مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (38) العدد (4) 2016
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (38) No. (4) 2016

الفطريات المرافقة لحبوب الذرة الصفراء المخزونة وتقصي تلوثها بالسموم الفطرية المنتجة من الفطر *Fusariumverticillioides*(Sacc.)

الدكتور حسين الدخيل*
الدكتور أيمن العرفي**
يارا ثلاج ***

(تاريخ الإيداع 4 / 4 / 2016. قبل للنشر في 15 / 8 / 2016)

□ ملخّص □

هدفت هذه الدراسة إلى إجراء مسح للفطريات المرافقة لحبوب الذرة الصفراء المخزونة من العروة الخريفية في الموسم2011، والتركيز على الفطر *Fusariumverticillioides*، والكشف بالتحليل الكيميائي على السمومFumonisin(FUM)وzearalenone(ZEA) المنتجة من قبل الفطر *F.verticilloides* تم ذلك في ثلاثة مواقع لاستلام وتخزين الحبوب (دير الزور والرقة والحسكة). أظهرت النتائج تلوث حبوب الذرة الصفراء بنسب 28.9، 32.5 و36.4%، ونسب رطوبة الحبوب 14.3، 17.2 و18.5% على التوالي في محافظات الحسكة، دير الزور والرقة. تم التعرف على 6 أجناس فطرية مرافقة للحبوب الملوثة بنسب مئوية متفاوتة وكانت المتوسطات في المحافظات الثلاثة بالترتيب *Penicillium*(40.2%)، *Aspergillus*(37.4%)، *Fusarium* (12.6%)، *Rhizopus*(4.5%)، *Mucor* (3.8%) و *Alternaria*(1.4%). كما تبين سيادة النوع *F. verticillioides* من بين أنواع الفطر *Fusarium*spp.بمتوسطات بلغت 83.8، 78.9 و82.0% على التوالي للمحافظات الثلاث، وتراوحت كمية السم FUM(0.6- 5.3-)، (0.9 – 6.7) و(0.2- 2.3-) ملغ/كغ، في حين تراوحت كمية السم (ZEA)بين (0.2-2.1)، (0.5-7.6) و(0.03-0.8) ملغ/كغ على التوالي في محافظات دير الزور، الرقة والحسكة. وتبين التحاليل بوساطة الكروماتوغرافيا أن 42 عزلة من أصل 60 عزلة من *F. verticillioides*تمتلك قابلية إنتاج السم (FUM) بنسب بلغت 70%، 80% و60% في المحافظات الثلاثة.

الكلمات المفتاحية: الذرة الصفراء، فطريات المخازن، *Fusarium*spp.، *Fusariumverticillioides*، Fumonisin(FUM)، Zearalenone(ZEA).

* أستاذ -أمراض النبات - كلية الزراعة- جامعة الفرات- دير الزور- سورية.
** أستاذ مساعد-أمراض النبات - كلية الزراعة- جامعة الفرات- دير الزور- سورية.
*** طالبة دراسات عليا (دكتوراه)- قسم وقاية النبات - كلية الزراعة- جامعة الفرات- دير الزور- سورية.

مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (38) العدد (4) 2016
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (38) No. (4) 2016

Mycoflora Associated with MaizeGrains Stored and mycotoxin contamination produced by *Fusariumverticillioides* (Sacc.)

Dr. Hussein Aldakhil*
Dr. AemanAlorfee**
IaraThalaj***

(Received 4 / 4 / 2016. Accepted 15 / 8 /2016)

□ ABSTRACT □

This study was carried out to survey the mycoflora of maize grain stored in the autumn season in 2011. Special attention to was paid to *Fusariumverticillioides* and detection of chemical analysis on the toxins Fumonisin(FUM) and zearalenone (ZEA) produced from *F.verticilloides* in three locations for the receipt and storage of grain in Deirezzor and Raqqa and Hasaka. The results showed that maize kernels discolored in rate of between 28.9, 32.5 and 36.4% respectively in Hasaka, Deirezzor and Raqqa. There was a positive coloration between maize kernels discolored and grain moisture percent. Microbial analysis showed associated fungi were *Penicillium* spp. (40.2%), *Aspergillus* spp. (37.4%), *Fusarium*spp. (12.6%), *Rhizopus* spp. (4.5%), *Mucor* spp. (3.8%) and *Alternaria* spp. (1.4%). *F. verticillioides* was the most frequency of *Fusarium* spp. Rates 83.8, 78.9 and 82.0% respectively in Deirezzor, Raqqa and Hasaka.Toxins (FUM) in Deirezzor was between 0.6 -5.3 mg / kg, and between 0.9 - 6.7 mg / kg in Raqqa, and from 0.2 to - 2.3 mg / kg in Hasaka, while Toxins (ZEA) were between 0.2-2.1, -0.5 7.6 and 0.03-0.8 mg / kg respectively in the three locations.Chromatographic analysis showed that the isolation of 42 out of 60 isolates of *F. verticillioides* was producing Toxins (FUM), were more isolates producing isolates Raqqa by 80%, in Deirezzor 70% and 60%. In Hasaka.

Key words: maize, Storage fungi, *Fusarium* spp. , *Fusariumverticillioides*, (FUM) Fumonisin, Zearalenone (ZEA).

***Professor , Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture Sciences - Al furat University, Der Alzor, Syria.**
****Associate Professor , Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture Sciences - Al furat University, Der Alzor, Syria.**
*****Postgraduate student , Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture Sciences - Al furat University, Der Alzor, Syria.**

مقدمة:

تعد الذرة الصفراء من أهم المحاصيل الحقلية متعددة الاستخدام في العالم بما في ذلك سورية (Bello *et al*., 2012). وبلغ الإنتاج العالمي من الذرة الصفراء 970.08 مليون طن محتلة بذلك المرتبة الثالثة بعد القمح والأرز(FAOSTAT, 2015). فيما كان في سورية 257.7 ألف طن تقريباً، وتأتي محافظة دير الزور بالمرتبة الثالثة بعد حلب والرقة بنسبة 20% من المساحة الإجمالية في القطر (وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي، 2012). تتعرض الذرة الصفراء إلى أضرار عديدة نتيجة إصابتها بالفطريات أثناء نموها في الحقل، أو خلال تداولها ونقلها، أو عند تخزينها إذا لم تجفف بعد الحصاد بشكل كاف (Munkvold, 2014). ورغم أن الإصابة بالحشرات هي السبب الرئيس الأول في الخسائر الحبية للمحصول (Gwinner*et al*., 1996)، إلا أن الفطريات تأتي بالمرتبة الثانية من حيث التسبب بخسائر هامة ومباشرة في الإنتاج الحبي وتدهور زراعة الذرة الصفراء في العالم (Ominski*et al*., 1994). ويذكر Kossouو Aho (1993) أن العوامل الفطرية الممرضة يمكن أن تتسبب بأضرار تتراوح بين 50 إلى 80% في ظروف التخزين غير المناسبة. وتعد أجناس الفطريات *Aspergillus* spp. ،*Fusarium* spp. و*Penicillium* spp.من أهم المسببات المرضية للذرة الصفراء في المناطق المدارية والمعتدلة في العالم (Samson 1991; Orsi*et al*.; 2000, El-Shabrawy, 2001; Madbouly*et al*., 2012). ولا تقتصر أضرار إصابة حبوب الذرة الصفراء بهذه الفطريات الممرضة بجعلها غير صالحة للاستهلاك البشري عن طريق تغير لونها أو الحد من قيمتها الغذائية، وإنما في إنتاجها لمجموعة كبيرة من السموم الفطرية Mycotoxinsالتي تلوث المنتجات الغذائية والعلفية وتشكل خطورة كبيرة على الإنسان والحيوانات المنزلية (Suleiman *et al*., 2013). تعرف بعض أنواع الفطر *Fusarium* spp. عادة كمسببات مرضية لحبوب الذرة الصفراء أثناء نموها في الحقل، ومن أهمها الفطر *Fusariumverticillioides*(Sacc.) Nirenberg = *Fusariummoniliforme*Shela وطوره الجنسي*Gibberellafujikuroi* (Sawada) Wollenwالمسبب لمرض عفن العرانيس والساق(Vigier*et al*., 1997). إلا أن هذه الأنواع يمكنها أن تستمر بالنمو والتطور في الحبوب المصابة بعد الحصاد وتخزينها عند محتوى رطوبي يزيد عن 13–14%، منتجة عدة أنواع من السموم الفطرية الخطيرة على الإنسان والحيوان(Scauflaire*et al*., 2011; Wang *et al*., 2014)، من أهمها Ochratoxin ,zearalenoneو fumonisins(Leslie *et al*, 2005)، حيث يؤدي استهلاك حبوب الذرة الملوثة بهذه الأنواع من السموم إلى مشاكل صحية خطيرة منها سرطان المريء عند الإنسان (Chu and Li ,1994)، وحدوث عيوب في الجهاز العصبي للأطفال حديثي الولادة (Reid *et al*., 1999)، كما تتسبب بأعراض مرضية خطيرة وأحياناً مميتة لعدة أنواع من الحيوانات كالخنازير والخيول والطيور(Nelson *et al*., 1993).

