Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)

49(2), Summer, 2026

10.22055/ppr.2026.52125.1888

Incidence and Severity of *Fusarium* Head Blight Disease in Wheat, Pathogen Identification and Spore Population Assessment in the Moghan Region

F. Houshyar Jelodar[1], B. Pouzeshimiyab[2*], S. Nematollahi[1], Kh. Valizadeh Kamran[3], M. Jamshidi[1]

1. Department of Plant Protection, Ta.C, Islamic Azad University, Tabriz, Iran
2. ***Corresponding Author:** Department of Plant Protection, Mara.C., Islamic Azad University, Marand, Iran (behnam3@iau.ir)
3. Department of Remote Sensing and GIS, University of Tabriz, Tabriz, Iran

Received: 25 May 2026 Revised: 12 July 2026 Accepted: 23 July 2026

Abstract

Background and Objectives

Fusarium head blight (FHB) is a serious disease affecting wheat. FHB has occurred sporadically in Iran for many years and ranks among the most important fungal diseases of wheat in Mazandaran, Golestan, Zanjan, Fars, and Ardabil provinces, including the Moghan Plain. Several factors influence FHB epidemics, including pathogen persistence in crop residues, wheat cultivar resistance, initial inoculum dynamics, a microclimate favorable for infection, and host phenology. Disease-risk prediction models based on weather data can identify periods favorable for disease development and spread. However, without direct measurements of pathogen inoculum, these models may not achieve the desired level of accuracy. Aerobiological pathogen monitoring using volumetric spore traps has provided valuable data on inoculum levels in wheat fields. Researchers have used these data to improve disease predictions across various cereal production systems.

Materials and Methods

A field investigation on the Moghan Plain, Ardabil Province, monitored 35 fields over three cropping seasons, 2020-2021, 2021-2022, and 2022-2023, to determine disease incidence and severity. Concurrently, continuous aerobiological sampling was conducted for 30 days, from March 29 to April 29, 2023, using a single spore trap installed in one field to examine the population structure and spatial distribution of spores (macroconidia). Disease incidence was recorded over the three-year period, while disease severity was recorded during the 2023 cropping season. Both parameters were calculated at the grain-filling stage. Pathogen species were identified using morphological and molecular methods. A generalized linear model (GLM) was used to analyze the relationship between the number of spores released within each 24-hour period as the dependent variable, based on 30 observations, and nine meteorological variables.

Results

The disease occurred in 77–85% of the surveyed fields, and symptom incidence within infected clusters ranged from 5 to 45%. Aerobiological trapping detected pathogen spores on 62.5% of the sampling days. Median 24-hour spore counts during the pre-flowering and flowering stages were 2.8 and 10.2, respectively, with peak densities reaching 25 spores per 24 hours. Morphological and PCR-based identification of 31 isolates showed that *Fusarium*

graminearum predominated, accounting for 83% of the fungal isolates, while *F. culmorum* was the second most frequent species, accounting for 17%. Statistical analyses identified daily rainfall and minimum relative humidity as the strongest predictors of 24-hour spore counts. A bivariate regression model incorporating these two variables explained approximately 78% of the variation in spore numbers ($R^2 \approx 0.783$; adjusted $R^2 \approx 0.675$). Variance inflation factors (VIF ≈ 1.09) indicated no substantial multicollinearity. However, the residuals showed possible temporal autocorrelation, suggesting that the model should account for temporal dependence.

Discussion

These results indicate that aerobiological monitoring during flowering and the use of lower intervention thresholds in risk-prediction models could help reduce epidemic risk. This study included 30 observations in the regression analysis and 35 farms in the field survey. Although the results were significant, future studies should increase the sample size to improve estimate stability and allow broader regional or national generalization. Future research should also collect larger longitudinal datasets and validate the models against independent datasets. Given the Durbin–Watson statistic, time-series or mixed-effects models may better account for temporal dependence and variance heterogeneity. Combining aerobiological data with climate models and farm management data, such as residue cover, crop rotation, planting date, and cultivar type, could improve predictions of FHB risk. This study showed that FHB was highly prevalent on the Moghan Plain and that moisture and precipitation influenced airborne spore dispersal. *F. graminearum* was the dominant species, and the regression models identified precipitation and minimum relative humidity as the most important predictors of spore counts. To improve the validity and applicability of these findings, future studies should expand the spatial and temporal scope, assess the statistical assumptions more precisely, and examine the direct relationships among spore counts, disease incidence, and mycotoxin risk.

Keywords: Airborne inoculum, Climate change, Host phenology, Food security, Mycotoxin

Associate editor: S. Abbasi (Ph.D.)

Citation: Houshyar Jelodar, F., Pouzeshimiyab, B., Nematollahi, S., Valizadeh Kamran, Kh. & Jamshidi, M. (2026). Incidence and Severity of *Fusarium* Head Blight Disease in Wheat, Pathogen Identification and Spore Population Assessment in the Moghan Region. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)*, *49*(2), 71-92. https://doi.org/ 10.22055/ppr.2026.52125.1888

گیاه‌پزشکی (مجله علمی کشاورزی)
جلد ٤٩، شماره ٢، تابستان ١٤٠٥

10.22055/ppr.2026.52125.1888

میزان بروز و شدت بیماری سوختگی فوزاریومی سنبله گندم، شناسایی گونه‌های بیمارگر و ارزیابی جمعیت اسپور در منطقه مغان

فرید هوشیار جلودار[1]، بهنام پوزشی میاب[2*]، سویل نعمت اللهی[1]، خلیل ولیزاده کامران[3]، منیژه جمشیدی[1]

۱- گروه گیاه‌پزشکی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران
۲- * **نویسنده مسوول**: گروه گیاه‌پزشکی، واحد مرند، دانشگاه آزاد اسلامی، مرند، ایران
۳- گروه سنجش از دور و سیستم اطلاعات جغرافیایی، دانشکده برنامه‌ریزی و علوم محیطی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۵/۰۳/۰۴ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۵/۰۴/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۵/۰۱

چکیده

سوختگی فوزاریومی سنبله یکی از مهم‌ترین بیماری‌های قارچی گندم در شمال و شمال غرب کشور محسوب می‌شود. مدل‌های پیش‌بینی خطر بیماری مبتنی بر داده‌های آب و هوایی می‌توانند دوره‌های مطلوب برای ظهور و گسترش بیماری را با تخمین برآورد نمایند، اما بدون اندازه‌گیری مستقیم مایه تلقیح بیماری، ممکن است به اندازه کافی مؤثر نباشند. پایش جمعیت هوازی بیمارگر از طریق تله‌گذاری حجمی اسپور، داده‌های ارزشمندی در مورد مایه تلقیح موجود در محیط مزرعه ارائه داده و برای بهبود پیش‌بینی ظهور بیماری استفاده می‌شود. این مطالعه میدانی در دشت مغان (استان اردبیل)، با پایش ۳۵ مزرعه در سه فصل زراعی، میزان بروز و شدت بیماری و قارچ‌های عامل بیماری بررسی و با نظارت هوازیست‌شناختی پیوسته طی یک دوره ۳۰ روزه در یک فصل زراعی، جمعیت اسپور (ماکروکنیدی) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بررسی در سه سال نشان داد بیماری در ۷۷ تا ۸۵ درصد از مزارع وجود داشت و شدت بیماری در سال ۱۴۰۲ در خوشه بین ۵ تا ٤٥ درصد متغیر بود. پایش بیماری با استفاده از تله اسپور نشان داد که اسپورهای عامل بیماری در ٦٢/٥ درصد روزهای پایش وجود داشته‌اند؛ میانگین تعداد اسپور در بازه ٢٤ ساعت در مرحله پیش ازگلدهی و گلدهی به‌ترتیب ۲/۸ و ۱۰/۲ عدد بود و اوج تراکم تا ۲۵ اسپور در ٢٤ ساعت ثبت گردید. از ۳۱ جدایه قارچ جداسازی‌شده، گونه *Fusarium graminearum* با ۸۳ درصد نمونه‌های جدا شده به‌عنوان گونه غالب و *Fusarium culmorum* با ۱۷ درصد نمونه‌ها در جایگاه بعدی قرار داشت. تحلیل آماری نشان داد بارش روزانه و حداقل رطوبت شبانه قوی‌ترین متغیر پیش‌بینی تعداد اسپور ٢٤ ساعته بودند؛ مدل رگرسیون دومتغیره با این دو متغیر توانست حدود ۷۸ درصد واریانس تعداد اسپور را توضیح دهد ($R^2 \approx 0.783$; Adjusted $R^2 \approx 0.675$) . شاخص‌های هم‌خطی(VIF ≈ 1.09) حاکی از عدم وجود هم‌خطی شدید بودند، هرچند نشانگر احتمال خودهمبستگی در باقیمانده‌ها بود که نیاز به مدل‌سازی وابستگی زمانی دارد. یافته‌ها تأکید می‌کنند که پایش هوازیست‌شناختی هدفمند در دوره گلدهی و در نظر گرفتن پارامترهای رطوبتی می‌تواند در پیش‌بینی بیماری و کاهش خطر همه‌گیری کمک نماید.

کلیدواژه‌ها: امنیت غذایی، تغییر اقلیم، زهرابه قارچی، مایه تلقیح هوابرد، مراحل رشد میزبان

دبیر تخصصی: دکتر سعید عباسی

مقدمه

بیماری سوختگی فوزاریومی سنبله[1] گندم سالهاست که به طور پراکنده در ایران وجود داشته و یکی از بیماری‌های مهم قارچی گندم در استان‌های مازندران، گلستان، زنجان، فارس و اردبیل (دشت مغان) محسوب می‌شود (Davari et al., 2014; Hasanvand et al., 2023). با وجود اینکه این بیماری از زمان‌های گذشته در ایران وجود دارد، اما از اوایل دهه ۱۳۶۰، گزارش‌های زیادی به‌ویژه از استان‌های گلستان و مازندران مشاهده شده است. از اوایل دهه ۱۳۷۰ تا کنون، بیماری در مناطق شمالی کشور و منطقه مغان به‌طور بومی در آن‌ها وجود دارد و هر چند سال یک‌بار به‌صورت همه‌گیر نیز ظاهر شده است. این بیماری به‌طور غیرمعمول در سال ۱۳۷۵ در برخی مناطق استان هرمزگان و در سال ۱۳۷۶ در برخی مزارع گندم جیرفت خسارت‌هایی به بار آورد. همچنین در سال ۱۳۸۲، گزارشی از استان خوزستان در مورد این بیماری منتشر شد. شیوع این بیماری در سال ۱۳۹۰ در منطقه مغان خسارت قابل توجهی به کشاورزان وارد کرد (Sabbagh et al., 2017; Malihipour et al., 2018). این بیماری با اختلال در رسوب نشاسته، تجزیه گلوتن و سایر پروتئین‌های ذخیره‌ای و تضعیف ساختار دیواره سلولی دانه، کیفیت پخت را به خطر می‌اندازد و در نتیجه باعث کاهش استحکام خمیر و عملکرد کلی فرآوری می‌شود (Bellesi et al., 2019). صدمه به جنین، باعث افت قوه نامیه بذر و بروز سوختگی گیاهچه در فصل بعدی کشت می‌گردد. از طرف دیگر، رشد و نمو قارچ عامل بیماری در سنبله منجر به بالارفتن خطر آلودگی به زهرابه‌های قارچی (مایکوتوکسین‌ها) از قبیل نیوالنول[2]، دی‌اکسی نیوالنول[3] و زرالنون[4] می‌شود که سلامت انسان و دام را به طور جدی با خطر مواجه می‌کنند (Zhang et al., 2020; Darvishnia et al., 2023). تاکنون هجده گونه قارچ از جنس *Fusarium* به عنوان عامل این بیماری گزارش شده‌اند که از میان آنها گونه *Fusarium graminearum* Schwabe به‌عنوان گونه غالب است. با این حال، مطالعات مختلف نشان داده است که سایر گونه‌های فوزاریوم ممکن است در مناطق مختلف جهان با شرایط آب و هوایی متفاوت، به طور قابل توجهی در ایجاد این بیماری نقش داشته باشند. به عنوان مثال، گونه‌های *F. graminearum*، *F. culmorum* (W. G. Smith) Saccardo، *F. avenaceum* (Fr.) Sacc.، *F. poae* (Peck) Wollenw. و *F. tricinctum* (Corda) Sacc. گونه‌های غالب در اروپا بودند. در کانادا، گونه‌های *F. avenaceum*، *F. equiseti* (Corda) Sacc.، *F. graminearum*، *F. poae* و *F. sporotrichioides* Sherb. شایع‌ترین گونه‌ها در دو دهه گذشته بوده‌اند (Alisaac & Mahlein, 2023). در چند دهه اخیر همه‌گیری‌های گسترده‌ای از این بیماری در مناطق مختلف دنیا از جمله ایالات متحده، کانادا و چین اتفاق افتاده است (Bolanos-Carriel et al., 2016).

