دانش گیاه‌پزشکی ایران
دوره ۴۵، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۳ (ص۸۸-۸۳)

قابلیت تولید تریکوتسین در جدایه‌های قارچ *Fusarium culmorum* مزارع گندم استان آذربایجان غربی بر اساس ردیابی ژن *Tri13*

آزاد لاوا [1*] و محمد سالاری [2]
۱،۲. دانشجوی کارشناسی‌ارشد و دانشیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
(تاریخ دریافت: ۹۲/۸/۱ - تاریخ تصویب:۹۳/۶/۲۵)

چکیده

قارچ *Fusarium culmorum* عامل بیماری بلایت فوزاریومی سنبلهٔ گندم، قادر به تولید داکسی‌نیوالنول، نیوالنول و مشتقات استیلی آنها است. بررسی حاضر به منظور ردیابی ژن *Tri13* با استفاده از جفت‌آغازگرهای Tri13F/Tri13DONR و Tri13NIVF/Tri13R جهت تعیین پتانسیل جدایه‌های قارچ *F. culmorum* استان آذربایجان غربی در تولید داکسی‌نیوالنول و نیوالنول صورت پذیرفته است. بدین منظور از مزارع گندم ارومیه، خوی، میاندواب، ماکو، تکاب و مهاباد نمونه‌برداری انجام گرفت. نود و هشت جدایه بر اساس خصوصیات ریخت‌شناسی ماکرو کنیدی‌ها، کلامیدوسپورها و شکل پرگنه‌ها به عنوان *F. culmorum* شناسایی شدند. جهت شناسایی تکمیلی جدایه‌ها از جفت‌آغازگر اختصاصی C51F/C51R استفاده شد. قابلیت تولید توکسین‌های داکسی‌نیوالنول و نیوالنول در جدایه‌های قارچی بر اساس ردیابی ژن *Tri13* انجام گرفت. نتایج نشان داد ۶۰/۲ درصد جدایه‌ها پتانسیل تولید داکسی‌نیوالنول و ۳۹/۸ درصد آنها پتانسیل تولید نیوالنول را دارایند.

واژه‌های کلیدی: بلایت فوزاریومی سنبله، داکسی‌نیوالنول، ژن *Tri13*، گندم، نیوالنول.

مقدمه

بلایت فوزاریومی سنبله[1] یا اسکب گندم[2] یکی از مهم‌ترین بیماری‌های غلات است. این بیماری با کاهش کمیت و کیفیت محصول منجر به ایجاد خسارات اقتصادی هنگفتی در سراسر جهان شده است (Bai & Shaner, 1996). اهمیت این بیماری زمانی بسیار افزایش می‌یابد که مرحلهٔ گلدهی و تکامل دانه با بارندگی یا رطوبت نسبی بالا همراه باشد. قارچ‌های *F. culmorum* و *F. graminearum* بیمارگرهای مهم و عامل فوزاریوز سنبلهٔ گندم در بسیاری از نقاط دنیایند (Parry *et al.*, 2007). این بیماری در اوایل قرن بیستم از انگلستان گزارش شد و از آن پس در بسیاری از مناطق جهان مانند آمریکا، کانادا، اروپا و چین گزارش شده است (Harris *et al.*, 1999). فوزاریوز سنبلهٔ گندم در شمال ایران به صورت بومی وجود دارد و گزارش‌هایی از سایر نقاط کشور مانند آذربایجان، هرمزگان، مغان، فارس و خوزستان نیز داده شده است (Sanjarian *et al.*, 2006).