أهمية البحث وأهدافه:

يهدف هذا البحث إلى حصر الأنواع الفطرية المرافقة لحبوب الذرة الصفراء من العروة الخريفية في ظروف التخزين في محافظات دير الزور والرقة والحسكة، وتقصي تلوثها بالسموم الفطرية، وتحديد نسب إصابة الحبوب بالفطر *F.verticillioides*واختبار قابلية عزلات الفطر على إنتاج السموم fumonisins في ظروف الإنتاج المثالية مخبرياً*in vitro*.

طرائق البحث ومواده:

جمع العينات:

تم جمع العينات عشوائياً في الفترة 10–2011/12/20 من الذرة الصفراء محلية المنشأ، والمخزنة بعد تجفيفها هوائياً في العراء من العروة الخريفية في الشهرين العاشر والحادي عشر للموسم 2011 من محافظات دير الزور والرقة والحسكة. المخازن بدائية دون أي أجهزة تحكم بالحرارة والرطوبة فيما تتم عملية التهوية بالنوافذ وشفاطات الهواء، وذلك بواقع 10 عينات من كل محافظة من 5 أماكن مختلفة ضمن المخزن الواحد (مراعاة أماكن تنضيد الأكياس المكدسة عمودياً على أرضيات أسمنتية أو ترابية) وبمعدل 2 كغ لكل عينة (تمثل 10 طن بوساطة المسبر المعدني اليدوي من ثلاثة أماكن مختلفة ضمن الكيس الواحد)، ووضعت كل عينة في كيس بلاستيكي(الجنفيص) مع بطاقة تعريف تتضمن موقع الجمع ورقم العينة، جلبت العينات إلى المخبر مباشرة، وبعد مجانسة عينات كل محافظة أخذت منها ثلاث عينات عشوائية لأغراض التحليل الفطري وتقدير المحتوى المائي والتحليل الكيميائي بواقع 1كغ/عينة. تم الكشف عن الفطريات المرافقة والمحتوى المائي مباشرة، أما العينات الخاصة بالتحليل الكيميائي للكشف عن السموم الفطرية فتم حفظها في الثلاجة بدرجة حرارة 5 °س لحين التحليل.

أخذت 10 عينات بواقع 200 حبة/عينة عشوائياً من كل محافظة لحساب نسبة الحبوب الملوثة والملونة بصورة غير طبيعية Discoloration. وتم تقدير المحتوى الرطوبي في عينات الحبوب السابقة من المحافظات الثلاثة بوساطة فرن الميكروويف من نوع LG 250 W ، حيث وزع 100 غ من عينة حبوب الذرة على طبق ورقي جاف تم وزنه مسبقاً، ووضع كوب زجاجي يحتوي على 200 مل ماء(ثلاثة أرباع حجمه) في الزاوية الخلفية من الفرن لحماية مغناطيسية الفرن عند انخفاض رطوبة العينة، وتم معايرة طاقة الفرن على 50% من الطاقة القصوى والتشغيل لفترتين مدة كل منها 5 دقائق وهو ما يعادل درجة حرارة 105°س لمدة ساعة واحدة في الفرن الحراري الهوائي وفق (Gunasekaran,1990) وذلك حسب المعادلة التالية:

$$\text{نسبة الرطوبة \%} = B-C \div B-A \times 100$$

حيث: **A** = وزن طبق الورق الفارغ (غ). **B**= الوزن الرطب للعينة + وزن طبق الورق الفارغ (غ).**C** = الوزن الجاف للعينة + وزن الطبق الورقي الفارغ (غ).

عزل الفطريات:

عقمت 100 حبة سطحياً من كل عينة بالغمر في محلول هيبوكلوريت الصوديوم (2%) في دوارق مخروطية 250 مل لمدة دقيقة واحدة، ثم غسلت بالماء المعقم ثلاث مرات، جففت بورق ترشيح معقم، وزرعت في أطباق بتري 9 سم تحتوي على البيئة الغذائية بطاطا دكستروز آغار PDA المعاملة بالمضاد الحيوي chloramphenicol (125 ملغ/ل)، وذلك بواقع 7 حبوب / طبق، وبمعدل 5 أطباق لكل عينة. حضنت الأطباق لمدة 5 –7 أيام بدرجة حرارة 25± 2°س (Watanabe, 2002). نقيت الفطريات المرافقة للحبوب بطريقة التخطيط Streak Method حيث تم نشر وتخطيط جزء من نموات كل مستعمرة فطرية متمايزة وبمعدل ثلاث مكررات لكل عينة (5 أطباق لكل مكرر) بواسطة إبرة تلقيح معقمة على اللهب ضمن غرفة العزل في أطباق بتري تحتوي على 20غ مستنبت الشعير بصورة متعرجة من أعلى الطبق باتجاه الأسفل، حضنت الأطباق لمدة 5 - 7 أيام بدرجة حرارة 25± 2°س (Clyde *et al*,1965). وتم الحصول على المزارع الفطرية وحيدة البوغ باستخدام تقنية البوغ المفرد Single Sporeبأخذ حمولة إبرة تلقيح معقمة على اللهب من كل مزرعة فطرية منشورة على مستنبت الشعير المعامل ب150 ملغ سلفات

الستربتومايسين /لتر مستنبت، وتخفيفها في 5 مل ماء مقطر ومعقم في أنابيب اختبار معقمة وخلطها بشكل متجانس في ظروف غرفة العزل. صب المعلق البوغي في أطباق بتري تحتوي على الآغار المائي وتركت حوالي 3−5 دقائق للتخلص من الماء الزائد وحضنت مدة 12-15 ساعة بدرجة حرارة 25± 2°س بصورة مائلة بدرجة 45° للسماح للمعلق البوغي بالتدفق للجانب الآخر من الطبق البتري وللحصول على كثافات متدرجة من الأبواغ، وبعد مرور فترة الحضانة وإنبات الأبواغ تم نقل جزء صغير منها بوساطة إبرة التلقيح المعقمة إلى شرائح زجاجية في قطرة ماء مقطر ومعقم ضمن شروط العزل وفحصت بالمجهر على التكبير ×20 ونقل بوغ مفرد(من كل جنس فطري) وزرع في منتصف الطبق البتري الحاوي على مستنبت Czapeck-Dox أو بيئة PDAالمعاملة ب150 ملغ سلفات الستربتومايسين /لتر مستنبت، وبمعدل ثلاث مكررات لكل جنس فطري (3 أطباق في المكرر الواحد)، وحضنت الأطباق لمدة 5 - 7 أيام بدرجة حرارة 25± 2°س للحصول على مزارع فطرية نقية للتشخيص والتصنيف إلى مستوى الجنس(Choi *et al*,1999). تم تحديد الأجناس الفطرية وفقاً لخصائصها المزرعية والشكلية ومقارنتها مع المفاتيح التصنيفية المتخصصة(Raper and Fennell 1977; Booth,1971; Samson *et al*.,1984; Watanabe,2002).ومن ثم حسبت نسبة تكرار كل فطر في عينات كل محافظة على حدة . كما حسبت النسبة المئوية لتردد نوعي الفطرين *F.verticillioides* و *F. graminearum*باعتبارهما الفطرين الممرضين السائدين في المزارع الفطرية الأولية المتمايزة وفقاً لخصائصها المزرعية الشكلية (معدل نمو ولون المستعمرة، وطبيعة نمو المشيجة الهوائية وتطور ألوانها خلال فترة النمو، أما المواصفات البيومترية فتمت استناداً لشكل الحوامل البوغية والأبواغ الكونيدية الكبيرة والصغيرة وقياساتها وعدد الحواجز، إضافة إلى وجود الأبواغ الكلاميدية أو غيابها بعد 10 أيام من التحضين في بيئة PDA، وذلك بتخفيف حمولة إبرة تلقيح معقمة على اللهب من مستعمرة الفطر بعمر 10 أيام في 5 مل ماء في أنبوب اختبار ومجانستها بالخلط المستمر، ثم أخذ بالماصة الميكرومترية (Pipette) 0.5 مل من المعلق البوغي ووضع في وسط شريحة زجاجية يحتوي على نقطة لاكتوفينول وتم قياس الأبواغ الكونيدية بأنواعها المختلفة بالمجهر الضوئي تحت التكبير× 40 بوساطة الشريحة الميليمترية(stage micrometer)، وتم اعتبار المستعمرات الفطرية المخالفة لهذه المواصفات أنواع أخرى تتبع للجنس *Fusarium* spp. وذلك عند مقارنتها مع المفاتيح التصنيفية المتخصصة(Booth,1971; Nelson *et al*,1983; Leslie and Summerell,2006).