همه‌گیری این بیماری متاثر از پارامترهای متعدد شامل میزان پایداری بیمارگر در بقایای محصول، مقاومت رقم گندم، پویایی مایه تلقیح اولیه، ریزاقلیم مساعد برای آلودگی و فنولوژی میزبان است (Karlsson et al., 2021; Alisaac & Mahlein, 2023; Matengu et al., 2024). در همه گیرشناسی، خطر بیماری تنها تابعی از میانگین پارامترهای آب و هوایی منطقه‌ای نیست؛ بلکه نتیجه فرآیندهایی مانند بلوغ پریتسیوم، آزادسازی آسکوسپور عامل بیماری، جوانه‌زنی آسکوسپور، نفوذ به گیاه میزبان و برهمکنش دما-رطوبت است (Garcia et al., 2025). در مزارع گندم، بسته به مقاومت رقم، وجود بقایای محصول، روش‌های آبیاری و شرایط اقلیمی مناسب، ممکن است سطوح مختلفی از بیماری دیده شود (Morellos et al., 2025; Nguyen et al., 2025). مدل‌های پیش‌بینی خطر بیماری که مبتنی بر داده‌های آب و هوایی هستند، می‌توانند دوره‌های مطلوب برای بروز و همه‌گیر شدن بیماری را تخمین بزنند، اما بدون اندازه‌گیری مستقیم مایه تلقیح بیماری، ممکن است این تخمین کارایی لازم را نداشته باشند. سنجش جمعیت بیمارگر در محیط مزارع از طریق تله‌گذاری حجمی

[1]. Fusarium head blight (FHB)
[2]. Nivalenol
[3]. Deoxynivalenol (DON)
[4]. Zearalenone

اسپور، داده‌های ارزشمندی در مورد مایه تلقیح موجود ارائه داده و برای بهبود پیش‌بینی در مزارع غلات مورد استفاده قرار می‌گیرد (Forrer et al., 2021). با این وجود، کاربرد این سامانه‌ها در اکوسیستم‌های کشاورزی نیمه‌خشک تا مدیترانه‌ای، که در آن‌ها بارندگی‌های متناوب و نوسانات شدید رطوبت می‌تواند دوره‌های کوتاه و موثری از آلودگی ایجاد کند، هنوز رایج نیست (Ma et al., 2025; Tapia et al., 2025). مطالعه حاضر به بررسی تأثیر تعاملات بین فنولوژی میزبان، تحرک مایه تلقیح هوابرد و شرایط اقلیمی بر وقوع و شدت بیماری سوختگی فوزاریومی سنبله می‌پردازد.

مواد و روش‌ها

منطقه مورد مطالعه و بررسی‌های میدانی

این مطالعه در دشت مغان واقع در شمال غربی ایران، که یکی از مناطق اصلی تولید گندم کشور است، انجام شد. این منطقه با کشت آبی متراکم، زمین‌های مسطح و تغییرات قابل توجه در آب و هوا شناخته می‌شود. بررسی‌های میدانی در ۳۵ مزرعه گندم در نقاط مختلف منطقه مغان (شهرستان‌های بیله سوار، پارس‌آباد و گرمی) که طول جغرافیایی متفاوتی دارند، انجام گرفت. مکان‌های نمونه‌برداری در مناطق UTM 38-39 شمالی قرار داشتند. میانگین درصد وقوع و شدت بیماری در طول سه فصل زراعی ۱۴۰۰-۱۳۹۹، ۱۴۰۱-۱۴۰۰ و ۱۴۰۲-۱۴۰۱ در مرحله پر شدن دانه، ثبت و محاسبه شد. رقم گندم مورد کشت در همه مزارع گندم آفتاب بود.

محاسبه درصد وقوع و شدت بیماری

برای ارزیابی بیماری، دو شاخص کلیدی میزان وقوع و شدت بیماری مورد سنجش قرار گرفت (Zadoks et al., 1974).

درصد وقوع بیماری که نشان‌دهنده نسبت سنبله‌های آلوده به کل سنبله‌هاست، با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید (Gillbert & Woods, 2006). :

$$I = \frac{N_i}{N} \times 100$$

در این رابطه I درصد وقوع بیماری به درصد، N_i تعداد سنبله‌های حاوی سنبلچه آلوده و N تعداد کل سنبله‌های مورد ارزیابی است.

جهت تعیین شدت بیماری، ابتدا هر سنبله بر اساس درصد سنبلچه‌های آلوده، با استفاده از یک مقیاس درجه‌بندی صفر تا پنج ارزیابی شد. بر اساس این مقیاس، امتیاز ۰ صفر سنبله‌های سالم، امتیاز یک به سنبله‌هایی تا ۲۰ درصد آلودگی، امتیاز دو برای تا ۴۰ درصد، امتیاز سه برای تا ۶۰ درصد، امتیاز چهار برای تا ۸۰ درصد و امتیاز پنج برای سنبله‌هایی با بیش از ۸۰ درصد سنبلچه آلوده اختصاص یافت (شکل ۱). سپس، از رابطه زیر برای محاسبه شدت بیماری استفاده شد:

$$S = \frac{\sum_{i=1}^{5}(n_i \times i)}{N_{infected} \times 5} \times 100$$

در این رابطه، S معرف شدت بیماری به درصد، متغیرهای n_1 تا n_5 به ترتیب نشان‌دهنده تعداد سنبله‌هایی هستند که درجه‌های آلودگی ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و بیش از ۸۰٪ را به خود اختصاص داده‌اند، $N_{infected}$ برابر با تعداد کل سنبله‌های آلوده است که از مجموع n_1 تا n_5 به دست می‌آید و عدد پنج در مخرج کسر، بالاترین امتیاز ممکن در مقیاس ارزیابی به شمار می‌رود.

پایش اسپورهای قارچ‌های عامل بیماری با استفاده از تله اسپور

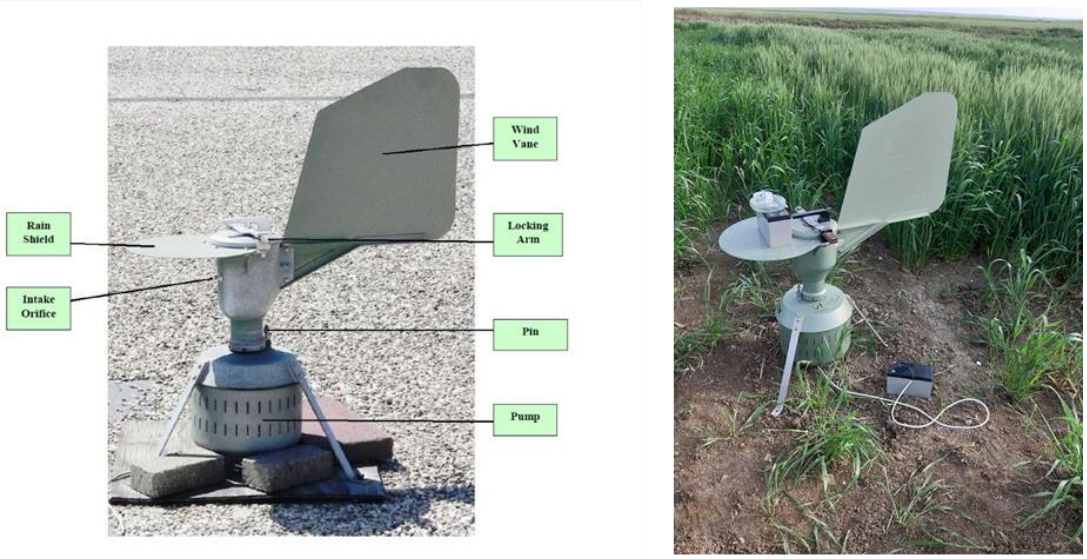
برای جمع‌آوری و پایش اسپورهای (ماکروکنیدی) معلق در اقلیم دشت مغان، در فصل زراعی۱۴۰۲-۱۴۰۱ (فروردین و اردیبهشت سال ۱۴۰۲) تله اسپور حجمی (Burkard, UK) در یکی از مزارع گندم (رقم آفتاب) متعلق به شرکت کشت و صنعت و دامپروری مغان نصب شد. انتخاب این مزرعه براساس شدت نسبی بالاتر بیماری در سال‌های قبل بود. ارتفاع نصب دستگاه حدود همتراز سایبان گندم و به عبارتی هم‌تراز با ارتفاع میانگین خوشه‌ها در مرحله گلدهی در نظر گرفته شد. برای بهترین کاراییِ تله اسپور، دستگاه در مسیری قرار گرفت که یکنواخت‌ترین جریان هوای ورودی را دریافت کند و دهانه آن تا حد امکان رو به جریان غالب یا مسیر اصلی حرکت هوا تنظیم تا ذرات کمتر منحرف شوند (Pouzeshimiyab & Fani, 2020). به‌صورت عملی، دستگاه در محل باز و بدون مانع قرار داده شد تا آشفتگی هوا کم شده، دهانه هم‌راستا با باد غالب یا بر اساس دستورالعمل سازنده تنظیم شد (شکل ۲). هدف اصلی، تعیین زمان‌بندی

و شدت انتشار اسپورها در مراحل مختلف رشد گندم و بررسی ارتباط آن با شرایط اقلیمی منطقه و میزان بروز بیماری بود. این دستگاه با مکش هوا از طریق یک شکاف باریک و رسوب ذرات بر روی نوارچسب عمل می‌کند. جمع‌آوری و شکار اسپورها با تعویض چسب‌ها در دو نوبت صبحگاهی و شامگاهی انجام شد تا امکان تحلیل زمانی انتشار اسپور فراهم گردد. نمونه‌های برداشت‌شده و چسبیده شده در روی نوار چسب به‌صورت مستقیم در زیر میکروسکوپ نوری (Nikon, Japan) با بزرگنمایی X ۴۰۰ مورد بررسی قرار گرفتند (Lacey & West, 2006). تشخیص اسپورها بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی از جمله اندازه و تعداد دیواره عرضی انجام شد و غلظت اسپورها به صورت تعداد اسپور در هر متر مکعب هوا بیان شد.