فوزاریوز سنبلهٔ گندم علاوه بر کاهش کمیت و کیفیت محصول، موجب تولید مایکوتوکسین‌های مختلف در دانه‌ها می‌شود (Kim *et al.*, 2003). تریکوتسین‌ها گروه اصلی مایکوتوکسین‌هایی‌اند که در گونه‌های مختلف فوزاریوم از جمله *F. culmorum* و *F. graminearum* تولید می‌شوند (Bennet *et al.*, 2003). تریکوتسین‌ها بر اساس ساختار شیمیایی به دو تیپ A و B تقسیم می‌شوند. مهم‌ترین تیپ شناخته‌شدهٔ تریکوتسین‌ها تیپ B است. گونهٔ *F. culmorum* مجموعه‌ای از تریکوتسین‌ها شامل نیوالنول (NIV)، داکسی نیوالنول (DON) و مشتقات استیلی DON را تولید می‌کند (Strub *et al.*, 2010). محصولات آلوده به تریکوتسین‌ها برای انسان و دام مضرند و منجر به ایجاد اختلالات گوارشی در پستانداران و بروز کم‌اشتهایی در دام‌های اهلی می‌شوند (Eriksen & Pettersson, 2004). تمام جانوران مورد آزمایش، که تاکنون در معرض تریکوتسین‌ها قرارگرفته‌اند، نسبت به این ترکیبات

E-mail: azad_lava64@yahoo.com
تلفن: ۰۹۱۴۴۴۶۷۸۲۰

1. *Fusarium* Head Blight
2. Wheat scab

حساسیت نشان داده‌اند. نوع و شدت حساسیت به تریکوتسین‌ها به عوامل متعددی همچون گونهٔ جانور، نوع تریکوتسین، مقدار تریکوتسین، مسیر ورود سم به بدن و سایر عوامل بستگی دارد (Marasas *et al.*, 1984). تیپ شیمیایی NIV نسبت به DON برای انسان و دام سمیت بیشتری دارد، اگرچه ممکن است تیپ شیمیایی DON خاصیت فیتوتوکسینی بیشتری نسبت به NIV داشته باشد (Buerstmayr *et al.*, 2003; Goswami & Kistler, 2004).

روش‌های مورد استفاده به منظور ردیابی NIV، DON و مشتقات استیلی آنها باید سریع باشد و نتایج قابل‌قبول و دقیقی ارائه کند(Adejumo *et al.*, 2007; Langseth, 1998; Muller *et al.*, 1997. یکی از روش‌های مناسب و متداول که با استفاده از آن می‌توان به تعیین تیپ‌های شیمیایی پرداخت، کاربرد واکنش زنجیره‌ای پلیمراز[1] مبتنی بر طراحی آغازگرهای اختصاصی ژن‌های سنتزکنندهٔ تریکوتسین است، که در کمترین زمان ممکن به ردیابی مایکوتوکسین‌ها در محصولات کشاورزی آلوده می‌پردازد و هزینه‌های کمتری در مقابل روش‌های سنتی دارد (Nicholson *et al.*, 1998). ژن‌های *Tri13* و *Tri7* از خوشهٔ ژنی بیوسنتزکنندهٔ تریکوتسین‌ها را Brown *et al.* (2002) شناسایی کردند. این دو ژن به ترتیب مسئول تبدیل DON به NIV و استیله‌کردن NIV به ۴-استیل نیوالنول‌اند. هدف این مطالعه ردیابی ژن *Tri13* با استفاده از جفت آغازگرهای Tri13F/Tri13DONR و Tri13NIVF/Tri13R جهت بررسی پتانسیل جدایه‌های *F. culmorum* استان آذربایجان غربی در تولید تریکوتسین‌های DON و NIV است. لازم به ذکر است که تاکنون گزارشی مبنی بر بررسی تیپ‌های شیمیایی مختلف جدایه‌های *F. culmorum* در ایران ارائه نشده است.

مواد و روش ها

تهیهٔ جدایه‌های قارچی

نمونه‌برداری در طول خرداد ماه سال زراعی ۱۳۹۰-۱۳۸۹ که مصادف با تشکیل و تکامل خوشه‌های گندم است، از مزارع ارومیه، مهاباد، میاندوآب، خوی، تکاب و ماکو صورت گرفت. قسمت‌های مختلف خوشه شامل پوشینک‌های دانه، قطعاتی از محور سنبلچه و خوشه به‌طور جداگانه با هیپوکلریت سدیم ۲ درصد به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی شد. سپس، سه بار با آب مقطر سترون شستشو داده و روی محیط کشت‌های سیب‌زمینی دکستروز آگار (PDA) و Nash and Snyder کشت شد. نمونه‌ها در دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد و در شرایط نور متناوب ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی قرارگرفتند. خالص‌سازی جدایه‌ها بر اساس روش Nirenberg (1976) از طریق تک‌اسپور کردن و نوک‌ریسه روی محیط کشت‌های آب آگار ۲ درصد حاوی استرپتومایسین، برگ میخک آگار (CLA)[2] و SNA[3] انجام گرفت.

