الكشف عن السم Diacetoxyscirpenol في حبوب الذرة الصفراء في العراق بتقنية صفائح الكروماتوكرافي الرقيقة

عمر عبد حميد* حليمة زغير حسين
باحث أستاذ مساعد
abidhameed1998@yahoo.com Halimaalbahadly@yahoo.com
قسم وقاية النبات– كلية الزراعة–جامعة بغداد

المستخلص

أجريت هذه الدراسة للكشف عن السم Diacetoxyscirpenol (DAS) المنتج من انواع الفطر *Fusarium* في حبوب الذرة الصفراء وتحديد بعض العزلات المنتجة له. أعتمد في الكشف عن السم كروموتوكرافيا الصفائح الرقيقة(Thin Layer Chromotography (TLC. جمعت عينات من حبوب الذرة الصفراء من بعض المناطق كما أخذت عزلة من الفطر *F.graminearum* و*F.culmorum* من وزارة العلوم والتكنولوجيا، استخدمت قسم من العينات لعزل أنواع الفطر *Fusarium* بينما استخدم القسم الاخر لاستخلاص السم بصورة مباشرة ، أظهرت نتائج التشخيص والكشف عن السم DAS أن هناك 10 عزلات من بين 15 عزلة تعود لأنواع الجنس *Fusarium* فارزة للسم منها الأنواع *F.graminearum* و*F.culmorum* كماأظهرت نتائج الكشف المباشر عن وجود السم في معظم عينات الذرة الصفراء وبنسبة 90.47% لأول مرة في العراق كما بينت النتائج التقدير الكمي بجهازGC للسم داس اختلاف العزلات في كمية السم المنتج حسب الموقع الجغرافي اذ كانت العزلة المأخوذة من كلية الزراعة اكثر العزلات انتاجا للسم بتركيز 653.89 نانو غرام /غم تلتها عزلة الحلة والتي انتجت سم بمعدل 388.36نانوغرام/غرام ثم عزلة الرضوانية بكمية 206.34نانوغرام /غرام وبعدها عزلة البصرة العائدة للنوع *F.graminearum* بتركيز 65.23 نانوغرام /غم ويعد هذا التسجيل الأول من نوعه لهذه الفطريات في العراق على افرازها للسم داس نستنتج من هذه الدراسة أن السم داس منتشر بنسبة عالية في الذرة الصفراء في العراق وممكن أن يسبب المشاكل الصحية للإنسان لذلك نوصي باستخدام ظروف خزن جيدة لمنع نمو الفطريات الفارزة لهذه للسموم والسيطرة عليها.

الكلمات المفتاحية: الذرة الصفراء Diacetoxyscirpenol (DAS), TLC ,GC

*البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الأول

The Iraqi Journal of Agricultural Sciences – 46(5): 841-846, 2015 Hameed & Hussein

DETECTION ON DIACETOXYSCIRPENOL MYCOTOXIN IN IRAQ ON CORN SEED BY THIN LAYER CHROMOTOGRAPHY (TLC)

O . A .Hameed* **H. Z. Hussein**
Researcher **Assistant Prof.**
Department of plant protection ,College of Agriculture ,University of Baghdad ,Bagdad ,Iraq.

Abstract

This study was conducted to detect Diacetoxyscirpenol (DAS) mycotoxin produced by *Fusarium* spp in corn seeds and to detect some fungal isolates that produce it .The detection of mycotoxin was archived by Thin Layer Chromotography. Corn seeds collected from some area and tow isolates of *F.graminearum and F.culmorum* were got from ministry of science and technology to use them of DAS production . A part of corn sampeles was used directly to extract and detect DAS toxin by TLC while the other part were used for isolation of *Fusarium* spp. Results showed that10 isolates from 15 of *Fusarium* spp produced DAS toxin , some of species was *F.graminearum and F.culmorum* also the result of directed detection of DAS mycotoxin showed that DAS associated with most samples and 90.4% of corn seed samples contained DAS toxin for the first time in Iraq , The quantitative detection on DAS mycotoxin by gas liquid chromatography showed deference of *Fusarium* spp. isolates in DAS production according to site of isolate where is the college of agriculture isolate was the more active in DAS production with 653.89 ng/g , the second isolate in DAS production was Al-Hilla isolate that produced 388.36 ng/g from DAS toxin while AL-Rhadwania isolate was 206.34 ng/g and then AL-Basrah isolate that belong to *F.graminearum* with 65.23 ng/g. This study is the first of recording of those species to secreting DAS toxin in Iraq .We concluded that DAS founded in a high amounts on corn seed in Iraq .We recommend use of suitable storing environment to prevent growth of fungi that producing toxins.