شکل ۱- شاخص شدت بیماری سوختگی فوزاریومی سنبله گندم از آلودگی صفر تا بالای ۸۰٪ (چپ به راست)

Figure 1 - Wheat Fusarium head blight disease severity index from zero to over 80% infection (left to right)



شکل ۲- استقرار دستگاه تله اسپور در مزرعه شرکت کشت و صنعت و دامپروری مغان

Figure 2. Establishment of the spore trap at Moghan Agro-industrial and Husbandry's farm

شناسایی ریخت‌شناسی گونه‌های *Fusarium*

برای جداسازی عوامل ایجادکننده بیماری سوختگی فوزاریومی سنبله ، از هر مزرعه دو سنبله انتخاب و دو سنبلچه از هر سنبله برای جداسازی قارچ‌ها استفاده شد. ابتدا نمونه‌های جمع‌آوری شده با آب شیر شسته شدند. سپس دو قطعه از بافت آلوده گیاه جدا گردید. این قطعات برای ضدعفونی سطحی، به مدت سه دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم یک درصد قرار گرفتند. پس از آن، سه بار با آب مقطر استریل آبشویی شده و روی کاغذ صافی استریل خشک شدند. در مرحله بعد، قطعات خشک‌شده روی محیط‌های کشت سیب زمینی دکستروز آگار [1] و پپتون پی سی ان بی آگار [2] کشت داده شدند و به مدت پنج تا هفت روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و در تاریکی قرار داده شدند. به منظور خالص‌سازی قارچ‌های جداشده، از روش تک‌اسپور استفاده شد و بعد از آن جدایه‌ها روی محیط‌های کشت PDA، آگار مصنوعی فقیر از مواد مغذی [3] و برگ میخک آگار [4] کشت (Leslie et al., 2006) و به مدت یک تا چهار هفته در دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرار داده شدند. کشت‌های محیط PDAدر تاریکی و محیط کشت‌های CLA و SNA تحت نور نزدیک به فرابنفش [5] نگهداری شدند. اطلاعات مربوط به رنگ پرگنه هر جدایه روی محیط PDA و ویژگی‌های ریخت‌شناسی قارچ نظیر اندازه ماکروکنیدیوم، میکروکنیدیوم، سلول‌های کنیدیوم‌زا و کلامیدوسپور با استفاده از کشت‌های انجام شده روی محیط‌های CLA و SNAثبت گردید. در نهایت، گونه‌های جنس *Fusarium* بر اساس این خصوصیات ریخت‌شناسی و با استناد به منابع (Leslie et al., 2006) شناسایی شدند.

استخراج DNA

با هدف شناسایی مولکولی قارچ عامل بیماری، ابتدا میسلیوم هر جدایه با تلقیح یک قرص آگار به قطر یک سانتی‌متر از حاشیه یک کلنی سه روزه برداشته و روی سه پتری دیش به قطر نه سانتی‌متری حاوی PDA در دمای ۲۵ درجه سلسیوس تکثیر شد. پس از گذشت ۱۰ روز، در زیر هود، ریسه‌های سطحی با استفاده از یک تیغ سترون با دقت قطع شده و به میکروتیوب‌های دو میلی‌لیتری منتقل شدند. متعاقباً، میسلیوم هر جدایه با استفاده از نیتروژن مایع پودر شد و پودرهای حاصل در لوله‌های استریل دو میلی‌لیتری قرار داده شدند تا برای استخراج آماده شوند. استخراج DNA طبق روش شرح داده شده توسط Moller et al. (1992) انجام شد. برای استخراج DNA، ۳۰ تا ۶۰ میلی‌گرم پودر قارچ با بافر Tris حاوی SDS، EDTA و Tris-HCl مخلوط و در حمام آب ۵۵–۶۰ درجه سلسیوس انکوبه شد. سپس NaCl و بافر CTAB افزوده و نمونه‌ها در ۶۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. پس از استخراج با مخلوط کلروفرم:ایزوآمیل الکل، نمونه‌ها سانتریفیوژ شده و مایع رویی به لوله جدید منتقل شد. در ادامه، با افزودن استات آمونیوم و تیمار با RNase، RNA حذف گردید. در نهایت، DNA با ایزوپروپانول رسوب داده شد، رسوب حاصل دو بار با اتانول ۷۰٪ شسته، پس از خشک شدن در هوا، در ۵۰ میکرولیتر بافر TE حل و تا زمان انجام آزمایش‌های بعدی در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد.

واکنش زنجیره‌ای پلی مراز و شناسایی مولکولی جدایه‌ها

برای شناسایی مولکولی و تأیید شناسایی ریخت‌شناسی گونه‌های غالب عامل بیماری، *F. graminearum* و *Fusarium culmorum*، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر با آغازگرهای اختصاصی این گونه‌ها، بر اساس پروتکل Akinsanmi et al. (2006) انجام شد. جهت تشخیص *F. graminearum*، جفت‌آغازگر Fg16F و Fg16R با توالی‌های CTACGGATATGTTGCGTCAA و GGTAGGTATCCGACATGGCAA به کار گرفته شد که محصولPCR حاصل از آن، قطعه‌ای به طول حدود ۴۰۰ جفت نوکلئوتید است (Concz et al., 2008).

[1]. Potato dextrose agar
[2]. Peptone PCNB agar
[3]. Synthetic nutrient-poor agar
[4]. Carnation leaf agar
[5]. Near ultra violet

همچنین برای شناسایی *F. culmorum*، از جفت آغازگر Fc01F و Fc01R با توالی‌های به ترتیب ATGGTGAACTCGTCGTGGC و CCCTTCTTACGCCAATCTCG استفاده گردید که منجر به تکثیر قطعه‌ای به اندازه ۵۷۰ جفت نوکلئوتید می‌شود (Nicholson et al., 1998). تمام آغازگرها و معرف‌های لازم از شرکت سیناکلون (کرج، ایران) تهیه شدند. چرخه حرارتی مورد استفاده برای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز[1] (PCR) جهت تکثیر قطعات DNA به شرح زیر تنظیم گردید: ابتدا یک مرحله واسرشت[2] اولیه به مدت سه دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس انجام شد. سپس، ۳۵ چرخه شامل مراحل واسرشت به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، اتصال[3] به مدت ۳۰ ثانیه و بسط[4] به مدت ۴۵ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس تکرار شد. لازم به ذکر است که دمای مرحله اتصال برای *F. graminearum* و *F. culmorum* به ترتیب ۵۸ و ۶۰ درجه سلسیوس در نظر گرفته شد. در نهایت، واکنش با یک مرحله بسط پایانی به مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس تکمیل گردید. بعد از تهیه ژل آگاروز یک درصد، برای رنگ آمیزی DNA، دو میکروگرم در میلی لیتر اتیدیوم برماید به ژل اضافه گردید. برای مشاهده محصول PCR الکتروفورز با شدت ولتاژ ثابت ۸۵ ولت به مدت یک ساعت در ژل آگاروز و بافر TAE (هیدروکسی متیل ۲۴۲ میلی گرم، اسید استیک ۵۷ میلی لیتر، EDTA ۱۰۰ میلی لیتر، آب تا حجم نهایی ۱۰۰۰ میلی لیتر) انجام گردید. با استفاده از دستگاه Gel Documentation (UVtec, Cambridge, UK)، تحت طول موج ۳۶۶ نور UV از آن عکسبرداری شد. جهت تعیین وزن قطعات از نشانگر اندازه DNA تحت عنوان Gene Ruler ™ DNA ladder mix استفاده شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

برای تحلیل آماری و بررسی ارتباط بین تعداد اسپورهای آزاد شده (متغیر وابسته)، و ۱۰ متغیر هواشناسی (شامل: میانگین سرعت باد[5](ffm) ، ساعات آفتابی[6] (sshn)، بیشینه دما[7] (tmax)، دمای میانگین[8] (tm)، کمینه دما[9] (tmin)، بیشینه رطوبت نسبی[10] (umax)، رطوبت میانگین[11] (um)، کمینه رطوبت[12] (umin)، تبخیر[13] (evt) و بارش روزانه[14] (rrr24))، از مدل خطی تعمیم‌یافته[15] (GLM) استفاده شد. سپس، برای تدوین و برآورد مدل نهایی پیش‌بینی تعداد اسپورها که صرفاً برپایه دو متغیر بارش روزانه و حداقل رطوبت استوار است، از مدل خطی ساده[16] (LM) بهره گرفته شد. تصحیح و آماده‌سازی داده‌ها در مایکروسافت اکسل انجام شد. آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزار[17] SPSS نسخه ۱۶ اجرا گردید و محاسبات همبستگی و رسم ماتریس همبستگی با بسته Corrplot در محیط R ver. 4.3.2 تهیه شد.

نتایج

میزان وقوع و درصد شدت بیماری FHB در مزارع گندم مغان

پایش بیماری در ۳۵ مزرعه گندم (رقم آفتاب) طی سه سال زراعی (۱۴۰۲-۱۳۹۹) و در بازه زمانی یک ماه از ۱۰ اردیبهشت تا ۱۰ خرداد، نشان داد که بیماری در ۸۵٪ از مزارع هر ساله وجود دارد. متوسط درصد وقوع بیماری در مزارع مختلف ۲۸-۱۰٪ و متوسط درصد شدت بیماری ۴۵-۵٪ برآورد شد. درصد وقوع و شدت بیماری در بخش ۷ از مزارع شرکت کشت و صنعت و دامپروری مغان از سایر نقاط بیشتر بود و به عنوان محل استقرار و نصب تله اسپور برای مطالعات بعدی انتخاب شد (شکل ۳، جدول ۱).

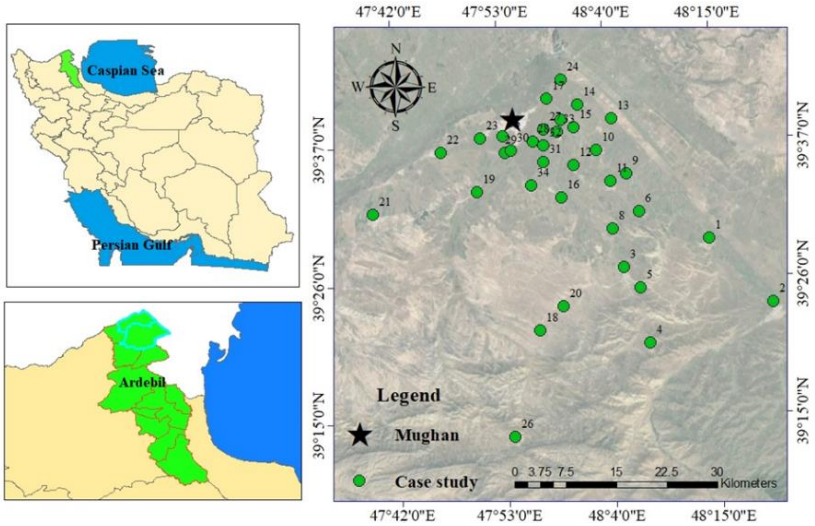
[1]. Polymerase chain reaction
[2]. Denaturation
[3]. Annealing
[4]. Extension
[5] Mean wind speed
[6] Sunshine hours
[7] Maximum temperature
[8] Mean temperature
[9] Minimum temperature
[10] Maximum relative humidity
[11] Mean relative humidity
[12] Minimum relative humidity
[13] Evaporation
[14] 24-hour rainfall
[15] Generalized linear model
[16] Linear model
[17] Statistical package for social science

جدول ۱- مشخصات مزارع گندم پایش شده در منطقه مغان طی ۳ سال از نظر وقوع و شدت بیماری سوختگی فوزاریومی سنبله گندم

Table 1. Characteristics of wheat fields monitored in the Moghan region over 3 years in terms of the occurrence and severity of FHB disease

Field code	Location	Disease incidence (May)*			Mean incidence disease in 2023 (%)	Mean disease severity in 2023 (%)
		2021	2022	2023		
1	Bakhsh 7	1	1	1	28	45
2	Chehel Pelleh	1	1	1	25	32
3	Khalifehloo	0	0	0	0	0
4	Babak	1	1	1	15	25
5	Pompaj Bilesavar	1	1	1	17	20
6	Haj Aman	1	1	1	15	10
7	Edare Markazi	1	1	1	27	38
8	Valimamiloo	0	0	0	0	0
9	Fouladloo village	0	0	0	0	0
10	Shahrak Golkhanei	1	1	1	27	36
11	Ghareh Savalan	1	1	1	22	5
12	Tahghighat Oltan	1	1	1	25	34
13	Aghdam	1	1	1	24	31
14	Gordigal	1	1	1	22	27
15	Germi synoptic st.	0	0	0	0	0
16	Fruit orchards	1	1	1	15	21
17	Haj Avaz	1	1	1	11	27
18	Firouzabad	1	1	1	18	19
19	Teklekandi	1	1	1	20	26
20	Tazekand	1	1	1	15	29
21	Ghoshagheshlagh	1	1	1	10	24
22	Khangheshlaghi	1	1	1	14	28
23	Mellatabad	1	1	1	15	22
24	Paragheshlagh	1	1	1	20	29
25	Shourgol	0	0	0	0	0
26	Gharehghabagh	1	1	1	20	27
27	Majidabad	1	1	1	15	18
28	Ghoojebigloo	1	1	1	18	27
29	Airport	1	1	1	20	14
30	Ajirloo Kandi	1	1	1	23	18
31	Iranabad	1	1	1	21	29
32	Mollakandi	1	1	1	25	31
33	Goashloo	1	1	1	21	33
34	Hallajlar	1	1	1	19	31
35	Parsabad environs	1	1	1	24	34

* The numbers 1 and 0 indicate the occurrence or absence of the disease, respectively.