تحديد محتويات حبوب الذرة الصفراء من السمين الفطرين Zearalenone and fumonisins:

تم تحديد نوع السم Zearalenoneفي عينات الذرة الصفراء وفقاً للطريقة الموصوفة من قبل Gallagher and Latch (1977) وباستخدام مجموعة تقنيات AOAC (1995). حيث أخذ 10 عينات متجانسة من كل محافظة بواقع 100 غ/حبوب مطحونة بوساطة مطحنة حبوب كهربائية، خلطت بوساطة خلاط كهربائي مع 200 مل من الميثانول والماء بنسبة 8:2 حجم/ حجم لمدة 3 دقائق بسرعة 1800 دورة/دقيقة، رشح المستخلص من خلال ورق ترشيح (Whatman No. 2)، أخذ 50غ من الرشاحة وأضيفت إلى 50 مل من محلول التنظيف(clean up solution) بوجود 150 غ من كبريتات الزنك و50 غ من phosphotungestic acid في لتر واحد من الماء المقطر، أخذ من الخليط 250 مل وحرك بوساطة قضيب زجاجي لمدة 10 دقائق، ثم تم تصفية الخليط مرة واحدة بوساطة ورق ترشيح قياس 4، وضع 75 مل من المستخلص مع 15 مل من البنزين لمدة دقيقة واحدة، تم صب الخليط في أنبوب زجاجي للتخلص من البنزين ومن ثم جفف المستخلص أمام تيار من النتروجين بدرجة حرارة المخبر، وللكشف عن السم تم تسليط ضوء الأشعة فوق النفسجية على الفلم الجاف(أوراق مفسفرة) أثناء تحرك الألواح الرقيقة

لجهاز الكروماتوغرافي (TLC) المحملة على امتدادها بنقاط من مستخلص السم، حيث يمتص الفلم الجاف مركبات السم ويترك بقعاً داكنة اللون عليه للاستدلال على وجود السم. أما بالنسبة لتحديد السموم fumonisinsفي عينات الذرة الصفراء من المحافظات الثلاثة فتم وفق طريقة Ross وآخرون(1990) حيث أخذ 100 غ من حبوب الذرة المطحونة في دورق سعة 250 مل، وأضيف إليه 100 مل من محلول acetonitrile : ماء بنسبة 1 : 1 حجم/حجم ووضع في الهزاز لمدة 60 دقيقة، رشح 50 مل من المحلول خلال ورق الترشيح)، ثم وضع الراشح في قمع فصل وأضيف إليه 100 مل من n-hexane ورج المحلول جيداً وترك ليتم الفصل وجمعت الطبقة المائية السفلى ووضعت في دورق سعة 100مل، سحب 10 مل من المحلول السابق وأضيف إليه 100 مل من الماء المقطر وحقن في علبة الفصل. غسلت العينة بوساطة 4 مل من الماء المقطر ثم 4 مل من المحلول acetonitrile : ماء بنسبة 80 : 20 حجم/حجم، تم تحرير السموم (FUM)بحقن 4 مل من محلول acetonitrile : ماء بنسبة 70 : 30 حجم/حجم، جمع الناتج في عبوات زجاجية صغيرة وجفف في حمام مائي بدرجة حرارة 70°س ، ثم أذيب 10 مل من المستخلص في محلول acetonitrile : ماء بنسبة 1 : 1 حجم/حجم ووضع في عبوات زجاجية في الثلاجة لحين المعايرة والكشف.

معايرة السموم الفطرية المستخلصة Preparation of Mycotoxins Standards:

تم معايرة السم Zearalenone بإذابة مستخلصه بالمحلول العضوي benzene-acetic acid بنسبة 99 : 1 حجم/حجم للحصول على التركيز المطلوب بوساطة مقياس الطيف الضوئي على طول موجي أقصى 317 نانومتر باستخدام المعادلة: **Zearalenone (µg/mL) = A x MW x 100 0 x CF/ E**

حيث: A = الامتصاص في الطول الموجي الأقصى. MW= الوزن الجزيئي للسم Zearalenone. CF= معامل تصحيح ثابت. E = معدل الامتصاصية للسم Zearalenone في المحلول benzene -acetonitrile 99 : 1 حجم/حجم. تم تعديل التركيز الناتج للوصول إلى مستخلص قياسي بتركيز 0.5 ميكروغرام Zearalenone/مل من المذيب.(مستخلص قياسي).وبالنسبة للسموم(fumonisins) فقد تم إذابة مستخلصاتها في محلول من الميثانول والماء بنسبة 8 : 2 حجم/حجم، وحضر مستخلص قياسي بتركيز0.5 ميكروغرام/مل من المذيب بالطريقة السابقة.

التحليل الكمي Quantitative Analysis:

تم التحليل الكمي وفقاً طريقة AOAC(1995)، حيث صب في قاع الوعاء الكروماتوغرافي مذيب من خليط الكلوروفورم والأسيتون بنسبة 9 : 1 حجم/حجم حتى عمق1 سم وغطي الوعاء بإحكام، ذوب المستخلص القياسي للسم Zearalenoneوالذي تم الحصول عليه سابقاً في 200 مل من benzene-acetic acidبنسبة 99 : 1 حجم/حجم، رسم بالقلم خط يبعد حوالي 2 سم عن الحافة السفلية من اللوح الكروماتوغرافي، ثم أخذ ت 20 ميكرولتر من كل محلول للسم الفطري Zearalenone ونقط بالماصة الميكرولترية على امتداد اللوح وكذلك من المحلول القياسي للسم، وضع اللوح في الوعاء وترك حتى جفاف المذيب، وتم التعرف على السم باستخدام مقياس شدة الأشعة فوق البنفسجية (Fluoro-densitometer) بكثافة 100 Vitatron، أما بالنسبة للسموم (fumonisins) فقد تم إذابة مستخلصاتها في محلول من الميثانول والماء بنسبة 8 : 2 . وتم تحديد كمية السموم عن طريق المقارنة بين قراءة قياس شدة الأشعة فوق البنفسجية في كل عينة مع محلولها القياسي باستخدام المعادلة التالية: **µg/g = S.Y.V/ X .W** . حيث: **S** = (µl) من مستخلص السموم mycotoxin المجهول التركيز. **Y** = تركيز مستخلص السموم mycotoxin القياسي (µg/mL). **V** = معامل التخفيف (µl). **X** = (µl) من مستخلص العينة وفق قياس شدة الأشعة فوق البنفسجية. **W** = الوزن بالغرام من العينة الأصلية للمستخلص النهائي. وتم تعديل كميات السموم المسجلة إلى mg/kg.

