



الجمهورية العربية السورية
جامعة دمشق
كلية الهندسة الزراعية
قسم وقاية النبات

تعريف مورفولوجي وجزئي لعزلات من الجنس *Fusarium* على القمح والكشف عن المورثات المسؤولة عن إنتاج السموم الفطرية

رسالة علمية أعدت لنيل درجة الدكتوراه في الهندسة الزراعية
اختصاص وقاية النبات

إعداد المهندسة

ليلى منيف زيدان

المشرف المشارك

الدكتورة دانا جودت

هيئة الطاقة الذرية السورية - دمشق
قسم البيولوجيا الجزيئية والتقانة الحيوية

المشرف الرئيسي

الأستاذ الدكتور وليد نفاع

جامعة دمشق - كلية الهندسة الزراعية
قسم وقاية النبات

1441 هـ / 2020 م

فهرس المحتويات

الرقم	الموضوع	الصفحة
	الملخص العربي	1
	مقدمة عامة	4
	أهمية البحث وأهدافه	7
	الفصل الأول	
1	الدراسة المرجعية	8
1.1	أهمية الجنس <i>Fusarium</i>	10
2.1	أهمية أنواع الجنس <i>Fusarium</i> على القمح	10
3.1	لمحة تاريخية عن تصنيف الجنس <i>Fusarium</i>	10
4.1	الصفات المورفولوجية لأنواع الجنس <i>Fusarium</i>	12
5.1	الصفات المورفولوجية لبعض الأقسام التي تنتمي إليها أنواع الجنس <i>Fusarium</i>	15
6.1	العوامل المؤثرة في انتشار أنواع الجنس <i>Fusarium</i>	19
7.1	دورة حياة الجنس <i>Fusarium</i>	20
8.1	أهم الأمراض التي تسببها أنواع الجنس <i>Fusarium</i> على القمح	22
1.8.1	لفحة البادرات <i>Fusarium seedling blight</i>	22
2.8.1	مرض تعفن الجذور الشائع Common root rot	22
3.8.1	مرض لفحة السنابل <i>Fusarium head blight</i>	23
9.1	أهم الأمراض الناتجة عن الجنس <i>Fusarium</i> على القمح في سورية ومسبباتها والسموم التي تفرزها	26
10.1	طرائق تعريف أنواع الجنس <i>Fusarium</i>	28
1.10.1	الطرائق المورفولوجية	28
1.1.10.1	الصفات الأولية	28
2.1.10.1	الصفات الثانوية	29
3.1.10.1	بعض الأوساط المستخدمة في تعريف أنواع الجنس <i>Fusarium</i>	29
3.1.10.11	وسط آجار الماء Water Agar (WA)	29
3.1.10.12	وسط آجار البطاطا والديكستروز (PDA) Potato Dextrose Agar	30
3.1.10.13	وسط آغار قطع أوراق القرنفل (CLA) Carnation Leaf Agar	30
2.10.1	الطرائق الجزيئية	31
11.1	السموم الفطرية Mycotoxins	32
1.11.1	أهم السموم الفيزيولوجية	33
1.1.11.1	سموم التريكوثيسينات Trichothecenes	33
2.1.11.1	الفومينوزينات Fumonisin	36

38	الزيرالينون Zearalenone	3.1.11.1
38	سمّ Moniliformin	4.1.11.1
38	سمّ Beauvericin	5.1.11.1
39	سمّ Fusaric acid	6.1.11.1
39	طرائق الكشف عن السموم الفطرية	2.11.1
	الفصل الثاني	
42	المواد والطرائق	2
43	جمع العينات	1.2
43	الفحص الظاهري للعينات	2.2
43	الأوساط المستخدمة في عزل وتعريف أنواع الجنس <i>Fusarium</i>	3.2
44	عزل أنواع الجنس <i>Fusarium</i> وتنقيتها	4.2
44	الحصول على مزرعة وحيدة البوغ Single spore colony	5.2
44	حساب سرعة النمو الخطية	6.2
44	تعريف أنواع الجنس <i>Fusarium</i> بالاعتماد على الصفات المورفولوجية	7.2
45	اختبار القدرة الإراضية لعزلات بعض أنواع الجنس <i>Fusarium</i>	8.2
46	الدراسة الجزيئية	9.2
46	مقارنة خمس طرائق لاستخلاص DNA من بعض أنواع الجنس <i>Fusarium</i>	1.9.2
47	استخلاص الدنا بطريقة الحبيبات الزجاجية باستخدام فينول/ كلوروفورم/ كحول الإيزوميل (PCI)	1.1.9.2
47	استخلاص الدنا بطريقة الحبيبات الزجاجية باستخدام فينول/ كلوروفورم/ كحول الإيزوميل المعدلة	2.1.9.2
48	استخلاص الدنا بطريقة الكيت Qiagen DNeasy Kit	3.1.9.2
48	استخلاص الدنا بطريقة LETS	4.1.9.2
48	استخلاص الدنا بطريقة CTAB	5.1.9.2
49	تقدير تركيز ونقاوة الدنا	2.9.2
49	اختبار نوعية DNA بالرحلان الكهربائي	3.9.2
49	الكشف عن أنواع الجنس <i>Fusarium</i> جزيئياً باستخدام بادئات متخصصة بالأنواع	4.9.2
52	الرحلان الكهربائي لنواتج PCR	1.4.9.2
52	الكشف عن أنواع الجنس <i>Fusarium</i> جزيئياً باستخدام طريقة Multiplex PCR	5.9.2
54	الرحلان الكهربائي لنواتج PCR	1.5.9.2
54	تحضير عينات DNA من أجل تحديد تتابع النوكليوتيدات في جهاز تحليل التسلسلات Sequencer	6.9.2
54	تضخيم منطقة DNA الهدف (مورثة <i>TEF1-α</i>)	1.6.9.2
55	الكشف عن المورثات المسؤولة عن التخليق الحيوي للسموم التي تنتجها بعض أنواع الجنس <i>Fusarium</i>	7.9.2

	الفصل الثالث	
57	النتائج والمناقشة	3
58	أعراض الإصابة بأنواع الجنس <i>Fusarium</i>	1.3
60	الدراسة المورفولوجية	2.3
60	الخصائص المجهرية	1.2.3
65	سرعة نمو العزلات على الوسط المغذي PDA	2.2.3
67	الوصف المورفولوجي لأنواع الجنس <i>Fusarium</i> المتحصل عليها في هذه الدراسة	3.3
100	الصعوبات خلال الدراسة المورفولوجية	4.3
101	اختبار القدرة الإمراضية لعزلات بعض أنواع الجنس <i>Fusarium</i>	5.3
105	الدراسة الجزيئية	6.3
105	مقارنة عدة طرائق لاستخلاص DNA من أنواع الجنس <i>Fusarium</i>	1.6.3
109	الكشف عن أنواع الجنس <i>Fusarium</i> باستخدام بادئات متخصصة Species-specific primers	2.6.3
112	الكشف عن أنواع الجنس <i>Fusarium</i> جزيئياً باستخدام طريقة Multiplex PCR	3.6.3
113	تضخيم جزئي لمورثة <i>TEF1-alpha</i> وتحديد تسلسلها النوكليوتيدي	4.6.3
128	الكشف عن المورثات المسؤولة عن التخليق الحيوي للسموم التي تنتجها بعض أنواع الجنس <i>Fusarium</i>	5.6.3
128	الكشف عن المورثة <i>TRI5</i> التي تشترك في عمليات التخليق الحيوي للتريكوثيسينات	1.5.6.3
130	الكشف عن المورثة <i>FUM5</i> التي تشترك في عمليات التخليق الحيوي للفيومينوزينات	2.5.6.3
131	الكشف عن المورثة <i>PKS4</i> التي تشترك في عمليات التخليق الحيوي للزيرالينون	3.5.6.3
136	الاستنتاجات	
137	المقترحات والتوصيات	
138	قائمة المراجع References	
158	الملخص الإنكليزي	

فهرس الجداول

الرقم	عنوان الجدول	الصفحة
	الفصل الأول	
1	مساحة (ألف هكتار) وإنتاج (ألف طن) وغلة (طن/ها) القمح حسب القطاعات خلال الفترة (2014 – 2018)	5
2	مساحة (هكتار) وإنتاج (طن) وغلة (كغ/هكتار) القمح حسب المحافظات لعام 2018 وتطورها على مستوى القطر خلال الفترة (2009 – 2018).	6
1.1	أسماء بعض المصنفين وعدد الأنواع التي تم تصنيفها من قبلهم	11
2.1	التوزيع الجغرافي لبعض أنواع الجنس <i>Fusarium</i> وعلاقتها بالمناخ	19
3.1	بعض أنواع الجنس <i>Fusarium</i> وبعض أنواع السموم الفطرية التي تفرزها	39
	الفصل الثاني	
1.2	تسلسل البادئات المتخصصة Species-specific primers المستخدمة في تعريف بعض أنواع الجنس <i>Fusarium</i> المتحصل عليها في هذه الدراسة	50
2.2	مكونات تفاعل PCR المستخدمة في تضخيم DNA الهدف و الحجم المأخوذ في كل تفاعل	51
3.2	البرنامج الحراري لتفاعل PCR المستخدم في تضخيم DNA الهدف للكشف عن النوع <i>F. culmorum</i>	51
4.2	البرنامج الحراري لتفاعل PCR المستخدم في تضخيم DNA الهدف للكشف عن النوعين <i>F. Verticillioidea</i> و <i>F. proliferatum</i>	51
5.2	البرنامج الحراري لتفاعل PCR المستخدم في تضخيم DNA الهدف للكشف عن الأنواع <i>F. subglutinans</i> ، <i>F. graminearum</i> ، <i>F. equiseti</i>	52
6.2	تسلسل البادئات المستخدمة في تعريف بعض أنواع الجنس <i>Fusarium</i> المتحصل عليها في هذه الدراسة باستخدام طريقة Multiplex PCR	53
7.2	مكونات تفاعل PCR المستخدمة في طريقة Multiplex PCR و الحجم المأخوذ من كل منها	54
8.2	البرنامج الحراري لتفاعل PCR المستخدم في تضخيم DNA في طريقة Multiplex PCR	54
9.2	التسلسل النووي تيدي للبادئات المستخدمة في تضخيم جزء من المورثة <i>TEF1-α</i>	54
10.2	البرنامج الحراري لتفاعل PCR المستخدم في تضخيم جزء من المورثة <i>TEF1-α</i>	55
11.2	البادئات المستخدمة في الكشف عن المورثات التي تشترك في التخليق الحيوي لبعض السموم المنتجة من قبل بعض أنواع الجنس <i>Fusarium</i> التي تصيب القمح	56
12.2	البرنامج الحراري لتفاعل PCR المستخدم في تضخيم المورثة <i>Tri5</i>	56
13.2	البرنامج الحراري لتفاعل PCR المستخدم في تضخيم المورثة <i>FUM5</i>	56
14.2	البرنامج الحراري لتفاعل PCR المستخدم في تضخيم المورثة <i>PKS4</i>	56

	الفصل الثالث	
63	أنواع الجنس <i>Fusarium</i> المُعرّفة في هذه الدراسة والأجزاء التي عزلت منها ومواقع جمعها	1.3
65	سرعة النمو الخطية لأنواع الجنس <i>Fusarium</i> المُعرّفة في هذه الدراسة عند تحضينها على وسط PDA في الظلام عند درجتَي الحرارة 25°س و 30°س لمدة ثلاثة أيام	2.3
95	أهم الصفات المُميزة لأنواع الجنس <i>Fusarium</i> المُعرّفة في هذه الدراسة	3.3
103	تقييم القدرة الإراضية لثمانية أنواع من الجنس <i>Fusarium</i> على بادرات صنف القمح القاسي دوما 1	4.3
107	كمية الدنا DNA المتحصل عليها من كل طريقة استخلاص كما تم قياسها بواسطة المطياف الضوئي.	5.3
116	العزلات المُعرّفة بالاعتماد على التتابع النوكليوتيدي، وأرقام دخولها والعزلات المشابهة في NCBI	6.3
135	أنواع المورثات المسؤولة عن إنتاج السموم الفطرية عند أنواع الفيوزاريوم المختبرة في هذه الدراسة	7.3

فهرس الأشكال

الرقم	عنوان الشكل	الصفحة
	الفصل الأول	
1	مساحة وإنتاج القمح في سورية بين عامي 2009 و2018	7
1.1	أشكال أبواغ الجنس <i>Fusarium</i>	13
2.1	الأبواغ الكلاميدية للجنس <i>Fusarium</i>	14
3.1	الطور الجنسي للجنس <i>Fusarium</i>	14
4.1	دورة حياة الفطر <i>F. graminearum</i>	21
5.1	أعراض الإصابة بمرض عفن الجذور الشائع على القمح	23
6.1	أعراض الإصابة بمرض لفحة السنابل على القمح	25
7.1	أعراض الإصابة بمرض لفحة السنابل على الحبوب وتشكل الثمار الزقية	25
8.1	الصيغة الكيميائية لبعض التريكوثيسينات	36
9.1	الصيغة الكيميائية لبعض سموم الفيو مينوزينات	37
10.1	الصيغة الكيميائية للزيرالينون وبعض مشتقاته	38
	الفصل الثاني	
1.2	سلم من 1 – 5 مستخدم لتقييم شدة الإصابة بعفن التاج والجذور المتسبب عن أنواع من الجنس <i>Fusarium</i>	46
	الفصل الثالث	
1.3	أعراض الإصابة بأنواع الجنس <i>Fusarium</i> على القمح	59
2.3	قطر مستعمرات عزلات أنواع مختلفة من الجنس <i>Fusarium</i> بعد ثلاثة أيام من التحضين عند درجتي حرارة 25°س و30°س	65
3.3	أشكال مختلفة لمستعمرات النوع <i>F. culmorum</i>	68
4.3	اختلاف حجم وتوزع الوسادات البوغية عند عزلات النوع <i>F. culmorum</i>	68
5.3	الصفات الشكلية للنوع <i>F. culmorum</i>	68
6.3	الصفات الشكلية للنوع <i>F. sambucinum</i>	70
7.3	الصفات الشكلية للنوع <i>F. pseudograminearum</i>	72
8.3	الصفات الشكلية للنوع <i>F. acuminatum</i>	73
9.3	الصفات الشكلية للنوع <i>F. semitectum</i>	74
10.3	الصفات الشكلية للنوع <i>F. verticillioides</i>	76
11.3	الصفات الشكلية للنوع <i>F. andiyazi</i>	77
12.3	الصفات الشكلية للنوع <i>F. proliferatum</i>	78
13.3	الصفات الشكلية للنوع <i>F. solani</i>	80
14.3	الصفات الشكلية للنوع <i>F. oxysporum</i>	81
15.3	الصفات الشكلية للنوع <i>F. compactum</i>	82
16.3	الصفات الشكلية للنوع <i>F. equiseti</i>	83

84	<i>F. sporotrichioides</i> الصفات الشكلية للنوع	17.3
86	<i>F. pseudocircinatum</i> الصفات الشكلية للنوع	18.3
87	<i>F. torulosum</i> الصفات الشكلية للنوع	19.3
88	<i>F. polyphialidicum</i> الصفات الشكلية للنوع	20.3
89	<i>F. brachygibbosum</i> الصفات الشكلية للنوع	21.3
91	<i>F. chlamydosporum</i> الصفات الشكلية للنوع	22.3
92	<i>F. redolens</i> الصفات الشكلية للنوع	23.3
94	<i>F. flocciferum</i> الصفات الشكلية للنوع	24.3
100	مستعمرات مصابة بالأكاروسات	25.3
100	مستعمرات متدهورة من النوع الثاني Mycelial type وأبواغ كونيدية كبيرة Macroconidia مشوهة من مستعمرات متدهورة من النوع الأول Pionnotal .type	26.3
104	تقييم القدرة الإراضية لعزلات تنتمي لثمانية أنواع مختلفة من الجنس <i>Fusarium</i> تبعاً لدرجة تلون الجذور والسلامية التاجية على بادرات قمح من الصنف القاسي دوما 1 بعد إجراء العدوى الاصطناعية	27.3
108	هلامة أغاروز 0.8 % مضافاً إليها صبغة بروميد الإيثيديوم لترحيل الدنا الناتج من كل طريقة من طرائق الاستخلاص الخمس لثلاثة أنواع من الجنس <i>Fusarium</i>	28.3
109	الكشف عن النوع <i>F. culmorum</i> باستخدام زوج البادئات Fc01F/Fc01R على هلامة الأغاروز 1 %	29.3
110	الكشف عن النوع <i>F. proliferatum</i> باستخدام زوج البادئات PRO1/PRO2 على هلامة الأغاروز 1	30.3
110	الكشف عن النوع <i>F. equiseti</i> باستخدام زوج البادئات FEF/FER على هلامة الأغاروز 1 %	31.3
114	تعريف بعض العزلات جزيئياً باستخدام طريقة الـ Multiplex PCR	32.3
115	الحزم الناتجة عن تضخيم مورثة <i>TEF1-α</i> على هلامة الأغاروز 1 % لبعض العزلات المختارة لإجراء التسلسل النوكليوتيدي	33.3
116	التسلسل النوكليوتيدي وجزء من كروماتوغرام التسلسل للعزلة <i>F. oxysporum</i> (MN883032)FS97	34.3
117	التسلسل النوكليوتيدي وجزء من كروماتوغرام التسلسل للعزلة <i>F. culmorum</i> (MN807691) FL20	35.3
117	التسلسل النوكليوتيدي وجزء من كروماتوغرام التسلسل للعزلة <i>F. solani</i> FT23 (MN890013)	36.3
117	التسلسل النوكليوتيدي وجزء من كروماتوغرام التسلسل للعزلة <i>F. incarnatum</i> (MN883027) (syn : <i>F. semitectum</i>) FT26	37.3
118	التسلسل النوكليوتيدي وجزء من كروماتوغرام التسلسل للعزلة <i>F. proliferatum</i> (MN865124) FT47	38.3
118	التسلسل النوكليوتيدي وجزء من كروماتوغرام التسلسل للعزلة <i>F. verticillioides</i> (MN807690) FT52	39.3
118	التسلسل النوكليوتيدي وجزء من كروماتوغرام التسلسل للعزلة <i>F. andiyazi</i> (MN867480) FT67	40.3

119	التسلسل النوكليوتيدي وجزء من كروماتوغرام التسلسل للعزلة <i>F. oxysporum</i> FH68 (MN867481)	41.3
119	التسلسل النوكليوتيدي وجزء من كروماتوغرام التسلسل للعزلة <i>F. proliferatum</i> FT79 (MN865124)	42.3
119	التسلسل النوكليوتيدي وجزء من كروماتوغرام التسلسل للعزلة <i>F. torulosum</i> FH3 (MN890014)	43.3
120	التسلسل النوكليوتيدي وجزء من كروماتوغرام التسلسل للعزلة <i>F. brachygibbosum</i> FS88 (MN883029)	44.3
120	التسلسل النوكليوتيدي وجزء من كروماتوغرام التسلسل للعزلة <i>F. chlamydosporum</i> FS89 (MN883030)	45.3
120	التسلسل النوكليوتيدي وجزء من كروماتوغرام التسلسل للعزلة <i>F. flocciferum</i> FS96 (MN883031)	46.3
122	محاذاة لجزء من التسلسل النوكليوتيدي للمورثة <i>TEF1-α</i> لثلاث عزلات تتبع ثلاثة أنواع من الجنس <i>Fusarium</i> تنتمي لقسم <i>Liseola</i>	47.3
126	شجرة القرابة لعزلات 11 نوعاً من الجنس <i>Fusarium</i> متحصل عليها في هذه الدراسة مقارنة مع عزلات مرجعية مشابهة	48.3
127	محاذاة Alignment للتسلسلات النوكليوتيدية لجزء من المورثة <i>TEF1-α</i> لـ 13 عزلة تابعة للجنس <i>Fusarium</i> متحصل عليها في هذه الدراسة	49.3
128	الكشف عن المورثة <i>TRI5</i> المسؤولة عن تخليق التريكوثيسينات عند عزلات النوع <i>F. culmorum</i> باستخدام زوج البادئات Tri5F/Tri5R على هلامية الأغاروز 1%.	50.3
129	الكشف عن المورثة <i>TRI5</i> المسؤولة عن تخليق التريكوثيسينات عند بعض أنواع الفيوزاريوم على هلامية الأغاروز 1%.	51.3
130	الكشف عن المورثة <i>FUM5</i> المسؤولة عن تخليق الفيومينوزينات عند بعض أنواع الفيوزاريوم على هلامية الأغاروز 1%.	52.3
132	الكشف عن المورثة <i>PKS4</i> المسؤولة عن تخليق الزيرالينون عند بعض عزلات النوع <i>F. culmorum</i> باستخدام زوج البادئات F1/R1 على هلامية الأغاروز 1%.	53.3
132	الكشف عن المورثة <i>PKS4</i> المسؤولة عن تخليق الزيرالينون باستخدام زوج البادئات F1/R1 على هلامية الأغاروز 1%.	54.3
133	الكشف عن المورثة <i>PKS4</i> المسؤولة عن تخليق الزيرالينون باستخدام زوج البادئات F1/R1 على هلامية الأغاروز 1%.	55.3
133	الكشف عن المورثة <i>PKS4</i> المسؤولة عن تخليق الزيرالينون باستخدام زوج البادئات F1/R1، والمورثة <i>TRI5</i> المسؤولة عن تخليق التريكوثيسينات باستخدام زوج البادئات Tri5F/Tri5R على هلامية الأغاروز 1%.	56.3

الملخص

تُعدّ أمراض تعفّن الجذور والتاج ولفحة السنابل المتسببة عن أنواع من الجنس *Fusarium* من أهم الأمراض الفطرية المحددة لإنتاج القمح، وعلى الرغم من كثرة الدراسات المتعلقة بهذين المرضين في العالم، إلا أنها مازالت قليلة نسبياً في سورية، لذلك كان الهدف من هذه الدراسة تعريف بعض عزلات الجنس *Fusarium* المرافقة لجذور وتاج وسنابل نبات القمح اعتماداً على الصفات المورفولوجية على الوسطين المغذيين آغار البطاطا والديكستروز (PDA) Potato Dextrose Agar وآغار قطع أوراق القرنفل (CLA) Carnation Leaf Piece Agar، وتأكيد التصنيف المورفولوجي باستخدام بعض الطرائق الجزيئية، والكشف عن المورثات المشاركة في التخليق الحيوي لبعض السموم التي تفرزها بعض أنواع الجنس *Fusarium*.

تم الحصول على 105 عزلات تنتمي للجنس *Fusarium* من مناطق مختلفة لزراعة القمح في سورية (طرطوس، اللاذقية، حماه، السويداء)، وقد أمكن من خلال الطرائق المعتمدة في هذه الدراسة التوصل لتوصيف مورفولوجي لعشرين نوعاً من الجنس *Fusarium*: *F. pseudograminearum*، *F. culmorum*، *F. sambucinum*، *F. compactum*، *F. acuminatum*، *F. solani*، *F. semitectum*، *F. pseudocircinatum*، *F. oxysporum*، *F. proliferatum*، *F. verticillioide*، *F. equiseti*، *F. andiyazi* و *F. torulosum*، *F. polyphialidicum*، *F. brachygibbosum*، *F. chlamydosporum*، *F. flocciferum*، *F. redolens*. تباينت هذه الأنواع في ترددها، فقد كان النوع *F. culmorum* أكثرها تردداً (29.52%)، تلاه النوع *F. proliferatum* (12.38%)، بينما تراوح تردد الأنواع الأخرى بين 0.95 و 8.57%.

اختُبرت القدرة الإمراضية لـ 20 عزلة تتبع لثمانية أنواع من الجنس *Fusarium* على بادرات صنف القمح القاسي "دوما 1" تحت ظروف المختبر والعدوى الاصطناعية. أبدى النوع *F. culmorum* أعلى قدرة إمراضية، إذ بلغ متوسط شدة الإصابة للعزلات المختبرة 4.45، وذلك تبعاً لسلم التقويم الخماسي المستخدم في هذه الدراسة، كما أبدى النوع *F. pseudograminearum* قدرة إمراضية عالية أيضاً، فقد بلغ متوسط شدة الإصابة (4.2) وبفروق غير معنوية مع النوع السابق، تلاهما النوع *F. proliferatum* الذي اعتبر متوسط القدرة الإمراضية، حيث بلغت شدة الإصابة (1.27)، بينما كانت الأنواع *F. verticillioide* و *F. equiseti* و *F. oxysporum* و *F. andiyazi* ضعيفة القدرة الإمراضية، حيث بلغت شدة الإصابة 0.9 و 0.87 و 0.4 و 0.7 على التوالي. بينما لم يكن النوع *F. semitectum* ممرضاً تحت ظروف التجربة الحالية.

ونظراً لأن معظم الدراسات الحالية تتجه إلى استخدام تقانات البيولوجيا الجزيئية، وبشكل خاص التفاعل المتسلسل للبوليميراز PCR، والذي يتطلب طريقة فعّالة وسهلة لاستخلاص DNA، لذلك فقد تمت مقارنة خمس طرائق مختلفة لاستخلاص DNA من ثلاثة أنواع من الجنس فيوزاريوم للحصول على كمية كافية ونوعية جيدة من DNA الضرورية لعملية التضخيم، وباعتماد على النتائج، تم ترتيب طرائق الاستخلاص وفق التالي: حبيبات زجاجية/ PCI المعدلة < CTAB < حبيبات زجاجية/ PCI < كيت تجاري Qiagen DNeasy Kit < LETS، وقد تبين من خلال هذه الدراسة أن طريقة الحبيبات الزجاجية / PCI المعدلة يمكن أن تكون طريقة مناسبة لاستخلاص DNA من أنواع الجنس فيوزاريوم بشكل عام.

تم تأكيد التعريف المورفولوجي لـ 64 عزلة من العزلات السابقة باستخدام الطرائق الجزيئية، حيث تم تعريف 29 عزلة تابعة للنوع *F. culmorum* باستخدام زوج البادئات المتخصصة Fc01F/Fc01R، و5 عزلات تابعة للنوع *F. proliferatum* باستخدام زوج البادئات PRO1/PRO2، و4 عزلات تابعة للنوع *F. equiseti* باستخدام زوج البادئات FEF/FER، ولم تظهر أية حزمة عند استخدام زوج البادئات Fg16NF/Fg16NR، مما يؤكد عدم وجود النوع *F. graminearum* بين العزلات المدروسة. وقد أمكن أيضاً باستخدام طريقة multiplex PCR تعريف سبعة أنواع من الجنس *Fusarium* في تفاعل واحد، وهذا يشير لأهمية هذه الطريقة في اختصار الوقت والجهد والتكلفة.

كما تم بواسطة التسلسل النيوكليوتيدي لمورثة *TEF1-α* تعريف 13 عزلة تابعة لأحد عشر نوعاً مختلفاً: *F. culmorum*، *F. semitectum*، *F. solani*، *F. proliferatum*، *F. verticillioides*، *F. oxysporum*، *F. chlamydosporum*، *F. torulosum*، *F. brachygibbosum*، *F. andiyazi* و *flocciferum*. وقد أودعت تسلسلات هذه العزلات في قاعدة بيانات المركز الوطني للمعلومات الحيوية NCBI، وقد أُعطي كل تسلسل رقم دخول Accession number. وتجدر الإشارة هنا إلى أن تعريف الأنواع الأربعة الأخيرة لم يكن ممكناً بالاعتماد على الطرائق المورفولوجية فقط لتشابه صفاتها المورفولوجية مع أنواع أخرى أو لقلّة الدراسات المورفولوجية المتعلقة ببعضها، لذلك تم تصنيفها بواسطة التسلسل النيوكليوتيدي لمورثة *TEF1-α*.

استخدمت بادئات متخصصة للكشف عن بعض المورثات الضرورية لعملية التخليق الحيوي لأهم 3 مجموعات من السموم الفطرية (التريكوثيسينات والفيومينوزينات والزيرالينون) التي تفرزها أنواع الجنس *Fusarium*، وقد أظهرت النتائج امتلاك العزلات المختبرة للأنواع *F. culmorum* و *F. pseudograminearum* و *F. semitectum* للمورثتين *TRI5* و *PKS4* اللتين تشتركان في عمليات التخليق الحيوي لسموم التريكوثيسينات والزيرالينون على التوالي، وامتلاك العزلات المختبرة

للنوع *F. verticillioides* للمورثة *FUM5* التي تشترك في عمليات التخليق الحيوي لسموم الفيومينوزينات، وامتلاك العزلات المختبرة من النوعين *F. oxysporum* و *F. equiseti* للمورثة *PKS4* فقط، أمّا العزلات الأخرى، فلم تعطِ أيّة حزمة مما يشير إلى عدم امتلاكها لتلك المورثات، وبالتالي عدم قدرتها على إنتاج هذه السموم.

أمكن بهذه الدراسة وضع مفتاح تصنيفي للأنواع المدروسة، والذي يمكن أن يُعتمد كأساس تصنيفي مفيد للكثير من المهتمين بتصنيف أنواع الفيوزاريوم. وحسب معلوماتنا فإن هذه الدراسة تُعدّ التسجيل الأول للنوع *F. andiyazi* كمسبب لعفن التاج على القمح في العالم، كما تُعدّ التسجيل الأول لسبعة أنواع: *F. chlamydosporum*، *F. pseudocircinatum*، *F. polyphialidicum*، *F.*، *brachygibbosum*، *F. torulosum*، *F. flocciferum*، *F. redolens* على القمح في سورية.

مقدمة عامة General Introduction

يُعدّ القمح أحد أهم المحاصيل المزروعة، ويُشكّل الغذاء الرئيس لأكثر من ثلث سكان العالم، ومن أوائل المحاصيل الحقلية التي تمّ استئناسها وزراعتها في تاريخ البشرية، حيث بدأ الإنسان باستزراع نبات القمح منذ أكثر من 10000 سنة لتلبية احتياجاته، وكونه مادة ضرورية لتغذية الإنسان، فقد ترافق تطوره مع تطور الإنسان، ويعود منشؤه إلى منطقة الهلال الخصيب، ويزرع الآن في جميع أنحاء العالم (Lev-Yadun *et al.*, 2000; Charmet, 2011; Haggag, 2013).

يحتل محصول القمح مكانة مميزة في قائمة المحاصيل الحبية الغذائية في العالم، حيث يعدّ الخبز الغذاء الرئيس لأكثر من ثلاثة أرباع سكان الكرة الأرضية، ويعتمد استقرار أي بلد وأمنه الغذائي على كفاءته في إنتاج وتخزين هذا المحصول الاستراتيجي. هذا ويشكل القمح مادة أولية للعديد من الصناعات الغذائية مثل الطحين والسميد والبرغل والمعكرونة والنشاء وغيرها (ديب وسوسي، 2004).

يعدّ محصول القمح مهماً جداً بالنسبة للجمهورية العربية السورية، حيث يستخدم في تغذية الإنسان، وفي تركيب العلائق العلفية (ديب وسوسي، 2004). وتنتج سورية القمح القاسي والطري في الأراضي المروية والبعليّة، ومعظم الأقماع المزروعة بعلاً هي أصناف قاسية، فقد سجّل القمح القاسي حوالي 60 % من إجمالي الإنتاج، في حين أنّ الأقماع الطرية شكّلت 40 % (سعد الدين وعطية، 2009). وقد أكّد ديب وسوسي (2004) وجود تزايد في إنتاج القمح في سورية مع مرور الزمن، وبمعدّل وسطي قدره 71.8 ألف طناً سنوياً خلال الفترة من عام 1960 حتى 2000، ففي عام 2000 بلغت المساحة المزروعة بالقمح 1679 ألف هكتاراً مع قفزة نوعية كبيرة بالإنتاج، وذلك نتيجة لاستصلاح الأراضي وإقامة السدود وتوافر البذار الجيد والمعقم. ويلاحظ من الجدول (1) تراجع المساحة المزروعة بالقمح الطري بين عامي 2014 و2018، بينما بقيت المساحة المزروعة بالقمح القاسي ثابتة تقريباً خلال هذه الفترة (المجموعة الإحصائية الزراعية السورية، 2018).

تتأثر زراعة القمح بمجموعة من المتغيرات أهمها تلك المتعلقة بالظروف البيئية والظروف الأمنية، ويبين الشكل (1) والجدول (2) مساحة وإنتاج القمح المروي والبعلي في سورية تبعاً للمحافظات التي يزرع فيها وذلك بين عامي 2009 - 2018.

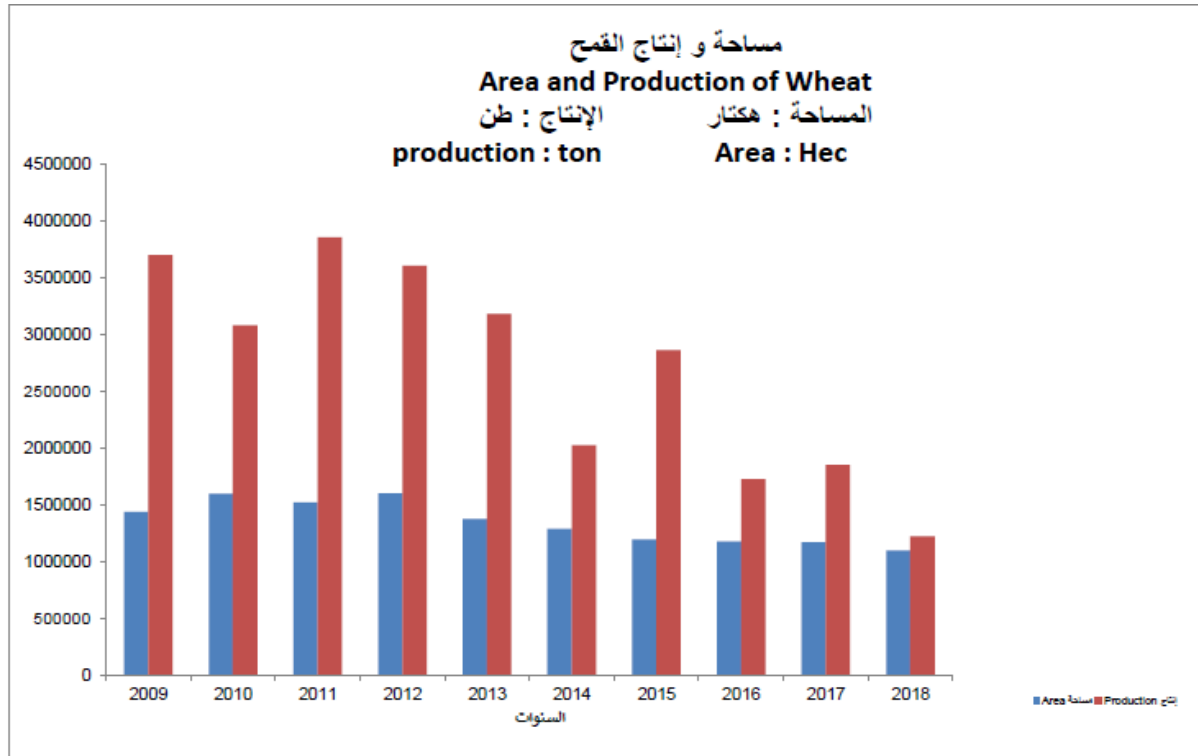
يُصاب القمح بالعديد من الآفات والأمراض النباتية التي تسبب خسائر اقتصادية كبيرة منها الفطريات والبكتيريا والفيروسات والنيماطودا وغيرها (Agrios, 2005; Haggag, 2013)، ومن أهم الأمراض الفطرية التي يتعرض القمح للإصابة بها مرض عفن التاج والجذور ولفحة السنابل والبياض الدقيقي والصدأ والتفحم وغيرها (Haggag, 2013)، وتعد أنواع الجنس *Fusarium* من أهم الفطريات المسببة لعفن التاج والجذور ولفحة السنابل على القمح.

الجدول 1: مساحة (ألف هكتار) وإنتاج (ألف طن) و غلة (طن/ها) القمح حسب القطاعات خلال الفترة (2014 – 2018) (المجموعة الإحصائية السورية، 2018)

Crops	Year	Yield			الثقة			Production			إنتاج			Area			مساحة		السنوات	اسم المحصول
		المجموع	الخاص	التعاوني	المجموع	الخاص	التعاوني	المجموع	الخاص	التعاوني	المجموع	الخاص	التعاوني	المجموع	الخاص	التعاوني	Cooperative	Private		
Soft Wheat	2014	1.5	1.5	1.5	1071	857	214	710	568	142	2014	2014	2014	710	568	142	2014	2014	القمح الطري	
	2015	2.5	2.6	2.4	1401	922	479	556	356	200	2015	2015	2015	556	356	200	2015	2015		
	2016	1.4	1.4	1.3	585	385	200	424	271	153	2016	2016	2016	424	271	153	2016	2016		
	2017	1.4	1.4	1.3	696	458	238	496	317	179	2017	2017	2017	496	317	179	2017	2017		
	2018	1.0	1.0	0.9	468	308	160	483	309	174	2018	2018	2018	483	309	174	2018	2018		
Durum Wheat	2014	1.6	1.6	1.6	953	572	381	578	347	231	2014	2014	2014	578	347	231	2014	2014	القمح القاسي	
	2015	2.3	2.4	2.2	1460	814	646	641	346	295	2015	2015	2015	641	346	295	2015	2015		
	2016	1.5	1.6	1.5	1141	636	505	755	407	348	2016	2016	2016	755	407	348	2016	2016		
	2017	1.7	1.8	1.6	1155	644	511	674	363	311	2017	2017	2017	674	363	311	2017	2017		
	2018	1.2	1.3	1.2	755	421	334	614	331	283	2018	2018	2018	614	331	283	2018	2018		
Total Wheat	2014	1.6	1.6	2	2024	1429	595	1288	915	373	2014	2014	2014	1288	915	373	2014	2014	إجمالي القمح	
	2015	2.4	2.5	2	2861	1736	1125	1197	702	495	2015	2015	2015	1197	702	495	2015	2015		
	2016	1.5	1.5	1.4	1726	1021	705	1179	678	501	2016	2016	2016	1179	678	501	2016	2016		
	2017	1.6	1.6	1.5	1851	1102	749	1170	680	490	2017	2017	2017	1170	680	490	2017	2017		
	2018	1.1	1.1	1.1	1223	729	494	1097	640	457	2018	2018	2018	1097	640	457	2018	2018		
Barley	2014	0.5	0.4	0.6	600	387	213	1221	888	333	2014	2014	2014	1221	888	333	2014	2014	الشعير	
	2015	1.4	1.5	1.4	1615	1126	489	1120	763	357	2015	2015	2015	1120	763	357	2015	2015		
	2016	0.8	0.8	0.7	954	665	289	1244	847	397	2016	2016	2016	1244	847	397	2016	2016		
	2017	0.8	0.9	0.8	990	690	300	1181	804	377	2017	2017	2017	1181	804	377	2017	2017		
	2018	0.3	0.4	0.3	408	284	124	1187	810	377	2018	2018	2018	1187	810	377	2018	2018		
Lentils	2014	0.7	0.7	0.7	75	51	24	114	78	36	2014	2014	2014	114	78	36	2014	2014	العدس	
	2015	1	1	1	99	56	43	98	54	44	2015	2015	2015	98	54	44	2015	2015		
	2016	1	1	1	113	64	49	123	68	55	2016	2016	2016	123	68	55	2016	2016		
	2017	1	1	1	138	78	60	135	75	60	2017	2017	2017	135	75	60	2017	2017		
	2018	1	1	1	74	42	32	125	70	55	2018	2018	2018	125	70	55	2018	2018		

الجدول 2: مساحة (هكتار) وإنتاج (طن) و غلة (كغ/هكتار) القمح حسب المحافظات لعام 2018 وتطورها على مستوى القطر خلال الفترة (2009 – 2018) (المجموعة الإحصائية السورية، 2018)

Item	المجموع Total			بعل Non- Irrigated			سقي Irrigated			البيان
	غلة Yield	إنتاج Production	مساحة Area	غلة Yield	إنتاج Production	مساحة Area	غلة Yield	إنتاج Production	مساحة Area	
2009	2575	3701784	1437375	851	664202	780448	4624	3037582	656917	2009
2010	1928	3083082	1599108	928	792644	854276	3075	2290438	744832	2010
2011	2537	3858331	1521038	808	611732	757444	4252	3246599	763594	2011
2012	2252	3609096	1602814	707	554011	784031	3731	3055085	818783	2012
2013	2316	3182111	1374077	1472	995323	676004	3133	2186788	698073	2013
2014	1572	2024332	1287885	649	442445	681885	2610	1581888	606000	2014
2015	2390	2861628	1197200	1378	851391	617691	3469	2010237	579509	2015
2016	1465	1726247	1178506	746	512261	686459	2467	1213986	492047	2016
2017	1582	1850740	1169911	1027	730570	711415	2443	1120170	458496	2017
2018	1115	1222988	1096818	301	204724	680803	2448	1018264	416015	2018
Sweida	297	8105	27328	275	7453	27113	3033	652	215	السويداء
Dar'a	491	27154	55342	261	12843	49128	2303	14311	6214	درعا
Quneitra	1104	870	788	917	500	545	1523	370	243	القيسرية
Damascus	1957	16473	8417	179	238	1326	2290	16235	7091	ريف دمشق
Homs	670	22866	34105	346	9062	26176	1741	13804	7929	حماص
Hama	2159	50337	23310	1151	11173	9708	2879	39164	13602	حماص
Chab	2145	105842	49338	665	1888	2837	2236	103954	46501	الغسب
Idleb	1104	75051	68000	770	33500	43500	1696	41551	24500	الغسب
Tartous	1523	17115	11240	935	6933	7416	2663	10182	3824	طرطوس
Lattakia	1815	5275	2907	1815	5275	2907	-	-	-	اللاذقية
Aleppo	1145	313323	273543	531	87466	164647	2074	225857	108896	حلب
Al-Raqqa	2371	249000	105000	360	9000	25000	3000	240000	80000	الرقة
Dnir-Ezzor	3043	76087	25000	-	-	-	3043	76087	25000	دير الزور
Al-Hassake	619	255490	412500	61	19393	320500	2566	236097	92000	الحسكة



الشكل 1: مساحة وإنتاج القمح في سورية بين عامي 2009- 2018 (المجموعة الإحصائية الزراعية السنوية، 2018)

أهمية البحث وأهدافه:

نظراً للأهمية الاقتصادية الكبيرة التي يتمتع بها محصول القمح في سورية، ولأهمية الأمراض المتسببة عن الإصابة بأنواع الجنس *Fusarium*، ولقلة الدراسات الجزيئية التي تتناول التعريف الدقيق لأنواع الجنس *Fusarium* التي تصيب القمح في سورية، حيث إنّ الحبوب عرضة للتلوث بهذه الفطريات وما يتبعه من إفراز للسموم الفطرية، فإنّ الكشف عن الأنواع أو السلالات التي تملك مورثات إنتاج السموم يُعدّ أمراً مهماً في مجال الأمن الغذائي، ولذلك فقد كان الهدف من هذه الدراسة:

- عزل أنواع الجنس *Fusarium* التي تصيب القمح في بعض المناطق السورية.
- تعريف أنواع الجنس *Fusarium* بالاعتماد على الصفات المورفولوجية وعلى التقانات الجزيئية.
- الكشف عن المورثات المسؤولة عن المسار التصنيعي لبعض السموم الفطرية التي تنتجها بعض أنواع الجنس *Fusarium*.

الفصل الأول

الدراسة المرجعية Literature review

الدراسة المرجعية Literature review

يُعدُّ الجنس *Fusarium* من مجموعة الفطريات الهامة والمثيرة للاهتمام، ويعود ذلك لتنوّعه وعالميته وكونه مسؤول عن عدد كبير من الأمراض النباتية، وأعفان التخزين، وعن حالات تسمم، وأمراض تصيب الإنسان والحيوان (Nelson et al., 1983; Nelson et al., 1994; Summerell et al., 2003). تعيش أنواع هذا الجنس بشكل شائع في التربة كمتربسات، إذ تنمو على بقايا النباتات وعلى المواد العضوية الأخرى، وتعدّ بعض أنواعه متطفلات اختيارية يمكن أن تسبب أمراضاً للنبات على المجموع الخضري والجذري عند توافر الظروف المناسبة (Liddell, 1991; Leslie and Summerell, 2006). يسبب هذا الفطر عدداً كبيراً من الأمراض النباتية من أهمها عفن التاج والجذور ولفحة السنابل وأمراض الذبول (Summerell et al., 2003).

يضم الجنس *Fusarium* أكثر من 70 نوعاً منتشراً في مناطق مختلفة من العالم، ويُعرف للبعض منها أطوار جنسية، إذ يتبع الطور الجنسي لأنواع الفيوزاريوم للجنس *Gibberella* أو *Haematonectria* أو *Albonectria*، ولكن بعض الأنواع مثل *F. culmorum* لم يعرف لها طور جنسي بعد (Leslie and Summerell, 2006). وبعد التغييرات التي أُجريت تبعاً للدليل الدولي للتسمية International Code of Nomenclature (ICN) بالنسبة للطحالب والفطريات والنباتات عام 2011، فإنّ التسمية الثنائية للطور الجنسي واللاجنسي لم تُعدّ تُستخدم، وتمّ توحيدها باستخدام الاسم اللاجنسي *Fusarium* بشكل رسمي بدلاً من أسماء الأطوار الجنسية (Geiser et al., 2013)، وحسب التصنيف الحالي ينتمي الجنس *Fusarium* إلى:

مملكة Fungi :kingdom

شعبة Ascomycota : phylum

تحت شعبة Pezizomycotina :subphylum

صف Sordariomycetes : class

تحت صف Hypocreomycetidae :subclass

رتبة Hypocreales : order

فصيلة Nectriaceae : family

جنس *Fusarium*: genus

(<http://www.catalogueoflife.org>)

1.1 - أهمية الجنس *Fusarium*:

ينتشر الفطر *Fusarium* في جميع أنحاء العالم، وأينما وُجد يُعدُّ مسؤولاً عن خسائر اقتصادية كبيرة ناتجة عن انخفاض الغلة، أو عن انخفاض في جودة الحبوب (Leslie and Summerell, 2006). يضم هذا الجنس عدداً كبيراً من الأنواع تسبب العديد من الأمراض النباتية على محاصيل مختلفة منها القمح، وفي نفس الوقت يمكن أن يكون ممرضاً للإنسان والحيوان، فالعديد من أنواعه قادرة على إعطاء نواتج استقلاب ثانوية سامة تعرف بالسموم الفطرية Mycotoxins، والتي تشكّل خطراً على صحة الإنسان والحيوان عند التغذية على حبوب ملوثة بها (Summerell et al, 2003)، وفي مسح أُجري من قبل مجموعة عالمية لإحصائي أمراض النبات احتلّ النوعان *F. oxysporum* و *F. graminearum* المرتبتين الرابعة والخامسة على التوالي في قائمة عشرة ممرضات فطرية من حيث الأهمية الاقتصادية والعلمية (Dean et al., 2012).

2.1 - أهمية أنواع الجنس *Fusarium* على القمح:

أصبح مرض لفحة السنابل ومرض عفن التاج المتسببين عن الإصابة بأنواع من الجنس *Fusarium* من الأمراض المستوطنة في مناطق زراعة القمح في العالم، حيث تؤثر الإصابة في كمية وجودة الحبوب المنتجة (Goswami and Kistler, 2004; Matny, 2015)، إذ يسببان فقداً في الغلة قد يصل لأكثر من 61 % ناتجاً عن عقم الأزهار وتشكل سنابل فارغة أو ممتلئة بشكل جزئي، وتكون الحبوب الناتجة ذات أوزان منخفضة، وغالباً تتلوث بالسموم الفطرية وما يليه من تلوث المنتجات المصنعة من تلك الحبوب، كما يؤدي التغذية على طعام أو علف ملوث بها إلى أمراض خطيرة للإنسان والحيوان كالسرطان والعقم والإجهاض وغيرها (Matny, 2015).

تُقدّر الخسائر الناجمة عن الإصابة بمرض عفن التاج في أستراليا بـ 80 مليون دولار سنوياً (Murray and Brennan, 2009)، وفي الولايات المتحدة الأمريكية قُدّرت الخسائر بين عامي 1998 - 2000 نتيجة الإصابة بمرض لفحة السنابل بـ 2.7 بليون دولار أمريكي من خلال الفقد في الغلة والنوعية الرديئة للحبوب الناتجة (Goswami and Kistler, 2004).

3.1 - لمحة تاريخية عن تصنيف الجنس *Fusarium*:

ينتمي الجنس *Fusarium* إلى صف الفطريات الزقية Ascomycetes، ويعود تعريفه إلى أكثر من مئتي عام، وقد سُمّي لأول مرة من قبل Link عام 1809 باسم *Fusisporium* (Summerell and Leslie, 2011).

يُعدُّ تصنيف أنواع *Fusarium* من الأمور المعقدة بسبب تعدّد أنظمة التصنيف المعتمدة من قبل الباحثين في العالم (Leslie and Summerell, 2006)، حيث مرّ هذا التصنيف بمراحل عديدة بين إضافة واختزال أنواع معينة، وقد تراوح عدد الأنواع الموصوفة بين 9 و 1000 نوعاً تقريباً حسب نظام التصنيف المستخدم، ويبيّن الجدول (1-1) أسماء بعض المصنّفين وعدد الأنواع التي تمّ تصنيفها من قبلهم (Nelson et al., 1983; Nelson, 1991; Leslie and Summerell, 2006).

الجدول 1-1: أسماء بعض المصنّفين وعدد الأنواع التي تمّ تصنيفها من قبلهم (Nelson et al., 1983; Nelson, 1991; Leslie and Summerell, 2006).

السنة	نظام التصنيف	عدد الأنواع
1809	وصف الجنس من قبل Link	
1809-1935	أنواع غير موصوفة بدقة	أكثر من 1000 نوع
1935	Wollenweber and Reinking	65 نوعاً، 16 قسماً
1940-1945	Snyder and Hansen	9
1971	Booth	44
1982	Gerlach and Nirenberg,	78
1983	Nelson et al	30
1990's	Molecular phylogenetics	عدة مئات من الأنواع
2006	Leslie and Summerell	70

يُعدُّ التصنيف المقترح من قبل Wollenweber و Reinking عام 1935 الأكثر قبولا، وقد قاما بوضع أنواع الجنس *Fusarium* في 16 قسماً هي: *Macroconia*، *Eupionnotes*، *Sporotrichiella*، *Arachnites*، *Pseudomicrocera*، *Submicrocera*، *Spicarioides*، *Martiella*، *Elegans*، *Lateritium*، *Discolor*، *Gibbosum*، *Roseum*، *Arthrosporiella*، *Liseola*، *Ventricosum* (Nelson, 1991; Leslie and Summerell, 2006).

وتحتوي الأقسام السابقة على 65 نوعاً Species و 55 صنفاً Varieties، و 22 شكلاً Forms، والأساس الذي اعتمد عليه هذا التصنيف هو بعض الصفات المورفولوجية للأبواغ الكونيدية الكبيرة والصغيرة والأبواغ الكلاميدية والأجسام الحجرية (Nelson, 1991; Leslie and Summerell, 2006).

4.1 - الصفات المورفولوجية لأبواغ الجنس *Fusarium*:

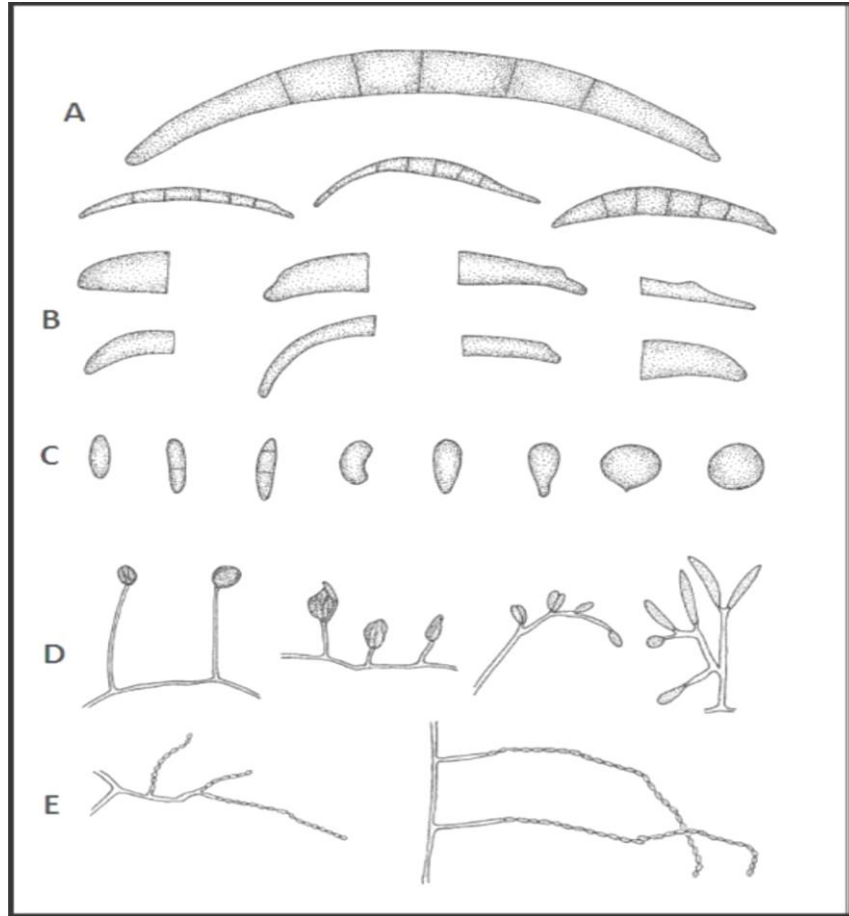
تنتج أنواع الجنس *Fusarium* بشكل عام ثلاثة أشكال من الأبواغ هي أبواغ كونيدية كبيرة *Macroconidia*، أبواغ كونيدية صغيرة *Microconidia*، وأبواغ كلاميدية *Chlamydospores* (Nelson et al., 1983; Nelson et al., 1994; Leslie and Summerell, 2006).

- **الأبواغ الكونيدية الكبيرة *Macroconidia***: تتشكل هذه الأبواغ ضمن وسادة بوغية *Sporodochium* وتكون مقسمة بحواجز عرضية يختلف عددها من نوع لآخر
- **الأبواغ الكونيدية الصغيرة *Microconidia***: لهذه الأبواغ أشكال عديدة (الشكل 1-1)، وتتكون من خلية واحدة أو خليتين، وتتشكل على الميسيليوم الهوائي من خلايا مولدة للأبواغ *Conidiogenous Cells* وحيدة الفيااليد *Monophialides* أو متعددة الفيااليدات *Polyphialides*.
- **الأبواغ الكلاميدية *Chlamydospores***: وهي أبواغ ذات جدر سميكة تتشكل عند بعض أنواع الجنس *Fusarium*، وتكون مفردة أو مزدوجة أو تتوضع في سلاسل أو عناقيد (الشكل 2-1) (Leslie and Summerell, 2006)، ويحتاج تكوّن هذه الأبواغ في ظروف المخبر وقتاً طويلاً يصل أحياناً إلى ستة أسابيع، وتتشكل هذه الأبواغ إما على الميسيليوم الهوائي أو ضمن الأغار.

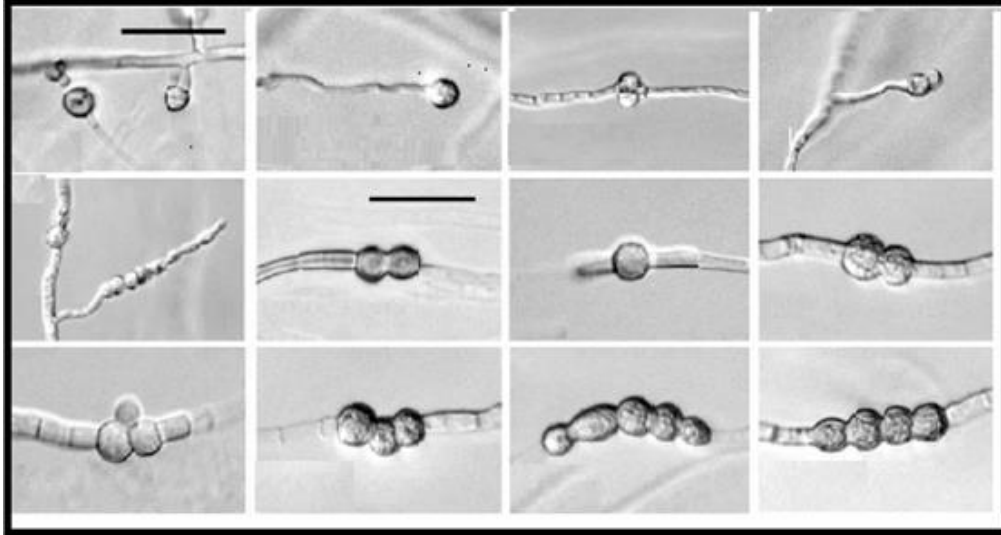
مكونات أخرى:

- **أبواغ وسطية *Mesoconidia***: تُشكلها بعض أنواع الجنس *Fusarium*، وهذه الأبواغ ذات شكل مغزلي مقسمة بـ 3-4 حواجز، وتشبه الأبواغ الكونيدية الكبيرة لكنها تفتقر لشكل الخلية القاعدية القدمية أو المدببة، وهي أصغر من الأبواغ الكونيدية الكبيرة *Macroconidia* وأكبر من الأبواغ الكونيدية الصغيرة *Microconidia*، وتتشكل عادةً على الميسيليوم الهوائي من خلايا حاملة للأبواغ الكونيدية متعددة الفيااليدات *Polyphialides* على وسط آغار قطع أوراق القرنفل *CLA* أو *Carnation Leaf Agar* على آغار خاص فقير بالمواد الغذائية *Spezieller SNA* أو *Nährstoffarmer Agar* فقط، ولا تتشكل ضمن الوسادات البوغية، وتتكون عند بعض الأنواع مثل *F. semitectum* و *F. chlamydosporum* و *F. polyphialidicum* و *F. subglutinans* و *F. avenaceum* وبعض أنواع *F. camptoceras* و *sporotrichioides* وتخدم في عملية التصنيف (Burgess et al., 1994; Leslie and Summerell, 2006). كما تُشكل بعض أنواع الجنس *Fusarium* تراكيباً تشبه الأجسام الحجرية، وتعتبر هذه الصفة مهمة بالنسبة لبعض الباحثين (Leslie and Summerell, 2006).

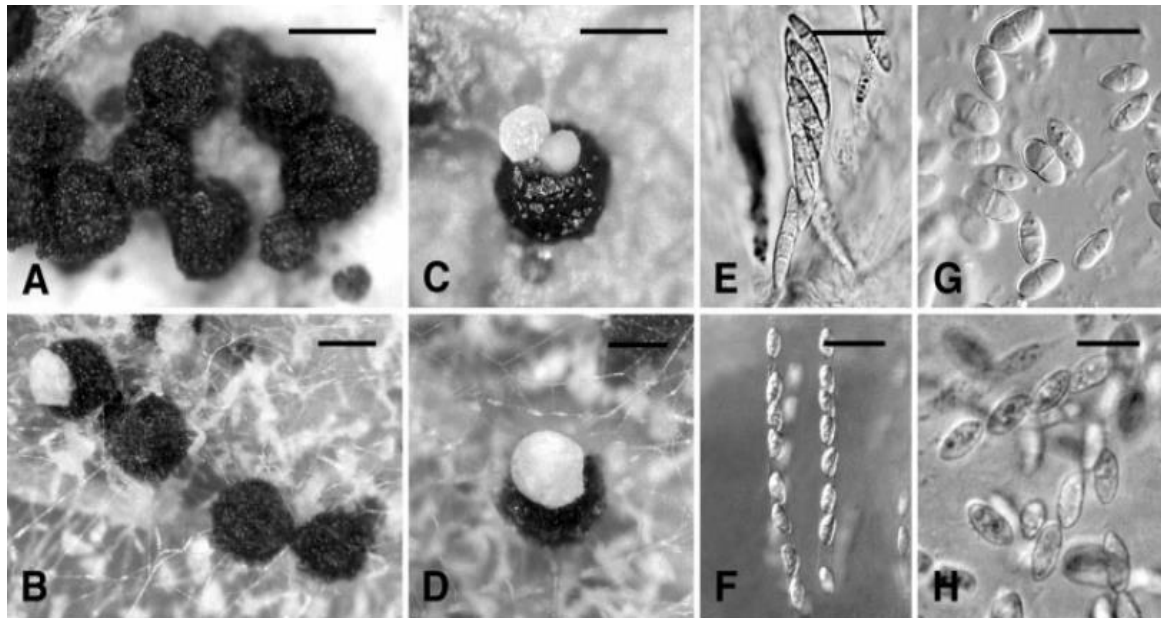
- **الطور الجنسي:** يمكن أن يكون الطور الجنسي من الصفات المميزة للنوع، وتُشاهد الأطوار الجنسية عادة ضمن الظروف المخبرية أكثر منها ضمن الحقل، ويتكون هذا الطور من أجسام ثمرية دورقية Perithecia تحتوي على أكياس زقية بداخلها أبواغ زقية (الشكل 1-3). وتجدر الإشارة إلى أنَّ الشكل المورفولوجي للطور الجنسي ليس له بشكل عام فائدة في التصنيف، ولكن تشكّل هذا الطور يمكن أن يكون مهماً جداً عند بعض الأنواع (Leslie and Summerell, 2006)، كما هي الحال في تصنيف النوع *F. graminearum* ، حيث لا يمكن تمييز أفراد *F. graminearum* group 1 عن أفراد *F. graminearum* group 2 بالاعتماد على الصفات المورفولوجية، لكن يمكن تمييزها من خلال تشكيل العزلات المأخوذة من بوع واحد في أفراد *F. graminearum* group 2 لأجسام ثمرية perithecia على وسط CLA، بينما النوع *F. graminearum* group 1 لا يشكل هذه الأجسام (Burgess et al., 1994).



الشكل 1-1: أشكال أبواغ الجنس *Fusarium*: A- أبواغ كونيدية كبيرة Macroconidia ، B- الخلايا القاعدية والقمية للأبواغ الكونيدية الكبيرة، C- أبواغ كونيدية صغيرة Microconidia ، D- فياليدات، E- سلاسل من الأبواغ الكونيدية الصغيرة (Leslie and Summerell, 2006)



الشكل 1-2: الأبواغ الكلاميدية للجنس *Fusarium* (Leslie and Summerell, 2006)



الشكل 1-3: الطور الجنسي للجنس *Fusarium*: أجسام ثمرية *Perithecia* وأكياس زقية وأبواغ زقية للأنواع *Gibberella moniliformis*, *Gibberella zeae*, *Haematonecrotia haematococca*. A- تجمع للأجسام الثمرية للنوع *G. zeae* على قش القمح. B- أجسام ثمرية للنوع *H. haematococca* على وسط CLA. C- جسم ثمرى للنوع *G. zeae* تخرج منه الأكياس الزقية. D- جسم ثمرى للنوع *H. haematococca* تخرج منه الأكياس الزقية. E- أكياس زقية للنوع *G. zeae*، البوغ الزقي مقسم بـ 3 حواجز. F- أكياس زقية للنوع *H. haematococca*. G- أبواغ زقية للنوع *G. moniliformis*، البوغ الزقي مقسم بحاجز واحد. H- أبواغ زقية للنوع *H. haematococca*. (Leslie and Summerell, 2006)

5.1 - الصفات المورفولوجية لبعض الأقسام التي تنتمي إليها أنواع الجنس *Fusarium*

Sporotrichiella Wr. em. Joffe: لون المستعمرات أبيض أو أصفر أو أحمر إلى أرجواني، الطور الجنسي غائب في هذه المجموعة، وتعتمد قاعدة التصنيف في هذا القسم على:

- شكل الأبواغ الكونيدية الصغيرة فيما إذا كانت ليمونية أو إجاصية الشكل، كروية أو لها شكل القطع الناقص أو متطاولة، وهل هي مبعثرة على الميسيليوم الهوائي أو متوضعة ضمن رؤوس كاذبة.
- الأبواغ الكونيدية الكبيرة هل هي متشكلة على الميسيليوم الهوائي أو ضمن الوسادات البوغية، هذه الأبواغ معتقة، وقليلة، متطاولة الشكل بالكاد هلالية أو مغزلية.
- الأبواغ الكلاميدية بينية أو طرفية، وتشكل أنواع هذه المجموعة أجساماً حجرية أحياناً (Joffe and Palti, 1975). من الأنواع التي تنتمي لهذا القسم *F. fusarioides*، *F. sporotrichioides*، *F. tricinatum*، *F. poae*، *chlamydosporem* (Nelson et al., 1983; Ismail et al., 2015).

● **Discolor Wr:** لون المستعمرات في هذه المجموعة أبيض وردي، أو بلون الدراق Peach، أو رمادي، أو أحمر إلى بني. الأبواغ الكونيدية الصغيرة غائبة، وتشكل الأبواغ الكونيدية الكبيرة على الميسيليوم الهوائي أو ضمن وسادات بوغية أو في طبقة هلامية ملساء أو محبة Pionnotes، وهي إما هلالية Falcate ذات نهاية قمية قصيرة وخلية قدمية واضحة، أو مغزلية Spindle، أو منجلية الشكل Sickle ذات نهاية قمية متطاولة ومتضيقة بالتدرج وخلية قاعدية واضحة، والأبواغ النموذجية مقسمة بـ 5 حواجز. الأبواغ الكلاميدية عادة بينية أو طرفية وتشكل غالباً في عقد أو سلاسل. الأجسام الحجرية أرجوانية أو زرقاء، والوسادات الهيفية صفراء (Joffe, 1974). ومن الأنواع التي تنتمي لهذا القسم *F. heterosporum*، *F. reticulatum*، *F. sambucinum*، *F. graminearum* (Nelson et al., 1983).

● **Martiella Wr. em. Joffe and Palti:** لون المستعمرات في هذه المجموعة أبيض، كريمي، برتقالي مزرق إلى بني Orange – blue to brown. الأبواغ الكونيدية الصغيرة وفيرة، بيضوية إلى مستطيلة الشكل، والأبواغ الكونيدية الكبيرة شبه مغزلية Fusoid، أو أسطوانية مقوسة أو متطاولة ذات خلايا قمية مدورة وخلايا قاعدية قدمية الشكل. الأبواغ الكلاميدية كروية أو بيضوية، جدرها ملساء أو خشنة، طرفية أو بينية، مفردة أو ضمن أزواج أو سلاسل قصيرة أو عقد (Joffe, 1974).

(1974). ضمّ هذا القسم في البداية 3 أنواع هي *F. solani* و *F. martii* و *F. coeruleum* ، ولكن خُفّض عدد الأنواع في هذا القسم إلى نوع واحد هو *F. solani* (Ismail et al., 2015).

• **Elegans Wr**: المستعمرات في هذه المجموعة ذات لون أبيض، أو وردي فاتح، أو برتقالي، أو بنفسجي إلى أرجواني، والميسيليوم ملبد *Felted*، مخطط *Striate*، أو مندف *Floccose*. تتواجد الأبواغ الكونيدية الصغيرة بوفرة على الميسيليوم أو ضمن رؤوس كاذبة، وهي ذات أشكال مختلفة، بيضوية أو لها شكل القطع الناقص مستقيمة إلى مقوّسة. أمّا الأبواغ الكونيدية الكبيرة تتشكّل على الميسيليوم الهوائي أو ضمن الوسادات البوغية وأحياناً في كتل هلامية *Pionnotes*، وهي هلالية الشكل أو مغزلية لها شكل المنجل ومتضيّقة في كلتا النهايتين. الأبواغ الكلاميدية وفيرة جدرها ملساء أو خشنة، طرفية أو بينية، والطور الجنسي لهذه المجموعة غير معروف (Joffe, 1974). ومن الأنواع التي تنتمي لهذا القسم *F. oxysporum* (Joffe, 1974; Nelson et al., 1983).

• **Liseola Wr**: اعتُبر هذا القسم في البداية جزءاً من القسم *Elegans*، لكنه وُضع فيما بعد بشكل مستقل، وذلك بعد تشكّل الأبواغ الكونيدية الصغيرة ضمن سلاسل، وتعدّ صفة تشكّل الأبواغ الكونيدية الصغيرة أو عدم تشكّلها في سلاسل ميزة هامة للتفريق بين الأنواع في هذا القسم (Ismail et al., 2015). المستعمرات بيضاء، كريمية إلى بنية اللون، برتقالية، أو بنفسجية. تتشكّل الأبواغ الكونيدية عادة في سلاسل أو رؤوس كاذبة صغيرة، وهي بيضوية مدببة، أو مستطيلة ونادراً أجاصية الشكل. الأبواغ الكونيدية الكبيرة نحيفة ذات جدر رقيقة، وتتشكّل ضمن وسادات هيفية أو كتل لزجة، وهي مغزلية أو أسطوانية الشكل، مستقيمة أو مقوّسة، خلاياها القميّة متضيّقة، والقاعدية معنقة وهي مقسّمة عادة ب 3 حواجز (Joffe, 1974; Ismail et al., 2015). الأبواغ الكلاميدية غائبة في هذا القسم حسب بعض المراجع (Joffe, 1974; Nelson et al., 1983; Burgess et al., 1994)، ولكن حسب Ismail وآخرون (2015) تشكّل بعض الأنواع التابعة لهذا القسم مثل النوع *F. pseudoanthophilum* أبواغاً كلاميدية ضمن سلاسل، كما يُشكّل النوع *F. nygamai* أبواغاً كلاميدية مفردة أو ضمن سلاسل أو كتل.