Key words : Diacetoxyscirpenol ,corn, TLC, GC

***Part of M.Sc. Thesis of first author**

المقدمة

يعد محصول الذرة الصفراء *Zea mays* L من محاصيل الحبوب الواسعة الانتشار في العالم (34) و قدرت المساحة المزروعة بها في العراق 605 الف دونم لعام 2012 (31) وتصاب الذرة الصفراء بمدى واسع من الفطريات المنتجة للسموم التي تشكل خطرا على صحة الإنسان والحيوان نتيجة تناول المنتجات الملوثة بهذه السموم (12,9) مما تؤدي إلى مشاكل صحية مثل الإصابة بالسرطان وحدوث التشوهات الخلقية (11,10) إضافة إلى خسائر سنوية في إنتاج المحصول (15,12,7) تقدر بملايين الدولارات نتيجة تضرر واستبعاد المحاصيل الملوثة بها (10) ويعد الجنس *Fusarium* من الفطريات التي تصيب الذرة الصفراء في الحقل وتستمر معها عند الخزن ولا سيما إذا كانت هناك رطوبة تساعد على انتشار الفطر في المخازن مما يؤدي إلى تلوث الحبوب بالإفرازات السامة للفطر(29,7) ولا تتأثر السموم الفطرية التي ينتجها الفطر بالحرارة و لا تتحطم ويبقى تركيبها ثابتا (18,19,3) إن أنواع الفطر *Fusarium* في مقدمة الفطريات المنتجة للسموم ومنها الترايكوثيسينات التي تشكل مع الافلاتوكسينات و الفيوموزينات والاوكراتوكسينات مجاميع السموم الفطرية الأكثر خطورة في العالم(2) وتعد مجموعة الترايكوثيسينات Trichothecene من مجاميع السموم المهمة التي تنتجها انواع الفطر *Fusarium* و تصنف هذه المجموعة الى أربع فئات رئيسة حسب التشابه الموجود بين المجاميع الفعالة في هذه المركبات(1). ويعد السم Diacetoxyscirpenol (DAS) من السموم الخطرة التي ينتجها بعض أنواع الفطر *Fusarium* وهو من مجموعة الترايكوثيسينات وينتمي الى الفئة (أ) التي تتصف بوجود مجموعة فعالة فضلا عن وجود الكيتون على ذرة الكاربون رقم 8 (trichothec-9-ene−3,4,15−triol, 12,13-epoxy-, 4,15-diacetate; anguidine)(5). اكتشف هذا السم أوائل الستينيات من القرن الماضي ويعد من أكثر مركبات الترايكوثيسنات سمية، أشارت دراسات سابقة إلى وجوده في حبوب الذرة الصفراء والعلائق الحيوانية (32,33,26,25,24,23,22,21,20,17,16.13,8) وهو سام للنبات ويحدث تلوثا للأعلاف الحيوانية (4). لذلك هدفت هذه الدراسة الى: عزل انواع الفطر *Fusarium* الفارز لهذا السم من العينات المأخوذة من مخازن وحقول الذرة الصفراء من المنطقة الوسطى والجنوبية والغربية من العراق وإجراء دراسات مسحية لعزل السم مباشرة من العينات المأخوذة لتحديد نسبة وجود السم فيها وتشخيص السم باستخدام تقانة كروموتوكرافيا الصفائح الرقيقة (TLC) (تشخيص نوعي) وباستخدام تقانة الكروموتوغرافي السائل الغازيGas Liquid Chromotography (تقدير كمي).