شکل ۳- پراکنش مزارع گندم تحت پایش بیماری سوختگی فوزاریومی سنبله در منطقه مغان

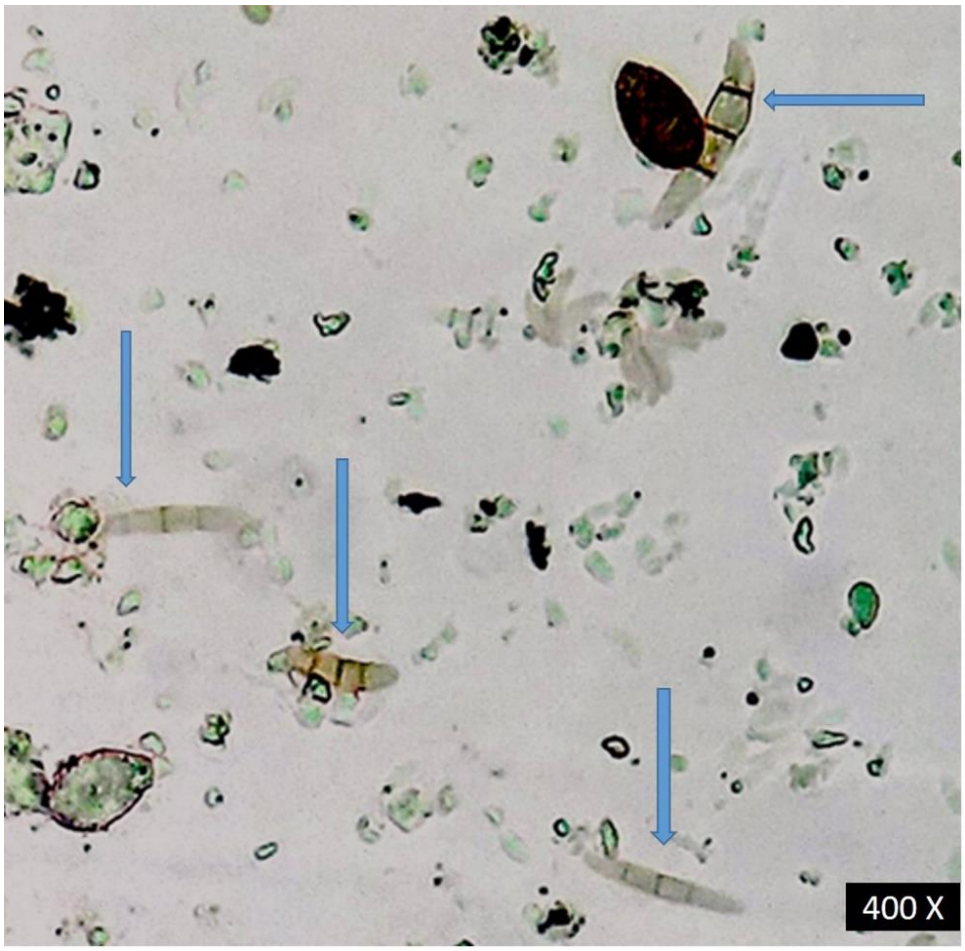
Figure 3. Distribution of wheat fields under surveillance for Fusarium head blight in the Moghan region

نوسان جمعیت اسپور عامل بیماری در فضای مزرعه پایلوت

داده‌های اقلیمی نزدیکترین ایستگاه هواشناسی (کد ایستگاه ۴۰۷۰۰) به مزرعه بخش ۷ (مجتمع کشت و صنعت مغان) در بازه زمانی یک ماهه ۹ فروردین تا ۹ اردیبهشت ۱۴۰۲ به همراه تعداد اسپورهای شکار شده در تله اسپور (شکل ۴) به صورت روزانه در جدول ۲ ارایه شده است. این بازه زمانی شامل مراحل قبل از گلدهی، شروع گلدهی، گلدهی، انتهای گلدهی و پس از گلدهی گندم بود. حداقل، حداکثر و میانگین دما در این بازه یک ماه به ترتیب °C ۴/۷-۳/۱۵، ۱۵/۲۹-۵/۷ و ۲۰/۵-۱۰/۴، میزان بارندگی ۴/۹-۰ میلی‌متر، حداقل، حداکثر و میانگین رطوبت نسبی به ترتیب ۲۳-۸۹، ۵۶-۱۰۰ و ۹۴-۴۳٪ ، سرعت باد ۵/۸-۱/۶ کیلومتر در ساعت و تعداد اسپور فوزاریوم شکار شده در ۲۴ ساعت ۰-۲۵ عدد ثبت گردید

همبستگی تعداد اسپورها و متغیرهای هواشناسی تحلیل (GLM/LM)

بررسی ماتریس همبستگی نشان داد که بیشترین همبستگی مثبت تعداد اسپور شکار شده در ۲۴ ساعت (spore 24h) با میزان بارندگی روزانه (rrr24) و حداقل رطوبت (umin) است، در حالی که شاخص‌های مربوط به دما رابطه خطی قابل‌توجهی نداشتند و متغیرهایی مانند تبخیر (evt)، میانگین سرعت باد (ffm) و ساعت آفتابی (sshn) همبستگی منفی داشتند؛ بنابراین میزان بارندگی روزانه و حداقل رطوبت به‌عنوان امیدوارکننده‌ترین پیش‌گوهای تک‌متغیره برای تعداد اسپور آزاد شده شناخته شدند (شکل ۵).



شکل ٤ - اسپورهای شکار شده توسط اسپورتراپ، ماکروکنیدی‌های چهار سلولی منقاری شکل در تصویر قابل تشخیص هستند.

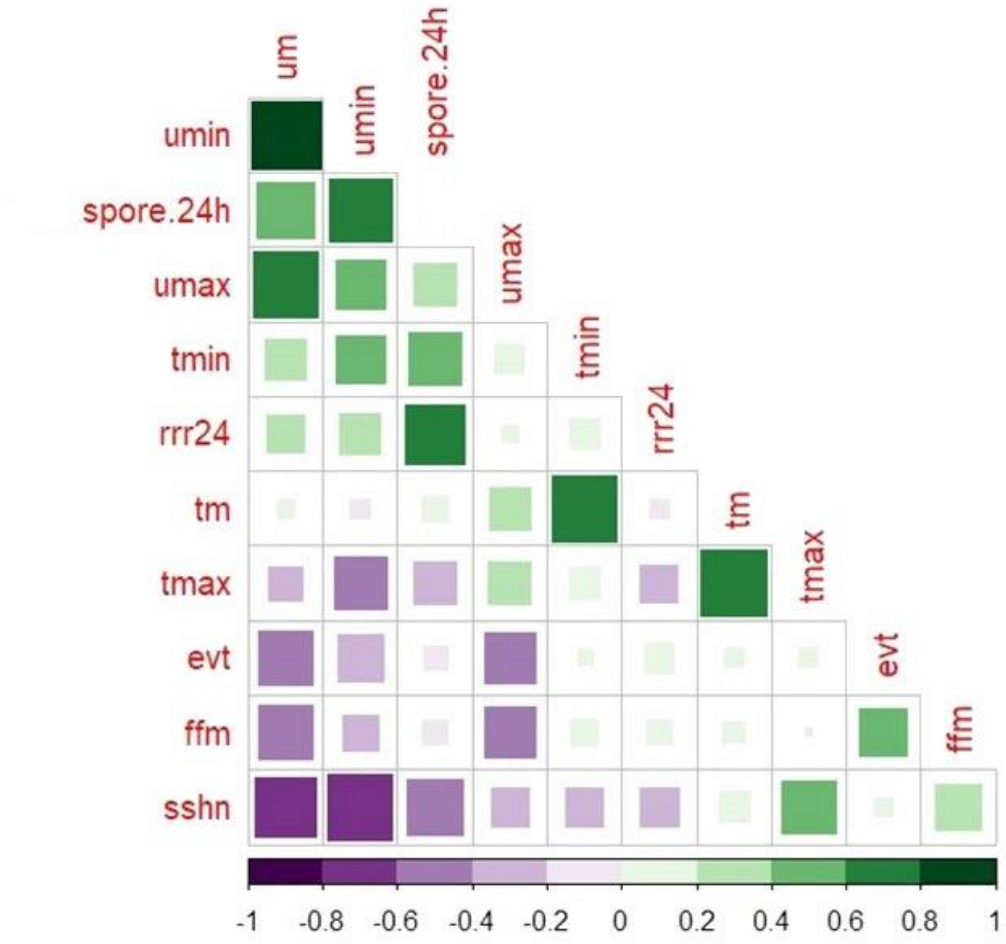
Figure 4. Spores captured by the spore trap, the beak-shaped 4-celled macroconidia are recognizable in the image.