شناسایی جدایه‌های *F. culmorum*

جدایه‌های فوزاریوم حاصل، از نظر خصوصیات ریخت‌شناسی کنیدیوم‌ها و شکل پرگنه‌ها بررسی شدند (Burgess & Gardens, 1994; Nelson *et al.*, 1983). برای شناسایی تکمیلی جدایه‌های متعلق به *F. culmorum*، از جفت آغازگرهای اختصاصی *F. culmorum* (C51F/C51R) (Nicholson *et al.*, 1998) استفاده شد (جدول ۱). استخراج DNA با استفاده از روش CTAB انجام پذیرفت (Nicholson *et al.*, 1998). شرایط دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شامل واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، سپس ۳۵ چرخه که هر چرخه شامل یک واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، مرحلهٔ اتصال در دمای ۶۱ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، مرحلهٔ بسط به مدت ۹۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد و بسط نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد در نظر گرفته شد (Nicholson *et al.*, 1998). محصول PCR با استفاده از این جفت آغازگر قطعات ۵۷۰ جفت بازی است.

1. Polymerase chain reaction

2. Carnation Leaf Agar

3. Spezielle Nahstoffarmer Agar

ردیابی ژن *Tri13*

برای ردیابی ژن *Tri13* از آغازگرهای Tri13F/ Tri13DONR و Tri3NivF/Tri3NivR استفاده شد (Chandler *et al.*, 2003). تمامی این آغازگرها به سفارش شرکت آرین ژن گستر در کشور آلمان توسط شرکت Metabion ساخته شدند (جدول ۱). واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر و با استفاده از ترموسایکلر (Eppendorph, Germany) انجام گرفت. برای انجام PCR غلظت DNA، $MgCl_2$، dNTP، آغازگرها و آنزیم *Taq* پلیمراز برای حجم ۲۵ میکرولیتر تعیین و بهینه شد (جدول ۲) (Ji *et al.*, 2007). هر آزمایش شامل یک کنترل مثبت (یک واکنش PCR با DNA ژنومی یک جدایهٔ *F. culmorum* شناخته شده) و یک کنترل منفی (یک واکنش PCR شامل همهٔ معرف‌ها اما بدون DNA ژنومی) انجام گرفت.

جدول ۱. آغازگرها به همراه توالی و اندازهٔ قطعهٔ تولید شدهٔ آنها

آغازگر (Primer)	اندازهٔ قطعه (bp)	توالی (Sequence)	منبع (refrence)
C51F C51R	570	ATGGTGAACTCGTCGTGGC CCCTTCTTACGCCAATCTCG	Nicholson *et al.*, (1998)
Tri13F Tri13DONR	282	GCTAGATCGATTGTTGCATTGAG	Chandler *et al.*, (2003)
Tri3NivF Tri3NivR	312	CCAAATCCGAAAACCGCAG TTGAAAGCTCCAATGTCGTG	Chandler *et al.*, (2003)

شرایط دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز جهت استفاده از جفت‌آغازگرهای Tri13F/Tri13DONR و Tri13NIVF/Tri13R شامل یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه و سپس ۳۵ چرخه، هر چرخه شامل یک مرحله واسرشت‌سازی به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد ، مرحلهٔ اتصال در دمای ۵۸ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، مرحلهٔ بسط در دمای ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و بسط نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد تنظیم شد (Chandler *et al.*, 2003). محصولات PCR به طور جداگانه روی ژل ۱/۲ درصد آگارز الکتروفورز شد. رنگ‌آمیزی محصولات PCR با اتیدیوم بروماید صورت گرفت. سپس، عکس‌برداری تحت نور UV با استفاده از دستگاه ژل داک (Bio-RAD, USA) انجام گرفت.