المواد والطرائق جمع العينات:

جمعت عينات حبوب الذرة الصفراء من مناطق محافظة بغداد (الزيدان،الرضوانية، أبو غريب) ومن محافظات الانبار(الفلوجة)، بابل (الحلة،المسيب)، وصلاح الدين (تكريت)، الديوانية والبصرة، في العروة الخريفية 2012−2013، وضعت في أكياس ورقية وتم تدوين الملاحظات الآتية عليها: تاريخ اخذ العينة ورقمها، وموقع اخذ العينة.

عزل الفطر *Fusarium* من العينات:

اخذت 400 حبة من كل عينة وبمعدل اربع مكررات (بواقع 100حبة للمكررالواحد) وعقمت سطحياً بمحلول هايبوكلوريد الصوديوم (المستحضر التجاري القاصر) بتركيز (2%) لمدة دقيقتين وبعدها غسلت بالماء المعقم وجففت بورق ترشيح معقم، زرعت الحبوب على وسط Potato Dextrose Agar (PDA) المعقم في أطباق بتري بلاستيكية معقمة قطر9 سم وقد استعملت 8 حبات من الذرة الصفراء في الطبق الواحد وحضنت الأطباق في درجة حرارة 25 ± 2 مْ لمدة 3−7 أيام نقيت أنواع الفطر .*Fusarium* spp وزرعت على الوسط الغذائي PDA بصورة مائلة Slant لحين اختبارها على وسط الرز لتحديد العزلة الاكثر انتاجا للسم وحضنت في درجة حرارة 25 ± 2 مْ لمدة 7 أيام (14) كما تم أخذ عزلات جاهزة ومشخصة من الفطر *F.graminearum*و*F.colmurum* في وزارة العلوم والتكنلوجيا حسب المفاتيح التصنيفية(30.6).

اختبار قابلية عزلات الفطر *Fusarium* على إنتاج السم داس في مزارع الرز:

تم اختبار قابلية عزلات الفطر *Fusarium* المعزولة على انتاج سم الداس على وسط الرز اذ وضع 200 غم من الرز في كل طبق زجاجي قطر20سم وارتفاع 5 سم وأضيف له 125 مل ماء مقطر، تركت لمدة 2 ساعة، ثم عقمت

بالمؤصدة على درجة حرارة 121 مْ وضغط 1.5 كغم/سم^2 لمدة 20 دقيقة، لقح وسط الرز في كل طبق بالعزلات الفطرية النقية بقرص قطر 1 سم من العزلة النقية باستعمال ثاقب الفلين مع التحريك المستمر للأطباق لضمان توزيع متجانس للقاح الفطري. حضنت الأطباق لمدة ثلاثة أسابيع بدرجة الحرارة 25 ± 2 مْ في الإسبوع الأول ثم خفضت إلى 13 ± 2 مْ في الاسبوعين الاخرين ثم طحنت قسم من عينات الذرة الصفراء والتي سبق إن جمعت من مناطق مختلفة بالخلاط الكهربائي كما طحن مستخلص الرز الذي نميت عليه العزلات في الخطوة السابقة بالخلاط الكهربائي EL-araby-Egypt.

استخلاص السم:

أتبعت طريقة Lauren وAgnew (23) في استخلاص السم داس من عينات الذرة ومزارع الرز حيث وضع 20 غم من المادة المطحونة في الفقرة السابقة في دورق زجاجي و أضيف له مزيج 100 مل من (أسيتون نايتريل – ميثانول – ماء بنسبة:80–15–5) على الترتيب ورج الخليط بجهاز الهزاز الكهربائي (S. CO. Ltd . England shaker Stuart) لمدة 120 دقيقة ورشح الخليط من خلال ورق رشيح Whatman NO . 2 في قمع زجاجي وجمع الراشح لغرض تنقيته.