من الأنواع التي تنتمي لهذا القسم *F. proliferatum* ، *F. verticillioides* ، *F. pseudonygamai* ، *F. pseudoanthophilum* ، *F. anthophilum* ، *subglutinans* ، *F. thapsinum* ، *F. acutatum* ، *F. nisikadoi* (Nelson et al., 1983; Ismail et al., 2015).

- **Gibbosum Wr. em. Joffe**: المستعمرات في هذه المجموعة بيضاء، وردية فاتحة، زيتونية، أو حمراء قرمزية. الأبواغ الكونيدية الصغيرة غائبة أو نادرة، وتشكل على الميسيليوم الهوائي، وتشكل الأبواغ الكونيدية الكبيرة ضمن وسادات هيفية أو كتل لزجة، وهي هلالية الشكل متضيقة في كلتا النهايتين، الخلايا القمية لها متطاولة، والخلايا القديمة متطورة ومعققة، وهي مقسمة عادة ب 5 حواجز ونادراً ب 3 حواجز (Joffe, 1974)، وتكون الأنواع التابعة لهذا القسم خلايا مولدة للأبواغ الكونيدية وحيدة الفياليات (monophialides) (Ismail et al., 2015). الأبواغ الكلاميدية وفيرة جدرها ملساء أو خشنة، بينية، وتشكل مفردة أو في سلاسل أو عقد، وهي بنية إلى صفراء اللون. ومن الأنواع التي تنتمي لهذا القسم *F. acuminatum*، *F. longipes*، *F. scirpi*، *F. equiseti* (Nelson et al., 1983).

- **Arachnits Wr**: المستعمرات في هذه المجموعة بيضاء، وردية فاتحة، صفراء إلى بنية. الأبواغ الكونيدية الكبيرة تشكل على الميسيليوم الهوائي ونادراً ضمن الوسادات الهيفية، وهي مقوسة ومعققة، وتغيب في هذه المجموعة الأبواغ الكلاميدية والأجسام الحجرية. ومن الأنواع التي تنتمي لهذا القسم *F. nivale* (Nelson et al., 1983).

- **Eupionnotes Wr**: المستعمرات في هذه المجموعة فاتحة، صفراء، برتقالية، صفراء إلى بنية، وردية إلى خضراء اللون (Joffe, 1974)، تنمو ببطء على الوسط PDA، الميسيليوم فيها غائب والمستعمرات تكون لزجة، لها مظهر الخميرة. تشكل الأبواغ الكونيدية الكبيرة في كتل لزجة ونادراً ضمن وسادات هيفية، وهي أسطوانية أو منجلية الشكل، هلالية مستطيلة أو مقوسة، معققة أو غير معققة. وبالنسبة للأبواغ الكلاميدية والأجسام الحجرية، فهي إما موجودة أو غائبة، ولبعض أنواع هذه المجموعة طوراً جنسياً. ومن الأنواع التي تنتمي لهذا القسم *F. aquaeductum*، *F. merismoides* و *F. dimerum* (Nelson et al., 1983).

- **Lateritium Wr**: المستعمرات في هذه المجموعة بيضاء، وردية، صفراء، برتقالية، حمراء إلى قرمزية، بنفسجية إلى زرقاء داكنة. الأبواغ الكونيدية الصغيرة غائبة أو نادرة، وفي حال تواجدها تكون بيضوية أو لها شكل القطع الناقص. الأبواغ الكونيدية الكبيرة تشكل على الميسيليوم الهوائي أو ضمن وسادات هيفية، ونادراً في كتل لزجة، وهي مستقيمة أو مقوسة قليلاً، الخلايا القمية منقارية Beaked apical cells، والخلايا القاعدية معققة. الأبواغ الكلاميدية بينية وتشكل ضمن الميسيليوم أو ضمن الأبواغ الكونيدية الكبيرة، كما تشكل أجسام حجرية زرقاء ضمن الميسيليوم (Ismail et al., 2015; Joffe, 1974). ومن الأنواع التي تنتمي لهذا القسم *F. lateritium* و *F. udum* (Nelson et al., 1983).

- **Arthrosporiella Wr**: المستعمرات في هذه المجموعة بيضاء اللون، أو ذات لون أحمر قرمزي. الأبواغ الكونيدية الصغيرة غائبة أو نادرة، وفي حال تواجدها تكون بيضوية أو إجاصية أو لها شكل القطع الناقص. الأبواغ الكونيدية الكبيرة تتشكل على الميسيليوم الهوائي أو ضمن وسادات هيفية، ونادراً في كتل لزجة، وهي هلالية أو رمحية، ذات خلايا قمية متضيقة، وخلايا قاعدية معتقة تشبه الأوتاد، ومقسمة عادة ب 3-5 حواجز. الأبواغ الكلاميدية موجودة وهي بينية مفردة، وأحياناً في سلاسل أو عقد، وقد تتواجد في بعض الأحيان أبواغ كلاميدية طرفية، وقد تغيب هذه الأبواغ أيضاً (Joffe, 1974; Ismail et al., 2015)، وتكون الأنواع التابعة لهذا القسم خلايا مولدة للأبواغ الكونيدية متعددة الفياليات polyphialides. ومن الأنواع التي تنتمي لهذا القسم *F. semitectum*، *F. camptoceras* (Nelson et al., 1983).
- **Roseum Wr**: المستعمرات في هذه المجموعة صفراء، قرمزية، أو حمراء. الأبواغ الكونيدية الصغيرة غائبة أو نادرة. الأبواغ الكونيدية الكبيرة تتشكل على الميسيليوم الهوائي أو ضمن وسادات هيفية، أو في كتل لزجة، وهي نحيفة في معظم الأحيان، خيطية Filiform، مقوسة، معتقة ومتضيقة في كلتي النهايتين، وتكون أفراد هذه المجموعة أجساماً حجرية بيضاء أو صفراء أو أرجوانية إلي بنية. ومن الأنواع التي تنتمي لهذا القسم *F. graminum*، *F. avenaceum* (Nelson et al., 1983).
- **Macroconia Wr**: المستعمرات في هذه المجموعة بيضاء وردية، أو صفراء برتقالية، لزجة، ذات نمو بطيء. الأبواغ الكونيدية الصغيرة غائبة أو نادرة، والأبواغ الكونيدية الكبيرة مقسمة بعدة حواجز، ذات جدر سمكة، أسطوانية، مقوسة قليلاً، معتقة، وتتشكل في وسادات هيفية. الأبواغ الكلاميدية غائبة، لكنها تتشكل أحياناً ضمن الأبواغ الكونيدية الكبيرة. ومن الأنواع التي تنتمي لهذا القسم *F. coccophilum* و *F. coccidicola* (Joffe, 1974).
- **Spicarioides Wr**: المستعمرات في هذه المجموعة وردية، حمراء وردية أو أرجوانية. تتشكل الأبواغ الكونيدية الصغيرة على الميسيليوم الهوائي في سلاسل طويلة أو رؤوس كاذبة، وهي كروية أو بيضوية الشكل. وتتشكل الأبواغ الكونيدية الكبيرة في وسادات هيفية أو كتل لزجة، جدرها سمكة، مقوسة قليلاً، أو مستطيلة، معتقة، الخلايا القمية لها ذات منقار، والخلايا القاعدية قديمة واضحة. الأبواغ الكلاميدية غائبة. ومن الأنواع التي تنتمي لهذا القسم *F. decemcellulare* (Nelson et al., 1983).

6.1 - العوامل المؤثرة في انتشار أنواع الجنس *Fusarium*:

تنتشر أنواع الجنس *Fusarium* في جميع المناطق الجغرافية في العالم، وتوجد في التربة والهواء ويمكن عزلها من أي جزء من النباتات المصابة بدءاً من أعرق جذر وحتى أعلى زهرة (Nelson *et al.*, 2003; Summerell *et al.*, 1994; Nelson *et al.*, 1983). تؤثر العوامل المناخية وبشكل خاص الحرارة والرطوبة والأمطار في نمو أنواع الجنس فيوزاريوم على القمح والشعير والذرة، وفي تكاثرها وبقائها وقدرتها على إنتاج السموم الفطرية، وقدرتها الإمراضية وقدرتها على المنافسة (Popovski and Celar, 2013; Ferrigo *et al.*, 2016). كما تؤثر الإجراءات الزراعية، والتسميد الأزوتي، والمعاملة بالمبيدات، وحساسية الأصناف وغيرها على انتشار أنواع الجنس *Fusarium* (Doohan, 2016; Ferrigo *et al.*, 2003). ويبين الجدول (1-2) بعض أنواع هذا الجنس وعلاقتها بالمناخ (Burgess *et al.*, 1994).

الجدول 1-2: التوزيع الجغرافي لبعض أنواع الجنس *Fusarium* وعلاقتها بالمناخ (Burgess *et al.*, 1994)

الأنواع التي تظهر في معظم المناطق المناخية	الأنواع التي تظهر بشكل رئيسي في المناطق المعتدلة	الأنواع التي تظهر بشكل رئيسي في المناطق الاستوائية وتحت الاستوائية
<i>F. chlamydosporum</i>	<i>F. acuminatum</i>	<i>F. beomiforme</i>
<i>F. equiseti</i>	<i>F. avenaceum</i>	<i>F. compactum</i>
<i>F. verticillioides</i>	<i>F. crookwellense</i>	<i>F. decemcellulare</i>
<i>F. oxysporum</i>	<i>F. culmorum</i>	<i>F. longipes</i>
<i>F. poae</i>	<i>F. graminearum</i>	
<i>F. semitectum</i>	<i>F. sambucinum</i>	
<i>F. solani</i>	<i>F. sporotrichioides</i>	
<i>F. tricinctum</i>	<i>F. subglutinans</i>	

7.1 - دورة حياة الجنس *Fusarium*:

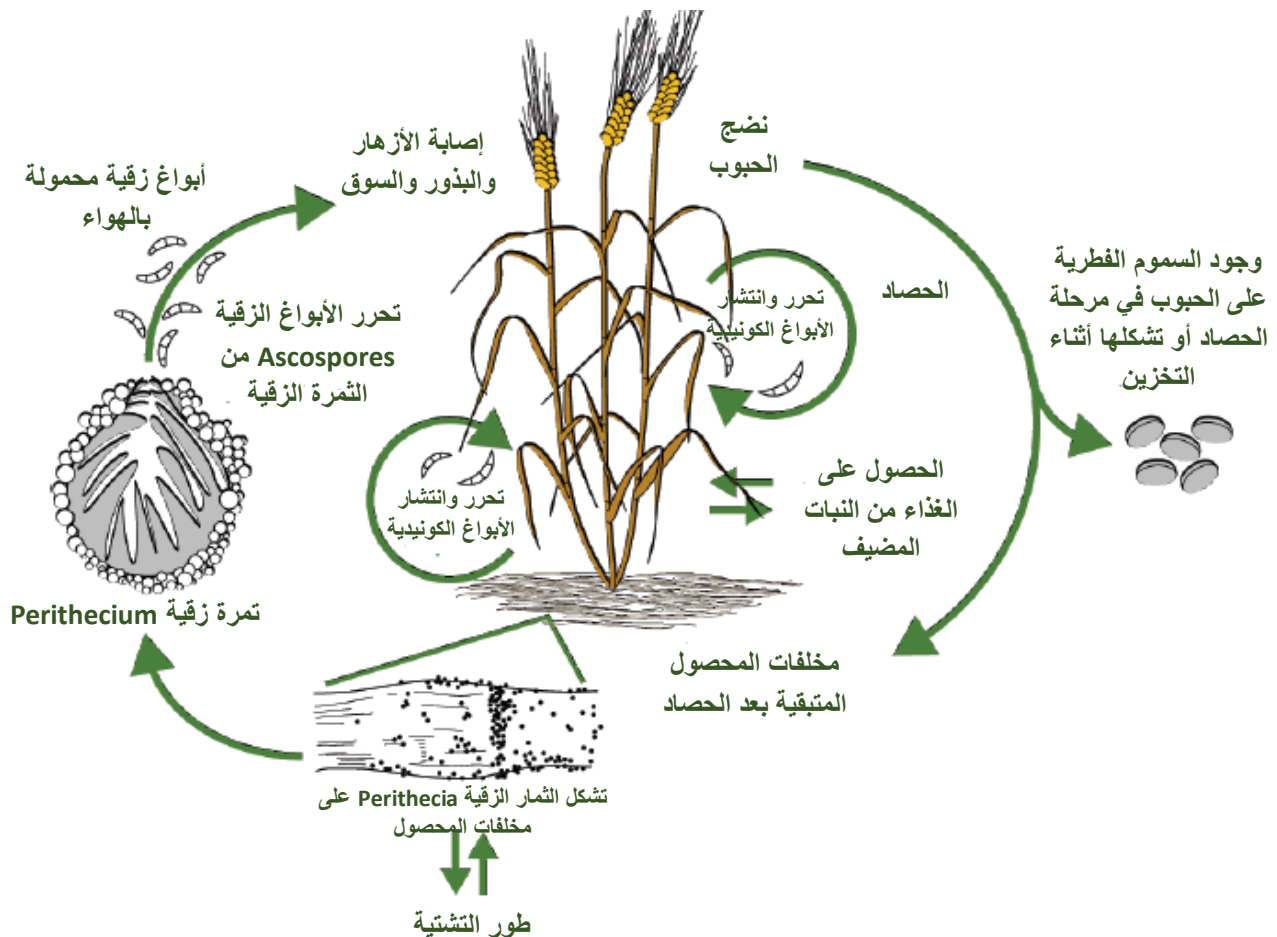
تُشكل أنواع الجنس *Fusarium* بشكل عام أبواغاً كونيدية، ولكن لبعضها طورٌ جنسيّ هو عبارة عن أجسام ثمرية (ثمار زقية) يتشكل بداخلها أبواغ زقية مثل النوع *F. graminearum* Schwabe وطوره الجنسي *Gibberella zea* (Schweinitz) Petch، بينما يوجد أنواع أخرى لا يعرف لها طورٌ جنسيّ مثل *F. culmorum* (W. G. Smith) Sacc (Leslie and Summerell , 2006).

دُرست دورة الحياة للنوع *F. graminearum* على نطاق واسع (Trail, 2009) (الشكل 4-1)، حيث يقضي هذا الفطر فصل الشتاء على هيئة ميسيليوم أو أبواغ زقية أو كونيدية أو كلاميدية على مخلفات المحاصيل الموجودة من الموسم السابق، ويمكن أن يبقى في التربة لأكثر من 6 سنوات محافظاً على حيويته وقدرته على الإصابة (Nelson et al., 1994; McMullen et al., 1997; Trail, 2009; Mills et al., 2014).

بشكل عام تتشكل الأبواغ الكونيدية الكبيرة بغزارة ضمن وسادات بوعية *Sporodochia* في الطقس الدافئ الرطب على بقايا نباتات الذرة والمحاصيل السابقة الموجودة في الحقل، أما الأبواغ الزقية فتتشكل ضمن أجسام ثمرية وتحرّر بقوة لتُحمل بواسطة التيارات الهوائية إلى السنبيلات المزهرة (Mills et al., 2014).

تحدث الإصابة الأولية في الربيع بواسطة الأبواغ الزقية التي تُحمل بالرياح لمسافات بعيدة وتصيب جميع أجزاء النبات، وتكون الإصابة شديدة في مرحلة الإزهار عندما تكون المآبر ظاهرة، حيث ذكرت بعض الدراسات المرجعية أنّ طور التأخير وما بعده بخمسة أيام يُعدّ فترة مثالية لحدوث الإصابة بلفحة السنايل، شريطة أن تكون الظروف المناخية مناسبة، مع توافر لقاح الفطر الممرض، والصنف القابل للإصابة، وقد تمتد فترة حدوث الإصابة حتى طور العجيني وبداية تصلب محتويات الحبوب لكن تكون السنايل أقل قابلية للإصابة (Martinez-Espinoza et al., 2015)، وبعد إنتاش الأبواغ يحدث الاختراق من خلال الفتحات الطبيعية مثل المآبر والثغور، ينمو الفطر بعد ذلك وينتشر ضمن أنسجة النبات. تظهر الأعراض الأولى للإصابة بعد حوالي ثلاثة أيام من العدوى عند توافر رطوبة عالية ودرجات حرارة تتراوح بين 25-30 °س، وبعد حدوث الإصابة يقوم الفطر بإفراز السموم الفطرية الملوثة للحبوب، كما يمكن أن تحدث الإصابة بواسطة الخيوط الفطرية أو الأبواغ الكلاميدية أو الأبواغ الكونيدية التي تنتقل لمسافات قصيرة بواسطة قطرات الماء مقارنة مع الأبواغ الزقية التي تنتقل بالهواء لمسافات أبعد (Trail, 2009; Mills et al., 2014).

تتشكل الأبواغ الكونيدية والزقية على السنبال في نهاية موسم النمو في معظم السنوات، وتُعد مصدراً للعدوى الثانوية في نفس الحقل، ويحافظ الفطر على وجوده بواسطة تلك الأبواغ في بقايا المحاصيل والبذور الملوثة والتي تشكّل مصدراً للعدوى الأولية في الموسم اللاحق (Mills *et al.*, 2014). تبدو البذور المصابة في مرحلة متقدمة سليمة لكنّها تكون ملوثة بالأبواغ الكونيدية للفطر وفي حال زراعتها في الموسم التالي يظهر على البادرات الناتجة عنها أعراض عفن الجذور وعفن التاج (Matny, 2015).



21

8.1 - أهم الأمراض التي تسببها أنواع الجنس *Fusarium* على القمح

1.8.1 - لفحة البادرات *Fusarium seedling blight*:

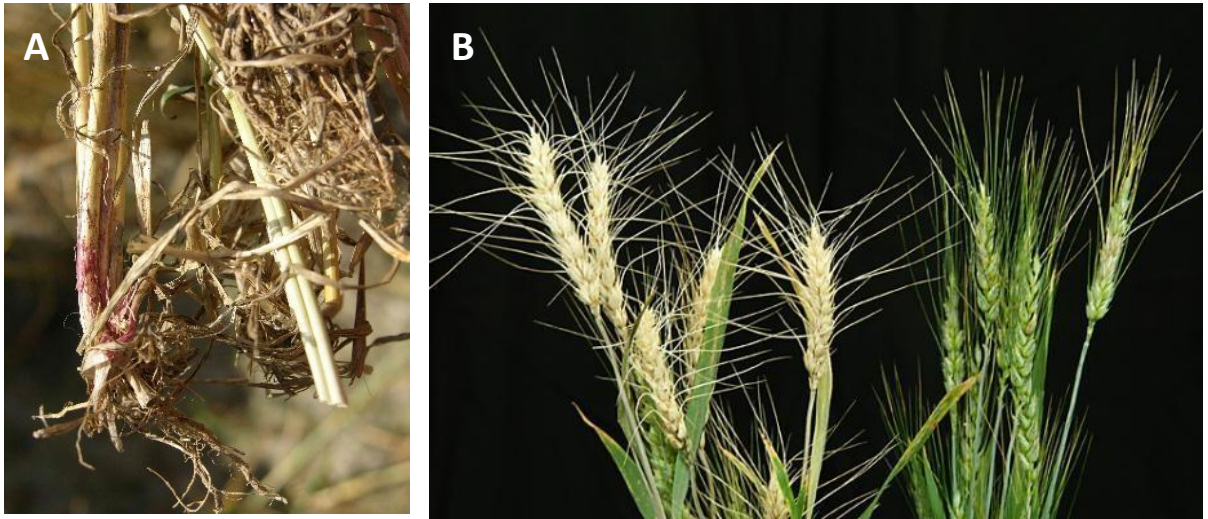
يصيب هذا المرض محاصيل الحبوب، وتختلف أعراض الإصابة وشِدَّتْها حسب العامل الممرض وصنف الحبوب والعوامل البيئية السائدة (Doohan, 2003)، ويتسبب هذا المرض عن العديد من الأنواع الفطرية من الجنس *Fusarium* مثل *F. culmorum* و *F. langsethiae* و *F. poae* (Imathiu et al., 2010)، ويمكن للحبوب المصابة أن تموت أو أن تنبت لكنّها تكون ضعيفة في هذه الحالة، وإذا نجحت بالظهور فوق سطح التربة فإنّها تموت في معظم الأحيان، وتكون البادرات المصابة ذات لون بني فاتح إلى بني محمر وتُغطّى بكّتل وردية أو بيضاء، وإذا نجحت البادرات المصابة بالحياة فتكون ضعيفة وتُعطي عدداً قليلاً من الإسطوانات وتكون السنابل المُتشكّلة صغيرة، ومع تطوّر النبات تظهر على الجذور بقع بنية فاتحة أو بنية مُحمرّة ويظهر على البادرات المصابة أعراض عفن التاج (Mills et al., 2014).

2.8.1 - مرض تعفن الجذور الشائع *Common root rot*:

يُعرف مرض تعفن الجذور الشائع على القمح بعدّة أسماء منها تعفن القدم الفيوزاريومي *Fusarium foot rot*، أو تعفن الجذور في الأراضي الجافة *Dry land root rot*، أو تعفن التاج والجذور الفيوزاريومي *Fusarium crown and root rot* (Smiley and Patterson, 1996)، أو تعفن التاج (Scherm et al., 2013)، وقد سُمّي بتعفن الجذور الشائع بشكل رسمي من قبل جمعية أمراض النبات الأمريكية APS (ال خليفة وآخرون، 2006). يُعدّ هذا المرض من الأمراض المهمة التي تصيب القمح والشعير في العالم، ويحدث فقدّاً كبيراً في الإنتاج (النائب وآخرون، 2002)، ويسهم في الإصابة بهذا المرض معقد مرضي يضم عدّة ممرضات فطرية منها *Helminthosporium* spp. و *Bipolaris sorokiniana* و *Rhizoctonia* spp. و *Fusarium* spp. و *Microdochium nivale* (النائب وآخرون، 2002؛ الخليفة وآخرون، 2006؛ Smiley and Patterson, 1996)، ومن أنواع الجنس *Fusarium* التي تشارك في إحداث الإصابة *F. pseudograminearum*، *F. crookwellense*، *F. culmorum*، *F. graminearum* (Williams et al., 2002)، *F. poae* (الشعبي و آخرون، 2015)، *F. avenaceum*، *F. equiseti* (El-Khalifeh et al., 2009)، *F. proliferatum* (الشعبي و آخرون، 2015).

سُجِّلَت العديد من الدراسات المتعلقة بهذا المرض في أماكن مختلفة من العالم منها أستراليا (Williams *et al.*, 2002; Backhouse *et al.*, 2004)، وكندا (Fernandez *et al.*, 2007)، والصين (Zhang *et al.*, 2015)، وتركيا (Bentley *et al.*, 2006)، وإيران (Darvishnia, 2013) والعراق (خليفة ومطني، 2013) وسورية (الشعبي وآخرون، 2015).

تظهر أعراض الإصابة بمرض تعفن الجذور الشائع بأشكال متعددة، وذلك تبعاً للظروف البيئية السائدة، ومن تلك الأعراض ظهور بقع بنية أو سوداء على الجذور أو قاعدة الساق والجذور معاً، ولفحة البادرات وتقرم النبات وموت الإشتاءات والنضج المبكر وتبقع الأوراق وبيضاض السنابل المعروف باسم السنبله البيضاء أو السنبله الميتة، ويظهر عند توافر الرطوبة المناسبة خيوط فطرية وردية إلى حمراء اللون عند قاعدة الساق (الشكل 5-1) (النائب وآخرون، 2002؛ Scherm *et al.*, 2013؛ Matny, 2015).



الشكل 5-1: أعراض الإصابة بمرض عفن الجذور الشائع على القمح: (A) تلون وردي على منطقة التاج و الساق، (B) سنابل بيضاء نتيجة الإصابة (اليسار)، سنابل سليمة (اليمن) (Scherm *et al.*, 2013; Matny, 2015).

3.8.1 - مرض لفحة السنابل *Fusarium head blight*

يُعدّ مرض لفحة السنابل من أهم الأمراض الفطرية التي تصيب محصول القمح، ويُعدّ مدمراً لهذا المحصول في العالم (Gilbert *et al.*, 2008; Wegulo *et al.*, 2015)، ويرتبط هذا المرض بأكثر من 17 عاملاً ممرضاً منها *Microdochium nivale* وأنواع الجنس *Fusarium* مثل *F. avenaceum*، *F. culmorum*، *F. graminearum*، *F. pseudograminearum*، *F. asiaticum*، *F. acuminatum*، *F. sporotrichioides*، *F. poae*، *langsethiae* (Matny, 2015).

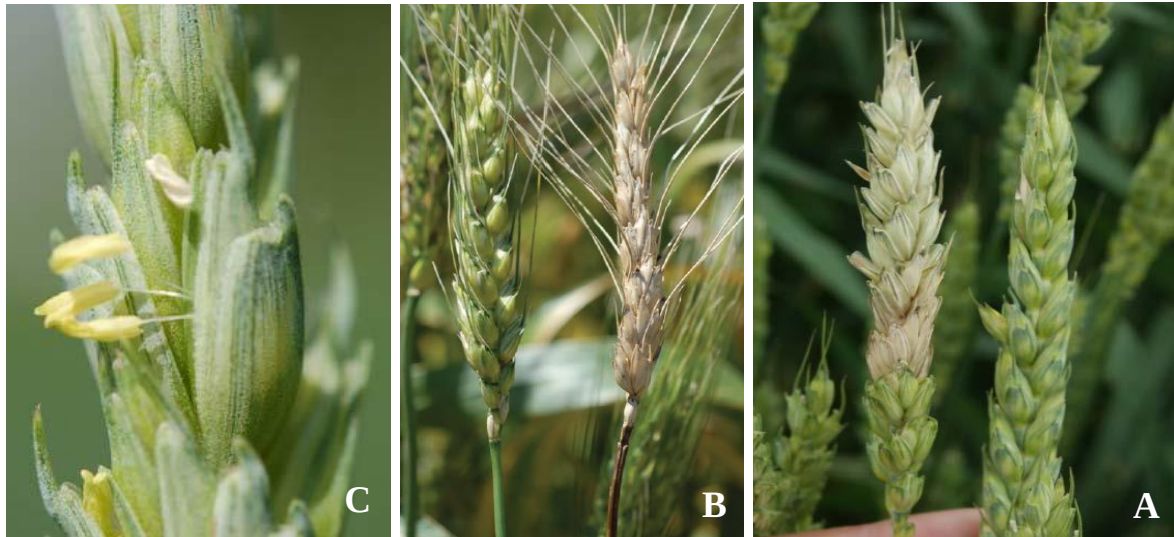
و قد سُجِّلَ هذا المرض في أستراليا (2015; Zhang *et al.*, 2015; Sardar and Ismael, 2017) والأرجنتين (Obanor *et al.*, 2013) وإيطاليا (Pancaldi *et al.*, 2010) وتركيا (Bentley *et al.*, 2006) وإيران (Abedi-Tizaki and Sabbagh, 2012) وسورية (الشعبي وآخرون، 2018).

يُسمّى هذا المرض أيضاً ابيضاض السنابل، لكن ظاهرة ابيضاض السنابل تُعزى أيضاً للإصابة الفيروسية وللإصابة بأمراض أخرى مثل الإصابة بمرض Take-all المتسبب عن الفطر *Gaeumannomyces graminis*، والإصابة ببعض الحشرات مثل دبور الحنطة المنشاري *Cephus cinctus* وحشرة السونة بدرجة طفيفة، أو إلى تأثير عوامل لا حيوية أخرى كالصقيع أو موجات الحر والجفاف التي تصيب الأقماع في طور امتلاء الحبوب (الشعبي وآخرون، 2015؛ Wegulo *et al.*, 2008).

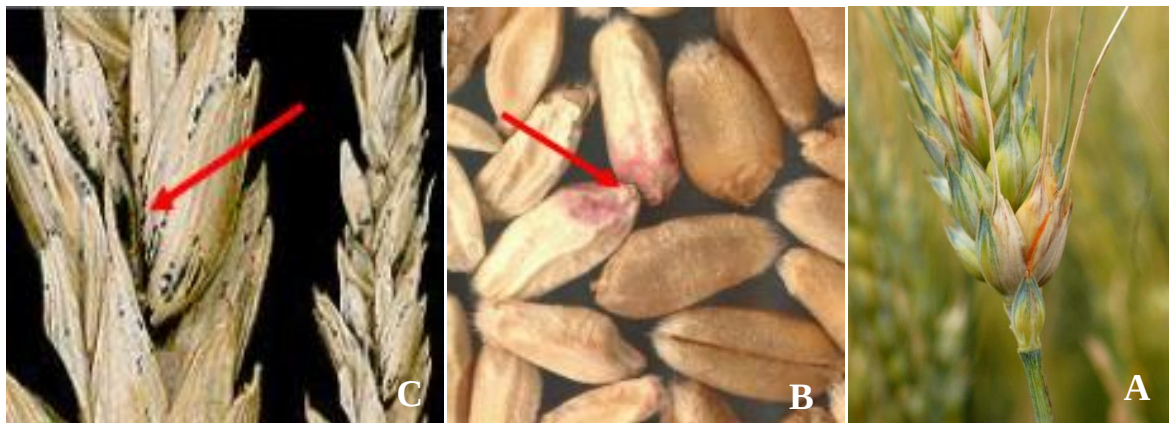
تظهر أعراض الإصابة بعد الإزهار مباشرة، ويمكن أن تُصاب سننبلة واحدة أو أكثر أو كامل السنبل، وتكون في البداية على شكل بقع مائية، ثم تفقد السننبلات المصابة لونها وتصبح بلون القش، كما تصبح قصيرة بسبب موت الأنسجة قبل نضجها، بينما تحافظ السننبلات السليمة على لونها الأخضر الطبيعي (الشكل 1-6-A)، وعندما يُصيب الفطر الساق تحت السنبل يمكن أن تموت السنبل بالكامل (الشكل 1-6-B)، وتظهر أعراض الإصابة المميزة لمرض لفحة السنابل بعد 18-21 يوماً من الإزهار، ويمكن أن تُلاحظ هذه الأعراض أبكر من ذلك إذا توافرت الظروف المناسبة من الرطوبة خلال الأيام التي تلي الإزهار مباشرة، وبعد حوالي 7-10 أيام من ظهور الأعراض يلاحظ ظهور خيوط فطرية وكتل من الأبواغ الكونيدية وردية اللون تدعى وسادات بوجية *Sporodochia*، وذلك على حواف العصافات وبشكل خاص قرب قاعدة السنبل (الشكل 1-7-A)، ويمكن ملاحظة كتل الأبواغ الوردية في الصباح قبل جفاف قطرات الندى (Logrieco and Moretti, 2008; Mills *et al.*, 2014).

تنكمش الحبوب المصابة وتصبح ضامرة مجمدة قليلة الوزن، ويتراوح لونها من البني الفاتح إلى اللون الوردي أو الأبيض الرمادي، ويتوقف مدى تجعد الحبوب وتغير لونها على مكان حدوث الإصابة ووقتها والظروف البيئية التي تلي الإصابة، فإذا هاجم الفطر محور السننبلة تموت السننبلات فوق تلك النقطة حتى ولو لم تُستعمر من قبل الفطر، وينتج عن ذلك عدم تشكل الحبوب أو تكون الحبوب مجمدة (الشكل 1-7-B) (Mills *et al.*, 2014).

يصبح لون البقع الموجودة على السنبيلات داكناً في نهاية الموسم نتيجة تشكّل أجسام ثمرية Perithecia أرجوانية إلى سوداء اللون (الشكل 1-7-C)، والتي يحافظ الفطر فيها على وجوده في الشتاء (Mills *et al.*, 2014).



الشكل 1-6: أعراض الإصابة بمرض لفحة السنابل على القمح: (A) موت جزء من السنبلة نتيجة مهاجمة الفطر محور السنبلة مما يؤدي إلى موت السنبيلات الواقعة فوقها، (B) موت السنبلة بالكامل نتيجة إصابة الساق تحت السنبلة (اليمين)، سنبلة سليمة (اليسار)، (C) مرحلة الإزهار عندما تكون المآبر ظاهرة (Wegulo *et al.*, 2008; Scherm *et al.*, 2013; Mills *et al.*, 2014).



الشكل 1-7: أعراض الإصابة بمرض لفحة السنابل على الحبوب وتشكل الثمار الزقية (A) كتل من الأبواغ الكونيدية برتقالية اللون على حواف العصافات وبشكل خاص قرب قاعدة السنبيلة، (B) حبوب مصابة مجمعة مع وجود أبواغ كونيدية وخيوط فطرية وردية (اليسار) حبوب سليمة (اليمين)، (C) كتل سوداء عبارة عن الأجسام الثمرية (Scherm *et al.*, 2013; Matny, 2015).

9.1 - أهم الأمراض الناتجة عن الجنس *Fusarium* على القمح في سورية ومسبباتها والسموم التي تفرزها:

ينتشر مرض تعفن الجذور الشائع على القمح في جميع أنحاء العالم، وقد سُجِّلَ هذا المرض في عدد من المحافظات السورية (النائب وآخرون، 2002؛ الخليفة وآخرون، 2006؛ الشعبي وآخرون، 2015)، حيث تمَّ تعريف عدة أنواع فطرية مسؤولة عن تعفن جذور القمح في خمس محافظات سورية (إدلب، حماه، حلب، درعا، الحسكة) تتبع للأجناس التالية: *Fusarium* spp.، *Helminthosporium* spp.، *Alternaria* spp.، *Rhizoctonia* spp.، وقد سجلت عزلات *Fusarium* spp. أعلى تردد مقارنة مع باقي الأجناس، ومن خلال دراسة الخصائص المزرعية والمورفولوجية لتلك العزلات ومقارنتها مع 5 أنواع مُعرَّفة من ذات الجنس أشارت النتائج إلى وجود شبه بين بعض العزلات وبين الأنواع *F. avenaceum* و *F. culmorum* و *F. equiseti* و *F. poae* و *F. graminearum* (الخليفة وآخرون، 2006)، كما بينت نتائج تشخيص عزلات فطرية مأخوذة من السلامة تحت التاجية لنباتات قمح مصابة بمرض تعفن الجذور من محافظات (حماه، حلب، درعا، الحسكة، دير الزور) وجود الأنواع *F. equiseti* و *F. culmorum* و *F. proliferatum*، وذلك بالاعتماد على الصفات المورفولوجية والمزرعية أيضاً (الشعبي وآخرون، 2015)، وباستخدام تقانة التعدد الشكلي لأطوال القطع المضخمة AFLP تمَّ التفريق بين الأنواع *F. graminearum* و *F. poae* و *F. equiseti* و *F. culmorum* و *F. avenaceum* (El-Khalifeh et al., 2009).

أما بالنسبة لمرض لفحة السنابل والذي يُعدُّ أكثر خطورة وأهمية، فقد تمَّ تسجيل الإصابة به على سنابل القمح في منطقة سهل الغاب في سورية، وتمَّ فحص وتعريف عشرة أنواع متحصِّل عليها من العصافات والحبوب باستخدام الطرائق المورفولوجية وهي *F. culmorum*، *F. equiseti*، *F. sambucinum*، *F. moniliforme* (syn. *F. verticillioides*)، *F. proliferatum*، *F. avenaceum*، *F. crookwellense*، *F. solani*، *F. compactum* (الشعبي وآخرون، 2018)، وقد كان النوع *F. culmorum* هو الأكثر تردداً (الشعبي وآخرون، 2018)، وقد ظهرت أعراض هذا المرض بصورة واضحة على السنابل في الحقول الموبوءة خلال طور النضج المائي للحبوب وحتى نهاية الطور العجيني على هيئة نباتات فردية في بؤر صغيرة منفصلة في معظم الحالات، توضع في جانب واحد أو أكثر من الحقل، لاسيما في الأراضي المنخفضة ذات نسبة رطوبة مرتفعة، ولوحظ انتشار أكبر للمرض في حقول القمح ذات الكثافة النباتية المرتفعة في وحدة المساحة، وعلى سنابل النباتات التي تعرّضت سوقها للضجعان بعد هطول أمطار غزيرة، وتمثّل المرض على

السنايل الخضراء على هيئة اصفرار (لفحة) وقد أصاب سنبيلة واحدة في الغالب، أو سنبيلتين منفصلتين أو متجاورتين أو أكثر ضمن السنبيلة الواحدة، توزعت ما بين سنبيلة وسطى أو قمية، متناوبة أو متجمعة، ونادراً ما أصابت اللفحة كامل سنبيلات السنبيلة، وقد رافق ذلك تماوت داكن اللون (جرب) على عصابات بعض السنبيلات المصابة، وترافقت الإصابة بلفحة السنايل في معظم الأحيان بضمور الحبوب في السنبيلات المصابة، كما ظهرت نموات فطرية بيضاء أو وردية أو برتقالية اللون بكثافة على حواف عصابات السنبيلات المصابة وما بينها من الجهة الداخلية لا سيما على سنايل النباتات الكثيفة الراقدة والنامية قرب قنوات صرف المياه (الشعبي وآخرون، 2018). كما درس العظم (2007) درجة القرابة الوراثية بين عشرة أنواع متحصّل عليها من سنايل القمح باستخدام تقانة AFLP. وقد أجريت دراسة في إيطاليا، حيث تمت مقارنة بعض العزلات المتحصّل عليها من عينات حبوب قمح مأخوذة من عدة مناطق في سورية مع عزلات إيطالية من الجنس *Fusarium*، وباستخدام الصفات المورفولوجية وبعض التقانات الجزيئية حيث تمّ تعريف الأنواع *F. culmorum* و *F. graminearum* و *F. equiseti* و *F. tricinatum* و *F. pseudograminearum* و *F. proliferatum* و *F. verticillioides* و *F. oxysporum* و *semitectum* (Alkadri, 2012; Alkadri et al., 2013)، وقد أظهرت نتائج الدراسة التي قامت بها Alkadri وآخرون (2013) أنّ حبوب القمح القاسي كانت أكثر إصابة من حبوب القمح الطري، وأنّ الإصابة في الحقول المروية كانت أكبر من الإصابة في الحقول البعلية، وعند الكشف عن السموم الفطرية المنتجة من قبل عزلات الجنس *Fusarium* المتحصّل عليها وجد أنّ 6 سلالات من *F. graminearum* أنتجت كميات قليلة من Nivalenol (NIV) ($<3 \text{ mg/kg}$)، و 10 سلالات من *F. culmorum* أنتجت كميات كبيرة من التريكوثيسينات ($>100 \text{ mg/kg}$)، و 4 سلالات منها أنتجت NIV و 6 سلالات أنتجت deoxynivalenol (DON) و 3-acetyl-deoxynivalenol (3Ac-) (DON)، وكل العزلات المختبرة من *F. culmorum*، *F. graminearum*، *F. equiseti* ومعظم عزلات *pseudograminearum* تفرز الزيرالينون.

إنّ وجود سلالات من *Fusarium* منتجة للسموم الفطرية في الحبوب المجموعة من مناطق زراعة القمح في سورية يؤدي إلى زيادة المخاوف حول خطر مرض لفحة السنايل في سورية وزيادة المخاطر من التعرض لتلك السموم الفطرية نتيجة التغذية على تلك الحبوب ومنتجاتها، وبالرغم من أن نسبة وجود أنواع الجنس *Fusarium* في حبوب القمح في سورية منخفضة لكن يجب أن تتم مراقبتها، ويجب اتخاذ إجراءات زراعية تحدّ من خطر الإصابة بمرض لفحة السنايل، كتجنب زيادة الري بعد موجات الجفاف وعدم استعمال محصول الذرة في الدورة الزراعية (Alkadri et al., 2013).

1.10- طرائق تعريف أنواع الجنس *Fusarium*

1.10.1- الطرائق المورفولوجية:

إنّ التوصيف المورفولوجي للفطريات الممرضة للنباتات هو الخطوة الأولى والأكثر صعوبة في عملية التعريف، وهذا ينطبق بشكل خاص على الجنس *Fusarium* (Rahjoo et al., 2008)، فتعريف عزلات الجنس *Fusarium* بالاعتماد على صفاتها المورفولوجية قد يعطي نتائج دقيقة في بعض الأحيان (Nelson et al., 1983; Nelson et al., 1994; Leslie and Summerell, 2006)، لكنّه يحتاج خبرةً عاليةً وجهوداً كبيرة (Fredlund et al., 2008; Abedi-Tizaki and Sabbagh, 2012)، بالإضافة إلى وجود تشابه في بعض الصفات المورفولوجية بين بعض الأنواع كما هي الحال في النوعين *F. avenaceum* و *F. arthrosporioides* (Yli-Mattila et al., 2004). وزيادة على ذلك فإن وجود اختلاف بأنظمة التصنيف المطبقة من قبل الباحثين يؤدي إلى صعوبة تصنيف أنواع الجنس *Fusarium*، فمثلاً في الولايات المتحدة يستخدم الباحثون نظام التصنيف المقترح من قبل Hansen و Snyder الذي يشير إلى وجود تسعة أنواع للجنس *Fusarium*، بينما في أوروبا يستخدم الباحثون نظام التصنيف المقترح من قبل Wollenweber و Summerell and Reinking (Leslie, 2011).

يُستخدم في تصنيف أنواع الجنس *Fusarium* من الناحية المورفولوجية العديد من الصفات الأولية والثانوية (Leslie and Summerell, 2006; Nelson et al., 1994).

1.10.1- الصفات الأولية:

- **الأبواغ الكونيدية الكبيرة:** تلعب صفات الأبواغ الكونيدية الكبيرة أهمية كبيرة في التصنيف من حيث شكلها، وعدد الحواجز العرضية الموجودة فيها، وشكل الخلية القاعدية Basal cell والخلية القمية Apical cell، إضافة إلى نسبة الطول إلى العرض.
- **الأبواغ الكونيدية الصغيرة:** تلعب الأبواغ الكونيدية الصغيرة أيضاً دوراً هاماً في التصنيف من حيث شكلها ووجودها أو غيابها، كما أنّ لتوضع هذه الأبواغ على الخلايا المولدة لها أهمية كبيرة في التصنيف، حيث تتوضع بشكل مفرد أو في سلاسل أو في رؤوس كاذبة.
- **الأبواغ الكلاميدية:** يعدّ وجود الأبواغ الكلاميدية أو غيابها، وكذلك طريقة توضعها من الصفات الإضافية في التصنيف، حيث تكون مفردة أو مزدوجة أو في عناقيد أو في سلاسل، وقد تكون بينية أو طرفية على الميسيليوم الهوائي أو ضمن الأغار.

- **شكل الحوامل الكونيدية:** يلعب شكل الحوامل الكونيدية دوراً هاماً في التصنيف، فهي إما أن تكون وحيدة الفياليدات Monophialides أو متعددة الفياليدات Polyphialides، ويمكن لبعض أنواع الجنس *Fusarium* أن تشكّل كلا النوعين السابقين من الحوامل كما هي الحال عند الفطر *F. proliferatum*، هذا ويلعب طول الحوامل الكونيدية أيضاً دوراً هاماً في التصنيف.

1.10.1. 2- الصفات الثانوية:

تلعب الصفات الثانوية دوراً مهماً في التعريف مثل شكل المستعمرات ولونها، حيث تعدّ الأصبغة المنتجة من قبل بعض الأنواع من الصفات المهمة في التصنيف، ويتم تسجيل لون الأصبغة بعد أسبوع من التحضين. ومن الصفات الثانوية الأخرى المستخدمة والمهمة أيضاً هو معدل النمو، ويتم حسابه بعد ثلاثة أيام من التحضين في الظلام على الوسط PDA عند درجة حرارة 25°س و 30°س، فبعض الأنواع ذات معدل نمو بطيء مثل *F. lateritium* و *F. merismoides*، وبعضها ذات معدل نمو سريع مثل *F. culmorum* و *F. graminearum*، كما يلعب وجود أو غياب الأجسام الحجرية Sclerotia دوراً مهماً في التصنيف (Nelson et al., 1983; Burgess et al., 1994). هذا وتعدّ أيضاً السموم الفطرية التي تفرزها أنواع الجنس *Fusarium* ميزة ثانوية هامة في تعريف الأنواع (Leslie and Summerell, 2006).

إنّ المبدأ الأساسي في تعريف أنواع الجنس *Fusarium* مورفولوجياً هو استخدام نفس الأوساط المستخدمة من قبل الباحثين الذين صنّفوا تلك الأنواع، لأنّ الصفات المورفولوجية المعروفة لعزلات تنمو على بعض الأوساط قد تغيب أو تتبدّل عندما تُزرع نفس العزلة على وسط آخر (Leslie and Summerell, 2006).

1.10.1. 3- بعض الأوساط المستخدمة في تعريف أنواع الجنس *Fusarium*

لقد تمّ استخدام العديد من الأوساط الزراعية لعزل وتنمية وتبؤغ أنواع الجنس *Fusarium* ومن أهمها:

1.10.1. 3.1- وسط آغار الماء (WA):

يُستخدم هذا الوسط لإنبات الأبواغ الكونيدية للحصول على مزارع وحيدة البوغ لاستخدامها في الدراسات المختلفة، ويتميز هذا الوسط بأنّ نمو الخيوط الفطرية عليه يكون متناثراً، وبالتالي مناسب للحصول على أطراف خيوط فطرية Hyphal tips تُستخدم للبدء بتكوين مستعمرات جديدة، كما يُسهّل وسط آغار الماء عزل أنواع الجنس *Fusarium* من المواد النباتية وبشكل خاص من الجذور (Burgess et al., 1994).

1.10.1. 2 - وسط آغار البطاطا والديكستروز (PDA):

يُستخدم هذا الوسط بشكل أساسي لملاحظة الشكل المورفولوجي للمستعمرات المتشكلة والصبغات التي تنتجها ضمن الآغار، ولهذا الوسط أهمية كبيرة في تصنيف أنواع الجنس فيوزاريوم، حيث تنمو جميعها عليه بأشكالها وألوانها المختلفة، ولكن في بعض الأحيان قد يُعطي نتائج مُضللة عند استخدامه للتمييز بين بعض الأنواع، فالمستعمرات التي تبدو متشابهة يمكن أن تعود لأنواع مختلفة، والمستعمرات التي تبدو مختلفة قد تعود لنفس النوع. وبسبب غنى هذا الوسط بالكربوهيدرات، فإنه يشجع نمو الميسيليوم على حساب التبروغ، فالمستعمرات المنمّاة عليه ضعيفة التبروغ، وتستغرق عادةً لتتبروغ أكثر من شهر، ويكون شكل الأبواغ الناتجة غير نموذجي، لذلك لا يُستخدم هذا الوسط لدراسة الصفات المجهرية للفطر (Nelson et al., 1983; Burgess et al., 1994).

يمكن أن تحدث تغيّرات لأنواع الفطر *Fusarium* المنمّاة على الوسط PDA عند إعادة تجديد المستعمرات، فقد يؤدي إعادة تجديدها مع الوقت إلى حدوث تغيرات تدريجية وطفرات تمنع تعريف الأنواع، حيث يتغير شكل المستعمرة وشكل الأبواغ الكونيدية الكبيرة، ويمكن حل المشكلة بتقليل تجديد المستعمرات قدر الإمكان، وعدم تخزين الفطر على أوساط غنية بالكربوهيدرات مثل وسط PDA (Nelson et al., 1983; Burgess et al., 1994).

1.10.1. 3- وسط آغار قطع أوراق القرنفل (CLA):

تأتي أهمية هذا الوسط في نمو الجنس *Fusarium* بسبب محتواه المنخفض من الكربوهيدرات، ولأنه يحتوي على مركبات طبيعية مشابهة للمركبات التي يصادفها الفطر في الطبيعة، لذلك ينمو الفطر ويتبروغ بشكل مشابه للشكل الذي يوجد عليه على النباتات المضيفة (Nelson et al., 1983; Burgess et al., 1994).

يُشجع وسط آغار قطع أوراق القرنفل تبرّغ الفطر أكثر من تشجيع نمو الميسيليوم، وتتشكل الأبواغ الكونيدية الكبيرة بوفرة بعد 6-10 أيام من الزرع على وسادات بوعية على قطع القرنفل، وتكون موحدة في الشكل والحجم وتقترب من أشكالها الموجودة في الطبيعة، بينما تتشكل الأبواغ الكونيدية الصغيرة على الهيفات الفطرية النامية على الآغار، ويمكن على هذا الوسط ملاحظة طريقة توزيع الأبواغ الكونيدية الصغيرة، فيما إذا كانت على حوامل كونيدية وحيدة الفياليات أم حوامل كونيدية متعددة الفياليات، أو ضمن سلاسل أو رؤوس كاذبة، كما يمكن ملاحظة تشكل الأبواغ الكلاميدية على هذا الوسط (Nelson et al., 1983; Burgess et al., 1994; Leslie and Summerell, 2006).

إضافة للأوساط السابقة تُستخدم أوساط أخرى لتنمية ودراسة أنواع الجنس *Fusarium* منها آغار خاص فقير بالمواد الغذائية (SNA) ،Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA) ، Soil Agar (SA) ، KCl Agar (Leslie and Summerell, 2006).

1.10.2- الطرائق الجزيئية:

إنّ التعريف الدقيق لأنواع الجنس *Fusarium* أمر ضروري للتنبؤ بالخطر المحتمل للسلاسل المفترزة للسموم وبالتالي منعها من الدخول في السلسلة الغذائية (Jurado et al., 2006)، لذلك اعتمد الباحثون على الطرائق الجزيئية لكونها تتميز بالدقة والسرعة، وقد استُخدمت كطرائق مكتملة لطرائق التعريف المورفولوجية (Abedi- Tizaki and Sabbagh, 2012).

استُخدمت الطرائق الجزيئية لتعريف أنواع الجنس *Fusarium* التي لا يمكن تحديدها مورفولوجياً بشكل دقيق، وبشكل خاص أفراد المعقد *Gibberella fujikuroi* مثل *F. fujikuroi*، *F. proliferatum*، *F. verticillioides*، *F. sacchari* و *F. andiyazi* (Rahjoo et al., 2008;) (Hsuan et al., 2011).

استُخدمت العديد من التقانات المعتمدة على PCR في تفريق أنواع الجنس *Fusarium* منها تقانة "التعدد الشكلي لأطوال القطع المضخمة" Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)، حيث استُخدمت للتفريق بين أنواع الـ *Fusarium* المسببة لمرض تعفن الجذور في القمح (El-khalifeh et al., 2009)، وتقانة "الدنا المتعدد شكلياً المضخم عشوائياً" Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) (Yli-Mattila and Hyvönen, 1996)، كما استُخدمت تقانة تفاعل البوليميراز السلسلي بالزمن الحقيقي Real-Time PCR في تعريف وتقدير كمية الـ *Fusarium* في الطعام والعلف (Fredlund et al., 2008; Sanoubar et al., 2015).

سمح استخدام بعض المورثات مثل عامل الإستطالة والترجمة Translation Elongation Factor 1 α (TEF-1 α) بتعريف أنواع الجنس *Fusarium* بشكل دقيق، وتُظهر مستوى عالي من التباين في تسلسلات الأنواع القريبة من بعضها (Geiser et al., 2004)، وتتوفر العديد من تسلسلات TEF-1 α في قواعد البيانات تُسهّل تعريف أنواع الجنس فيوزاريوم مثل FUSARIUM-ID (<http://www.cbs.knaw.nl/fusa->) و Fusarium MLST (<http://isolate.fusariumdb.org>) (rium)، ومن المورثات المستخدمة في تعريف أنواع الجنس *Fusarium* أيضاً مورثة calmodulin و β -tubulin (Mulé et al., 2004; Summerell and Leslie, 2011).

تمّ تطوير بعض البادئات المتخصصة specific primers بتعريف بعض الأنواع، ولكن لم يتم توسيع نطاق اختبارها في معظم الحالات، كما أنّه لم يتم إثبات موثوقيتها بالنسبة للسلاسل المأخوذة من محاصيل ومناطق جغرافية مختلفة (Rahjoo et al., 2008).

استُخدمت البادئات المتخصصة في العديد من الدراسات لتعريف أنواع الفيوزاريوم من قبل بعض الباحثين، حيث تمّ تعريف الأنواع *F. proliferatum* و *F. subglutinans* و *F. verticillioides* التي تصيب الذرة بالاعتماد عليها (Mulé et al., 2004)، كما عرّف Abedi-Tizaki و Sabbagh (2012) العديد من أنواع الفيوزاريوم التي تصيب القمح منها *F. culmorum* و *F. graminearum* و *F. poae* و *F. equiseti* وغيرها وذلك بالاعتماد على البادئات المتخصصة أيضاً.

1.1- السموم الفطرية Mycotoxins:

السموم الفطرية هي مركبات سامة تُنتج من قبل بعض الفطريات خلال عمليات الاستقلاب الثانوي، وتُسبب ضرراً للإنسان والحيوان، وتوجد غالباً في المنتجات الزراعية، وتُشكّل خطراً على سلامة الغذاء (Nelson et al., 1994; Marasas et al., 2008).

تُعدّ السموم الفطرية من أقوى السموم المعروفة، ويرجع السبب إلى أن هذه السموم ذات أوزان جزيئية منخفضة، كما أنّها تُعدّ غير مستضدية أي لا تحفّز الجهاز المناعي للإنسان والحيوان لإنتاج الأجسام المضادة لها، فضلاً عن مقاومة بعض أنواعها لدرجات الحرارة العالية، وبالتالي لا تتحطم بتعريضها لها (وهبة والنسر، 2010).

بدأت قصة السموم الفطرية في الأربعينات من القرن الماضي، إذ حدثت وفاة جماعية في روسيا وتناولتها الصحف، ولم تُعرف الأسباب حينئذ، وأشارت الدراسات فيما بعد أنّ التلوّث الغذائي بسموم التريكوثيسينات كان السبب وراء موت الآلاف في روسيا في ذلك الوقت (مطني، 2014).

تنتمي الفطريات التي تُنتج السموم الفطرية غالباً إلى أحد الأجناس التالية: *Fusarium*، *Penicillium*، *Aspergillus* (Logrieco and Moretti, 2008; Marasas et al., 2008).

تُعدّ صفة إنتاج السموم صفة بارزة للجنس *Fusarium* (Summerell and Leslie, 2011)، حيث تُنتج أنواعه مجموعات متعددة من السموم منها *Fumonisin*، *trichothecenes*، *Desjardins and Proctor, 2007*؛ *Fusarins*، *Enniatins*، *Beauvericin*، *Zearalenones* (Fink-Gremmels, 2008).

يعتمد وجود السموم الفطرية على العديد من العوامل مثل سلالة الفطر والظروف المناخية والجغرافية ومستوى قابلية النبات العائل وغيرها (Pancaldi *et al.*, 2010; Ferrigo *et al.*, 2016). إن وجود السموم الفطرية في القمح يثير قلقاً كبيراً في جميع أنحاء العالم لأنه من المستحيل تجنب وجودها في الغذاء والعلف (Logrieco and Moretti, 2008)، ويؤدي التغذية على حبوب ملوثة بنسب مرتفعة من السموم الفطرية إلى تأثيرات حادة ومزمنة للإنسان والحيوان (Peracia *et al.*, 1999).

1. 11. 1- أهم السموم الفيوزاريومية

دخل علم السموم الفطرية للجنس *Fusarium* عصر المورثات مع نهاية القرن العشرين، وقد سُجل اكتشاف العنقود المورثي للتركيب الحيوي للعديد من السموم الفطرية منها التريكوثيسينات Trichothecenes والفيومينوزينات Fumonisin والإنياتين Enniatins التي تفرزها بعض أنواع الجنس *Fusarium*، كما أصبحت قواعد بيانات التسلسل النيكليوتيدي لبعض المورثات للعديد من أنواع الفيوزاريوم المفزة للسموم الفطرية متوفرة (Desjardins and Proctor, 2007)، وتنتج أنواع الجنس *Fusarium* سموماً تنتمي إلى أهم ثلاث مجموعات وهي التريكوثيسينات والفيومينوزينات والزيرونيون (Summerell and Leslie, 2011)، وحسب بعض الدراسات تُعدّ التريكوثيسينات والفيومينوزينات الزمرتان الرئيسيتان من السموم الفيوزاريومية المتواجدة في الغذاء (Sweeney and Dobson, 1998)، وفيما يلي بعض مجموعات السموم التي تفرزها بعض أنواع هذا الجنس:

1. 11. 1 - سموم التريكوثيسينات Trichothecenes:

تُعدّ التريكوثيسينات أكثر السموم الفطرية المنتجة من قبل بعض أنواع الفيوزاريوم قوة من حيث ارتباطها بحدوث التسمم المزمن والقاتل للإنسان والحيوانات (Desjardins and Proctor, 2007)، وهي مجموعة سموم تُنتج من قبل العديد من أجناس الفطريات منها *Fusarium*، *Trichoderma*، *Myrothecium*، *Stachybotrys*، *Trichothecium*، *Verticimonosporium*، *Cephalosporium* (مطني، 2014؛ McCormick *et al.*, 2011)، وقد سُميت بهذا الاسم بعد اكتشاف المركب (تريكوثيسين Trichothecin) من الفطر *Trichothecium roseum* عام 1948 (Desjardins *et al.*, 1993).

تُشكّل التريكوثيسينات أكبر مجموعة من السموم الفطرية معروفة حتى هذا التاريخ، وتتكوّن من أكثر من 200 مركباً كيميائياً، وتنتمي هذه المجموعة حسب تركيبها الكيميائي إلى مركبات السييسكوتيربين

Sesquiterpene compounds. تملك التريكوثيسينات حلقة إيبوكسي بين ذرتي الكربون 12 و13 والتي تُعدّ الجزء الفعّال لإعطاء هذه السموم الفعل السام (McCormick et al., 2011؛ مطني، 2014).

تُعدّ التريكوثيسينات من المثبطات القوية لتصنيع البروتينات، وهي سهلة الامتصاص وذات تأثير كبير على الجلد مقارنة مع السموم الأخرى، كما أنّها سهلة الامتصاص عن طريق الجهاز الهضمي. وتتمثل أعراض التسمم بسموم التريكوثيسينات برفض الغذاء والتقيؤ والإسهال، وفقدان الوزن، واضطرابات عصبية، وأضرار بالأوعية الدموية والقلب، وتثبيط الجهاز المناعي، واحتقان الجلد، وضعف الإخصاب، وأضرار في نخاع العظم، كما تُعدّ التريكوثيسينات من المركبات السامة للخلايا النباتية حيث تثبّط نمو الجذور وتسبب شحوب وتقزم النبات (مطني، 2014; Bennett and Klich, 2003; McCormick et al., 2011).

دخلت سموم التريكوثيسينات مجال الأسلحة البيولوجية، وإنّ أكثر السموم المتعلّقة بهذه الأسلحة هي DON و T-2 toxin و Diacetoxyscirpenol (مطني، 2014).

تُقسم سموم التريكوثيسينات إلى أربع مجاميع رئيسية تبعاً للتركيب الكيميائي لها وهي (A، B، C، D) (McCormick et al., 2011). هذا وتقرّر بعض أنواع الفيوزاريوم سموماً تتبع للمجموعتين A و B (Bennett and Klich, 2003):

المجموعة A: وهي المجموعة الأكثر سمية، ومن السموم التي تنتمي لها T-2 toxin، HT-2 toxin، Neosolaniol (NEO)، Diacetoxyscirpenol (DAS) (McCormick et al., 2015; Tamura et al., 2011).

• HT-2 toxin، T-2 toxin: عُرف هذان السمّان تاريخياً بأنهما سبب مرض ندرة أو نقص الكريات البيض في الإنسان (ATA) Alimentary Toxic Aleukia. وقد ظهر هذا المرض في الاتحاد السوفياتي سابقاً في الفترة الممتدة بين 1941-1947، وقد نتج عن تناول حبوب متعفّنة مخزونة خلال فترة الشتاء، ومن الأنواع المنتجة لهذه السموم *F. sporotrichioides*، *F. poae*، *F. tricinctum*، وتتواجد هذه الأنواع وسمومها على محاصيل الحبوب كالقمح والذرة الصفراء والشعير والشوفان، وتظهر أعراض مرضية أخرى عند تناول غذاء ملوّث بهما تتمثل بفقدان الوزن، ورفض الغذاء والتقيؤ، والتهاب الجلد، وإسهال ونزف داخلي، وتقرح لكل من المعدة وبطانة الأمعاء الداخلية والطحال ونخاع العظم (Bennett and Klich, 2003؛ مطني، 2014).

- **(DAS) Diacetoxyscirpenol**: يُنتج هذا السمّ من قبل بعض أنواع الجنس *Fusarium* منها *F. verticillioides* ، *F. equiseti* ، *F. sambucinum* ، *graminearum*. يُسبب هذا السمّ أعراضاً مرضية على حيوانات التجارب تتمثل بتقرح في الطحال ونخاع العظم والعقد اللمفاوية وبطانة الجهاز الهضمي، ولوحظ عند تغذية الحيوانات على غذاء ملوث به وجود متبقيات السم في الكبد والكلية والطحال ونخاع العظم، وهذا السم غير مسرطن أو محفز للسرطان، وليس له فعل تطفيري على الحمض النووي لكن يسبب أعراض تقرح للجلد عند ملامسته، وتقرح الفم ونزف من الأنف والفم واضطراب الجهاز العصبي المركزي، كما يؤثر على عملية التناسل ويسبب ضعف الجهاز المناعي، وبالنسبة للنباتات فهو يؤثر على خلايا النباتات ويسبب موتها (مطني، 2014).

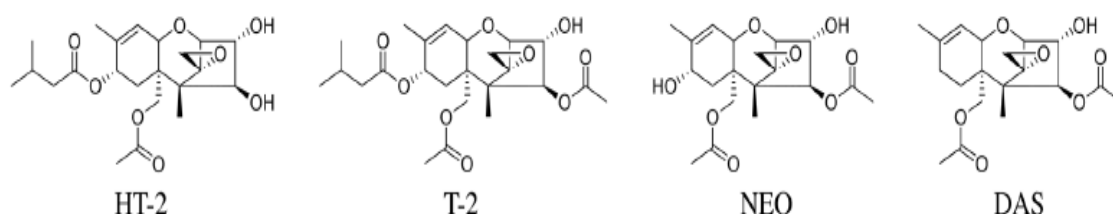
المجموعة B: تُعدّ هذه المجموعة أقلّ سمّية من المجموعة السابقة، لكنّها المجموعة الأكثر تلويثاً لمحصول القمح (Wegulo, 2012) ، ومن السموم التي تنتمي لها *Nivalenol* (NIV)، *Fusarenon-x* (FUX)، *Deoxynivalenol* (DON)، *3-acetydeoxynivalenol* (3ADON) و *15-acetydeoxynivalenol* (15ADON) (Tamura et al., 2015; Foroud and Eudes,) (2009; McCormick et al., 2011).

- سم *Deoxynivalenol* (DON): ويُسمّى أيضاً السمّ المُقيء *Vomitoxin* (Rotter et al., 1996)، يُنتج هذا السمّ بصورة رئيسية من قبل *F. culmorum* و *F. graminearum* ، وهناك أنواع تُعدّ منتجات ثانوية له هي *F. poae* و *F. verticillioide* و *F. proliferatum* . إنّ أغلب الأنواع السابقة ممرضة للنباتات وتنتج السم أثناء إصابتها للنبات في الحقل، وتتطوّر الإصابة في المخزن على المحصول المصاب مما يزيد من إنتاج وتراكم السمّ فيه، وهو أكثر السموم الفطرية الشائع وجودها في الحبوب، ويتواجد هذا السم على محاصيل القمح والشعير والذرة البيضاء والصفراء والشوفان (Bennett and Klich, 2003; مطني ، 2014).

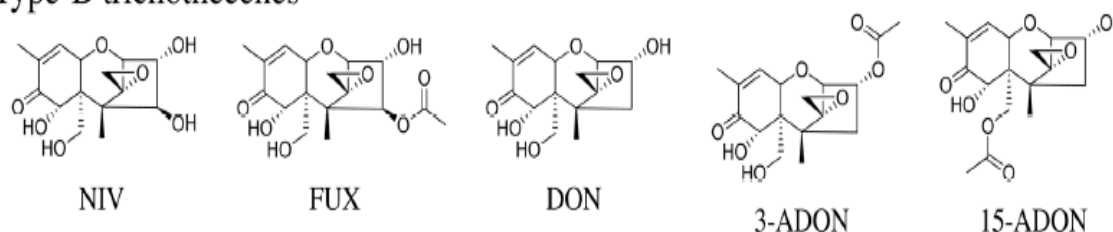
لا يُعدّ سمّ DON من المركبات المسرطنة أو المحفزة للسرطان، ولكنه يؤثر في الإنسان والحيوان باعتباره مثبّطاً قوياً لتصنيع البروتينات (Rotter et al., 1996)، ويؤثر بشكل مباشر على الدماغ، كما يسبب اضطراب التغذية وقلة الشهية، ويسبب أيضاً تهيج الجهاز الهضمي والإصابة بقرحة المريء والمعدة، وتنتقل مركبات الأيض الثانوي لهذا السم عبر المنتجات الحيوانية كبيض الدجاج وحليب الأبقار عند التغذية على أعلاف ملوثة به (مطني، 2014).

- سمّ Nivalenol (NIV): سُمّي بهذا الاسم لأنه عزل لأول مرّة من الفطر *F. nivale*، ويُنتج بشكل رئيسي من قبل الأنواع *F. poae*، *F. crookwellence*، كما يُفرَز من قبل أنواع أخرى مثل *F. graminearum* و *F. culmorum* (Zhang et al., 2007)، ويتواجد في القمح والشعير والذرة الصفراء والشوفان، ويسبب تثبيط تصنيع البروتينات والحمض النووي، وهو غير مسرطن أو محفز للسرطان لكن له تأثير مثبط للجهاز اللمفاوي. تتمثل أعراض الإصابة بحدوث إسهال، واحتقان الرئتين والجهاز الهضمي، وتحطم في نخاع العظم، وزيادة وزن الكبد والطحال وانخفاض وزن الجسم (مطني، 2014)، هذا ولا تُعدّ المنتجات الحيوانية مصدراً هاماً لهذا السمّ (Jonker and Stephany, 1999).

Type-A trichothecenes



Type-B trichothecenes



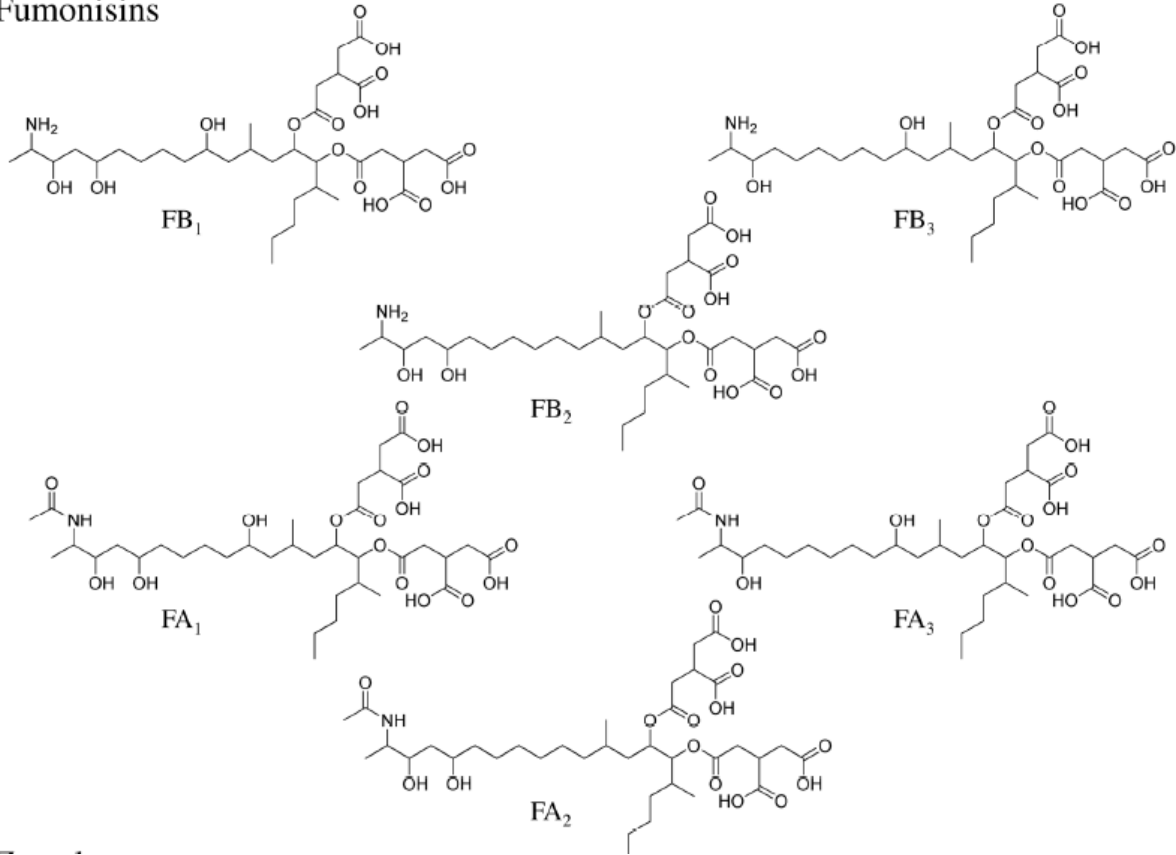
الشكل 8-1: الصيغة الكيميائية لبعض التريكوثيسينات: HT-2 toxin=HT-2، T-2 toxin=T-2، NEO = NIV، fusarenon-X= FUX، nivalenol= NIV، diacetoxyscirpenol = DAS، neosolaniol =DON، 15-acetyl deoxynivalenol=15-ADON، 3-acetyl deoxynivalenol=3-ADON، deoxynivalenol (مطني، 2014)

1. 11. 2 - الفيومونوزينات Fumonisin

من الأنواع التي تفرز هذه السموم *F. proliferatum* و *F. verticillioides* (Tamura et al., 2015)، *F. anthophilum*، *F. nygamai* (مطني، 2014)، *F. solani* و *F. fujikuroi* (Shi et al., 2017).