اختبار قابلية الفطر *F. verticillioides* لإنتاج السم fumonisins:

لاختبار قابلية الفطر *F.verticillioides* على إنتاج السم fumonisins تم اختيار 20 مستعمرة من مستعمرات الفطر النقية والمعزولة سابقاً من عينات حبوب الذرة الصفراء في كل محافظة، وتم تسميتها على أساس الموقع وأعطيت أرقام متسلسلة، وضع 100 غ من الرز في دوارق زجاجية مخروطية سعة 250 مل، وأضيف إليها 75 مل ماء مقطر، تركت لمدة ساعتين ثم عقمت بالأوتوكلاف بدرجة حرارة 121°س وضغط 1.5كغ/سم^2 لمدة 20 دقيقة ، بعد التبريد لقح وسط الرز في كل طبق بقرص 1 سم من كل مستعمرة من مستعمرات الفطر النقية باستعمال ثاقب الفلين مع التحريك المستمر لتوزيع اللقاح الفطري بشكل متجانس، حضنت الدوارق لمدة 3 أسابيع بدرجة حرارة 25± 2°س لمدة 7 أيام، بعد ذلك خفضت إلى 13± 2°س في الأسبوعين الآخرين، طحنت محتويات الدوارق كل على حدة بالخلاط الكهربائي(الهيتي،1992). تم استخلاص السموم fumonisins من مزارع الفطر على وسط الرز حسب طريقة Desjardins وPlattner(1994) كما يلي: أخذ 10 غ من المادة المطحونة ووضعت في خلاط كهربائي وأضيف لها 50 مل من محلول acetonitrile : ماء بنسبة 1: 1 حجم/حجم، نقل الخليط إلى دورق مخروطي سعة 250 مل، وأغلق بسدادة من ورق الألمنيوم، ووضع في الهزاز لمدة 3 ساعات، رشح المستخلص خلال ورق ترشيح (Whatman No. 2)وجمع منه أنبوبة صغيرة ووضع في المجمدة. وتم الكشف عن السموم fumonisins باستخدام ألواح الكروماتوغرافي الرقيقة (TLC)، حيث أذيب جزء من المستخلص في محلول من الميثانول والماء بنسبة 8 : 2 حجم/حجم ، وتم تنقيط عدة بقع على اللوح الكروماتوغرافي ثم جفف هوائياً، ومن ثم رشت البقع بمحلول 0.5% من الميثانول وحمض الخليك وحمض الكبريت بنسب 85 : 10 : 5 حجم/حجم/حجم وسخن برجة 110°س لمدة 10 دقائق حيث تبدو بقع السموم fumonisins بلون أرجواني محمر متوهج (متألق) تحت ضوء الأشعة فوق البنفسجية بشدة 366 نانومتر(nm).

النتائج والمناقشة:

تبين النتائج في الجدول (1) وجود فروق معنوية بين متوسطات نسبة الرطوبة في الحبوب المجموعة من محصول العروة التكثيفية المخزنة في محافظة الحسكة مقارنة بمحافظتي دير الزور والرقة، ويلاحظ ارتفاع نسبة المحتوى المائي في هذه الحبوب وبشكل يفوق نسبة رطوبة الحبوب المثالية التي يفترض التخزين عليها والتي يجب ألا تزيد عن 13–14% لمنع نشاط الفطريات في المخازن، حيث تراوحت بين 14.3 في الحسكة و 18.5 في الرقة فيما كانت 17.2% في دير الزور(Amadi and Adeniyi,2009). كما يتبين في الجدول ذاته أن هناك فروقاً معنوية واضحة بين متوسطات نسبة التلوث الظاهري في عينات الحبوب بين الحسكة والرقة من جهة وبين الحسكة ودير الزور من جهة أخرى، في حين لم تسجل فروق معنوية بين دير الزور والرقة، وسجل تناسباً طردياً بين ارتفاع نسبة رطوبة الحبوب ونسبة التلوث والتلون غير الطبيعي فيها، حيث كانت النسب 28.9، 32.5 و36.4% في محافظات الحسكة، دير الزور والرقة على التوالي، ويرجع ذلك إلى ازدياد نشاط كثير من الفطريات وخاصة الرمية ونصف الطفيلية التي يتطلب نموها توفر درجات معينة من الرطوبة في الحبوب مثل أنواع الفطرين *Aspergillus*spp. و*Penicillium*spp.، وتتسبب هذه الفطريات في تغيير لون الحبوب نتيجة تأثيرها في محتوى هذه الحبوب من صبغة الكاروتين مما يفقدها قيمتها التسويقية بشكل كبير(Samson,1991).

الجدول(1): متوسط نسبة الرطوبة والتلوث الظاهري في عينات حبوب العروة التكثيفية من الذرة الصفراء المخزونة في محافظات دير الزور، الرقة والحسكة

الموقع	نسبة الرطوبة في الحبوب، %	نسبة التلوث والتلون الظاهري في الحبوب، %
ديرالزور	17.2	32.5
الرقة	18.5	36.4
الحسكة	14.3	28.9
LSD 0.05	2.04	4.78

أظهرت نتائج الكشف عن الفطريات في عينات الذرة الصفراء في المحافظات الثلاثة وجود 6 أجناس فطرية بنسب متباينة، (الجدول 2) وكانت المتوسطات في المحافظات الثلاثة بالترتيب *Penicillium*spp. (40.2%)، *Aspergillus*spp. (37.4%)، *Fusarium*spp. (12.6%)، *Rhizopus*spp. (4.5%)، *Mucor*spp. (3.8%) و *Alternaria*spp. (1.4%) ونلاحظ وجود فروق معنوية بين أجناس الفطريات الثلاثة الأولى(*Penicillium,Aspergillus,Fusarium*) وبقية الأجناس الأخرى من جهة، وبين معظم متوسطات وجود هذه الأجناس على مستوى المحافظة الواحدة من جهة أخرى،

الجدول(2): النسب المئوية لأجناس الفطريات المرافقة لحبوب العروة التكثيفية من الذرة الصفراء المخزونة في محافظات ديرالزور، الرقة والحسكة، الموسم 2011

الفطريات	*Aspergillus*	*Penicillium*	*Fusarium*	*Rhizopus*	*Mucor*	*Alternaria*
ديرالزور	38.4	35.7	13.8	4.9	4.6	2.6
الرقة	42.7	29.7	16.2	5.8	3.8	1.8
الحسكة	31.3	54.8	7.9	3.0	3.0	0.0
المتوسط	37.4	40.2	12.6	4.5	3.8	1.4
LSD 0.05	2.89	4.34	1.64	1.21	1.01	1.12

وتتطابق هذه النتائج مع دراسات كثيرة من حيث كون الأجناس الفطرية المسجلة في هذه الدراسة هي فطريات مخازن نموذجية تم رصدها في مختلف دول العالم (الطحلي وآخرون، 2015؛ Samson,1991؛ Proctor *et al*,1994). ويمكن تفسير تباين نسب وجود هذه الفطريات إلى اختلاف النضج الفيزيولوجي للأصناف المزروعة، ودرجة إصابتها بالأمراض والحشرات، وتوقيت الحصاد و ظروف ما بعد الحصاد مثل التجفيف، الفرز والنقل وتوفر الشروط المناسبة أثناء التخزين ونظافة المخازن في كل محافظة، إذ أن معظم هذه الفطريات تنتشر بالهواء، وتتواجد في أماكن كثيرة من البيئة المحيطة بصورة طبيعية وتصيب حبوب الذرة الصفراء عندما تتوفر لها الظروف البيئية المناسبة وخاصة درجتي الرطوبة والحرارة، إضافة إلى أن أنواع الفطر *Fusarium* spp. تصيب حبوب الذرة الصفراء أثناء نمو المحصول في الحقل ويمكن أن تستمر في نشاطها في مراحل ما بعد الحصاد والخزن(Samson,1991; Hall,

1996; Orsi*et al*.,2000; El-Shabrawi,2007; EL-Sheikh *et al*.,2009; Channaiah and Maier, 2014; Sally *et al*.,2015).