التنقية

تم تحضير عمود الكروموتوغرافي باستخدام طريقة Romer (28). اخذ المستخلص المحضر سابقا ووضع ببطء في العمود واضيف له خليط من بنزين وخلات الاثيل بنسبة 80–20 وبالتدريج جمع الراشح الأخير ووضع في أنابيب زجاجية وجفف بهواء ساخن واغلقت الانابيب ووضعت في الثلاجة بعيدا عن الضوء لحين اجراء الكشف والتقدير الكمي. وأجريت نفس الخطوات من الاستخلاص والتنقية على الذرة المطحونة.

الكشف عن وجود سم الداس على حبوب الذرة الصفراء باستخدام صفائح الكروماتوكرافي الرقيقة (TLC):

استعملت صفائح الكروماتوكرافي الرقيقة Thin Layer Chromatography (TLC) المنتجة من قبل شركة Whatman قياس 20 × 20 سم للكشف عن السم داس وتم الحصول على االسم القياسي Standard من شركة سكما (Sigma aldric)، حضر تركيز 500 جزء بالمليون من السم القياسي لغرض الكشف عن السم في النماذج المستحصل عليها. وضعت بقع (spots) للسم القياسي والنماذج بمقدار 20 مايكروليتر باستعمال محقنة دقيقة Microsyringe على صفائح TLC وبمسافة 1.5 سم بين بقعة وأخرى ابتداء من جهة اليسار مع ترك مسافة 2 سم بين الحافة السفلية للصفيحة ونقطة الاصل. وضعت الصفائح بعد جفافها في حوض زجاجي Tank محكم الغلق يحتوي على من خليط الاسيتون – بنزين (90:40) مل. اخرجت الصفائح من الحوض بعد وصول الطور المتحرك مسافة 18 سم من البداية، ثم سخنت الصفائح بالفرن الكهربائي وفحصت تحت الاشعة فوق البنفسجية.**الكشف عن سم الداس على صفائح ال TLC:**

تم التأكد من وجود السم داس المنتج برش صفيحة الTLC بمزيج حامض الكبريتيك والميثانول 50 : 50 بعد تسخين الصفيحة في الفرن الكهربائي Oven على درجة حرارة 120 مْ لمدة 5–10 دقيقة ثم رفعت وفحصت تحت الاشعة فوق البنفسجية ويستدل على وجود السم من خلال ظهور تألق أصفر الى بني في النماذج المفحوصة.

تقدير كمية السم المنتج بتقانة كروموتوغرافيا الغاز Gas Chromatography (GC):

ستخدم جهاز Gas Chromatography التابع لمختبرات وزارة العلوم والتكنولوجيا–مركز بحوث تلوث الغذاء ذو المواصفات:

Tep injector=280 ,Tep Detector FID=300
CColumn Oven (ZB 5MS) = 150
(7C/Min).250(2Min)

أخذت الانابيب المجففة في الفقرة 6 من التنقية واضيف اليها 1مل محلول (أسيتون –بنزين) بنسبة 40–60 وتم حقن 1مايكروليتر من كل عينة في الجهاز وكذلك عينة السم القياسي ،ثم أخذت النتائج من الجهاز و حسبت كمية السم بوساطة المعادلةالآتية:

$$\frac{\text{تركيز السم القياسي}}{\text{تركيز النموذج}} = \frac{\text{مساحة منحنى السم القياسي}}{\text{مساحة منحنى النموذج}}$$

النتائج والمناقشة

الكشف عن السم داس في حبوب الذرة الصفراء:

أظهرت نتائج الكشف المباشر عن السمDAS في حبوب الذرة الصفراء بوساطة صفائح الكروموتوكرافيا الرقيقة TLCعن وجود السم DAS في معظم عينات الذرة الصفراء بنسبة 47–90% وهي نسبة كبيرة يمكن ان تسبب مشاكل للانسان الذي يتناول المواد الغذائية المصنعة من الذرة مثل الشامية وغيرها وكذلك ممكن ان تسبب امراضا للحيوان نتيجة استهلاك العلف الحيواني الحاوي على الذرة الملوث بهذا السم ويعد هذا التسجيل الأول في العراق للسم داس على حبوب الذرة الصفراء .(7) وقد يعود السبب في إنتشار السم الى توفر الظروف المهيئة للإصابة بالفطريات الفارزة له فضلا ن وجود الرطوبة لعالية يساعد على انتشار هذه الفطريات في الكومات والحبوب المخزونة في السايلوات والمخازن مع ظروف الخزن الرديئة وفقدان التهوية (27) وإن هذا يؤشر على وجود خطورة كبيرة لهذه السموم وأثرها السيئ على صحة الإنسان. تتفق نتائج هذه الدراسة مع دراسات عدد من الباحثين في العالم والتي أظهرت وجود السم داس في عدد من العلائق الحيوانية في عدة بلدان مثل الارجنتين و البرازيل وكندا والصين وفلندا واليابان و كوريا ونيوزلندا(32,13,16,17,20,21,24.25,8).

جدول1. انتشار السم داس في مناطق ومحافظات العراق.

المنطقة	R1	R2	R3
بغداد/ابوغريب	+	+	–
كلية الزراعة	+	+	+
الزيدان	+	+	–
الرضوانية	+	+	–
الفلوجة	+	+	+
تكريت	+	+	+
الحلة	+	+	+
الديوانية	+	+	–
البصرة	+	–	+
المسيب	+	+	+

+ : تعني وجود السم – : عدم وجوده

تقييم قابلية العزلات المختلفة للفطر *Fusarium* على انتاج السم داس على صفائح الكروموتوكرافيا الرقيقة:

اوضحت نتائج التحليلات الكروماتوكرافية باستعمال صفائح الكروماتوكرافي الرقيقة TLC عن وجود 10عزلات من اصل 15 عزلة من الفطر *Fusarium* المنماة على وسط الرز منتجة للسم داس.

جدول2. اختبار قابلية العزلات على إنتاج السم DAS.

المكان	العدد الكلي للعزلات	العزلات المنتجة للسم	نسبة العزلات المنتجة %
ابوغريب	2	2	100
الرضوانية	3	2	66
البصرة	2	2	100
الديوانية	3	2	66
الحلة	3	1	33
كلية الزراعة	2	1	50
العدد الكلي	15	10	66

حديد كمية السم المنتج من العزلة الفطرية بواسطة جهاز Gas liqud chromatography:

بينت نتائج التقدير الكمي بجهازGC للسم داس في مستخلص العزلات عن وجود السم بالعزلات الفطرية وبنسب مختلفة اذ كان زمن احتجاز السم المنتج من هذه العزلات مقاربا لزمن احتجاز السم القياسي ويعد هذا التسجيل الأول من نوعه لهذه الفطريات في العراق على افرازها للسم داس على وسط الرز. ويتبين من النتائج ان عزلة كلية الزراعة كانت الاكثر انتاجا للسم اذ بلغت نسبة الانتاج 653.89 نانوغرام/غرام وأعطيت الاسم (AG-42) وتلتها عزلة الحلة والتي انتجت سم بمعدل 388.36 نانوغرام/غرام ومن ثم عزلة الرضوانية بكمية 206.34 نانوغرام/غرام وبعدها عزلة البصرة تتفق هذه النتائج مع دراسات سابقة استخدمت فيها تقانة GC اشارت الى وجود السم داس بتراكيز مختلفة (22,26,33) وان سبب الاختلاف في كميات إفراز السم من قبل الانواع الفطرية يرجع الى عدة عوامل اهمها اختلاف نوع الفطر فقد ينتج الفطر كمية سم اكثر من نوع اخر كما تعتمد كمية السم المنتجة من قبل الفطر على درجة الحرارة والاس الهايدروجيني والرطوبة خصوصا وجود الرطوبة العالية التي تؤدي الى انتشار هذه الفطريات الفارزة للسموم

في كومات الحبوب مما ينذر بخطورة هذه المركبات السامة التي لا تتأثر بالحرارة وتنتشر بالسلسة الغذائية وتسبب تلو الغذاء والاعلاف الحيوانية و اصابة الانسان وحيواناته بالامراض السرطانية التي تسببه هذه السموم الفطرية.