تُقسم هذه المجموعة إلى عدّة أنواع: مجموعة A وتضم Fumonisin A1، Fumonisin A2، Fumonisin A3. المجموعة B وتضم Fumonisin B1، Fumonisin B2، Fumonisin B3. والمجموعة C (Tamura *et al.*, 2015).

Fumonisin



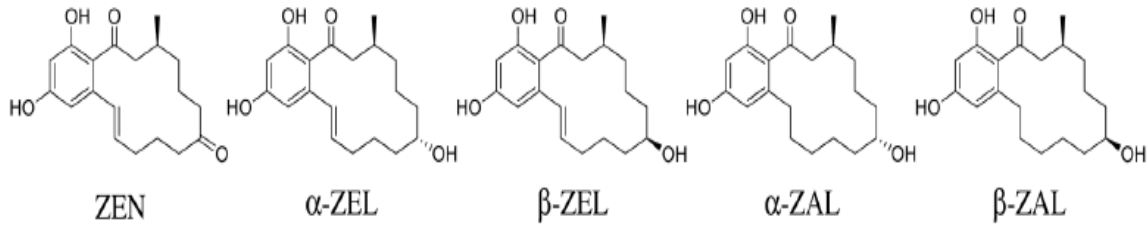
الشكل 1-9: الصيغة الكيميائية لبعض سموم الفيومينوزينات ، Fumonisin B2= FB2، Fumonisin B1=FB1 ، Fumonisin A3= FA3، Fumonisin A2=FA2 ، Fumonisin A1= FA1، Fumonisin B3=FB3 (مطني، 2014)

عُرفت هذه السموم عام 1970 عندما حدثت في جنوب أفريقيا حالة وبائية لمرض ELEM Leukoencephalomalacia في الخيول بعد تغذيتها على حبوب ذرة صفراء مصابة بالفطر *F. verticillioides*، وتسبب هذه السموم مشاكل في الجهاز التنفسي، وسرطان المريء (Bennett and Klich, 2003)، وسجلت حالات وبائية في الهند عام 1995 تمثلت بالإسهال وآلام في الجسم نتيجة التغذية على حبوب ذرة صفراء وبيضاء مصابة بتركيزات عالية من الفيومونوزينات، ولهذه المجموعة من السموم تأثير سامّ يضافاً على خلايا النباتات Phytotoxic، حيث أشارت العديد من الدراسات إلى أنّها تُسبب أضراراً في أغشية الخلايا وخلايا الميزوفيل، وتختزل النمو الخضري والجذري والوزن الجاف للنباتات المتعرضة للسم (مطني، 2014).

1. 11. 1. 3- الزيرالينون Zearalenone:

يُنتج هذا السم من قبل العديد من أنواع *Fusarium* منها *F. culmorum* و *F. graminearum* (Bosch and Mirocha, 1992; Tamura et al., 2015)، *F. crookwellens* (مطني، 2014)، ويتواجد هذا السم ملوثاً لمحاصيل الحبوب منها القمح والشعير والذرة والشوفان، ويسبب انخفاضاً في نسبة الإخصاب عند الحيوانات التي تتغذى على علائق ملوثة به، كما يؤثر على الأجهزة التناسلية، ويؤدي إلى تضخمها بشكل غير طبيعي، هذا ويسبب أيضاً ضعفاً في الجهاز المناعي، وله تأثيرات مطفرة، ويؤثر في الكبد (مطني، 2014).

Zearalenone-group



الشكل 10-1: الصيغة الكيميائية للزيرالينون وبعض مشتقاته: ZEN = zearalenone، α-ZEL = α-zearalenol، β-ZEL = β-zearalenol، α-ZAL = α-zearalanol، β-ZAL = β-zearalanol.

1. 11. 1. 4- سم Moniliformin:

يُنتج من قبل العديد من أنواع الجنس *Fusarium* منها *F. proliferatum*، *F. verticillioides*، *F. subglutinans*، ويُعد من السموم التي تؤثر بشكل مباشر على عضلة القلب مسببة تضخم البطين (مطني، 2014).

1. 11. 1. 5 - سم Beauvericin:

عُزل هذا السم لأول مرة من الفطر *Beauveria bassiana*، ويُفرز أيضاً من قبل بعض أنواع الجنس *Fusarium*، وله تأثير قاتل للحشرات، وله أيضاً فعالية قاتلة على أنواع البكتيريا السالبة والموجبة الغرام والخمائر وبعض أنواع الفيروسات، ولهذا السم فعالية مضادة لسرطان الدم (لوكيميا)، إذ يعمل على زيادة نفاذية أغشية خلايا اللوكيميا السرطانية لأيونات Ca^{2+} وزيادة مستواه في الخلايا والذي يؤدي بدوره إلى موت الخلية (مطني، 2014).

1. 11. 1 - Fusaric acid سم

يُنتج هذا السم من قبل بعض أنواع الجنس *Fusarium* ومنها *F. oxysporum* و *F. fujikuroi* (مطني، 2014)، و *F. proliferatum*، *F. verticillioides*، *F. solani*، *F. tricinctum*، *F. equiseti*، *F. andiyazi*، *F. subglutinans* (Shi et al., 2017)، ولهذا السم تأثيرات سامة على أنسجة النباتات، ويُعدّ عاملاً مثبطاً لتضاعف الخلايا والحمض النووي، ويبين الجدول (3-1) بعض أنواع الجنس *Fusarium* التي تصيب القمح وبعض أنواع السموم الفطرية التي تفرزها (Matny, 2015).

الجدول 3-1: بعض أنواع الجنس *Fusarium* وبعض أنواع السموم الفطرية التي تفرزها (Matny, 2015)

النوع	السموم الفطرية
<i>F. graminearum</i>	DON, NIV, ZEN,
<i>F. avenaceum</i>	MON, ENS, BEA
<i>F. culmorum</i>	DON, ,NIV, ZEN
<i>F. poae</i>	NIV, FUS, BEA, DAS
<i>F. equiseti</i>	DAS, ZEN
<i>F. tricinctum</i>	MON
<i>F. cerealis</i>	NIV, FUS, ZEN
<i>F. sporotrichioides</i>	T2, NEO, HT2,
<i>F. acuminatum</i>	T2, NEO
<i>F. subglutinans</i>	MON

BEA = Beauvericin; DAS = Diacetoxyscirpenol; DON = Deoxynivalenol (Vomitoxin); ENS = Enniatins; FUS = Fusarenone-X; HT2 = HT-2 toxin; MON = Moniliformin; NEO = Neosolaniol; NIV = Nivalenol; T2 = T-2 toxin; ZEN = Zearalenone

1. 11. 2 - طرائق الكشف عن السموم الفطرية

تتوفّر العديد من الطرائق الدقيقة والحساسة للكشف عن السموم الفطرية منها طرائق تقليدية Classical methods، وطرائق حديثة Emerging Methods (Pascale and Visconti, 2008). تقسم الطرائق التقليدية إلى:

1 تقانات الكروماتوغرافيا (Pascale and Visconti, 2008) Chromatographic Techniques مثل:

- كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (Thin Layer Chromatography (TLC): تعدّ أول تقانة استخدمت في فصل المركبات الكيميائية منذ عام 1958 بشكل نقي ومنها السموم الفطرية، ولا تزال تستخدم في المختبرات كتحليل روتيني وخاصة في البلدان النامية.
- الكروماتوغرافيا الغازية (Gas Chromatography (GC): وتُستخدم للكشف عن السموم الفطرية التي لها القدرة على التحول إلى مركبات غازية أثناء تعريضها لدرجات حرارة عالية.
- الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (High Performance Liquid Chromatography (HPLC): تُستخدم لفصل المركبات وتشخيصها نوعاً وتقديرها كمياً، وتتميز بأنها دقيقة النتائج وتحسّس التراكيز الضئيلة جداً، لكنّها مكلفة نسبياً ومعقّدة.
- الكروماتوغرافيا السائلة مع مطياف الكتلة (Liquid Chromatography/Mass Spectrometry (LC/MS).

2 تقانات مناعية (Pascale and Visconti, 2008) immunological techniques: وتعتمد هذه

- التقانات بشكل أساسي على وجود الأجسام المضادة للسمّ المراد الكشف عنه ومن هذه التقانات:
- تقانة إيزا (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA، وهي من الطرائق الشائعة في تقدير السموم الفطرية كمياً ونوعاً، حيث استُخدمت في مجال السموم الفطرية منذ أكثر من ثلاثة عقود.
- الأشرطة المناعية (Immuno strip): وهي من الاختبارات ذات الخطوة الواحدة، وهي سهلة وبسيطة ولا تتطلب أجهزة أو كواشف.

أما الطرائق الحديثة للكشف عن السموم الفطرية فتتضمّن العديد من التقانات منها:

تفاعل بوليميراز السلسلي (PCR) Polymerase Chain Reaction: تستخدم هذه الطريقة في الكشف عن العزلات الفطرية المنتجة للسموم الفطرية من خلال التحري عن المورثة المسؤولة عن إنتاج السمّ الفطري في الحمض النووي للفطر، ويُستخدم لذلك بادئات متخصصة مصمّمة خصيصاً لكل نوع من السموم الفطرية المراد الكشف عنه، وتتخصّص الطريقة بتنقية الحمض النووي للفطريات المراد اختبار مقدرتها على إنتاج السمّ الفطري، وباختيار البادئ المناسب (المخصص للكشف عن السمّ المستهدف)، وباستخدام تقانة PCR يتم معرفة العزلات المنتجة للسمّ من خلال إعطائها نتيجة موجبة (وجود حزمة على هلام الأغاروز) (مطني، 2014)، وقد دُرست العديد من المورثات التي تشترك في المسار الحيوي

لتصنيع السموم الفطرية لتمييز أنواع الجنس *Fusarium* المفرزة للسموم من الأنواع غير المفرزة لها، وقد ذكرت العديد من الأبحاث استخدام المورثات المفتاحية لتركييب بعض السموم الفطرية في تمييز أنواع الجنس *Fusarium* المفرزة لتلك السموم (Atoui et al., 2011)، فعلى سبيل المثال استُهدفت المورثة *TRI5*، وهي المورثة المفتاحية لإنتاج سموم التريكوثيسينات في اختبارات الـ PCR للكشف عن أنواع الفيوزاريوم المفرزة لهذه السموم في القمح، وقد تمّ تطوير واستخدام العديد من البادئات للكشف عن هذه المورثة منها *TRI5 F/R*، *TOX5 1/2* (Niessen and Vogel, 1998; Doohan et al., 1999)، ومن المورثات التي تشترك أيضاً في التخليق الحيوي لسموم التريكوثيسينات، والتي استُخدمت في الكشف عن الأنواع المنتجة لهذه السموم، المورثة *TRI6* (Bluhm et al., 2002). كما تمّ الكشف عن الأنواع المنتجة لسموم الفيومينوزينات من خلال الكشف عن المورثات التي تشترك في التخليق الحيوي لهذه السموم ومنها *FUM1* (كانت تُسمّى سابقاً *FUM5*)، وذلك باستخدام بادئات متخصصة (Bluhm et al., 2004; Bluhm et al., 2002). هذا وقد استخدم بعض الباحثين تقانة Multiplex PCR، والتي تعتمد على استخدام عدد من البادئات في نفس التفاعل، لتمييز أنواع الجنس *Fusarium* المفرزة للسموم من الأنواع غير المفرزة لها ومنهم Bluhm وآخرون (2002)، حيث استخدموا بادئات متخصصة بالكشف عن بعض المورثات المرتبطة بإنتاج سموم التريكوثيسينات والفيومينوزينات في نفس التفاعل وذلك للكشف عن الأنواع المنتجة لهذه السموم بشكل متزامن.

الفصل الثاني

المواد والطرائق Materials and Methods

المواد والطرائق Materials and Methods

1.2 - جمع العينات:

نُفِّذَ المسح الحقلّي خلال شتاء وربيع 3 مواسم (2017، 2018، 2019)، وجمعت عينات من جذور وتاج وساق وسنابل نباتات قمح ظهر عليها أعراض تعفن الجذور الشائع ولفحة السنابل، وذلك بشكل عشوائي من مناطق مختلفة تابعة لمحافظة (طرطوس، حماه، السويداء، اللاذقية)، ووضعت في أكياس من البولي إيثيلين، وكتب عليها المعلومات اللازمة مثل مكان وتاريخ الجمع، ونُقلت إلى المختبر.

2.2- الفحص الظاهري للعينات:

تم وصف الأعراض الظاهرية الموجودة على كل عينة، ومقارنتها مع المراجع المختصة وتصويرها.

2.3- الأوساط المستخدمة في عزل وتعريف أنواع الجنس *Fusarium*:

استُخدم في هذه الدراسة ثلاثة أوساط مغذية لعزل الفطر، والحصول على مستعمرات من أبواغ مفردة، ودراسة الصفات المزرعية، والصفات المجهرية.

• وسط آجار الماء (Water Agar (WA):

حُضِرَ هذا الوسط بإذابة 20 غراماً من الآغار في 1 لتر من الماء المقطر في دورق زجاجي، بعدها تمّ تعقيم الوسط بالأوتوغلّاف بدرجة حرارة 121 °س، وبضغط 1.1 بار لمدة 20 دقيقة، ثمّ بُرد الوسط قليلاً وأضيف إليه المضادات الحيوية Ampicillin (500µg/ml) و Streptomycin (500 µg/ml).

• وسط بطاطا ديكستروز آجار (Potato Dextrose Agar (PDA):

حُضِرَ هذا الوسط بإذابة 39 غراماً من المستحضر الجاهز في 1 لتر من الماء المقطر في دورق زجاجي، بعدها تمّ تعقيم الوسط بالأوتوغلّاف بدرجة حرارة 121 °س، وضغط 1.1 بار لمدة 20 دقيقة، ثمّ بُرد الوسط قليلاً وأضيف إليه المضادات الحيوية Ampicillin (500 µg/ml) و Streptomycin (500 µg/ml).

• وسط آجار قطع أوراق القرنفل (Carnation Leaf Piece Agar (CLA):

جمعت أوراق فتية من نباتات القرنفل، قُطعت إلى قطع صغيرة، جُففت في الفرن الكهربائي عند درجة حرارة 50°س لمدة ساعتين، وُضعت الأوراق المجففة في أوراق من الألمنيوم، وطُويت جيداً لمنع وصول الرطوبة إليها، وعُقدت بجهاز الأوتوغلّاف عند درجة حرارة 121°س وضغط 1.1 بار لمدة 20 دقيقة، ثم وُزعت على أطباق بتري تحتوي وسط آجار الماء المعقم والمبرد، وذلك حسب Burgess وآخرون (1994).

2.4 - عزل أنواع الجنس *Fusarium* وتنقيتها:

غُسِلَت الجذور ومنطقة التاج جيداً لإزالة الأتربة العالقة عليها، قُطِّعت إلى قطع صغيرة، غُوِملت بالكحول الإيثيلي تركيز 70 % لمدة دقيقة، غُسِلَت جيداً بالماء المقطر والمعقم، غُوِملت بمحلول هيبوكلوريت الصوديوم تركيز 3 % لمدة 5 دقائق، غُسِلَت مرتين بالماء المعقم، جُفِفت على ورق نشاف، ثم وُزعت في أطباق بتري تحوي الوسط المغذي PDA المضاف إليه المضادات الحيوية Ampicillin (500 µg/ml) و Streptomycin (500 µg/ml)، وبمعدل أربع إلى خمس قطع في كل طبق. وبالنسبة للسنابل المصابة، تم عزل الفطر منها بشكل مباشر من كتل الأبواغ الكونيدية البرتقالية اللون المتشكلة على السنابل، وحُصِنَت الأطباق عند درجة حرارة 23 ± 1 °س لمدة ثلاثة إلى سبعة أيام، ثم تَمَّت تنقيتها بنقلها إلى أطباق جديدة.

2.5 - الحصول على مزرعة وحيدة البوغ Single spore colony:

حُضِرَ معلق من الأبواغ الكونيدية لكل من العزلات المتحصل عليها في هذه الدراسة، وأُخذت قطرة من المعلق بواسطة إبرة عزل معقمة، وأُجري تخطيط متعرج في طبق بتري يحتوي الوسط Water Agar (WA)، ومن خلال الفحص بالمجهر الضوئي بعد 24 ساعة، تم تحديد أماكن وجود أبواغ مفردة نابثة، وتم نقل كل منها على مربع صغير من الآغار إلى طبق بتري جديد يحتوي على الوسط PDA، وحُصِنَت الأطباق عند 25 °س لمدة 7-14 يوماً (Burgess et al., 1994).

بعد الحصول على مزارع وحيدة البوغ، تم تلقيح أطباق بتري حاوية على الوسط PDA بوضع قرص مأخوذ من حواف مستعمرة حديثة النمو في منتصف الطبق، وبالنسبة للأطباق المحتوية على CLA يوضع قرص التلقيح قريباً من قطع أوراق القرنفل.

2.6 - حساب سرعة النمو الخطية:

تم تلقيح وسط الأطباق المحتوية على الوسط PDA بأقراص منتظمة بقطر 5 مم من مزارع فطرية بعمر 7 أيام وبمعدل ثلاثة مكررات لكل عزلة، وحُصِنَت في الظلام لمدة ثلاثة أيام عند درجتي الحرارة 25 °س و 30 °س (Burgess et al., 1994; Leslie and Summerell, 2006)، وحُسِب قطر المستعمرات بعد 3 أيام من التحضين بعمل خطين متعامدين على قاعدة الطبق، وقياس كلٍّ منهما وأخذ المتوسط.

2.7 - تعريف أنواع الجنس *Fusarium* بالاعتماد على الصفات المورفولوجية:

دُرِست الخصائص المزرعية لـ 105 عزلات على الوسط PDA من حيث شكل المستعمرات ولونها، والصبغات التي تنتجها ضمن الآغار بعد 10-14 يوماً من التحضين عند درجة الحرارة 25 °س في الظلام. كما دُرِست الخصائص الشكلية للأبواغ الكونيدية الكبيرة Macroconidia المتشكلة ضمن وسادات

بوغية على قطع أوراق القرنفل، لأنّ هذه الأبواغ تكون موحدة في الشكل، وفي حال ظهور عدد قليل من الأبواغ الشاذة تم تجاهلها. وُدُرس أيضاً صفات الأبواغ الكونيدية الصغيرة *Microconidia* في حال تشكّلها، وكيفية توضعها بعد 6 – 10 أيام من التحضين على وسط آجار قطع أوراق القرنفل CLA عند درجة الحرارة 25°س. تمّ تكرار فحص المزارع كل أسبوع أو أسبوعين لمراقبة تشكّل الأبواغ الكلاميدية، وكيفية توضعها عند العزلات المختلفة، وُحددت أنواع الفيوزاريوم المتحصل عليها باستخدام المفاتيح التصنيفية المعتمدة (Nelson et al., 1983; Burgess et al., 1994; Leslie and Summerell, 2006).

2.8- اختبار القدرة الإراضية لعزلات بعض أنواع الجنس *Fusarium*

تم اختبار القدرة الإراضية لـ 20 عزلة تتبع 8 أنواع من الجنس *Fusarium*: *F. culmorum* (4), *F. pseudograminearum* (3), *F. equiseti* (3), *F. proliferatum* (3), *F. oxysporum* (2), *F. andiyazi* (1), *F. semitectum* (2), *F. verticilloides* (2).

استخدمت أنابيب بقطر 2.5 سم وارتفاع 16 سم، حيث تم ملؤها بخليط من التربة مكون من رمل وتربة وتورب (50: 40: 10 ح/ح/ح) على الترتيب حتى مستوى 5 سم من فوهة الأنبوب. وضعت قطعة بقطر 1 سم من الوسط المغذي، مأخوذة من محيط المزرعة الفطرية بعمر 7 أيام، على سطح التربة في الأنبوب. وضعت بذور القمح القاسي *Triticum durum* Desf. من الصنف (دوما 1) القابل للإصابة على ورق نشاف مرطب في أطباق بتري لمدة 3 – 4 أيام حتى بدء الإنبات. وضعت بذرة واحدة نابتة على قطعة الآغار، وتمت تغطيتها بخليط التربة بسماكة 2 سم. تم إجراء نفس العملية في أنابيب الشاهد، ولكن وضعت قطعة آغار بدون فطر. اعتبرت كل عزلة فطرية كمعاملة، وكررت كل معاملة خمس مرات (يمثل كل أنبوب مكرر). وضعت الأنابيب في غرفة النمو عند درجة حرارة 15 ليلاً / 25 نهاراً و 16 ساعة إضاءة، وتم ري النباتات حسب الحاجة (Mitter et al., 2006; Gebremariam et al., 2017). بعد 4 أسابيع من العدوى، غُسلت الجذور، وتم تقدير شدة الإصابة بالاعتماد على نسبة تلون السلامة تحت التاجية، وذلك باستخدام سلم خماسي (1: 0 – 9 %، 2: 10-29 %، 3: 30-69 %، 4: 70-89 %، 5: 90-100 %) (Wildermuth et al., 2001; Nicol et al., 2001) كما هو مبين في الشكل (1-2)، كما أعطيت البادرات الميئة الدرجة 5، واعتبرت العزلة غير ممرضة إذا كانت السلامة سليمة غير ملونة، واعتُبرت ضعيفة القدرة الإراضية إذا كانت قيمة شدة الإصابة ≥ 1 ، ومتوسطة القدرة الإراضية إذا كانت قيمة شدة الإصابة < 1 و ≥ 3 ، وعالية القدرة الإراضية عند شدة الإصابة < 3 .

تم تطبيق فرضية كوخ Koch's postulate بإعادة العزل من الأنسجة المصابة بالنسبة لكل نوع من الأنواع الفطرية المختبرة، ومقارنة الصفات المورفولوجية مع المزارع المستخدمة في البداية لتأكيد تعريف أنواع الفيوزاريوم.

تم تحليل النتائج إحصائياً باستخدام برنامج التحليل الإحصائي Genstat 7 وفقاً لجدول تحليل التباين ANOVA، وحسبت قيمة أقل فرق معنوي LSD عند مستوى احتمال 5%.



الشكل 2-1: سلم من 1 - 5 لتقييم شدة الإصابة بعفن التاج والجذور المتسبب عن أنواع من الجنس *Fusarium* (Nicol et al., 2001)

2.9 - الدراسة الجزيئية

2.9.1- مقارنة خمس طرائق لاستخلاص DNA من بعض أنواع الجنس *Fusarium*

تمت في هذه الدراسة مقارنة خمس طرائق مختلفة لاستخلاص الدنا من ثلاثة أنواع من الجنس فيوزاريوم، وهذه الطرائق هي: (1) الحبيبات الزجاجية / فينول كلوروفورم / كحول الإيزوميل PCI؛ (2) الحبيبات الزجاجية / فينول كلوروفورم / كحول الإيزوميل المعدلة؛ (3) كيت تجاري Qiagen DNeasy Kit؛ (4) Lidocaine Epinephrine and Tetracaine Solution (LETS)؛ (5) Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB)، استُخدمت 3 عزلات تابعة لثلاثة أنواع مختلفة من الجنس *Fusarium*، وهي *F. culmorum* (F1) و *F. pseudograminearum* (F2) و *F. semitectum* (F3)، تم إكثار العزلات على وسط PDA، وُجمعت المشيجة بعد 10 أيام لاستخلاص الدنا DNA.

2.9.1.1- استخلاص الدنا بطريقة الحبيبات الزجاجية باستخدام فينول/ كلوروفورم/كحول الإيزوميل (PCI):

تمّ كشط مشيخة الفطر (50 مغ تقريباً) ووضعها في أنبوب سعة 2 مل، أضيف 400 µl من محلول الاستخلاص [Extraction buffer 2% Triton X-100، 1% SDS، 100 mM NaCl، 10 mM Tris (pH = 8)، 1 mM EDTA] وأضيف للأنبوب 6 حبيبات زجاجية قطر كل منها 0.4 مم بعد تعقيمها بحمض، ثم غسلها بالماء المقطر، وأضيف لها 400 µl من فينول/ كلوروفورم/كحول الإيزوميل (1:24:24)، رُجت الأنابيب لمدة 30 دقيقة عند أعلى سرعة على الرجّاج، نُقلت لمدة 5 دقائق عند 14000 دورة/دقيقة، نُقل الوسط المائي العلوي إلى أنبوب جديد وأضيف إليها 400 µl من فينول كلوروفورم كحول الإيزوميل (1:24:24)، رُجت الأنابيب لمدة 5 دقائق عند أعلى سرعة، ونُقلت لمدة 5 دقائق عند 14000 دورة/دقيقة، أُضيف نفس حجم الوسط المائي العلوي الناتج من الكلوروفورم كحول الإيزوميل (1:24)، ونُقلت الأنابيب لمدة 5 دقائق عند سرعة 14000 دورة/دقيقة، نُقل الوسط المائي العلوي إلى أنابيب جديدة، وأضيف لها 0.1 حجم من أسيتات الأمونيوم و 2 حجم من الإيثانول 100%، وضعت عند درجة حرارة - 20°س لمدة 30 دقيقة، ثم نُقلت العينات لمدة 10 دقائق عند درجة حرارة 4°س بسرعة 12000 دورة/دقيقة. تم التخلص من الرشاحة، وغُسل الراسب بـ 1 مل من الإيثانول 70 %، نُقلت العينات لمدة 5 دقائق عند درجة حرارة 4°س بسرعة 12000 دورة/دقيقة، وتم التخلص من السائل وتنشيف الراسب تحت الهواء، ثم حُلّ الراسب بمحلول TE [1 mM EDTA، 10 mM Tris (pH= 8)]، وحُصّنت العينات طوال الليل عند درجة حرارة 4°س، وتمت إضافة 2 µl من RNase، وحُصّنت عند 37°س لمدة 45 دقيقة (Van Burik et al,1998).

2.9.1.2- استخلاص الدنا بطريقة الحبيبات الزجاجية باستخدام فينول/ كلوروفورم/كحول الإيزوميل المعدلة:

تمّ كشط مشيخة الفطر (40 مغ) ووضعها في أنبوب سعة 2 مل، أضيف 400 µl من محلول الاستخلاص Extraction buffer وأضيف للأنبوب 6 حبيبات زجاجية قطر كل منها 0.4 مم بعد تعقيمها، ثم غسلها بالماء المقطر. أضيف 400 µl من فينول/ كلوروفورم/ كحول الإيزوميل (1:24:24)، رُجت الأنابيب لمدة 10 دقائق عند أعلى سرعة على الرجّاج، نُقلت لمدة 5 دقائق عند 14000 دورة/دقيقة، نُقل 500 µl من الرشاحة العلوية إلى أنبوب جديد، وأضيف لها 1000 µl من الإيثانول 100%، وحُرّكت بشكل خفيف، وحُصّنت عند درجة حرارة - 20°س لمدة ساعة، نُقلت العينات لمدة 10 دقائق عند درجة حرارة 4°س بسرعة 12000 دورة/دقيقة. تم التخلص من الرشاحة، وغُسل الراسب بـ 1 مل من الإيثانول 70

٠؄ تُفَلت العينات لمدة 5 دقائق عند درجة حرارة 4 س بسرعة 12000 دورة /دقيقة؄ وتم التخلص من السائل؄ وتنشيف الراسب تحت تيار الهواء؄ ثم حُلَّ الراسب بمحلول TE؄ وحُصِّنت العينات طوال الليل عند درجة حرارة 4 س. وتمت إضافة 2 µl من RNase؄ وحُصِّنت عند 37 س لمدة 45 دقيقة.

2. 9. 1. 3- استخلاص الدنا بطريقة الكيت Qiagen DNeasy Kit:

تم طحن المشيجة (50 مغ تقريباً) على شكل مسحوق ناعم بالأزوت السائل باستخدام هاون معقم من البورسلان؄ نُقل مسحوق المشيجة إلى أنابيب سعة 2 مل؄ وتم اتباع تعليمات الشركة المصنعة في الاستخلاص وفقاً للبروتوكول المرفق مع الكيت Qiagen DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen؄ Germany).

2. 9. 1. 4- استخلاص الدنا بطريقة LETS:

تم طحن المشيجة (40 مغ تقريباً) على شكل بودرة ناعمة بالأزوت السائل باستخدام هاون معقم من البورسلان؄ نُقل المسحوق الناتج إلى أنابيب سعة 2 مل وأضيف لها 800 µl من محلول LETS المكون من (0.1M LiCl, 10 mM EDTA, 0.2% SDS, 10 mM Tris pH =7.4)؄ حُصِّنت عند درجة حرارة 65° س لمدة 10 دقائق؄ تَمَّت إضافة 500 µl من فينول كلوروفورم كحول الإيزوميل (1:24:24)؄ تُفَلت العينات لمدة 10 دقائق عند درجة حرارة 4 س بسرعة 10000 دورة /دقيقة. ونقل 500 µl من الرشاحة العلوية إلى أنبوب جديد؄ وأضيف لها 1000 µl من الإيثانول 100%؄ وحركت بشكل خفيف؄ وحضنت عند درجة حرارة – 20 س لمدة ساعة وتُفَلت بعدها العينات لمدة 10 دقائق عند درجة حرارة 4 س بسرعة 12000 دورة /دقيقة؄ تم التخلص من الرشاحة وغسل الراسب بـ 1 مل من الإيثانول 70 %؄ ثفلت العينات لمدة 5 دقائق عند درجة حرارة 4 س بسرعة 12000 دورة /دقيقة؄ وتم التخلص من السائل وتنشيف الراسب تحت الهواء؄ ثم حُلَّ الراسب بمحلول TE؄ وحُصِّنت العينات طوال الليل عند درجة حرارة 4 س؄ وتمت إضافة 2 µl من RNase؄ والتحصين عند 37 س لمدة 45 دقيقة (Raeder and Broda, 1985).

2. 9. 1. 5- استخلاص الدنا بطريقة CTAB:

تم طحن المشيجة (50 ملغ) على شكل بودرة ناعمة بالأزوت السائل باستخدام هاون معقم من البورسلان؄ نُقلت بودرة المشيجة الناتجة إلى أنابيب سعة 2 مل؄ وأضيف لها 1 مل من محلول CTAB (Cetyl trimethyl ammonium bromide) المكون من المواد التالية [2% CTAB, 2M NaCl, 0.2 M Tris (pH= 8), 0.05 M EDTA]؄ حُصِّنت عند درجة حرارة 60 س لمدة 30 دقيقة؄ أُضيف 850 µl من مزيج الكلوروفورم / كحول الإيزوميل 24 : 1 وتم مزجها بشكل جيد بهدوء؄ ووضعت في البراد لمدة 15 دقيقة. تُفَلت العينات لمدة 20 دقيقة عند درجة حرارة 4 س وبسرعة 14000 دورة /دقيقة؄

وُنُقِلَت الرشاخة العلوية إلى أنبوب جديد وأضيف لها حجم مماثل من الكحول المطلق البارد 100%، ورجت بشكل خفيف ثم حُصِنَت عند درجة حرارة - 20 °س لمدة 30 دقيقة. لاحقاً نُقِلَت الأنابيب لمدة 10 دقائق بسرعة 14000 دورة /دقيقة، وتمّ التخلص من الرائق وُغسل الراسب بـ 1 مل من الايثانول 70 %، نُقِلَت الأنابيب مرة ثانية لمدة 3 دقائق عند سرعة 14000 دورة /دقيقة، غُسل الـ DNA مرة ثانية باستخدام الإيثانول 70 %، وُنُقِلَت الأنابيب لمدة 3 دقائق عند سرعة 14000 دورة /دقيقة، ثم جُفّف الراسب عند درجة حرارة الغرفة لمدة 20 دقيقة، وحلّ الراسب أخيراً بمحلول TE (10 mM Tris) باستخدام الإيثانول 70 %، وحضنت طوال الليل عند درجة حرارة 4 °س، تمت إضافة 2 µl من RNase و حُصِنَت عند 37 °س لمدة 45 دقيقة (Murray and Thompson, 1980).

2. 9. 2- تقدير تركيز ونقاوة الدنا:

تم قياس تركيز الحمض النووي منقوص الأكسجين الـ DNA باستخدام المطياف الضوئي Thermo scientific Multiskan Go مقدراً بـ ng/µl، حيث أُخذت القراءات عند طول الموجة 260 نانومتر، كما سُجِلَت نقاوة الـ DNA للعينات المدروسة (وهي عبارة عن نسبة قراءة الامتصاصية بين طول الموجتين 260 و 280 نانومتر)، حيث يملك الـ DNA النقي نسبة قراءات ما بين 1.7 إلى 1.9 (Sambrook et al., 1989).

2. 9. 3- اختبار نوعية DNA بالرحلان الكهربائي:

تم فحص نوعية الـ DNA من خلال الترحيل الكهربائي على هلامة الأغاروز بتركيز 0.8 % مكونة من 0.8 غ أغاروز و 100 مل محلول منظم 1XTBE (90 mM Tris-base, 90 mM Boric acid, 2 mM EDTA, pH =8). سُخِّن المزيج حتى ذوبان الأغاروز، ثم بُرِّد قليلاً، وأضيف له 1.5 µl من محلول الإيثيديوم برومايد Ethidium bromide. تم حقن الآبار بـ 5 µl من كل عينة بعد تصلب المزيج، كما حُقِن سَلَم جزيئي 100 bp.

أُجريت عملية الرحلان الكهربائي تحت جهد 80 فولت لمدة ساعة، وبعد انتهاء عملية الترحيل الكهربائي، صُوِّرَت الهلامة باستخدام جهاز الإضاءة فوق البنفسجية (UV transilluminator BIO View).

2. 9. 4- الكشف عن أنواع الجنس *Fusarium* جزيئياً باستخدام بادئات متخصصة بالأنواع:

أُجريت تفاعل PCR لتضخيم الـ DNA الهدف لبعض أنواع الفيوزاريوم المعرفة مورفولوجياً في هذه الدراسة كلّ على حدا باستخدام زوج البادئات الخاص بالأنوع Species-specific primers، وذلك لتأكيد تعريفها جزيئياً، ويبين الجدول (1-2) تسلسل البادئات المستخدمة في تعريف أنواع الجنس *Fusarium* المتحصل عليها في هذه الدراسة.

الجدول 1-2: تسلسل البادئات المتخصصة Species-specific primers المستخدمة في تعريف أنواع الجنس *Fusarium* المتحصل عليها في هذه الدراسة

الوزن الجزيئي لمنتج PCR (bp)	درجة حرارة الانحلال Tm °C	التسلسل النوكليوتيدي للبادئة Primer Sequence (5' → 3')	اسم البادئة	النوع المراد الكشف عنه	المرجع
570	من 62 إلى 66	ATGGTGAACCTCGTCGTGGC CCCTTCTTACGGCCAATCTCG	Fc01F Fc01R	<i>F. culmorum</i>	Nicholson <i>et al.</i> , 1998
280	58	ACAGATGACAAGATTTCAGGCACA TTCTTTTGACATCTGTTC AACCCA	Fg16NF Fg16NR	<i>F. graminearum</i>	Nicholson <i>et al.</i> , 1998
400	55	CATACCTATACGTTGCCCTCG TTACCAGTAACGAGGTGTATG	FEF FER	<i>F. equiseti</i>	Kuzdraliński <i>et al.</i> , 2017
550	56	CTTCCGCCCAAGTTTCTTC TGTCAGTAACTCGACGTTGTG	PRO1 PRO2	<i>F. proliferatum</i>	Mulé <i>et al.</i> , 2004
578	56	CTTCCTGCGATGTTTCTCC AATTGGCCATTGGTATTATATCTA	VER1 VER2	<i>F. verticillioides</i>	Mulé <i>et al.</i> , 2004
445	60	GGCCACTCAAGCGGCGAAAG GTCAGACCAAGAGCAATGGGC	61-2P 61-2R	<i>F. subglutinans</i>	Kuzdraliński <i>et al.</i> , 2017

حُضِرَ مزيج التفاعل (25 µl) المكون من 12.5 µl من Dream Taq Green PCR Master Mix (Thermo Scientific) (2X) و 22.5 pmol من كل بادئة (الجدول 2-2)، و 200 ng من الـ DNA.

الجدول 2-2: مكونات تفاعل PCR المستخدمة في تضخيم DNA الهدف و الحجم المأخوذ في كل تفاعل

المكونات	الحجم (µl)
Dream Taq Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific)	12.5
البادئة المباشرة forward primer	1.5
البادئة العكسية reverse primer	1.5
DNA [100 ng/ µl]	2
RNase-free water	7.5
Final volume	25

أُجريت عملية التضخيم ضمن جهاز المدور الحراري BIO RAD وفق برامج حرارية خاصة بكل زوج من البادئات كما هو مبين في الجداول التالية:

الجدول 2-3: البرنامج الحراري لتفاعل PCR المستخدم في تضخيم DNA الهدف للكشف عن النوع *F. culmorum* (Nicholson et al., 1998)

المدة الزمنية	درجة الحرارة	مراحل التفاعل
5 min	95°C	الفصل الأولي Initiation denaturation
30 sec	95°C	فصل denaturation
30 sec	66°C	التحام annealing
30 sec	72°C	استطالة extension
30 sec	95°C	فصل denaturation
30 sec	64°C	التحام annealing
30 sec	72°C	استطالة extension
30 sec	95°C	فصل denaturation
30 sec	62°C	التحام annealing
30 sec	72°C	استطالة extension
8 min	72°C	استطالة نهائية final extension

الجدول 2-4: البرنامج الحراري لتفاعل PCR المستخدم في تضخيم DNA الهدف للكشف عن النوعين *F. verticillioides* و *F. proliferatum* (Mulé et al., 2004)

المدة الزمنية	درجة الحرارة	مراحل التفاعل
5 min	94°C	الفصل الأولي Initiation denaturation
50 sec	94°C	فصل denaturation
50 sec	56°C	التحام annealing
1 min	72°C	استطالة extension
10 min	72°C	استطالة نهائية final extension

الجدول 2-5: البرنامج الحراري لتفاعل PCR المستخدم في تضخيم DNA الهدف للكشف عن الأنواع *F. equiseti* ، *F. subglutinans*، *F. graminearum* (Kuzdraliński et al., 2017)

المدة الزمنية	درجة الحرارة	مراحل التفاعل
5 min	95°C	Initiation denaturation الفصل الأولي
30 sec	95°C	denaturation فصل
30 sec	(55°C) <i>F. equiseti</i> (58°C) <i>F. graminearum</i> (60°C) <i>F. subglutinans</i>	annealing التحام
45 sec	72°C	extension استطالة
8 min	72°C	final extension استطالة نهائية

2.9.4 - الرحلان الكهربائي لنواتج PCR:

تم التأكد من نجاح تفاعلات PCR السابقة بترحيل المنتجات ضمن هلامية الأغاروز بتركيز 1 % ، تحت جهد 80 فولت لمدة ساعة، وتم تعريف العزلات الناتجة حسب الوزن الجزيئي لمنتج تفاعل الـ PCR

2.9.5- الكشف عن أنواع الجنس *Fusarium* جزيئياً باستخدام طريقة Multiplex PCR

بهدف توفير الوقت وتأكيد تعريف أكبر عدد ممكن من العزلات، تم إجراء تفاعل Multiplex PCR باستخدام البادئات المتخصصة المتوفرة المبيّنة في الجدول (2-6).

الجدول 2-6: تسلسل البادئات المستخدمة في تعريف بعض أنواع الجنس *Fusarium* المتحصل عليها في هذه الدراسة باستخدام طريقة Multiplex PCR

الوزن الجزيئي PCR المنتج (bp)	التسلسل النوكليوتيدي للبادئة Primer Sequence (5' → 3')	اسم البادئة	النوع المراد الكشف عنه	المرجع
570	ATGGTGAACCTCGTCGTGGC CCCTTCTTACGCCAATCTCG	Fc01F Fc01R	<i>F. culmorum</i>	Nicholson <i>et al.</i> , 1998
400	CATACCTATACGTTGCCTCG TTACCAGTAACGAGGTGATG	FEF FER	<i>F. equiseti</i>	Kuzdraliński <i>et al.</i> , 2017
550	CTTTCCGCCAAGTTTCTTC TGTCAGTAACTCGACGTTGTTG	PRO1 PRO2	<i>F. proliferatum</i>	Mulé <i>et al.</i> , 2004
332	AAAAGCCCCAAATTGCTGATG TGGCATGTTTCATTGTCACCT	AF330109CF AF330109CR	<i>F. sporotrichioides</i>	Sadhasivam <i>et al.</i> , 2017
578	CTTCCTGCGATGTTTCTCC AATTGGCCATTGGTATTATATCTA	VER1 VER2	<i>F. verticillioides</i>	Mulé <i>et al.</i> , 2004
315	ACATACCTTTATGTTGCCCTCG GGAGTGTGACAGACACAGCT	FSF1 FSR1	<i>F. sambucinum</i>	Konietzny and Greiner, 2003
340	ACATACCCACTTGTTCCTCG CGCCAAATCAATTGAGGAACG	FOF1 FOR1	<i>F. oxysporum</i>	Sadhasivam <i>et al.</i> , 2017
842	CTCAGTGTCCACCGGTTGCGTAG CTCAGTGTCCCATCAAAATAGTCC	CRO-AF CRO-AR	<i>F. crookwellenes</i>	Kuzdraliński <i>et al.</i> , 2017
280	ACAGATGACAAAGATTCAAGGCACA TTCTTTGACATCTGTTCAACCCA	Fg16NF-gra Fg16NR	<i>F. graminearum</i>	Kuzdraliński <i>et al.</i> , 2017
175	GCAGGTATGGCTTTTGTGGAA AGTAAACTCCGACAGGTGCAA	FS1 FS2	<i>F. solani</i>	Sadhasivam <i>et al.</i> , 2017

حُضِّر مزيج التفاعل (25 µl) المكون من 12.5 µl من Dream Taq Green PCR Master Mix (Thermo Scientific) (2X) و 7.5 pmol من كل بادئة (الجدول 2-2)، و 250 ng من الـ DNA ، ويبين الجدول (2-7) مكونات تفاعل الـ PCR المستخدمة في طريقة Multiplex PCR، وأُجريت عملية التضخيم ضمن جهاز المدور الحراري BIO RAD وفق البرنامج الحراري المبين في الجدول (2-8).

الجدول 2-7: مكونات تفاعل PCR المستخدمة في طريقة Multiplex PCR و الحجم المأخوذ من كل منها

المكونات	الحجم (µl)
Dream Taq Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific)	12.5
البادئات المباشرة forward primer (عددها 10)	0.5 (من كل بادئة)
البادئات العكسية reverse primer (عددها 10)	0.5 (من كل بادئة)
DNA	2.5

الجدول 2 - 8: البرنامج الحراري لتفاعل PCR المستخدم في تضخيم DNA في طريقة Multiplex PCR

المدة الزمنية	درجة الحرارة	مراحل التفاعل
5 min	94°C	Initiation denaturation الفصل الأولي
30 sec	95°C	denaturation فصل
60 sec	58°C	annealing التلاحم
60 sec	72°C	extension استطالة
5 min	72°C	final extension استطالة نهائية

2.9.5 - الرحلان الكهربائي لنواتج PCR:

تمّ التأكد من نجاح تفاعل Multiplex PCR السابق بترجيل المنتجات ضمن هلامة الأغاروز بتركيز 1.8% ، تحت جهد 80 فولت لمدة ساعة، وتمّ تعريف العزلات الناتجة حسب الوزن الجزيئي لمنتج الـ PCR الناتج في كل تفاعل.

2.9.6 - تحضير عينات DNA من أجل تحديد تتابع النوكليوتيدات في جهاز تحليل التسلسلات

Sequencer

2.9.6.1 - تضخيم منطقة DNA الهدف (مورثة TEF1-α):

أُجري تفاعل PCR باستخدام زوج البادئات EF1، EF2، ويبين الجدول (2-9) تسلسل البادئات السابقة.

الجدول 2-9: التسلسل النوكليوتيدي للبادئات المستخدمة في تضخيم مورثة TEF1-α

المرجع	حجم منتج الـ PCR	التسلسل النوكليوتيدي	البادئة Primer
O'Donnell et al., 1998	700 bp	ATGGGTAAGGAGGACAAGAC GGAAGTACCAGTGATCATGTT	EF1 EF2

حُضِرَ مزيج التفاعل (25 µl) المكون من 12.5 µl من Dream Taq Green PCR Master Mix و 22.5 pmol من كل بادئة (نفس جدول البرايمرات المتخصصة)، و 250 ng من الـ DNA. أُجريت عملية التضخيم ضمن جهاز المدور الحراري BIO RAD وفق البرنامج الحراري المبين في الجدول (2-10).

الجدول 2-10: البرنامج الحراري لتفاعل PCR المستخدم في تضخيم جزء من المورثة *TEF1-α* (Geiser et al., 2004; Gebremariam et al., 2017)

المدة الزمنية	درجة الحرارة	مراحل التفاعل
3 min	93°C	Initiation denaturation
45 sec	92°C	denaturation
45 sec	53°C	annealing
1 min	72°C	extension
10 min	72°C	final extension

أُرسلت منتجات PCR إلى المخبر المختص في هيئة الطاقة الذرية لإجراء التسلسل النوكليوتيدي باستخدام جهاز تحديد التسلسلات النوكليوتيدية ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystem)

عُرِفَت الأنواع الناتجة في هذه الدراسة من خلال مقارنة التسلسلات التي تم الحصول عليها مع التسلسلات المنشورة على الموقع الإلكتروني للمركز الوطني للمعلومات الحيوية (NCBI) National center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

2.9.7 - الكشف عن المورثات المسؤولة في التخليق الحيوي للسموم التي تنتجها بعض أنواع الجنس *Fusarium*:

تم الكشف عن بعض المورثات التي تشترك في التخليق الحيوي لأهم ثلاث مجموعات من السموم الفطرية (التريكوثيسينات، الفيومينوزينات، الزيرالينون) التي تفرزها بعض أنواع الجنس *Fusarium*، وذلك للتمييز بين عزلات الـ *Fusarium* المنتجة لتلك السموم والعزلات غير المنتجة لها بالإضافة إلى أنواع السموم التي تفرزها كل من هذه العزلات.

أُجري تفاعل PCR لتضخيم DNA الهدف لكل سُم على حدة باستخدام زوج البادئات الخاص به Species-specific primers، ويبين الجدول (2 - 11) تسلسل البادئات المستخدمة في الكشف عن تلك السموم.

الجدول 2-11: البادئات المستخدمة في الكشف عن المورثات التي تشترك في التخليق الحيوي لبعض السموم المنتجة من قبل بعض أنواع الجنس *Fusarium* التي تصيب القمح:

المرجع	حجم التضخيم (bp)	التسلسل النوكليوتيدي للبادئ (5' → 3')	اسم البادئة	المورثة المستهدفة	السم الفطري
Doohan <i>et al.</i> 1999	544	AGCGACTACAGGCTTCCCTC AAACCATCCAGTTCTCCATCT	Tri5F Tri5R	<i>Tri5</i>	Trichothecene
Bluhm <i>et al.</i> 2004	845	GTCGAGTTGTTGACCACTGCG CGTATCGTCAGCATGATGTAG	FUM5F FUM5R	<i>FUM5</i>	Fumonisin
Meng <i>et al.</i> , 2010	280	CGTCTTCGAGAAGATGACAT TGTTCTGCAAGCACTCCGA	F1 R1	<i>PKS4</i>	Zearalenone

تم تحضير مزيج التفاعل كما ورد في الفقرة (4.9.2) الخاصة بالكشف عن أنواع الجنس *Fusarium* جزيئياً باستخدام بادئات متخصصة، وذلك في حجم نهائي قدره 25 µl ، وأجريت عملية التضخيم ضمن جهاز المدور الحراري BIO RAD وفق برامج حرارية خاصة بكل زوج من البادئات كما هو مبين في الجداول التالية:

الجدول 2-12: البرنامج الحراري لتفاعل PCR المستخدم في تضخيم المورثة *Tri5* (Doohan *et al.* 1999)

المدة الزمنية	درجة الحرارة	مراحل التفاعل
5 min	95°C	Initiation denaturation
30 sec	95°C	denaturation فصل
20 sec	60°C	annealing التحام
45 sec	72°C	extension استطالة
10 min	72°C	final extension استطالة نهائية

الجدول 2-13: البرنامج الحراري لتفاعل PCR المستخدم في تضخيم المورثة *FUM5* (Bluhm *et al.*, 2004)

المدة الزمنية	درجة الحرارة	مراحل التفاعل
2 min	94°C	Initiation denaturation
45 sec	93°C	denaturation فصل
60 sec	62°C	annealing التحام
60 sec	72°C	extension استطالة
10 min	72°C	final extension استطالة نهائية

الجدول 2-14: البرنامج الحراري لتفاعل PCR المستخدم في تضخيم المورثة *PKS4*. (Meng *et al.*, 2010)

المدة الزمنية	درجة الحرارة	مراحل التفاعل
3 min	95°C	Initiation denaturation
30 sec	94°C	denaturation فصل
30 sec	60°C	annealing التحام
30 sec	72°C	extension استطالة
7 min	72°C	final extension استطالة نهائية

الفصل الثالث

النتائج والمناقشة Results and Discussion

النتائج والمناقشة Results and Discussion

3.1- أعراض الإصابة بأنواع الجنس *Fusarium*:

أظهرت نتائج المسح الحقلية انتشار مرض عفن الجذور والتاج في بعض حقول القمح، وقد تمّ أثناء الجولات الحقلية تسجيل أعراض الإصابة بهذا المرض، حيث ظهرت بشكل اصفرار وضعف عام على النباتات المصابة (الشكل 1-3، A-B)، وقد ظهر هذا المرض في بعض الأحيان على شكل بؤر متفرقة من الحقل (الشكل 1-3، C)، ولوحظ على النباتات المصابة وجود بقع بنية إلى سوداء اللون على الجذور وعند قاعدة الساق، وبقع سوداء على العقد، أو اسوداد منطقة التاج بالكامل نتيجة موت الأنسجة (الشكل 1-3، D-E)، كما لوحظ وجود تلونات وردية على سوق بعض النباتات (الشكل 1-3، F)، بالإضافة إلى ظهور سنابل بيضاء اللون حيث تؤدي الإصابة بالفطر لموت أنسجة النباتات في منطقة التاج والجذور، مما يؤثر على انتقال الماء والنسغ، وبالتالي تنخفض كمية ونوعية الحبوب، ويكون ذلك مصحوباً بظاهرة ابيضاض السنابل (Strausbaugh *et al.*, 2005; Mitter *et al.*, 2006)، وتعدّ ظاهرة تلون منطقة التاج باللون العسلي إلى البني (الشكل 1-3، G)، وتشكل السنابل البيضاء الناتجة عن النضج المبكر (الشكل 1-3، H) من الأعراض الرئيسية لمرض عفن التاج الناجم عن الإصابة بأنواع الجنس *Fusarium* (Paulitz *et al.*, 2002).

كما لوحظت بعض النباتات المصابة بمرض لفحة السنابل، حيث ظهرت الأعراض على السنابل الخضراء على شكل اصفرار وموت بعض السنيبلات في السنبلة الواحدة (الشكل 1-3، I)، كما ظهرت على بعض العصافات وسادات بوعية واضحة برتقالية اللون (الشكل 1-3، J)، وترافقت إصابة السنيبلات بفطر الفيوزاريوم بضمور الحبوب فيها (الشكل 1-3، K)، و تتوافق هذه الأعراض مع أعراض الإصابة بالجنس *Fusarium* المذكورة في دراسات سابقة (النائب وآخرون، 2002؛ Backhouse *et al.*, 2013؛ Matny, 2015؛ Paulitz *et al.*, 2002).



الشكل 1-3: أعراض الإصابة بأنواع الجنس *Fusarium* على القمح: A- اصفرار النباتات، B- ضعف عام على النباتات، C- بؤر مصابة في أماكن متفرقة من الحقل، D- بقع بنية وبقع سوداء اللون على الجذور، E- اسوداد الجذور ومنطقة التاج بالكامل، F- تلونات وردية على سوق بعض النباتات، G- تلون الساق وقاعدة الجذور باللون العسلي، H - سنبله بيضاء فارغة، I - ابيضاض بعض السنبيلات، J- وسادت بوغية برتقالية اللون على بعض السنبيلات، K - ضمور بعض الحبوب. (A، B، C، D، E، F، J، K حماه-الغاب).

3.2 - الدراسة المورفولوجية:

تمّ في هذه الدراسة الحصول على 105 عزلات للفطر *Fusarium* من أجزاء مختلفة لنباتات القمح (الجزور، منطقة التاج، الساق، السنابل) ظهرت عليها أعراض مميزة للإصابة بهذا الفطر، وذلك من محافظات سورية مختلفة (طرطوس، اللاذقية، حماه، السويداء)، ويبين الجدول (3-1) الأجزاء النباتية التي تمّ العزل منها، والمحافظات التي جُمعت العينات منها.

3.2.1- الخصائص المجهرية

بالرغم من كون الدراسات المورفولوجية صعبة وغير موثوقة تماماً إلا أنّها ضرورية لوضع العزلات ضمن مجموعات متقاربة وتعريفها، وذلك لعدم إمكانية تصنيفها كلّها بالاعتماد على الطرائق الجزيئية نظراً لارتفاع التكاليف.

قُسمت العزلات التي جُمعت إلى 20 مجموعة بالاعتماد على التشابه في الصفات المظهرية للمستعمرات على وسط PDA، وعلى قياس قطرها، وصفات المكونات الفطرية لها على وسط CLA، إذ تباينت هذه المجاميع الفطرية في قياس قطر مستعمراتها، وأشكالها من حيث كثافة المشيجة الفطرية ولونها، فقد تراوحت ألوانها بين الوردي والبنفسجي والكريمي وغيرها، كما اختلفت من حيث وجود الوسادات البوغية وألوانها وتوزّعها، واختلفت أيضاً من حيث الصبغات التي تنتجها ضمن وسط الزرع، والتي تدرجت من وردي فاتح إلى أحمر داكن إضافةً إلى وجود ألوان أخرى مثل البنفسجي والبني وغيرها، مع الأخذ بعين الاعتبار حدوث تغيرات في هذه الألوان مع تقدّم المستعمرات في العمر. في الواقع، يتأثر لون عزلات الفيوزاريوم بالنمط الوراثي للنبات *Plant genotype* وبالترية وبالظروف البيئية، كما يرتبط شكل العزلات ولونها بالظروف المناخية والموقع الجغرافي (Atabaki et al., 2018).

كذلك أظهرت نتيجة الفحص المجهرى وجود اختلافات في التراكيب الفطرية المتمثلة بالأبواغ الكونيدية الكبيرة *Macroconidia* الهلالية الشكل، والتي تعدّ سمة هامة للتمييز بين أنواع هذا الجنس، حيث تختلف هذه الأبواغ في الطول وعدد الحواجز، فتعدّ أبواغاً قصيرة إذا كانت تملك 1-2 حاجر، ومتوسطة الطول إذا كانت تملك من 3-7 حواجز، وطويلة إذا كانت تملك بشكل عام 8 أو 9 حواجز (Nelson et al., 1983)، كما تختلف الأبواغ الكبيرة في شكل الخلايا القمية والقاعدية (Nelson et al., 1983; Burgess et al., 1994; Summerell and Leslie, 2006). وكذلك وُجدت اختلافات في شكل الأبواغ الكونيدية الصغيرة *Microconidia* في حال وجودها، وفي طريقة توزيعها على الحوامل الكونيدية، فقد توضع بشكل مفرد أو في سلاسل أو رؤوس كاذبة على حوامل كونيدية وحيدة أو

متعددة الفياليدات. إضافة لذلك لوحظ تشكّل الأبواغ الكلاميدية Chlamydospores في بعض العزلات بشكل مفرد أو مزدوج أو بشكل سلاسل أو تجمعات، ونتيجة لما سبق تمّ تعريف ستة عشر نوعاً من الجنس *Fusarium* هي: *F. culmorum*، *F. sambucinum*، *F. pseudograminearum*، *F. acuminatum*، *F. semitectum*، *F. verticillioides*، *F. proliferatum*، *F. solani*، *F. chlamydosporum*، *F. sporotrichioides*، *F. equiseti*، *F. compactum*، *oxysporum*، *F. pseudocircinatum*، *F. polyphialidicum* و *F. redolens*، كما تمّ تعريف الأنواع *F. torulosum*، *F. brachygibbosum*، *F. flocciferum* و *andiyazi* لاحقاً بعد استخدام الطرائق الجزيئية.

إنّ كثرة الاختلافات المذكورة السابقة تفسّر وجود صعوبات كبيرة في تصنيف الأنواع التابعة للجنس *Fusarium* اعتماداً على الصفات المورفولوجية (Nelson et al., 1983; Nelson et al., 1994; Burgess et al., 1994; Summerell and Leslie, 2006).

يتضح من الجدول (1-3) أن كل الأنواع المعرفة تم عزلها من الساق والجذور ومنطقة التاج، بينما عزلت أربعة أنواع فقط وهي *F. culmorum*، *F. verticillioides*، *F. proliferatum* و *F. oxysporum* من السنبال، كما لوحظت الإصابة بجرب السنبال في محافظتي طرطوس وحماه، بينما لم تشاهد في محافظتي اللاذقية والسويداء.

كانت أعلى نسبة تردد للنوع *F. culmorum* (29.52%)، تلاه النوع *F. proliferatum* (12.38%)، بينما تراوح تردد الأنواع الأخرى بين 0.95 و 8.57% (الجدول 1-3)، وتتفق هذه النتائج مع تلك التي حصل عليها الشعبي وآخرون (2015، 2018) حيث كان النوع *F. culmorum* أكثر أنواع الفيوزاريوم المتحصل عليها تردداً. ويبدو أن التردد النسبي للأنواع يختلف من منطقة جغرافية إلى أخرى، فقد أشارت دراسة أجريت في شرق إيران أن النوع *F. solani* كان الأعلى تردداً (18.6%) من بين الأنواع المعزولة من جذور نباتات القمح، تلاه النوع *F. acuminatum* (12.9%)، و *F. longipes* (11.4%)، ثم النوع *F. nygamai* (10%)، بينما الأنواع الأخرى كان ترددها منخفضاً نسبياً (Besharati et al., 2017).

في الواقع، ينتشر مرض تعفن جذور وتاج القمح في جميع أنحاء العالم، وقد سُجِّل هذا المرض في عدد من المحافظات السورية (النائب وآخرون، 2002؛ الخليفة وآخرون، 2006؛ الشعبي وآخرون، 2015)، حيث تمّ تعريف عدة أنواع فطرية مسؤولة عن تعفن جذور القمح في خمس محافظات سورية (إدلب، حمّاه، حلب، درعا، الحسكة) تتبع للأجناس *Helminthosporium* و *Fusarium* و *Rhizoctonia* و *Alternaria*، وقد سجلت عزلات *Fusarium* spp. أعلى تردد مقارنة مع باقي

الأجناس، وهذا يؤكد أيضاً على أن المسبب الرئيس لتعفن جذور القمح في الظروف المحلية هي أنواع من الجنس *Fusarium*. ويبدو من خلال الدراسة السابقة (الخليفة وآخرون، 2006) أن التصنيف المورفولوجي للأنواع المعزولة لم يكن مؤكداً، فقد اعتمد التصنيف على وجود شبه في الخصائص الزراعية والمورفولوجية للعزلات المتحصل عليها ومقارنتها مع 5 أنواع محددة الهوية من ذات الجنس هي *F. graminearum* و *F. poae* و *F. equiseti* و *F. culmorum* و *F. avenaceum*، والتي تم الحصول عليها من المركز الدولي لتحسين الذرة الصفراء والقمح CIMMYT في المكسيك، وهذا يؤكد على مدى التشابه الكبير بين أنواع هذا الجنس وصعوبة التصنيف المورفولوجي الذي يتطلب دراسة الكثير من المؤشرات والخصائص الشكلية، وهذا ما كنا نسعى إليه في هذه الدراسة للوصول إلى تصنيف مورفولوجي دقيق وشبه مؤكد.

وقد أكدت دراسة محلية أخرى أيضاً على أن المسبب الرئيس لتعفن جذور القمح هي أنواع من الجنس *Fusarium*، إذ بينت نتائج تشخيص عزلات فطرية مأخوذة من السلامة تحت التاجية لنباتات قمح مصابة بمرض تعفن الجذور من محافظات (حماء وحلب ودرعا والحسكة ودير الزور) وجود الأنواع *F. equiseti* و *F. culmorum* و *F. proliferatum*، وذلك بالاعتماد على الصفات المورفولوجية والمزرعية أيضاً (الشعبي وآخرون، 2015).

كما تم في الدراسة الحالية عزل بعض الأنواع من سنابل قمح مصابة بمرض لفحة (جرب) السنابل *Fusarium head blight or scab*، والذي يُعدُّ أكثر خطورة وأهمية، وقد تمَّ تسجيل الإصابة به سابقاً على سنابل القمح في منطقة سهل الغاب في سورية، وتمَّ تعريف عشرة أنواع متحصّل عليها من العصافات والحبوب باستخدام الطرائق المورفولوجية وهي *F. culmorum*، *F. equiseti*، *F. solani*، *F. compactum*، *F. sambucinum*، *F. proliferatum*، *F. moniliforme*، *F. avenaceum*، *F. semitectum*، وقد كان النوع *F. culmorum* هو الأكثر تردداً أيضاً (الشعبي وآخرون، 2018).

الجدول 3-1: أنواع الجنس *Fusarium* المُعرّفة في هذه الدراسة والأجزاء التي عزلت منها ومواقع جمعها

عدد العزلات المعروفة من كل محافظة *				الجزء النباتي الذي عزلت منه	النسبة المئوية لتعدد النوع %	عدد العزلات المُعرّفة	اسم النوع	الرقم المتسلسل
السويداء FS	حمّاه FH	اللاذقية FL	طرطوس FT					
7	11	5	8	سنبال وساق وجذور وتاج	% 29.52	31	<i>F. culmorum</i>	1
-	2	-	1	جذور	% 2.85	3	<i>F. sambucinum</i>	2
1	-	-	3	جذور وتاج	% 3.8	4	<i>F. pseudograminearum</i>	3
-	4	-	2	جذور وتاج	% 5.71	6	<i>F. acuminatum</i>	4
2	3	-	4	جذور وتاج	% 8.57	9	<i>F. semitectum</i>	5
-	-	-	2	سنبال وجذور	% 1.9	2	<i>F. verticillioides</i>	6
-	-	-	1	جذور	% 0.95	1	<i>F. andiyazi</i>	7
4	4	-	5	سنبال وجذور	% 12.38	13	<i>F. proliferatum</i>	8
2	-	-	1	جذور وتاج	% 2.85	3	<i>F. solani</i>	9
3	2	-	2	سنبال وجذور	% 6.66	7	<i>F. oxysporum</i>	10
4	5	-	-	جذور وتاج	% 8.57	9	<i>F. compactum</i>	11
3	2	-	-	جذور	% 4.06	5	<i>F. equiseti</i>	12
-	3	-	-	جذور وتاج	% 2.85	3	<i>F. sporotrichioides</i>	13
1	-	-	-	جذور	% 0.95	1	<i>F. pseudocircinatum</i>	14
1	1	-	-	جذور	% 1.9	2	<i>F. torulosum</i>	15
1	-	-	-	جذور	% 0.95	1	<i>F. polyphialidicum</i>	16
1	-	-	-	جذور	% 0.95	1	<i>F. brachygibbosum</i>	17
2	-	-	-	جذور	% 1.9	2	<i>F. chlamydosporum</i>	18
1	-	-	-	جذور	% 0.95	1	<i>F. flocciferum</i>	19
1	-	-	-	جذور	% 0.95	1	<i>F. redolens</i>	20

* أُعطيت العزلات تسميات مؤلفة من حرفين الأول F يشير إلى *Fusarium* والثاني يدل على الحرف الأول من المحافظة التي جمعت العينات منها، ثم رقم العزلة مثلاً (FS98) أي أن العزلة من السويداء ورقمها 98

لقد اتفقت نتائج تعريف العزلات المُتحصّل عليها من أجزاء نباتات القمح التي ظهرت عليها أعراض الإصابة بتعفن الجذور الشائع وأعراض الإصابة بلفحة السنابل، والتي تمّ جمعها من أربع محافظات سورية (طرطوس، اللاذقية، حماه، السويداء) مع دراسات سابقة في سورية من حيث إصابة جذور القمح بالنوعين *F. culmorum* و *F. equiseti* في محافظات إدلب، حماه، حلب، درعا، الحسكة (الخليفة وآخرون، 2006)، وبالأنواع *F. equiseti* و *F. culmorum* و *F. proliferatum* في محافظات حماه وحلب ودرعا والحسكة ودير الزور (الشعبي وآخرون، 2015)، كما اتفقت مع نتائج (الشعبي وآخرون، 2018) من حيث إصابة السنابل بالأنواع *F. culmorum* و *F. proliferatum* و *F. verticillioides*. قد يعود سبب الحصول على أنواع جديدة في هذه الدراسة لم يتم الحصول عليها في الدراسات السابقة مثل الأنواع *F. andiyazi*، *F. torulosum*، *F. brachygibbosum* و *F. flocciferum* أو العكس أي وجود أنواع في تلك الدراسات لم تتواجد في هذه الدراسة مثل *F. poae*، *F. avenaceum* و *F. crookwellense* ربما إلى اختلاف الموقع الجغرافي واختلاف المناخ بين المحافظات السورية، أو إلى أنّ عملية جمع العينات لم تغطّ كامل المحافظات التي تمّ الجمع منها، فقد تتواجد هذه الأنواع في مواقع أخرى غير المناطق التي أخذت منها العينات، أو إلى خطأ تصنيفي نتيجة التشابه في الصفات المورفولوجية بين بعض الأنواع وعدم استخدام التقانات الجزيئية، والتي تعدّ ضرورية للكشف عن بعض الأنواع مثل النوع *F. andiyazi*. وحسب معرفتنا، فإن هذه الدراسة تعدّ الأولى في العالم التي تشير إلى عزل النوع *F. andiyazi* من جذور قمح مصابة، إذ إن هذا النوع معروف جيداً كممرض للذرة البيضاء (Lesli et al., 2005).