ومما يسترعي الانتباه في هذه النتائج ارتفاع نسبة تلوث حبوب الذرة الصفراء بالفطر *Fusarium*spp. وبنسب متباينة بصورة معنوية بين المحافظات الثلاثة حيث كانت 13.8، 16.2 و7.9% في دير الزور والرقة والحسكة على التوالي، وبمتوسط عام بلغ 12.6%، (الجدول 2). ويرجع ذلك إلى كون أنواع الفطر المذكور هي فطريات طفيلية قادرة على مهاجمة محصول الذرة في الحقل والمخزن، إضافة إلى قابليتها لإنتاج مجموعة من السموم الفطرية الخطيرة مثل Fumonisinو Zearalenone وذلك في كلا المرحلتين على حد سواء(Doko*et al*., 1995; Marasas, 2001; Lorenzo *et al*., 2011).

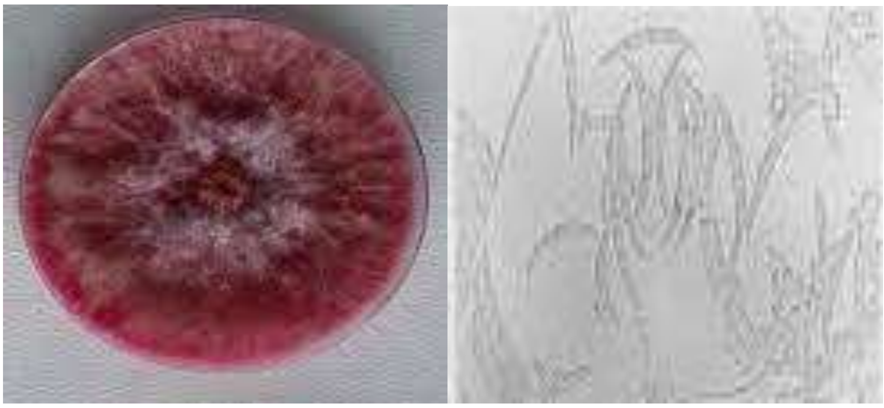
وتبين النتائج في (الجدول 3) نسبة تردد أنواع الفطر *Fusarium* spp. في عينات الذرة الصفراء الملوثة بالفطر في المحافظات الثلاثة، حيث نلاحظ سيادة النوع *F. verticillioides* المسبب لمرض عفن العرانيس والساق ولفحة البادرات وبمتوسطات بلغت 83.8، 78.9 و82.0% على التوالي في دير الزور، الرقة والحسكة ، في حين سجلت نسب تردد منخفضة للنوع *F. graminearum* المسبب لمرض عفن العرانيس القرمزي كانت أعلاها في محافظة الرقة وبلغت 6.6%. وتوضح (الصورة 1) و(الجدول 4) الخصائص المزرعية والشكلية والقياسات البيومترية للأبواغ الكونيدية الكبيرة والصغيرة للفطرين الممرضين بعد 10 أيام من التحضين، ويتطابق ذلك مع المواصفات الواردة في المفاتيح التصنيفية (Nelson *et al*,1983; Leslie and Summerell,2006). وتتوافق هذه النتائج مع الدراسات الخاصة بالانتشار الجغرافي للفطر في العالم، والذي يتركز في المناطق الدافئة (Logrieco*et al*., 2002)، وفي المناطق المدارية وشبه المدارية الرطبة (Marasas*et al*., 1984)، وتفيد بعض المراجع بانتشاره أيضاً وبشكل أكثر وبالاً من حيث قدرته على إنتاج السموم الفطرية في المناطق الحارة والجافة (Cantalejo*et al*., 1998)، فيما يناسب الفطر *F. graminearum* المناطق المعتدلة الباردة (Logrieco*et al*., 2002; Munkvold, 2003).

الجدول(3): النسبة المئوية لتردد أنواع الفطر *Fusarium*spp. في عينات الذرة الصفراء الملوثة

الموقع	*F. verticillioides*	*F. graminearum*	*Fusarium*spp.
ديرالزور	83.8	2.7	13.5
الرقة	78.9	6.6	14.5
الحسكة	82.0	2.3	15.7

ولذلك تم دراسة معدلات تلوث هذه العينات بأنواع الفطر *Fusarium* spp. في المحافظات الثلاثة من خلال الأعراض الظاهرية المميزة للمرض وخاصة تلون الحبوب باللون الزهري أو القرمزي، والخطوط البيضاء على البشرة

A B



CD

الصورة(1): A- مستعمرة الفطر *F. verticillioides* بعمر 10 أيام على بيئة PDA. B- الأبواغ الكونيدية الكبيرة والصغيرة للفطر *F. verticillioides*C - مستعمرة الفطر *F. graminearum* بعمر 10 أيام على بيئة PDA. D- الأبواغ الكونيدية الكبيرة للفطر *F. graminearum*.

الخارجية للحبوب(Marasas.,2001; Munkvold, 2003)، وكميات أهم السموم الفطرية التي تنتجها في (الجدول5)، بلغت نسبة العينات الملوثة بالسم Fumonisin 80% بمدى تراوح بين 0.6 - 5.3 ملغ/كغ في دير الزور، وفي الرقة كانت نسبة العينات الملوثة أكبر(90%) وكذلك نطاق كميات السم فيها 0.9 -6.7 ملغ/كغ، في حين انخفضت نسبة العينات الملوثة في الحسكة إلى 60% ، بنطاق سمي 0.2-2.3 ملغ/كغ. وبشكل عام كانت متوسطات كميات السم Fumonisinأعلى من الحدود المسموح بها عالمياً في حال استخدام هذه الحبوب في الصناعات الغذائية المعدة للاستهلاك البشري، في حين يقع معظمها ضمن الحدود الدولية التي يسمح بها عند إعدادها كأعلاف حيوانية باستثناء عينات محدودة في محافظتي دير الزور والرقة تجاوزت كمية السم فيها الحدود المسموح بها عالمياً وكانت 5.3 و6.7 ملغ/كغ وذلك وفق اللائحة الأميركية FDA(2001) والبالغة 3ملغ/كغ،

الجدول(4): الخصائص المزرعية والشكلية والبومترية للفطرين

F. verticillioides و F. graminearum على بيئة PDA بعد 10 أيام من التحضين.

الفطر	معدل نمو المستعمرة	طبيعة نمو المشيجة وألوانها	الأبواغ الكونيدية الكبيرة	الأبواغ الكونيدية الصغيرة	الأبواغ الكلاميدية
F. verticillioides	سريع (6-8سم) بعد 7 أيام من التحضين	هوائية كثيفة يتدرج لونها من الأبيض إلى اللون الكريمي ثم البرتقالي الفاتح بعد 10 أيام من التحضين	طويلة، ذات نهايات مستدقة ومعقوفة، مقسمة بحواجز عرضية(3-5)، تتكون عل خيوط هيفية، طولها 30-55 ميكرون (متوسط 100 بوغ)	أحادية أو ثنائية الخلية، طولها 6-9 ميكرون (متوسط 100 بوغ)	غيرموجودة
F. graminearum	سريع (5-7سم) بعد 7 أيام من التحضين	هوائية كثيفة يتدرج لونها من الأبيض إلى اللون البرتقالي الشاحب والزهري الغامق المحمر بعد 10 أيام من التحضين	هلالية الشكل مدببة، تحتوي من 5-6 حواجز عرضية، وهي شفافة تعطي عند تجمعها لوناً زهرياً محمر، تتكون على خيوط أو وسائد هيفية، طولها 42-64 ميكرون (متوسط 100 بوغ)	غائبةأونادرةالتشكل	غيرموجودة

وكذلك الأوربية 4ملغ/كغ (EFSA, 2014). في حين كانت نسب عينات حبوب الذرة الملوثة بالسم Zearalenone 70،80 و40 % في دير الزور، الرقة والحسكة على التوالي، وتراوح مدى السم في دير الزور بين 0.2 -2.1 ملغ/كغ، وفي الرقة 0.5 -7.6 ملغ/كغ، وفي الحسكة 0.01 –0.8 ملغ/كغ، وتعد متوسطات هذه النسب إجمالاً مرتفعة باستثناء عينات الحسكة، وتتجاوز الحدود المسموح بها عالمياً والبالغة 0.1 ملغ/كغ وفق اللائحة الأوربية سواء لحبوب الذرة المعدة للاستهلاك البشري أو الحيواني(EC, 2007).