جدول ۲- داده های هواشناسی و تعداد اسپور فوزاریوم شکارشده در بازه زمانی ۹ فروردین تا ۹ اردیبهشت ۱۴۰۲ در بخش ۷ کشت و صنعت مغان

Table 2. Meteorological data and Fusarium spores captured from March 29 to April 29, 2023, in Section 7 of the Moghan agro-industrial farm

Date	Temperature °C			Rainfall (mm)	Humidity (%)			Mean wind speed (Km/h)	Spore/24h	Flowering stage*	FHB risk**
	Min.	Max.	Mean		Min.	Max.	Mean				
3/29/2022	11.7	21.8	16.8	0	49	87	70	3.1	0	PF	L
3/30/2022	8.9	24.8	16.8	0	41	96	75	2.4	0	PF	L
3/31/2022	8.4	25.7	17	0	45	100	79	2.4	0	PF	L-M
4/1/2022	8.2	28.6	18.4	0	35	100	65	5.5	0	PF	L
4/2/2022	8.2	20.2	14.2	0	32	72	54	5	0	PF	L
4/3/2022	8	19.3	13.6	0	23	56	43	4.4	0	PF	L
4/4/2022	5.6	21.6	13.6	0	27	67	46	5.8	0	PF	L
4/5/2022	3.7	17.1	10.4	1	42	89	66	2.9	5	PF	L
4/6/2022	3.4	22.7	13.1	0.4	35	92	62	2.8	6	PF	L
4/7/2022	5.4	20.7	13.1	0	53	94	79	1.6	8	PF	L-M
4/8/2022	8.5	22.7	15.6	0	50	100	85	1.8	8	PF	M
4/9/2022	11.9	25.1	18.5	0	46	99	73	2.6	7	PF	M
4/10/2022	12.4	21.4	16.9	0	48	91	69	7.5	7	SF	M
4/11/2022	7.7	23.5	15.6	0	44	97	64	4.4	8	F	M
4/12/2022	8.2	21.7	15	0	49	89	68	3.1	6	F	M
4/13/2022	7.6	22.3	14.9	0	57	97	83	2.1	9	F	M
4/14/2022	13.4	25.2	19.3	0	44	97	77	2.4	5	F	M
4/15/2022	12.7	27.3	20	0	45	99	76	1.9	5	F	M
4/16/2022	10.3	29	19.6	0	33	94	67	2.4	6	F	M
4/17/2022	10.6	29.7	20.2	0	36	100	65	3.6	8	F	M
4/18/2022	12.2	28.8	20.5	0	41	94	65	3.3	8	F	M
4/19/2022	15.7	24.5	20.1	0.61	52	86	69	3.6	12	F	H
4/20/2022	13.2	24.3	18.8	0	47	86	65	7	9	F	M
4/21/2022	13.5	24.6	19	0	33	88	60	2.6	8	F	M
4/22/2022	15.1	21	18	0	63	79	71	5	8	F	M
4/23/2022	11.9	24.3	18.1	0	46	90	69	4.5	9	F	M
4/24/2022	13.5	20.4	17	0.4	70	96	84	3	22	F	VH
4/25/2022	11	24.3	17.6	0.9	39	88	63	3.3	18	F	H
4/26/2022	13.8	21	17.4	4.9	62	93	84	5	25	F	VH
4/27/2022	10.5	18.2	14.4	0.6	72	98	90	2.4	17	EF	H
4/28/2022	12.6	21.9	17.3	0.4	53	96	77	2.5	9	PSF	M
4/29/2022	13	15.5	14.3	0.5	89	100	94	2	18	PSF	M

*Flowering stage, PRF: pre flowering; SF: start of flowering; F: flowering; EF: end of flowering; PSF: post flowering, ** FHB risk, L: low; M: medium; H: high; VH: very high



شکل ۵- همبستگی متغیرهای هواشناسی با تعداد اسپور در ۲٤ ساعت (مربع‌های سبز نشان‌دهنده همبستگی مثبت خطی (با شدت بیشتر در سایه‌های تیره‌تر و مربع‌های بزرگ‌تر) و مربع‌های بنفش نشان‌دهنده همبستگی منفی هستند). لازم به ذکر است که به دلیل جابه‌جایی متغیرهای محور افقی و عمودی در این نمایش مثلثی، خانه‌های روی قطر اصلی نشان‌دهنده همبستگی هر متغیر با خودش نیستند؛ بنابراین مقادیر روی قطر الزاماً برابر ۱ نیستند و بیانگر همبستگی بین زوج‌متغیرهای متفاوت هستند.

Figure 5. Correlation between meteorological variables and 24-hour spore counts. Positive linear associations are shown by green squares (darker shades and larger squares denote stronger correlations), while negative associations are indicated by purple squares. It should be noted that due to the displacement of the horizontal and vertical axis variables in this triangular representation, the cells on the main diagonal do not indicate the correlation of each variable with itself; therefore, the values on the diagonal are not necessarily equal to 1 and indicate the correlation between different pairs of variables.

برآورد مدل پیش بینی تعداد اسپور در ۲٤ ساعت از روی دو متغیر میزان بارندگی و حداقل رطوبت

مدل رگرسیون خطی برای ارزیابی تأثیر عوامل هواشناسی بر تعداد اسپور شکارشده در فاصله ۲۴ ساعت اجرا شد و نتایج نشان داد که مدل کلی معنادار بود (جدول ۳). مقدار ضریب تعیین نشان‌دهنده برآیند مناسب مدل بود (R2 = 0.783) و پس از اصلاح برای تعداد متغیرهای مستقل، تقریباً ۶۷/۵٪ از واریانس متغیر وابسته توسط متغیرهای مدل توضیح داده شد (Adjusted R^2 = 0.675). از میان پیش‌بین‌ها، میزان بارندگی ۲۴ ساعته (rrr24) تأثیر قوی و معناداری بر تعداد اسپور داشت، و حداقل رطوبت(umin) نیز اثر معنی‌داری نشان داد ($P<0.05$). سایر متغیرهای مورد بررسی در این مدل اثر آماری معناداری نداشتند. جمع کل مشاهدات نشان‌دهنده کیفیت برازش و کلیت داده‌ها بودند. لذا نتیجه‌گیری میشود که در مجموعه‌داده مورد بررسی، افزایش میزان بارندگی و سطوح بالاتر حداقل رطوبت با افزایش تعداد اسپور در بازه ۲۴ ساعت همراه بوده است.

نتایج مدل رگرسیونی و ضرایب مدل به شرح جدول ۴ است.

مدل رگرسیونی با دو متغیر پیش‌بین میزان بارندگی ۲۴ ساعته (rrr24) و حداقل رطوبت (umin) برازش شد و ضرایب بدون استاندارد به ترتیب ۳/۱۹۹ (SE = 0.771, P < 0.001) و ۰/۲۶۵ (SE = 0.050, P < 0.001) برآورد گردیدند، بنابراین معادله پیش‌بینی به‌صورت ذیل ارایه می‌شود:

$$Y = (3.19 \times rr24) + (0.26 \times umin) - 5.3$$

شاخص‌های هم‌خطی (Tolerance = 0.916, VIF = 1.092) بیانگر عدم وجود هم‌خطی چندگانه معنی‌دار بودند، اما مقدار Durbin–Watson = 1.02 اشاره به احتمال خودهمبستگی خفیف در سایر متغیرها داشت؛ با توجه به این نتایج، هر دو متغیر به‌طور معناداری با افزایش شمار اسپور در ۲۴ ساعت مرتبط شناخته شدند، ولی به‌دلیل محدودیت حجم نمونه توصیه می‌شود مدل روی داده‌های مستقل اعتبارسنجی و فروض رگرسیون به‌طور دقیق‌تر بررسی گردد.

نمودارهای P-P نرمال باقیمانده‌های استانداردشده رگرسیون و پراکنش باقیمانده‌های استانداردشده در برابر مقادیر پیش‌بینی‌شده استانداردشده در شکل‌های ۶ و ۷ ارایه شده است.

جدول ۳- جدول آنالیز واریانس مدل رگرسیون خطی چندمتغیره برای پیش‌بینی تعداد اسپور در ۲٤ ساعت

Table 3. Analysis of variance (ANOVA) for the multiple linear regression model predicting spore counts over 24 hours

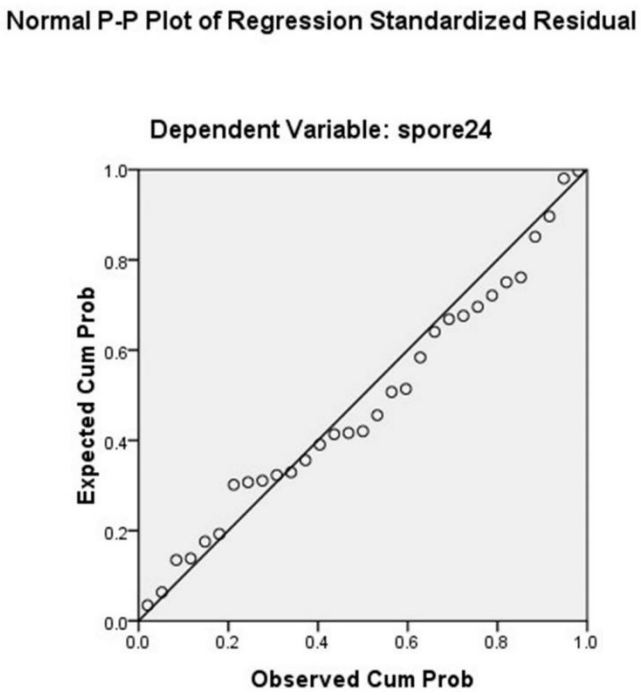
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	P value
Corrected Mode	948.074[a]	10	94.807	7.220	0.000
Intercept	0.365	1	0.365	0.028	0.869
tmin	6.114	1	6.114	0.466	0.503
tmax	6.867	1	6.867	0.523	0.478
rrr24	228.314	1	228.314	17.386	0.000
evt	0.152	1	0.152	0.012	0.915
sshn	0.070	1	0.070	0.005	0.942
tm	6.863	1	6.863	0.523	0.478
um	34.172	1	34.172	2.602	0.122
ffm	25.582	1	25.582	1.948	0.178
umax	10.996	1	10.996	0.837	0.371
umin	62.309	1	62.309	4.745	0.042
Error	262.635	20	13.132		
Total	3243.000	31			
Corrected Total	1210.710	30			

a. R Squared = 0.783 (Adjusted R Squared = 0.675), CV=44.7%

جدول ٤- مدل رگرسیونی پیش بینی تعداد اسپور در ٢٤ ساعت از روی میزان بارندگی و حداقل رطوبت

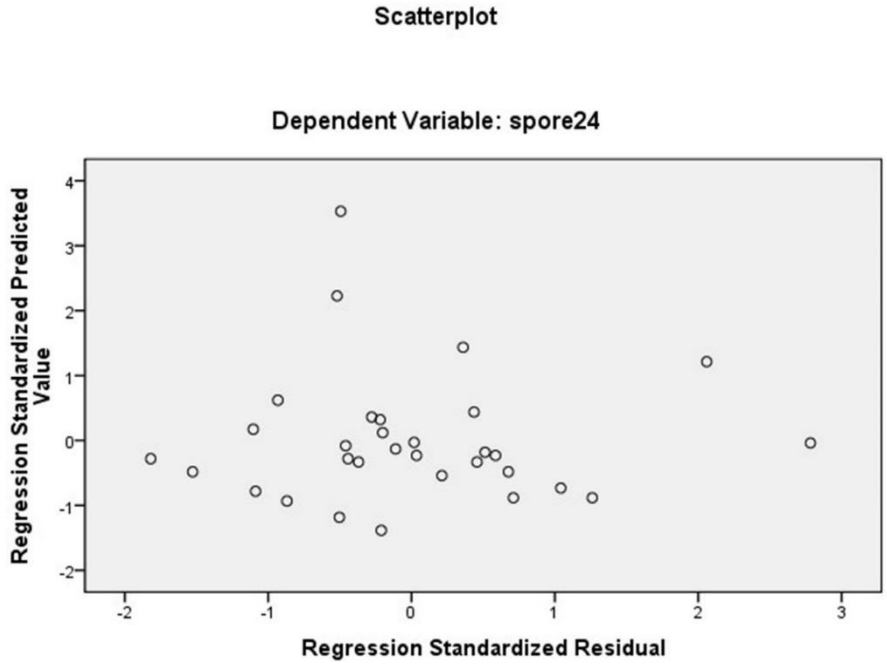
Table 4. Regression model for predicting the number of spores in 24 hours based on rainfall and minimum humidity

Predictor	Unstandardized Coefficient (B)	Std. Error	Standardized Coefficient (Beta)	t	p-value	Tolerance	VIF
(Intercept)	-5.339	2.367		-2.255	0.32		
rrr24 (rain24h)	3.199	0.771	0.453	4.150	<0.001	0.916	1.092
umin (RHmin)	0.265	0.050	0.581	5.328	<0.001	0.916	1.092



شکل ٦- نمودار P-P نرمال باقیمانده‌های استانداردشده رگرسیون

Figure 6. Normal P-P plot of standardized regression residuals



شکل ۷- نمودار پراکنش باقیمانده‌های استانداردشده در برابر مقادیر پیش‌بینی‌شده استاندارد شده