3. 2. 2- سرعة نمو العزلات على وسط المغذي PDA

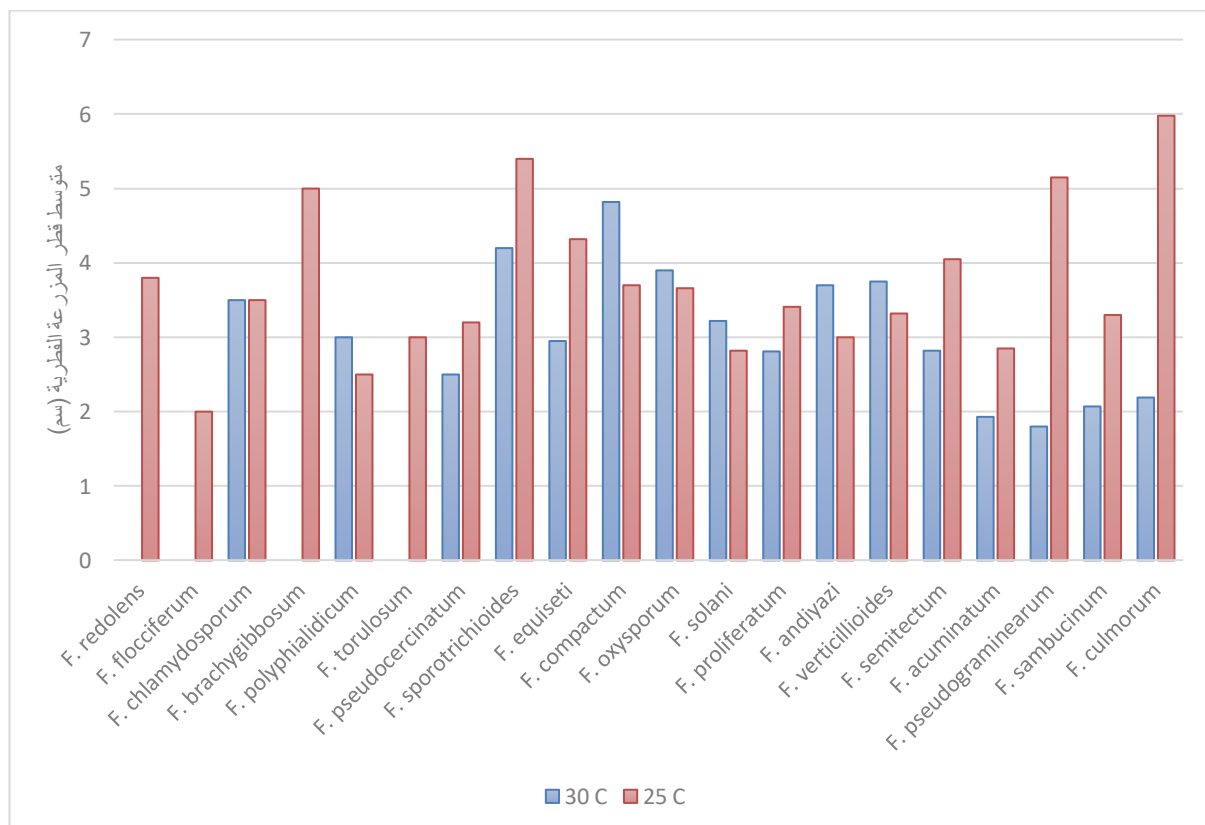
اختلفت العزلات التي تم الحصول عليها في سرعة النمو الخيطية (قطر مستعمراتها) عند تحضينها على وسط PDA في الظلام عند درجتي الحرارة 25°س و 30°س لمدة ثلاثة أيام (الجدول 2-3، والشكل 3-2).

الجدول 2-3: سرعة النمو الخيطية لأنواع الجنس *Fusarium* المُعرّفة في هذه الدراسة عند تحضينها على وسط PDA في الظلام عند درجتي الحرارة 25°س و 30°س لمدة ثلاثة أيام

الرقم المتسلسل	اسم النوع	عدد العزلات	قطر المستعمرة (سم)			
			25°س		30°س	
			المتوسط	المجال	المتوسط	المجال
1	<i>F. culmorum</i>	31	5.98 n	6.1 -5.8	2.19 c	2.4 -1.8
2	<i>F. sambucinum</i>	3	3.3 efg	3.5 -3.2	2.07 bc	2.2 -2
3	<i>F. pseudograminearum</i>	4	5.15 lm	5.3 -4.6	1.8 a	2.2 -1.2
4	<i>F. acuminatum</i>	6	2.85 bcd	3 -2.5	1.93 ab	2 -1.2
5	<i>F. semitectum</i>	9	4.05 jk	4.2 -3.4	2.82 e	3 -2.5
6	<i>F. verticillioides</i>	2	3.32 efg	3.5 -3	3.75 h	4 -3.5
7	<i>F. andiyazi</i>	1	3 cde	3	3.7 gh	3.7
8	<i>F. proliferatum</i>	13	3.41 fgh	3.5 -3	2.81e	3 -2.5
9	<i>F. solani</i>	3	2.82 bc	3 -2	3.22 f	3.5 -3
10	<i>F. oxysporum</i>	7	3.66 ghi	3.8 -3	3.9 h	4 -3.5
11	<i>F. compactum</i>	9	3.7 hij	5 -4	4.82 j	5 -4.5
12	<i>F. equiseti</i>	5	4.32 k	4.5 -3.5	2.95 e	3.5 -1.5
13	<i>F. sporotrichioides</i>	3	5.4 m	5.5 -5	4.2 i	4.5 -3.5
14	<i>F. pseudocircinatum</i>	1	3.2 def	3.2	2.5 d	2.5
15	<i>F. torulosum</i>	2	3 cde	3	-	-
16	<i>F. polyphialidicum</i>	1	2.5 b	2.5	3 ef	3
17	<i>F. brachygibbosum</i>	1	5 l	5	-	-
18	<i>F. chlamydosporum</i>	2	3.5 fghi	3.5	3.5 g	3.5
19	<i>F. flocciferum</i>	1	2 a	2	-	-
20	<i>F. redolens</i>	1	3.8 ij	3.8	-	-

• تشير الأحرف المشتركة ضمن نفس العمود لعدم وجود فروق معنوية عند مستوى 5%

لقد استخدمت أقطار المستعمرات سابقاً كمعيار إضافي في تصنيف أنواع الجنس *Fusarium* إلى مستوى النوع وتحت النوع، ففي بعض الحالات يحدث خلط بين نوعين أو أكثر نتيجة التشابه في الصفات المورفولوجية لمكونات النوعين، فيستخدم معدل النمو للتفريق بينهما (Leslie and Summerell, 2006)، فعلى سبيل المثال يتشابه النوعان *F. culmorum* و *F. sambucinum* في صفاتهما المورفولوجية على وسط PDA، وكذلك في الصبغات التي ينتجانها ضمن الوسط، ولكن يمكن التمييز بينهما من خلال شكل الأبواغ الكونيدية الكبيرة، فالحايا القمية للأبواغ الكونيدية الكبيرة للنوع *F. culmorum* تكون عادة مدورة Blunt، لكنها في بعض العزلات تكون محطمة Papillate مشابهة بذلك للخلايا القمية للنوع *F. sambucinum*، وفي هذه الحالة تبرز أهمية معدل النمو في التمييز بينهما، فالنوع *F. culmorum* يملك معدل نمو سريع على وسط PDA (5.5-6.8 cm) عند درجة الحرارة 25°س، بينما يملك النوع *F. sambucinum* معدل نمو بطيء (2.4-3.5 cm) عند الدرجة ذاتها من الحرارة (Burgess et al., 1994).



الشكل 2-3: قطر مستعمرات عزلات أنواع مختلفة من الجنس *Fusarium* بعد ثلاثة أيام من التحضين عند درجتي حرارة 25°س و 30°س (غياب الأعمدة الزرقاء عند بعض العزلات بسبب عدم أخذ قطر المستعمرات عند الدرجة 30°س).

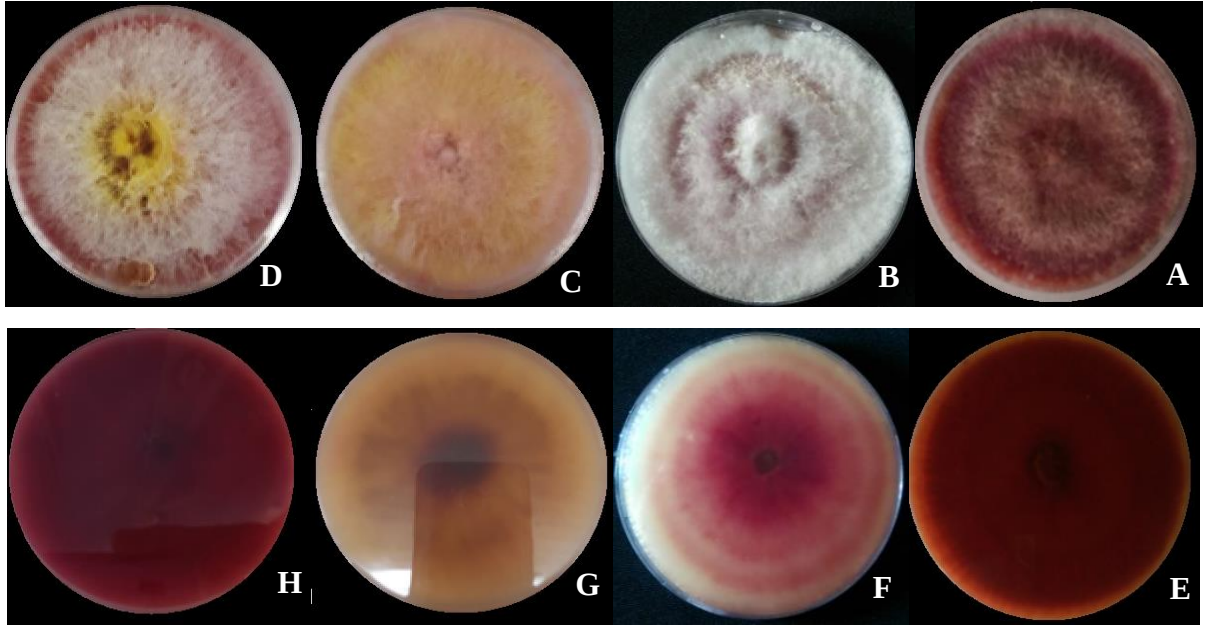
3.3 - الوصف المورفولوجي لأنواع الجنس *Fusarium* المدروسة:

المجموعة الأولى: تشمل العزلات FT14، FT12، FT11، FH10، FH9، FH8، FH7، FH2، FH15، FT18، FT16، FH40، FT32، FL30، FH29، FT27، FH21، FL20، FL19، FT43، FH42، FS101، FS70، FS66، FS65، FH62، FS61، FS59، FL58، FL53، FS102 والتي تشابهت في صفاتها المزرعية والمورفولوجية مع النوع *Fusarium culmorum*.

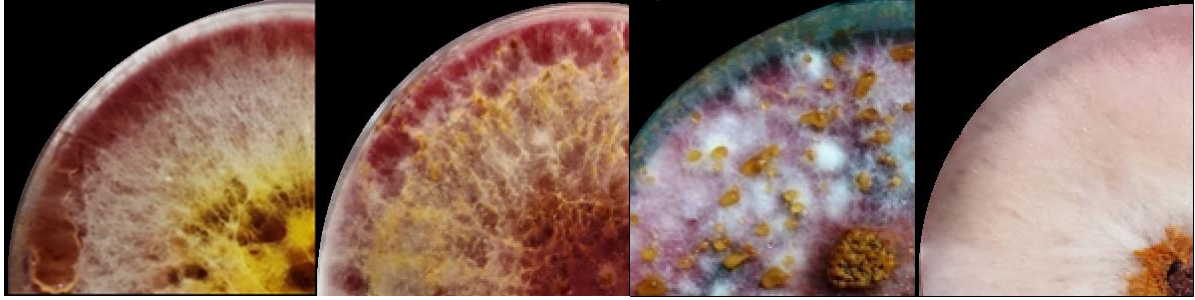
Fusarium culmorum (W.G. Smith) Saccardo

بلغ قطر مستعمرات العزلات السابقة بعد 3 أيام من التحضين في الظلام على وسط PDA (5.8-6.1) سم عند درجة الحرارة 25°س، و 1.8-2.4 سم عند درجة الحرارة 30°س، وهذا يتفق مع ما ذكر في دراسات سابقة من أن معدل نمو *F. culmorum* سريع على وسط PDA. وقد تباينت العزلات في كثافة الخيوط الفطرية المتشكلة وألوانها، فقد كان الميسيليوم الفطري كثيفاً في بعض العزلات ومتوسط الكثافة في بعضها الآخر، وتدرّج لونه بين الأبيض والوردي في بعض العزلات، وفي بعضها الآخر كان وردياً مصفراً، وبعضها كان ذا لون أصفر حول كتل الأبواغ المركزية وأبيض على الحواف. وقد شكل عدد قليل من العزلات صبغة صفراء وردية ضمن الأغار، ولكن معظمها شكل صبغة حمراء (الشكل 3-3). كما ظهرت وسادات بوغية على ميسيليوم بعض العزلات مع التقدم بالعمر، وتدرّج لونها بين الأصفر والبرتقالي الفاتح والبرتقالي الداكن، كما اختلف تورّعها بين عزلة وأخرى، فقد تجمّعت في بعض العزلات بوفرة في المركز بالقرب من قرص التلقيح فقط، أو تورّعت على كامل المستعمرة (الشكل 3-4). تُعزى الاختلافات المورفولوجية السابقة في عزلات نفس النوع إلى المرونة الوراثية للجنس *Fusarium* وقدرته على التباين الشكلي استجابة لتغيرات البيئة المحيطة (Burgess et al., 1994).

شكّلت عزلات هذا النوع على قطع أوراق القرنفل أبواغاً كونيدية كبيرة Macroconidia ضمن وسادات بوغية برتقالية اللون (الشكل 3-5، A)، هذه الأبواغ قصيرة ضخمة وذات نهايات عريضة stout، مقسّمة ب 3 – 5 حواجز عرضية (الشكل 3-5، B)، الخلية القمية لمعظمها مدوّرة Blunt (الشكل 3-5، C)، وبعضها خلية قمية محلّمة قليلاً Papillate (الشكل 3-5، D)، وتكون بذلك مشابهة للنوع *F. sambucinum* لكنّها أعرض وأقصر منها، والخلية القاعدية عادة مثلمة Notched لكنها تفتقر للشكل المميز لمظهر القدم، وقد تشكّل معظم الأبواغ على حوامل كونيدية متفرعة وحيدة الفياليد Monophialides ضمن الوسادات البوغية (الشكل 3-5، E). لم يشكّل هذا النوع أبواغاً كونيدية صغيرة Microconidia، لكنّه شكّل أبواغاً كلاميدية وفيرة كروية مزدوجة أو بشكل سلاسل (الشكل 3-5، F)، ولا تعدّ الأبواغ الكلاميدية معياراً موثقاً في التصنيف.



الشكل 3-3: أشكال مختلفة لمستعمرات النوع *F. culmorum* (A, B, C, D) السطح العلوي، (E, F, G, H) السطح السفلي.



الشكل 3-4: اختلاف حجم وتوزع الوسادات البوغية عند عزلات النوع *F. culmorum*



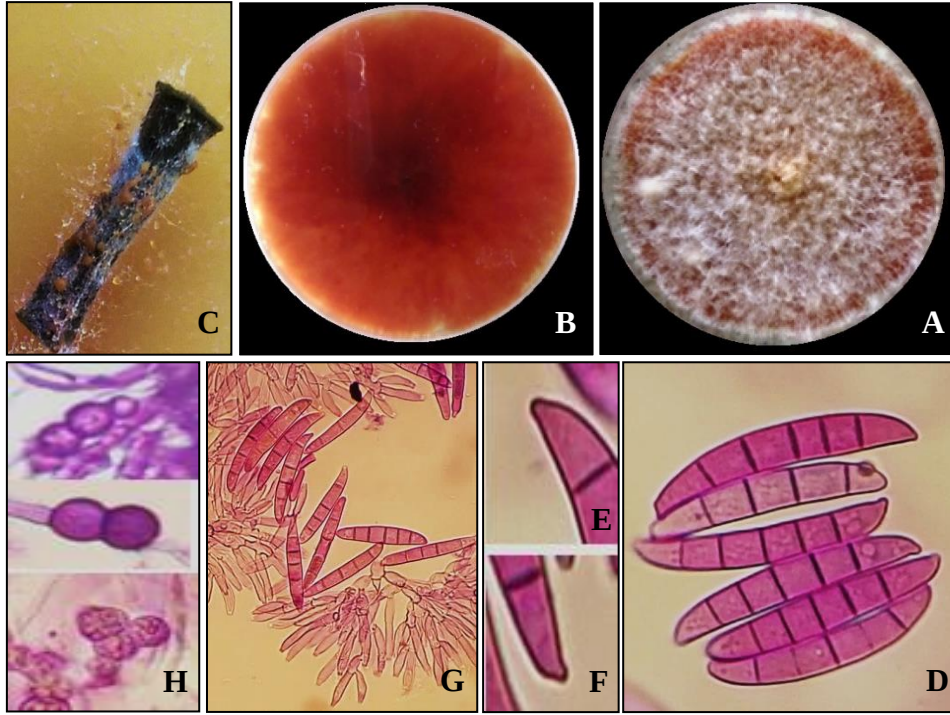
الشكل 3-5: الصفات الشكلية للنوع *F. culmorum*: A - وسادات بوغية على قطع أوراق القرنفل، B - أبواغ كونيدية كبيرة، C - بوغ كونيدي كبير ذو خلية قمية مدورة، D - بوغ كونيدي كبير ذو خلية قمية محللة، E - حوامل كونيدية متفرعة وحيدة الفياثيد ضمن الوسادات البوغية، F - أبواغ كلاميدية.

المجموعة الثانية: تشمل العزلات FH1، FH48، FT60، والتي تشابهت في صفاتها الزرعية والمورفولوجية مع النوع *Fusarium sambucinum*.

***Fusarium sambucinum* Fückel sensu strict**

يتشابه الشكل المورفولوجي لمستعمرات عزلات النوع *F. sambucinum* مع شكل مستعمرات النوع *F. culmorum*، ولكن أمكن التمييز بينهما بالاعتماد على قياس قطر المستعمرات على وسط PDA بعد 3 أيام من التحضين في الظلام، حيث بلغ قطر مستعمرات العزلات السابقة 3.2-3.5 سم عند درجة الحرارة 25°س، و 2-2.2 سم عند درجة الحرارة 30°س، وهذه الأقطار أقل من متوسط أقطار مستعمرات النوع *F. culmorum*. شكّلت عزلات هذا النوع خيوطاً بوعية صوفية بيضاء اللون، تحولت مع التقدّم بالعمر إلى وردية رمادية، وقد أنتجت أيضاً صبغة حمراء في الأغار (الشكل 3-6، A,B).

شكّلت عزلات هذا النوع على وسط CLA أبواغاً كونيدية كبيرة Macroconidia وفيرة ضمن وسادات بوعية برتقالية فاتحة متوضعة على قطع أوراق القرنفل (الشكل 3-6، C)، وقد كانت هذه الأبواغ قصيرة وعريضة ولكنها أطول وأقل عرضاً من النوع السابق *F. culmorum*، مقسّمة بـ 3 – 5 حواجز عرضية (الشكل 3-6، D)، والخلية القمية محلّمة Papillate (الشكل 3-6، E)، وتعدّ هذه السمة للأبواغ الكونيدية الكبيرة هي السمة المميزة لأبواغ النوع *F. sambucinum*، أمّا الخلية القاعدية عادة مثلمة Notched، أو لها الشكل المميز لمظهر القدم (الشكل 3-6، F)، وقد تشكّلت من خلايا مفردة مولدة للأبواغ الكونيدية محمولة على حوامل كونيدية متفرعة Branched Conidiophores ضمن الوسادات البوعية (الشكل 3-6، G). لم تشكّل عزلات هذا النوع أبواغاً كونيدية صغيرة Microconidia، وهذا يتفق مع (Nelson et al, 1983)، مع العلم أنّ بعض العزلات تنتج على بعض الأوساط الزرعية عدداً قليلاً من الأبواغ الصغيرة مكونة من 1-2 خلية (Ismail et al, 2006 ; Leslie and Summerell, 2015)، كما شكّل هذا النوع أبواغاً كلاميدية مفردة أو مزدوجة أو متوضعة في سلاسل (الشكل 3-6، H).



الشكل 3-6: الصفات الشكلية للنوع *F. sambucinum*، A-السطح العلوي، B-السطح السفلي، C- وسائد بوغية على قطع أوراق القرنفل، D -أبواغ كونيدية كبيرة، E- خلية قمية محملة، F- خلية قاعدية قديمة الشكل، G - حوامل كونيدية متفرعة وحيدة الفيايد ضمن الوسائد البوغية، H- أبواغ كلاميدية.

المجموعة الثالثة: تشمل العزلات FT63، FT83، FT72، FS87 التي تشابهت في صفاتها الزرعية والمورفولوجية مع النوع *Fusarium pseudograminearum*.

***Fusarium pseudograminearum* Aoki & O'Donnell**

بلغ قطر مستعمرات العزلات السابقة 4.6- 5.3 سم عند درجة الحرارة 25°س، و1.2- 2.2 سم عند درجة الحرارة 30°س. من الصعب تمييز أفراد النوع *F. graminearum* (group-2) عن أفراد النوع *F. pseudograminearum* (سابقاً group-1) (*F. graminearum* group-1) (Aoki and O'Donnell, 1999)، وذلك بالاعتماد على الصفات المورفولوجية للأبواغ الكونيدية الكبيرة، أو بالاعتماد على شكل الحوامل الكونيدية، ولكن أسهل طريقة للتمييز بينهما هي أن النوع *F. graminearum* يوصف بأنه متجانس الثالوس Homothallic أي أن التكاثر الجنسي يحدث على نفس المشيجة المتشكلة من بوغ واحد، وتتشكل ثمار زقية دورقية Perithecia على وسط CLA أو وسط آغار الجزر Carrot Agar (CA)، أما النوع *F. pseudograminearum* فهو متباين الثالوس Heterothallic أي أن التكاثر الجنسي يتطلب وجود مشيجتين مختلفتين فيزيولوجياً، وبالتالي العزلات

المأخوذة من بوع واحد غير قادرة على تشكيل أجسام ثمرية على أي من الأوساط السابقة (Francis and Burgess, 1977; Purss, 1971).

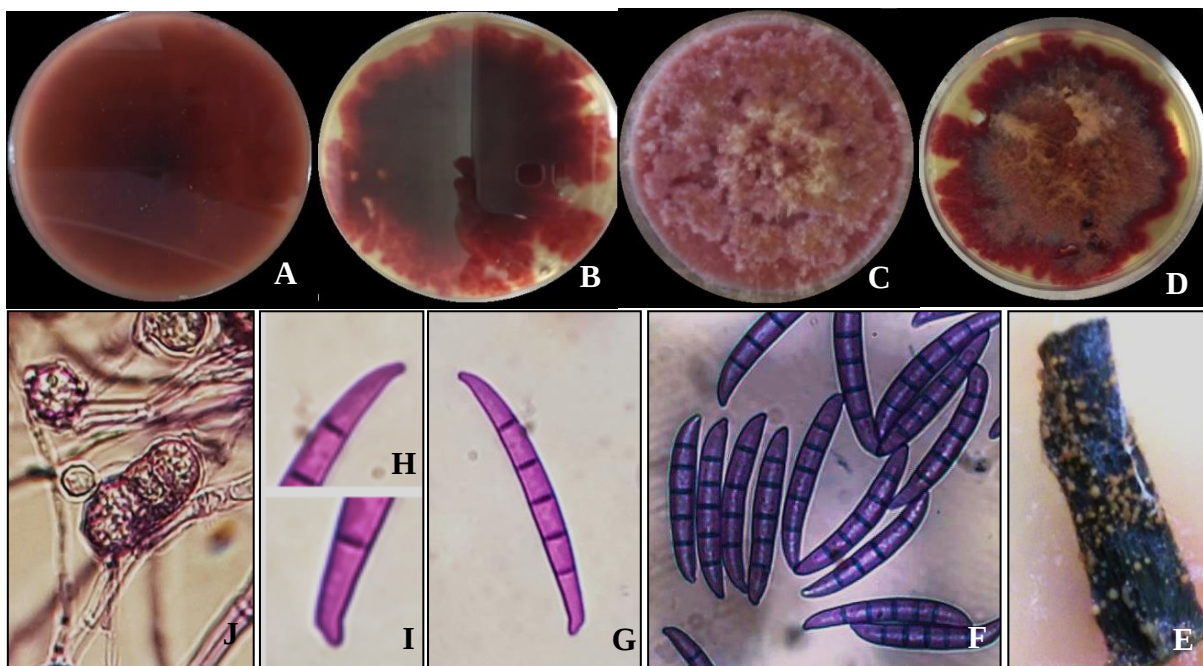
إن أفراد النوع *F. pseudograminearum* هي ممرضات محمولة بالتربة *Soil-borne*، وتسبب أعفان التاج لعدد كبير من العوائل النباتية منها القمح والشعير والشيلم، بينما أفراد النوع *F. graminearum* هي ممرضات محمولة بالهواء *Airborne*، وتسبب أمراضاً لأجزاء النباتات الهوائية مثل مرض لفحة السنابل للقمح والشعير والشوفان وغيرها (Burgess et al., 1994).

لم تشكل العزلات المدروسة أجساماً ثمرية على وسط آغار القرنفل، كما أُنْزِلت من جذور وتاج نباتات القمح، وهذا يرجح أن يكون هذا النوع *F. pseudograminearum*.

شكّلت عزلات هذا النوع على وسط PDA مستعمرات بعضها ذات حواف منتظمة وأخرى ذات حواف غير منتظمة، وخيوطاً بوعية بيضاء إلى صفراء أو حمراء اللون (الشكل 3-7، B,A)، كما أنتجت صبغة حمراء اللون ضمن الآغار (الشكل 3-7، D,C). الوسائد البوعية نادرة أو تكون مغطاة بالميسيليوم الكثيف.

شكّلت عزلات هذا النوع على وسط CLA أبواغاً كونيديية كبيرة ضمن وسادات بوعية برتقالية فاتحة (الشكل 3-7، E)، وهذه الأبواغ نحيلة مستقيمة تقريباً، السطح البطني لها مستقيم والسطح الظهري مقوّس قليلاً، وهي مقسّمة بحواجز مميزة تماماً عددها من 4 - 5 (الشكل 3-7، F,G)، الخلية القمية لها شكل الخطم أو مقوسة *curved* (الشكل 3-7، H)، والخلية القاعدية قديمة (الشكل 3-7، I)، وتغيب في هذا النوع الأبواغ الكونيديية الصغيرة، كما لوحظ تشكّل الأبواغ الكلاميديية (الشكل 3-7، J).

تنتمي الأنواع الثلاثة السابقة: *F. pseudograminearum*، *F. sambucinum*، *F. culmorum* إلى القسم *Discolor*، وتتميز جميع الأنواع التابعة لهذا القسم بأنها تكوّن خيوطاً بوعية غزيرة وأصبغة حمراء قرمزية ضمن الآغار على وسط PDA، ولكن يمكن التمييز بينها من خلال معدلات نموها على هذا الوسط، ومن خلال الشكل المورفولوجي للأبواغ الكونيديية الكبيرة (Nelson et al., 1983).

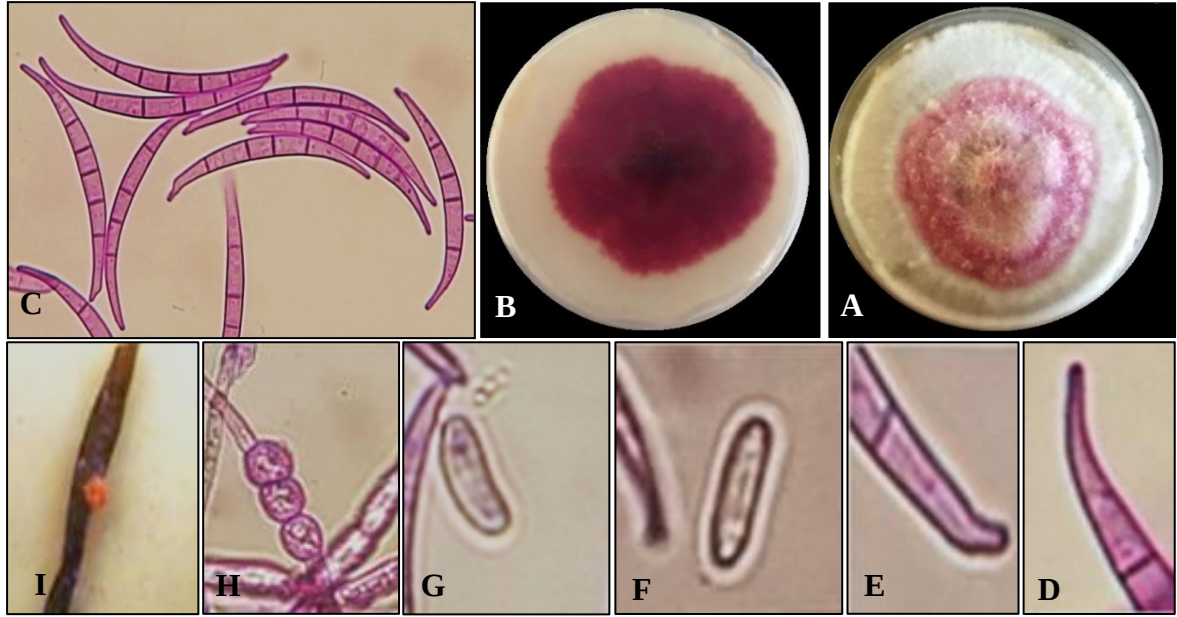


الشكل 3-7: الصفات الشكلية للنوع *F. pseudograminearum*: (A, B) - السطح العلوي، (C, D) - السطح السفلي، E - وسائد بوغية على قطع أوراق القرنفل، (F, G) - أبواغ كونيدية كبيرة، H - الخلية القمية مقوسة curved، I - الخلية القاعدية قديمة الشكل، J - أبواغ كلاميذية.

المجموعة الرابعة: تشمل العزلات FT13، FT76، FH77، FH80، FH81، FH82، والتي تشابهت في صفاتها الزرعية والمورفولوجية مع النوع *Fusarium acuminatum*.

***Fusarium acuminatum* Ellis & Everhart**

ينتمي النوع *F. acuminatum* إلى القسم Gibbosum. مستعمراته بطيئة النمو نسبياً حيث بلغ قطرها 2.5-3 سم عند درجة الحرارة 25°س، و 1.2-2 سم عند 30°س. وقد شكّلت عزلات هذا النوع خيوطاً بوغية بيضاء ووردية اللون، كما أنتجت أيضاً صبغة وردية أو حمراء في الأغار (الشكل 3-8، A, B). شكّلت عزلات هذا النوع على وسط CLA أبواغاً كونيدية كبيرة ضمن وسادات بوغية مشمشية اللون (الشكل 3-8، I)، وهذه الأبواغ نحيفة ومقوسة، ومقسمة غالباً بـ 4-5 حواجز (الشكل 3-8، C)، والخلية القمية متطاولة ومستدقة في نهايتها، وغالباً ما يوجد انحناء مميز في النصف العلوي من الخلية القمية (الشكل 3-8، D)، والخلية القاعدية قديمة واضحة (الشكل 3-8، E). وقد لوحظ وجود عدد قليل جداً من الأبواغ الكونيدية الصغيرة، غير مقسمة كلوية أو مغزلية (الشكل 3-8، F, G). كما تشكّل عدد قليل من الأبواغ الكلاميذية (الشكل 3-8، H). وتجدر الإشارة هنا إلى أن تشكيل أبواغ كونيدية صغيرة عند هذا النوع ليس معياراً تصنيفياً مهماً، فلم يتم تفريق العزلات المنتجة لأبواغ كونيدية صغيرة من العزلات غير المنتجة لها جزيئياً (Leslie and Summerell, 2006).



الشكل 3-8: الصفات الشكلية للنوع *F. acuminatum*: A-السطح العلوي، B-السطح السفلي، C - أبواغ كونيدية كبيرة، D- الخلية القمية متطاولة ومستدقة في نهايتها وذات انحناء مميز في النصف الثاني منها، E - الخلية القاعدية قديمة الشكل، F- بوع كونيدي صغير مغزلي، G- بوع كونيدي صغير كلوي، H- أبواغ كلاميدية، I- وسادة بوعية على قطع أوراق القرنفل.

المجموعة الخامسة: تشمل العزلات FT22، FT26، FT33، FT34، FH35، FH39، FH86، FS103، FS104، والتي تشابهت في صفاتها الزرعية والمورفولوجية مع النوع *Fusarium semitectum*.

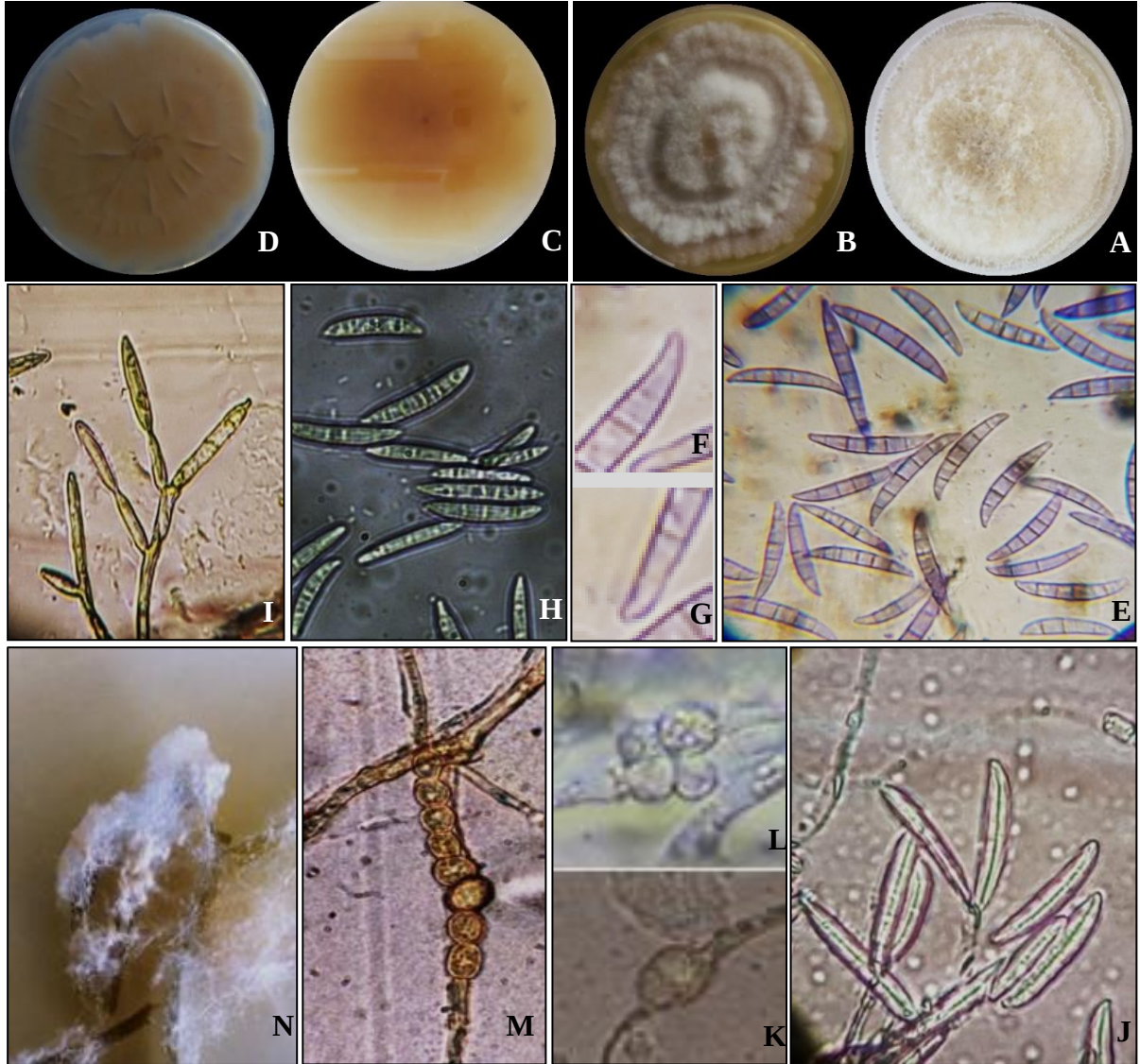
***Fusarium semitectum* Berkeley & Ravenel**

النوع *F. semitectum* هو مرادف لـ *F. incarnatum* كما اقترح من قبل (Leslie and Summerell, 2006)، وهو المفضل استخدامه كونه معروف على نطاق واسع إلى أن يتم المزيد من العمل بشأن المشاكل التصنيفية والتسمية لهذا النوع.

ينتمي النوع *F. semitectum* إلى القسم *Arthrosporiella*. بلغ قطر مستعمرات العزلات السابقة 3.4-4.2 سم عند درجة الحرارة 25°س، و 2.5-3 سم عند درجة الحرارة 30°س. وقد شكّلت عزلات هذا النوع خيوطاً بوعية غزيرة بيضاء اللون تحولت إلى البيج مع التقدم بالعمر، وكوّنت صبغة بنية فاتحة ضمن الأغار (الشكل 3-9، A-D).

شكّلت عزلات هذا النوع على وسط CLA أبواغاً كونيدية كبيرة وفيرة نحيفة نسبياً، السطح الظهري لها مقوّس قليلاً والسطح البطني مستقيم تقريباً، مقسّمة بـ 3-5 حواجز عرضية (الشكل 3-9،

(E)، والخلية القمية لها مستدقة (الشكل 9-3، F)، والقاعدية لها مظهر القدم (الشكل 9-3، G). كما لوحظ وجود أبواغ متوسطة Mesoconidia مغزلية الشكل مقسمة بـ 3-5 حواجز عرضية (الشكل 9-3، H)، تشكلت على حوامل كونيديية وحيدة أو متعددة الفيااليد (الشكل 9-3، I)، وتتشكل هذه الأبواغ ضمن أزواج معطية شكلاً يشبه أذني الأرنب (الشكل 9-3، J)، وتعدّ هذه الأبواغ المغزلية من أهم الصفات التي تميّز هذا النوع. كما لوحظ تشكل أبواغ كلاميديية مفردة أو في كتل أو في سلاسل (الشكل 9-3، K, L, M).



الشكل 9-3: الصفات الشكلية للنوع *F. semitectum*: (A، B) - السطح العلوي، (C، D) - السطح السفلي، E - أبواغ كونيديية كبيرة، F - الخلية القمية مستدقة، G - الخلية القاعدية قديمة، H - أبواغ كونيديية وسطية Mesoconidia مغزلية، I - حوامل كونيديية وحيدة الفيااليد Monophialides ومتعددة الفيااليد Polyphialides، J - توزيع الأبواغ وسطية ضمن أزواج معطية شكلاً يشبه أذني الأرنب، K, L, M - أبواغ كلاميديية مفردة، أو ضمن كتل أو سلاسل، N - وسائد بوعية.

المجموعة السادسة: تشمل العزلتين FT31، FT52 اللتان تشابهتا في صفاتهما الزرعية والمورفولوجية مع النوع *Fusarium verticillioides*.

***Fusarium verticillioides* (Saccardo) Nirenberg**

ينتمي النوع *F. verticillioides* إلى القسم *Liseola*. بلغ قطر مستعمرات العزلات السابقة 3-3.5 سم عند درجة الحرارة 25°س، و3.5-4 سم عند درجة الحرارة 30°س.

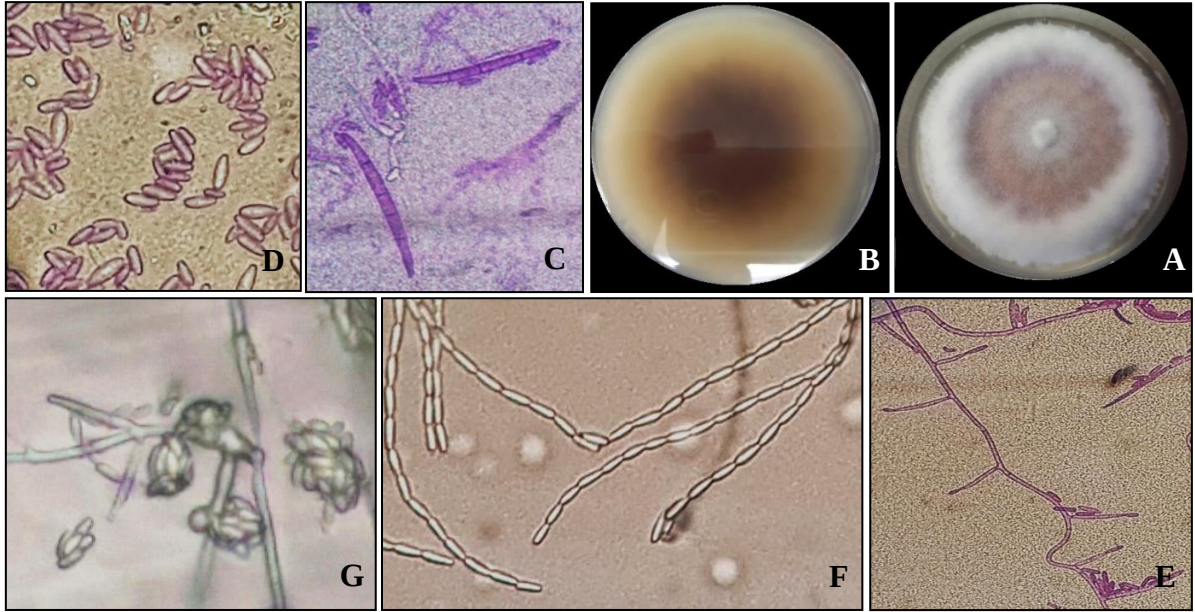
شكّلت عزلات هذا النوع خيوطاً بوغية بيضاء اللون مع ظهور لون بنفسجي مع التقدّم بالعمر، ولوحظ غياب الوسادات البوغية، وكوّنت هذه العزلات في الآغار صبغة رمادية إلى بنفسجية (الشكل 3-10، A,B).

كوّنت هذه العزلات أبواغاً كونيدية كبيرة طويلة ونحيفة منحنية قليلاً إلى مستقيمة، مقسّمة ب 3-4 حواجز عرضية، الخلية القميّة لها مقوسة قليلاً ومستدّقة إلى نقطة، الخلية القاعدية لها مظهر القدم (الشكل 3-10، C). وكوّنت هذه العزلات أبواغاً كونيدية صغيرة وفيرة صولجانية الشكل وحيدة الخلية (الشكل 3-10، D)، محمولة على حوامل بوغية وحيدة الفياليد (الشكل 3-10، E)، وقد تشكّلت ضمن سلاسل طويلة (الشكل 3-10، F)، كما لوحظ تشكّل الأبواغ الكونيدية الصغيرة ضمن رؤوس كاذبة على حوامل بوغية وحيدة الفياليد (الشكل 3-10، G)، ولم يتشكّل في هذا النوع أبواغ كلاميديّة.

المجموعة السابعة: تشمل العزلة FT67 والتي تشابهت في صفاتها الزرعية والمورفولوجية مع النوع *Fusarium andiyazi*. (تسجيل لأول مرة عالمياً على القمح)

***Fusarium andiyazi* Marasas, Rheeder, Lamprecht, Zeller & Leslie**

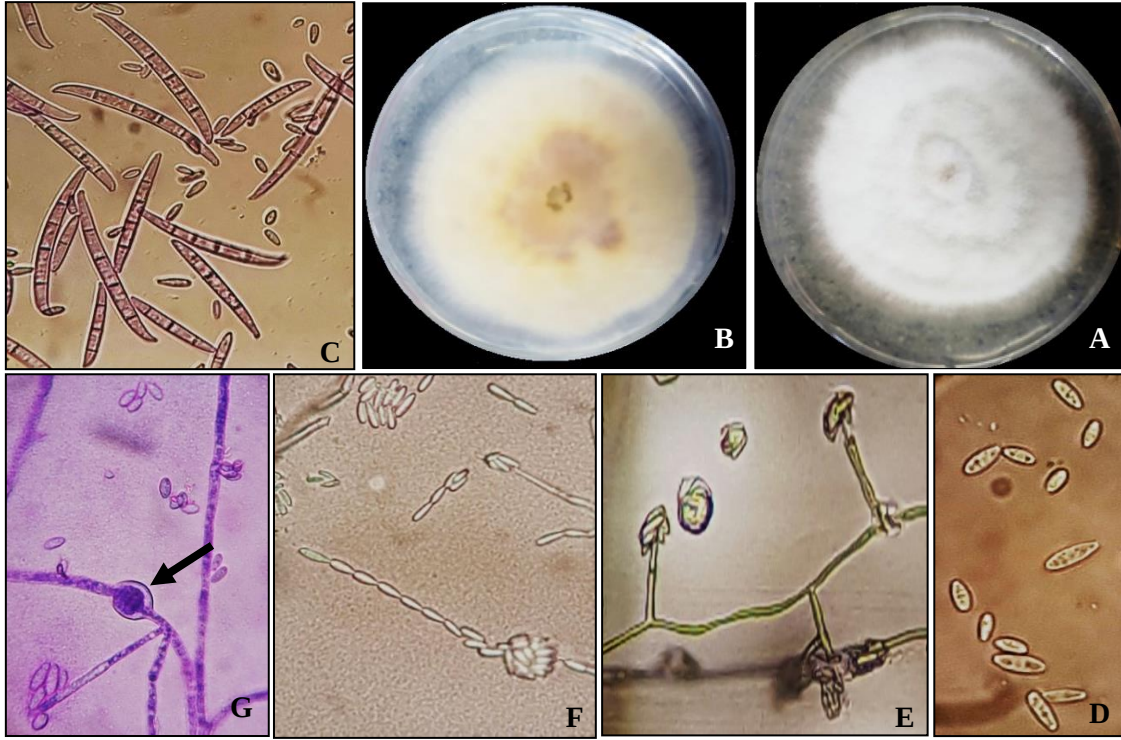
تمّ تعريف هذه العزلة في البداية على أنّها *F. verticillioides* بسبب التشابه المورفولوجي الكبير بين المكونات المجهرية لهذين النوعين، فكلاهما يشكّل أبواغاً كونيدية صغيرة متوضعة بشكل سلاسل أو بشكل رؤوس كاذبة ومحمولة على حوامل كونيدية وحيدة الفياليد، هذا بالإضافة إلى تشابه الأبواغ الكبيرة عندهما بشكل كبير. ولاحقاً باستخدام الطرائق الجزيئية تبين أنّ هذه العزلة هي *F. andiyazi*، حيث تمّ الرجوع إليها وإعادة توصيفها، وقد تمّت الإشارة في بعض المراجع إلى التشابه الكبير بين هذين النوعين وصعوبة التفريق بينهما بالاعتماد على الطرائق المورفولوجية (Leslie and Summerell, 2006).



الشكل 3-10: الصفات الشكلية للنوع *F. verticillioides* : A- السطح العلوي، B- السطح السفلي، C- أبواغ كونيدية كبيرة وأبواغ كونيدية صغيرة، D- أبواغ كونيدية صغيرة، E- حوامل كونيدية وحيدة الخلية *Monophialides*، F- أبواغ كونيدية صغيرة متوضعة في سلاسل طويلة، G- أبواغ كونيدية صغيرة متوضعة في رؤوس كاذبة محمولة على *Monophialides*.

ينتمي النوع *F. andiyazi* إلى القسم *Liseola*. بلغ قطر المستعمرة للعزلة (FT67) 3 سم عند درجة الحرارة 25°س و 2.7 سم عند درجة الحرارة 30°س. شكّلت هذه العزلة خيوطاً فطرية بيضاء اللون، مع ظهور لون بنفسجي فاتح، وكوّنت صبغة بنفسجية فاتحة في الأغار (الشكل 3-11، A,B).

شكّلت هذه العزلة أبواغاً كونيدية كبيرة نحيفة نسبياً، مقوّسة قليلاً إلى مستقيمة تقريباً، مقسّمة ب 3-5 حواجز عرضية (الشكل 3-11، C)، والخلية القمية مستدقة والقاعدية لها مظهر القدم، كما كوّنت أبواغاً كونيدية صغيرة وفيرة بيضوية أو صولجانية الشكل وحيدة الخلية (الشكل 3-11، D)، وقد تشكّلت ضمن رؤوس كاذبة محمولة على حوامل بوغية وحيدة الفياليد *Monophialides* (الشكل 3-11، E)، أو توضع ضمن سلاسل طويلة (الشكل 3-11، F). كما لوحظ تشكّل عدد قليل جداً من الأبواغ الكلاميدية الكاذبة *Pseudochlamydo-spores* (الشكل 3-11، G). تُكوّن سلاسل *F. andiyazi* أبواغاً كلاميدية كاذبة، وهي مشابهة للأبواغ الكلاميدية لكنها شفافة وذات جدر ملساء، وتكون غالباً مفردة أو تتشكل في سلاسل قصيرة (Marasas et al., 2001).



الشكل 11-3: الصفات الشكلية للنوع *F. andiyazi* -A- السطح العلوي، -B- السطح السفلي، -C- أبواغ كونيدية كبيرة وأبواغ كونيدية صغيرة، -D- أبواغ كونيدية صغيرة، -E- حوامل كونيدية وحيدة الخلية *Monophialides* ورؤوس كاذبة، -F- أبواغ كونيدية صغيرة متوضعة في سلسلة، -G- بوغ كلاميدي كاذب مفرد *Pseudochlamydospores*

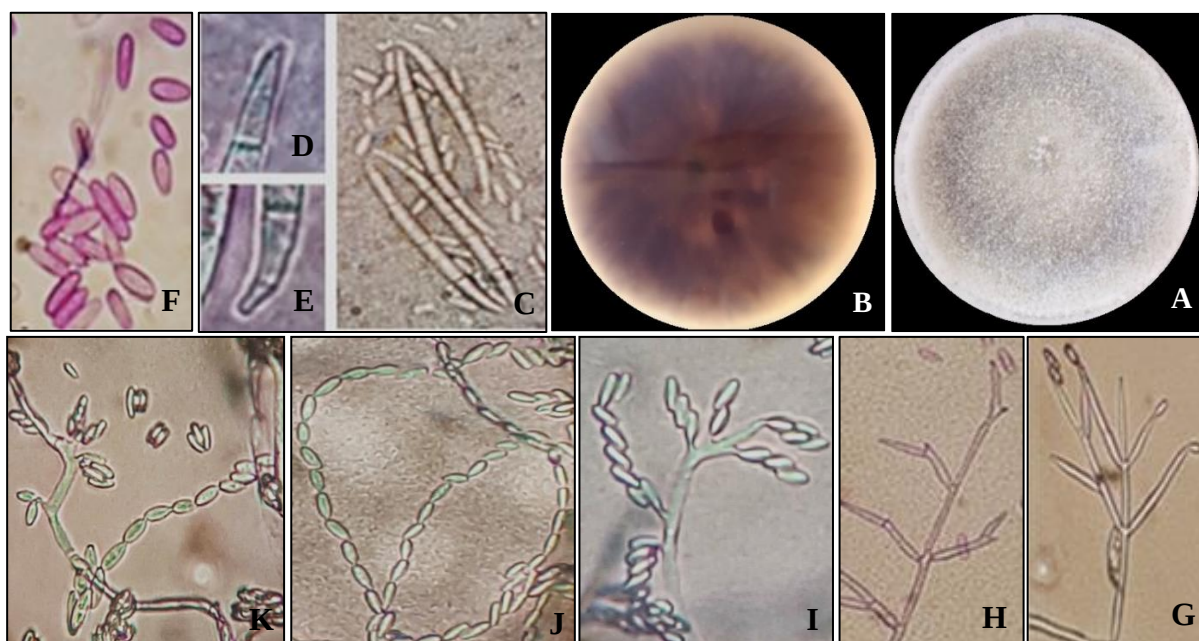
تم وصف النوع *F. andiyazi* من قبل Marasas وآخرين عام (2001)، وذلك بالاعتماد على الطرائق المورفولوجية والجزيئية، ومن المحتمل أن يكون هذا النوع موجوداً في الماضي، ولكنه كان يُصنّف *F. verticillioides* بسبب التشابه المورفولوجي الكبير بين هذين النوعين. ويُعدّ هذا النوع ممرضاً لنبات الذرة البيضاء، ومن المحتمل أن يكون هو النوع السائد عليها لكنه لم يُدرس على نطاق واسع (Leslie and Summerell, 2006).

المجموعة الثامنة: تشمل العزلات FT17 ، FH37 ، FT38 ، FH44 ، FH45 ، FT46 ، FT47 ، FH50 ، FS51 ، FS57 ، FS64 ، FS78 ، FT79 ، والتي تشابهت في صفاتها المزرعية والمورفولوجية مع النوع *Fusarium proliferatum*.

***Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nirenberg**

ينتمي النوع *F. proliferatum* إلى القسم *Liseola*. بلغ قطر مستعمرات العزلات السابقة 3-3.5 سم عند درجة الحرارة 25°س، و2.5-3 سم عند درجة الحرارة 30°س. شكّلت هذه العزلات خيوطاً فطرية بيضاء، مع ظهور لون بنفسجي فاتح، وكونت صبغة بنفسجية فاتحة في الأغار (الشكل 12-3، A,B).

شكّلت عزلات هذا النوع على وسط CLA أبواغاً كونيديية كبيرة نحيفة نسبياً، مقوّسة قليلاً إلى مستقيمة تقريباً، مقسّمة بـ 3-5 حواجز عرضية (الشكل 3-12، C)، الخلية القمية مستدقة (الشكل 3-12، D) والقاعدية قليلة التطور (الشكل 3-12، E). كما كوّنت هذه العزلات أبواغاً كونيديية صغيرة وفيرة بيضوية الشكل وحيدة الفياليد (الشكل 3-12، F)، محمولة على حوامل بوغية وحيدة الفياليد Monophialide (الشكل 3-12، G)، أو على حوامل بوغية متعددة الفياليدات Polyphialides (الشكل 3-12، H)، وقد توضعّت في سلاسل قصيرة (الشكل 3-12، I)، أو طويلة (الشكل 3-12، J)، أو في رؤوس كاذبة (الشكل 3-12، K)، ولم يتشكّل في هذا النوع أبواغ كلاميديية.



الشكل 3-12: الصفات الشكلية للنوع *F. proliferatum*: A-السطح العلوي، B-السطح السفلي، C- أبواغ كونيديية كبيرة وأبواغ كونيديية صغيرة، D- الخلية القمية مستدقة، E- الخلية القاعدية قديمة الشكل، F- أبواغ كونيديية صغيرة ، G- حوامل كونيديية وحيدة الفياليد Monophialides، H- حوامل كونيديية متعددة الفياليد Polyphialides، I- أبواغ كونيديية صغيرة متوضعة في سلاسل قصيرة، J- أبواغ كونيديية صغيرة متوضعة في سلاسل طويلة، K- أبواغ كونيديية صغيرة متوضعة في رؤوس كاذبة وسلاسل .

تتشابه الأنواع الثلاثة السابقة *F. verticillioides*، *F. andiyazi*، *F. proliferatum* مع بعضها في الكثير من الصفات، حيث تنتج صبغات بنفسجية في الأغار، وتشكّل أبواغاً كونيديية صغيرة متشابهة في الشكل ومتوضعة في سلاسل أو في رؤوس كاذبة، ولكن يمكن التمييز بين *F. proliferatum* و *F. verticillioides* من خلال طول السلاسل وشكل الحوامل الكونيديية (Burgess et al., 1994; Leslie and Summerell, 2006)، فسلاسل النوع *F. proliferatum* أقصر من سلاسل النوع *F.*

verticillioides، وتتشكل سلاسل النوع *F. proliferatum* غالباً على حوامل كونيدية متعددة الفياليديات Polyphialides، كما يمكن أن تتشكل على حوامل كونيدية وحيدة الفياليديات Monophialides، أما في النوع *F. verticillioides* تُحمل الأبواغ الكونيدية الصغيرة على حوامل كونيدية وحيدة الفياليديات فقط (Burgess et al., 1994; Leslie and Summerell, 2006)، كما يتشابه النوعان *F. verticillioides* و *F. andiyazi* كثيراً، وتُحمل الأبواغ الكونيدية الصغيرة فيهما على حوامل كونيدية وحيدة الفياليد فقط (Leslie and Summerell, 2006).

المجموعة التاسعة: تشمل العزلات FT23، FS55، FS56، والتي تشابهت في صفاتها المزرعية والمورفولوجية مع النوع *Fusarium solani*.

***Fusarium solani* (Martius) Appel & Wollenweber emend. Snyder & Hansen**

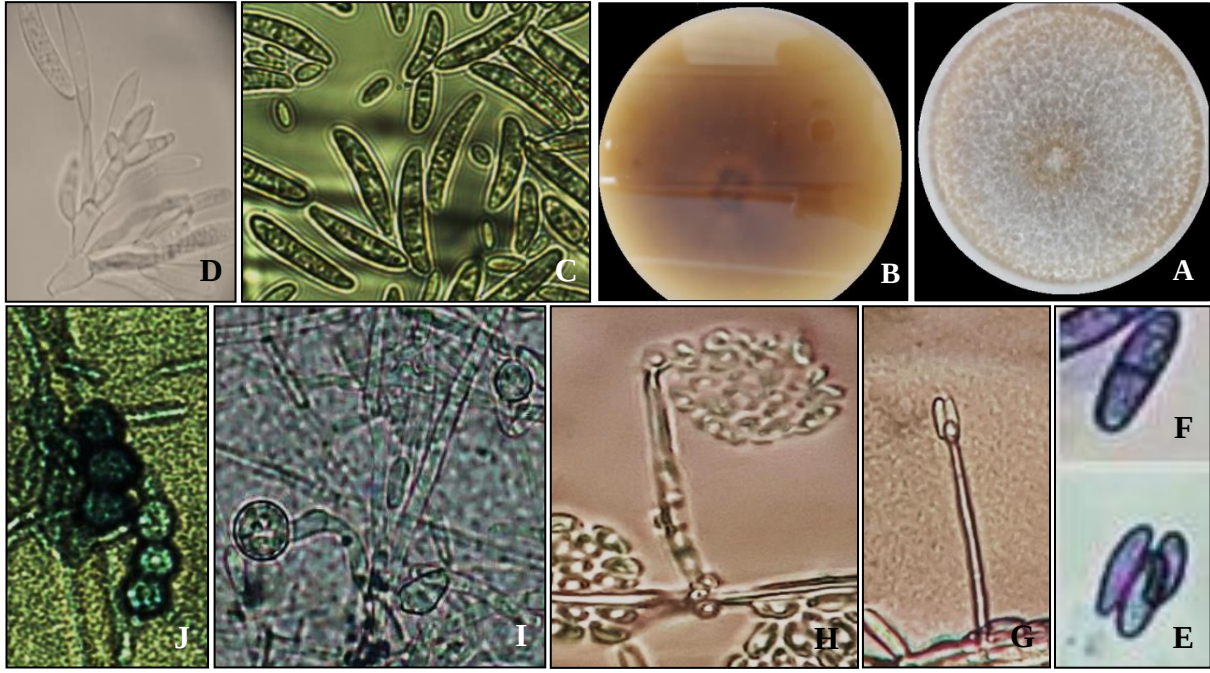
ينتمي النوع *Fusarium solani* إلى القسم Martiella. بلغ قطر مستعمرات العزلات السابقة 2 - 3 سم عند درجة الحرارة 25°س، و 3 - 3.5 سم عند درجة الحرارة 30°س. وقد شكّلت عزلات هذا النوع خيوطاً هيفية بيضاء إلى كريمية اللون، وكوّنت صبغة بنية ضمن الآغار (الشكل 3-13، A,B).

شكّلت هذه العزلات أبواغاً كونيدية كبيرة وفيرة، عريضة مقوّسة قليلاً، الخلايا القمية والقاعدية مدوّرة (الشكل 3-13، C)، وذلك ضمن وسادات هيفية من حوامل كونيدية وحيدة الفياليد (الشكل 3-13، D). الأبواغ الكونيدية الصغيرة ذات شكل بيضوي مكّونة من خلية واحدة أو من خليتين (الشكل 3-13، E,F)، وقد تشكّلت ضمن رؤوس كاذبة على حوامل كونيدية وحيدة الفياليد طويلة (الشكل 3-13، G,H). كما كوّنت أبواغاً كلاميدية غزيرة مفردة طرفية أو متوضعة في سلاسل (الشكل 3-13، I,J).

المجموعة العاشرة: تشمل العزلات (FS97، FS93، FS92، FH84، FH68، FT49، FT25)، والتي تشابهت في صفاتها المزرعية والمورفولوجية مع النوع *Fusarium oxysporum*.

***Fusarium oxysporum* Schlechtendahl emend. Snyder & Hansen**

ينتمي النوع *F. oxysporum* إلى القسم Elegans. بلغ قطر مستعمرات العزلات السابقة بعد 3 أيام من التحضين في الظلام على وسط PDA (3.8-3) سم عند درجة الحرارة 25°س، و 3.5-4 سم عند درجة الحرارة 30°س.

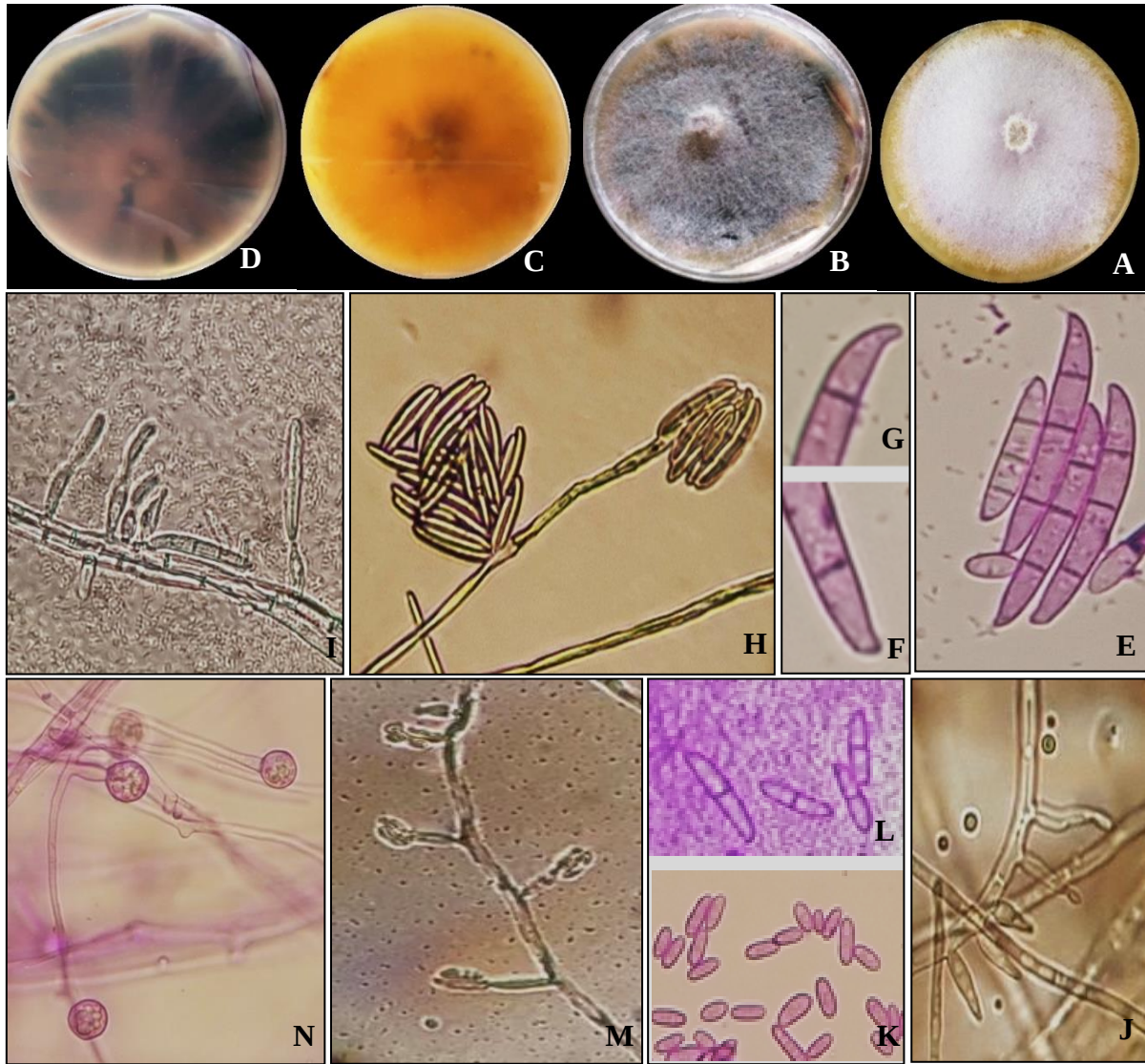


الشكل 13-3: الصفات الشكلية للنوع *F. solani*: A- السطح العلوي، B-السطح السفلي، C- أبواغ كونيدية كبيرة وأبواغ كونيدية صغيرة، D- حوامل كونيدية وحيدة الفياييد ضمن وسادة هيفية، E - أبواغ كونيدية صغيرة وحيدة الخلايا، F- أبواغ كونيدية صغيرة ثنائية الخلايا، G و H - حوامل كونيدية طويلة وحيدة الخلية *Monophialides* تحمل رؤوساً كاذبة، I-أبواغ كلاميدية مفردة، J- أبواغ كلاميدية متوضعة في سلاسل.

يتغير الشكل المورفولوجي لعزلات هذا النوع بشكل كبير على وسط PDA. شكّلت العزلات الناتجة في هذه الدراسة خيوطاً فطرية غير كثيفة، بيضاء إلى بنفسجية اللون، وكوّنت بعض العزلات صبغة بنفسجية فاتحة وأخرى صبغة بنفسجية داكنة إلى حمراء قرمزية في الأغار (الشكل 14-3، A-D).

شكّلت عزلات هذا النوع أبواغاً كونيدية كبيرة قصيرة إلى متوسطة الطول، هلالية إلى مستقيمة تقريباً، مقسّمة غالباً بثلاثة حواجز عرضية (الشكل 14-3، E)، والخليتان القمية والقاعدية لهذا النوع مستدقتان إلى حدٍّ ما (الشكل 14-3، F,G)، وقد تشكّلت هذه الأبواغ ضمن وسادات هيفية (الشكل 14-3، H)، وبشكل أقل على حوامل كونيدية وحيدة الفياييد على الخيوط الهيفية (الشكل 14-3، I)، كما كوّنت هذه العزلات أبواغاً كونيدية صغيرة وفيرة ببيضوية الشكل وحيدة أو ثنائية الخلايا (الشكل 14-3، K,L)، وقد تشكّلت ضمن رؤوس كاذبة محمولة على حوامل بوغية قصيرة وحيدة الفياييد *Monophialides* (الشكل 14-3، M) كما لوحظ تشكّل أبواغ كلاميدية مفردة طرفية غالباً عند هذا النوع وأحياناً بينية (الشكل 14-3، N).

يتشابه النوع *F. oxysporum* مع النوع *F. solani*، ولكن يمكن التمييز بينهما من خلال طول الحوامل الكونيدية التي تحمل الرؤوس الكاذبة، فهي قصيرة عند النوع الأول، وطويلة عند النوع الثاني.



الشكل 3-14: الصفات الشكلية للنوع *F. oxysporum*: (A,B)-السطح العلوي، (C,D)-السطح السفلي، E- أبواغ كونيدية كبيرة، F- الخلية القاعدية، G- الخلية القمية، H- أبواغ كونيدية متوضعة في وسادات هيفية، I- أبواغ كونيدية متشكلة على الميسيليوم مباشرة، J- حوامل كونيدية قصيرة وحيدة الفيااليد Monophialides، (K,L)- أبواغ كونيدية صغيرة، M- أبواغ كونيدية صغيرة متوضعة في رؤوس كاذبة، N- أبواغ كلاميذية مفردة.

