

**НАСТАВНО - НАУЧНОМ ВЕЋУ
ПОЉОПРИВРЕДНОГ ФАКУЛТЕТА
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ**

ДАТУМ: 01.12.2017. године

Предмет: **Оцена урађене докторске дисертације Ане Обрадовић, дипл. инж.**

Одлуком Научно-наставног већа Пољопривредног факултета - Универзитета у Београду бр. 33/2-5.1. од 29.11.2017. године именована је комисија за оцену и одбрану докторске дисертације Ане Обрадовић, дипл. инж., под насловом: „ДИВЕРЗИТЕТ КОМПЛЕКСА ВРСТЕ *Fusarium graminearum* ПАТОГЕНА СТРНИХ ЖИТА И КУКУРУЗА У СРБИЈИ“. Комисија у саставу др Горан Делибашећ, редовни професор, др Славица Станковић, научни саветник, др Александра Булајић, редовни професор, др Ана Николић, научни сарадник и др Драгана Игњатовић-Мицић, научни саветник, на основу прегледа докторске дисертације, подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

1. ОПШТИ ПОДАЦИ О ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ

Докторска дисертација Ане Обрадовић, дипл. инж., написана је на 172 стране текста и укључује 36 табела, 6 графикана и 32 оригиналне фотографије. Испред основног текста написан је резиме са кључним речима на српском и енглеском језику.

Докторска дисертација садржи осам основних поглавља, и то: Увод (стр. 1-3), Преглед литературе (стр. 4-33), Циљеви истраживања (стр. 34-35), Материјал и методе (стр. 36-59), Резултати (стр. 60-122), Дискусија (стр. 123-142), Закључак (стр. 143-146) и Литература (стр. 147-172). На крају текста дисертације налази се Биографија кандидата. Поголавља Преглед литературе, Материјал и методе, Резултати и Дискусија садрже више потпоглавља.

2. ПРИКАЗ И АНАЛИЗА ДИСЕРТАЦИЈЕ

У **уводу** је указано на значај стрних жита и кукуруза у свету и у Србији, као и на штете које проузрокују патогене врсте гљива из рода *Fusarium*. Ове врсте се појављују сваке године у усеву жита у одређеном проценту, а у годинама са повољним агроклиматским условима за њихов развој могу умањити принос 70-90%, нарочито када је захваћен клип. Врста *Fusarium graminearum* једна је од најраспрострањенијих и најдеструктивнијих патогена зрна жита и других индустријских биљака широм света. Штете које причињава додатно су повећане њеном способношћу синтезе више од 17 микотоксина, од којих су најраспрострањенији зеараленон и деоксиниваленол. Иако је комплексна врста *F. graminearum* као патоген стрних жита и кукуруза доста проучавана широм света, о њеној дистрибуцији и варијабилности у погледу морфолошких, физиолошких, токсиколошких, генетичких и других својстава нема довољно информација у нашој земљи.

Преглед литературе има пет потпоглавља у којем су анализирани подаци који су доступни у литератури из области која је била предмет проучавања ове докторске дисертације. Прво потпоглавље *Привредни значај жита* указује на широку примену и разноврсне употребне вредности кукуруза, пшенице и јечма. У другом потпоглављу описана је географска дистрибуција и економски значај, као и симптоми обољења и циклус развоја врсте *F. graminearum* на стрним житима и кукурузу. У потпоглављу

Микотоксини (фузариотоксини) указано је на значај микотоксина у свету и нашој земљи, као и утицај најважнијих фузариотоксина на здравље људи и животиња. У четвртом потпоглављу детаљно се описује варијабилност гљиве *F. graminearum*, као и класификација анаморфног и телеоморфног стадијума која се временом мењала. У овом потпоглављу обрађени су литературни подаци који говоре да у оквиру комплексне врсте *F. graminearum* има најмање 15 нових врста које се разликују у погледу морфолошких, патогених и токсигених својстава, као и распрострањеност хемотипова у различитим деловима света. У потпоглављу *Генетичка и биогеографска варијабилност врста Fg комплекса* описане су молекуларне методе које се користе за прецизну и поуздану идентификацију гљива из овог комплекса, као и порекло и биогеографска распрострањеност врста *Fg* комплекса широм света.