جدول 3 . تقدير الكمي للسم DAS المنتج من عزلات الفطر *Fusarium* في بعض مناطق ومحافظات العراق

العينة	الفطر الفارز للسم	تركيز السم نانوغرام /غرام
السم القياسي		500
كلية الزراعة	*Fusarium spp*	653.89
الرضوانية	*F. spp*	206.34
البصرة	*F.graminearum*	65.23
الحلة	*F. spp*	388.36
الديوانية	*F.colmurum*	135.5

REFERENCES.

1. Agodi, A. M., M. Barchitta, S.Ferrante andL.Niessen .2004. Detection of tichothecene producing Fusarium spp by PCR : adaptation, Validation and application to fast food. Italian J. of Puplic Health.(5): 7-11.

2. Bankole, S.A. and A. Adebanjo .2003. Mycotoxin in food in west Africa: current situation and possibilities of controlling it. African Jo.Of Biotechnology.2: 254-263.

3.Barry,J.J. ; W.C Robert and M. Mostrom 2007. Trichothecens T2 ,HT2 and DAS w.w.w bug wood.org.

4.Blood ,V.P. and C.C Gay . 2007.Diacetoxyscirpenol non macrocyclic trichothecene mycotoxin from the fungi *Fusarium* spp. Saunders verterinari dictionary.

5.Bocarov, A. S, Z. Stankovic, J.T., Levic, N. M., Salma, V., R., Pantic and S.S. Barnic 2011.In vitro degradation of acetoxyscirppenol and T-2 Toxin by use of *Mucor racemosus* Fresen. F.sp racemosus isolate. Proc. Nat. Sci, Matica Srpska Novi Sad, 121: 51-59.

6.Booth, C. 1971. The genus Fusarium. Common wealth Mycological Institute. Kew , Surrey , England.

7.CAST .2003. Mycotoxins risks in plant animal and human Systems. Council for Agriculture Science and Technology, Ames, Iowa, USA. 10-15.

8.Chu, F.S., M. Y. Chen Liang and G.S. Zhang.1984.Production and characterization of Antibody against Diacetoxyscirpenol .Applied and Environmental Microbology. 48: 777-780.

9.Desjardins, A. E .2006. Fusarium Mycotoxins: Chemistry and Biology. APS press, St. Paul, Minnesota, USA. 90-130.

10. Devegowda,G.A, K.L. Arvind and L.K. Girish .2005. Impact of mycotoxin on poultry industry and some practical solutions. http./www.poulvet.com.

11. Driehuis, F., M. Spanjer, J.Scholten, and M.T. Giffel .2008. Occurrence of mycotoxins in feed stuffs of dairy cows and estimation of total dietary intakes. Journal of Dairy Science 91(11): 4261-4271.

12.Edwards,S. and A. Stewart .2010.Fusarium mycotoxins in UK straw from the 2008 harvest–Implications for pigs on straw bedding. Advances in Animal Biosciences 1(01): 201-201.

13.Elisabeth S, C. Schwab, S. Michael, N. Karin, K. Rudolf and S. Gerd.2013.Multi-Mycotoxin Screening Reveals the Occurrence of 139 Different Secondary Metabolites in Feed and Feed Ingredients, Toxins, 5, 504-523.

14.Evans, C. K., W. xei, R. D. Macky, and C. J. Mirocha. 2000. Biosynthesis of deoxynir-alenol in spikelete of barley inoculated with macroconidia of *Fusarium graminearum*, Plant. Dis. 84: 654 – 660.

15. Fink-Gremmels, J. 2008.The role of mycotoxins in the health and performance of dairy cows. The Veterinary Journal 176(1): 84-92.http://dx.doi.org.

16.Furlang, E. B. and L. M. V.Soares, 1995. Gas chromatographic method forquantification and confirmation of trichothecenes in wheat. Journal of the AOAC International, 78 (2) 386-390.