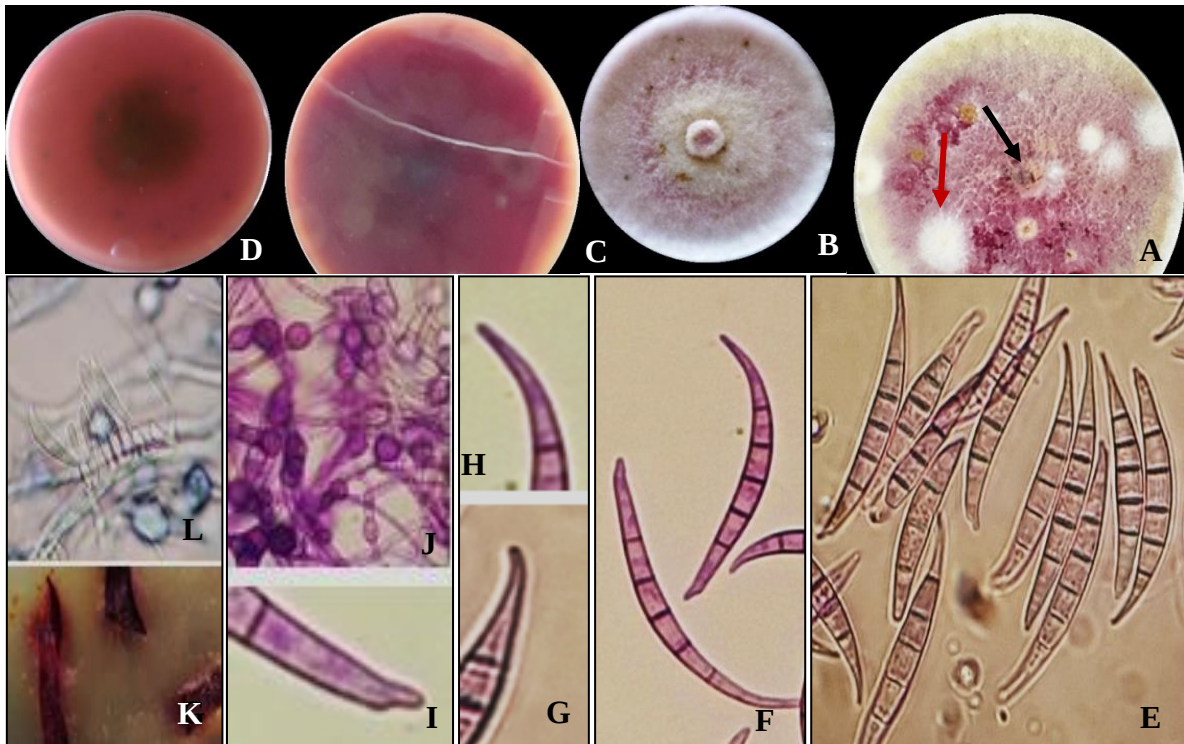
المجموعة الحادية عشرة: تشمل العزلات FS94، FS91، FH85، FH36، FH28، FH6، FH5، FS105، FS95، والتي تشابهت في صفاتها المزرعية والمورفولوجية مع النوع *Fusarium compactum*.

***Fusarium compactum* (Wollenweber) Gordon**

ينتمي النوع *F. compactum* إلى القسم Gibbosum. بلغ قطر مستعمرات العزلات السابقة على وسط PDA بعد 3 أيام من التحضين في الظلام 4 - 5 سم عند درجة الحرارة 25°س، و 4.5 - 5 سم عند

درجة الحرارة 30°س. شكّلت هذه العزلات خيوطاً فطرية بيضاء اللون، تتلون مع التقدم بالعمر، وتشكّلت الأبواغ الكونيدية الكبيرة على الميسيليوم ضمن كتل برتقالية اللون، وكوّنت صبغة حمراء في الآغار، كما لوحظ في بعض العزلات تشكّل بقع بنية داكنة Flecks على السطح السفلي للمستعمرة، وتجمّعت خيوط الميسيليوم بشكل حزم بيضاء tufts في بعض العزلات (الشكل 3-15، A-D).

كوّنت هذه العزلات أبواغاً كونيدية كبيرة ضمن وسادات هيفية برتقالية على الآغار وعلى قطع أوراق القرنفل (الشكل 3-15، K)، وهذه الأبواغ مقوّسة، عريضة في المنتصف، ومقسّمة عادةً بخمسة حواجز (الشكل 3-15، E,F)، الخلية القميّة لهذه العزلات متطاولة مستدّقة وإبرية (الشكل 3-15، G,H)، والخلية القاعدية لها مظهر القدم (الشكل 3-15، I). تغيب الأبواغ الكونيدية الصغيرة في هذا النوع، كما لوحظ تشكّل أبواغ كلاميديّة غزيرة (الشكل 3-15، J).



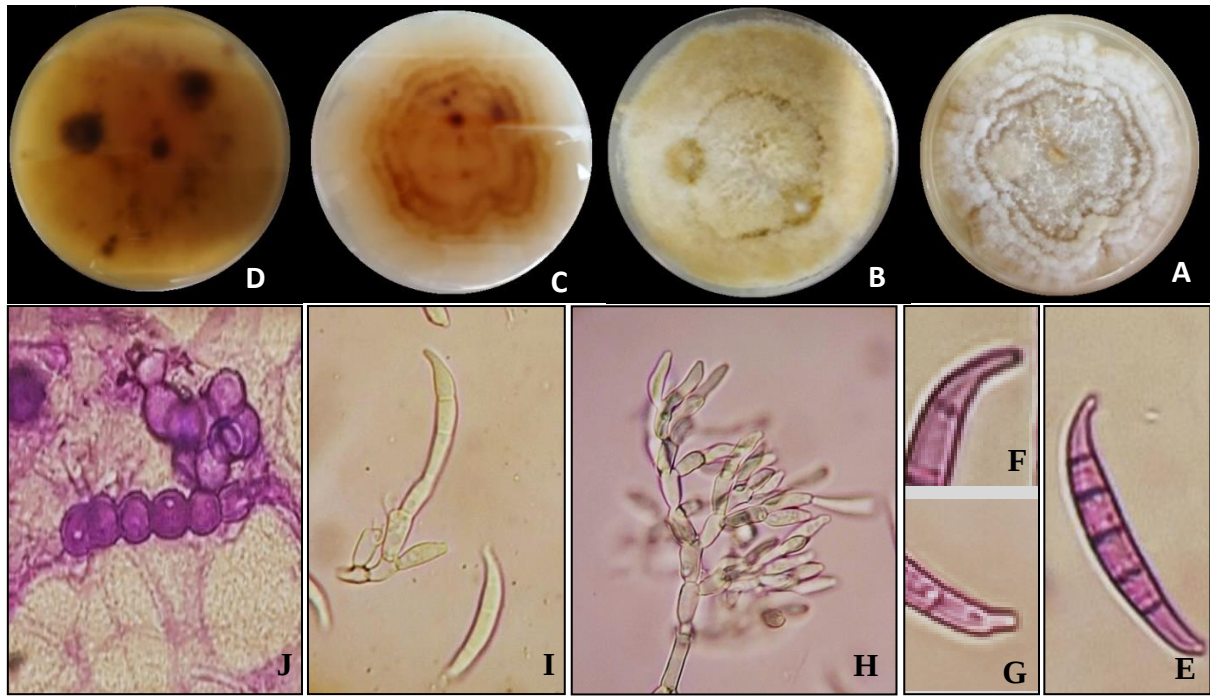
الشكل 3-15: الصفات الشكلية للنوع *F. compactum*: (A,B) - السطح العلوي، السهم الأسود يشير إلى كتل الأبواغ الكونيدية، السهم الأحمر يشير إلى Tufts، (C,D) - السطح السفلي، (E,F) - أبواغ كونيدية كبيرة، (G,H) - الخلية القميّة متطاولة ومستدقة في نهايتها، I - الخلية القاعدية قديمة الشكل، J - أبواغ كلاميديّة، K - وسادات هيفية برتقالية على الآغار وعلى قطع أوراق القرنفل، L - حوامل كونيدية.

المجموعة الثانية عشرة: تشمل العزلات FS75، FS74، FS73، FH71، FH54، والتي تشابهت في صفاتها المزرعية والمورفولوجية مع النوع *Fusarium equiseti*.

Fusarium equiseti (Corda) Saccardo

ينتمي النوع *F. equiseti* إلى القسم Gibbosum. بلغ قطر مستعمرات العزلات السابقة على وسط PDA بعد 3 أيام من التحضين في الظلام 3.5-4.5 سم عند درجة الحرارة 25°س، و1.5-3.5 سم عند درجة الحرارة 30°س. شكّلت عزلات هذا النوع خيوطاً هيفية غزيرة بيضاء اللون تحوّلت إلى البيج أو البني الفاتح مع التقدم بالعمر، وكوّنت صبغة بنية فاتحة ضمن الأغار، وقد لوحظ تشكّل بقع بنية داكنة Flecks على السطح السفلي للمستعمرة (الشكل 3-16، A-D).

كوّنت هذه العزلات أبواغاً كونيدية كبيرة مقوّسة، ومقسّمة بخمسة حواجز عرضية (الشكل 3-16، E)، والخلية القمية متطاولة ومستدقة (الشكل 3-16، F)، والخلية القاعدية لها مظهر القدم (الشكل 3-16، G)، وقد تشكّلت على حوامل كونيدية متفرعة وحيدة الفياليات (الشكل 3-16، H,I). لم تتشكل الأبواغ الكونيدية الصغيرة في هذا النوع، كما لوحظ تشكّل أبواغ كلاميذية في سلاسل أو كتل (الشكل 3-16، J). تتشابه عزلات النوعين *F. semitectum* و *F. equiseti* بشكل المستعمرات، ولكن يمكن التمييز بينهما بأن عزلات النوع *F. equiseti* فقط تكوّن بقعاً بنية داكنة flecks في الأغار.



الشكل 3-16: الصفات الشكلية للنوع *F. equiseti*: (A,B) - السطح العلوي، (C,D) - السطح السفلي، E - بوغ كونيدي كبير، F - الخلية القمية متطاولة ومستدقة في نهايتها، G - الخلية القاعدية قدمية الشكل، (H,I) - حوامل كونيدية متفرعة وحيدة الفياليات، J - أبواغ كلاميذية (كتل وسلاسل).

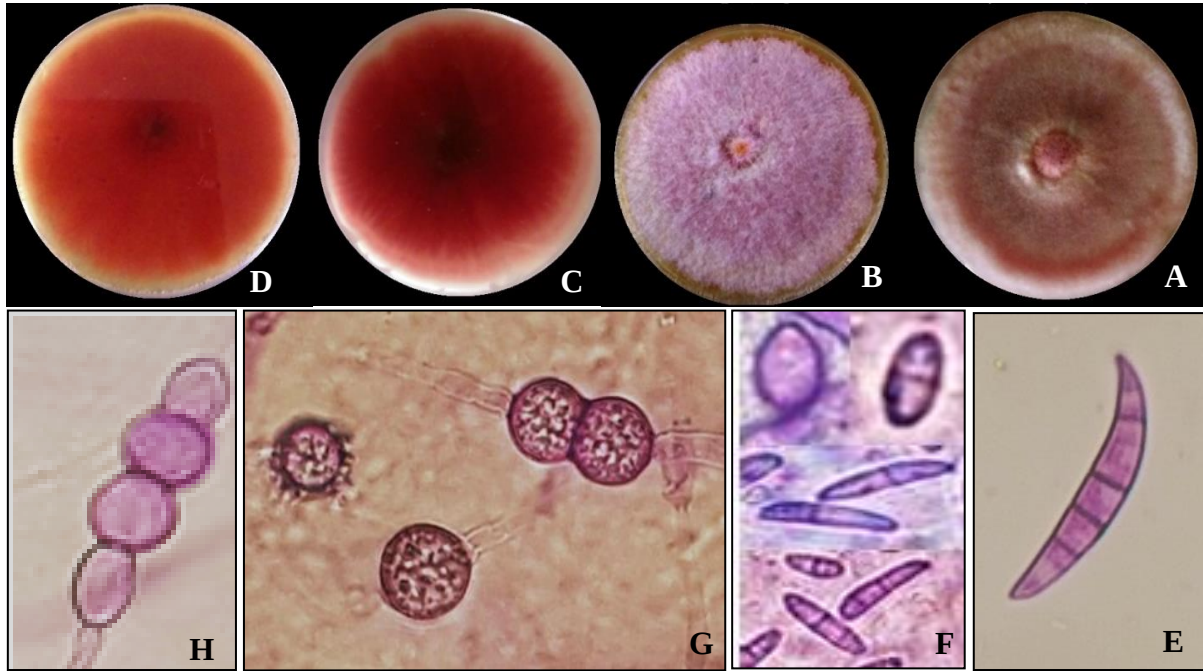
تتشابه الأبواغ الكونيدية الكبيرة لبعض عزلات النوع *F. compactum* مع الأبواغ الكونيدية الكبيرة للنوع *F. equiseti*، ويصعب التمييز بين النوعين بالاعتماد على صفات الأبواغ الكونيدية الكبيرة، لكن يُلاحظ أنّ الخلية القمية لأبواغ النوع الأوّل مستدقة وإبرية أكثر من الخلية القمية لأبواغ النوع الثاني.

المجموعة الثالثة عشرة: تشمل ثلاث عزلات FH41, FH24, FH4، والتي تشابهت في صفاتها المزرعية والمورفولوجية مع النوع *Fusarium sporotrichioides*.

Fusarium sporotrichioides Sherbakoff

ينتمي النوع *F. sporotrichioides* إلى القسم *Sporotrichiella*. بلغ قطر مستعمرات العزلات السابقة على وسط PDA بعد 3 أيام من التحضين في الظلام 5-5.5 سم عند درجة الحرارة 25°س، و3.5-4.5 سم عند درجة الحرارة 30°س. شكّلت هذه العزلات خيوطاً فطرية بيضاء اللون، تتحول إلى اللون الوردي مع التقدم بالعمر، وكوّنت صبغة حمراء في الآغار (الشكل 3-17، A-D).

شكّلت عزلات هذا النوع على وسط CLA أبواغاً كونيدية كبيرة متوسطة الطول، السطح الظهري لها مقوّس والسطح البطني مستقيم تقريباً، مقسّمة غالباً بثلاثة أو أربعة حواجز عرضية (الشكل 3-17، E)، والخلية القمية مقوسة، والقاعدية مثلثة *notched*. كما شكّلت أبواغاً كونيدية صغيرة مكونة من خلية واحدة أو من خليتين، وفيرة بيضوية أو إجاصية. وقد لوحظ أيضاً تشكل أبواغ وسطية مغزلية *Mesoconidia* (الشكل 3-17، F). كما لوحظ تشكل أبواغ كلاميذية مفردة أو مزدوجة أو في سلاسل (الشكل 3-17، G,H).



الشكل 3-17: الصفات الشكلية للنوع *F. sporotrichioides*: (A,B) - السطح العلوي، (C,D) - السطح السفلي، E - بوع كونيدي كبير، F - أبواغ كونيدية صغيرة بيضوية و إجاصية، وأبواغ كونيدية وسطية مغزلية، (G,H) - أبواغ كلاميذية.

المجموعة الرابعة عشرة: تشمل عزلة واحدة FS69، والتي تشابهت في صفاتها المزرعية والمورفولوجية مع النوع *Fusarium pseudocircinatum*

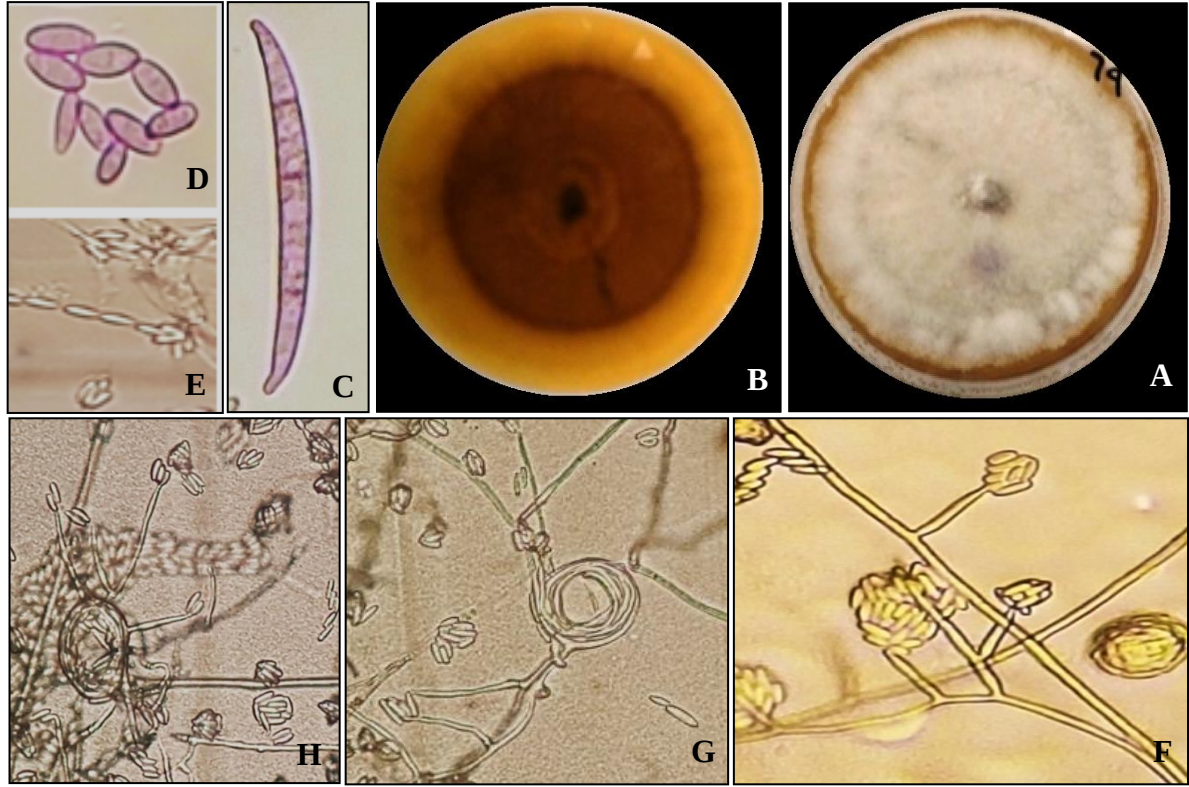
***Fusarium pseudocircinatum* O'Donnell & Nirenberg**

بلغ قطر المستعمرة للعزلة السابقة بعد 3 أيام من التحضين في الظلام على وسط PDA (3.2) سم عند درجة الحرارة 25°س، و2.5 سم عند درجة الحرارة 30°س.

شكّلت هذه العزلة خيوطاً فطرية بيضاء اللون، وكوّنت صبغة بنفسجية في الآغار بشكل خاص في منتصف الطبقة (الشكل 3-18، A,B).

شكّلت عزلات هذا النوع أبواغاً كونيديية كبيرة نحيفة نسبياً، مقوّسة قليلاً إلى مستقيمة تقريباً، مقسّمة غالباً بثلاثة حواجز عرضية، الخلية القمية منقارية Beaked والقاعدية لها مظهر القدم (الشكل 3-18، C). كما كوّنت هذه العزلات أبواغاً كونيديية صغيرة وفيرة بيضوية الشكل وحيدة الخلية (الشكل 3-18، D)، وقد تشكّلت ضمن سلاسل قصيرة أو ضمن رؤوس كاذبة (الشكل 3-18، E) محمولة على حوامل بوغية وحيدة الفياليد Monophialides (الشكل 3-18، F,G,H). ومن الصفات المورفولوجية الأخرى المميزة لهذا النوع، والتي تمّت ملاحظتها على وسط CLA تشكيل هيفات ملتفة Coiled hyphae (الشكل 3-18، G,H)، ولم يلاحظ تشكل أبواغ كلاميديية عند هذا النوع.

يتشابه النوع *F. pseudocircinatum* من الناحية المورفولوجية مع النوعين *F. circinatum* و *F. sterilihyphosum* من ناحية تشكيل هيفات ملتفة، حيث تُعدّ الأنواع الثلاثة السابقة هي الوحيدة التي تشكّل هذا النوع من الهيفات. يمكن تمييز النوع *F. pseudocircinatum* عن النوع *F. circinatum* من خلال تشكيل النوع الأول سلاسل قصيرة من الأبواغ الكونيديية الصغيرة، بينما تتشكّل هذه الأبواغ ضمن رؤوس كاذبة فقط عند النوع *F. circinatum*. ويمكن تمييز النوع *F. pseudocircinatum* عن النوع *F. sterilihyphosum* من خلال شكل الأبواغ الكونيديية الكبيرة، فهي في النوع الأخير أطول ومقسّمة عادة بـ 3-5 حواجز.



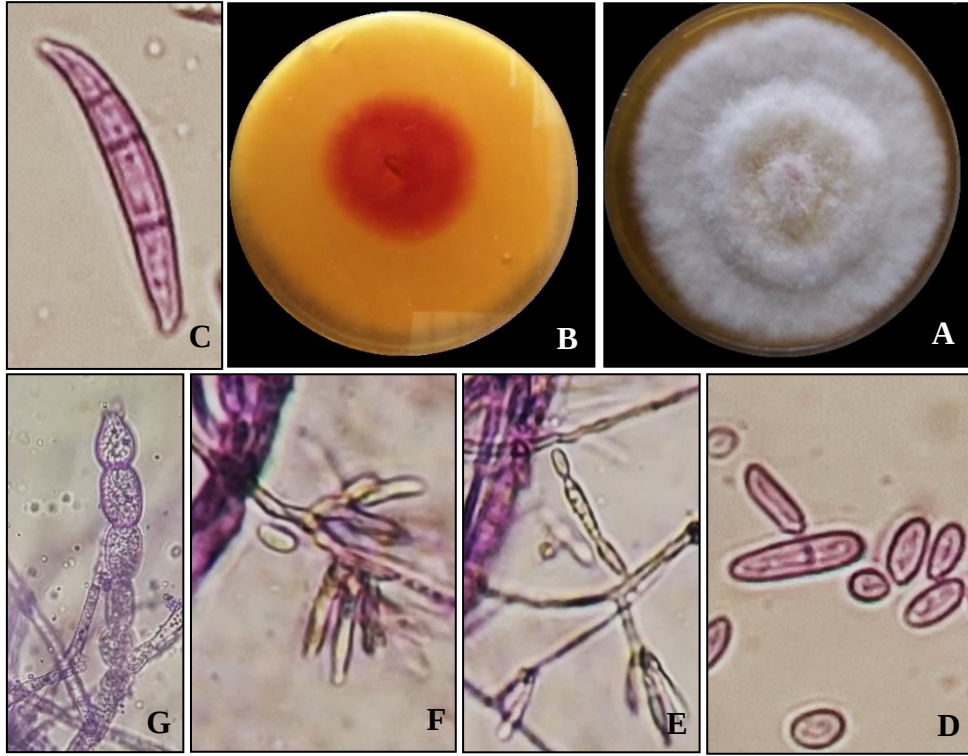
الشكل 3-18: الصفات الشكلية للنوع *F. pseudocircinatum* : A- السطح العلوي، B- السطح السفلي، C- بوغ كونيدي كبير، D - أبواغ كونيديية صغيرة، (E,F)- أبواغ كونيديية صغيرة ضمن سلاسل ورؤوس كاذبة، (G,H)- هيفات ملتفة Coiled hyphae.

المجموعة الخامسة عشرة: تشمل العزلتين FH3 وFS98، حيث لم يتم تعريفهما إلى مستوى النوع مورفولوجياً، وباستخدام الطرائق الجزيئية تبين أنّ العزلة FH3 هي *F. torulosum*. (تسجيل لأول مرة في سورية).

***Fusarium torulosum* (Berkeley & Curtis) Nirenberg**

بلغ قطر المستعمرة 5 سم بعد 3 أيام من التحضين في الظلام على وسط PDA عند درجة الحرارة 25°س. شكّلت هذه العزلة خيوطاً فطرية بيضاء إلى برتقالية اللون، وحلقات متحدة المركز، إضافة إلى وجود صبغة حمراء في الأغار بشكل خاص في منتصف الطبقة (الشكل 3-19، A,B).

شكّلت عزلات هذا النوع على وسط CLA أبواغاً كونيديية كبيرة متوسطة الطول، السطح الظهري لها مقوّس والسطح البطني مستقيم تقريباً، مقسّمة غالباً بثلاثة حواجز عرضية (الشكل 3-19، C)، والخلية القمية مقوسة، والقاعدية مثلثة Notched. كما شكّلت أبواغاً كونيديية صغيرة مكونة من خلية واحدة أو من خليتين (الشكل 3-19، D) تتشكل مفردة (الشكل 3-19، E). كما لوحظ تشكّل أبواغ كلاميديية متوضعة في سلاسل (الشكل 3-19، G). تتوافق هذه الصفات مع صفات النوع *F. torulosum* حسب (Nirenberg, 1995; Summerell and Leslie, 2006).



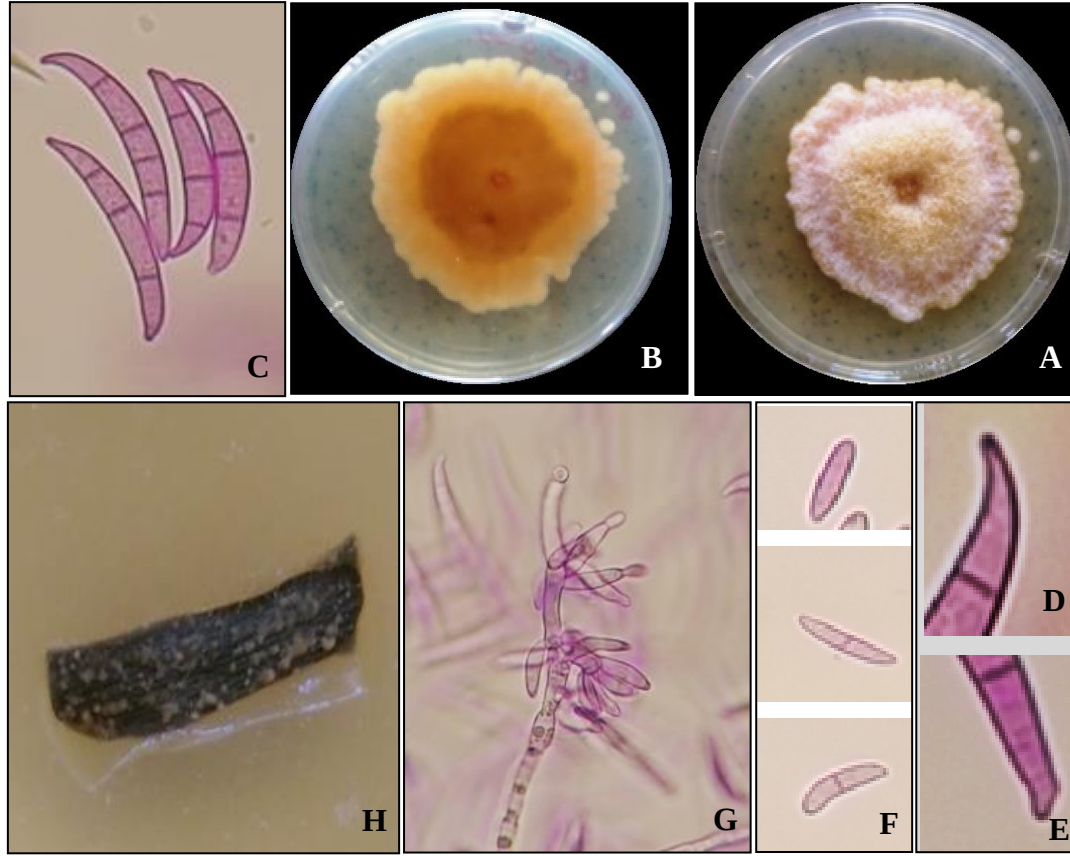
الشكل 3-19: الصفات الشكلية للنوع *F. torulosum*: A- السطح العلوي، B-السطح السفلي، C - بوغ كونيدي كبير، D- أبواغ كونيدية صغيرة بيضوية مكونة من خلية أو خليتين، E- بوغ كونيدي مفرد على حامل كونيدي، F- حوامل كونيدية، G- أبواغ كلاميدية في سلاسل.

المجموعة السادسة عشرة: تنتمي إليها العزلة FS100، والتي تشابهت في صفاتها المزرعية والمورفولوجية مع النوع *Fusarium polyphialidicum*.

***Fusarium polyphialidicum* Marasas, Nelson, Toussoun & van Wyk**

مستعمرات هذا النوع بطيئة النمو نسبياً، حيث بلغ قطر المستعمرة 2.5 سم عند درجة الحرارة 25°س، و 3 سم عند درجة الحرارة 30°س، وقد شكّلت هذه العزلة مشيجة كثيفة ذات لون أبيض إلى برتقالي فاتح ومحيط زهري، كما أنتجت صبغة صفراء في الأغار (الشكل 3-20، A,B).

شكّلت هذه العزلة على وسط CLA أبواغاً كونيدية كبيرة ضمن وسادات هيفية بيضاء إلى برتقالية فاتحة (الشكل 3-20، H)، وهذه الأبواغ نحيفة مقوّسة ومقسّمة غالباً بـ 3-4 حواجز (الشكل 3-20، C)، الخلية القمية مقوّسة (الشكل 3-20، D)، والخلية القاعدية قديمة الشكل (الشكل 3-20، E)، وقد لوحظ وجود أبواغ كونيدية صغيرة مغزلية مكونة من خلية واحدة أو خليتين (الشكل 3-20، F).



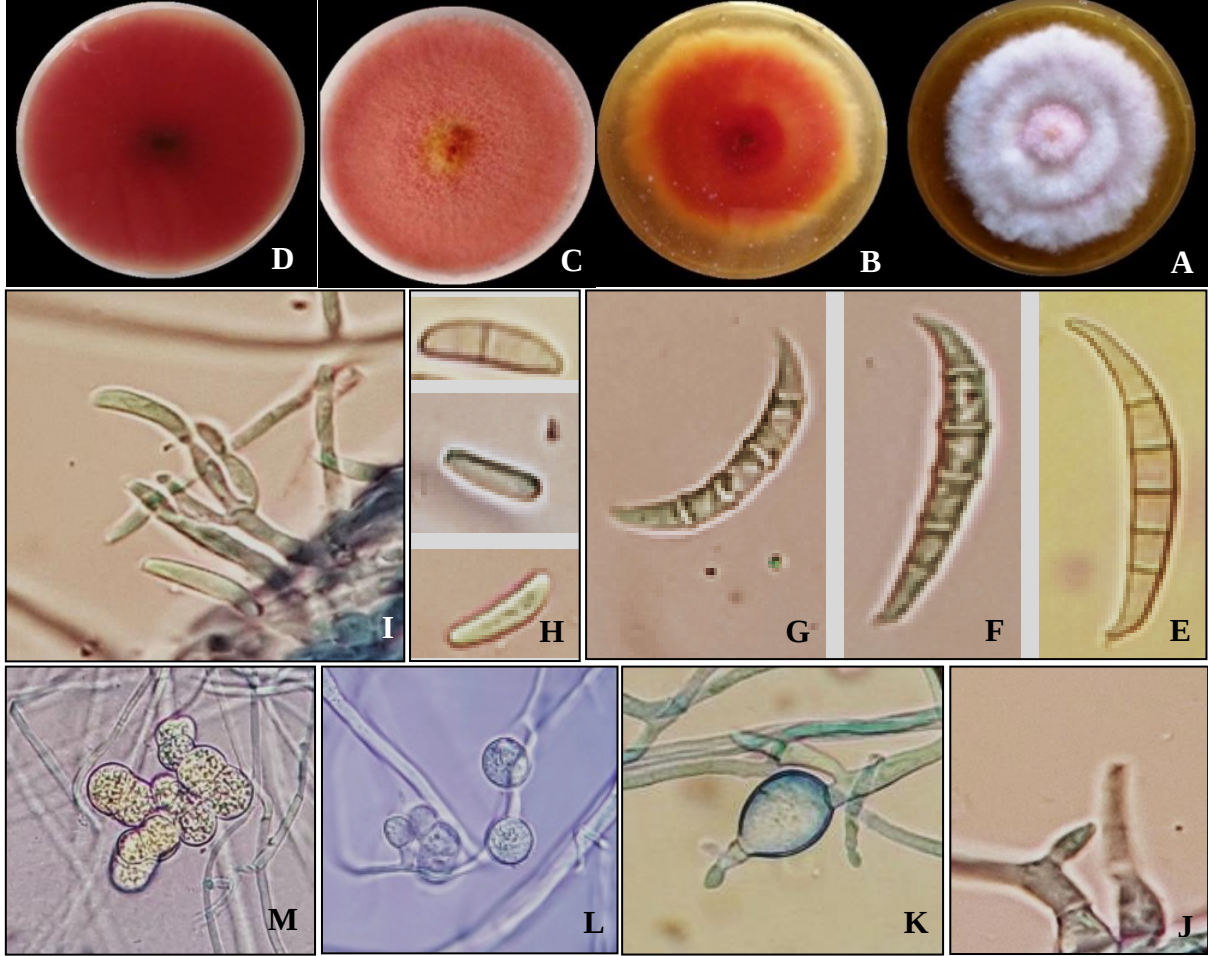
الشكل 3-20: الصفات الشكلية للنوع *F. polyphialidicum*: A- السطح العلوي، B- السطح السفلي، C - أبواغ كونيدية كبيرة، D- الخلية القمية مقوسة، E- الخلية القاعدية قديمة الشكل، F- أبواغ كونيدية صغيرة، G- حوامل كونيدية، H- وسادات هيفية على قطع أوراق القرنفل.

المجموعة السابعة عشرة: تنتمي إليها العزلة FS88، والتي تمّ تعريفها في البداية بالاعتماد على الطرائق المورفولوجية *F. transvaalense*، حيث تشابهت بشكل كبير في صفاتها المورفولوجية مع وصف هذا النوع حسب (Sandoval-Denis et al., 2018)، ولكن باستخدام الطرائق الجزيئية تبين أنها تنتمي للنوع *Fusarium brachygibbosum*.

***Fusarium brachygibbosum* Padwick (التسجيل لأول مرة في سورية)**

بلغ قطر المستعمرة 5 سم عند درجة الحرارة 25°س، ومن الملاحظ تغير شكل المستعمرة بسرعة، إذ كانت قطنية كثيفة بيضاء إلى زهرية اللون، على شكل حلقات متحدة المركز، والخلفية حمراء إلى برتقالية في الوسط وصفراء في المحيط، تحولت مع التقدم بالعمر إلى برتقالية مخملية، مع وجود خيوط فطرية صفراء اللون في الوسط، والخلفية حمراء أو خمرية (الشكل 3-21، A-D).

شكّلت هذه العزلة على وسط CLA أبواغاً كونيدية كبيرة، مقسّمة غالباً ب 4-5 حواجز، جدرها سميكة، الخلية الوسطى عريضة، والخلية القمية مستدقة أو خطافية، والخلية القاعدية قديمة (الشكل 3-21)، (E,F,G). وقد لوحظ وجود أبواغ كونيدية صغيرة بيضوية أو مغزلية، أو مقوسة قليلاً في بعض الأحيان، مكونة من خلية أو خليتين (الشكل 3-21، H)، وبالنسبة للحوامل الكونيدية للأبواغ الصغيرة فقد كانت قصيرة قارورية ووحيدة الفياليد (الشكل 3-21، I,J). كما شكل هذا النوع أبواغاً كلاميدية وفيرة مفردة أو متوضعة ضمن سلاسل أو كتل (الشكل 3-21، K,L,M).



الشكل 3-21: الصفات الشكلية للنوع *F. brachygibbosum*: A- السطح العلوي لمستعمرة حديثة (بعد 5 أيام)، B- السطح السفلي لمستعمرة حديثة، C- السطح العلوي لمستعمرة قديمة (بعمر أسبوعين)، D- السطح السفلي لمستعمرة قديمة، (E,F,G)- أبواغ كونيدية كبيرة، H- أبواغ كونيدية صغيرة، (I,J)- حوامل كونيدية وحيدة الخلايا، (K, L,M) - أبواغ كلاميدية .

تمّ تعريف النوع *F. brachygibbosum* كممرض لعدد من النباتات مثل القمح (Gebremariam et al., 2017)، والبقوليات (Tan et al., 2011)، والنباتات الطبية (Gashgari et al., 2016).

وأشجار اللوز (Stack *et al.*, 2017)، وأشجار الزيتون (Trabelsi *et al.*, 2017)، والذرة (Shan *et al.*, 2017)، والشوندر السكري (Cao *et al.*, 2018)، ولكن حسب معلوماتنا لم يتم عزله سابقاً من أي نوع من النباتات في سورية.

المجموعة الثامنة عشرة: تنتمي إليها العزلة FS89، والتي تشابهت في صفاتها المزرعية والمورفولوجية مع النوع *Fusarium chlamydosporum* (التسجيل لأول مرة في سورية).

***Fusarium chlamydosporum* Wollenweber & Reinking**

ينتمي النوع *F. chlamydosporum* إلى القسم *Sporotrichiella*. بلغ قطر المستعمرة 3.5 سم على وسط PDA بعد 3 أيام من التحضين في الظلام عند درجتي الحرارة 25 و30°س. ظهرت المستعمرة قطنية كثيفة بيضاء اللون وزهرية في الوسط، وكوّنت صبغة حمراء في الأغار. تحولت بعد 10 أيام لتصبح مسطحة زهرية ومجعدة في الوسط، والخلفية بلون خمري أو نبيذي (الشكل 3-22، A-D).

شكّلت هذه العزلة على وسط CLA أبواغاً كونيديية كبيرة لكنها قليلة جداً، السطح الظهري لها مقوّس قليلاً والسطح البطني مستقيم تقريباً، ومقسّمة غالباً بثلاثة حواجز عرصية، الخلية القمية مقوسة، والقاعدية مثلثة Notched. الأبواغ الكونيديية الصغيرة وفيرة ومكونة من خلية واحدة أو خليتين، وقد تشكّلت بشكل مفرد على حوامل كونيديية وحيدة أو متعددة الفيااليدات. الحوامل الكونيديية متعددة الفيااليدات متطورة وذات تفرعات ثنائية أو شجيرية، كما لوحظ تشكّل أبواغ كلاميديية مفردة أو مزدوجة معظمها ذي موضع جانبي أو في سلاسل أو كتل (الشكل 3-22).

المجموعة التاسعة عشرة: تنتمي إليها العزلة FS99، والتي تشابهت في صفاتها المزرعية والمورفولوجية مع النوع *Fusarium redolens*.

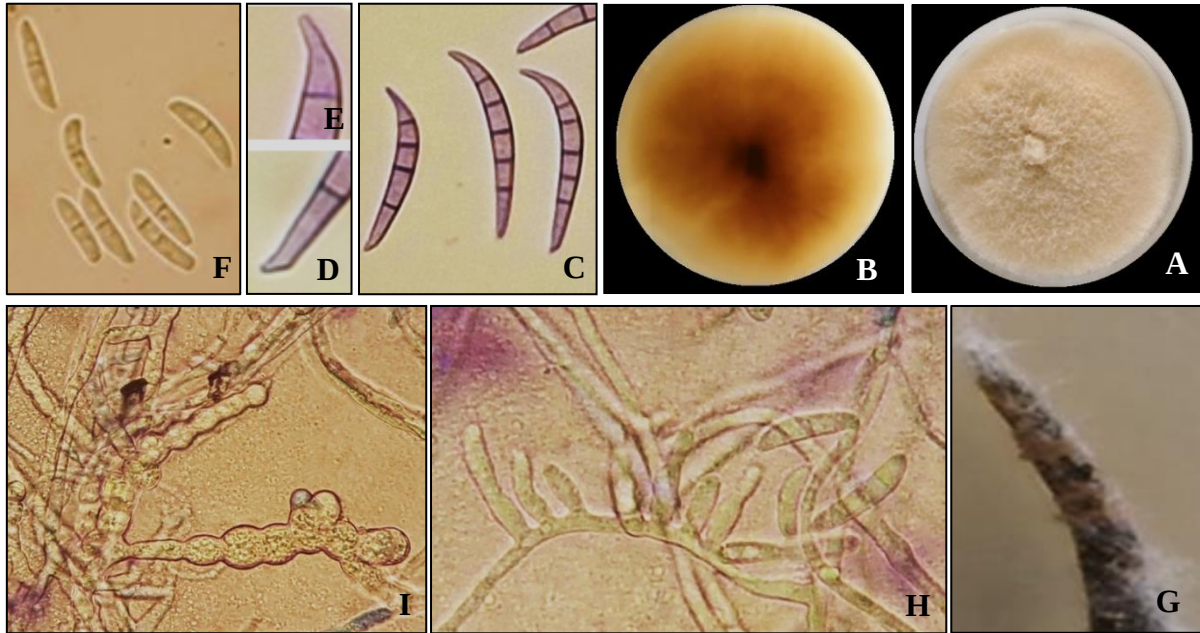
***Fusarium redolens* Wollenweber**

بلغ قطر المستعمرة 3.8 سم على وسط PDA بعد 3 أيام من التحضين في الظلام عند درجة الحرارة 25°س. شكّلت هذه العزلة مستعمرات زغبية بيضاء إلى كريمية ومائلة إلى الزهري الخفيف جداً، وكوّنت صبغة بنية فاتحة في الأغار (الشكل 3-23).



الشكل 3-22: الصفات الشكلية للنوع *F. chlamydosporum*: A- السطح العلوي لمستعمرة حديثة (بعد 5 أيام)، B- السطح السفلي لمستعمرة حديثة، C- السطح العلوي للمستعمرة (بعد 10 أيام)، D- السطح السفلي لمستعمرة قديمة، E - بوغ كونيدي كبير، F- أبواغ كونيدية صغيرة، (G، H، I، J، K) - حوامل كونيدية، (L، M، N) - أبواغ كلاميدية.

شُكِّلَت عزلة هذا النوع على وسط CLA أبواغاً كونيدية كبيرة ضمن وسادات هيفية كريمة إلى بنية فاتحة، ومقسمة بـ 4-5 حواجز والثلاث العلوي أعرض غالباً من الثلثين الباقيين، والخلية القمية خطافية Hooked، والخلية القاعدية قديمة. الأبواغ الكونيدية الصغيرة وفيرة أسطوانية الشكل مكونة من خليتين، وغالباً تستدق باتجاه إحدى النهايتين، ومحمولة على حوامل كونيدية وحيدة الخلية تشكلت على خيوط هوائية، وقد أشارت بعض المراجع إلى تكونها ضمن رؤوس كاذبة بالإضافة إلى تكونها على الميسيليوم (Leslie and Summerell, 2006). كما لوحظ تشكُّل الأبواغ الكلاميدية ضمن سلاسل، وقد كانت بنية أو جانبية (الشكل 3-23). تمَّ تسجيل هذا النوع على القمح سابقاً (Gebremariam et al., 2017).



الشكل 3-23: الصفات الشكلية للنوع *F. redolens*، A-السطح العلوي، B-السطح السفلي، C - أبواغ كونيدية كبيرة، D- الخلية القاعدية قديمة، E- الخلية القمية خطافية، F - أبواغ كونيدية صغيرة مكونة من خليتين، G- وسائد بوغية على قطع أوراق القرنفل، H- حوامل كونيدية وحيدة الخلية، I- أبواغ كلاميدية .

المجموعة العشرون: تنتمي إليها العزلة FS96، والتي لم نتمكن من تعريفها بالاعتماد على الصفات المورفولوجية، ولكن بالاعتماد على مقارنة التسلسل النيوكليوتيدي لجزء من المورثة TEF1- α لهذه العزلة مع تسلسل العزلات المشابهة لها على NCBI كانت أعلى نسبة تشابه مع النوع *F. flocciferum* و *Fusarium* sp.، لكن الدراسات المورفولوجية لهذا النوع قليلة جداً، وحسب (Nelson et al, 1983) لا يكون *F. flocciferum* أبواغاً كونيدية صغيرة، لكن في هذه العزلة تكونت

أبواغ كونيدية صغيرة وبغزارة، وذلك يتفق مع (Helal et al., 2018) حيث ذكر أنّ هذا النوع يكون أبواغاً مختلفة الأحجام، وأنّ هذه الأبواغ تتشكّل على حوامل كونيدية متفرعة نهايتها إلى 2-3 فياليديات.

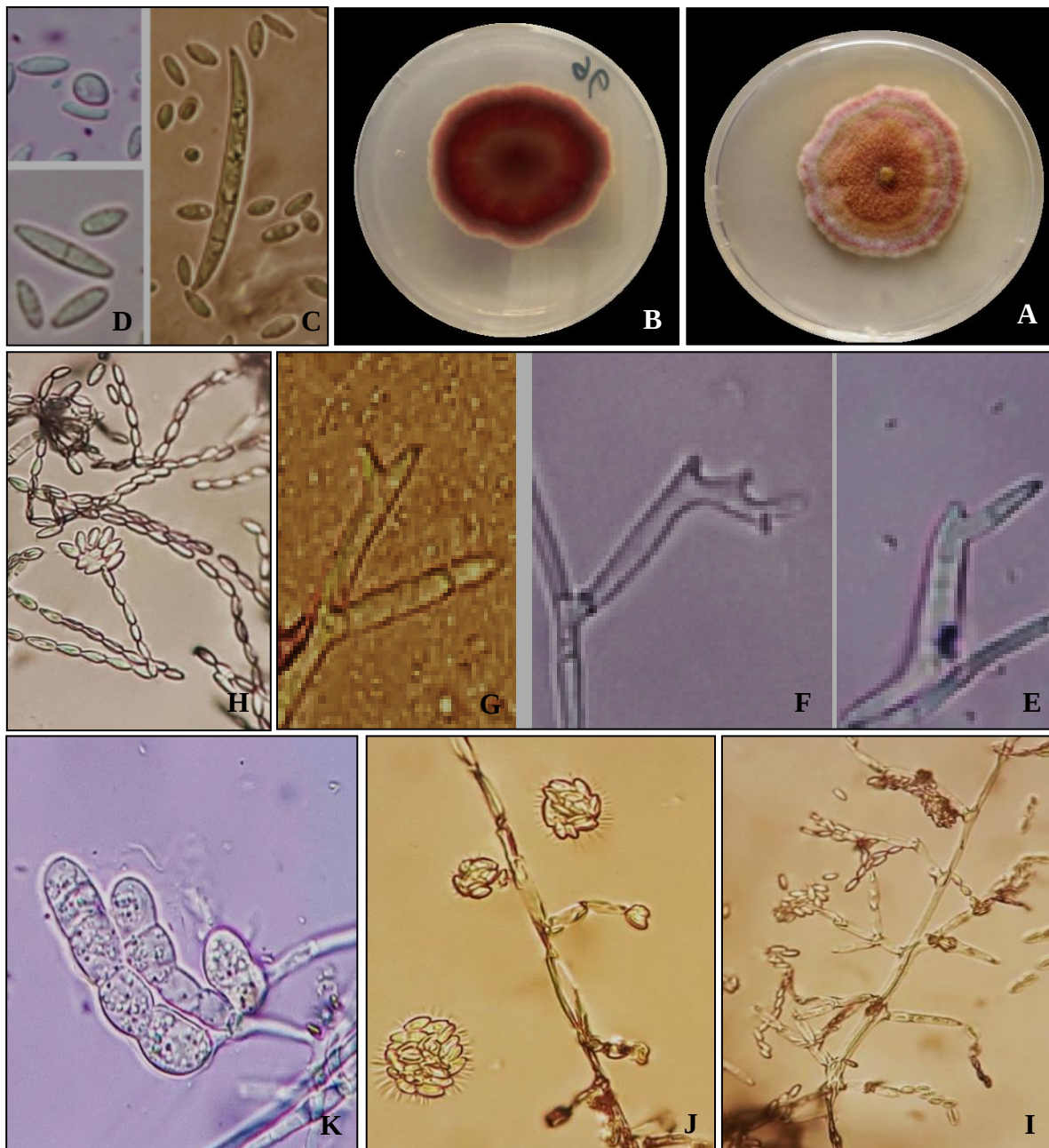
Fusarium flocciferum Corda (التسجيل لأول مرة في سورية)

بلغ قطر المستعمرة 2 سم بعد 3 أيام من التحضين عند درجة الحرارة 25°س، وقد شكّلت هذه العزلة في البداية مستعمرة بيضاء إلى صفراء اللون في الوسط وبيضاء فقط على الحواف، ومع التقدم بالعمر ظهر على حواف المستعمرة حلقات متحدة المركز متناوبة بين اللونين الأبيض والوردي وبرتقالية في الوسط، وقد أنتجت صبغة حمراء ضمن الأغار (الشكل 3-، 24، A,B).

شكّلت هذه العزلة على وسط CLA أبواغاً كونيدية كبيرة لكنها قليلة جداً، السطح الظهري مقوّس قليلاً والسطح البطني مستقيم تقريباً، ومقسّمة غالباً ب 3-4 حواجز عرضية (الشكل 3-24، C)، الخلية القمية مقوسة، والقاعدية مثلثة Notched. كما شكّلت أبواغاً كونيدية صغيرة وفيرة، ومعظمها صولجانية مكونة من خلية واحدة، أو بيضوية مكونة من خليتين، وعدد قليل جداً منها كروية محلمة (الشكل 3-24، D)، وقد تشكّلت ضمن سلاسل أو رؤوس كاذبة على حوامل كونيدية معظمها متعددة الفياليديات. وبالنسبة للحوامل الكونيدية المتعددة الفياليديات، فقد كانت متطورة ذات تفرعات ثنائية أو شجيرية (الشكل 3-24، E-J). كما لوحظ تشكّل أبواغ كلاميديّة متوضعة في سلاسل (الشكل 3-24، K).

إنّ التعريف المورفولوجي للفطريات الممرضة للنباتات هو الخطوة الأولى والأكثر صعوبة في عملية التعريف، وهذا ينطبق بشكل خاص على الجنس *Fusarium* (Rahjoo et al., 2008)، حيث يحتاج خبرةً عاليةً وجهوداً كبيرة (Fredlund et al., 2008; Abedi-Tizaki and Sabbagh, 2012)، ويعد غير موثوق في بعض الأحيان، حيث يوجد تشابه مورفولوجي كبير بين بعض أنواع هذا الجنس وبشكل خاص أفراد المعقد *Gibberella fujikuroi* مثل *F. fujikuroi*، *F. proliferatum*، *F. verticillioides*، *F. sacchari* و *F. andiyazi* (Rahjoo et al., 2008; Hsuan et al., 2011)، كما حدث عند تعريف العزلة FT67، حيث أعطت الطرائق المورفولوجية نتيجة خاطئة، وعرفت في البداية على أنّها *F. verticillioides*، وتبين فيما بعد باستخدام الطرائق الجزيئية أنّها *F. andiyazi*. وكذلك بالنسبة للعزلة FS88، فقد تمّ تعريفها في البداية *F. transvaalense*، وتبين بالتعريف المورفولوجي أنّها تعود للنوع *F. brachygibbosum*. ونظراً لاستمرار ظهور وتعريف أنواع جديدة من الجنس *Fusarium*، وندرة المعلومات والصور التي تتعلق بصفات المورفولوجية، فهناك صعوبة كبيرة في تعريف بعض الأنواع باستخدام الطرائق المورفولوجية فقط، حيث لم نتمكن من تعريف العزلة FS96 بالاعتماد على صفات مكوناتها المجهرية، وقد تمّ تعريفها باستخدام الطرائق

الجزئية بأنها تعود للنوع *F. flocciferum*، ولم نتمكن من الحصول على وصف مورفولوجي مرجعي دقيق للمكونات المجهرية لهذا النوع لمقارنتها مع الصفات المورفولوجية التي حصلنا عليها في هذه الدراسة.



الشكل 3-24: الصفات الشكلية للنوع *F. flocciferum*: A- السطح العلوي، B- السطح السفلي، C - بوع كونيدي كبير وأبواغ صغيرة، D- أبواغ كونيديية صغيرة، (E، F، G)- حوامل كونيديية متعددة الفياليدات، H- سلاسل ورؤوس كاذبة، I- حوامل كونيديية وأبواغ، J- رؤوس كاذبة، K- أبواغ كلاميدية .

الجدول 3-3: أهم الصفات المميزة لأنواع الجنس *Fusarium* المعروفة في هذه الدراسة

الرقم المتسلسل	النوع	صفات الأبواغ الكونيدية الكبيرة Macroconidia				صفات الأبواغ الكونيدية الصغيرة / المتوسطة Mesoconidia/Microconidia				الأبواغ الكلاميدية	صفات مميزة إضافية للنوع
		الشكل	عدد الحواجز	الخلية القمية	الخلايا القاعدية	الشكل	عدد الحواجز	طريقة التوضع	صفات الحوامل البوغية		
1	<i>F. culmorum</i>	قصيرة وضخمة ذات نهايات عريضة Stout	4-3	مدورة Blunt	مدورة Blunt	غير موجودة (غائبة)				مزدوجة، كتل، سلاسل.	عدد وفير من الوسائد البوغية على PDA
2	<i>F. sambucinum</i>	تشبه <i>F. culmorum</i> لكنها أطول وأضيق نسبياً	5-3	ذات حلمة Papillate	مثلثة Notched أو قديمة	غير موجودة				كتل، وسلاسل.	الخلايا القمية حلمية (تشبه أنف الدوفلين)، معدل نمو بطيء
3	<i>F. pseudograminearum</i>	نخيفة مستقيمة تقريباً، السطح البطني مستقيم تقريباً والظهري مقوس قليلاً	5-4	مستدقة Tapered، أو بشكل الخطم Snout	قديمة	غير موجودة				مفردة، مزدوجة، كتل.	-
4	<i>F. compactum</i>	ذات انحناء بطني ظهري واضح، عريضة في	5-3	طويلة ومستدقة	قديمة	غير موجودة				مزدوجة	تجمعات بيضاء من الخيوط الفطرية Tufts
5	<i>F. acuminatum</i>	نخيفة ومقوسة	3	منطوية ومستدقة وغالباً يوجد انحناء مميز في النصف الثاني منها	قديمة	كلوية أو مغزلية	0	-	-	مفردة	وسائد بوغية مششبية apricot اللون
6	<i>F. semitectum</i>	نخيفة مستقيمة تقريباً، السطح البطني مستقيم تقريباً والظهري مقوس قليلاً.	5-3	مستدقة ومقوسة Curved and tapering	قديمة	سطحية ومغزلية	5-3	مفردة أو بشكل ثنائي	وحيدة ومتعددة الفياليات	مفردة كتل سلاسل	وجود أبواغ وسطية Mesoconidia بشكل أذني الأرنب

هيفات ملتفة Coiled hyphae	-	وحيدة الفياثيد	سلاسل قصيرة ورؤوس كاذبة	0	بيضوية	قديمة	منقارية Beaked.	3	نادرة، نحيفة مقوسة قليلاً.	<i>F. pseudocircinatum</i>	7
الحوامل الكونيدية طويلة جداً	مفردة طرفية/سلاسل	وحيدة الفياثيد طويلة	رؤوس كاذبة	1-0	بيضوية/ شكل القطع الناقص	مدورة Blunt	مدورة Blunt	غير واضحة	وفيرة، عريضة مقوسة قليلاً	<i>F. solani</i>	8
الحوامل الكونيدية قصيرة ومتنقحة أحياناً.	مفردة طرفية	وحيدة الفياثيد قصيرة	رؤوس كاذبة	1-0	بيضوية/ شكل القطع الناقص	قديمة	مقوسة ومستندقة	3	متوسطة الطول، مقوسة قليلاً إلى مستقيمة.	<i>F. oxysporum</i>	9
-	-	وحيدة ومتعددة الفياثيدات	سلاسل ورؤوس كاذبة	0	صولجانية	قديمة	مقوسة قليلاً ومستندقة	5-3	طويلة ونحيفة منحنية قليلاً إلى مستقيمة	<i>F. proliferatum</i>	10
-	-	وحيدة الفياثيد	سلاسل ورؤوس كاذبة	0	صولجانية	قديمة	مقوسة قليلاً ومستندقة	4-3	طويلة ونحيفة منحنية قليلاً إلى مستقيمة	<i>F. verticillioides</i> <i>F. andiyazi</i> - مشابه	11
وجود أبواغ وسطية Mesocomidia	مفردة مزدوجة سلاسل	متعددة الفياثيدات	رؤوس كاذبة	0 1-0 2-1	إجاصية قطع ناقص وسطية مغزلية	مثلثة Notched أو قديمة	مقوسة ومستندقة	3	مقوسة	<i>F. sporotrichioides</i>	12
وجود بقع بنية داكنة Flecks في الأغار	مفردة كتل سلاسل	-	-	-	-	قديمة	منطاوله ومستندقة	5	مقوسة، وعريضة في المنتصف	<i>F. equiseti</i>	13
	سلاسل	وحيدة الفياثيد	مفردة	0-1	بيضوية	مثلثة	مقوسة	3	السطح الظهري لها مقوس والسطح البطني مستقيم تقريباً	<i>F. torulosum</i>	14

15	<i>F. polyphialidicum</i>	نحيفة مقوسة	3-4	مقوسة	قديمة	مغزلية	0-1	متعددة الفياليات	مزدوجة- سلاسل	-
16	<i>F. brachygibbosum</i>	الخبية الوسطى عريضة، و الخلية القمية مسندة أو خطافية	4-5	خطافية hooked	متلمة	بيضوية أو مغزلية ، أو مقوسة	0-1	قصيرة قارورية ووحيدة الفياليات	مفردة أو في سلاسل أو كتل	
17	<i>F. chlamydosporum</i>	السطح الظهري لها مقوس قليلاً والسطح البطني مستقيم تقريباً	3	مقوسة	متلمة	بيضوية	0-1	وحيدة أو متعددة الفياليات	مفردة أو مزدوجة معظمها ذو توضع جانبي أو متوضعة في سلاسل أو كتل	الحوامل المتعددة الفياليات متطورة ذات تقربات ثنائية أو شجرية
18	<i>F. redolens</i>	و الثالث العلوي لها غالباً أ عرض من الثلاثين الباقيين	5-4	خطافية hooked	قديمة	أسطوانية تستدق باتجاه إحدى النهايتين	1	وحيدة الفياليات	سلاسل	
19	<i>F. flocciferum</i>	السطح الظهري لها مقوس قليلاً والسطح البطني مستقيم تقريباً،	4-3	مقوسة	متلمة	صولجانية بيضوية كروية محلمة	0 1 0	سلاسل أو رؤوس كاذبة	سلاسل متعددة الفياليات	الحوامل المتعددة الفياليات متطورة ذات تقربات ثنائية أو شجرية

تُعد هذه الدراسة من الدراسات القليلة أو النادرة التي أعطت وصفاً مورفولوجياً دقيقاً للعديد من أنواع الفيوزاريوم التي تصيب القمح، والتي يمكن أن تُعتمد كأساس تصنيفي مفيد للكثير من المهتمين بتصنيف أنواع الفيوزاريوم، وقد تمّ وضع المفتاح التصنيفي التالي الخاص بالأنواع المُعرّفة في هذه الدراسة:

- 1- السطح السفلي للمستعمرة وردي أو أحمر اللون.....2
- 1- السطح السفلي للمستعمرة بلون بنفسجي.....6
- 1- السطح السفلي للمستعمرة بني فاتح.....9
- 1- السطح السفلي للمستعمرة أصفر أو برتقالي فاتح.....10
- 2-Microconidia غير موجودة3
- 2-Microconidia موجودة.....5
- 3-Macroconidia قصيرة، ضخمة وذات نهايات مدورة.....*F. culmorum*
- 3-Macroconidia متوسطة الطول، عريضة قليلاً وذات خلايا قمية محلّمة Papillate4
- 3-Macroconidia مستقيمة ، نحيفة وذات خلايا قمية مستدقة.....*F. pseudograminearum*
- 3-Macroconidia مقوّسة وعريضة في المنتصف.....*F. compactum*
- 4- معدل نمو سريع*F. culmorum*
- 4- معدل نمو بطيء.....*F. sambucinum*
- 5-Microconidia غزيرة ويوجد أبواغ وسطية Mesoconidia.....*F. sporotrichioides*
- 5-Microconidia نادرة ولا يوجد Mesoconidia ، الخلايا القمية لـ Macroconidia مستدقة وغالباً يوجد انحناء مميز في جزئها الطرفي.....*F. acuminatum*
- 5-Microconidia موجودة، تتوضع بشكل مفرد على حوامل كونيديية وحيدة الفياليد، بيضوية مكونة من خلية أو خليتين. في الأبواغ الكونيديية الكبيرة Macroconidia غالباً 3 حواجز، والخلايا القمية لها مقوسة قليلاً.....*F. torulosum*
- 5-Microconidia غزيرة، متوضعة بشكل مفرد على حوامل كونيديية شجيريه متطورة.
- Macroconidia نادرة جداً ومقوسة قليلاً.....*F. chlamydosporum*

- 5- Microconidia غزيرة، متوضعة ضمن سلاسل ورؤوس كاذبة على حوامل كونيدية متطورة (2) –
3 فياليدات) *F. flocciferum*.....
- 5- Microconidia غزيرة بيضوية أو مغزلية أو مقوسة، مكونة من خلية أو خليتين. Macroconidia مميزة والخلية الوسطى عريضة، والقمية مستدقة أو خطافية، مكونة من 4-5 حواجز..... *F. brachygibbosum*
- 6- Microconidia تتوضع ضمن رؤوس كاذبة فقط على حوامل كونيدية قصيرة..... *F. oxysporum*
- 6- Microconidia تتوضع ضمن سلاسل ورؤوس كاذبة.....7
- 7- تُشكّل هيفات ملتفة..... *F. pseudocircinatum*
- 7- لا تُشكّل هيفات ملتفة.....8
- 8- السلاسل والرؤوس الكاذبة محمولة على حوامل كونيدية وحيدة الفياليات فقط.....
F. andiyazi أو *F. verticillioides*.....
- 8- السلاسل والرؤوس الكاذبة محمولة على حوامل كونيدية وحيدة ومتعددة الفياليات.....
F. proliferatum.....
- 9- Microconidia تتوضع ضمن رؤوس كاذبة فقط على حوامل كونيدية طويلة..... *F. solani*
- 9- Microconidia أسطوانية مكونة من خليتين تستدق باتجاه إحدى النهايتين. Macroconidia مقسّمة بـ 4-5 حواجز، والثالث العلوي أعرض غالباً من الثلثين الباقيين، والخلية القمية خطافية Hooked..... *F. redolens*
- 9- توجد Mesoconidia بشكل يشبه أذني الأرنب..... *F. semitectum*
- 9- لا توجد Microconidia ولا Mesoconidia، تُشكّل بقعاً داكنة Flecks في الأغار، Macroconidia مقوسة، وعريضة في المنتصف..... *F. equiseti*
- 10- المستعمرات بطيئة النمو نسبياً، المشيجة كثيفة ذات لون أبيض إلى برتقالي. Microconidia مكونة من خلية أو خليتين، الحوامل الكونيدية متعددة الفياليات. Macroconidia نحيفة مقوسة ومقسّمة غالباً بـ 3-4 حواجز، الخلية القمية مقوسة..... *F. polyphialidicum*

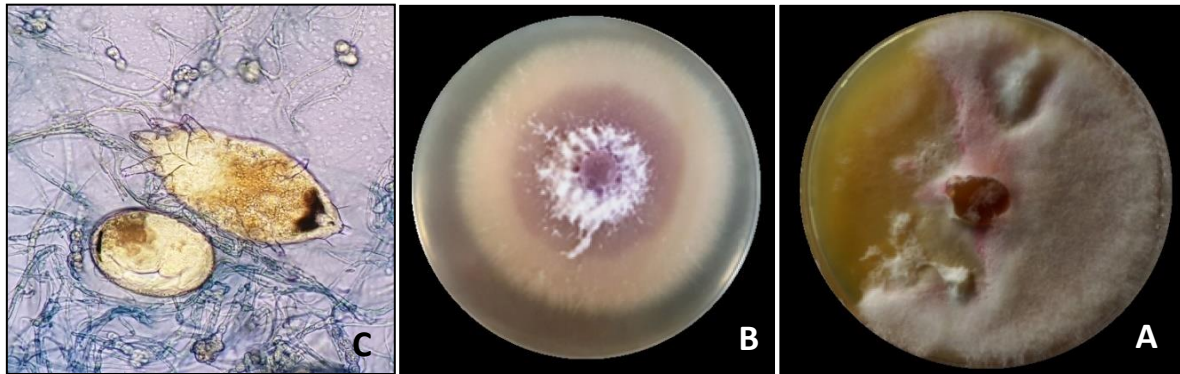
4.3 - الصعوبات خلال الدراسة المورفولوجية

تمّ خلال هذه الدراسة مواجهة العديد من المشاكل، منها تدهور بعض المستعمرات وإصابة بعضها الآخر بالأكاروسات، حيث تم الحصول في البداية على أكثر من 130 عزلة تقريباً، ولكن تمّ تعريف 105 عزلات فقط. وتعدّ مشكلة تدهور المستعمرات من أهمّ المشاكل التي تتم مواجهتها أثناء إجراء دراسات تتعلق بالجنس *Fusarium*، ويجب استبعاد هذه المستعمرات المتدهورة أثناء عمليات التصنيف لأنّ تدهور المستعمرات يؤثر عليها من الناحية المورفولوجية والفيزيولوجية (Burgess et al., 1994).

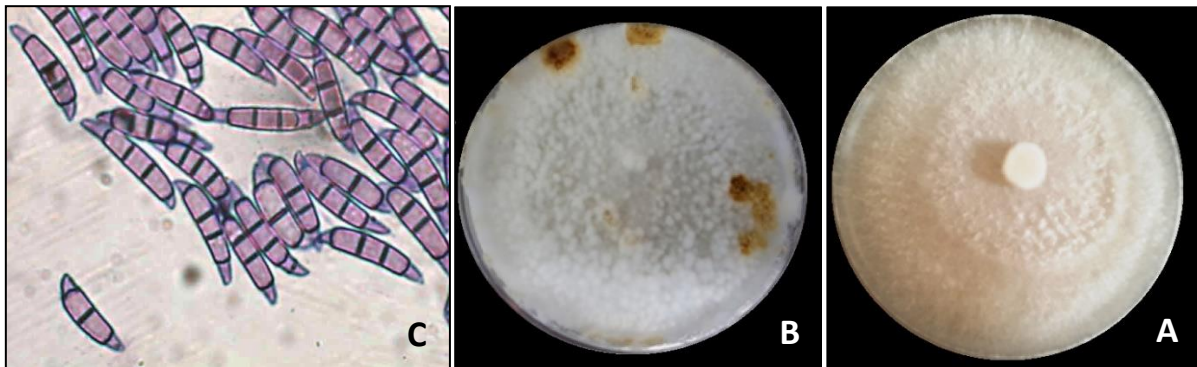
هناك نوعان لتدهور المستعمرات (Burgess et al., 1994)، وقد تمّت مشاهدتهما في هذه الدراسة:

النمط الدهني Pionnotal type: وتكون المستعمرات لزجة Slimy colony، وتفتقر للميسيليوم الهوائي، ويتشكل في هذه المستعمرات عدد كبير من الأبواغ الكونيدية الكبيرة لكنها تكون مشوهة.

النمط المشيجي Mycelial type: تكون المستعمرة عبارة عن ميسيليوم أبيض فقط وعقيم. وتبين الشكلان (3-25، 3-26) صوراً لبعض العزلات المتدهورة، ولأبواغ كونيدية كبيرة مشوهة.



الشكل 3-25: (A, B) مستعمرات مصابة بالأكاروسات، (C) أكاروس من مستعمرة مصابة



الشكل 3-26: (A, B) مستعمرات متدهورة من النوع الثاني Mycelial type (ميسيليوم أبيض عقيم)، (C) أبواغ كونيدية كبيرة Macroconidia مشوهة من مستعمرات متدهورة من النوع الأول Pionnotal type.

نظراً لأنّ التعريف الدقيق لأنواع الجنس *Fusarium* أمر ضروري للتنبؤ بالخطر المحتمل للسلاسل المفترزة للسموم، وبالتالي منعها من الدخول في السلسلة الغذائية (Jurado et al., 2006)، وبسبب تشابه بعض أنواع هذا الجنس مورفولوجياً، وبشكل خاص أفراد المعقد *Gibberella fujikuroi* مثل *F. andiyazi* و *F. sacchari*، *F. verticillioides*، *F. proliferatum*، *F. fujikuroi* (Rahjoo et al., 2008; Hsuan et al., 2011)، وصعوبة تعريفها بشكل دقيق، استخدمت الطرائق الجزيئية من قبل العديد من الباحثين كطرائق بديلة أو مكملّة لطرائق التعريف المورفولوجية (Abedi- Tizaki and Sabbagh, 2012).

3-5: اختبار القدرة الإمراضية لعزلات بعض أنواع الجنس *Fusarium*:

تم اختبار القدرة الإمراضية لـ 20 عزلة تتبع لثمانية أنواع من الجنس *Fusarium* على بادرات صنف القمح القاسي (دوما 1) تحت ظروف المختبر والعدوى الاصطناعية. أبدى النوع *F. culmorum* أعلى قدرة إمراضية، إذ تراوحت شدة الإصابة للعزلات المختبرة بين (3.4 و 5) وبالمتوسط (4.45)، وذلك تبعاً لسلم التقييم الخماسي المستخدم في هذه الدراسة. وكانت العزلة FC2 أقلها إمراضية وبفروق معنوية مع العزلات الأخرى التي لم تبدِ فروقاً معنوية فيما بينها. من الملاحظ أن العدوى الاصطناعية أدت إلى تعفن البذور قبل ظهورها فوق سطح التربة، أو موت البادرات بمرحلة مبكرة وتلونها باللون البني الداكن أو الأسود، إذ أدت الإصابة إلى موت 14 بادرة من أصل 20 (70%). كما أبدى النوع *F. pseudograminearum* قدرة إمراضية عالية أيضاً، فقد بلغ متوسط شدة الإصابة (4.2) وبفروق غير معنوية مع النوع السابق، ولم تلاحظ فروق معنوية بين العزلات، إذ تراوحت شدة الإصابة بين (3.8 – 4.6)، وقد لوحظ أيضاً موت 8 بادرات من أصل 15 (53.33%). تلاهما النوع *F. proliferatum* والذي يعتبر حسب سلم التقييم المستخدم متوسط القدرة الإمراضية، حيث بلغت شدة الإصابة (1.27)، بينما كانت الأنواع *F. verticillioides* و *F. equiseti* و *F. oxysporum* و *F. andiyazi* ضعيفة القدرة الإمراضية، حيث بلغت شدة الإصابة 0.9 و 0.87 و 0.4 و 0.7 على التوالي. في حين لم تلاحظ أية أعراض تلون على الجذور والسويقة التاجية للبادرات المعدة بالنوع *F. semitectum*، وبالتالي لم يكن ممرضاً تحت ظروف التجربة الحالية (الجدول 3-4 والشكل 3-27).