الجدول (5): نسبة عينات حبوب الذرة الصفراء الملوثة ومتوسط كميات السموم FumonisinوZearalenone

المحافظة	عدد العينات	نسبة العينات الملوثة بالسم، %	مدى كمية السم في العينات (ملغ/كغ)	المتوسط (ملغ/كغ)
Fumonisinملغ/كغ				
ديرالزور	10	80	5.3-0.6	1.2
الرقة	10	90	6.7-0.9	1.8
الحسكة	10	60	2.3-0.2	1.0
Zearalenone (ملغ/كغ)				
ديرالزور	10	70	2.1-0.2	0.5

الرقة	10	80	7.6–0.5	0.9
الحسكة	10	40	0.8–0.01	0.03

ويعود تباين كميات السموم في حبوب الذرة الصفراء بين المحافظات الثلاثة إلى اختلاف ظروف نمو المحصول في كل محافظة من حيث العوامل البيئية خاصة درجة الحرارة والرطوبة، فقد وجد أن إجهاد الجفاف للنباتات يناسب الفطر *F. verticillioides* بشكل واضح ويزيد من قدرته على إفراز السموم الفطرية(Marin *et al.*, 1995; Reid *et al.*, 1999 ;Munkvold, 2003)، إضافة إلى أن التقلبات الحادة في معدلات المطر والرطوبة النسبية وخاصة في الشهر الذي يسبق الحصاد يزيد من شدة الإجهاد الفيزيولوجي للذرة الصفراء المصابة بالمرض، وينعكس ذلك في خلق الظروف الملائمة لإنتاج السموم (Visconti, 1996). كما وجد أن زيادة تركيز السموم الفطرية من النوعين zearalenone و fumonisins ارتبطت بظروف توتر الأوكسجين العالي في أنسجة النبات البالغة(Miller, 2001). وتلعب المواصفات الزراعية لأصناف الذرة الصفراء دوراً مهماً في قابلية هذه الأصناف للإصابة بالفطر الممرض ونسبة تراكم السموم الفطرية فيها مثل لون وشكل وحجم الحبوب، وكذلك تركيبها الكيميائي ومحتواها الرطوبي، ووقت حدوث العدوى وزمن النضج الفيزيولوجي للنباتات وسرعة التجفاف، إذ وجد أن الأصناف المتأخرة في النضج، والبطيئة الجفاف (slowly below) هي أكثر عرضة للإصابة بالمرض (Manninger, 1979).وتتفق هذه النتائج مع دراسات Lorenzo وآخرون (2011) التي تم فيها تحديد كمية السم Fumonisin المنتج من قبل أنواع الفطر *F. verticillioides* في إيطاليا بحوالي 4.3 و5.7ملغ/كغ في الموسمين 2006و2007 على التوالي. وفي جنوب إفريقيا تراوحت كمية السم Fumonisin المنتج في عينات ذرة صفراء مصابة بمرض عفن العرانيس بين (0.0–2.81 ملغ/كغ)، فيما تجاوزت كمية السم Zearalenoneفي 14 عينة من أصل 37 عينة ملوثة بالفطر الممرض الحدود المسموح بها وفق اللائحة الأوربية (Edson *et al.*,2011). وفي مصر سجلت مستويات عالية من السمFumonisinفي عينات الذرة الصفراء الملوثة بالفطر *F. verticillioides* تراوحت بين 0.01 و9.8 ملغ/كغ، وبالسم Zearalenone بين 0.02 و7.2 ملغ/كغ (Sally *et al.*,2015). كما وجد في بعض مناطق البرازيل أن 0.8% من أصل 121 عينة ذرة كانت ملوثة بالسم Zearalenone وبمعدل وصل إلى 4.48 ملغ/كغ (Beatriz *et al.*,2005). وفي منطقة كانتراري البرازيلية تراوحت كمية السم Zearalenone بين 0.0 و9.83 ملغ/كغ في 358 عينة ذرة صفراء ملوثة (Sabino*et al.*,1989)، فيما كانت كمية السم ذاته في منطقة أمبريا الإيطالية منخفضة عموماً بالمقارنة مع وجود نسب عالية من السم Deoxynivalenolتراوحت بين 0.2 و3.9 ملغ/كغ(Lorenzo*et al.*, 2011). كما سجلت نسب مرتفعة من السم Zearalenone في منطقة إب في اليمن بمعدل تراوح بين 4 و11 ملغ/ كغ (Nogaim,2012). وتبين النتائج في (الجدول 6) قابلية الفطر *F. verticillioides*على إنتاج السم Fumonisinفي المحافظات الثلاثة، حيث أظهرت نتائج التحليل الكروماتوغرافي لاختبار سمية 60 عزلة من الفطر الممرض*F. verticillioides*السائد في عينات الذرة الملوثة في المحافظات الثلاث أن 42 عزلة منها تمتلك قابلية إنتاج السم Fumonisinبنسبة 70%، وكانت أكثر العزلات قابلية لإنتاج السم عزلات الرقة بنسبة بلغت 80%، في حين كانت في دير الزور 70%، وأقل نسبة عزلات فارزة للسم سجلت في الحسكة وكانت 60%.ويرجع التفاوت في نسب عزلات الفطر القادرة على إنتاج السم Fumonisinإلى عوامل عديدة من أهمها اختلاف القدرة الوراثية للفطر الممرض على إنتاج السم، حيث تم تحديد مورثات عديدة تتحكم في تهيئة المركبات الحيوية اللازمة لتكوين السموم Fumonisinفي الفطر *F. verticillioides* مثل FCC1, ZFR1, GBP1, CPP1،GBB1, PAC1

وFvVE1(Choi and Shim, 2008)، فقد وجد فروقاً وراثية كبيرة بين 8 عزلات من الفطر *F. verticillioides* من حيث درجة شراستها وقدرتها الإمراضية في إصابة الذرة الصفراء وإنتاج السموم الفطرية في الحبوب، حيث تراوح معدل إنتاج السموم Fumonisin بين 14.5و57.5 ملغ/كغ، و Zearalenone بين 1.1 و 49.5 ملغ/كغ وdeoxynivalenol بين 100 و284 ملغ/كغ (Miedaner*et al*.,2010). أو عدم توفر الظروف البيئية المناسبة لإنتاج السم، حيث وجد أن تعرض المحصول للجفاف في المراحل المتأخرة من النضج وبالتالي الإجهاد المائي يزيد من تراكم السموم الفطرية في الحبوب(Blandino*et al*., 2009).

الجدول(6): قابلية الفطر *F. verticillioides* على إنتاج السم Fumonisin

الموقع	العزلات																				نسبة العزلات المنتجة للسموم، %
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
ديرالزور	+	+	−	+	+	−	+	−	−	+	+	+	−	+	+	−	+	+	+	+	70.0
الرقة	−	+	+	+	+	+	+	−	+	−	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	80.0
الحسكة	+	+	+	−	−	−	+	+	+	+	−	−	+	+	+	−	+	+	−−	−	60.0
	LSD 0.05																				14.7

(+): عزلة منتجة للسم (-): عزلة غير منتجة للسم

الاستنتاجات والتوصيات:

الاستنتاجات:

1 − سجل تناسباً طردياً بين نسبة رطوبة الحبوب ونسبة التلوث والتلون غير الطبيعي فيها.

2 - أظهرت نتائج الكشف عن الفطريات في عينات الذرة الصفراء الملوثة في المحافظات الثلاثة وجود 6 أجناس فطرية بنسب متباينة، وهي: *Fusarium*spp. ،*Aspergillus*spp. ،*Penicillium*spp. ،*Rhizopus*spp. *Mucor*spp. و *Alternaria*spp.