Основни **циљ истраживања** у оквиру ове докторске дисертације је утврђивање присуства, распрострањености и диверзитета врста из комплекса *Fg* на територији Србије, као и утврђивање карактеристика које би могле послужити као таксономски критеријуми за разликовање изолата и врста у оквиру комплекса *F. graminearum*. С обзиром на литературне податке о присуству новооткривених врста у суседним земљама - *F. boothii* и *F. vorosii*, један од циљева био је да се утврди њихово евентуално присуство на зрну стрних жита и кукуруза гајених у Србији. Бројни резултати из светске литературе указују на велики диверзитет врста у оквиру *Fg* комплекса, па је један од приоритетних циљева ове дисертације био да се проучи варијабилност испитиваних изолата врсте *F. graminearum* у погледу морфолошких својстава, на основу макроскопских и микроскопских карактеристика моноспоријалних култура испитиваних изолата. Патогеност испитиваних изолата врсте *F. graminearum* применом вештачке инокулације биљака у пољским и лабораторијским условима, испитивана је у циљу утврђивања варијабилности и разлика у односу на биљку домаћина са које су изоловани. Способност синтезе микотоксина је, с обзиром на велики значај у производњи здравствено безбедне хране, једна од значајнијих карактеристика врста рода *Fusarium*, па је циљ у оквиру ових истраживања био и да се одреди способност испитиваних изолата да синтетишу зеараленон и деоксиниваленол. Квантитативном и квалитативном анализом испитана је варијабилност изолата у синтези микотоксина. У циљу утврђивања припадности одређеном хемотипу (ЗАДОН, 15АДОН и НИВ), извршена је хемијска и молекуларна анализа изолата *F. graminearum* различитог порекла. У циљу молекуларне карактеризације врсте *F. graminearum* изолованих из зрна жита у Србији, у овој дисертацији извршено је секвенцирање више геномних региона одабраних изолата, њихово међусобно поређење и одређивање филогенетског међуодноса са изолатима *F. graminearum* у свету.

Материјал и методе садрже 6 потпоглавља у којима су обухваћене методе рада које су примењене за испитивања у лабораторијским и пољским условима. Коришћени су изолати *F. graminearum* (101) из колекције Института за кукуруз који су прикупљени у периоду од 1993. до 2015. године. Изолати су пореклом са кукуруза (37), пшенице (42) и јечма (22) из 41 локалитета на територији Србије. У потпоглављу *Добијање чистих култура и њихово чување* описан је поступак изолације и добијања униформних чистих култура и њихово чување. У другом потпоглављу изложене су методе за проверу патогених својстава на листу јечма, класу пшенице и клипу кукуруза (Imathiu et al., 2009; Mesterhazy et al., 1999; Reid et al., 1996). У оквиру потпоглавља *Утврђивање варијабилности морфолошких својстава Fusarium graminearum* приказано је проучавање анаморфног и телеоморфног стадијума. Код анаморфног стадијума праћене су макроскопске и микроскопске карактеристике одабраних изолата. Такође, испитивано је и присуство телеоморфних структура (перитеција) формираних на подлози од шаргарепе (СА). У оквиру четвртог потпоглавља (*Утврђивање*