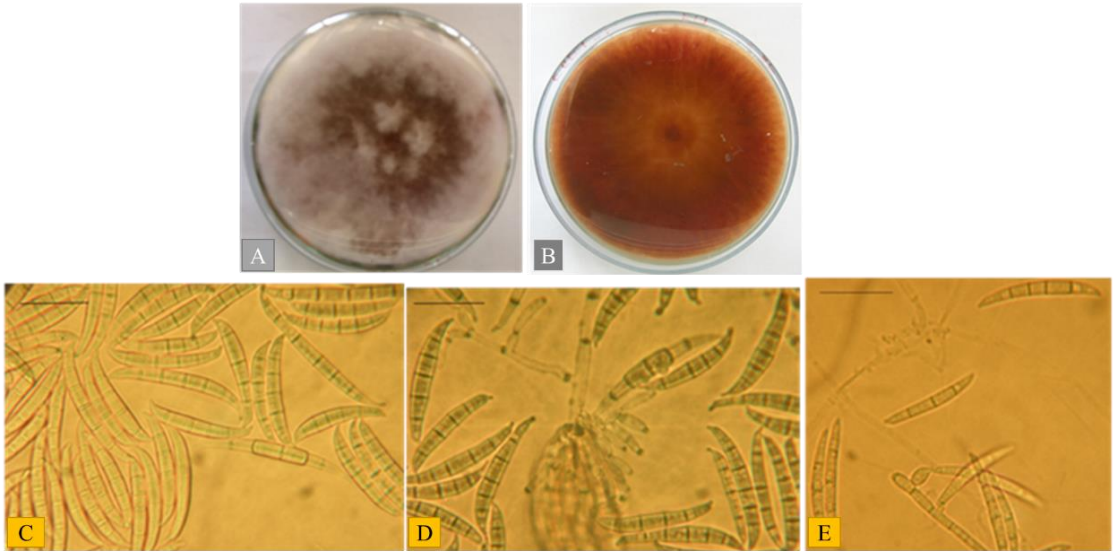
Figure 7. Scatter of standardized residuals against standardized predicted values

مشخصات ریخت‌شناسی گونه‌های فوزاریوم

در مجموع ۳۱ جدایه فوزاریوم از نمونه‌های خوشه گندم جمع‌آوری شده از منطقه مغان جداسازی شدند. بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی، ۲۵ جدایه (۸۳٪ از جدایه ها) به عنوان *F. graminearum* و شش جدایه (۱۶٪ از جدایه‌ها) به عنوان *F. culmorum*، مورد شناسایی اولیه قرار گرفتند. مشخصات ریخت‌شناسی جدایه‌ها به شرح ذیل بودند.

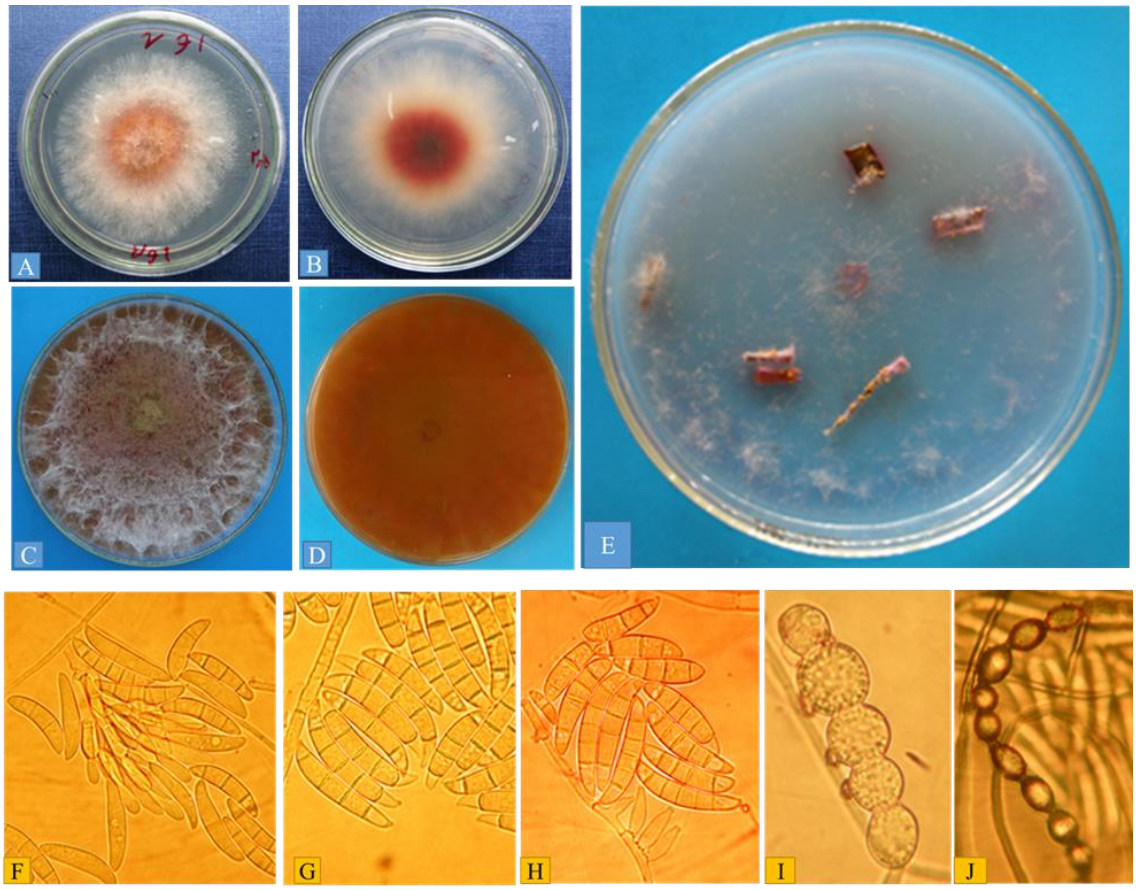
گونه *F. graminearum*: پرگنه‌ها در محیط کشت PDA رشد سریعی داشتند و میسیلیوم‌های نارنجی تا زرد فراوان چسبیده به درب تشتک پتری را تولید کردند (شکل ۸، A و B). در محیط کشت برگ میخک آگار، ماکروکنیدیوم‌ها در اسپوردوکیوم‌های نارنجی اما به سختی تولید شدند. ماکروکنیدیوم‌ها باریک و طول متوسط با ۵-۶ دیواره ضخیم بوده با سلول انتهایی باریک و سلول پایه به شکل پاشنه (شکل ۸، C) بودند. ماکروکنیدیوم‌ها از فیالید انفرادی بر روی کنیدیوم‌برهای منشعب واقع در اسپوردوکیوم بوجود آمدند (شکل ۸، D) و ندرتاً روی فیالیدهای منفرد، مستقیم روی ریسه‌ها هم دیده شدند (شکل ۸، D). میکروکنیدیوم تشکیل نشد. کلامیدوسپور: به‌صورت منفرد، خوشه‌ای یا در زنجیر تولید شدند و معمولاً کروی با انتهای زبر بودند (شکل ۸، E). متوسط اندازه ماکروکنیدی‌های چهاربندی (۵/۵-۵-۳/۵) ۴/۵ × (۴۱-۳۳) ۳۵/۶ میکرومتر و کلامیدوسپورها به قطر ۲۵-۱۲ میکرومتر بودند (Leslie et al., 2006).

گونه *F. culmorum*: متوسط قطر رشد پرگنه جدایه‌های این گونه روی محیط کشت PDA پس از هفت روز در شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتیگراد برابر با ۸/۸ سانتی متر بود. پرگنه ها در ابتدا دارای ریسه های هوایی تار عنکبوتی به رنگ سفید و یا زرد متمایل به قهوه‌ای بودند، که بعد از ۱۰-۷ روز همه پرگنه‌ها به رنگ سرخ روشن متمایل به رنگ هلویی درآمدند و پشت پرگنه به رنگ قهوه‌ای روشن دیده شد (شکل ۹، A-E) که در زیر ریسه‌های هوایی توده‌های اسپور به صورت بالشتک‌های زرد متمایل به نارنجی با تعداد فراوان تشکیل شدند. در محیط کشت CLA ماکروکنیدیوم‌ها به فراوانی در اسپوردوکیوم‌های نارنجی تا قهوه‌ای تشکیل شدند (شکل ۹، E). ماکروکنیدیوم‌ها کوتاه، قوی با دیواره ضخیم، قسمت پشتی مقداری خمیده، اما قسمت شکمی تقریباً صاف با سلول پایه ای ضعیف و سلول انتهایی گرد و معمولاً دارای ۴-۳ دیواره عرضی بودند. ماکروکنیدی‌ها از منوفیالیدهای روی کنیدیوم‌برهای منشعب در اسپوردوکیوم و یا از مونوفیالیدها کوتاه روی هیف تشکیل شدند (شکل ۹، F-H). متوسط اندازه ماکروکنیدیوم‌های چهاربندی (۸-۵) ۶/۲ × (۴۲-۳۴) ۳۶/۶ میکرومتر بود. میکروکنیدیوم وجود نداشت. کلامیدوسپور معمولا فراوان و به شکل نسبتاً سریع در ۵-۳ هفته روی CLA تشکیل شدند. کلامیدوسپورها به صورت کنیدیومی و ریسه‌ای به شکل‌های تخم مرغی تا کروی و به صورت منفرد، زنجیری یا توده‌ای و اکثراً دارای سطحی صاف بودند (شکل ۹، I-J) (Leslie et al., 2006).



شکل ۸- سطح رویی(A) و پشتی(B) پرگنه *Fusarium graminearum* روی محیط PDA، ماکروکنیدی(C)، کنیدیوفورهای منشعب(D) و کلامیدوسپورمنفرد(E) تشکیل شده در محیط CLA

Figure 8. The upper (A) and lower (B) surfaces of the colony of *Fusarium graminearum* on PDA medium, macroconidia (C), branched conidiophores (D), and single chlamydospores (E) formed in CLA medium



شکل ۹- سطح رویی (A, C) و پشتی (B, D) پرگنه *Fusarium culmorum* روی محیط PDA و CLA، کشت در محیط CLA برای تولید انبوه ماکروکنیدی (E)، تولید ماکروکنیدی‌ها از منوفیالیدهای روی کنیدیوفورهای منشعب در اسپوردوکیوم و یا از مونوفیالیدها کوتاه روی هیف (F-H) و تولید کلامیدوسپورها به صورت کنیدیومی و ریسه ای (I-J)

Figure 9. The upper (A, C) and lower (B, D) surfaces of the colony of *Fusarium culmorum* on PDA and CLA media; cultivation in CLA for mass production of macroconidia (E); production of macroconidia from monophialides on branched conidiophores in the sporodochium or from short monophialides on hyphae (F-H); and production of chlamydospores in both conidial and filamentous forms (I-J).