17.Hietaniemi, V. and J.Kumpolainen, 1991. Contents of Fusarium toxins in Finnish and imported grains and feeds. Food Additives and Contaminants, 8, (2) 171-182.

18.Hussain, H.Z.2008.Effiacancy of Fylx of detoxification of deferent levels of aflatoxin B1 in stored corn. The Iraqi J. Agric. Sci. 39 (3) 104:112 (In Arabic).

19.Jabur, K. S. and K. M Abdullah .2005. Determination of Fungi Biomass and Aflatoxin in imported wheat and its controlling by organic acid The Iraqi J. Agric. Sci. 36 (2) 127:134 (In Arabic).

20. Kim, J. C. ; H.J. Kang ; D. H. Lee ; Y. W. Lee and T. Yoshizawa. 1993. Natural occurrence of *Fusarium* mycotoxin (Tricho-theces and Zearalenone) in barley and corn in

Korea. Appl. and Environ. Microbiol. (USA) 59 : 3798-3802.

21.Kim J.C, Y.W Lee. H. Tamura and T. Yoshizawa .1995. Sambu toxin. a new mycotoxin isolated from *Fusarium* sambucinum, Tetrahedron Lett.,36 (7),1047-1050.

22.Kotal . F, K. Holadova´, J. Hajsˇlova´, J. Poustka, Z. Radova. 1999. Determination of trichothecenes in cereals. Journal of Chromatography A, 830 .219–225.

23. Lauren, D. R and M. P Agnew.1991. Multitoxin screening method for Fusarium mycotoxins in grains.agrc. Food Chem., 39, 502-507.

24.Lauren, D. R. and R. Greenhalgh, 1987. Simultaneous analysis of nivalenol and deoxynivalenol in cerals by liquid chromatography. Journal of the Association Official Analytical Chemists, 70, (3) : 479-483.

25.Quiroga, N., S. Resing, A. Pacin, E. Martinez. 1995. Natural occurrence of trichothecenes and zearalenone in Argentine wheat. Food Control 6 : 201-201.

26.Radová. Z, K. Holadová and J. Haj Sová. 1998. Comparison of two clean-up principles for determination of trichothecenes in grain extract. J. Chrom A;829:259-67.

27.Ramirez M. L. ,S. Chulze and N. Magan. 2003. Impact of environmental factors and fungicides on growth and Deoxynevalenol production by *Fusarim graminearum* in wheat. Crop protection 23 (2) : 117-125.

28.Romer,T.R,T.M.Boling and T.McDonald. 1978. Gas liquid chromatographic determination of T2 toxin and Diacetoxyscirpenol in corn and mixed feeds.j.Assoc.off. Anal.chem.61:801-808.

29.Scauflaire, J.; O. Mahieu,; J. Louvieaux,; G. Foucart, F. Renard and F.Munaut, .2011. Biodiversity of *Fusarium* species in ears and stalks of maize plants in Belgium. Eur. J. Plant Pathol. (131) 59–66.

30.Seifert, K. 1996. Fuskey (Fusarium interactive key) Agriculture and Agri-food Canada Cat. No. A42-66/1996 E-IN, ISBN 0-662-24111-8.

31.Statistics central system. Report of production and improvement of cotton and corn yields in 2012 season in Iraq. Management of Agricultural statistics , Ministry of Agriculture ,Baghdad ,Iraq.

32.Tanaka, T., A. Hasegawa, S. Yammamoto, U.S. Lee, Y. Sugiuara , Y. Ueno.1988. Worldwide contamination of cereals by the *Fusarium* mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol, and zearalenone . Survey of 19 countries.Journal of Agricultural and Food Chemistry, 36 : 979-983.

33.Thaïs V. Milanez and M. Lúcia. 2006. Gas Chromatography - Mass Spectrometry Determination of Trichothecene Mycotoxins in Commercial Corn Harvested in the State of São Paulo, BrazilJ. Braz. Chem. Soc., 17, (2) : 412-416.

34.Uppal, D. S; S. M Ilyas and S. S Sikka. 2014. Central institute of post harvest engineering and technology (ICAR), Ludhiana, India.