أبدت عزلات النوعين *F. culmorum* و *F. pseudograminearum* أعلى قدرة إمراضية مقارنةً مع عزلات الأنواع الأخرى المختبرة، وجاءت هذه الدراسة متوافقة مع نتائج الشعبي وآخرين (2015)، حيث أبدى النوع *F. culmorum* أعلى قدرة إمراضية مقارنةً مع النوعين *F. equiseti* و *F. proliferatum*. كما أكدت نتائج دراسات أخرى القدرة الإمراضية العالية للنوع *F. culmorum* إلى

جانب النوعين *F. graminearum* و *F. pseudograminearum* تلاها النوع *F. proliferatum* (Chehri et al., 2010). وقد أظهر النوعان *F. culmorum* و *F. pseudograminearum* أعلى شدة تلون وإصابة على البادرات (Gargouri-Kammoun, 2009; Smiley et al., 2005; Tunali et al., 2006). لقد سبب النوعان *F. culmorum* و *F. pseudograminearum* لفحة وموت البادرات بنسبة عالية في هذه الدراسة، وهذا يتوافق أيضاً مع ما توصل اليه Dyer وآخرون (2009) بأن النوع *F. culmorum* سبب أكبر نسبة بلفحة وموت البادرات، بينما سبب النوع *F. pseudograminearum* أشد تلون في منطقة التاج إضافة إلى لفحة البادرات.

أبدت الأنواع *F. equiseti* و *F. verticillioides* و *F. oxysporum* قدرة إمراضية ضعيفة، وهذا يتوافق مع دراسات أخرى سابقة، فقد أشار Fernandez and Chen (2005) أن *F. culmorum* و *F. graminearum* كانا أشد الأنواع المختبرة إمراضية، بينما كان *F. equiseti* و *F. poae* أقل الأنواع إمراضية. وأشارت دراسات أخرى أيضاً إلى أن الأنواع *F. verticillioides* و *F. equiseti* و *F. oxysporum* ضعيفة القدرة الإمراضية (Demirci and Dane, 2003)، ولا تعد كمرضات ضمن الظروف التي أجريت فيها التجربة في تركيا (Tunali et al., 2006). كما اعتبر النوع *F. equiseti* ممرضاً ضعيفاً أو رمياً ينشط في تربة الزراعة العضوية (Fernandez and Chen, 2005).

لم تشر أية دراسة سابقة محلية أو عالمية لعزل النوع *F. andiyazi* من جذور نباتات قمح مصابة، لذلك كان الهدف الأساسي من إجراء اختبار القدرة الإمراضية هو التأكد من إمراضية النوع *F. andiyazi* الذي تم عزله لأول مرة من القمح في هذه الدراسة، فمن المعروف أن هذا النوع ممرض بشكل أساسي للذرة (Lesli et al., 2005)، وقد تبين نتيجة العدوى الاصطناعية قدرته على إصابة القمح، ولكنه يعتبر ممرض ضعيف جداً، ومن المؤكد أنه يوجد في التربة كفطر رمي، ولكن من المحتمل أن يصيب جذور القمح في ظروف زراعة معينة.

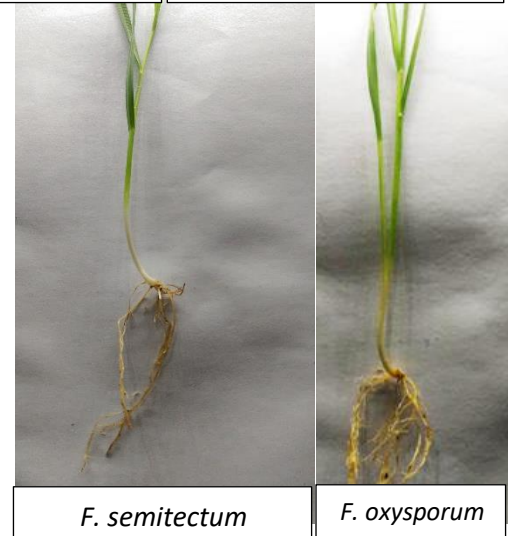
الجدول 3-4: تقييم القدرة الإمراضية لثمانية أنواع من الجنس *Fusarium* على بادرات صنف القمح القاسي دوما 1.

النوع	العزلة المدروسة	شدة الإصابة	القدرة الإمراضية*	% للبادرات الميته
<i>F. culmorum</i>	FC1	4.8 dg	H	%80
	FC2	3.4 c	H	%40
	FC3	4.6 dg	H	%60
	FC4	5 g	H	%100
	المتوسط	4.45	H	
<i>F. pseudograminearum</i>	Fp1	3.8 cf	H	20%
	Fp2	4.2 edf	H	%60
	Fp3	4.6 d	H	%80
	المتوسط	4.2	H	
<i>F. equesiti</i>	Fe1	0.8 b	L	-
	Fe2	1 b	L	-
	Fe3	0.8 b	L	-
	المتوسط	0.87	L	
<i>F. proliferatum</i>	Fa1	1.2 b	I	-
	Fa2	1.4 b	I	-
	Fa3	1.2 b	I	-
	المتوسط	1.27	I	
<i>F. oxysporum</i>	Fo1	0.4 a	L	-
<i>F. andiyazi</i>	Fan1	0.6 a	L	-
	Fan2	0.8 a	L	-
	المتوسط	0.7 a	L	
<i>F. semitectum</i>	Fs1	0 a	N	-
	Fs2	0 a	N	-
<i>F. verticillioides</i>	Fac1	0.8 b	L	-
	Fac2	1 b	I	-
	المتوسط	0.9 b	L	-

• H: عالي القدرة الإمراضية، I: متوسط القدرة الإمراضية، L: ضعيف القدرة الإمراضية، N: غير ممرض



الشكل 3-27: تقييم القدرة الإراضية لعزلات تنتمي لثمانية أنواع مختلفة من الجنس *Fusarium* تبعاً لدرجة تلون الجذور والسلامة التاجية على بادرات قمح من الصنف القاسي دوما 1 بعد إجراء العدوى الاصطناعية.



3.6 - الدراسة الجزيئية

3.6.1 - مقارنة عدة طرائق لاستخلاص DNA من أنواع الجنس *Fusarium*:

تمت في هذه الدراسة مقارنة خمس طرائق لاستخلاص الدنا DNA من ثلاث عزلات تابعة لثلاثة أنواع من الجنس *Fusarium*. وعلى الرغم من أن كمية الدنا المتحصل عليها بجميع الطرائق كانت كافية من أجل تفاعل البلمرة المتسلسل، إلا أن كمية الدنا الكلية وتركيزه ونقاوته تباينت تبعاً لطريقة الاستخلاص المستخدمة. يظهر الجدول (3-5) أن العائد من دنا الأنواع الفطرية الثلاثة كان أعلى بطريقة الحبيبات الزجاجية / PCI المعدلة، حيث بلغ بالمتوسط 0.082%، وهي الطريقة المعدلة من الحبيبات الزجاجية / PCI، والتي بلغ فيها متوسط العائد من الدنا 0.062%، أما أقل كمية من الدنا، فقد تم الحصول عليها باستخدام طريقة LETS (0.026%)، وبمعدل أقل بثلاثة أضعاف تقريباً من كمية الدنا المتحصل عليها بالطريقة المعدلة.

من الواضح أن الطريقة المعدلة أدت إلى زيادة كفاءة طريقة الاستخلاص بمعدل 32.3% مقارنة مع طريقة الحبيبات الزجاجية / PCI. كما أن الطريقة المعدلة كانت أسرع، وكمية فينول كلوروفورم المستخدمة فيها أقل، إضافة إلى أن استخدام الحبيبات الزجاجية يؤدي بشكل أفضل إلى تحطيم الخلايا، وبالتالي زيادة كمية الدنا المستخلصة، فقد أشار Van Burik وآخرون (1998) إلى أن استخدام الحبيبات الزجاجية أدى إلى الحصول على ضعف الكمية من الدنا بالمقارنة مع سحق العينات باستخدام مدقة وهاون خزفي، كما استخدمت الحبيبات الزجاجية في بروتوكولات استخلاص الدنا من أجل تحطيم الخلايا الخمائرية، إضافة إلى الفينول كلوروفورم لفصل الحمض النووي عن البروتينات (Hoffman and Winston, 1987). ومع ذلك، فقد كانت طريقة الحبيبات الزجاجية / PCI أفضل نسبياً من الكيت التجاري، وتتوافق هذه النتائج مع نتائج دراسات أخرى، إذ تبين عند مقارنة أربعة كيتات تجارية مع الطريقة التقليدية باستخدام فينول كلوروفورم ايزوميل PCI في استخلاص الدنا من أنسجة العديد من النباتات، أن طريقة PCI كانت أفضلها من حيث تركيز الدنا المتحصل عليه (Djurkinkušec et al., 2015).

ومن الملاحظ أن طريقة CTAB أعطت أيضاً كمية مرتفعة من الدنا. في الواقع، فإن هذه الطريقة تم تطويرها أساساً من قبل Doyle و Doyle عام (1987) لاستخلاص الدنا من الأنسجة النباتية، واستخدمت في استخلاص الدنا من البكتيريا (Smith et al., 1989)، ومن النباتات (Ausubel, 1994). وفي دراسة أخرى، أعطت طريقة CTAB كمية كافية من دنا الفطريات من أجل التضخيم العشوائي لقطع متعددة شكلياً من الدنا RAPD (Graham et al., 1994)، وقد

اعتبرت الطريقة الأفضل من أجل التخلص من الكربوهيدرات، ولكنها تستهلك الكثير من الوقت والعمل المخبري. وتختلف هذه النتائج عما توصل إليه Tripathy وآخرون (2017)، إذ لم تكن كمية الدنا المتحصل عليها من كل العينات الحيوية بما فيها مشيجة الفطريات كافية. وهذا يتوافق أيضاً مع ما توصل إليه Abdel-Latif وOsman (2017) بأن طريقة Mericon المعدلة Qiagen DNeasy Mericon Kit كانت طريقة الاستخلاص الأكثر فاعلية لدنا نباتات الذرة الصفراء من حيث الكمية والنوعية مقارنة مع الكيت التجاري وطريقة CTAB. وتبعاً للنتائج التي حصلنا عليها يمكن ترتيب طرائق الاستخلاص تبعاً لكمية الدنا المتحصل عليها (حبيبات زجاجية/ PCI معدلة <CTAB> حبيبات زجاجية/ PCI < كيت تجاري <LETS>).

على الرغم من أنه تم الحصول على كمية دنا كافية، إلا أن نقاوة الدنا لم تكن مقبولة في معظم طرائق الاستخلاص المستخدمة باستثناء طريقة حبيبات الزجاج / PCI المعدلة. فقد كانت أقل من 1.5 لكل العزلات بطريقة الحبيبات الزجاجية / PCI، وأقل من 1.4 بطريقة LETS، وأقل من 1.6 بطريقة CTAB إضافة إلى أنها مازالت تحتوي على بعض الـ RNA مما يتطلب زيادة كمية RNase المستخدمة (الشكل 3-28). كما أن كمية الدنا المتحصل عليها باستخدام الكيت التجاري كانت قليلة نسبياً، إلا أن نقاوة الدنا كانت أفضل من الطرائق الثلاث السابقة، حيث بلغت 1.6 للعزلتين F1 وF2، و1.7 للعزلة F3. أما بالطريقة المعدلة، فقد تراوحت نقاوة الدنا بين 1.7 – 1.9، وتمتاز هذه الطريقة باختصار الوقت، والتقليل من كمية مادة فينول كلوروفورم كحول الإيزوميل السامة المستخدمة في عملية الاستخلاص، كما أن نقاوة الدنا أفضل من الطرائق السابقة، وغير مكلفة اقتصادياً، أما طريقة الكيت التجاري فهي سريعة، ونقاوة الحمض النووي المستخلص مقبولة إلى حد ما، إلا أن العائد من الدنا قليل نسبياً بالإضافة إلى أنها مكلفة.

من الملاحظ أن كل الطرائق المستخدمة أدت إلى استخلاص دنا الأنواع الثلاثة المستخدمة من الجنس *Fusarium*، على الرغم من أن كمية الدنا المتحصل عليها تباينت تبعاً لطريقة الاستخلاص ونوع الفطر، فقد أعطت كل طرائق الاستخلاص كمية جيدة من الدنا بالنسبة لجميع العزلات الفطرية، باستثناء طريقة LETS حيث أعطت كمية مقبولة من الدنا بالنسبة للعزلة F1 (*F. culmorum*) فقط، بينما كانت كمية الدنا قليلة جداً بالنسبة للنوعين الآخرين: *F. pseudograminearum* و *F. semitectum*. ومن الواضح أن فاعلية طريقة الاستخلاص تختلف تبعاً للفطر أيضاً، فقد تبين عند مقارنة عدة طرائق لاستخلاص الدنا من عدة أنواع من الجنس *Aspergillus*، أن أفضلها كان الكيت التجاري (من Sigma) المستخدم لعزل DNA من أوراق النباتات بالنسبة لجميع الأنواع بالمقارنة مع الطرائق الأخرى التي تباينت فاعليتها تبعاً للنوع (Motřková and Vyřasová, 2011). وبالمقابل، وجد Fredlund

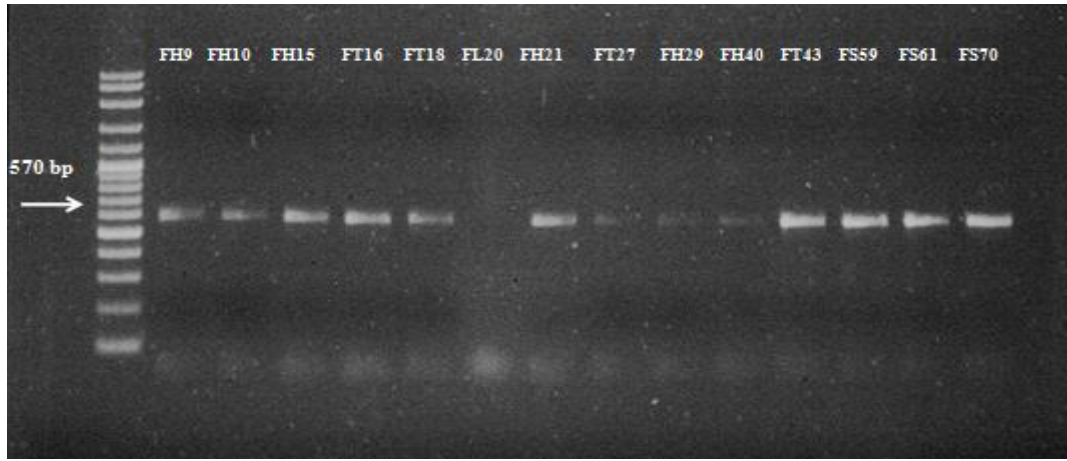
وزملاؤه (2008)، عند مقارنة عدة طرائق لاستخلاص الدنا لعدة أنواع من الجنس *Fusarium* وهي: Biorobot EZ1 with DNease Blood and DNeasy plant Mini Spin columns و Fast DNA Spin kit for soil و Tissue kit، أن كل الطرائق السابقة أعطت فعالية أكثر من 90 %، ولكن الطريقة الأولى DNeasy plant Mini Spin columns كانت أفضلها في الحصول على أعلى كمية من الدنا لكل أنواع الفيوزاريوم المدروسة.

الجدول 3-5: كمية الدنا DNA المتحصل عليها من كل طريقة استخلاص كما تم قياسها بواسطة المقياس الطيفي

طريقة الاستخلاص	العزلات الفطرية	الوزن النهائي للدنا المستخلص	% للغة	نقاوة الدنا
DNA extraction method	Fungal isolates	End weight of extracted DNA (µg)	Yield	260/ 280 nm
الحبيبات الزجاجية / PCI	F1	35.2	0.070	1.2
Glass beads / PCI	F2	39.6	0.079	1.4
	F3	19.1	0.038	1.5
الحبيبات الزجاجية / PCI معدلة	F1	51.3	0.128	1.7
Modified Glass beads / PCI	F2	19.1	0.048	1.7
	F3	28.2	0.071	1.9
كيت جاهز	F1	14.9	0.029	1.6
Qiagen DNeasy Kit	F2	36.1	0.072	1.6
	F3	24.7	0.049	1.7
	F1	27.1	0.068	1.4
LETS	F2	1.9	0.005	1.2
	F3	2.1	0.005	1.2
	F1	46.8	0.094	1.6
CTAB	F2	51.3	0.103	1.4
	F3	23.7	0.047	1.3

3.6.2 - الكشف عن أنواع الجنس *Fusarium* باستخدام بادئات متخصصة -Species-specific primers

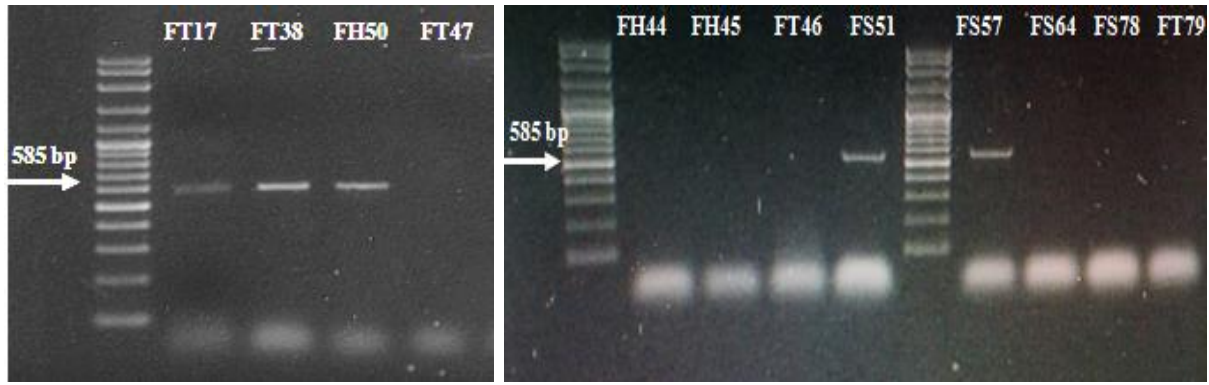
تم تأكيد نتائج التعريف المورفولوجي لـ 27 عزلة من أصل 31 عزلة من النوع *F. culmorum* المُعرّفة مورفولوجياً، وذلك باستخدام زوج البادئات Fc01F/Fc01R، حيث تم الحصول على حزم بوزن جزيئي 570 bp تقريباً في جميع العزلات باستثناء العزلتين (FT14 و FL20)، وهو الوزن الجزيئي المتوقع المميز للنوع *F. culmorum*، وبالنسبة للعزلتين FS101 و FS102، واللذان تم عزلهما لاحقاً، فقد تم تعريفهما باستخدام طريقة الـ Multiplex PCR، ويبين الشكل (29-3) حدوث تضخيم لـ DNA المُستهدف لـ 13 عزلة تنتمي لهذا النوع.



الشكل 29-3: الكشف عن النوع *F. culmorum* باستخدام زوج البادئات Fc01F/Fc01R على هلامة الأغاروز 1%

أما بالنسبة للعزلات التي تم تعريفها مورفولوجياً على أنها تعود للنوع *F. proliferatum*، فقد تم اختبارها باستخدام زوج البادئات PRO1/PRO2، وتم تأكيد التعريف المورفولوجي لـ 5 عزلات هي (FT17، FT38، FH50، FS51، FS57) من أصل 13 عزلة، حيث تم الحصول على حزم بوزن جزيئي 585 bp تقريباً، وهو الوزن الجزيئي المتوقع المميز للنوع *F. proliferatum*، بينما لم تظهر أية حزمة بالنسبة للعزلات الباقية المُعرّفة مورفولوجياً على أنها *F. proliferatum*، ويبين الشكل (30-3) حدوث تضخيم لـ DNA المُستهدف للعزلات الخمس السابقة باستخدام زوج البادئات PRO1/PRO2.

كما تم باستخدام زوج البادئات VER1/VER2 محاولة تأكيد تعريف العزلات (FT31، FT52، FT67) التي عُرِّفت مورفولوجياً على أنها *F. verticillioides* لكن لم تُعطِ هذه العزلات أية حزمة.



الشكل 3-30: الكشف عن النوع *F. proliferatum* باستخدام زوج البادئات PRO1/PRO2 على هلامة الأغاروز %1

كما تم تأكيد التعريف المورفولوجي لـ 4 عزلات من أصل 5 عزلات من النوع *F. equiseti* المُعرّفة مورفولوجياً، وذلك باستخدام زوج البادئات FEF/FER، حيث تم الحصول على حزم بوزن جزيئي 400 bp تقريباً في جميع العزلات باستثناء العزلة (FH71)، وهو الوزن الجزيئي المتوقع المميز للنوع *F. equiseti* (الشكل 3-31).



الشكل 3-31: الكشف عن النوع *F. equiseti* باستخدام زوج البادئات FEF/FER على هلامة الأغاروز %1

ونظراً لوجود تشابه كبير بين الأنواع التي تنتمي للمعقد *G. fujikuroi* مثل *F. proliferatum* و *F. subglutinans* و *F. verticillioides*، فقد تم اختبار العزلات المُعرّفة مورفولوجياً بأنها تعود لأحد الأنواع الموجودة في هذا القسم باستخدام زوج البادئات 61-2P/61-2R المتخصص بالكشف عن النوع *F. subglutinans*، وذلك لتوفّر هذه البادئات المتخصصة بالكشف عن هذا النوع، وقد تطابقت النتائج مع نتائج التصنيف المورفولوجي، فلم يتم الحصول على أية حزمة تشير لوجود هذا النوع.

وكذلك نظراً لوجود تشابه كبير بين النوعين *F. pseudograminearum* و *F. graminearum* كما ذُكر في فقرة سابقة، فقد تمّ اختبار العزلات المُعرّفة مورفولوجياً بأنها تعود للنوع *F. pseudograminearum* باستخدام زوج البادئات Fg16NF/Fg16NR المتخصص بالكشف عن النوع *F. graminearum*، وذلك لعدم توفّر البادئات المتخصصة بالكشف عن النوع *F. pseudograminearum*، وقد تطابقت النتائج أيضاً مع نتائج التصنيف المورفولوجي، فلم يتم الحصول على أية حزمة تشير لوجود النوع *F. graminearum*.

تعتمد طرائق التعريف التقليدية لأنواع الجنس *Fusarium* على الصفات المورفولوجية، لكن هذه الطرائق أصبحت حالياً غير كافية لتمييز كل الأنواع، وتحتاج خبرة كبيرة كما تستغرق وقتاً طويلاً، لذلك تستخدم حالياً العديد من الطرائق التي تعتمد على الـ PCR في الكشف عن أنواع الفيوزاريوم المنتجة للسموم الفطرية (Meng et al., 2010)، ومنها استخدام البادئات المتخصصة حيث تمّ تطوير واستخدام بادئات متخصصة للكشف عن العديد من أنواع الجنس *Fusarium* (Nicholson et al., 1998; Mulé et al., 2004; Spanic et al., 2010; Konietzny and Greiner, 2003; Kuzdraliński et al., 2017).

استخدم Schilling وآخرون (1996) زوج البادئات OPT18F/R المتخصص بالكشف عن النوع *F. culmorum*، حيث أمكن تضخيم DNA لـ 65 عزلة من أصل 69 عزلة تمّ الحصول عليها من بلدان وقارات مختلفة، كما استخدم Abedi-Tizaki و Sabbagh (2012) العديد من البادئات المتخصصة لتأكيد التعريف المورفولوجي لعدد من أنواع الفيوزاريوم، ولكن لم يتمكنوا من تأكيد تعريف جميع العزلات المتحصل عليها، فقد تمكّنوا من تأكيد تعريف 160 عزلة من أصل 166 عزلة تابعة للنوع *F. graminearum*، و 51 عزلة من أصل 59 عزلة تابعة للنوع *F. culmorum*، و 30 عزلة من أصل 35 عزلة تابعة للنوع *F. acuminatum* باستخدام أزواج البادئات Fg16F/Fg16R و OPT18F/OPT18R و FAC-F/FAC-R على التوالي. أمّا بالنسبة للنوعين *F. equiseti* و *F. poae*، فقد تمّ تأكيد نتائج التعريف المورفولوجي لجميع عزلتهما باستخدام زوجي البادئات المتخصصة بالكشف عنهما FEF/FER و Fp82F/Fp82R على التوالي. ولكن بالنسبة لعزلات النوعين *F. proliferatum* و *F. subglutinans*، فلم يتمكنوا من تأكيد تعريفهم المورفولوجي باستخدام البادئات المتخصصة. وبشكل مشابه وجد Rhjoo وآخرون (2008) عند استخدام زوجي البادئات PRO1/PRO2 و VER1/VER2 لتأكيد تعريف عزلات مُتحصّل عليها من نبات الذرة تنتمي للنوعين *F. proliferatum* و *F. verticillioides* على التوالي أنّهما ليسا متخصصين لجميع عزلات النوعين السابقين، كما ذكروا أنّه تمّ تطوير بعض البادئات المتخصصة بتعريف بعض أنواع *Fusarium*، لكن لم يتم توسيع نطاق اختبارها في معظم الحالات، كما أنّه لم يتم إثبات موثوقيتها بالنسبة

للسلالات المأخوذة من محاصيل ومناطق جغرافية مختلفة، وهذا يُفسّر عدم قدرتنا على تأكيد التعريف المورفولوجي لعدد من العزلات المُحصّل عليها في هذه الدراسة باستخدام البادئات المتخصصة، وهذا يشير لوجود أكثر من سلالة ضمن نفس النوع، إذ أظهرت النتائج أنّ البادئات المستخدمة في هذه الدراسة غير متخصصة بدرجة كبيرة بالنسبة للسلالات المعزولة من سورية، وهناك حاجة لتصميم بادئات متخصصة بدرجة أكبر يمكنها الكشف عن أكبر عدد من العزلات السورية، ولذلك تمّ التوجّه إلى إجراء التسلسل النوكليوتيدي لعدد من العزلات، والتيتمّ اختيارها بحيث تمثّل أكبر عدد ممكن من الأنواع.

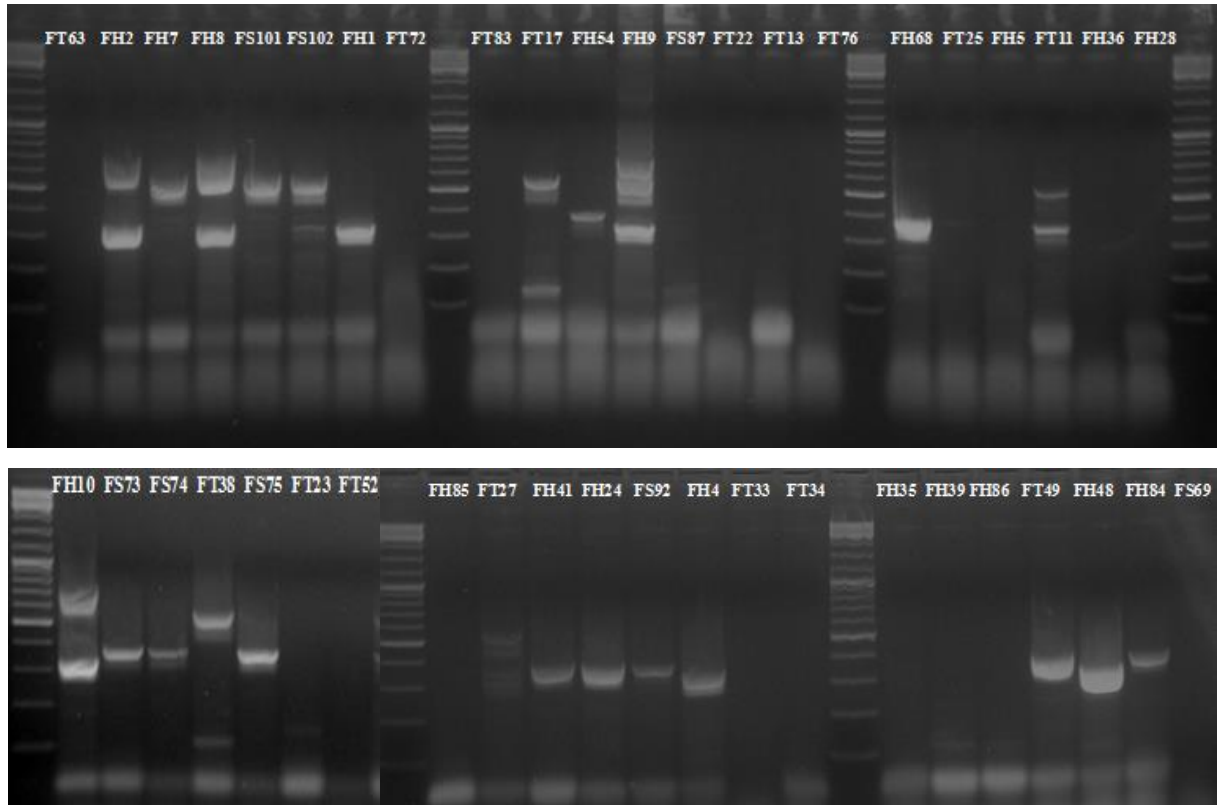
3.6.3 - الكشف عن أنواع الجنس *Fusarium* جزيئياً باستخدام طريقة Multiplex PCR:

في محاولة لإيجاد طريقة توفر الوقت والجهد، وتُعرّف أكبر عدد ممكن من العزلات التابعة للجنس *Fusarium* دون الحاجة إلى تعريفها مورفولوجياً، تم إجراء تفاعل Multiplex PCR باستخدام البادئات المتخصصة المتوفرة في هذه الدراسة، حيث أُجري الاختبار لـ 44 عزلة من العزلات المؤكدة وغير المؤكدة جزيئياً. تمّ الحصول على حزم وزنها الجزيئي تقريباً 560bp في جميع العزلات المُعرّفة على أنها *F. culmorum* (FT27، FT11، FS102، FS101، FH9، FH8، FH7، FH2). كما تمّ الحصول على حزم بأوزان جزيئية 300bp تقريباً للعزلتين FH48 و FH10 المُعرّفتان *F. sambucinum* باستخدام الطرائق المورفولوجية، وهو الوزن الجزيئي المتوقع الحصول عليه لهذا النوع. تم خلط دنا العزلة FH1 المُعرّفة *F. sambucinum* مع دنا العزلات FH9، FH8، FH2، FH10، FT11 المُعرّفة *F. culmorum*، إذ يلاحظ عند هذه العزلات الخمس ظهور حزمتين بأوزان جزيئية 560 pb و 300 pb موافقتين للأوزان الجزيئية التي تم الحصول عليها بالنسبة للنوعين المذكورين، مما يؤكد صحة النتائج التي تم الحصول عليها، وهذه الطريقة في خلط الدنا لأكثر من عزلة استخدمت أيضاً في دراسة سابقة لتأكيد صحة النتائج (Yli-Mattila et al., 2017). تمّ أيضاً الحصول على حزم وزنها الجزيئي 385 bp تقريباً للعزلات (FS75، FS74، FS73، FH54) المُعرّفة *F. equiseti* وهو الوزن الجزيئي المتوقع الحصول عليه لهذا النوع أيضاً. وبالنسبة للعزلات (FT72، FT63، FT83، FS87) المُعرّفة مورفولوجياً *F. pseudograminearum* فلم يتم الحصول على أية حزمة عند استخدام زوج البادئات المُستخدم في الكشف عن النوع *F. graminearum* ولا يوجد زوج متخصص بالكشف عن *F. pseudograminearum* في مزيج التفاعل، وهذا يؤكد صحة التعريف المورفولوجي. كما تمّ الحصول على حزم بأوزان جزيئية 550bp تقريباً للعزلتين FT38 و FT17 المُعرّفتين *F. proliferatum*، وهو الوزن الجزيئي المتوقع الحصول عليه لهذا النوع. وبالنسبة للعزلات

(FT25، FT49، FH68، FH84، FS92) المُعرّفة *F. oxysporum*، فقد تمّ الحصول على حزم وزنها الجزيئي 340bp تقريباً، وهو الوزن الجزيئي المتوقع الحصول عليه لهذا النوع. وقد تمّ الحصول أيضاً على حزم وزنها الجزيئي 330bp تقريباً للعزلات (FH4، FH24، FH41) المُعرّفة مورفولوجياً *F. sporotrichioides*. كما تمّ الحصول على حزمة وزنها الجزيئي تقريباً أقل من 150bp للعزلة FT23 المُعرّفة *F. solani* علماً أنّ الحجم المُتوقّع الحصول عليه باستخدام زوج البادئات FS1/FS2 هو 175bp (الشكل 3-32). لم يتمّ الحصول على حزم للعزلات المتبقية والتابعة لأنواع لم تُستخدم بادئات متخصصة للكشف عنها في هذا التفاعل مثل العزلات (FT22، FT33، FT34، FH35، FH39، FH86) التابعة للنوع *F. semitectum*، والعزلات (FH5، FH28، FH36، FH85) التابعة للنوع *F. compactum*، والعزلتان FT13 و FT76 التابعتان للنوع *F. acuminatum*، والعزلة FS69 التابعة للنوع *F. pseudocircinatum*، كما لم تظهر حزمة للعزلة FT52 التابعة للنوع *F. verticillioides* بالرغم من وجود زوج البادئات المتخصص بالكشف عن هذا النوع، وهذا قد تم توضيحه في فقرة البادئات المتخصصة.

نستنتج من هذا الاختبار أهمية استخدام طريقة Multiplex PCR لتعريف أنواع الجنس *Fusarium* في الواقع، طوّر Demeke وآخرون (2005) هذه الطريقة للكشف عن ثلاثة أنواع من الجنس *Fusarium* هي *F. culmorum* و *F. graminearum* و *F. sporotrichioides*، كما استُخدمت للكشف عن العديد من أنواع الجنس *Fusarium* في آنٍ واحد، وفي الكشف عن أنواع الفيوزاريوم المفترزة لمجموعات مختلفة من السموم الفطرية (Yli-Mattila et al., 2017). لكن تحتاج هذه الطريقة المُتبعة في الدراسة الحالية لمزيد من الاختبارات حول اختيار درجة الحرارة المثلى، وإجراء اختبار للبادئات المستخدمة فيها، حيث ظهرت حزم ذات أوزان جزيئية صغيرة مع بعض الحزم التي كشفت عن الأنواع كما في العزلة FT17، وقد تكون هذه الحزم ناتجة عن التصاق بعض البادئات مع بعضها وحدث تضخيم لها، وكما يُفضّل اختيار بادئات بحيث تُعطي حزم تكون فيها الفروقات واضحة بين الأنواع، وبالتالي يسهّل معرفة النوع حسب الوزن الجزيئي للحزمة الناتجة، ففي التجربة الحالية كانت الأوزان الجزيئية لبعض الأنواع متقاربة إلى درجة كبيرة يصعب فيها تفريق الأنواع كما هي الحال في الأنواع *F. sambucinum* و *F. sporotrichioides* و *F. oxysporum*.

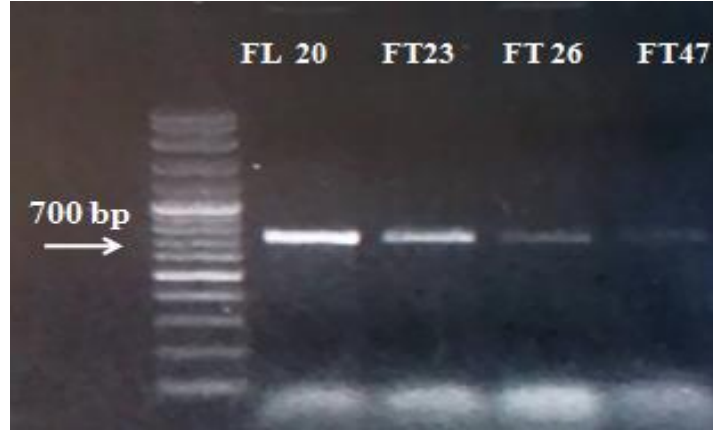
لقد تمكنا من خلال هذا الاختبار من تعريف سبعة أنواع من الجنس *Fusarium* دفعة واحدة، وبهذا اختصار للوقت والتكلفة، ومن هنا تكمن أهمية استخدام طريقة Multiplex PCR في الكشف عن أنواع الفيوزاريوم، وخاصةً في اختبارات البذور، حيث تختصر كثيراً من الجهد والوقت، وتسمح بالكشف عن عدة أنواع مرة واحدة دون الحاجة للتعريف المورفولوجي الذي يحتاج إلى وقتٍ طويل، وإلى خبرة كبيرة أيضاً في التصنيف، وذلك لاختيار البادئة المتخصصة المناسبة لكل نوع على حدة.



الشكل 3-32: تعريف بعض العزلات جزيئياً باستخدام طريقة الـ Multiplex PCR

3.6.4- تضخيم جزئي لمورثة *TEF1*-alpha وتحديد تسلسلها النيكلوتيدي:

نظراً لعدم قدرتنا على تأكيد التعريف المورفولوجي لبعض العزلات المتحصل عليها في هذه الدراسة باستخدام البادئات المتخصصة، كان من الضروري استخدام طرائق أخرى للحصول على تعريف دقيق لأنواع الجنس *Fusarium* خلال فترة زمنية قصيرة مثل طريقة التسلسل النيكلوتيدي للحمض النووي منقوص الأكسجين DNA، حيث تم في هذه الدراسة تضخيم جزء من المورثة *TEF1*- α لثلاث عشرة عزلة من الجنس *Fusarium* (FT20، FT23، FT26، FT47، FT52، FT67، FT79، FH68، FS97، FS96، FS89، FS88، FH3 O'Donnell et al.,) باستخدام زوج البادئات ef1/ef2 (1998). تم الحصول على منتجات PCR (Amplicons) بحدود 700 bp (الشكل 3-33). وتتفق هذه النتائج مع ما ذكره Geiser وآخرون (2004) عن إمكانية تضخيم جزئي لمورثة *TEF1*- α والحصول على حزم بحجم 700 bp تقريباً.

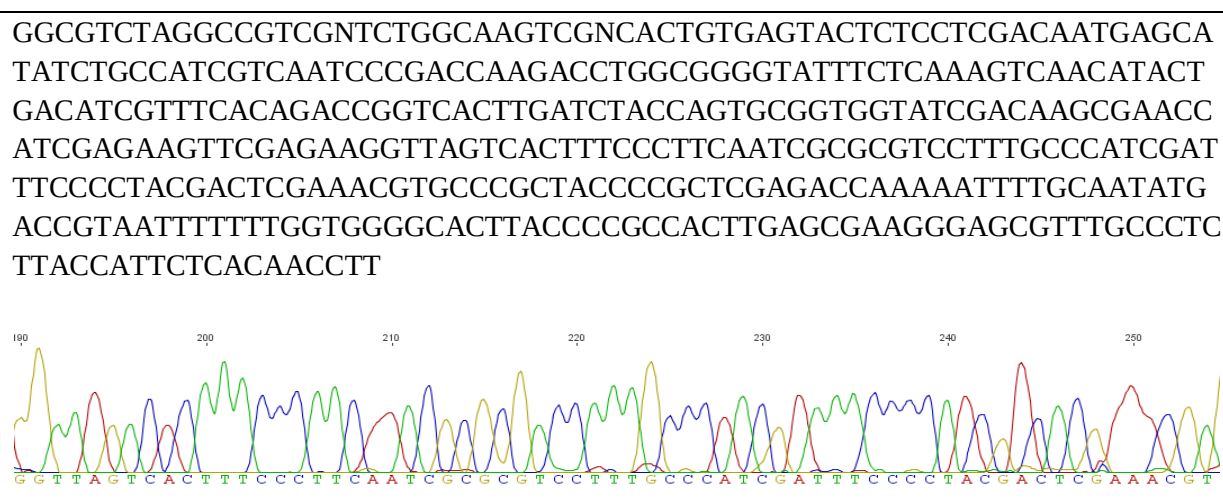


الشكل 3-33: الحزم الناتجة عن تضخيم مورثة *TEF1-α* على هلامة الأغاروز 1 % لبعض العزلات المختارة لإجراء التسلسل النوكليوتيدي.

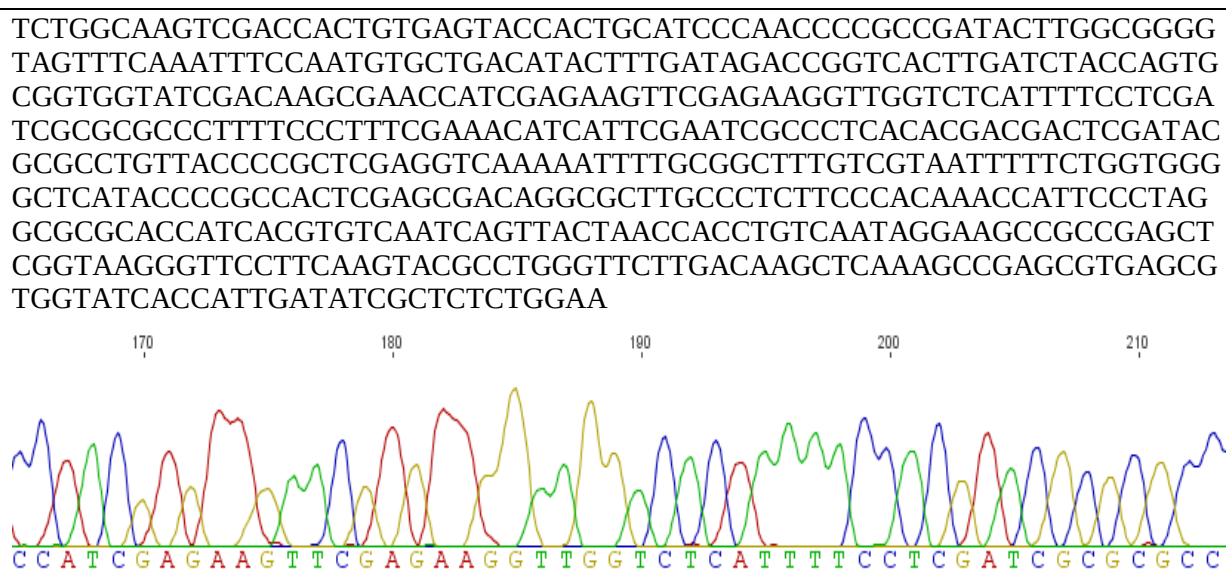
تمّ تحديد التتابعات النوكليوتيدية لمنتجات الـ PCR المتحصل عليها، حيث تمّ حذف التتابعات النوكليوتيدية الطرفية بسبب عدم وضوحها، ثمّ تمّ تعريف الأنواع الناتجة من خلال مقارنة التسلسلات التي تمّ الحصول عليها مع التسلسلات المنشورة على الموقع الإلكتروني للمركز الوطني للمعلومات الحيوية NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)، حيث أظهرت هذه العزلات تشابهاً مع عزلات مرجعية موجودة في بنك الجينات، وقد أودعت هذه التتابعات في قاعدة بيانات البنك الوراثي NCBI، وقد أُعطي كل تتابع رقم دخول Accession number (الجدول 3-6)، وتبين الأشكال (3-34 حتى 3-46) التسلسل النوكليوتيدي لثلاث عشرة عزلة مختلفة.

الجدول 3-6: العزلات المعروفة بالاعتماد على التتابع النوكليوتيدي، وأرقام المدخلات لها وللعزلات المشابهة في NCBI

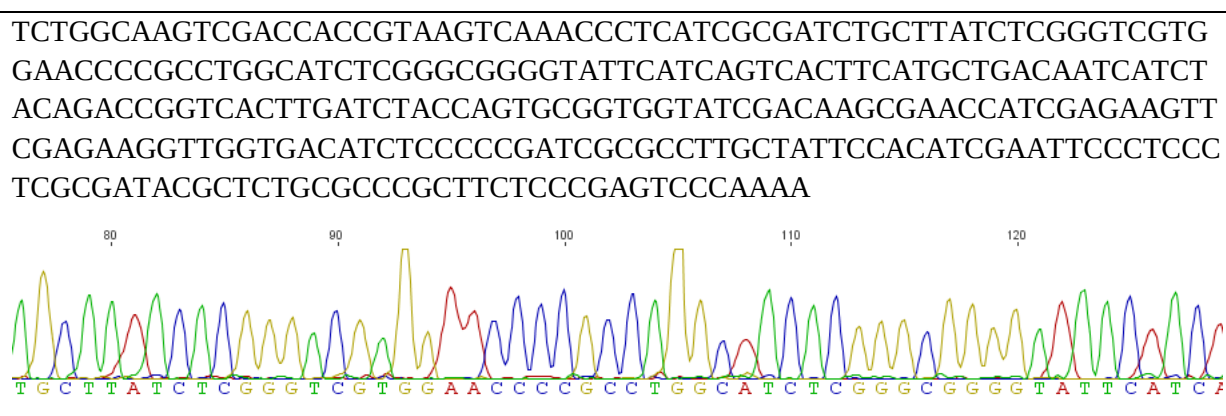
العزلة	أرقام المدخلات Accession numbers للعزلات المحلية	أرقام المدخلات Accession numbers للعزلات المشابهة في بنك الجينات	نسبة التشابه %	بلدان العزلات المشابهة
<i>F. culmorum</i> FL20	MN807691	MF510939	100	تونس
		MG857178	100	نيوزيلاندا
<i>F. proliferatum</i> FT47	MN865124	MK105816	100	إيران
		MK408645	100	الهند
<i>F. verticillioides</i> FT52	MN807690	MK560263	99.79	الصين
		MH791038	99.79	كينيا
<i>F. andiyazi</i> FT67	MN867480	JX261977	98.58	سورية
		KR612338	97.58	المكسيك
<i>F. solani</i> FT23	MN890013	MG973093	100	الجزائر
		MG973089	100	الجزائر
<i>F. incarnatum</i> FT26	MN883027	MG857148	98.77	نيوزيلاندا
		KC820972	96.77	USA
<i>F. proliferatum</i> FT79	MN883028	MG550950	96.54	الأرجنتين
		LS420089	96.54	إيطاليا
<i>F. oxysporum</i> FH68	MN867481	DQ220125	98.90	أنثيوبيا
		MK482291	98.69	البرازيل
<i>F. oxysporum</i> FS97	MN883032	AF346504	100	إسبانيا
		MK461973	100	أستراليا
<i>F. brachygibbosum</i> FS88	MN883029	MG588061	99.37	جنوب أفريقيا
		KX421377	99.37	كاليفورنيا
<i>F. chlamydosporum</i> FS89	MN883030	MG857324	99.03	أستراليا
		MG588071	95.83	جنوب أفريقيا
<i>F. torulosum</i> FH3	MN890014	MK816992	92.70	USA
		KY659169	92.70	كندا
<i>F. flocciferum</i> FS96	MN883031	MH456851	99.53	إيران
		MH456848	99.53	إيران



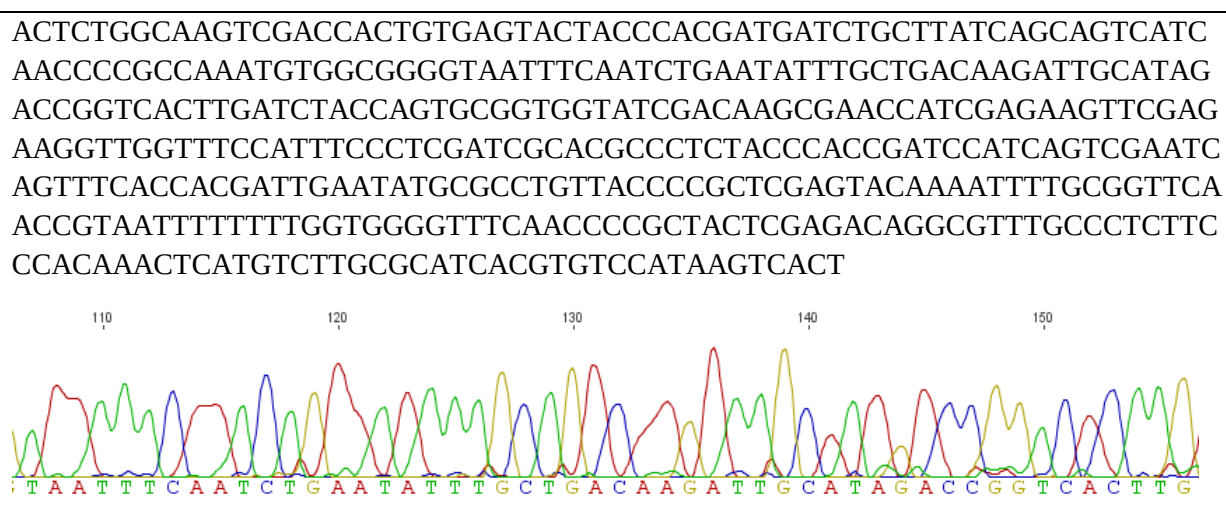
الشكل 3-34: التسلسل النيكلوتيدي وجزء من كروماتوغرام التسلسل للعزلة *F. oxysporum* FS97 (MN883032)



الشكل 3-35: التسلسل النيكليوتيدي وجزء من كروماتوغرام التسلسل للعزلة (MN807691) *F. culmorum* FL20

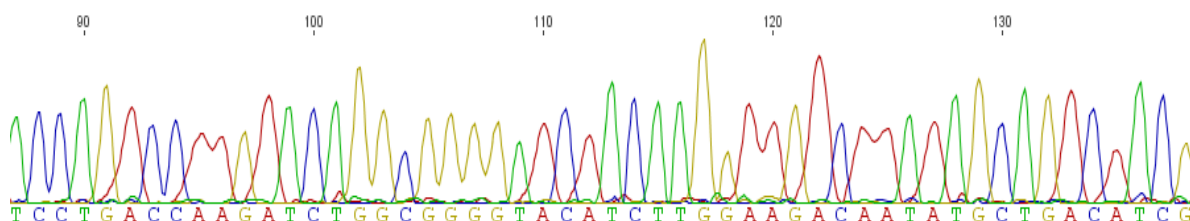


الشكل 3-36: التسلسل النيكليوتيدي وجزء من كروماتوغرام التسلسل للعزلة (MN890013) *F. solani* FT23



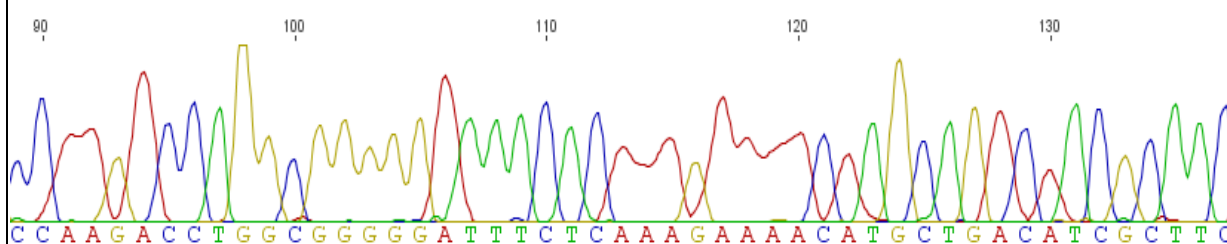
الشكل 3-37: التسلسل النيكليوتيدي وجزء من كروماتوغرام التسلسل للعزلة (MN883027) (*semitectum*) *F. incarnatum* FT26
syn : *F. incarnatum* FT26

ACTCTGGCAAGTCGACCACTGTGAGTACTACCCTGGACGATGAGCTTATCTGCCATCGTG
ATCCTGACCAAGATCTGGCGGGGTACATCTTGGAAGACAATATGCTGACATCGCTTCACA
GACCGGTCACCTTGATCTACCAGTGCAGTGGTATCGACAAGCGAACCATCGAGAAGTTCGA
GAAGGTTAGTCACTTTCCCTTCGATCGCGGTCCTCTGCCCACCGATTTCACTTGCGATTC
GAAACGTGCCTGCTACCCCGCTCGAGACCAAAAATTTTGCGA



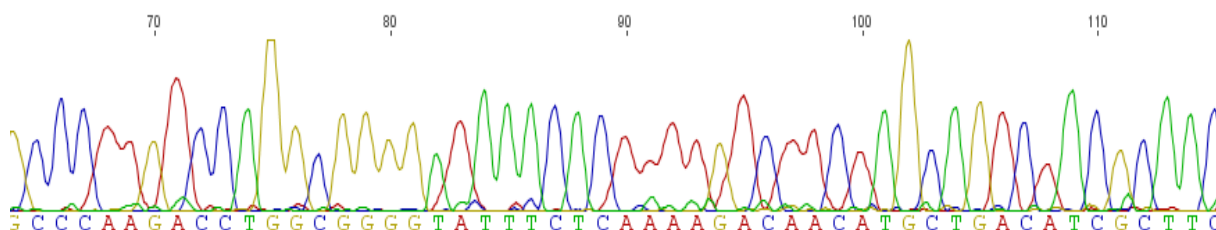
الشكل 3-38: التسلسل النيكليوتيدي وجزء من كروماتوغرام التسلسل للعزلة (MN865124) *F. proliferatum* FT47

CGTCGACTCTGGCAGTCGACCACTGTGAGTACTACCCTTGACGATGAGCTTATCGGCCAT
CGTAAACCCGGCCAAGACCTGGCGGGGGATTCTCAAAGAAAACATGCTGACATCGCTTC
ACAGACCGGTCACCTTGATCTACCAGTGCAGTGGTATCGACAAGCGAACCATCGAGAAGTT
CGAGAAGGTTAGTCACTTTTCTTCTATCGCGGTCCTTTGCCCATCGATTCCCCCTACG
ACTCGAAACGTACCCGCTACCCCGCTCGAGCCCAAAAATTTTGCGATACGACCGTAATTT
TTTCTGGTGGGGCATTACCCCGCCACTCGAGCGGCGGCTTCTGCCCTCTCCATTCCAC
AACCTCACTGAGCTCATCGTCACGTGTCAAGCAGTCACTAACCATCCGACAATAGGAAGC
CGCTGAGCTCGGTAAGGGTTCCTTCAAGTACGCCTGGGTTCTTGAT



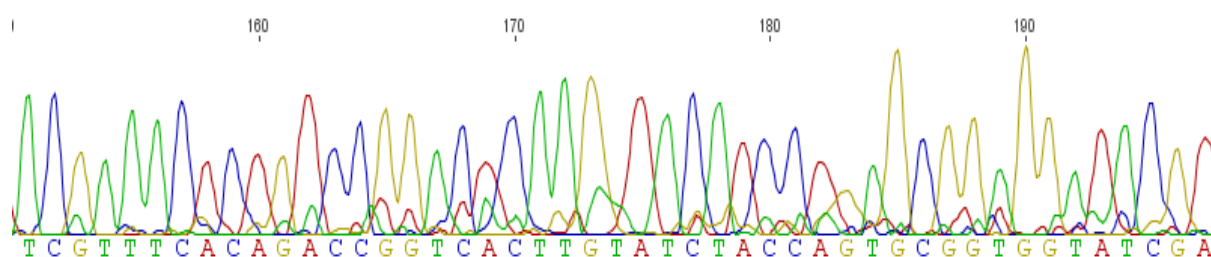
الشكل 3-39: التسلسل النيكليوتيدي وجزء من كروماتوغرام التسلسل للعزلة (MN807690) *F. verticillioidea* FT52

TCTGGCAAGTCGACCACTGTGAGTACTGCCCTTGACGATGAGCTTATCGGCCATCGTAAT
CCCGCCCAAGACCTGGCGGGGTATTTCTCAAAGACAACATGCTGACATCGCTTCACAGA
CCGGTCACCTTGATCTACCAGTGTGGTGGTATCGACAAGCGAACCATCGAGAAGTTCGAGA
AGTTAGTCACAATCCCTTCGATCGCGGTCCTTTGACCACCGAGTTCTCCCTACGCCTCGA
AACGTGCCCCGCTACCCCGCTCGAGTCCAAAAATTTTGCGATATGTCCGTAATTTTTTTTG
TGGGGCATTACCCCGCCACTCGAGCGG



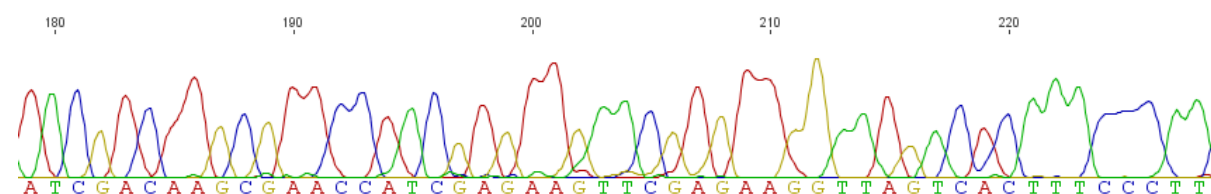
الشكل 3-40: التسلسل النيكليوتيدي وجزء من كروماتوغرام التسلسل للعزلة (MN867480) *F. andiyazi* FT67

CTGTGGTTCTCTCCTCGACAATGAGCTTATCTGCCATCGTCAATCCCGACCCAGACCTGGC
GGGGTATTTCTCACAGTCAACATACTGACATCGTTTCACAGACCGGTCACTTGATCTACCA
GTGCGGTGGTATCGACAAGCGAACCATCGAGAAGTTCGAGAAGGTTAGTCACTTTCCCTT
CGATCGCGCGTCTTTGCCCATCGATTTCCCCTACGACTCGAAACGTGCCCCGCTACCCCGC
TCGAGACCAAAATTTTGAATATGACCGTAATTTTTTTTTCGGTGGGGCACTTACCCCGCCA
CTTGAGCGACGGGAGCGTTTGCCCTCTTACCATTCTCACAACCTCAATGAGTGCCTCGTCA
CGTGTCAAGCAGTCCCTAACCATTCAACAATAGGAAGCCGCTGAGCTCGGTAAGGGTTCC
TTCAAGTACGCCTGGGTTCTTGACAAGCTC



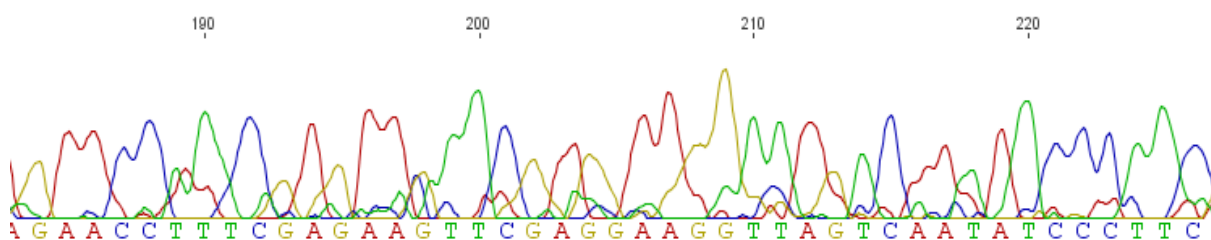
الشكل 3-41: التسلسل النيكلوتيدي وجزء من كروماتوغرام التسلسل للعزلة (MN867481) *F. oxysporum* FH68

TGTGTGTTCTCCCCAGGACGATGAGCTTATCATGCCATCGTGATCCTGACCAAGATCTGGC
GGGGTACATCATTGGAAGACAATATGCTGACATCGCTTCACAGACCGGTCACTTGATCTA
CCAGTGCAGGTGGTATCGACAAGCGAACCATCGAGAAGTTCGAGAAGGTTAGTCACTTTCC
CTTCGATCGCGCGTCTTCTGCCCACCGATTTCACTTGCGATTTCGAAACGTGCCTGCTACCC
CGCTCGAGACCAAAATTTTTCGATATGACCGTAATTTTTTTGGTGGGGCATTACCCCGC
CACTCGAGCGATGGGCGCGTTTTCCTGTCCACACCTTCAAGAGCGCATTGTCAC
GTGTCAAGCAACGACTACATTCGACATAGGAAGCCGCTGAGCTCGGTAAGGGTTCCTTCA
AGTAC



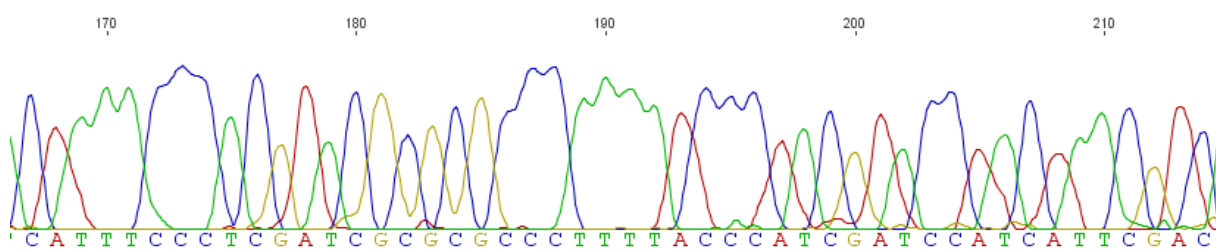
الشكل 3-42: التسلسل النيكلوتيدي وجزء من كروماتوغرام التسلسل للعزلة (MN865124) *F. proliferatum* FT79

TTAGTCAATATCCCTTCGATTGCGCGCGCTCCCATCGATTCCCTACGACTCGCTCCCTCATT
CGAAACGCATCCATTACCCCGCTCGAGCCCGAAAATTTTTCGGTGCGACCGTGATTTTTTT
TGGGAGGGGTATCTTACCCCGCCACTTCGAACGACGAAAGCGTTGCCCTGGTTCCCA
ACAAAACCTTACTTCCCTGGCCGGGACTTTTCATATATGTTTTGCAGTTCTTACCCTCCTGA
CAATATAGGAAGCCGCCGAGCTCGGAAAGGGTTCCTTCAAGTACGCCTGGGTTCTTGACA
AGCTCAAAGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATTGATATCGCTCTCTGGAAG



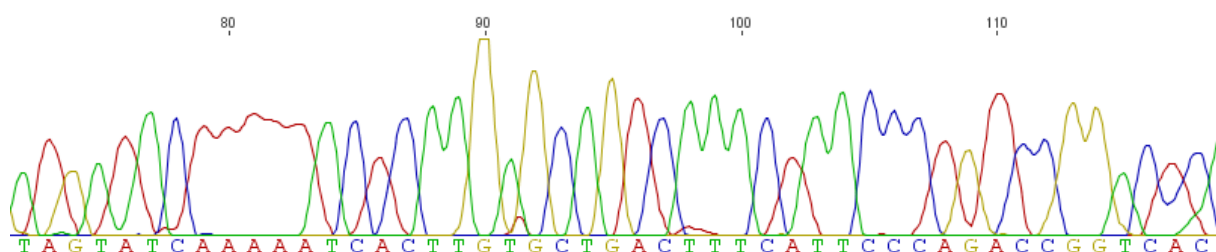
الشكل 3-43: التسلسل النيكلوتيدي وجزء من كروماتوغرام التسلسل للعزلة (MN890014) *F. torulosum* FH3

TGGCAAGTCGACCACTGTGAGTACCACCAAGCCTCGACCCCGCCTAGATTTGGTGGGGTA
GTCTCAAGATTCATTCATACTGACATACTTTGATAGACCGGTCACCTTGATCTACCAGTGCG
GTGGTATCGACAAGCGAACCATCGAGAAGTTCGAGAAGTTGGTCTCATTTCCCTCGATCG
CGCGCCCTTTTACCCATCGATCCATTCGACTCGCTCTTTCACGACGATTCGATCCGCG
CCCGTTACCCCGCTCGAGCTCAAAATTTTTGCGATTCAATCGTAATTTTTTTTTGGGGGGCT
CATACCCCGCC



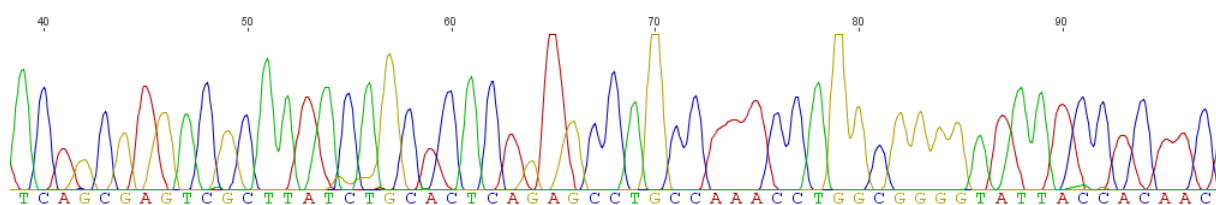
الشكل 3-44: التسلسل النيكليوتيدي وجزء من كروماتوغرام التسلسل للعزلة (MN883029) *F. brachygibbosum* FS88

AGTCGACCACTGTGAGTCCACCTCGACGATCTGCTTATCAGCAATCGTGAACCCCGCCAA
TATATGGCGGGGTAGTATCAAAAATCACTTGTGCTGACTTTCATTCCCAGACCGGTCACCTT
GATCTACCAGTGCGGTGGTATCGACAAGCGAACCATCGAGAAGTTCGAGAAGTTGGTCT
CATTTTCCTCGATCGCGCGCCCTATACCCATCGATACATCATTCGAATCGCTCTTTCACG
ACGACTCGACAAGCGTCCGTTACCCCGCTCGAGCTCAAAAATTTTTGCGGTTCTGTCTGTA
TTTTTTTTCT



الشكل 3-45: التسلسل النيكليوتيدي وجزء من كروماتوغرام التسلسل للعزلة (MN883030) *F. chlamydosporum* FS89

ATAGGCTCCTACAGGCCGTCGATCTGGCAAGTCGACCACTGTAGTACACCATCAGCGAGT
CGCTTATCTGCACTCAGAGCCTGCCAAACCTGGCGGGGTATTACCACAACAGTTTGCTAA
CTTTCGATAGACCGGTCACCTTGATCTACCAGTGCGGTGGTATCGACAAGCGAACCATCGA
GAAAGTTCGAGAAGGTTAGTCAATATCCCTTCGATTGCGCGCTTCCCATCGATCCCCACG
ACTCGCTCCTTCACTCGAAACGCATCCATTACCCCGCTCGAGCCCGAAAATTTTGCGGTGC
GACCGTGATTTTTTTGGTGGGGTATCTTACCCCGCCACTCGAGTGACGGATGCGCTTGCCC
TGNTTCCACAAAAGCCTTACTACCCTGCCGCGCACTATCATATGTCTTGCAAGTCACTAA
CACTGGACAATAAGAAAGC



الشكل 3-46: التسلسل النيكليوتيدي وجزء من كروماتوغرام التسلسل للعزلة (MN883031) *F. flocciferum* FS96

تمّ في هذه الدراسة الجزيئية تأكيد تعريف 64 عزلة، منها 51 عزلة تمّ تعريفها باستخدام البادئات المتخصصة، و13 عزلة بالاعتماد على التسلسل النوكليوتيدي.

لقد أثبتت الطرائق الجزيئية أنّ التعريف المورفولوجي لـ 60 عزلة من أصل 64 عزلة كان مطابقاً، بينما عزلتان تمّ تعريفهما بشكل خاطئ وهما العزلتان FT67 وFS88، وعزلتان لم نتمكن من تعريفهما مورفولوجياً هما العزلتان FH3 وFS96، فالعزلة FT67 تمّ تعريفها مورفولوجياً على أنها تتبع النوع *F. verticillioidea*، بينما تبين جزيئياً أنها تعود للنوع *F. andiyazi*، ويُعزى هذا الخطأ في التعريف إلى تشابه النوعين السابقين في مكوناتهما المجهرية، فكلهما ينتمي إلى المعقد *G. (G. fujikuroi species complex)* الذي تتميز أفراده بدرجة عالية من التشابه، حيث يتشابهان في شكل الأبواغ الكونيدية الكبيرة، وفي شكل الأبواغ الكونيدية الصغيرة وطريقة توضعها، إذ تتوضع في كلا النوعين ضمن رؤوس كاذبة أو سلاسل وتكون محمولة على حوامل كونيدية وحيدة الفيليد، وهذا ما تمّت الإشارة إليه من قبل Leslie وSummerell (2006). أظهرت نتائج التسلسل النوكليوتيدي، والبحث في *TEF1-α* BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)، ومقارنتها مع تسلسل المورثة *TEF1-α* أن العزلات FT47 وFT52 وFT67 تتشابه بنسبة 99.79% و99.79% و98.58% مع الأنواع *F. proliferatum* و *F. verticillioidea* و *F. andiyazi* على التوالي، وقد تم إجراء محاذاة Alignment لتسلسل العزلات الثلاث باستخدام برنامج CLUSTAL X لإظهار التباين الوراثي (الشكل 3-47). وحسب معلوماتنا، فإن هذه الدراسة تعد التسجيل الأول في العالم لعزل النوع *F. andiyazi* من جذور نباتات قمح مصاب. في الحقيقة، فإن هذا النوع معروف بشكل جيد كفطر ممرض على الذرة الصفراء والبيضاء وليس على القمح (Leslie and Summerell, 2006)، فقد تمّ عزله وتعريفه لأول مرة من الذرة البيضاء *Sorghum* في أفريقيا من قبل Marasas وآخرون (2001)، ومن حبوب الرزّ المصابة بمرض باكانا في أفريقيا وآسيا (Wulff et al., 2010)، كما تمّ عزله في سورية من الذرة البيضاء أيضاً (Madania et al., 2013). أمّا العزلة FS88، فقد تمّ تعريفها في البداية *F. transvaalense* وتبين بالتعريف الجزيئي أنها تعود للنوع *F. brachygibbosum*.