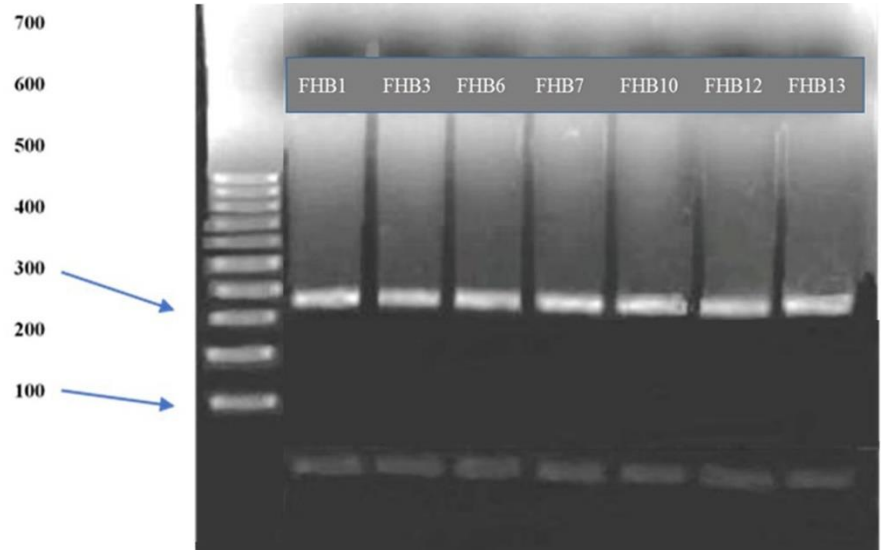
شناسایی مولکولی با استفاده از آغازگر اختصاصی گونه

گونه *F. graminearum*: تجزیه و تحلیل مولکولی، تأیید قطعی هویت گونه را ارائه داد. واکنش PCR با استفاده از مجموعه آغازگرهای اختصاصی گونه *F. graminearum*، Fg1-1 و Fg1-2، منجر به تولید محصولی واضح از DNA ژنومی جدایه مورد آزمایش گردید. الکتروفورز ژل آگارز نشان داد که این محصول یک باند مجزا با وزن مولکولی تقریبی ۴۰۰ جفت باز است. این اندازه دقیقاً همان افزونه[1] مورد انتظار برای ناحیه ژن Tri5 است که توسط این آغازگرها هدف قرار می‌گیرد (شکل ۱۰).

گونه *F. culmorum*: تجزیه و تحلیل مولکولی، تأیید قطعی هویت گونه را ارائه داد. واکنش PCR با استفاده از مجموعه آغازگرهای اختصاصی Fcoif و Fcoir منجر به تولید محصولی واضح از DNA ژنومی جدایه مورد آزمایش گردید. الکتروفورز ژل آگارز نشان داد که این محصول یک باند مجزا با وزن مولکولی تقریبی ۵۷۰ جفت باز تولید شد. این اندازه مربوط به ناحیه بین ژنی[2] (IGS) از DNA ریبوزومی است که توسط این آغازگرها هدف قرار می‌گیرد (شکل ۱۱).

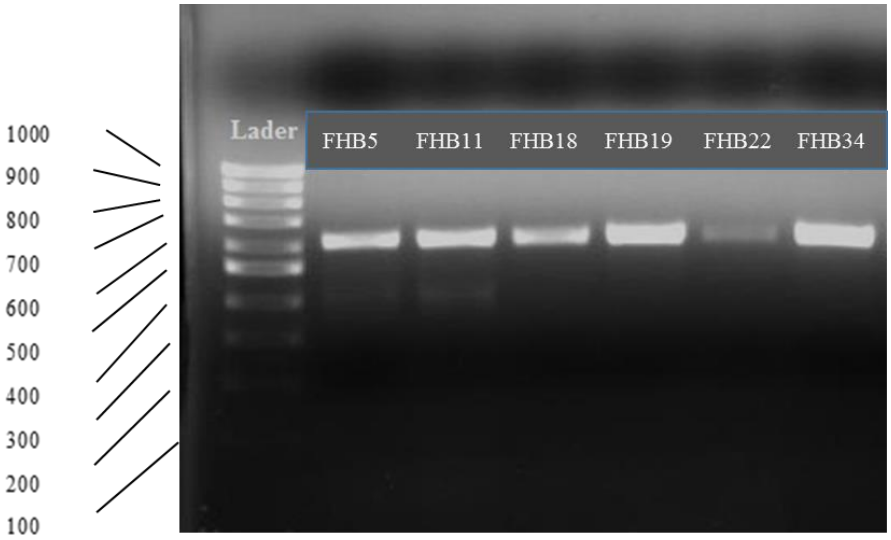
[1] Amplicon

[2] Intergenic spacer



شکل ۱۰- الکتروفورز ژل، قطعه تکثیر شده حدود ٤٠٠ جفت باز، نشان‌دهنده هویت جدایه‌ها به عنوان *Fusarium graminearum*

Figure 10. Gel electrophoresis showing the ~400 bp amplicon confirming the identity of the isolates as *Fusarium graminearum*



شکل ۱۱- الکتروفورز ژل، قطعه تکثیر شده حدود ۵۷۰ جفت باز، نشان‌دهنده هویت جدایه‌ها به عنوان *Fusarium culmorum*

Figure 11. Gel electrophoresis showing the ~570 bp amplicon confirming the identity of the isolates as *Fusarium culmorum*

بحث

در این مطالعه چندفصلی و چندمحلی که در دشت مغان انجام شد، سوختگی فوزاریومی سنبله در ۸۵–۷۷٪ از مزارع مورد پایش مشاهده و شدت بیماری در خوشه‌های علامت‌دار بین ۵٪ تا ۴۵٪ برآورد شد. نتایج هوازیست‌شناختی نشان داد که آلودگی هوابرد اسپورها در ۶۲/۵٪ از روزهای پایش شناسایی شده و تعداد میانگین اسپورها در بازه ۲۴ ساعت در مرحله پیش‌گلدهی و گلدهی به‌ترتیب حدود ۲/۸ و ۱۰/۲ بوده و اوج تراکم تا ۲۵ اسپور در ۲۴ ساعت در دوره‌های مرطوب کوتاه‌مدت رخ داده است. شناسایی‌های ریخت‌شناسی و مولکولی نشان داد گونه *F. graminearum*، غالب (۸۳٪) و گونه *F. culmorum* (≈۱۷٪) از جدایه‌های فوزاریوم را شامل می‌شود. فراوانی بالای وقوع و دامنه شدت گزارش‌شده در این مطالعه با شواهدی از سایر مناطق ایران و جهان هم‌خوانی دارد. برای مثال، گزارش‌های پیشین از ایران نشان داده‌اند سوختگی سنبله گندم در استان‌های گلستان و مازندران شیوع قابل‌توجهی دارد (Malihipour et al., 2018; Hasanvand et al.,

2023). مطالعه دیگری در مناطق شمال و شمال غرب ایران نشان داد گونه *F. graminearum* به ترتیب عامل ۵۰ و ۹۶ درصد سوختگی سنبله گندم است (Davari et al., 2013). مقادیر شدت و وقوع در بازه‌های مورد مطالعه با مقادیر گزارش‌شده در مطالعات بین‌المللی که در شرایطی با رطوبت متناوب و بارش‌های فصل رشد گزارش شده‌اند، همخوانی دارد (Bolanos-Carriel et al., 2016; Matengu et al., 2024). تفاوت‌های جزئی در درصد وقوع و شدت احتمالاً ناشی از تفاوت در رقم مورد کشت، مدیریت بقایا، تاریخ کاشت، و تفاوت‌های میکرواقلیمی بین مطالعات است (Morellos et al., 2025).

غالبیت *F. graminearum* در نمونه‌های این مطالعه (۸۳٪) مطابق با الگوهای جهانی است که نشان می‌دهد *F. graminearum* در بسیاری از مناطق به‌عنوان عامل غالب این بیماری شناخته می‌شود (Leslie et al., 2006). سهم پایین‌تر *F. culmorum* نیز در برخی مطالعات مشابه گزارش شده است؛ با این حال نسبت گونه‌ها می‌تواند تحت تأثیر شرایط محیطی و کاربرد آفت‌کش‌ها قرار گیرد (Nicholson et al., 1998; Bolanos-Carriel et al., 2016).

مایه تلقیح اولیه غیرجنسی بیماری سوختگی فوزاریومی سنبله، به ویژه ماکروکنیدی‌های تولید شده روی بقایای گیاهی آلوده، منبع مهمی از آلودگی در گندم هستند زیرا می‌توانند در شرایط مرطوب و گرم همزمان با گلدهی، مستقیماً گلچه‌ها را آلوده کنند. این قارچ روی بقایای گندم، ذرت و سایر علف‌ها زنده می‌ماند و وجود بقایای آلوده روی سطح خاک، میزان مایه تلقیح موجود در نزدیکی سایبان محصول را افزایش می‌دهد (Alisaac & Mahlein, 2023). این مایه تلقیح مرتبط با بقایای گیاهی از نظر همه‌گیرشناسی مهم است زیرا بیماری به شدت به در دسترس بودن مایه تلقیح در زمان گرده افشانی وابسته است و حتی سطوح متوسط بقایای گیاهی نیز می‌تواند در صورت مساعد بودن هوا، فشار بیماری محلی را افزایش دهد. ماکروکنیدی‌های تولید شده از بقایای گیاهی در اولین رویدادهای آلودگی نقش دارند که سپس باعث گسترش ثانویه در داخل طبق شده و احتمال سفید شدن سنبلچه‌ها، چروکیدگی دانه‌ها و کاهش عملکرد را افزایش می‌دهند (Khan et al., 2020).

ماتریس همبستگی و تحلیل رگرسیونی نشان داد که میزان بارندگی ۲۴ ساعته (rrr24) و حداقل رطوبت (umin) به‌طور معناداری با تعداد اسپور ۲۴ ساعته همبستگی دارند؛ مدل LM دومتغیره نهایی با $R^2 \approx 0.783$ (Adjusted $R^2 \approx 0.675$) بخش قابل‌توجهی از واریانس تعداد اسپور را توضیح می‌دهد. این نتایج نشان‌دهنده نقش مهم عوامل رطوبتی و بارشی در تعیین مایه تلقیح هوابرد هستند و با نتایج مطالعاتی که تغییرات رطوبت و بارش را به‌عنوان پیش‌بینی‌کننده‌های کلیدی انتشار اسپور معرفی کرده‌اند، همخوانی دارد (Forrer et al., 2021; Ma et al., 2025; Tapia et al., 2025). شاخص‌های هم‌خطی (Tolerance ≈ 0.916, VIF ≈ 1.09) بیانگر عدم وجود هم‌خطی چندگانه معنادار بین میزان بارندگی و حداقل رطوبت بودند، بنابراین تخمین ضرایب از اعوجاج هم‌خطی شدید مصون مانده است. با این حال مقدار Durbin–Watson ≈ 1.02 نشان‌دهنده وجود خودهمبستگی مثبت در سایر متغیرها برای داده‌های روزانه طبیعی است و باید با استفاده از مدل‌هایی که وابستگی زمانی را در نظر می‌گیرند بررسی شوند (Matengu et al., 2024). توسعه بیماری سوختگی فوزاریومی سنبله به شدت تحت تأثیر رطوبت طولانی مدت در زمان گلدهی قرار دارد و خطر آلودگی زمانی که بارندگی یا رطوبت نسبی بالا حداقل به مدت ۲۴ ساعت در حوالی گلدهی ادامه داشته باشد، به شدت افزایش می‌یابد. گزارش‌ها نشان داده است که رطوبت نسبی بالای ۹۵٪ به مدت ۴۰ تا ۶۰ ساعت معمولاً برای آلودگی موفقیت‌آمیز توسط ماکروکنیدی‌ها کافی است، در حالی که بارندگی یا رطوبت بالای پایدار، رطوبت برگ و سنبله مورد نیاز برای جوانه‌زنی و نفوذ اسپور را فراهم می‌کند. در عمل، یک بارندگی ۲۴ ساعته یا یک دوره طولانی رطوبت نزدیک به اشباع می‌تواند شروع همه‌گیری را نشان دهد و دوره‌های طولانی‌تر رطوبت عموماً منجر به بروز بیشتر بیماری، سوختگی شدید سنبله و خطر آلودگی بیشتر دانه می‌شود (Khan et al., 2020).