نتایج و بحث

ویژگی‌های ریخت‌شناسی *F. culmorum*

گونهٔ *F. culmorum* فاقد میکروکنیدی است، اما ماکروکنیدی‌ها معمولاً فراوان‌اند و دیوارهٔ ضخیمی دارند که در قسمت بالایی مرکز اسپور به طور محسوسی پهن‌تر است. در قسمت پشتی ماکروکنیدی‌ها تا حدودی خمیدگی مشاهده می‌شود، اما قسمت شکمی تقریباً بدون خمیدگی است (Leslie & Summerell, 2006). تعداد کلامیدوسپورها معمولاً فراوان است و در اسپوردوکیوم‌ها و هیف‌ها مشاهده می‌شود.

اسپوردوکیوم‌ها نارنجی تا قهوه‌ای رنگ‌اند (Wiese, 1987). پرگنه‌های این گونهٔ قارچی، روی محیط کشت PDA به سرعت رشد می‌کنند. میسلیوم‌های هوایی سفید تا زرد رنگ‌اند، اما به مرور زمان و با رشد میسلیوم‌ها، به رنگ‌های قهوه‌ای تا قهوه‌ای تیره و قهوه‌ای مایل به قرمز دیده می‌شوند (شکل ۱) (Nelson *et al.*, 1983).

شناسایی تکمیلی جدایه‌های *F.culmorum* با استفاده از جفت‌آغازگر اختصاصی C51F/C51R

تعداد ۹۸ جدایهٔ *F.culmorum* جداسازی‌شده از خوشه‌های آلوده که بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی شناسایی شده بودند، با استفاده از واکنش PCR و جفت آغازگر اختصاصی C51F/C51R شناسایی شد. تمامی جدایه‌ها تولید باند ۵۷۰ جفت بازی کردند که این امر نشان‌دهندهٔ صحیح بودن شناسایی جدایه‌های *F.culmorum* با استفاده از صفات ریخت‌شناسی آنها است (شکل ۲). در این بررسی، با استفاده از

جفت‌آغازگر اختصاصی گونهٔ C51F/C51R، صحیح‌بودن شناسایی ۹۸ جدایهٔ *F. culmorum* جداسازی‌شده از مزارع استان آذربایجان غربی با استفاده از کلیدهای شناسایی تأیید شد. جفت‌آغازگر C51F/C51R را Nicholson *et al.* (1998) طراحی کردند. آنها تمام جدایه‌های *F. culmorum* شناسایی شده با استفاده از روش‌های سنتی را با استفاده از این جفت‌آغازگر شناسایی مجدد کردند. تمام جدایه‌های مورد بررسی تولید باند ۵۷۰ جفت‌بازی کردند که نشانگر صحیح بودن شناسایی آنها با استفاده از کلیدهای شناسایی بود.

با استفاده از این جفت‌آغازگر، طبقه‌بندی ۵۵ جدایهٔ *F. culmorum* با میزبان‌های مختلف گیاهی در کشورهای اروپایی تأیید شده است (Quarta *et al*., 2005). صد جدایهٔ *F. culmorum* در کشور تونس با استفاده از این جفت‌آغازگر را Kammoun *et al.* (2010) شناسایی کردند.

جدول ۲. میزان مواد مورد نیاز برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (حجم ۲۵ µL)

اجزای واکنش PCR	غلظت مواد پایه (Stock)	غلظت نهایی
آب مقطر دو بار تقطیر	-	-
بافر PCR با ۱۵ میلی‌مولار کلرید منیزیم	۱۰X	۱X
dNTP	۱۰ mM	۰/۲ mM
آغازگر Forward	۲۰ µM	۰/۴ µM
آغازگر Reverse	۲۰ µM	۰/۴ µM
Taq DNA polymerase	۵ unit/µL	۰/۷۵ unit
Template DNA	۲۵ ng/µL	۲۵ ng/µL