3 − أظهرت نتائج العزل والتنقية والتشخيص لعينات الذرة الصفراء الملوثة سيادة النوع *F. verticillioides*بالمقارنة مع النوع *F. graminearum* *المسبب* لمرض عفن العرانيس القرمزي.

4 − بينت النتائج أن كميات السم Fumonisinفي عينات الذرة الصفراء كانت أعلى من الحدود المسموح بها عالمياً في حال استخدام هذه الحبوب في الصناعات الغذائية المعدة للاستهلاك البشري، في حين يقع معظمها ضمن الحدود الدولية التي يسمح بها عند استعمالها كأعلاف حيوانية باستثناء عينات محدودة في محافظتي دير الزور والرقة تجاوزت كمية السم فيها الحدود المسموح بها عالمياً. في حين كانت نسب عينات حبوب الذرة الملوثة بالسم Zearalenone إجمالاً مرتفعة باستثناء عينات الحسكة، وتتجاوز الحدود المسموح بها عالمياً سواء لحبوب الذرة المعدة للاستهلاك البشري أو الحيواني.

5 − أظهرت نتائج التحليل الكروماتوغرافي أن 42 عزلة من أصل 60 عزلة من الفطر الممرض *F. verticillioides*تمتلك قابلية إنتاج السم Fumonisin، وكانت أكثر العزلات قابلية لإنتاج السم عزلات الرقة، تلاها عينات دير الزور، وأقل نسبة عزلات فارزة للسم سجلت في الحسكة.

التوصيات:

1 - ضرورة الاهتمام بخفض نسبة رطوبة الحبوب من خلال اختيار التوقيت المناسب للحصاد، وعملية التجفيف والفرز والتخلص من الحبوب المكسورة والملونة والملوثة أثناء التخزين، والمحافظة على نظافة المخزن بالتعقيم ومراقبة الحبوب المخزونة بصورة دورية.

2 - دراسة شراسة عزلات الفطر *F. verticillioides* المنتشرة في مناطق الدراسة للاستفادة من إمكانية استخدامها في استنباط الأصناف المقاومة للمرض.

المراجع:

1 -الطحلي، عبد الواحد. حمد ابتسام، أبو الفضل تيسير، وجودة فضول،، *تصنيف الفطور المرافقة لحبوب الذرة الصفراء المخزونة في ريف دمشق* . المجلة الأردنية في العلوم الزراعية. 2015، المجلد 11، العدد 1: 189-208.

2 -الهيتي، أياد عبد الواحد. *السموم الفطرية- المفهوم العام* ، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، جامعة بغداد. 1992، 432 ص.

3 -وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي السورية، النشرة الإحصائية لعام 2012.

4- AMADI, J. E; and D. O. ADENIYI.*Mycotoxin production by fungi isolated from stored grains*. Nigeria, African Journal of Biotechnology. 2009, 8 (7): 1219-1221.

5- AOAC.*Association of Official Analytical Chemists, official methods of analysis*. 16th ed, Washington DC, 1995, USA.771p.

6- BEATRIZ, L. S., ALESSANDRA, B. R., PAULO, A. M., and M. J. MIGUEL.*Aflatoxins, Ochratoxin A and zearalenone in maize- based food products Brazilian.J.of Microbiology*. 2005, 36:289-294.

7- BELLO, O.B; O.T. GANIYU; M..K. WAHAB; M.A. AZEEZ; S.Y. ABDULMALIQ; S.A. IGE; J. MAHMOOD; F. OLULEYE and M.S. AFOLABI. *Yield and Disease Reactions of Quality Protein Maize Varieties in the Southern Guinea Savanna Agro-Ecology of Nigeria*. Int. J. Agricult. Forestry.2012, 2(5): 203-209.

8- BLANDINO, M; A. REYNERI;G. COLOMBARI and A. PIETRI. *Comparison of integrated field programmes for the reduction of fumonisin contamination in maize kernels*. Field Crops Research. 2009,111: 284-289.

9- BOOTH. *The genus Fusarium. Commonwealth Mycological Institute*. Kew. 1971, 237 pp.

10- CANTALEJO, M.J; J.M. CARRASCO and E, HERNANDEZ. *Incidence and distribution of Fusarium species associated with feeds and seeds from Spain*. Rev. Iberoam. Micol. 1998,15, 36–39.

11- CHANNAIAH, L. H., and D. E. MAIER. *Best Stored Maize Management Practices for the Prevention of Mycotoxin Contamination. In Mycotoxin Reduction in Grain Chains,* by John F. Leslie and Antonio F. Logrieco. John Wiley & Sons, Inc. 2014, 321p.

12- CHOI YE; and W.B, SHIM.*Functional characterization of Fusariumverticillioides CPP1, a gene encoding a putative protein phosphatase 2A catalytic subunit.* Microbiology. 2008,154, 326–36.

13- CHU, F. S; and G. Y, LI.*Simultaneous occurrence of fumonisin B1 and other in moldy corn collected from the mycotoxins People's Republic of China in regions of high incidences of oesophageal cancer*. Appl. Environ. Microbiol. 1994, 60:847-852.

14- DESJARDINS, A.E., and R.D.PLATTNER.*Distribution of fumonisins in symptomatic and symptomless kernels of maize*. Plant Disease.1998,82:953-958.

15- DOKO, M.B; S. RAPIOR; A. VISCONTI and J.E. SCHJOTH.*Incidence and levels of fumonisin contamination in maize genotypes grown in Europe and Africa.* J. Agric. Food Chem. 1995, 43: 429–434.

16- EC EUROPEAN COMMISSION. Commission regulation. *setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards Fusarium toxins in maize and maize products*. Official Journal of the European Union, L. N_ 1126/2007 of 28 September 2007 amending Regulation (EC) No 1881/2006, 2007, 255, 14e17.

17- EDSON N; C. F. BRADLEY;C. WAALWIJK and A. VILJOEN.*Fusarium*spp. *and levels of fumonisins in maize produced by subsistence farmers in South Africa. Research article*. South Africa j. science. 2011,107 p.

18- EFSA, EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA), PARMA, ITALY.*Evaluation of the increase of risk for public health related to a possible temporary derogation from the maximum level of deoxynivalenol, zearalenone and fumonisins for maize and maize products*. EFSA Journal.*2014*,12(5):3699.

19- EL-SHABRAWY E. M.*Maize grains infected with Fusarium spp. In relation to toxin production*. Ph. D. Dept, Plant Pathology, Fac, Agric, Cairo Univ. 2007, 80 pp.

20- EL-SHABRAWY E. M.*Studies on ear and kernalrot of maize caused by Aspergillus and Fusarium*spp. M.Sc. Thesis, Fac, Agric, Tanta Univ. 2001, 80pp.

21- EL-SHEIKH M.A; S.I. ATTA –ALLA; M.M. RAHAL and R. M. EL-TAHAN.*Stored maize grains fungi and fumonisin B1 production*. J. Agric. &Env.Sci.Alex.Univ., Egypt. 2009,Vol.8 (2). 61-79.

22- FAOSTAT.*Food Agriculture Orgnization Statistical*. Yearbook 2013 - World Food and Agriculture,2015, 236p.

23- FDA, Food and Drug Administration.Guidance for Industry: *Fumonisin Levels in Human Foods and Animal Feeds; Final Guidance Contains Nonbinding Recommendations*. june 6, 2000; Revised November 9.2001, 21p.

24- GALLAGHER, R.T and S.M. LATCH.*Production of the termorgenicmycotoxinverruelulogen and fumitremorgin B by PenicilliumpiscariumWestling*. Applied and Environmental Microbiology, 1977. 33: 730-731.

25- GUNASEKARAN, S. *Drying corn using continuous and pulsed microwave energy*. Drying Technology, 1990, 8(5):1039-1047.

26- HALL, CHAPMAN.*Cereal Grain Quality*. ISBN-13: 978-94-010-7177-2.Springer Netherlands, Springer Science+Business Media B.V.1996. 488p.