بالنسبة للعزلتين FH3 وFS96، فلم يتم تعريفهما مورفولوجياً إلى مستوى النوع، وتبين بالاعتماد على التسلسل النوكليوتيدي أنّهما تشابهان مع *F. torulosum* و *F. flocciferum* على التوالي، وتجدر الإشارة هنا أيضاً إلى أنه لا توجد أية دراسة محلية سابقة تشير لعزل الأنواع *F. torulosum* و *F. Brachygibbosum* في سورية، بينما تم عزلها من جذور نباتات قمح مصابة في تركيا (Gebremariam et al., 2017). كما تمّ تأكيد التعريف المورفولوجي للعزلة FS89 باستخدام التسلسل النوكليوتيدي لجزء من المورثة *TEF1-α* بأنها تعود للنوع *F. chlamydosporum*، وتعدّ هذه الدراسة الأولى أيضاً التي تشير لعزل هذا النوع من جذور نباتات القمح في سورية.

من العزلات التي تم اختيارها لإجراء التسلسل النوكليوتيدي، العزلات (FT79، FT47، FL20)، والتي عُرِّفت الأولى *F. culmorum* والعزلتان الباقيتان *F. proliferatum* بالاعتماد على الصفات المورفولوجية، ولم نتمكن من إثبات التعريف بالاعتماد على البادئات المتخصصة، ولكن باستخدام التسلسل النوكليوتيدي تم إثبات التعريف المورفولوجي للعزلات الثلاث السابقة، والذي كان موافقاً للتعريف المورفولوجي، وبالتالي يتبين أن استخدام التسلسل النوكليوتيدي أكثر دقة من استخدام البادئات المتخصصة، ويُفضل استخدامه في حال توافر الإمكانيات المادية لكونه أكثر تكلفة من استخدام البادئات المتخصصة.

تُعد مورثة *TEF1-α* مؤشراً مثالياً لتعريف أنواع الفيوزاريوم، وذلك لعدة أسباب منها: تفيد في دراسة القرابة الوراثية لأنها غنية بمعلومات تسمح بتمييز أنواع الجنس *Fusarium*، وتظهر كنسخة واحدة في هذا الجنس، وتُبدى نسبة عالية من التباين الوراثي بين الأنواع المتقاربة، وقد صُممت بادئات عامة تعمل على جميع الأنواع التابعة لهذا الجنس. هذه البادئات تُضخم قطعة وزنها الجزيئي 700bp تقريباً، وتتكون من أربع مناطق مشفرة Exons تحصر بينها ثلاث مناطق غير مشفرة Introns، وتُشكل هذه الأخيرة أكثر من نصف حجم القطعة بالطول (O'Donnell et al., 1998; Geiser et al., 2004). لقد استُخدمت طريقة تسلسل الحمض النووي DNA لمورثة *TEF1-α* في العديد من الدراسات، فعلى سبيل المثال تم في تركيا تعريف 17 نوعاً من أنواع الجنس *Fusarium* بالاعتماد عليها (Gebremariam et al, 2017)، كذلك استخدم Wulff وآخرون (2010) هذه الطريقة للحصول على تعريف دقيق لأنواع الجنس *Fusarium* التي تنتمي للمعقد *Gibberella fujikuroi* (*F. verticillioides* و *F. proliferatum* و *F. andiyazi* و *F. fujikuroi*)، والتي تسبب مرض باكانا في الرز Rice Bakanae disease، حيث قاموا بتضخيم جزء من المورثة *TEF1-α* باستخدام زوج البادئات ef1 و ef2، كما استخدم Rhjoo وآخرون (2008) المورثة *TEF1-α* لتعريف عدة أنواع من الفيوزاريوم متحصل عليها من نباتات الذرة في إيران، والتي لم يتمكنوا من تعريفها باستخدام الطرائق المورفولوجية، وباستخدام البادئات المتخصصة مثل النوعين *F. thapsinum* و *F. bullatum*. وبشكل مشابه أيضاً في دراسة قام بها Sampietro وآخرون (2010) تمكنوا من الكشف عن عدة أنواع من الفيوزاريوم السامة التي تصيب الحبوب في الأرجنتين، وذلك بالاعتماد على التسلسل الناتج من تضخيم جزئي للمورثة *TEF1-α* باستخدام زوج البادئات ef1 و ef2 أيضاً.

بالرغم من إجراء عدد من الدراسات للكشف عن أنواع الفيوزاريوم التي تصيب القمح في سورية إلا أنها قليلة، وقد تم القيام بها منذ أكثر من عشر سنوات تقريباً أي قبل حدوث الأزمة في سورية، وكان آخرها المسح الذي أجري عام 2006، والذي تم فيه عزل وتعريف ثلاثة أنواع تصيب التاج وجذور القمح

من محافظات حلب، ودير الزور، والرققة، والحسكة، وحماه، ودرعا، وهي *F. culmorum* و *F. proliferatum* و *F. equiseti*، وذلك بالاعتماد على الطرائق المورفولوجية فقط (الشعبي وآخرون، 2015)، وبالنسبة للفحة السنابل، كان آخر مسح عام 2008، حيث تمّ تعريف 10 أنواع تصيب السنابل في سهل الغاب في محافظة حماه، وهذه الأنواع ذُكرت سابقاً، وذلك بالاعتماد على الطرائق المورفولوجية أيضاً (الشعبي وآخرون، 2018)، ولم تجر أية دراسة تشمل الأنواع التي تصيب القمح في محافظات اللاذقية وطرطوس والسويداء، حيث يمكن أن تختلف مسببات تعفن التاج والجذور في نبات القمح باختلاف المواقع البيئية والعوامل المناخية وبشكل خاص الحرارة والرطوبة، ونتيجة لحدوث تغيرات في الظروف المناخية خلال السنوات الأخيرة، والتي يمكن أن تكون قد أثرت بدورها في انتشار أنواع الجنس فيوزاريوم، ونتيجة للظروف الأمنية التي سادت خلال السنوات الماضية، واحتمال إدخال بذار القمح بطرائق غير نظامية، فمن المتوقع حدوث تغير بأنواع الممرضات التي تصيب النباتات ومن بينها القمح. كما أن الدراسات التي استخدمت الطرائق الجزيئية في تعريف أنواع الجنس *Fusarium* المعزولة من القمح في سورية قليلة جداً. وحسب معلوماتنا، لم تستخدم سابقاً البادئات المتخصصة والتسلسل النووي تيدي في تعريف أنواع الفيوزاريوم المعزولة من القمح في سورية، حيث أجري مسح حقلي عام 2003، وتم تحديد درجة القرابة الوراثية بين بعض الأنواع باستخدام تقانة AFLP (El-Khalifeh et al., 2009)، كما أجري مسح حقلي آخر في عام 2004، وتم أيضاً تحديد درجة القرابة الوراثية بين بعض الأنواع باستخدام تقانتي RAPD و AFLP (العظم، 2007)، ومن المعروف أن هذه الطرائق تقسم العزلات إلى مجموعات متشابهة لكن لا تحدد النوع بدقة. أجري مسح حقلي عام 2009-2010، واستخدمت بادئات متخصصة للكشف عن أنواع الفيوزاريوم في عينات حبوب قمح سورية وإيطالية، ولكن هذه الدراسة لم تجر في سورية (Alkadri et al., 2013). ومن هنا تأتي أهمية هذه الدراسة، والتي تؤكد أنّ استخدام الميزات المورفولوجية لبعض أنواع الجنس *Fusarium* يمكن أن يقود إلى نتائج خاطئة، أمّا استخدام الطرائق الجزيئية، فقد أثبتت دقتها وسرعتها في تعريف أنواع هذا الجنس. نستنتج مما سبق ضرورة استخدام تقانات PCR للحصول على تعريف دقيق لأنواع الجنس فيوزاريوم، وهذا ما ذكره Varga (2003) بأنّ بعض التقانات التي تعتمد على الـ PCR تُتيح التعريف الدقيق و/ أو الكشف عن العديد من الكائنات الحية الدقيقة.

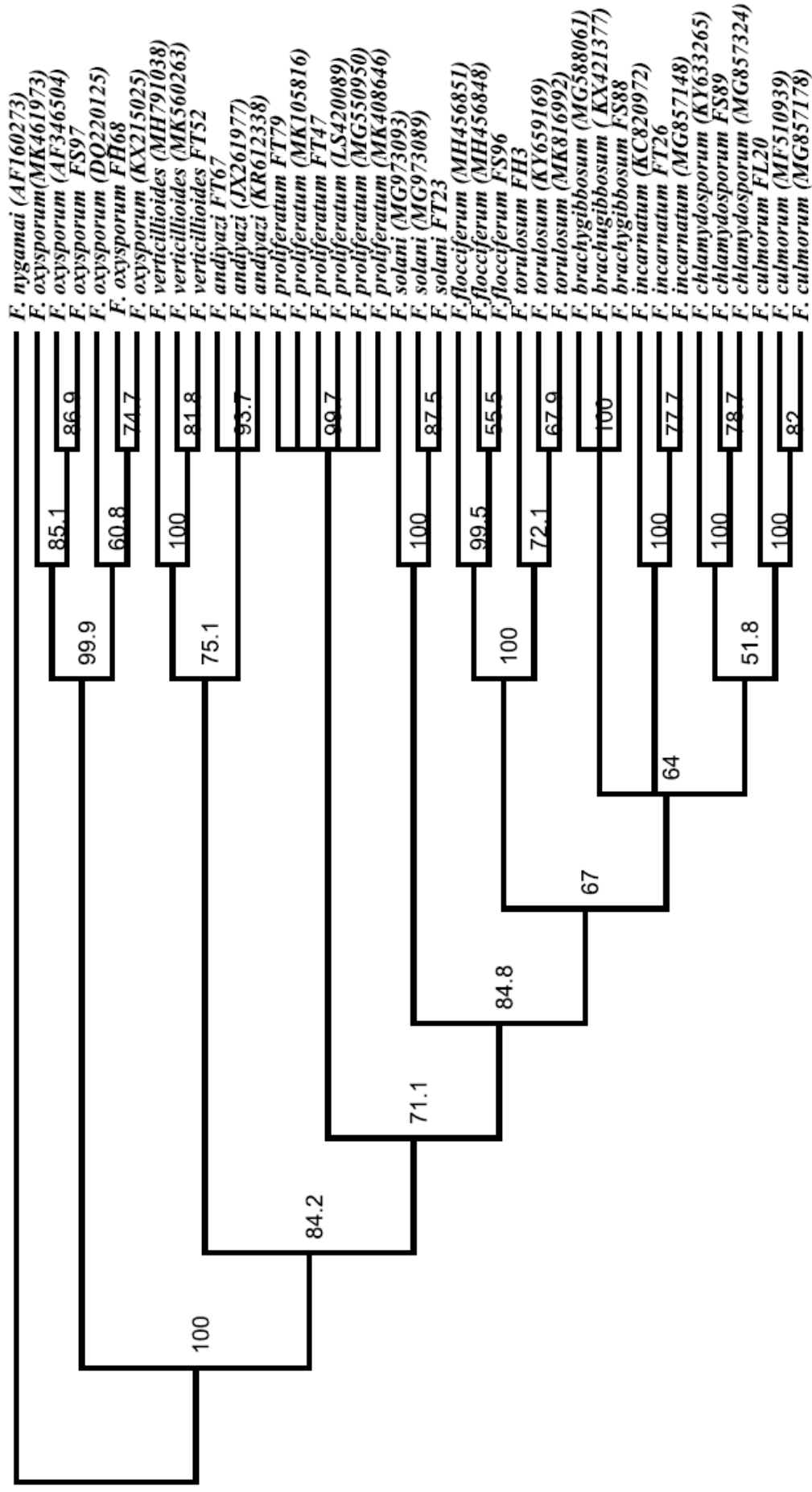
تمّ الحصول على عدد من تسلسلات المورثة *TEF1-α* من عزلات أنواع الفيوزاريوم المدروسة في هذا العمل وذلك من قواعد البيانات العالمية، وتم دمجها مع التسلسلات المحلية، ورسم شجرة قرابة للعزلات المحلية والعالمية معاً (الشكل 3 - 48). وقد اتضح من شجرة القرابة الناتجة اجتماع العزلات

المحلية مع العزلات العالمية من نفس النوع ضمن عناقيد واحدة، وهذا يؤكد صحة النتائج المتحصل عليها في هذه الدراسة.

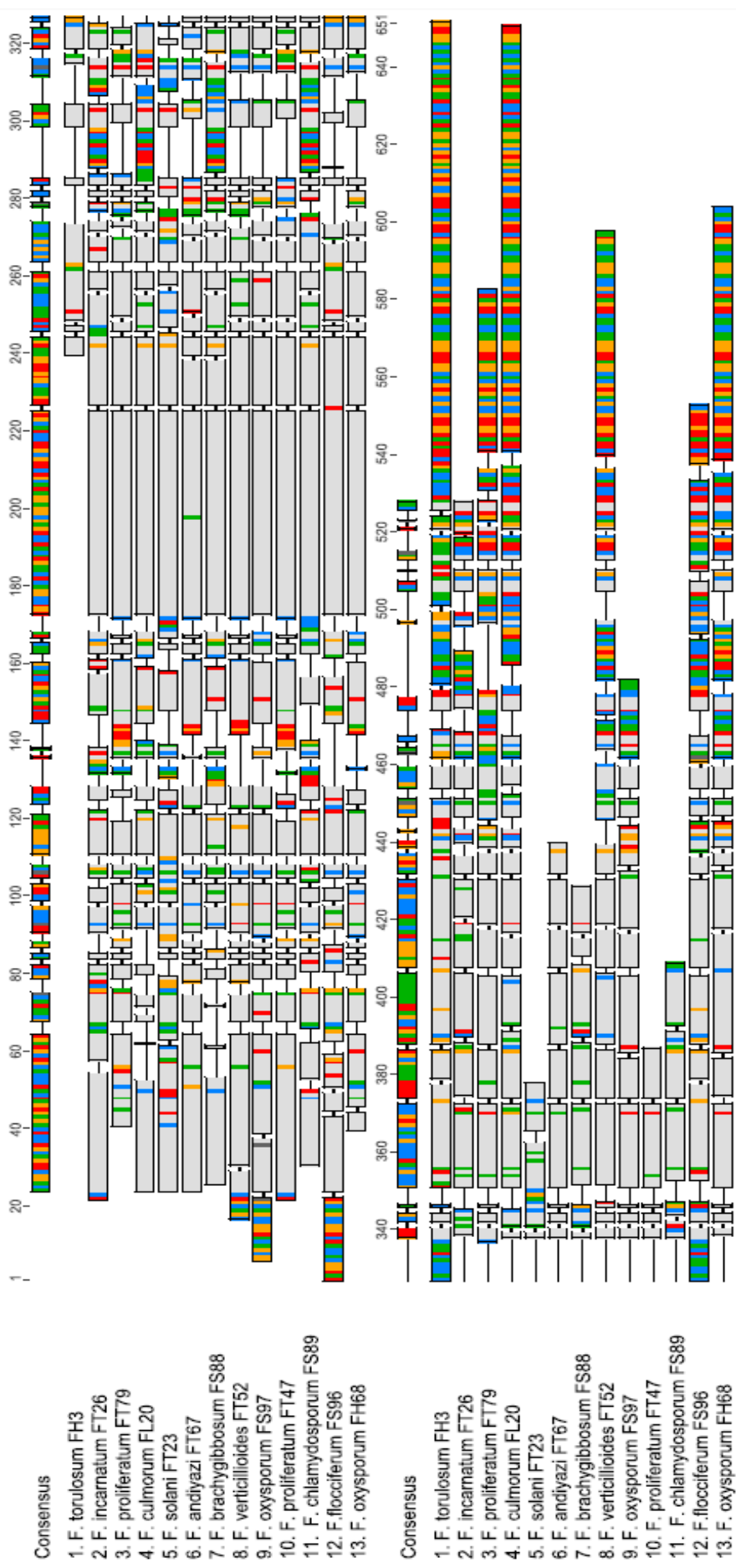
يتشابه النوعان *F. flocciferum* و *F. torulosum* مورفولوجياً حسب بعض الدراسات (Šišić et al, 2019)، وقد انعكس ذلك بشكل واضح في شجرة القرابة الوراثية (الشكل 3 - 48)، فقد توضعاً في تحت عنقود واحد مما يعكس درجة عالية من القرابة الوراثية. وهذا يتوافق مع نتائج Šišić وآخرون (2019) حيث تبين أن 27 عزلة، متحصل عليها من البازلاء والفل، تم تعريفها مورفولوجياً على أنها *F. torulosum*، ثم تبين باستخدام التسلسل النكليوتيدي لجزء من المورثة *TEF1-α* أنها *F. flocciferum*. كما اتضح من هذه الشجرة أنّ النوعين *F. andiyazi* و *F. verticillioides* المتشابهين مورفولوجياً أيضاً قد اجتمعا في تحت عنقود واحد.

لقد أبدت بعض الأنواع تقارباً وراثياً بالرغم أنّها تنتمي لأقسام مختلفة، وذلك عند استخدام جزء من مورثة *TEF1-α* كما هي الحال في النوعين *F. culmorum* و *F. chlamydosporum* الذين يتبعان لقسمين مختلفين *Discolor* و *Sporotrichiella* على الترتيب، إلا أنّهما كانا متقاربين وراثياً وتوضعاً في تحت عنقود واحد.

يتضح مما سبق أنه ليس من الضروري أن تكون الأنواع المتشابهة مورفولوجياً وخاصة تلك المصنفة في نفس القسم متقاربة أيضاً وراثياً، كما أن بعض الأنواع المصنفة مورفولوجياً في أقسام مختلفة قد تبدي درجة عالية من القرابة الوراثية، وبالتالي فإن التشابه المورفولوجي ليس بالضرورة أن يعكس درجة عالية من القرابة الوراثية، وهذا يتوافق أيضاً مع نتائج Ünal وآخرون (2017)، الذين اعتمدوا على تضخيم منطقة ITS للعزلات المختبرة باستخدام بادئات عامة ITS-1/ITS-4، وتحديد التسلسل النكليوتيدي لمنتجات PCR، ورسم شجرة القرابة الوراثية بين الأنواع المدروسة من الجنس *Fusarium*. إنّ استخدام المزيد من المورثات إلى جانب المورثة *TEF1-α* قد يحسم نتيجة التقارب الوراثي بين أنواع الجنس *Fusarium*.



الشكل 3-48: شجرة القرابة الوراثية لعزلات 11 نوعاً من الجنس *Fusarium* متحصل عليها في هذه الدراسة مقارنة مع عزلات مرجعية مشابهة



الشكل 49-3: محاذاة التسلسلات النوكليوتيدية لجزء من المورثة *TEF1-α* لـ 13 عزلة تابعة للجنس *Fusarium* متحصل عليها في هذه الدراسة

3.6.5 - الكشف عن المورثات المسؤولة عن التخليق الحيوي للسموم التي تنتجها بعض

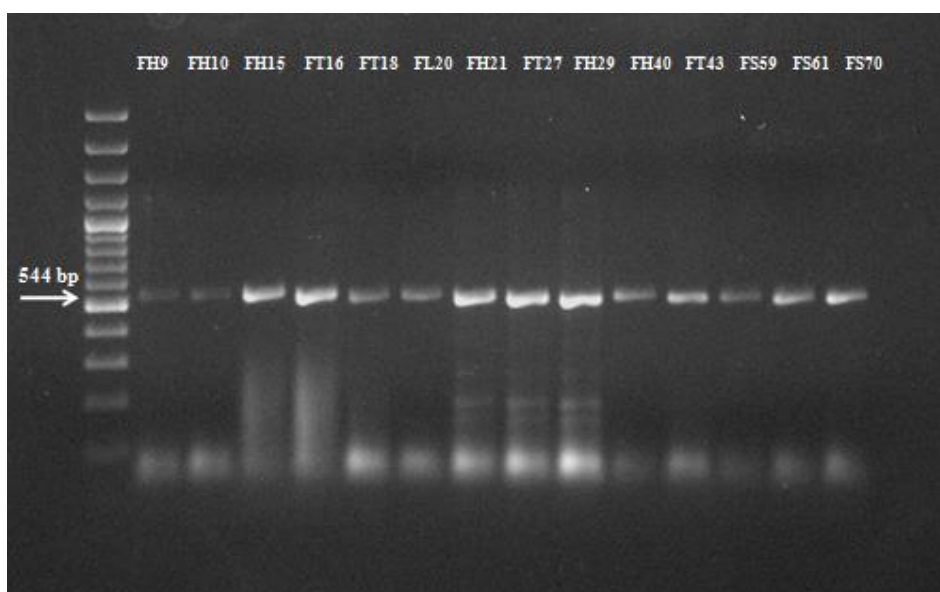
أنواع الجنس *Fusarium*

إنّ تحديد أنواع الفيوزاريوم المفرزة للسموم والسيطرة عليها أمرٌ حاسم في الحد من دخول هذه السموم في السلسلة الغذائية (Jurado et al, 2006).

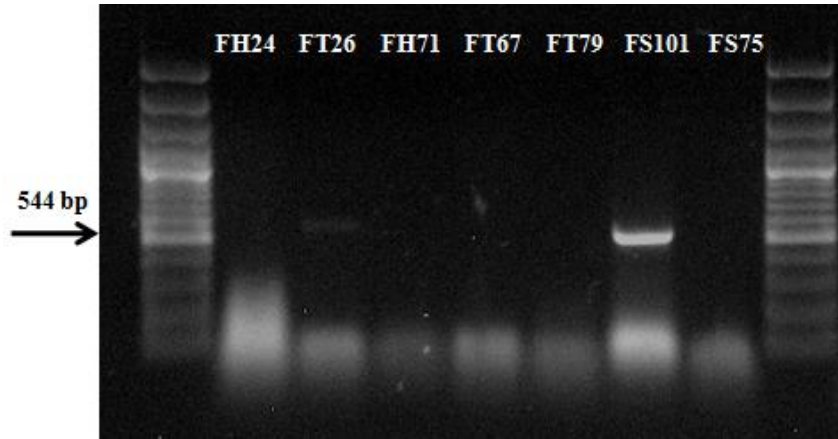
أُجريت اختبارات PCR على العزلات المدروسة بهدف الكشف عن أنواع الجنس *Fusarium* المفرزة لأهم ثلاث مجموعات من السموم الفطرية هي (التريكوثيسينات، والفيومينوزينات، والزيلينون) باستخدام ثلاثة أزواج من البادئات المتخصصة بالكشف عن المورثات الرئيسية التي تشترك في عمليات التخليق الحيوي لتلك السموم.

3.6.5.1 - الكشف عن المورثة *TRI5* التي تشترك في عمليات التخليق الحيوي للتريكوثيسينات:

أظهر تفاعل تضخيم مورثة *TRI5* باستخدام زوج البادئات Tri5F/Tri5R وجود حزمة وحيدة ذات وزن جزيئي 544 bp تقريباً عند جميع عزلات النوع *F. culmorum*، مما يشير إلى امتلاكها لهذه المورثة الضرورية في عملية التخليق الحيوي للتريكوثيسينات، وبالتالي إمكانية إفراز هذه السموم عند توافر الظروف الملائمة (الشكل 3-50)، كما ظهرت حزم بنفس الوزن الجزيئي عند العزلة FT26 التابعة للنوع *F. semitectum* (الشكل 3-51)، وعند العزلتين FT63 و FT72 التابعتين للنوع *F. pseudograminearum* (الشكل 3-56)، بينما لم تظهر أية حزمة عند محاولة الكشف عن هذه المورثة عند عزلات الأنواع الأخرى .



الشكل 3-50: الكشف عن المورثة *TRI5* المسؤولة عن تخليق التريكوثيسينات عند عزلات النوع *F. culmorum* باستخدام زوج البادئات Tri5F/Tri5R على هلام الأغاروز 1%.



الشكل 3- 51: الكشف عن المورثة *TRI5* المسؤولة عن تخليق التريكوثيسينات عند بعض أنواع الفيوزاريوم على هلامية الأغاروز 1%. *F. (FH71, FS75)*, *F. semitectum (FT26)*, *F. sporotrichoides (FH24)*, *F. culmorum (FS101)*, *F. proliferatum (FT79)*, *F. andiyazi (FT67)*, *equiseti*

يعدّ *F. culmorum* و *F. graminearum* و *F. poae* و *F. equiseti* من أكثر أنواع الفيوزاريوم إفرازاً للتريكوثيسينات (Jurado et al., 2006)، وقد أكدت الدراسة الحالية امتلاك جميع عزلات النوع *F. culmorum* لمورثة *TRI5*، والتي تُعدّ المورثة الأولى في مسار تصنيع التريكوثيسينات، وهي تشفر لأنزيم التريكودين Trichodiene، ومحفوطة بدرجة كبيرة عند أنواع الجنس فيوزاريوم المنتجة للتريكوثيسينات (Lee et al., 2001)، وقد سهّل اكتشاف هذه المورثة تطوير العديد من الطرائق التي تعتمد على الـ PCR للكشف عن أنواع الفيوزاريوم المنتجة لتلك السموم. هذا وقد استُخدمت مورثات أخرى تشترك في التخليق الحيوي للتريكوثيسينات للكشف عن نوع السم الذي ينتمي لهذه المجموعة باستخدام الـ PCR، فعلى سبيل المثال يتم الاعتماد على المورثتين *TRI7* و *TRI13* في الكشف عن أنواع الجنس *Fusarium* المفززة لسمي DON و NIV (Chandler et al., 2003)، كما أُكّدت بعض المراجع قدرة عزلات النوعين *F. semitectum* و *F. pseudograminearum* على إفراز التريكوثيسينات (Leslie and Summerell, 2006).

أظهرت نتائج الدراسة الحالية أنّ عزلات النوع *F. equiseti* لا تملك المورثة *TRI5*، بينما ذكرت دراسة سابقة أجريت في إيطاليا، للكشف عن المورثات المسؤولة عن إنتاج السموم عند أنواع الجنس فيوزاريوم المعزولة من حبوب قمح سورية، امتلاك سبع عزلات من أصل تسعة تابعة للنوع *F. equiseti* للمورثة *TRI5* التي تشترك في عملية التخليق الحيوي للتريكوثيسينات، وبالتالي إمكانية إفراز هذه السموم عند توافر الظروف الملائمة (Alkadri, 2012).

كما أن بعض سلالات النوع *F. sporotrichioides* معروفة بإفرازها للتريكوثيسينات من النمط B مثل T-2 و HT-2 (Thrane et al., 2004)، لكن لم تظهر حزم تشير إلى امتلاك السلالات الناتجة في هذه الدراسة لمورثة *TRI5*، وقد يُعزى الاختلاف بين نتائجنا ونتائج بعض الدراسات السابقة إلى احتمال حدوث طفرات في المسار التصنيعي لتلك السموم الفطرية (Hestbjerg et al., 2002)، وقد يكون هناك احتمال حدوث فقد لجزء من تسلسل المورثة مكان ارتباط البادئات، وللتأكد من ذلك يجب إجراء دراسات لاحقة للتأكد من وجود سموم مفرزة.

3.6.5.2- الكشف عن المورثة *FUM5* التي تشترك في عمليات التخليق الحيوي للفيومينوزينات:
أظهر تفاعل تضخيم المورثة *FUM5* الضرورية في عملية التخليق الحيوي للفيومينوزينات، باستخدام زوج البادئات *FUM5R/FUM5F*، وجود حزمة بوزن جزيئي 845 bp تقريباً عند العزلتين FT31 و FT52 التابعتين للنوع *F. verticillioides*، بينما لم تظهر أية حزم عند بقية الأنواع المدروسة (الشكل 3-52).



الشكل 3-52: الكشف عن المورثة *FUM5* المسؤولة عن تخليق الفيومينوزينات عند بعض أنواع الفيوزاريوم على هلامية الأغاروز 1%. *F. (FT31, FT52)*، *F. oxysporum* (FH68)، *F. sporotrichioides* (FH24)، *F. (FS75, FS74)*، *F. culmorum* (FS101, FL20)، *F. proliferatum* (FT47)، *F. verticillioides*، *F. solani* (FT23)، *F. semitectum* (FT26)، *F. equiseti*

يعد النوع *F. verticillioides* منتجاً قوياً للسموم الفطرية وبشكل خاص الفيومينوزين، والذي يمكن أن يُنتج من قبل أنواع أخرى من الفيوزاريوم منها *F. proliferatum* (Leslie et al., 1992)، وفي هذه الدراسة تبين امتلاك العزلتين اللتين تعودان للنوع *F. verticillioides* للمورثة *FUM5*. وتتفق هذه النتائج مع النتائج التي حصلت عليها Alkadri (2012)، التي أشارت لامتلاك جميع العزلات المختبرة (عددها 8) من النوع *F. verticillioides* للمورثة *FUM5*، وبالتالي إمكانية إفراز سموم الفيومينوزينات عند توفر الظروف الملائمة.

كما أظهرت النتائج عدم امتلاك العزلات التابعة للنوع *F. proliferatum* لهذه المورثة بالرغم من أن العديد من الدراسات السابقة أشارت إلى قدرة النوع الأخير على إفراز الفيومينوزين بتركيز عالية، ولكن يبدو أن ذلك يختلف تبعاً للسلالة، فبعض السلالات ليس لديها القدرة على إنتاج الفيومينوزين (Leslie and Summerell, 2006). أشارت Alkadri (2012) أيضاً إلى امتلاك جميع العزلات المختبرة (5 عزلات) من النوع *F. proliferatum* لهذه المورثة، وبالتالي إمكانية إفراز الفيومينوزينات في الظروف الملائمة، كما أشار Leslie و Summerell و (2011) أن سلالات من النوعين *F. proliferatum* و *F. verticillioides* تفرز كميات مرتفعة من الفيومينوزين، ولكن هذه الكميات تعتمد على السلالة وظروف الزراعة، وهما النوعان الوحيدان من ضمن أنواع الفيوزاريوم القادران على إنتاج مرتفع من الفيومينوزين في ظروف الحقل (Summerell and Leslie, 2011). وقد ذكرت العديد من المراجع إفراز هذين النوعين للفيومينوزين عند الذرة البيضاء والصفراء (Leslie et al., 2005; Ncube et al., 2011; Boutigny et al., 2012).

في الحقيقة، يُعرف النوع *F. proliferatum* بأنه ذو مجال عائلتي واسع يتضمن الذرة والمانجو والبصل وغيرها، ويعدّ النوعان *F. proliferatum* و *F. verticillioides* من أكثر الفطريات شيوعاً على الذرة (Marin et al., 2004)، ولهذا يولى محصول الذرة الاهتمام الأكبر فيما يخص الفيومينوزينات (Summerell and Leslie, 2011). ويبدو أن العائل يلعب دوراً مهماً في قدرة أنواع الفيوزاريوم على إنتاج السموم الفطرية، فقد بيّن Marin وآخرون (2004) أن السلالات من النوع *F. proliferatum* أعطت درجة عالية من السمية على الذرة، لم تكن قادرة على إفراز الفيومينوزين على القمح والشعير تحت نفس الشروط البيئية، وقد يعود ذلك إلى أن مكونات القمح والشعير قد تثبط إنتاج الفيومينوزين، أما مكونات الذرة فتحفز إنتاجه، كما أنّ نسبة البروتين إلى الكربوهيدرات المنخفضة في الذرة مفضّلة لإنتاج الفيومينوزين (Marin et al., 2004). وعلى الرغم من تسجيل تلوث حبوب الذرة بالفيومينوزين، لكن لم يتم الكشف عن هذه السموم في القمح والشعير باستخدام الطرائق التي تعتمد على الكروماتوغرافيا في جنوب أفريقيا، كما أن تركيز الزيرالينون كان أعلى في الذرة منه في القمح (Beukes et al., 2017).

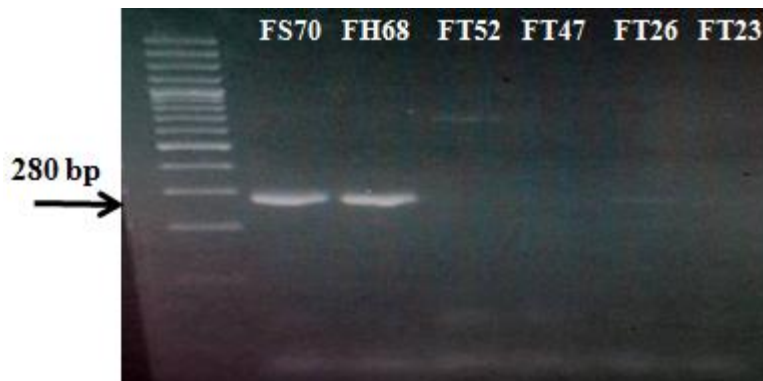
3.6.5. الكشف عن المورثة *PKS4* التي تشترك في عمليات التخليق الحيوي للزيرالينون:

أظهر تفاعل تضخيم المورثة *PKS4* الضرورية في عملية التخليق الحيوي للزيرالينون باستخدام زوج البادئات R1/F1 وجود حزمة وحيدة ذات وزن جزيئي 280 bp تقريباً عند عزلات النوع *F. culmorum* (الشكل 3-53). لقد دعمت هذه الدراسة الدراسات السابقة التي تشير إلى قدرة النوع *F. culmorum* على إفراز التريكوثيسينات والزيرالينون (D' Mello and Macdonald, 1997).

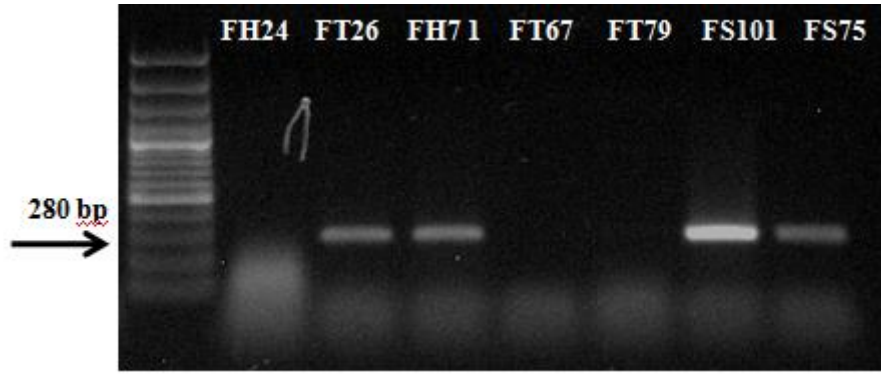


الشكل 3- 53: الكشف عن المورثة *PKS4* المسؤولة عن تخليق الزيرالينون عند بعض عزلات النوع *F. culmorum* باستخدام زوج البادئات F1/R1 على هلامة الأغاروز 1%

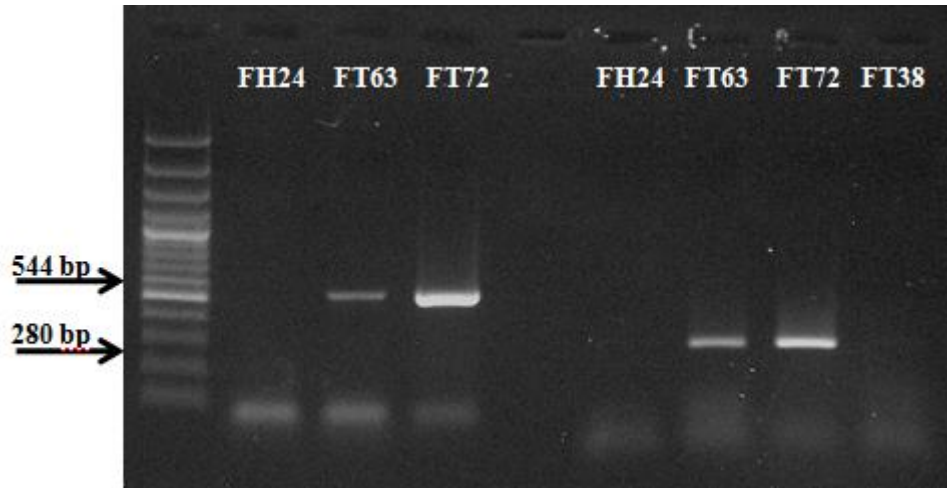
كما تبين امتلاك العزلة FH68 والتي تعود للنوع *F. oxysporum* للمورثة *PKS4*، وبالتالي إمكانية إفراز الزيرالينون عند توافر الظروف الملائمة، حيث أعطت حزمة بالوزن الجزيئي المتوقع 280 bp عند استخدام زوج البادئات F1/R1 المتخصص بالكشف عن المورثة *PKS4* التي تشترك في عمليات التخليق الحيوي للزيرالينون (الشكل 3- 54)، وقد أكدت بعض الدراسات السابقة قدرة بعض عزلات النوع *F. oxysporum* على إفراز الزيرالينون (Beek et al., 2013; Beukes et al., 2017). تبين أيضاً امتلاك العزلة FT26 التابعة للنوع *F. semitectum*، والعزلتين FH71 و FS75 التابعتين للنوع *F. equiseti* (الشكل 3- 55)، والعزلتين FT63 و FT72 التابعتين للنوع *F. pseudograminearum* (الشكل 3- 56) للمورثة *PKS4*، وبالتالي إمكانية إفراز الزيرالينون عند توافر الظروف الملائمة، وهذا يتفق مع (Leslie and Summerell, 2006)، في حين لم تظهر أية حزمة عند عزل الأنواع الأخرى بالرغم من أن بعض الدراسات أشارت إلى قدرة عزلات *F. solani* species complex على إفراز الزيرالينون (Beukes et al., 2017).



الشكل 3- 54: الكشف عن المورثة *PKS4* المسؤولة عن تخليق الزيرالينون باستخدام زوج البادئات F1/R1 على هلامة الأغاروز 1%. *F. verticillioides* (FT52)، *F. oxysporum* (FH68)، *F. culmorum* (FS70)، *F. solani* (FT23)، *F. semitectum* (FT26)، *F. proliferatum* (FT47)



الشكل 3- 55: الكشف عن المورثة *PKS4* المسؤولة عن تخليق الزيرالينون باستخدام زوج البادئات F1/R1. *F. (FT67)*, *F. equiseti* (FH71, FS75), *F. semitectum* (FT26), *F. sporotrichioides* (FH24), *F. culmorum* (FS101), *F. proliferatum* (FT79), *andiyazi*



الشكل 3- 56: الكشف عن المورثة *PKS4* المسؤولة عن تخليق الزيرالينون باستخدام زوج البادئات F1/R1 (على اليمين)، والمورثة *TRI5* المسؤولة عن تخليق التريكوثيسينات باستخدام زوج البادئات Tri5F/Tri5R (على اليسار) على هلامة الأغاروز 1% لعزلات النوع *F. pseudograminearum* (FH24), *F. sporotrichioides* (FT63,), *F. proliferatum* (FT38), *F. pseudograminearum* (FT72)

استخدم العديد من الطرائق التي تعتمد على الكروماتوغرافيا في الكشف عن الزيرالينون (Lea and Meng, 2006; Christoph, 2003; Labuda et al., 2005; Songsermsakul et al., 2006). ونظراً لكون هذه الطرائق تتطلب جهوداً كبيرة وتستغرق وقتاً طويلاً، فقد تم تطوير زوج البادئات F1/R1 من قبل Meng وآخرون (2010) للكشف عن المورثة *PKS4* التي تشترك في التخليق الحيوي لهذا السم.

تتفق النتائج التي حصلنا عليها مع نتائج دراسات أخرى بأن العديد من أنواع الفيوزاريوم مثل *F. culmorum* و *F. equiseti* و *F. semitectum* قادرة على إنتاج الزيرالينون (Glenn, 2007; Bottalico and Perrone, 2002). ويبدو أنه ليس من الضروري أن تكون كل عزلات النوع نفسه

قادرة على إنتاج السم الفطري، فقد بين Summerell و Leslie (2011) بأن الزيرالينون يفرز من قبل بعض عزلات النوعين *F. semitectum* و *F. equiseti*. وفي دراسة سابقة أجريت في إيطاليا، للتحري عن بعض السموم التي تفرزها أنواع الجنس فيوزاريوم المعزولة من حبوب قمح مصدرها سورية، تم الكشف عن الزيرالينون في جميع العزلات التابعة للنوعين *F. culmorum* و *F. pseudograminearum*، وعزلة واحدة فقط تابعة للنوع *F. equiseti* من أصل 9 عزلات، وعزلة واحدة أيضاً من أصل عزلتين تابعتين للنوع *F. semitectum* (Alkadri, 2012).

تشير بعض الدراسات إلى قدرة بعض عزلات النوع *F. oxysporum* على إفراز سموم الزيرالينون، ونوع واحد أو أكثر من سموم التريكوثيسينات، ولكن معظم السلالات لا تفرز أيّاً من التريكوثيسينات والزيرالينون، وتفتقر للمورثة *TRI5* التي تشترك في عملية التخليق الحيوي للتريكوثيسينات، كما تملك بعض السلالات القدرة على إفراز الفيومينوزينات (Glenn, 2007).

تفرز معظم أنواع الفيوزاريوم نوعاً واحداً أو أكثر من السموم الفطرية (Beukes et al., 2017)، وهذا ما أكدته هذه الدراسة (الجدول 3-7) حيث تبين امتلاك عزلات النوع *F. culmorum* و *F. pseudograminearum* للمورثتين *TRI5* و *PKS4* اللتين تشتركان في التخليق الحيوي لسموم التريكوثيسينات والزيرالينون على التوالي. ولكن الدراسات المتوفرة عن قدرة النوع *F. pseudograminearum* على إفراز السموم الفطرية محدودة، إذ تشير بعض الدراسات إلى قدرة سلالات من هذا النوع على إفراز بعض أنواع التريكوثيسينات مثل 3-deoxynivalenol، acetyldeoxynivalenol، وقدرتها أيضاً على إفراز الزيرالينون (Leslie and Summerell, 2006)، وبالمقابل أشارت دراسات أخرى إلى إفراز جميع سلالات النوع *F. pseudograminearum* للزيرالينون (Blaney and Dodman, 2002).

بسبب وجود تشابه كبير بين بعض أنواع الجنس *Fusarium* كما هي الحال في النوعين *F. sporotrichioides* و *F. tricinctum*، قد يتم تعريف بعض الأنواع بشكل خاطئ، مما يتسبب في الحصول على نتائج خاطئة أيضاً فيما يخص إنتاج تلك الأنواع للسموم الفطرية (Niessen and Vogel, 1998)، فمثلاً تم تخفيض عدد الأنواع المنتجة للسموم من قبل Marasas وآخرون (1984) من 25 إلى 11 نوعاً، حيث وجد أن العديد من الأنواع المعروفة في دراسات مرجعية سابقة، كانت مُعرّفة بشكل خاطئ (Niessen and Vogel, 1998).

إن اختلاف العزلات المتحصل في هذه الدراسة بامتلاكها لمورثات معينة، وبالتالي إمكانية إفرازها لأنواع مختلفة من السموم، واتفاقها مع بعض الدراسات واختلافها مع بعضها الآخر، يجب أن يكون موضع اهتمام، وبحاجة إلى المزيد من الدراسات اللاحقة.

الجدول 3-7: أنواع المورثات المسؤولة عن إنتاج السموم الفطرية عند أنواع الفيوزاريوم المختبرة في هذه الدراسة

نوع المورثة			نوع الفطر <i>Fusarium</i>
PKS4	FUM5	TRI5	
+	-	+	<i>F. culmorum</i>
+	-	+	<i>F. pseudograminearum</i>
+	-	-	<i>F. oxysporum</i>
+	-	-	<i>F. equiseti</i>
-	+	-	<i>F. verticillioides</i>
-	-	-	<i>F. sporotrichioides</i>
+	-	+	<i>F. semitectum</i>
-	-	-	<i>F. andiyazi</i>
-	-	-	<i>F. proliferatum</i>
-	-	-	<i>F. solani</i>
-	-	-	<i>F. flocciferum</i>
-	-	-	<i>F. brachygibbosum</i>
-	-	-	<i>F. chlamydosporum</i>

الاستنتاجات Conclusions

- أمكن في هذه الدراسة عزل وتعريف عشرين نوعاً من الجنس *Fusarium* تصيب نبات القمح في أربع محافظات سورية (طرطوس، واللاذقية، وحماه، والسويداء) هي: *F. culmorum*، *F. sambucinum*، *F. pseudograminearum*، *F. compactum*، *F. acuminatum*، *F. proliferatum*، *F. oxysporum*، *F. solani*، *F. pseudocircinatum*، *F. semitectum*، *F. torulosum*، *F. equiseti*، *F. sporotrichioides*، *F. andiyazi*، *F. verticillioides*، *F. chlamydosporum*، *F. brachygibbosum*، *F. redolens*، *F. polyphialidicum*، *F. flocciferum*.
- الانتشار الكبير للنوع *F. culmorum* مقارنة مع باقي الأنواع المسببة لمرض تعفن الجذور والنتاج في نباتات القمح في المناطق المدروسة.
- الصفات المورفولوجية غير كافية لتعريف عدد كبير من أنواع الجنس *Fusarium*، إذ إنها صعبة وتحتاج خبرة كبيرة، وتستغرق وقتاً طويلاً.
- الطرائق الجزيئية ضرورة لا يمكن الاستغناء عنها في التعريف الدقيق لبعض أنواع الجنس *Fusarium*.
- يمكن باستخدام البادئات المتخصصة لتعريف بعض عزلات الجنس *Fusarium* بشكل دقيق.
- سرعة وفعالية طريقة Multiplex PCR في تعريف العديد من أنواع الجنس *Fusarium*. وإمكانية استخدام هذه الطريقة في اختبارات البذور للكشف عن أنواع الفيوزاريوم المحمولة على البذور بسرعة دون الحاجة للتعريف المورفولوجي.
- يعطي استخدام طريقة التتابعات النوكلوتيدية تعريفاً دقيقاً لعزلات الجنس *Fusarium* وهي أكثر دقة من استخدام البادئات المتخصصة.
- إمكانية تحديد العزلات المنتجة للسموم الفطرية باستخدام البادئات المتخصصة.
- أمكن من خلال هذه الدراسة تعريف النوع *F. andiyazi*، وهذا يعد حسب معرفتنا التسجيل الأول في العالم لعزل هذا النوع من جذور نباتات قمح مصابة بعفن الجذور.
- أمكن من خلال هذه الدراسة عزل وتعريف سبعة أنواع جديدة من جنس *Fusarium* وتوصيفها بدقة وهي: *F. pseudocircinatum*، *F. torulosum*، *F. polyphialidicum*، *F. redolens*، *F. chlamydosporum*، *F. brachygibbosum* و *F. flocciferum* وتوصيفها بدقة، وهذا يُعدّ التسجيل الأول لهذه الأنواع في سورية.

المقترحات والتوصيات

- التوسع في عمليات المسح الحقلية الدقيقة لتقصي الأمراض الناجمة عن الإصابة بأنواع الجنس *Fusarium* على القمح، وبشكل خاص مرض لفحة السنبال على الرغم من انتشاره المحدود، وذلك نظراً للأخطار التي يمكن أن تنتج عن تلوث القمح ومنتجاته بالسموم الفطرية التي تفرزها أنواع هذا الجنس.
- ضرورة اعتماد التقانات الجزيئية لتأكيد التعريف المورفولوجي لبعض أنواع الجنس *Fusarium*، وخاصة الأنواع التي تنتمي إلى المعقد *G. fujikuroi*، حيث يمكن أن يقود اعتماد التعريف المورفولوجي لوحده إلى نتائج خاطئة.
- تصميم بادئات متخصصة لتعريف أنواع الجنس *Fusarium* خاصة بالسلالات السورية لكون استخدام هذه الطريقة أقل تكلفة من استخدام طريقة التتابعات النوكليةوتيدية.
- تطوير تقانة الـ Multiplex PCR وإدخال بعض البادئات المستخدمة في الكشف عن السموم الفطرية في التفاعل للكشف عن أنواع الفيوزاريوم المتواجدة، والسموم التي تفرزها في آن واحد.
- ضرورة قيام الهيئات الرسمية بتحديد الحد الأقصى المسموح به من السموم الفطرية التي تنتجها أنواع الفيوزاريوم في الأغذية والاعلاف.

المراجع العربية

1. الخليفة محمد، أحمد الأحمد، محمد موفق يبرق وميلودي نشيط. 2006. تباين الخصائص المزرعية والمورفولوجية لأنواع من *Fusarium spp.* المسببة لمرض تعفن الجذور الشائع على القمح في سورية. مجلة وقاية النبات العربية. 24: 67-74.
2. الشعبي صلاح، صفية المصري، عدنان النحلاوي ولينا مطرود. 2015. مسببات تعفن الجذور والتاج على القمح في سورية، وقدرتها الإراضية، وأداء بعض أصناف القمح وطرزه البرية إزاء المرض. مجلة وقاية النبات العربية. 33(2): 116-129.
3. الشعبي صلاح، صفية المصري، عدنان نحلاوي، لينا مطرود وتيسير أبو الفضل. 2018. تقصي انتشار مرض لفحة فيوزاريوم سنابل القمح ومسبباته في سهل الغاب في سورية، والتباين في قدراتها الإراضية. مجلة وقاية النبات العربية، 36(2): 98-113.
4. العظم مازن. 2007. دراسة التباين الوراثي لفيزاريوم سنابل القمح باستخدام الواسمات الجزيئية. أطروحة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة دمشق، 72 صفحة.
5. المجموعة الإحصائية الزراعية السنوية. 2018. وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي، مديرية التخطيط والتعاون الدولي، دمشق، سورية.
6. النائب رنا، عمر يحيوي، أحمد الأحمد وميلودي نشيط. 2002. مسح حقلي لمرض تعفن الجذور الشائع على القمح والشعير في محافظتي حلب وإدلب (شمال سورية). مجلة وقاية النبات العربية. 20: 131-136.
7. خليفة محمد حمود وعدي نجم اسماعيل مطني. 2013. تقييم إراضية عزلات مختلفة للفطر *Fusarium spp.* المسبب لمرض تعفن التاج في القمح. مجلة العلوم الزراعية العراقية. 44(4): 480-489.
8. ديب، طارق علي وفاتن سوسي. 2004. تطوّر استهلاك القمح في الجمهورية العربية السورية. مجلة جامعة دمشق للعلوم البيولوجية. المجلد 20، العدد الأول، 191-213.
9. سعد الدين، أحمد وباسمة عطية. 2009. تحليل الإنتاج الزراعي لمحاصيل مختارة: قمح، قطن، شعير. الجمهورية العربية السورية، المركز الوطني للسياسات الزراعية NAPC، ورقة عمل رقم 44.
10. مطني، عدي نجم اسماعيل. 2014. السموم الفطرية، النظرية والمفهوم العام. كلية الزراعة، جامعة بغداد، 285 صفحة.

11. وهبة، ناهد محمد ونيفين عبد الغني النسر. 2010. السموم الفطرية في الألبان ومنتجاتها، الخطر والوقاية. مجلة أسبوط للدراسات البيئية. العدد الرابع والثلاثون.

المراجع الأجنبية

A

- Abedi-Tizaki, M. and Sabbagh, S.K. 2012. Morphological and molecular identification of *Fusarium* head blight isolates from wheat in north of Iran. AJCS. 6(9):1356-1361.
- Abdel-Latif, A. and Osman, G. 2017. Comparison of three genomic DNA extraction methods to obtain high DNA quality from maize. Plant Methods. 13:1–9.
- Agrios, G.N. 2005. Plant Pathology. 5th ed. Academic Press, San Diego. pp. 922.
- Alkadri, D. 2012. *Fusarium* Species Responsible for Mycotoxin Production in Wheat Crop: Involvement in Food Safety. PhD. Dissertation, University of Bologna, Bologna, Italy.
- Alkadri, D., Nipoti, P., Döll, K., Karlovsky, P., Prodi, A. and Pisi, A. 2013. Study of fungal colonization of wheat kernels in Syria with a focus on *Fusarium* species. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 5938-5951; doi:10.3390/ijms14035938.
- Aoki, T. and O'Donnell, K. 1999. Morphological and molecular characterization of *Fusarium pseudograminearum* sp.nov., formerly recognized as the Group 1 population of *F. graminearum*. *Mycologia*. 91: 597–609.
- Atabaki, N., Rahjoo, V., Hanafi, M.M., Abiri, R., Zadeh, H.Z., Zamani, M., Sahebi, M., Valdiani, A. 2018. Morpho-molecular identification, pathogenicity variation, mating biology, and fumonisin production of *Fusarium* species in *Zea Mays* L. *Int. J. Phytopathol.* 07 (01) : 31-50.
- Atoui, A., El Khoury, A., Kallassy, M. and Lebrihi, A. 2011. Quantification of *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* by real-time PCR system

and zearalenone assessment in maize. *International Journal of Food Microbiology*. vol. 154 . 59-65. ISSN 0168-1605.

Ausubel, F. 1994. Preparation of plant DNA using CTAB. *Curr Protocols Molec Biol. Suppl.* 27: 2.3-2.3.7.

B

Backhouse, D., Abubakar, A.A., Burgess, L.W., Dennis, L., Hollaway, G.J. Wildermuth, G.B., Wallwork, H. and Henry. F.J. 2004. Survey of *Fusarium* species associated with crown rot of wheat and barley in eastern Australia. Australas. *Plant Pathol.*33:255-261.

Beev, G., Denev, S. and Bakalova, D. 2013. Zearalenone - Producing Activity of *Fusarium graminearum* and *Fusarium oxysporum* isolated from Bulgarian Wheat. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 19(2):255-259.

Bennett, J.W. and Klich, M. 2003. Mycotoxins. *Clin. Microbio. Rev.*16:497- 516.

Bentley, R., Tunali, B., Leslie, F., Nicol, J., Burgess, W. and Summerell, A. 2006. A survey of *Fusarium* species associated with wheat and grass stem bases in northern Turkey. *Sydowia*. 58: 136–177.

Besharati, M. F., A. Mohammadi and M. Darvishnia. 2017. *Fusarium* species associated with wheat crown and root tissues in the Eastern Iran, *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, DOI: 10.1080/03235408.2016.127542.

Beukes, I., Rose, L.J., Shephard, G.S., Flett, B.C. and Viljoen, A. 2017. Mycotoxigenic *Fusarium* species associated with grain crops in South Africa – A review. *South African Journal of Science*, 113 (number 3/4).

Blaney B., Dodman R. 2002. Production of zearalenone, deoxynivalenol, nivalenol, and acetylated derivatives by Australian isolates of *Fusarium graminearum* and *F. pseudograminearum* in relation to source and culturing conditions. *Australian Journal of Agricultural Research*. 53:317-1326.

- Bluhm, B.H., Cousin, M.A. and Woloshuk, C.P. 2004. Multiplex real-time PCR detection of fumonisin producing and trichothecene-producing groups of *Fusarium* species. *J Food Prot.* 67:536–543.
- Bluhm, B.H., Flaherty, J.E., Cousin, M.A. and Woloshuk, C.P. 2002. Multiplex polymerase chain reaction assay for the differential detection of trichothecene- and fumonisin-producing species of *Fusarium* in cornmeal. *J Food Prot.* 65:1955–1961.
- Bosch, U. and Mirocha, C.J. 1992. Toxin production by *Fusarium* species from sugar-beets and natural occurrence of zearalenone in beets and beet fibers. *Appl. Environ. Microb.* 58: 3233–3239.
- Bottalico, A., Perrone, G. 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *European Journal of Plant Pathology.* 108: 611-624.
- Boutigny, A-L., Beukes, I., Small, I., Zuhlke, S., Spiteller, M., Janse Van Rensburg, B., *et al.* 2012. Quantitative detection of *Fusarium* pathogens and their mycotoxins in South African maize. *Plant Pathol.* 61(3):522–531. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02544>
- Burgess, L.W., Summerell, B.A., Bullock, S., Gott, K.P. and Backhouse, D. 1994. Laboratory Manual for *Fusarium* Research; University of Sydney: Sydney, Australia. 132 p.

C

- Cao, S., Yang, N., Zhao, C., Liu, J., Han, C. and Wu, X. 2018. Diversity of *Fusarium* species associated with root rot of sugar beet in China. *Journal of General Plant Pathology* 1-9. <https://doi.org/10.1007/s10327-018-0792-5>.
- Chandler, E.A., Simpson, D.R., Thoms, M.A. and Nicholson, T.P. 2003. Development of PCR assays to Tri7 and Tri13 trichothecene biosynthetic genes, and characterization of chemotypes of *Fusarium graminearum*,

Fusarium culmorum and *Fusarium cerealis*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 62: 355–367 .

Charmet, G. 2011. Wheat domestication: Lessons for the future. *C. R. Biologies* 334: 212–220.

Chehri, K., Salleh, B., Yli-Mattila, T., Soleimani, M.J. and Yousefi, A.R. 2010. Occurrence, Pathogenicity and Distribution of *Fusarium* spp. in Stored Wheat Seeds Kermanshah Province, Iran. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 13: 1178-1186.

D

Darvishnia, M. 2013. Morphological and phylogenetic studies of *Fusarium* species in Iran. *Journal of Novel Applied Sciences*. 2 (S4): 1134-1142.

Dean, R., van Kan, J.A.L., Pretorius, Z.A., Hammond-Kosack, K.E., Di Pietro, A., Spanu, P.D., Rudd, J.J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J. and Foster, G.D. 2012. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 13:414-430.

Demeke, T., Clear, R.M., Patrick, S.K, Gaba, D. 2005. Species specific PCR-based assays for the detection of *Fusarium* species and a comparison with the whole seed agar plate method and trichothecene analysis. *Int J Food Microbiol.* 103: 271–284.

Demirci, E., and Dane, E. 2003. Identification and pathogenicity of *Fusarium* spp. from stem bases of winter wheat in Erzurum, Turkey. *Phytoparasitica* 31:170-173.

Desjardins, A. E., Hohn, T. M. and McCormick, S. P. 1993. Trichothecene biosynthesis in *Fusarium* species: chemistry, genetics, and significance. *Microbiol Rev.* 57(3): 595– 604.

Desjardins, A.E. and Proctor, R.H. 2007. Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins. *International Journal of Food Microbiology*. 119 . 47–50.

- Djurkin-Kušec, I., Radišić, Ž., Komlenić, M. and Kušec, G. 2015. Comparison of commercial DNA kits and traditional DNA extraction procedure in PCR detection of pork in dry/fermented sausages. *Poljoprivreda/Agriculture*. <http://dx.doi.org/10.18047/poljo.21.1.sup.47>
- Doohan, F.M., Weston, G., Rezanoor, H.N., Parry, D.W. and Nicholson, P. 1999. Development and use of a reverse transcription-PCR Assay to study expression of Tri5 by *Fusarium* Species in vitro and in planta. *Appl Environ Microbiol.* 65:3850–3854.
- Doohan, F.M. 2003. Studies on *in vitro* growth and pathogenicity of *Fusarium* fungi. *European Journal of Plant Pathology*. 109: 577–587.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull.* 19: 11-15.
- Dyer, A., Johnston, R., Hogg, A. and Johnston, J. 2009. Comparison of pathogenicity of the *Fusarium* crown rot (FCR) complex (*F. culmorum*, *F. pseudograminearum* and *F. graminearum*) on hard red spring and durum wheat. *Eur. J. Plant Pathol.* 125:387-395.
- D'Mello J.P.F. and Macdonald A.M.C. 1997. Mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology*. 69: 155–166.

E

- El-Khalifeh, M., El-Ahmed, A., Al-Saleh, A. and MiloudiNacht, M. 2009. Use of AFLPs to differentiate between *Fusarium* species causing root rot disease on durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. *durum*). *African Journal of Biotechnology*. 8 (18): 4347-4352.

F

- Fernandez, M. R., and Chen, Y. 2005. Pathogenicity of *Fusarium* species on different plant parts of spring wheat under controlled conditions. *Plant Dis.* 89:164-169.

- Fernandez, M.R., Basnyat, P. and Zenter, R.R. 2007. Response of wheat root pathogens to crop management in eastern Saskatchewan. *Can. J. Plant Sci.* 87:953-963.
- Ferrigo, D., Raiola, A. and Causin, R. 2016. *Fusarium* toxins in cereals: occurrence, legislation, factors promoting the appearance and their management. *Molecules* 21, 627; doi:10.3390/molecules21050627.
- Fink-Gremmels, J. 2008. The impact of mycotoxins in animal feeds. In Leslie, J. F., Bandyopadhyay, R. and Visconti, A. (eds) *Mycotoxins: detection methods, management, public health and agricultural trade*, pp. 155-167. Wallingford, Cabi.
- Foroud, N.A. and Eudes, F. 2009. "Trichothecenes in Cereal Grains. *International Journal of Molecular Sciences*. 10 (1): 147-173. doi:10.3390/ijms10010147.
- Francis, R. G. and Burgess, L.W. 1977. Characteristics of two populations of *Fusarium roseum* 'Graminearum' in eastern Australia. *Transactions of the British Mycological Society*. 68: 421-427.
- Fredlund, E., Gidlund, A., Olsen, M., Börjesson, T., Spliid, N.H.H. and Simonsson, M. 2008. Method evaluation of *Fusarium* DNA extraction from mycelia and wheat for down-stream real-time PCR quantification and correlation to mycotoxin levels. *Journal of Microbiological Methods*. doi:10.1016/j.mimet.2008.01.007.

G

- Gargouri-Kammoun, L., Gargouri, S., Rezgui, S., Trifi, M., Bahri, N. and Hajlaoui, M.R. 2009. Pathogenicity and aggressiveness of *Fusarium* and *Microdochium* on wheat seedlings under controlled conditions. *Tunisian Journal of Plant Protection*. 4: 135-144.
- Gashgari, R., Gherbawy, Y., Ameen, F. and Alsharari, S. 2016. Molecular characterization and analysis of antimicrobial activity of endophytic fungi

- from medicinal plants in Saudi Arabia. *Jundishapur Journal of Microbiology* 9(1): e26157. DOI: 10.5812/jjm.26157.
- Gebremariam, E. S., Sharma-Poudyal, D., Paulitz, T. C., Erginbas-Orakci, G., Karakaya, A. and Dababat, A. A. 2017. Identity and pathogenicity of *Fusarium* species associated with crown rot on wheat (*Triticum* spp.) in Turkey. *Eur J Plant Pathol*. DOI 10.1007/s10658-017-1285-7.
- Geiser, D., Jimenez-Gasco, M., Kang, S., Mkalowska, Veeraraghavan, N., Ward, T., Zhang, N., Kulda, A. and O'Donnell, K. 2004. FUSARIUM-ID v.1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology*. 110: 473-479.
- Geiser, D.M., Aoki, T., Bacon, C.W, Baker, S.E., Bhattacharyya, M.K, *et al.* 2013. One fungus, one name: defining the genus *Fusarium* in a scientifically robust way that preserves longstanding use. *Phytopathology*. 103:400–408.
- Gilbert, J., Tekauz, A., Kaethler, R., Slusarenko, K., Hamilton, J., Unrau, T., Mueller, E., Stulzer, M. and Beyene, M. 2008. Survey of *Fusarium* head blight of spring wheat in Manitoba. *Canadian Plant Disease survey*. 88: 85-86.
- Glenn, A.E. 2007. Mycotoxigenic *Fusarium* species in animal feed. *Anim. Feed Sci. Technol.* 137, 213–240.
- Goswami, R.S. and Kistler, H.C. 2004. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Mol. Plant Pathol.* 5:515-525.
- Graham, G. C., Mayers, P. and Henry, R. J. 1994. A simplified methods for the preparation of fungal genomic DNA for PCR and RAPD analysis. *Biotechniques*. 16: 48 – 50

H

- Haggag, W.M. 2013. Wheat Diseases in Egypt and its management. *Journal of Applied Sciences Research*. 9(1): 46-50.
- Helal, R. B., Hosen, S. and Shamsi, S. 2018. Mycoflora associated with post-harvest disease of papaya (*Carica papaya* L.) and their pathogenic

potentiality. *Bangladesh Journal of Botany*, 47(3), 389–395.
doi:10.3329/bjb.v47i3.38656

Hestbjerg, H., Felding, G., Elmholt, S. 2002. *Fusarium culmorum* infection of barley seedlings: correlation between aggressiveness and deoxynivalenol content. *Journal of Phytopathology*.150: 308–312.

Hoffman, C.S. and Winston, F.A. 1987. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*. 57: 267 – 272.

Hsuan, H.M., Salleh, B. and Zakaria, L.2011.Molecular Identification of *Fusarium* Species in *Gibberella fujikuroi* Species Complex from Rice, Sugarcane and Maize from Peninsular Malaysia. *Int. J. Mol. Sci.*, 12, 6722-6732; doi:10.3390/ijms12106722.

I

Imathiu, S.M., Hare, M.C., Ray, R.V., Back, M. and Edwards, S.G. 2010. Evaluation of pathogenicity and aggressiveness of *F. langsethiae* on oat and wheat seedlings relative to known seedling blight pathogens. *European Journal of Plant Pathology*. 126, 203–216.

Ismail, M.A., Abdel-Hafez, S.I.I., Hussein, N.A. and Abdel-Hameed, N.A. 2015. Contributions to the genus *Fusarium* in Egypt. First Edition. Tmkarpiński publisher, Suchy Las, Poland.

J

Joffe, A.Z. 1974. A Modern system of *Fusarium* taxonomy. *Mycopathologia et Mycologia applicata*, vol, 53: 201-228.

Joffe, A. Z. and Palti, J. 1975. Taxonomic study of Fusaria of the Sporotrichiella section used in recent toxicological work. *Appl. Microbiol.* 29, 575-579.

Jonker, M.A. and Stephany, R.W. 1999. *Mycotoxins in food of animal origin*. CRL document 389002 095, CRL-European Union Community Reference Laboratory on residues.

Jurado, M., Vazquez, C., Marín, S., Sanchis, V. and Gonzalez Jaen, M.T. 2006. PCR-based strategy to detect contamination with mycotoxigenic *Fusarium* species in maize. *Systematic and Applied Microbiology*. 29 :681–689.

K

Kikot, G.E., Moschini, R., Consolo, V.F., Rojo, R., Salerno, M.G., Hours, R.A., Gasoni, L., Arambarri, A.M. and Alconada, T.M. 2009. Occurrence of different species of *Fusarium* from wheat in relation to disease levels predicted by a weather-based model in Argentina Pampas region. *Mycopathologia*. DOI 10.1007/s11046-010-9335-0.

Konietzny, U. and Greiner, R. 2003. The application of PCR in the detection of mycotoxigenic fungi in food. *Brazilian Journal of Microbiology*. 34: 283-300.

Kuzdraliński, A., Nowak, M., Szczerba, H., Dudziak, K., Muszyńska, M., Leśniowska-Nowak, J. 2017. The composition of *Fusarium* species in wheat husks and grains in south-eastern Poland. *Journal of Integrative Agriculture*. 16(7): 1530- 1536.

L

Labuda, R., Parich, A., Berthiller, F. and Tancinová, D. 2005. Incidence of trichothecenes and zearalenone in poultry feed mixtures from Slovakia. *International Journal of Food Microbiology*. 105: 19–25.

Lea, P. and Christoph, V. H. 2003. Determination of zearalenone from wheat and corn by pressurized liquid extraction and liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 993: 39–45.

Lee, J. T., Bae, D. W., Park, S. H., Shin, C. K., Kwak, Y. S. and Kim, H. K. 2001. Occurrence and biological control of postharvest decay in onion caused by fungi. *Plant Pathology J*. 17:141-148.