تعیین تیپ شیمیایی جدایه‌ها

در این بررسی از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای تعیین تیپ شیمیایی جدایه‌های *F.culmorum* استفاده شد. تمامی جدایه‌ها با استفاده از جفت‌آغازگرهای Tri13F/Tri13DONR و Tri13NIVF/Tri13R بررسی شدند که از میان آنها ۳۹ جدایه تولید باندهای ۳۱۲ جفت بازی (مرتبط با NIV) (شکل ۳) و تعداد ۵۹ جدایه تولید باندهای ۲۸۲ جفت بازی (مرتبط با DON) کردند (شکل۴). هیچ یک از جدایه‌ها قادر به تولید هر دو نوع تیپ شیمیایی نبودند و فقط با یکی از جفت‌آغازگرها تولید باند کردند. با توجه به ارقام به دست آمده، ۶۰/۲ درصد جدایه‌ها دارای پتانسیل تولید تیپ شیمیایی DON و ۳۹/۸ درصد آنها دارای پتانسیل تولید تیپ شیمیایی NIV بودند. تعیین تیپ شیمیایی جدایه‌های مورد بررسی در مزارع استان آذربایجان غربی نشان داد که هر دو تیپ شیمیایی DON و NIV در مزارع استان تولید می‌شوند. تیپ‌های شیمیایی NIV و DON در جدایه‌های *F.culmorum* مزارع کشور انگلستان ردیابی شد (Prickett *et al.*, 2000). حضور این دو تیپ شیمیایی در کشورهای آلمان، هلند، ایتالیا، نروژ و فرانسه گزارش شده است (Bakan *et al.*, 2001; Gang *et al.*, 1998; Langseth 1998; Muthomi *et al.*, 2000). در استان مازندران، Haratian *et al.* (2008) تولید این دو تیپ شیمیایی با قارچ *F. graminearum* را گزارش کردند و تیپ شیمیایی NIV را تیپ شیمیایی غالب معرفی کردند. در گزارش Jennings *et al.* (2004) غالب بودن تیپ شیمیایی DON در میان جدایه‌های *F. culmorum* کشور انگلستان مطرح شد. در تونس NIV تیپ شیمیایی غالب تولید شدهٔ جدایه‌های *F. culmorum* معرفی شده است (Kammoun *et al.*, 2010). تولید تیپ شیمیایی DON و عدم تولید تیپ شیمیایی NIV در مزارع کشور ترکیه را Albayrak & Yoruk (2011) گزارش کرده‌اند.

مایکوتوکسین‌ها، متابولیت‌های ثانویهٔ قارچی‌اند که آثار زیان‌باری بر سلامت انسان و دام می‌گذارند. قارچ‌های تولیدکنندهٔ مایکوتوکسین با توجه به کاهش کمیت و کیفیت محصول از نظر اقتصادی نیز بسیار بااهمیت‌اند. مولکول‌های توکسین‌ها نسبت به حرارت پایدارند و طی فرایندهای تهیهٔ مواد غذایی از بین نمی‌روند و سمیت خود را حفظ می‌کنند (Hazel & Patel, 2004). به منظور کاهش خطر اپیدمی فوزاریوز سنبلهٔ گندم و کاهش توکسین‌های تولیدی، روش‌های متعددی برای مبارزه با این بیماری به کار گرفته شده است. اقدام‌های متداول پیشگیری شامل مبارزهٔ زراعی،

کشت ارقام مقاوم، کنترل بیولوژیکی و استفاده از قارچ‌کش‌هاست. علی‌رغم به‌کارگیری تمام این روش‌ها برای کنترل این بیماری و گذشت بیش از یک قرن، هنوز راه‌حل مناسبی برای مهار این بیماری یافت نشده است (Parry *et al.*, 2007). بهترین راه برای جلوگیری از گسترش توکسین‌ها، محدود کردن سنتز آنها در مزرعه است. شناسایی سازوکارهای بیوشیمیایی، مولکولی و فاکتورهای تنظیم‌کنندهٔ بیوسنتز توکسین‌ها، شرط اساسی مبارزه با تولید و مدیریت آنها است (Cuomo *et al.*, 2007). قارچ *F. culmorum* جزو مهم‌ترین عوامل ایجادکنندهٔ فوزاریوز سنبلهٔ گندم و سایر غلات در سراسر جهان به شمار می‌آید. با وجود این، بخش عمده‌ای از تحقیقات انجام‌گرفته دربارهٔ این بیماری، روی گونهٔ *F. graminearum* صورت پذیرفته است و اطلاعات اندکی در خصوص این گونهٔ قارچی موجود است. روش‌های مختلف مبارزه با این بیماری در طول سالیان متمادی نتایج قابل قبولی در بر نداشته است و محدود کردن سنتز توکسین‌ها بهترین راه مبارزه با این بیماری معرفی شده است. بنابراین، مطالعهٔ ساختار ژنتیکی، چگونگی تولید مایکوتوکسین‌ها و بررسی نقش آنها در بیماریزایی *F. culmorum* اهمیت بسزایی دارد. با توجه به اینکه گندم پرمصرف‌ترین غله در سبد غذایی مردم کشورمان است و از طرفی بیماری بلایت فوزاریومی سنبلهٔ گندم از اکثر مناطق کشور گزارش شده است، متأسفانه تحقیقات اندکی دربارهٔ شناسایی عوامل مختلف ایجادکنندهٔ این بیماری و تعیین تیپ‌های شیمیایی انجام گرفته است. لذا، نتایج پژوهش حاضر برای اولین بار از ایران گزارش می‌شود.