27- Kossou D.K. and N, Aho.Stockage et conservation des grains alimentairestropicaux : principes et pratiques. Les Editions du Flamboyant, Benin. 1993, 125 p.

28- LESLIE J.Fand B.A SUMMERELL .*Fusariumverticilliodes*(Saccardo)Nirenberg. In: Leslie JF, Summerell BA, Editors.The Fusarium Laboratory Manual.2006, p 274-279. Blackwell Publishing.

29- LESLIE, J. F; ZELLER, K. A; LAMPRECHT, S. C; RHEEDER, J. P; and W. F. O, MARASAS.*Toxicity, pathogenicity, and genetic differentiation of five species of Fusarium from sorghum and millet*. Phytopathology . 2005, 95:275-283.

30- LOGRIECO A.; G. MULÈ; A. MORETTI and A. BOTTALICO. *Toxigenic Fusarium species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe*. European Journal of plant pathology, 2002.108; 579- 609.

31- LORENZO, C; B. GIOVANNI and S. SELEN.*Infection by mycotoxigenic fungal species and mycotoxin contamination of maize grain in Umbria, Central Italy*. Food and Chemical Toxicology.2011, 49: 2365- 2369.

32- MADBOULY A.K; I.M.I. MOHAMED; F. S. AHMED and A. A. MOSAAD. Co-*occurrence of mycoflora, aflatoxins and fumonisins in maize and rice seeds from markets of different districts in Cairo*. Egypt, Food Additives and Contaminants. 2012, Part B, Vol. 5, No. 2, 112–120.

33- MANNINGER, I. *Resistance of maize to ear rot on the basis of natural infection and inoculation. In: Proceeding 10th Meeting, Eucarpia, Maize, Sorghum Sec.* Varna, Bulgaria. 1979, p 181–184.

34- MARASAS, W.F.O .*Discovery and occurrence of the fumonisins: a historical perspective. Environ*. Health Perspect. 2001, 109: 239-243.

35- MARASAS, W.F; NELSON, P.E. and T. A. TOUSSOUN. *Toxigenic Fusarium species: identity and mycotoxicology*. The Pennsylvania state University Pres , University park , Pa ,1984. 320p.

36- MARÍN, S; SANCHIS, V; and N. MAGAN.*Water activity, temperature and pH effects on growth of Fusariummoniliforme and Fusariumproliferatum isolates from maize.* Canadian Journal of Microbiology. 1995, 41: 1063–1070.

37- MILLER, J.D. *Factors that affect the occurrence of fumonisin*. Environmental Health Perspectives. 2001, 109: 321–324.

38- MUNKVOLD, G.*Crop Management Practices to Minimize the Risk of Mycotoxins Contamination in Temperate-Zone Maize. Mycotoxin Reduction in Grain Chains*, John F. Leslie and Antonio F. Logrieco. 2014, 59-74. John Wiley & Sons, Inc.

39- MUNKVOLD, G. P.*Epidemiology of Fusarium diseases and their mycotoxins in maize ears.* European Journal of Plant Pathology. 2003, 109: 705-713.

40- NELSON, E.P; E.A. DESJARDINS and D.R. PLATTNER. *Fumonisins, mycotoxins produced by Fusarium species: biology, chemistry and significance.* Annual Review of Phytopathology.1983, 31: 233- 252.

41- NOGAIM, Q.A.*Natural Incidence of Fungi and Mycotoxins on Corn Grains in Ibb (Yemen).* Pakistan Journal of Life and Social Science. 2012, 10(2): 111-115.

42- OMINSKI, K.H; R.R. MARQUARDT; R.N. SINHA and D. ABRAMSON.*Ecological aspects of growth and mycotoxin production by storage fungi*. In: Miller JD, Trenholm HL. eds. Mycotoxins in Grains. Compounds other than Aflatoxin. Eagen Press, USA.1994, p 287–305.

43- ORSI, R.B; B. CORRÊA; C.R. POSSI; E.A. SCHAMMASS; J.R. NOGUEIRA; S.M.C. DIAS and M.A.B. MALOZZI.*Mycoflora and occurrence of fumonisins in freshly harvested and stored hybrid maize*. J. Stor. Prod. Res. 2000, 36: 75-87.

44- PROCTOR, R. H;T. M. HOHN, and S. P. MCCORMICK.*Reduced virulence of Gibberellazeae caused by disruption of a trichothecene toxin biosynthetic gene*. Mol. Plant-Microbe Interact. 1995, 8 593-601.

45- RAPER, K.B; D.I. FENNELL.*The Genus Aspergillus*. Robert E.Krieger Publ. Co. Huntigngton, NewYork- USA. 1977, 686p.

46- REID, L. M; NICOL, R. W; OUELLET, T; SAVARD, M; MILLER, J. D; YOUNG, J. C; STEWART, D. W and A. W. SCHAAFSMA.*Interaction of Fusariumgraminearum and F. moniliforme in maize ears: Disease progress, fungal biomass, and mycotoxin accumulation*. Phytopathology. 1999, 89:1028-1037.

47- ROSS, P. F; P. E. NELSON; J. L. RICHARD ; G. D. OSWELLER; L. G. RICE; R. D. PLATNER and T. M. WILTSON. *Production of Fumonisin by Fusariummoniliforme and Fusariumproliferatum isolates associated with ELEM and PPE syndrome in swine* . Envir. Micro.1990, 56:5225 – 3226..

48- SABINO, M; G. PRADO; E.I. INOMATA; M.O. PEDROSO and R.V. GARCIA.*Natural occurrence of aflatoxins and zearalenone in maize in Brasil* .Part II. Food Addit. Contam.1989, 6(3), 327-331.

49- SALLY, I; ABD EL-FATAH, MOHAMED; M. NAGUIB, EBTSAM; N. EL- HOSSINY; and Y. SULTAN. *Occurrence of Fusarium species and the potential accumulation of its toxins in Egyptian maize*. International Journal of Advanced Research. 2015 , 3, 11, 1435 – 1444.

50- SAMSON, R.A.*Identification of food-borne Penicillium, Aspergillus, and Fusarium species*. In: Champ BR, Highley E, Hocking AD, Pitt JI. eds. Fungi and mycotoxins in stored products. Proceedings of an international conference, Bangkok, Thailand. 1991, 23–26 April 1991.

51- SAMSON, R.A; HOEKSTER, E.S and VAN C.A.N, OORSCHOT. Introduction *to Food – Borne Fungi 2nd ed*. Inst. Roy .Nether .Acad. Art and Sci,1984. 396p.

52- SCAUFLAIRE, J; O. MAHIEU; J. LOUVIEAUX; G. FOUCART; F. RENARD and F. MUNAUT.*Biodiversity of Fusarium species in ears and stalks of maize plants in Belgium*. Eur. J. Plant Pathol. 2011, (131) 59–66.

53- SULEIMAN, R; K. ROSENTRATER and C. BERN. *Effects of Deterioration Parameters on Storage of Maize*. A Review. Journal of Natural Sciences Research. 2013, 3(9): 147-165.

54- VIGIER, B; L. REID; M. SEIFERT; K. A. STEWART; D. W and R. I. HAMILTON. *Distribution and prediction of Fusarium species associated with maize ear rot in Ontario*. Can. J. Plant Pathol. 1997, 19:60-65.

55- VISCONTI, A. *Fumonisins in maize genotypes grown in various geographic areas.* In: Jackson LS, de Vries JW, Bullerman LB. eds. Fumonisins in food. Plenum Press, New York. 1996, p 193–204.

56- WANG, J.H; J.B. ZHANG; H.P LI; A.D. GONG; S. XUE; R.S AGBOOLA and Y.C. LIAO.*Molecular identification, mycotoxin production and comparative pathogenicity of Fusariumtemperatum isolated from maize in China*. J. Phytopathol. 2014, 162:147–157.

57- WATANABE, A.*Pictorial atlas of soil and seed fungi, morphologies of cultured fungi and key to species*. 2nd ed. 2002, CRC Press LLC,426p.