این مطالعه بر پایه ۳۰ داده ثبت شده برای تحلیل رگرسیونی و ۳۵ مزرعه برای پایش بود؛ هرچند نتایج معنادار هستند، ولی حجم نمونه برای تعمیم‌پذیری ملی یا منطقه‌ای بیشتر، باید افزایش یابد تا ثبات برآوردها بهبود یابد. توصیه می‌شود مطالعات آتی، داده‌های طولی وسیع‌تری جمع‌آوری کنند و اعتبارسنجی مدل‌ها روی داده‌های مستقل انجام شود. با توجه به مقدارDurbin–Watson، استفاده از مدل‌های سری زمانی یا مدل‌های مختلط[1] برای درنظر گرفتن وابستگی‌های زمانی و ناهمسانی واریانس توصیه می‌شود. ترکیب داده‌های هوازیست‌شناختی با مدل‌های اقلیمی و داده‌های مدیریت مزرعه (مانند پوشش بقایا، تناوب زراعی، تاریخ کاشت و نوع رقم) می‌تواند پیش‌بینی‌های موثرتری برای خطر سوختگی فوزاریومی سنبله فراهم سازد (Nguyen et al., 2025; Xiao et al., 2020).

نتیجه‌گیری نهایی

این مطالعه نشان داد که در دشت مغان، سوختگی فوزاریومی سنبله فراوانی قابل‌توجهی دارد و توزیع هوابرد اسپورها تحت تأثیر پارامترهای رطوبتی و بارشی قرار دارد. گونه *F. graminearum* گونه غالب بود و مدل‌های رگرسیونی نشان دادند که بارش و حداقل رطوبت از مهم‌ترین پیش‌بین‌های تعداد اسپور و احتمال بروز بیماری هستند. برآورد جمعیت اسپور برای اولین بار در کشور انجام شد لیکن برای بهبود اعتبار و کاربرد این نتایج، پیشنهاد می‌شود که مطالعات آتی در گستره فضایی و زمانی بیشتری انجام شود. بدیهی است با این افزایش، فرض‌های آماری دقیق‌تر شده و ارتباط مستقیم بین شمار اسپور، وقوع بیماری و آلودگی به مایکوتوکسین‌ها با اعتبار بیشتری ارزیابی خواهد شد.

سپاس‌گزاری

بدین‌وسیله از جناب آقای دکتر مرتضی بیطرف ثانی و دکتر مصطفی زارع محققین مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی یزد برای ارائه مشاوره‌های فنی و علمی ارزشمندشان که به بهبود محتوای این مقاله انجامید، قدردانی می‌شود.

References

Akinsanmi, O. A., Backhouse, D., Simpfendorfer, S., & Chakraborty, S. (2006). Pathogenic variation of Fusarium isolates associated with head blight of wheat in Australia. *Journal of Phytopathology*, *154*(9), 513-521. https://doi.org/ 10.1111/j.1439-0434.2006.01137.x

Alisaac, E., & Mahlein, A. K. (2023). Fusarium head blight on wheat: Biology, modern detection and diagnosis and integrated disease management. *Toxins*, *15*(3), 192. https://doi.org/10.3390/toxins15030192

Bellesi, F. J., Arata, A. F., Martínez, M., Arrigoni, A. C., Stenglein, S. A. & Dinolfo, M. I. (2019). Degradation of gluten proteins by Fusarium species and their impact on the grain quality of bread wheat. *Journal of Stored Products Research*, *83*, 1-8. https://doi.org/ 10.1016/j.jspr.2019.05.007

Bolanos-Carriel, C., Wegulo, S. N., Hallen-Adams, H., Baenziger, P. S., Eskridge, K. M., & Funnell-Harris, D. (2016). Effects of cultivar resistance, fungicide application timing, and fungicide chemical class on FHB and DON in winter wheat. In: S. Canty, A. Clark, K. Wolfe, and D. van Sanford (Eds.), *Proceedings of the 2016 National Fusarium Head Blight Forum*. East Lansing, MI/Lexington, KY, USA. P. 10. https://www.cabidigitallibrary.org/doi/pdf/10.5555/20183183619

Darvishnia, M., Senshenas, S., Bazgir, E., & Darvishnia, F. (2023). Identification of *Fusarium verticillioides* fumonisin B1 mycotoxin and the effects of pH, relative humidity and light on its

[1] Mixed-effects

production on maize substrate. *Journal of Applied Research in Plant Protection*, *11*(4), 15-27. (In Farsi with English summary) https://doi.org/10.22034/arpp.2022.15740

Davari, M., Safaie, N., Darvishnia, M., & Didar Taleshmikaeel, R. (2014). Occurrence of deoxynivalenol producing isolates of Fusarium graminearum species complex associated with head blight of wheat in Moghan area. *Journal of Crop Protection*, *3*(2), 113-123. https://doi.org/10.48311/jcp.2014.1099

Davari, M., Wei, S. H., Babay-Ahari, A., Arzanlou, M., Waalwijk, C., van der Lee, T. A., ... & Van Diepeningen, A. D. (2013). Geographic differences in trichothecene chemotypes ofFusarium graminearum in the Northwest and North of Iran. *World Mycotoxin Journal*, *6*(2), 137-150. https://brill.com/view/journals/wmj/6/2/article-p137_4.xml

Forrer, H. R., Pflugfelder, A., Musa, T., & Vogelgsang, S. (2021). Low-cost spore traps: An efficient tool to manage Fusarium head blight through improved cropping systems. *Agronomy*, *11*(5), 987. https://doi.org/10.3390/agronomy11050987

Garcia, M. A., Mahmoud, R., Bancal, M. O., Bancal, P., Bernillon, S., Pinson-Gadais, L., ... & Foulongne-Oriol, M. (2025). Ecophysiological behavior of major *Fusarium* species in response to combinations of temperature and water activity constraints. *Applied and Environmental Microbiology*, *91*(7), e01832-24. https://doi.org/10.1128/aem.01832-24

Gilbert, J., & Woods, S. (2006, March). Strategies and considerations for multi-location FHB screening nurseries. In *The global fusarium initiative for international collaboration: A strategic planning workshop. CIMMYT, El Batàn, Mexico* (pp. 93-102). https://scabusa.org/pdfs/ptt/Gilbert_Field-Screening.pdf

Hasanvand, E., Darvishnia, M., Mirzaei Najafgholi, H., & Pakbaz, S. (2023). Evaluation of the response of 25 commonly cultivated wheat genotypes to Fusarium head blight disease under greenhouse conditions. *Journal of Applied Research in Plant Protection*, *12*(2), 213-224. (In Farsi with English summary) https://dx.doi.org/10.22034/arpp.2023.16368

Karlsson, I., Persson, P., & Friberg, H. (2021). Fusarium head blight from a microbiome perspective. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 628373. https://doi.org/ 10.3389/fmicb.2021.628373

Khan, M. K., Pandey, A., Athar, T., Choudhary, S., Deval, R., Gezgin, S., Hamurcu, M., Topal, A., Atmaca, E., Santos, P. A. & Omay, M. R. (2020). Fusarium head blight in wheat: contemporary status and molecular approaches. *3 Biotech*, *10*(4), 172. https://doi.org/ 10.1007/s13205-020-2158-x

Koncz, Z., Huszti, K., Naár, Z., Kiss, A. & Szécsi, Á. (2008). PCR identification of *Fusarium graminearum* isolated from wheat grain. *Cereal Research Communications*, *36*(4), 623-630. https://doi.org/10.1556/CRC.36.2008.4.11

Lacey, M. E., & West, J. S. (2006). *The air spora: a manual for catching and identifying airborne biological particles* (Vol. 156). Dordrecht: Springer. https://doi.org/ 10.1007/978-0-387-30253-9

Leslie, J. F., Summerell, B. A., & Bullock, S. (2006). *The Fusarium laboratory manual* (Vol. 2, No. 10). Ames, IA: Blackwell Pub. https://doi.org/ 10.1002/9780470278376

Ma, J., Chai, A., Shi, Y., Xie, X., Li, L., Xiang, S., ... & Li, B. (2025). Diurnal release of airborne pathogen spores in greenhouses via the synergistic effects of relative humidity and wind. *Advanced Science*, *12*(25), 2501500. https://doi.org/ 10.1002/advs.202501500

Malihipour, A., Dehghan, M. A., Shahbazi, K., & Esmaeilzadeh Moghaddam, M. (2018). Resistance to Fusarium head blight (FHB) among the 2013 elite wheat genotypes of the south warm and dry zone in Iran under field and greenhouse conditions. *Iranian Journal of Plant Protection Science*, *49*(1), 41-55. (In Farsi with English summary) https://doi.org/ 10.22059/ijpps.2018.227550.1006763

Matengu, T. T., Bullock, P. R., Mkhabela, M. S., Zvomuya, F., Henriquez, M. A., Ojo, E. R., & Fernando, W. D. (2024). Weather-based models for forecasting Fusarium head blight risks in wheat and barley: A review. *Plant Pathology*, *73*(3), 492-505. https://doi.org/ 10.1111/ppa.13839

Möller, E. M., Bahnweg, G., Sandermann, H., & Geiger, H. H. (1992). A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucleic Acids Research*, *20*(22), 6115. https://doi.org/ 10.1093/nar/20.22.6115

Morellos, A., Pantazi, X. E., Almoujahed, M. B., Kriaučiūnienė, Z., Kazlauskas, M., Šarauskis, E., & Mouazen, A. M. (2025). Forecasting of Fusarium head blight spatial distribution in winter wheat using machine learning. *Computers and Electronics in Agriculture*, *231*, 109967. https://doi.org/ 10.1016/j.compag.2025.109967

Nicholson, P., Simpson, D. R., Weston, G., Rezanoor, H. N., Lees, A. K., Parry, D. W., & Joyce, D. (1998). Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearumin* cereals using PCR assays. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *53*(1), 17-37. https://doi.org/ 10.1006/pmpp.1998.0170

Nguyen, T. B. H., Henri-Sanvoisin, A., Le Floch, G., & Picot, A. (2025). Delving into the soil and phytomicrobiome for disease suppression: A case study for the control of Fusarium Head Blight of cereals. *Science of the Total Environment*, *965*, 178655. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2025.178655

Pouzeshimiyab, B., & Fani, S. R. (2020). Epidemiology and aerobiology of *Pseudoperonospora cubensis* in northwest Iran. *Italian Journal of Agrometeorology*, (2), 109-116. https://doi.org/ 10.13128/ijam-850

Sabbagh, S.K., Peikani, M. & Esmailzadeh Bahabadi, S. (2017). Salicylic acid effect on antioxidant enzymes activity and transcription of β 1,3- gluconase and oxalat oxidase genes in infected wheat with head blight disease. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)*, *40*(1), 15-31. https://doi.org/ 10.22055/ppr.2016.12486

Tapia, L., Castillo-Novales, D., Riquelme, N., Valencia, A. L., Larach, A., Cautín, R., & Besoain, X. (2025). Rainfall and high humidity influence the seasonal dynamics of spores of *Glomerellaceae* and *Botryosphaeriaceae* genera in avocado orchards and their fruit rot association. *Agronomy*, *15*(6), 1453. https://doi.org/ 10.3390/agronomy15061453

Xiao, Y., Dong, Y., Huang, W., Liu, L., Ma, H., Ye, H., & Wang, K. (2020). Dynamic remote sensing prediction for wheat fusarium head blight by combining host and habitat conditions. *Remote Sensing*, *12*(18), 3046. https://doi.org/ doi.org/10.3390/rs12183046

Zadoks, J. C., Chang, T. T., & Konzak, C. F. (1974). A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed research*, *14*(6), 415-421. https://doi.org/10.1111/j.1365-3180.1974.tb01084.x

Zhang, W., Boyle, K., Brûlé-Babel, A. L., Fedak, G., Gao, P., Robleh Djama, Z., ... & Fobert, P. R. (2020). Genetic characterization of multiple components contributing to Fusarium head blight resistance of FL62R1, a Canadian bread wheat developed using systemic breeding. *Frontiers in plant science*, *11*, 580833. https://doi.org/ 10.3389/fpls.2020.580833

© 2026 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/.