REFERENCES

1. Adejumo, T.O., Hettwer, U. & Karlovsky, P. (2007). Occurrence of*Fusarium* species and trichothecenes in Nigerian maize. *International Journal of Food Microbiology*, 116, 350-357.
2. Bai, G.H. & Shaner, G. (1996). Variation in *F. graminearum* and cultivar resistance to wheat scab. *Plant Disease*, 80, 975-979.
3. Bakan, B., Pinson, L., Cahagnier, B., Melcion, D., Semon, E. & Richard-Molard, D. (2001). Toxigenic potential of *Fusarium culmorum* strains isolated from French wheat. *Food Additives & Contaminants*,36,998-1003.
4. Bennett, J. & Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical MicrobiologyReviews*, 16, 497-516.
5. Brown, D.W., Mccormick, S.P., Alexander, N.J., Proctor, R.H. & Desjardins, A.E. (2002). Inactivation of a cytochrome P-450 is a determinant of trichothecene diversity in "*Fusarium*" species. *Fungal Genetics and Biology*, 36, 224-233.
6. Buerstmayr, H., Steiner, B., Hartl, L., Griesser, M., Angerer, N., Lengauer, D., Miedaner, T., Schneider, B. & Lemmens, M. (2003). Molecular mapping of QTLs for *Fusarium* head blight resistance in spring wheat. II. Resistance to fungal penetration and spread. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 107, 503-508.
7. Burgess, L.W. & Gardens, R.B. (1994). *Laboratory manual for Fusarium research*.
8. Chandler, E.A., Simpson, D.R., Thomsett, M.A. & Nicholson, P. (2003). Development of PCR assays to *Tri7* and *Tri13* trichothecene biosynthetic genes, and characterisation of chemotypes of *F. graminearum Fusarium culmorum* and *Fusarium cerealis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 62, 355-367.
9. Cuomo, C.A., Guldener, U ,.Xu, J.R., Trail, F., Turgeon, B.G., Di Pietro, A., Walton, J.D., Ma, L.J., Baker, S.E. & Rep, M. (2007). The *F. graminearum* genome reveals a link between localized polymorphism and pathogen specialization. *Science*, 317, 1400-1402.
10. Eriksen, G.S&Pettersson, H. (2004). Toxicological evaluation of trichothecenes in animal feed. *Animal Feed Science and Technology*, 114, 205-239.
11. Gang, G., Miedaner, T., Schuhmacher, U., Schollenberger, M. & Geiger, H. (1998). Deoxynivalenol and nivalenol production by*Fusarium culmorum* isolates differing in aggressiveness toward winter rye. *Phytopathology*, 88, 879-884.
12. Goswami, R.S. & Kistler, H.C. (2004). Heading for disaster: *F. graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant Pathology*, 5, 515-525.
13. Haratian, M., Sharifnabi, B., Alizadeh& Safaie, N. (2008). PCR analysis of the *Tri13* gene to determine the genetic potential of *Fusarium graminearum* isolates from Iran to produce nivalenol and deoxynivalenol. *Mycopathologia*, 166, 109-116.