Leslie, J. F., Doe, F. J., Plattner, R. D., Shackelford, D. D. and Jonz, J. 1992. Fumonisin B1 production and vegetative compatibility of strains from

- Gibberella fujikuroi* mating population A (*Fusarium moniliforme*). *Mycopathologia* 117: 37-45.
- Leslie, J.F. and Summerell, B.A. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell., Oxford. 388 p.
- Leslie, J.F, Zeller, K.A, Lamprecht, S.C, Rheeder, J.P, Marasas, W.F.O .2005. Toxicity, pathogenicity and genetic differentiation of five species of *Fusarium* from sorghum and millet. *Phytopathology*, 95:275–283.
- Lev-Yadun, S., Gopher, A. and Abbo, S. 2000. The cradle of agriculture. *Science*. 288: 1602-1603.
- Liddell, C.1991. Recent Advances in *Fusarium* Systematics. *Phytopathology*. 81: 1044-1045.
- Logrieco, A. and Moretti, A. 2008. Between emerging and historical problems: An overview of the main toxigenic fungi and mycotoxin concerns in Europe. In Leslie, J.F., Bandyopadhyay, R. and Visconti, A.(eds) *Mycotoxins: Detection methods, management, public health and agricultural trade*, pp. 139-153. Wallingford, Cabi.

M

- Madania, A., Altawil, M., Naffaa, W., Volker, P.H. and Hawat, M. 2013. Morphological and molecular characterization of *Fusarium* isolated from maize in Syria. *J Phytopathol*. 161: 452–458.
- Marasas, W. F. O., Nelson, P. E., Toussoun, T. A. 1984. *Toxigenic Fusarium Species - Identity and Mycotoxicology*. The Pennsylvania State University Press, University Park, Pennsylvania, USA, 328 pp.
- Marasas, W.F.O., Gelderblom, W.C.A., Shephard, G.S. and Vismer, H. F. 2008. Mycotoxins: A global problem. In Leslie, J. F., Bandyopadhyay, R. & Visconti, A. (eds) *Mycotoxins: Detection methods, management, public health and agricultural trade*, pp. 29-39. Wallingford, Cabi.

- Marasas, W. F. O., Rheeder, J. P., Lamprecht, S. C., Zeller, K. A. and Leslie, J. F. 2001. *Fusarium andiyazi* sp. nov., a new species from sorghum. *Mycologia*, 93: 1203–1210.
- Marin, S., Magan, N., Ramos, A.J. and Sanchis, V. 2004. Fumonisin-Producing Strains of *Fusarium*: A Review of Their Ecophysiology. *Journal of Food Protection*, Vol. 67, No. 8, Pages 1792–1805
- Martinez-Espinoza, A., Ethredge, R., Youmans, J., Vermeer, B. and Buck, J. 2015. Identification and control of *Fusarium* head blight (Scab) of wheat in Georgia. *UGA Extension Circular*1066.
- Matny , O. 2015. *Fusarium* head blight and crown rot on wheat & barley: Losses and health risks. *European Journal of Botany, Plant Sciences and Phytology*. Vol.2, No.3: 27-35.
- McCormick, S.P., Stanley, A.M., Stover, N.A. and Alexander, N.J. 2011. Trichothecenes: From Simple to Complex Mycotoxins. *Toxins*.3: 802-814; doi:10.3390/toxins3070802.
- McMullen, M., Jones, R. and Gallenberg, D. 1997. Scab of wheat and barley: a re-emerging disease of devastating impact. *Plant Disease*. 81: 1340–1348.
- Meng, K., Wang, Y., Yang, P., Luo, H., Bai, Y., Shi, P., Yuan, T., Ma, R. and Yao, B. 2010. Rapid detection and quantification of zearalenone - producing *Fusarium* species by targeting the zearalenone synthase gene PKS4. *Food Control*. 21: 207 – 211.
- Mills, K., Salgado, J.D. and Pierce A.P.2014. *Fusarium* Head Blight or Head Scab of Wheat, Barley and other Small Grain Crops. College of Food, Agricultural, and Environmental Sciences/Department of Plant Pathology. The Ohio State University. <http://www.oardc.ohiostate.edu/ohiofieldcropdis ease>.
- Mitter, V., Zhang, M.C., Liu, C.J., Ghosh, R., Ghosh, M. and Chakraborty, S. 2006. A high-throughput glasshouse bioassay to detect crown rot resistance in wheat germplasm. *Plant Pathol*. 55: 433-41.

- Mořková, P. and Vyřasová, J. 2011. Comparison of methods for isolating fungal DNA. *Czech J. Food Sci.* 29 (Special Issue): 76–85.
- Mulé, G., Susca, A., Stea, G. and Moretti, A. 2004. A species-specific PCR assay based on the calmodulin partial gene for identification of *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. subglutinans*. *European Journal of Plant Pathology* 110: 495-502.
- Murray, M. G. and Thompson, W. F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* 8: 4321-4325. (7).
- Murray, G. and Brennan, J. 2009. Estimating disease losses to the Australian wheat industry. *Australas Plant Pathol.* 38:558-570.

N

- Ncube, E., Flett, B.C., Waalwijk, C., Viljoen, A. 2011. *Fusarium* spp. and levels of fumonisins in maize produced by subsistence farmers in South Africa. *S Afr J Sci.* 107(1/2), Art. #367, 7 pages. <http://dx.doi.org/10.4102/sajs.v107i1/2.367>.
- Nelson, P., Toussoun, T. and Marasas, W. 1983. *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. Pennsylvania State University Press, University Park, PA. 193 P.
- Nelson, P.E. 1991. History of *Fusarium* Systematics. The American Phytopathological Society. Vol.81, No.9, 1045-1048.
- Nelson, P.E., Dignani, M.C. and Anaissie, E. J. 1994. Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clinical Microbiology Reviews*, 7 (4): 479-504.
- Nicholson, P., Simpson, D.R., Weston, G., Rezanoor, H.N., Lees, A.K., Parry, D.W., and Joyce, D. 1998. Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in cereal using PCR assays. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 53: 17-38.

- Nicol, J. M., Rivoal, R., Trethowan, R. M., Van Ginkel, M., Mergoum, M. and Singh, R. P. 2001. CIMMYT's approach to identify and use resistance to nematodes and soil-borne fungi, in developing superior wheat germplasm. In: Bedo, Z & Lang, L. (Eds.), *Wheat in a global environment*. Proceedings of the 6th International Wheat Conference, 5- 9th June 2000, Budapest, Hungary.
- Niessen, M.L. and Vogel F.F. 1998. Group specific PCR-detection of potential trichothecene-producing *Fusarium*-species in pure cultures and cereal samples. *Syst. Appl. Microbiol.* 21:618–631.
- Nirenberg, H. I. 1995. Morphological differentiation of *Fusarium sambucinum* Fückel *sensu stricto*, *F. torulosum* (Berk. & Curt.) Nirenberg *comb. nov.*, and *F. venenatum* Nirenberg *sp. nov.* *Mycopathologia* 129: 131-141.

O

- Obanor, F., Neate, S., Simpfendorfer, S., Sabburg, R., Wilson, P. and Chakraborty, S. 2013. *Fusarium graminearum* and *Fusarium pseudograminearum*. *Plant Pathology* . 62: 79–91.
- O'Donnell, K., Kistler, H.C., Cigelnik, E. and Ploetz, R.C. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:2044–2049.

P

- Pancaldi, D., Tonti, S., Prodi, A., Salomoni, D., Dal Pra, M., Nipoti, P., Alberti, I. and Pisi, A. 2010. Survey of the main causal agents of *Fusarium* head blight of durum wheat around Bologna, northern Italy. *Phytopathol. Mediterr.* 49: 258–266.
- Pascale, M. and Visconti, A. 2008. Overview of detection methods for mycotoxins. In: Leslie, J. F., Bandyopadhyay, R., Visconti, A. Eds., *Mycotoxins Detection Methods, Management, Public Health and Agricultural*. CAB International, UK, pp 171- 183.

- Paulitz, T. C., Smiley, R. W., & Cook, R. J. (2002). Insights into the prevalence and management of soilborne cereal pathogens under direct seeding in the Pacific Northwest, USA. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 24, 416–428.
- Peraica, M., Radic, B., Lucic, A. and Pavlovic, M.1999. Toxic effects of mycotoxins to humans. *Bull World Health Organ* .77(9):754- 66.
- Popovski, S. and Clear, F.A. 2013. The impact of environmental factors on the infection of cereals with *Fusarium* species and mycotoxin production – A review.*Acta agriculturae Slovenica*, 101 (1): 105 - 116.
- Purss, G.S. 1971. Pathogenic specialization in *Fusarium graminearum*. *Australian Journal of Agricultural Research*. 22: 553-561.

R

- Raeder, U. and Broda, P. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Lett. Appl. Microbiol.* (1): 17-20.
- Rahjoo, V., Zad, J., Javan-Nikkhah, M., MirzadiGohari, A., Okhovvat, S.M., Bihamta, M.R., Razzaghian, J. and Klemsdal, S.S. 2008. Morphological and molecular identification of *Fusarium* isolated from maize ears in Iran *Journal of Plant Pathology*. 90 (3): 463-468.
- Rotter, B.A., Prelusky, D.B. and Pestka. J.J. 1996. "Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin)." *Journal of Toxicology and Environmental Health* 48 (1):1-34:doi:10.1080/713851046.

S

- Sadhasivam, S., Britzi, M., Zakin, V., et al. 2017. Rapid Detection and Identification of Mycotoxigenic Fungi and Mycotoxins in Stored Wheat Grain. *Toxins (Basel)*. 9(10):302. Published 2017 Sep 25. doi:10.3390/toxins 9100302
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring. Harbor Laboratory Press.
- Sampietro, D. A., Marín, P., Iglesias, J., Presello, D. A., Vattuone, M. A., Catalan, C. A. N. and Jaen, M. G. 2010. A molecular based strategy for

- rapid diagnosis of toxigenic *Fusarium* species associated to cereal grains from Argentina. *Fungal Biology*, 114: 74–81.
- Sandoval-Denis, M., Swart, W.J. and Crous, P.W. 2018. New *Fusarium* species from the Kruger National Park, South Africa. *Myco Keys* 34: 63–92. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.34.25974>.
- Sanoubar, R., Bauer, A. and Seigner, L. 2015. Detection, Identification and Quantification of *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* in Wheat Kernels by PCR Techniques. *J Plant Pathol Microb.* 6: 287. doi:10.4172/2157-7471.1000287.
- Sardar, S.A. and Ismael, H. 2017. Enhancing Resistance to *Fusarium graminearum* in Danish and Iraqi Local Winter Wheat Varieties under Greenhouse Conditions. *Int. J. Curr. Res. Biosci. Plant Biol.* 4(2): 16-25 .
- Scherm, B., Balmas, V., Spanu, F., Pani, G., Delogu, G., Pasquali, M. and Migheli, Q. 2013. *Fusarium culmorum*: causal agent of foot and root rot and head blight on wheat. *Molecular Plant Pathology*. 14(4): 323–341.
- Schilling, A.G., Moller, M.E., Geiger, H.H. 1996. Polymerase chain reaction-based assays for species specific detection of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum* and *F. avenaceum*. *Phytopathology*: 86:515–522.
- Shan, L.Y., Cui, W.Y., Zhang, D.D., Zhang, J. Ma. NN., Bao, Y.M., Dai, X.F. and Guo, W. 2017. First report of *Fusarium brachygibbosum* causing maize stalk rot in China. *Plant Disease* 101(5): 837. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-16-1465-PDN>
- Shi, W.; Tan, Y.; Wang, S.; Gardiner, D.M.; De Saeger, S.; Liao, Y.; Wang, C.; Fan, Y.; Wang, Z.; Wu, A. 2017. Mycotoxigenic Potentials of *Fusarium* Species in Various Culture Matrices Revealed by Mycotoxin Profiling. *Toxins*, 9, 6.
- Šišić, A., Baćanović-Šišić, J., Schmidt, H. and Finckh, M. R. 2019. First Report of *Fusarium flocciferum* Causing Root Rot of Pea (*Pisum sativum*) and

Faba Bean (*Vicia faba*) in Germany. DO - 10.1094/PDIS-06-19-1302-PDN. JO - Plant Disease ER.

- Smiley, R.W. and Patterson, L.M. 1996. Pathogenic fungi associated with *Fusarium* foot rot of winter wheat in the semiarid Pacific Northwest. *Plant Disease*. 80: 944-949.
- Smiley, R.W., Gourlie, J. A. Easley, S. A. and Patterson, L.M. 2005. pathogenicity of fungi associated with the wheat crown rot complex in oregon and washington. *plant disease*, 89: 949-957. 48.
- Smith, G.L., Sansone, C. and Socranksy, S.S. 1989. Comparison of two methods for the small-scale extraction of DNA from subgingivalmicro-organisms. *Oral Microbiol.* 4: 135- 140.
- Songsermsakul, P., Sontag, G., Cichna-Markl, M., Zentek, J. and Razzazi, E. 2006. Determination of zearalenone and its metabolites in urine, plasma and faeces of horses by HPLC–APCI–MS. *Journal of Chromatography B*. 843: 252–261.
- Spanic, V., Lemmens, M. and Drezner,G. 2010. Morphological and molecular identification of *Fusarium* species associated with head blight on wheat in East Croatia. *Eur J Plant Pathol* .128:511–516.
- Stack, A.J., Yaghmour, M.A., Kirkpatrick, S.C., Gordon, T.R. and Bostock, R.M. 2017. First report of *Fusarium brachygibbosum* causing cankers in cold-stored, bare-root propagated almond trees in California. *Plant Disease*, 101(2): 390-390. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-16-0929-PDN>.
- Stewart, C.N. and Via, L.E. 1993. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications. *Biotechniques*. 14: 748 – 750.
- Strausbaugh, A.C., Overturf, K. and Koehn, C.A. 2005. Pathogenicity and real-time PCR detection of *Fusarium* spp. in wheat and barley roots. *Can. J. Plant Pathol.* 27: 430-438.

- Summerell, B.A., Salleh, B. and Leslie, J.F. 2003. A utilitarian approach to *Fusarium* identification. *Plant Disease* 87: 117-128.
- Summerell, B.A. and Leslie, J.F. 2011. Fifty years of *Fusarium*: how could nine species have ever been enough? *Fungal Diversity*. 50(1) :135-144.
- Sweeney, M.J. and Dobson A.D.W.1998. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium*, and *Penicillium* species. *Int. J. Food Microbiol.*43:141-158.

T

- Tamura, M., Mochizuki, M., Nagatomi, Y., Harayama, K., Toriba, A. and Hayakawa, k.2015.A Method for Simultaneous Determination of 20 *Fusarium* Toxins in Cereals by High-Resolution Liquid Chromatography-Orbitrap Mass Spectrometry with a Pentafluorophenyl Column. *Toxins*. 7: 1664-1682; doi:10.3390/toxins7051664.
- Tan, D.C., Flematti, G.R., Ghisalberti, E.L., Sivasithamparam, K., Chakraborty, S., Obanor, F. and Barbetti, M.J. 2011. Mycotoxins produced by *Fusarium* species associated with annual legume pastures and ‘sheep feed refusal disorders’ in Western Australia. *Mycotoxin research* 27(2):123-135. doi: 10.1007/s12550-010-0085-0
- Thrane, U., Adler, A., Clasen, P.E., Galvano, F., Langseth, W., Logrieco, A., Nielsen, K.F. and Ritieni, A. 2004. Diversity in metabolite production by *Fusarium langsethiae*, *Fusarium poae*, and *Fusarium sporotrichioides*. *Int. J. Food Microbiol.* 95, 257–266.
- Trabelsi, R., Sellami, H., Gharbi, Y., Krid, S., Cheffi, M., Kammoun, S., Dammak, M., Mseddi, A., Gdoura, R. and Ali, T.M. 2017. Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp. associated with olive trees dieback in Tunisia. *Biotech*, 7:28. doi.org/10.1007/s13205-016-0587-3.
- Trail, F. 2009. For blighted waves of grain: *Fusarium graminearum* in the postgenomics era. *Plant Physiology*.149: 103-110.
- Tripathy, S.K., Maharana, M., Ithape, M., Lenka, D., Dayanidhi, M., Prusti, A., Digbijaya, S., Mohanty, M.R. and ReshmiRaj, K.R. 2017. Exploring Rapid

and Efficient Protocol for Isolation of Fungal DNA. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 6(3): 951-960.

Tunali, B., Nicol, J. M., Erol, F. Y., and Altıparmak, G. 2006. Pathogenicity of Turkish crown and head scab isolates on stem bases on winter wheat under greenhouse conditions. *J. Plant Pathol.* 5:143-149.

U

Ünal, F., Dolar, F. S., Tekiner, N., Yeğin, N. Z. 2017. Molecular Identification, Virulence and Genetic Diversity of *Fusarium* species on Wheat. *Eurasian Journal of agricultural research.* 13-22

V

Van Burik, J.A.H., Schreckhise, R.W., White, T.C., Bowden, R.A. and Myerson, D. 1998. Comparison of six extraction techniques for isolation of DNA from filamentous fungi. *Medical Mycology.* 36: 299-303.

Varga, J. 2003. Molecular detection of fungi in foods and feeds. In: Arora, D.K., Ed., *Fungal Biotechnology in Agricultural, Food, and Environmental Applications.* New York: Marcel Dekker Inc., pp. 299-309.

W

Wegulo, S.N. 2012. "Factors Influencing Deoxynivalenol Accumulation in Small Grain Cereals." *Toxins* 4 (11): 1157-1180. doi:10.3390/toxins 4111 157.

Wegulo, S.N., Jackson, T.A., Baenziger, P.S., Carlson, M.P. and Nopsa, J.H. 2008. *Fusarium* Head Blight of Wheat. University OF Nebraska-Lincoln Extension. <http://extension.unl.edu/publications>.

Wegulo, S.N., Baenziger, P.S., Nopsa, J.H., Bockus W.W. and Hallen-Adams, H. 2015. Management of *Fusarium* head blight of wheat and barley. *Crop Protection.* 73: 100- 107.

Wildermuth, G.B., R.B. McNamara and J.S. Quick. 2001. Crown depth and susceptibility to crown rot in wheat. *Euphytica*, 122: 397-405.

- Williams, K.J., Dennis, J.I., Smyl, C. and Wallwork, H. 2002. The application of specific-specific assays based on the polymerase chain reaction to analyze *Fusarium* crown rot of durum wheat. *Aust. Plant Pathol.* 31:119-127.
- Wulff, E. G., Sørensen, J. L., Lübeck, M., Nielsen, K. F., Thrane, U. and Torp, J. 2010. *Fusarium* spp. associated with rice Bakanae: Ecology, genetic diversity, pathogenicity and toxigenicity. *Environmental Microbiology*, 12: 649–657.

Y

- Yli-Mattila, T. and Hyvönen, J. 1996. RAPD-PCR analysis of *Fusarium* strains - cladistic evaluation of the results. *Sydowia*.48 (2): 184-195.
- Yli-Mattila, T., Paavanen-Huhtala, S., Parikka, P., Konstantinova, P. and Gagkaeva, T. Y. 2004. Molecular and morphological diversity of *Fusarium* species in Finland and northwestern Russia. *Eur J Plant Pathol*110:573-584.
- Yli-Mattila, T., Nayaka, S. C., Venkataramana, M. and Yörük, E. 2017. Multiplex Detection of *Fusarium* Species. in *Mycotoxigenic Fungi: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, edited by Antonio Moretti and Antonia Susca, vol. 1542,DOI 10.1007/978-1-4939-6707-0_18, © Springer.

Z

- Zhang, J.B., Li, H.P., Dang, F.J.; Qu, B., Xu, Y.B., Zhao, C.S. and Liao, Y.C. 2007. Determination of the trichothecene mycotoxin chemotypes and associated geographical distribution and phylogenetic species of the *Fusarium graminearum* clade from China. *Mycol. Res.* 111: 967–975.
- Zhang, X., Sun, H., Shen, C., Li, W., Yu, H. and Chen, H.2015. Survey of *Fusarium* spp. causing wheat crown rot in major winter wheat growing regions of China. *Plant Dis.* 99(11):1610-1615.

Abstract

Fusarium root and crown rot and head blight are important diseases limiting wheat production. Although there are many studies related to these two diseases in the world, few studies were conducted in Syria. Therefore, the objectives of this study were: (i) to identify some *Fusarium* species associated with roots, crown and spikes of wheat, based on their morphological characteristics on potato dextrose agar (PDA) and carnation leaf piece agar (CLA) media; (ii) to confirm the morphological identification using some molecular methods; (iii) to detect the genes involved in the biosynthesis of some toxins produced by some *Fusarium* species.

One hundred and five isolates were obtained from different areas for wheat cultivation in Syria (Tartous, Latakia, Hama and Sweida), and through the methods adopted in this study, a high-level morphological description of the following twenty *Fusarium* species was achieved: *F. pseudograminearum*, *F. culmorum*, *F. sambucinum*, *F. compactum*, *F. acuminatum*, *F. solani*, *F. semitectum*, *F. pseudocircinatum*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. verticillioides*, *F. sporotrichioides*, *F. equiseti*, *F. andiyazi*, *F. torulosum*, *F. polyphialidicum*, *F. brachygibbosum*, *F. chlamydosporum*, *F. flocciferum*, *F. redolens*. The most frequent species was *F. culmorum* with 29.52%, followed by *F. proliferatum* (12.38%), while the frequency of other species ranged between 0.95 and 8.57%.

A total of 20 isolates belonging to 8 *Fusarium* species, were tested for their pathogenicity on durum wheat cultivar Doma1, under laboratory conditions and artificial infection. *F. culmorum* was the most virulent, with disease severity of 4.45 using a 0-to-5 rating scale. *F. pseudograminearum* showed also a high pathogenic ability, with disease severity of 4.2, and non-significative differences with the previous species. Followed by *F. proliferatum*, which had an intermediate pathogenicity, with a disease severity level of 1.27. While *F.*

verticillioides, *F. equiseti*, *F. oxysporum* and *F. andiyazi* were weak pathogens, with disease severities of 0.9, 0.87, 0.4 and 0.7 respectively. *F. semitectum* was not pathogenic under current trial conditions.

Most current studies tend to use molecular technologies, especially polymerase chain reaction (PCR), which require an effective and easy DNA extraction method. For this purpose, five DNA extraction methods were compared to obtain DNA of sufficient quality and quantity necessary for its amplification, from three *Fusarium* species. Based on obtained results, the extraction methods can be arranged according to the DNA yields as follows: modified glass beads/CPI > CTAB > glass beads/PCI > Qiagen DNeasy Kit > LETS. This study showed that the use of the modified glass beads/CPI method is appropriate for DNA extraction from *Fusarium* species in generally.

The morphological identification of 64 *Fusarium* isolates was confirmed using molecular methods, where 29 isolates of *F. culmorum*, 5 isolates of *F. proliferatum* and 4 isolates of *F. equiseti* were identified using Fc01F / Fc01R, PRO1/PRO2 and FEF/FER primers, respectively. No amplification was obtained using Fg16NF/Fg16NR primers, which confirms the absence *F. graminearum*. It was also possible, using multiplex PCR method, to identify seven *Fusarium* species in a single reaction. This indicates the importance of this method in reducing time, effort and cost.

Thirteen isolates belonging to 11 *Fusarium* species were identified as *F. culmorum*, *F. semitectum*, *F. solani*, *F. proliferatum*, *F. verticillioides*, *F. oxysporum*, *F. chlamydosporum*, *F. andiyazi*, *F. torulosum*, *F. brachygibbosum* and *F. flocciferum*, based on sequencing a partial translation elongation factor 1- α (TEF1- α) gene region using primers ef1 and ef2. It should be noted that identification of the last four species was not possible based only on morphological methods because of their morphological similarity with other

species, or the lack of morphological studies related to some of them. So, they were identified using the nucleotide sequence of TEF1- α gene.

Specific primers were used to detect some genes involved in the biosynthesis pathway of the three most important groups of mycotoxins (trichothecenes, fumonisins and zearalenone), produced by some *Fusarium* species. Results showed that *F. culmorum*, *F. pseudograminearum* and *F. semitectum* had both TRI5 and PKS4 genes involved in the biosynthesis of trichothecenes and zearalenone respectively. Tested isolates of *F. verticillioides* had FUM5 gene involved in the fumonisins biosynthesis. While, isolates of *F. equiseti* and *F. oxysporum* had the PKS4 gene. Non amplification was obtained for the other isolates, which indicates that they do not have any of these genes, and therefore their inability to produce these mycotoxins.

This study is one of the few or rare studies that gave a precise morphological description of many *Fusarium* species affecting wheat, and it was possible to make a taxonomic key, which can be used as a taxonomic base for the classification of *Fusarium* species. Up to our knowledge, this is the first report of *F. andiyazi* causing crown and root rot on wheat in the world. This study is also the first report on the presence of seven *Fusarium* species: *F. torulosum*, *F. pseudocircinatum*, *F. polyphialidicum*, *F. brachygibbosum*, *F. chlamydosporum*, *F. flocciferum*, *F. redolens* on wheat in Syria.



Morphology, pathogenicity and molecular identification of some *Fusarium* species within the *Gibberella fujikuroi* species complex from wheat in Syria

Zidan L¹, Jawdat D² and Naffaa W³

¹Damascus University, Second Faculty of Agriculture, Seiwda, Syria

²Department of Molecular Biology and Biotechnology, Atomic Energy Commission, P. O. 6091, Damascus, Syria

³Damascus University, Faculty of Agriculture, Department of Plant Protection, 30621 Damascus, Syria

Zidan L, Jawdat D, Naffaa W 2020 – Morphology, pathogenicity and molecular identification of some *Fusarium* species within the *Gibberella fujikuroi* species complex from wheat in Syria. Current Research in Environmental & Applied Mycology (Journal of Fungal Biology) 10(1), 156–166, Doi 10.5943/cream/10/1/16

Abstract

Fusarium is a worldwide distributed fungal genus and includes different phytopathogenic species which are able to infect cereals among other crops. This study was carried out to identify and characterize the isolates of *Fusarium* spp. in the *Gibberella fujikuroi* species complex (Liseola section) through morphological and molecular approaches. A total of 105 isolates of *Fusarium* spp. were recovered from crown and roots of wheat plants, showing typical symptoms, collected from four Syrian provinces during 2017-2018. Seventeen isolates in the *G. fujikuroi* species complex were identified as *F. proliferatum*, *F. verticillioides* and *F. andiyazi* based on morphological characteristics, and sequencing a partial translation elongation factor 1-alpha (TEF1- α) gene. The pathogenicity test showed that all recovered isolates of these three species were pathogenic, with low to moderate severity, on durum wheat seedlings under laboratory conditions. To our knowledge, this is the first report of *F. andiyazi* causing crown and root rot on wheat.

Key words – crown rot – first report – root rot – TEF1- α

Introduction

Wheat is the main cereal crop in all parts of the world, where bread is the staple food (Dib & Soussi 2004). The *Gibberella fujikuroi* species complex includes an assemblage of *Fusarium* species with similar and overlapping morphological traits that complicates their differentiation (Kvas et al. 2009). Diseases caused by *Fusarium* species in this species complex are among the most common diseases reported on agricultural crops worldwide (Hsuan et al. 2011). Species such as *F. verticillioides*, *F. sacchari*, *F. subglutinans*, *F. proliferatum* and *F. fujikuroi* have been implicated in diseases of agricultural crops including rice, sugarcane, maize and wheat (Marasas et al. 2006, Siti Nordahliawate et al. 2008, Mohammadi et al. 2016). They also produce a remarkable wide range of secondary metabolites or mycotoxins that have a negative effect on human and animal health (Leslie & Summerell 2006, Wolny-koładka 2014). In Syria, some species of *Fusarium* in the *Gibberella fujikuroi* species complex such as *F. proliferatum* and *F. verticillioides* have been implicated in head blight, crown and root rot of wheat (El-Khalifeh et al. 2009, Al-Chaabi et al. 2015, 2018).

Morphological identification of plant pathogenic fungi especially *Fusarium* is the first and the most difficult step in the identification process. There are limits on the use of morphological characters for the identification of species in the *G. fujikuroi* species complex as species (*F. proliferatum* and *F. fujikuroi*, *F. verticillioides* and *F. andiyazi*) have very similar morphology. Although morphological observations may not suffice for complete identification, a great deal of information is usually obtained on the culture at this stage (Rahjoo et al. 2008), and still play an important role in sorting isolates into groups before applying other methods of identification (Leslie & Summerell 2006).

Several studies proved that molecular approaches could support morphological diagnostics by providing a rapid and reliable assay for routine identification of *Fusarium* spp. (Bluhm et al. 2002, Abedi-Tizaki & Sabbagh 2012, Carvalhais et al. 2019, Minati & Ameen 2019, Hafez et al. 2020). Polymerase chain reaction (PCR)-based techniques are considered a powerful diagnostic method for the identification of *Fusarium* and other fungal species. The techniques serve as confirmation step to morphological characterization and can be used for direct identification (Spanic et al. 2010). Some researchers have used species-specific PCR assay to identify some *Fusarium* species such as *F. proliferatum*, *F. subglutinans* and *F. verticillioides* (Mulè et al. 2004). Other commonly used PCR approach for *Fusarium* identification are the amplification of the second largest subunit of RNA polymerase II (RPB2) and the translation elongation factor 1-alpha (TEF1- α) genes (Šišić et al. 2018). TEF1- α gene is commonly used for diagnosis and sequences for this gene are available through GenBank and through the FUSARIUM-ID databases (Geiser et al. 2004).

The main objectives of this study are to (i) identify some species within the *G. fujikuroi* species complex, isolated from root and crown regions of winter wheat in Syria, using morphological and molecular methods, and (ii) test their pathogenicity on wheat seedlings.

Materials & Methods

Sample collection

Infected wheat plants were collected from different regions of four Syrian provinces [Tartous, Latakia, Hama (Al-Ghab plain), and Sweida] (Fig. 1), during 2017–2018. Samples were put in paper bags, and transported to the laboratory. The crown, root, and stem base tissues of each plant were rinsed with tap water to remove soil particles and examined for lesions.

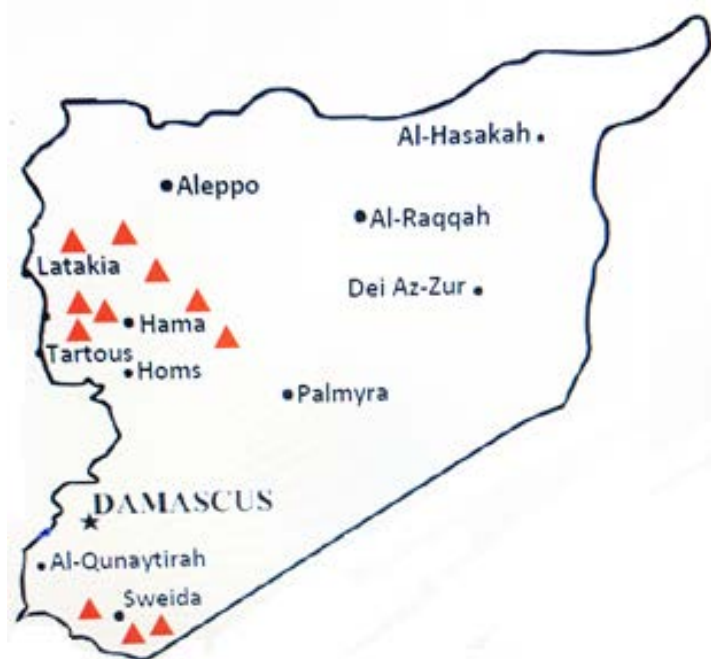


Fig. 1 – Map of Syria Provinces where *Fusarium* isolates were collected

Isolation of *Fusarium* spp.

Sections (3 cm) of symptomatic tissues were surface-sterilized with 1% sodium hypochlorite NaOCl for 3 min, rinsed with sterile distilled water, and air dried on sterilized filter paper in a laminar flow. Dried sections were cut into 1 cm in length and placed on potato dextrose agar (PDA) amended with 0.3 g L⁻¹ streptomycin and neomycin sulphate, and incubated at 22±1°C in the dark for 7 days. *Fusarium*-like colonies were purified using the single spore isolation method (Nelson et al. 1983, Burgess et al. 1994). Single-spore cultures were grown on PDA in the dark at 25°C and 30°C for 72 h to study the growth rate as described by Burgess et al. (1994). Two media were used for the identification study: Potato Dextrose Agar (PDA) to study growth rate and the cultural appearances (colony colour and pigmentations), and Carnation Leaf Agar (CLA) to investigate microscopic characteristics (Burgess et al. 1994, Leslie & Summerell 2006).

DNA extraction

Fungal isolates were grown on PDA medium and incubated for 3–7 days at 25°C. The mycelium was harvested, transferred to a micro-centrifuge tube and suspended in 400µl extraction buffer (1.4 M sodium chloride, 0.1M Tris HCl, pH = 8, 20 mM EDTA Ethylenediaminetetraacetic acid, 2% CTAB Cetyltrimethylammonium bromide, 1% PVP polyvinyl pyrrolidone, 1% β-mercaptoethanol). Lysis of the mycelium was achieved by the addition of acid washed 0.4-0.6 mm diameter glass beads and 400µl phenol/chloroform/iso-amyl alcohol (Phe/Chl/IAA) (25:24:1). The mixture was vortexed at high speed for 10 min, centrifuged at 14000 rpm for 5 min, and 500 µl of supernatant were transferred to a new micro-centrifuge tube. 1000 µl of ice-cold ethanol 100% were added, mixed gently, incubated at -20°C for 1 h and centrifuged at 12000 rpm for 10 min to pellet the DNA. Supernatant was decanted, and DNA pellet was washed with 1000 µl of 70% ethanol. DNA pellet was air dried and dissolved in 50-75 µl TE buffer (10mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 mM EDTA). 2µl RNase was added to DNA samples, mixed and incubated at 37°C for 45 min.

The DNA concentration was measured using NanoDrop Spectrophotometer (Thermo Scientific), and was adjusted to 100 ng/µL. DNA was then used as template for subsequent amplification using PCR.

Molecular identification based on partial TEF1-α gene sequence

Partial translation elongation factor 1-alpha (TEF1-α) gene sequence was amplified using primers ef1 (ATGGGTAAGGAGGACAAGAC) and ef2 (GGAAGTACCAGTGATCATGTT) (O'Donnell et al. 1998). The TEF partial sequence region was amplified in a 25 µl reaction mixture containing 12.5 µl *DreamTaq Green* PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific), 7.5 µl RNase-free water, 1.5 µl each of both forward and reverse primers (10 µM) and 2 µl of DNA. One isolate of each *Fusarium* species was selected for species confirmation. The PCR conditions were as follows: pre-denaturation at 95°C for 3 min; 10 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 53°C for 1 min, and extension at 72°C for 2 min and final extension at 72°C for 10 min (Geiser et al. 2004).

Amplified products were analyzed using 1% agarose gel electrophoresis, and visualized under a UV transilluminator. Amplified samples showing discrete bands were subjected to automated DNA sequencing. Sequences were aligned using CLUSTAL X program (Thompson et al. 1997) to investigate genetic variation.

Pathogenicity test

Fusarium isolates were grown on PDA to prepare plugs for inoculum in the pathogenicity test. Experiments were conducted on a susceptible durum wheat cultivar Doma1. Glass tubes (2.5 cm in diameter × 20 cm in height) were filled with sterile soil mix [sand, soil, and organic matter (50:40:10 v/v/v) respectively] up to 5 cm below the top of the tube. A 1-cm diameter PDA agar plug from the periphery of a 7-day-old colony was placed on the soil surface in the tube. Seeds were germinated in Petri dishes for 4 days before being planted. A single germinated seed was placed on the agar plug and covered with soil mix. An agar plug with no fungus was used for the

control treatment. Seven *Fusarium* isolates were tested for their pathogenicity, and each fungal isolate represented a single treatment. Each treatment was replicated five times (each tube represented one replicate), and treatments were arranged in a randomized complete block design. The pathogenicity of 5 isolates of *F. culmorum* and *F. pseudograminearum*, obtained in previous study, were also tested for comparison. Plants were grown in a growth chamber at a temperature of 25/15°C day/night, with 16 h of photoperiod (Mitter et al. 2006), and watered as needed. Five weeks after fungal inoculation, plant roots were washed and scored for the typical symptoms of browning on the crown and the main stem base using a 1-5 scale (1: 0-9%, 2: 10-29%, 3: 30-69%, 4: 70-89%, 5: 90-100%) (Wildermuth et al. 2001, Gebremariam et al. 2017). For each *Fusarium* species, re-isolation was carried out, and the re-isolated cultures were confirmed as the corresponding *Fusarium* species by comparing their morphology with known cultures of the species. One-way analysis of variance was carried out using SPSS15 statistical program at $P \leq 0.05$.

Results

Morphological characterization

A total of 105 isolates of *Fusarium* spp. were obtained. Seventeen of them were identified within the *G. fujikuroi* species complex: 13 isolates of *F. proliferatum* (FT17, FH37, FT38, FH44, FH45, FT46, FT47, FH50, FS51, FS57, FS64, FS78, FT79), two of *F. verticillioides* (FT52, FT31) and two of *Fusarium andiyazi* (FT67, FT81) based on their morphological characteristics (Burgess et al. 1994, Leslie & Summerell 2006).

F. proliferatum isolates produced white aerial mycelia with a violet pigmentation on PDA after 10 days (Fig. 2a, b). The colony diameter ranged from 3-3.5 cm at 25°C, and 2.5-3 cm at 30°C after incubation in the dark for 3 days. Macroconidia were rare, slender, almost straight, 3-5 septate, curved apical cell, and distinct foot-shaped basal cell (Fig. 2c, d). Microconidia were oval to obovoid in shape, no septa (Fig. 2e), formed in false heads (Fig. 2f) and/or in short or long chains (Fig. 2g). Conidiogenous cells were monophialide (Fig. 2h) and polyphialide (Fig. 2i). Chlamydospores were absent.

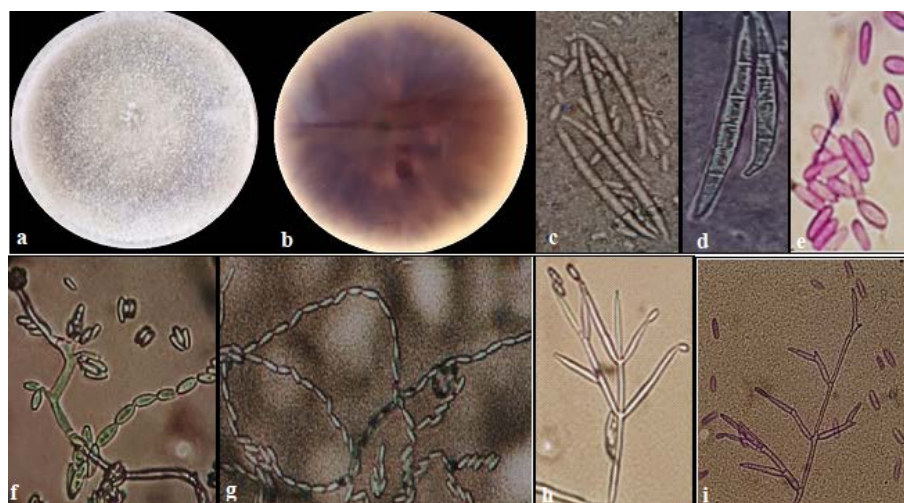


Fig. 2 – Morphological characteristics of *F. proliferatum* (isolate FT47). a upper surface of the colony. b lower surface of the colony. c 3-5-septate macroconidia. d macroconidia with distinct foot-shaped basal cell. e microconidia. f microconidia in false heads and in chains. g microconidia in long chains. h monophialide conidiogenesis. i polyphialide conidiogenesis.

F. verticillioides isolates produced white mycelia and developed violet pigments with age on PDA (Fig. 3a, b). The colony diameter ranged from 3-3.5 cm at 25°C, and 3.5-4 cm at 30°C after incubation in the dark for 3 days. Macroconidia were slender, slightly straight, 3-4 septate and

curved apical cell (Fig. 3c). Microconidia oval to obovoid in shape, no septa (Fig. 3d), formed in false heads (Fig. 3e) and/or in long chains (Fig. 3f) and they were formed from monophialides on the CLA (Fig. 3g). Chlamydospores were absent.

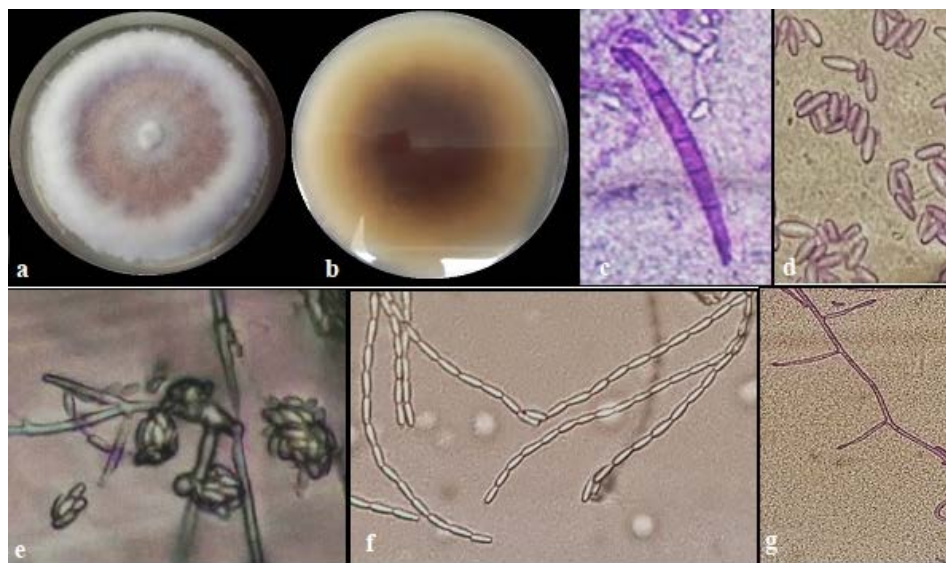


Fig. 3 – Morphological characteristics of *F. verticillioides* (isolate FT52). a upper surface of the colony. b lower surface of the colony. c 3-4-septate macroconidium. d microconidia. e microconidia in false heads. f microconidia in long chains. g monophialide conidiogenesis.

F. andiyazi isolates produced white aerial mycelia, with a violet pigmentation on PDA after 10 days (Fig. 4a, b). Colony diameter ranged from 3-3.2 cm at 25°C, and 2.7-3.5 cm at 30°C after incubation in the dark for 3 days. Macroconidia were slender, slightly straight, 3-5 septa, apical cell slightly curved, basal cell pedicellate (Fig. 4c). Microconidia abundant, clavate to ovoid, no septa (Fig. 4d), formed in false heads from monophialides (Fig. 4e), and in chains (Fig. 4f). Pseudochlamydospores are rarely present (Fig. 4g).

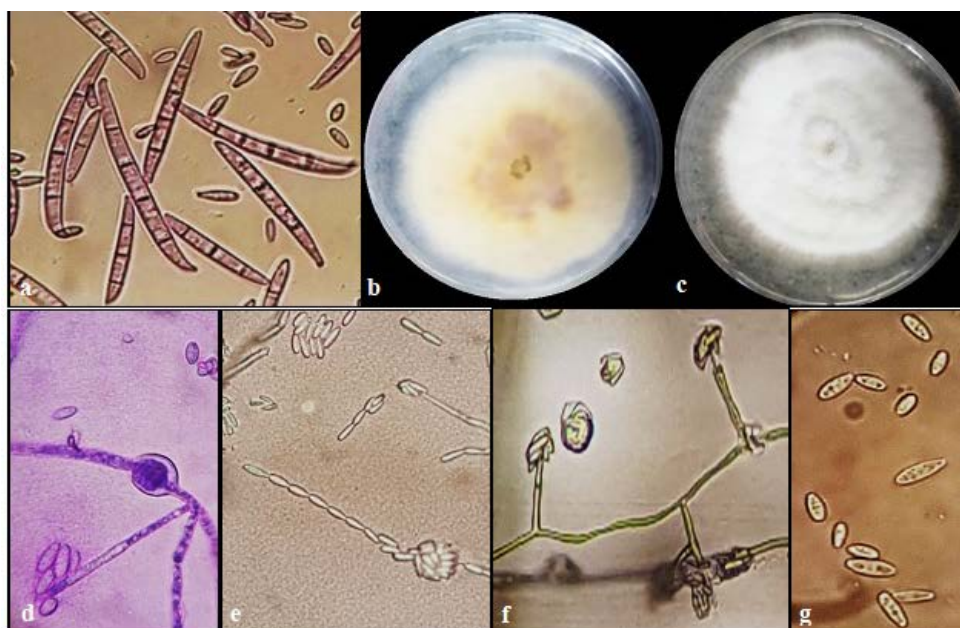


Fig. 4 – Morphological characteristics of *F. andiyazi* (isolate FT67). a upper surface of the colony. b lower surface of the colony. c 3-5-septate macroconidia. d microconidia. e false heads and monophialide conidiogenesis. f microconidia in chains. g pseudochlamydospore.

Molecular identification based on partial TEF1- α gene sequence

Amplified TEF1- α fragment size was ~700 bp in all tested isolates. A BLAST search (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) confirmed species identification for FT47, FT52, and FT67 and showed 99.79%, 99.79% and 98.58% similarity with *F. proliferatum*, *F. verticillioides* and *F. andiyazi* respectively. Sequences were deposited in GenBank with the following accession numbers: MN865124 (FT47), MN807690 (FT52) and MN867480 (FT67). Sequences were aligned to investigate genetic variation (Fig. 5). A neighbor-joining phylogenetic tree was constructed using the Geneious tree builder software, where the consensus tree was based on the bootstrap resampling method of 1000 replications. This phylogenetic tree of partial TEF1- α gene shows close relationships between sequences of our isolates and reference sequences of *F. proliferatum*, *F. verticillioides* and *F. andiyazi* (Fig. 6). A confirmed Syrian isolate of *F. culmorum* (MN807691) was treated as the outgroup.

Pathogenicity test

A total of 12 isolates belonging to 5 *Fusarium* species (Table 1), were tested for their ability to cause crown rot on wheat seedlings. The tested species had different disease severity ranging from 0.6 – 3.8 depending on their virulence. *F. andiyazi*, *F. verticillioides* and *F. proliferatum* had low, low to intermediate and intermediate pathogenicity respectively (Fig. 7). The pathogenicity of the three species in the *G. fujikuroi* species complex was compared with those of *F. culmorum* and *F. pseudograminearum* that caused severe crown rot disease and death of wheat seedlings (Table 1).

Table 1 Mean disease severity index caused by 12 isolates of *Fusarium* spp. and scored 5 weeks after inoculating wheat seedlings of the cultivar Doma1 under laboratory conditions.

Fusarium species	Tested isolate ⁽¹⁾	Infected seedlings (%)	Infection severity of sub crown internode ^{(2) (3)}
<i>F. proliferatum</i>	FT17	100	1.2 cd
	FH44	80	1.4 d
	FS57	100	1.2 c d
<i>F. verticillioides</i>	FT52	80	0.8 bc
	FT31	80	1 bcd
<i>F. andiyazi</i>	FT67	60	0.6 b
	FT81	80	0.8 bc
<i>F. culmorum</i>	FH7	100	3.8 h
	FT27	100	2.4 e
	FS66	100	3.6 gh
<i>F. pseudograminearum</i>	FT63	100	2.8 ef
	FS87	100	3.2 fg
Control	-	0	0 a

(1) FT, FH and FS: isolates obtained from Tartous, Hama and Sweida provinces respectively

(2) Values followed by the same letter are not significantly different ($P > 0.05$) according to LSD tests. LSD at 5% = 0.513

(3) Scale = 0 – 5

Discussion

In this study, seventeen isolates were morphologically identified as *F. proliferatum*, *F. verticillioides* and *F. andiyazi*. In fact, distinguishing species within the *G. fujikuroi* species complex such as *F. proliferatum*, *F. verticillioides*, *F. andiyazi*, *F. fujikuroi* and *F. subglutinans* using morphological characters is a difficult procedure even for specialists (Summerell et al. 2003, Leslie & Summerell 2006, Hsuan et al. 2011). *F. proliferatum*, *F. verticillioides* and *F. andiyazi* have similar morphological characteristics like shape of the conidia, growth rate, colony morphology, and pigmentation on PDA (Burgess et al. 1994, Leslie & Summerell 2006). These species produce microconidia in chains or in false heads. The microconidia of *F. proliferatum* are

derived from polyphialide or/and monophialide conidiogenous cells, but the microconidia of *F. verticillioide*s and *F. andiyazi* are only derived from monophialide conidiogenous cells (Burgess et al. 1994, Leslie & Summerell 2006). In the present study, it was very difficult to distinguish isolates of *F. verticillioide*s and *F. andiyazi* because of the morphological similarity, and the only distinguishable character of *F. andiyazi* was the formation of very few pseudochlamydospores on PDA. In contrast, Venturini et al. (2017) reported that chlamydospores are absent in this species.

Due to the fact that using morphological characteristics can result in misidentification according to Rahjoo et al. (2008), molecular methods are usually needed for confirmation. The method of choice by several research groups is the characterization of *Fusarium* isolates based on the TEF1- α gene sequences (Gebremariam et al. 2017, Boutigny et al. 2019). Our results based on the partial DNA sequence of the TEF1- α region confirmed the morphological identification.

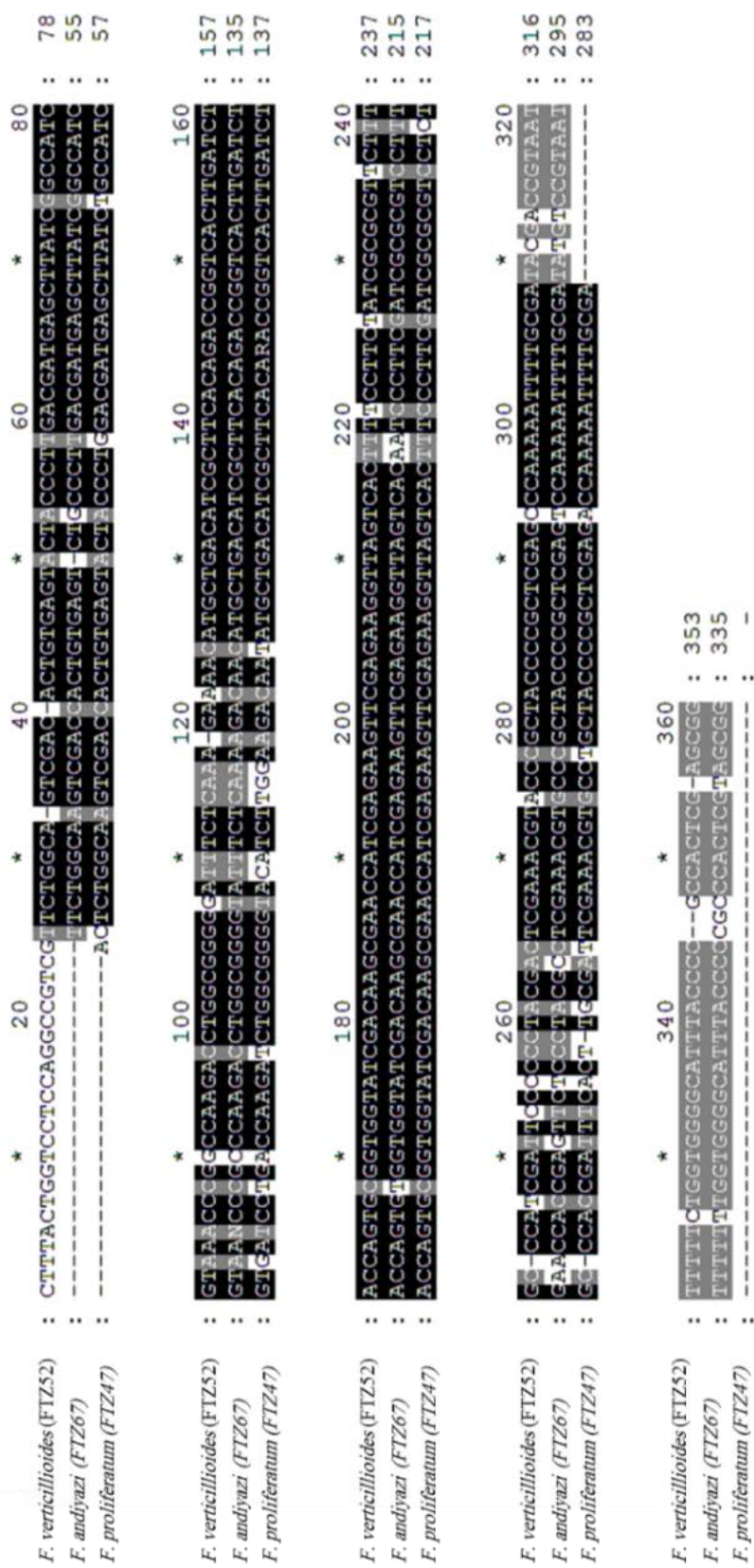


Fig. 5 – Alignment of partial TEF1- α gene sequences of three isolates of *F. proliferatum*, *F. verticillioide*s and *F. andiyazi*

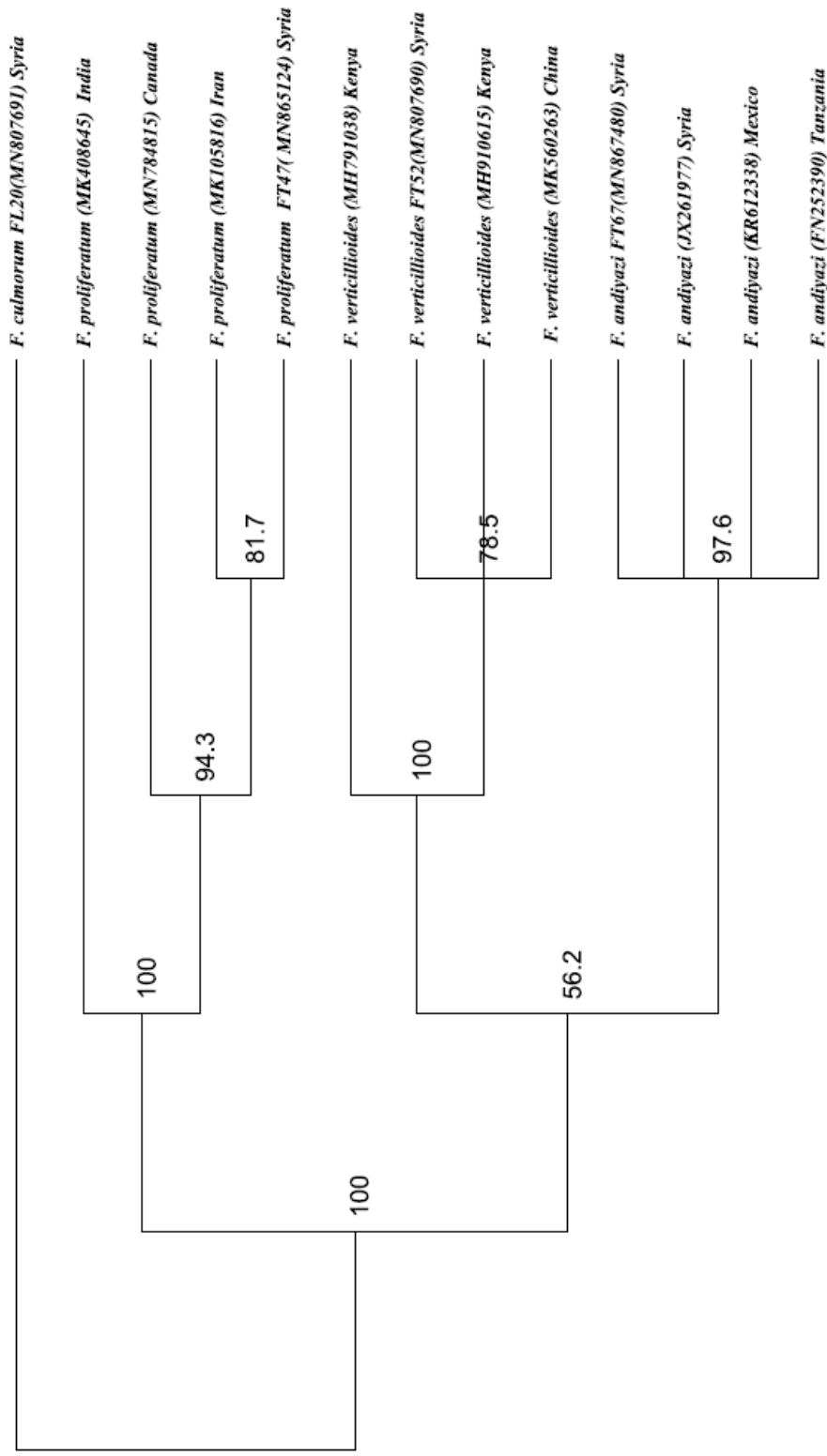


Fig. 6 – Neighbor-joining phylogenetic tree of partial TFE1- α gene showing relationships between sequences of Syria isolates and reference sequences of *F. proliferatum*, *F. verticillioideis* and *F. andiyazi*. *F. culmorum* was treated as the outgroup.

All Isolates of *F. proliferatum*, *F. verticillioideis* and *F. andiyazi* tested in this study caused disease on durum wheat seedlings under laboratory conditions, but they were less virulent compared with isolates of *F. culmorum* and *F. pseudograminearum* that caused a high disease severity. Al-Chaab et al. (2015) reported *F. proliferatum* among the least virulent *Fusarium* species tested on durum wheat of variety ACSAD65 in Syria. Gebremariam et al. (2017) reported *F. proliferatum* as non-pathogenic species in Turkey. Although, *F. andiyazi* infected wheat seedlings under laboratory conditions, but it had relatively a low pathogenicity, and we can consider it as a weak pathogen. In fact, *F. andiyazi* is well known as a pathogen of maize (Leslie & Summerell 2006). It was first isolated and identified from Sorghum in Africa by Marasas et al. (2001), from rice grains

infected with Bakanae disease in Africa and Asia (Wulff et al. 2010), and from maize in Syria (Madania et al. 2013). In fact, some *Fusarium* species isolated from wheat have been also reported as saprophytic or weakly pathogenic. For example, *F. equiseti* has been reported as a wide spread and non-pathogenic *Fusarium* species (Summerell et al. 2003, Leslie & Summerell 2006, Gebremariam et al. 2017), while it was reported as pathogenic fungus on wheat, causing disease on the roots and crowns (Al-Chaabi et al. 2015, Fernandez & Chen 2005).

In summary, we have recovered three *Fusarium* spp. within the *F. fujikuroi* species complex from durum wheat in Syria. *F. proliferatum* and *F. verticillioides* are from the *F. fujikuroi* species complex and have been previously associated with crown and root rot of wheat. But, up to our knowledge, this study is the first report of *F. andiyazi* causing crown rot on wheat.

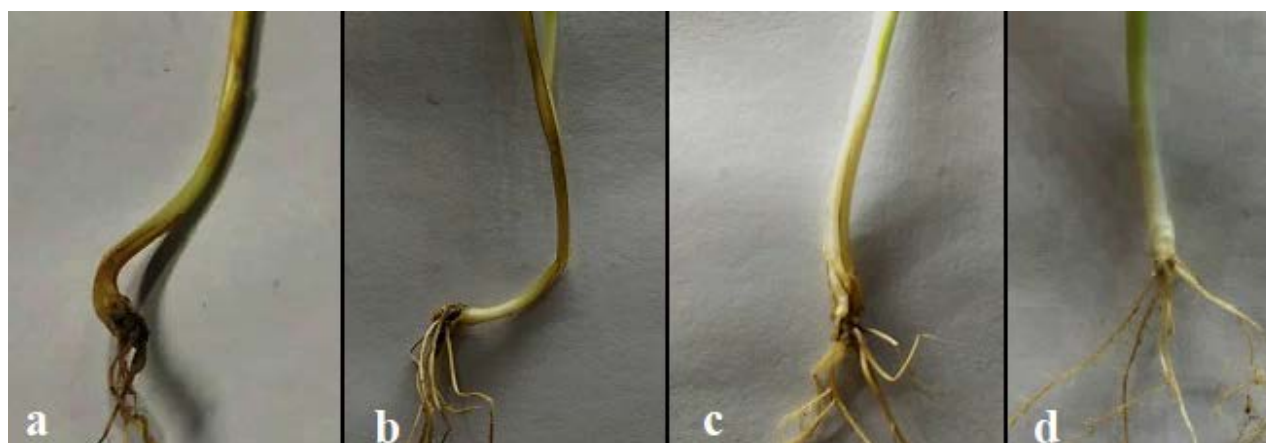


Fig. 7 – Durum wheat seedlings inoculated with *F. proliferatum* (a), *F. verticillioides* (b), *F. andiyazi* (c), non-inoculated control (d).

References

- Abedi-Tizaki M, Sabbagh SK. 2012 – Morphological and molecular identification of *Fusarium* head blight isolates from wheat in north of Iran. *Australian Journal of Crop Science* 6, 1356–1361.
- Al-Chaabi S, Masri S, Nahlawi A, Matrod L. 2015 – The causal agents of wheat crown and root rot in Syria, their pathogenicity, and the reaction of some wheat cultivars and wild relatives to the disease. *Arab Journal of Plant Protection* 33, 116–129.
- Al-Chaabi S, Al-Masri S, Nehlawi A, Al-Matroud L, Abu-Fadel T. 2018 – Monitoring of *Fusarium* wheat head blight distribution, its causal agents, and pathogenicity variation in Al-Ghab plain, Syria. *Arab Journal of Plant Protection* 36, 98–113.
- Bluhm BH, Flaherty JE, Cousin MA, Woloshuk CP. 2002 – Multiplex polymerase chain reaction assay for the differential detection of trichothecene- and fumonisin-producing species of *Fusarium* in cornmeal. *Journal of Food Protection* 65, 1955–1961.
- Boutigny AL, Gautier A, Basler R, Dauthieux F et al. 2019 – Metabarcoding targeting the EF1 alpha region to assess *Fusarium* diversity on cereals. *PLoS ONE* 14(1): e0207988.
- Burgess LW, Summerell BA, Bullock S, Gott KP, Backhouse D. 1994 – *Laboratory Manual for Fusarium Research*; University of Sydney: Sydney, Australia.
- Carvalhais LC, Henderson J, Rincon-Florez VA, O'Dwyer C et al. 2019 – Molecular diagnostics of banana *Fusarium* wilt targeting *Secreted-in-Xylem* genes. *Frontiers in Plant Science*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00547>
- Dib T, Soussi FA. 2004 – Study on the development of the consumption of wheat in Syria. *Journal of Damascus University for Agricultural Science* 20, 191–213.

- El-Khalifeh M, El-Ahmed A, Al-Saleh A, Nachit M. 2009 – Use of AFLPs to differentiate between *Fusarium* species causing root rot disease on durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. durum). African Journal of Biotechnology 8, 4347–4352.
- Fernandez MR, Chen Y. 2005 – Pathogenicity of *Fusarium* species on different plant parts of spring wheat under controlled conditions. Plant Disease 89, 164–169.
- Gebremariam ES, Sharma-Poudyal D, Paulitz TC, Erginbas-Orakci G et al. 2017 – Identity and pathogenicity of *Fusarium* species associated with crown rot on wheat (*Triticum* spp.) in Turkey. European Journal of Plant Pathology 150, 387–399.
- Geiser DM, Gasco J, Kang MM, Mkalowska S et al. 2004 – FUSARIUM-IDv.1.0: a DNA sequence database for identifying *Fusarium*. European Journal of Plant Pathology 110, 473–479.
- Hafez M, Abdelmagid A, Adam LR, Daayf F. 2020 – Specific detection and identification of *Fusarium graminearum* Sensu Stricto using a PCR-RFLP tool and specific primers targeting the translational elongation factor 1 α gene. Plant disease. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-19-0572-RE>
- Hsuan HM, Salleh B, Zakaria L. 2011 – Molecular Identification of *Fusarium* species in *Gibberella fujikuroi* species complex from rice, sugarcane and maize from Peninsular Malaysia International Journal of Molecular Sciences 12, 6722–6732.
- Kvas M, Marasas WFO, Wingfield BD, Wingfield MJ, Steenkamp ET. 2009 – Diversity and evolution of *Fusarium* species in the *Gibberella fujikuroi* complex. Fungal Diversity 34, 1–21.
- Leslie JF, Summerell BA. 2006 – The Fusarium Laboratory Manual. Blackwell., Oxford. 2006.
- Madania A, Altawil M, Naffaa W, Volker PH, Hawat M. 2013 – Morphological and molecular characterization of *Fusarium* isolated from maize in Syria. Journal of Phytopathology 161, 452–458.
- Marasas WFO, Rheeder JP, Lamprecht SC, Zeller KA, Leslie JF. 2001 – *Fusarium andiyazi* sp. nov., a new species from sorghum. Mycologia 93, 1203–1210.
- Marasas WF, Ploetz RC, Wingfield MJ, Wingfield BD, Steenkamp ET. 2006 – Mango malformation disease and the associated *Fusarium* species. Phytopathology 96, 667–672.
- Minati MH, Mohammed-Ameen MK. 2019 – Novel report on six *Fusarium* species associated with head blight and crown rot of wheat in Basra province, Iraq. Bulletin of the National Research Centre 43, 139. <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0173-z>
- Mitter V, Zhang MC, Liu CJ, Ghosh R et al. 2006 – A high-throughput glasshouse bioassay to detect crown rot resistance in wheat germplasm. Plant Pathology 55: 433–41.
- Mohammadi A, Shams-Ghahfarokhi M, Nazarian-Firouzabadi F, Kachuei R et al. 2016 – *Gibberella fujikuroi* species complex isolated from maize and wheat in Iran: distribution, molecular identification and fumonisin B1 in vitro biosynthesis. Journal of the Science of Food and Agriculture 96, 1333–1340.
- Mulè G, Susca A, Stea G, Moretti A. 2004 – A Species- Specific PCR Assay Based on the Calmodulin Partial Gene for Identification of *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. subglutinans*. European Journal of Plant Pathology 110: 495–502.
- Nelson P, Toussoun T, Marasas W. 1983 – *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. Pennsylvania State University Press, University Park, PA. pp. 193.
- O'Donnell K, Kistler HC, Cigelnik E, Ploetz RC. 1998 – Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. Proc Natl Acad Sci USA. 95: 2044–2049.
- Rahjoo V, Zad J, Javan-Nikkhah M, Mirzadi Goharim A et al. 2008 – Morphological and molecular identification of *Fusarium* isolated from maize ears. Iranian Journal of Plant Pathology 90: 463–468.
- Šišić A, Baćanović-Šišić J, Al-Hatmi AMS, Karlovsky P et al. 2018 – The ‘forma specialis’ issue in *Fusarium*: A case study in *Fusarium solani* f. sp. *Pisi*. Scientific Reports 8: 1252. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19779-z>

- Siti Nordahliawate MS, Nur Ain Izzati MZ, Azmi AR, Salleh B. 2008 – Distribution, morphological characterization and pathogenicity of *Fusarium sacchari* associated with Pokkah Boeng disease of sugarcane in Peninsular Malaysia. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science* 31(2), 279–286.
- Spanic V, Lemmens M, Drezner G. 2010 – Morphological and molecular identification of *Fusarium* species associated with head blight on wheat in East Croatia. *European Journal of Plant Pathology* 128: 511–516.
- Summerell BA, Salleh B, Leslie JF. 2003 – A utilitarian approach to *Fusarium* identification. *Plant Disease* 87, 117–128.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. 1997 – The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25, 4876–4882.
- Venturini G, Toffolatti SL, Quaglino F, Casati P. 2017 – First report of *Fusarium andiyazi* causing ear rot on maize in Italy. *Plant Disease* 101, p 839.
- Wildermuth GB, McNamara RB, Quick JS. 2001 – Crown depth and susceptibility to crown rot in wheat. *Euphytica* 122, 397–405.
- Wolny-koładka K. 2014 – Fungi of the genus *Fusarium* – occurrence, characteristics and significance in the environment. *Cosmos* 63, 623–633.
- Wulff EG, Sørensen JL, Lübeck M, Nielsen KF et al. 2010 – *Fusarium* spp. associated with rice Bakanae: Ecology, genetic diversity, pathogenicity and toxigenicity. *Environmental Microbiology* 12, 649–657.

Damascus University

Faculty of Agriculture

Department of Plant Protection



**Morphological and Molecular Identification of *Fusarium*
Isolates on Wheat and Detection of genes responsible for
Mycotoxins production**

**A thesis submitted for the degree of PhD in Agriculture
Engineering, Plant Protection**

By

Eng. Laila Mounif Zidan

Supervisor

Prof. Dr. Walid Naffaa

**Damascus University
Faculty of Agriculture
Department of Plant Protection**

Co-supervisor

Dr. Dana Jaoudat

**Atomic Energy Commission of Syria
Department of Molecular
Biology and Biotechnology**

2020