14. Harris, L., Desjardins, A. E., Plattner, R., Nicholson, P., Butler, G., Young, J., Weston, G., Proctor, R. & Hohn, T. (1999). Possible role of trichothecene mycotoxins in virulence of *F. graminearum* on maize. *Plant Disease*, 83, 954-960.
15. Hazel, C.M. & Patel, S. (2004)Influence of processing on trichothecene levels. *Toxicology letters*, 153, 51-59.
16. Jennings, P., Coates, M., Turner, J., Chandler, E. & Nicholson, P. (2004). Determination of deoxynivalenol and nivalenol chemotypes of *Fusarium culmorum* isolates from England and Wales by PCR assay. *Plant Pathology*, 53, 182-190.
17. Ji, L., Cao, K., Hu, T. & Wang, S. (2007). Determination of deoxynivalenol and nivalenol chemotypes of *Fusarium graminearum* isolates from China by PCR assay. *Journal of Phytopathology*, 155, 505-512.
18. Kammoun, L.G., Gargouri, S., Barreau, C., Richard-Forget, F. & Hajlaoui, M.R. (2010). Trichothecene chemotypes of *Fusarium culmorum* infecting wheat in Tunisia. *International Journal of Food Microbiology*, 140, 84-89.
19. Kim, H.S., Lee, T., Dawlatana, M., Yun, S.H. & Lee, Y.W. (2003). Polymorphism of trichothecene biosynthesis genes in deoxynivalenol and nivalenol producing *F. graminearum* isolates. *Mycological Research*, 107, 190-197.
20. Langseth, W. (1998). Mycotoxin production and cytotoxicity of *Fusarium* strains isolated from Norwegian cereals. *Mycopathologia*, 144, 103-113.
21. Marasas, W.F.O., Nelson, P.E. & Toussoun, T.A. 1984 .*Toxigenic Fusarium species. Identity and mycotoxicology*: Pennsylvania State University. 328 pp.
22. Muller, H.M., Reimann, J., Schumacher, U. & Schwadorf, K. (1997). Natural occurrence of
23. *Fusarium* toxins in barley harvested during five years in an area of southwest Germany. *Mycopathologia*, 137, 185-192.
24. Muthomi, J., Schutze, A., Dehne, H., Mutitu, E. & Oerke, E. (2000). Characterization of *Fusarium culmorum* isolates by mycotoxin production and aggressiveness to winter wheat. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 107, 113-123.
25. Nelson, P., Toussoun, T. & Marasas, W. (1983). *Fusarium species. An illustred manual for identification*.Pennslyvania State Univ. Press, University Park,193: 109-110.
26. NIcholson, P., Simpson, D., Weston, G., Rezanoor, H., Lees, A., Parry, D. & Joyce, D. (1998). Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and*F. graminearum* in cereals using PCR assays. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 53, 17-37.
27. Nirenberg, H. (1976). Studies on the biological and morphological differentiation in *Fusarium* section Liseola. *Mitt. Biol. Bundesanst. L and-u. Forstwirtsch. Berlin-Dahlem*, 169, 1-117.
28. Parry, D., Jenkinson, P. & Mcleod, L. (2007). *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals—a review. *Plant pathology*, 44, 207-238.
29. Quarta, A., Mita, G., Haidukowski, M., Santino, A., Mule, G. & Visconti, A. (2005). Assessment of trichothecene chemotypes of *Fusarium culmorum* occurring in Europe. *Food Additives and Contaminants*, 22, 309-315.
30. Sanjarian, F., Mousavi, A., Alizadeh, A., Weindorfer, H & Adam, G. (2006). Evaluation of the yeast acetyltransferase (AYT1) in detoxification of the *F. graninearum* toxin deoxynivalenol in transgenic plants. *Iranian Journal ofBiology*, 19, 223-232. (In Farsi)
31. Strub, C.,Pocaznoi, D., Lebrihi, A., Fournier, R. & Mathieu, F. (2010). Influence of barley malting operating parameters on T-2 and HT-2 toxinogenesis of *Fusarium langsethiae*, a worrying contaminant of malting barley in Europe. *Food Additives and Contaminants*, 27 ,1247-1252.
32. Yoruk, E. & Albayrak, G. (2012). Chemotyping of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* Isolates from Turkey by PCR Assay. *Mycopathologia*, 173, 53-61.