варијабилности токсигених својстава *Fusarium graminearum*) описан је поступак за квалитативно и квантитативно одређивање потенцијала продукције микотоксина деоксиниваленола (ДОН) и зеараленона (ЗЕА) помоћу ELISA методе код проучаваних изолата *F. graminearum*. Такође, коришћена је и високо ефикасна течна хроматографија (HPLC) за квалитативно и квантитативно одређивање ниваленола (НИВ) и деоксиниваленола (ДОН), као и његових ацетил естар деривата (ЗАДОН и 15АДОН). Овом методом је поред способности синтезе микотоксина испитиваних изолата урађено и одређивање припадности изолата хемотипу. У потпоглављу *Молекуларне анализе*, обављена је молекуларна детекција гена за продукцију трихотеценских хемотипова (НИВ, ЗАДОН и 15АДОН) као и молекуларна идентификација *F. graminearum* применом PCR (polymerase chain reaction). Детекција гена за продукцију трихотеценских хемотипова обављена је применом мултиплекс PCR реакције коришћењем два сета специфичних прајмера (Ward et al., 2002) дизајнираних на основу секвенци гена укључених у продукцију трихотецена (*TRI3* и *TRI2*). Молекуларна идентификација врста у оквиру *Fg* комплекса обављена је умножавањем три геномска сегмена гљиве (транскрипциони елонгациони фактор *Ef1 алфа*, хистон *H3* и β -*tubulin*). Изолација укупне количине ДНК из испитиваних изолата обављена је коришћењем комерцијалног кита DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). За умножавање *Ef1 алфа* региона ДНК коришћен је пар прајмера еф1/еф2, за хистон *H3* коришћени су H3-1a/H3-1b и за β -*tubulin* коришћени су прајмери T1/T22. Визуелизација умножених фрагмената ДНК обављена је електрофоретским раздвајањем у 1% агарозном гелу и бојењем у раствору етидијум-бромида, а затим су амплификовани фрагменти пречишћени помоћу кита (Purification Kit, Metabion International, Germany). Секвенцирање је урађено на ABI 3730XL аутоматском капиларном секвенционатору у Macrogen, Inc (<http://dna.macrogen.com>, Korea) у оба смера уз коришћење истих прајмера као при амплификацији. Добијене секвенце обрађене су у програму FinchTV Version 1.4.0 и одређене су консензус секвенце. Поређење добијених секвенци са секвенцама доступним у GenBank бази података (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) урађено је помоћу BLAST анализе у CLUSTAL W програму, интегрисаном унутар програма MEGA верзија 6 (Thompson et al., 1994). За прорачун генетичке сличности на основу секвенци гена одабраних изолата са изолатима гљива из других делова света, коришћен је програм MEGA верзија 6 (Tamura et al., 2011). Филогенетске анализе, односно проучавање еволутивне повезаности проучаваних изолата обављене су реконструкцијом филогенетских стабала секвенцираних изолата *Fg* комплекса из Србије и 25 одабраних изолата из других делова света доступних у GenBank бази. Реконструкција филогенетских стабала обављена је коришћењем Maximum parsimony методе интегрисане унутар MEGA 6.0 софтвера и bootstrap анализе са 1000 понављања. У потпоглављу *Статистичке методе и обрада података* описан је поступак статистичке обраде добијених резултата. Обрада података урађена је у програмском пакету *Статистика* 12.0, а добијени резултати обрађени су једнофакторијалном анализом варијансе, а значајност разлика средњих вредности одређена је Данкановим post-hoc тестом ($p < 0,05$). Коефициент корелације коришћен је за утврђивање међузависности степена патогености, као и потенцијала продукције изолата.

Резултати истраживања приказани су у 6 потпоглавља, јасно и концизно, уз текстуална тумачења, табеле, графиконе и слике које приказују поједине делове истраживања. У првом потпоглављу *Изолати одабрани за проучавања и добијање моноспоријалних изолата* дате су детаљне информације о биогеографском пореклу изолата, односно о локалитету, биљци домаћину и биљним органима са којих је изолован патоген (стабло, зрно, вретено, клас, плевике). Из колекције гљива

Лабораторије за фитопатологију Института за кукуруз Земун Поље одабран је 101 изолат пореклом из различитих локалитета и из различитих узорака пшенице, кукуруза и јечма, прикупљених у периоду између 1993. и 2015. године. У другом потпоглављу описана је варијабилност у морфолошким својствима. С обзиром на варијабилност у изгледу колоније- бујност и боја ваздушне мицелије као и боја пигмента у подлози, код испитиваних изолата није било могуће на основу овог својства уочити разлике између изолата различитог порекла као и врста у оквиру *Fg* комплекса - *F. graminearum sensu stricto*, *F. boothii* и *F. vorosii*. Утврђено је да се просечна брзина дневног пораста на PDA подлози није значајно разликовала између изолата у односу на њихово порекло, док се разликовала између различитих врста у оквиру *Fg* комплекса. Брзина пораста колоније, указала је да су се изолати *F. boothii* најспорије развијали, док је изолат врсте *F. vorosii* најбрже растао, а остали бројни изолати *F. graminearum sensu stricto* испољавали су сличну просечну брзину пораста. Уочене су разлике у ширини макроконидија испитиваних изолата, али ово својство нема довољну дијагностичку резолуцију за разликовање врста *Fg* комплекса због малих разлика у просечној ширини као и преклапања просечних вредности ширине макроконидија за поједине врсте овог комплекса. Изолати *F. boothii* имали су најуже макроконидије, док је изолат *F. vorosii* имао најшире макроконидије. Међутим, изолати *F. graminearum ss* имали су велику варијабилност у ширини конидија па је њихова ширина, у зависности од изолата, била јако блиска ширини конидија поменутих врста. Утврђено је присуство црних и јајастих телеоморфних структура (перитеција) код свих испитиваних изолата на СА подлози. С обзиром да нису утврђене разлике у њиховој боји, облику и димензијама, није утврђена интерспецијска и интраспецијска варијабилност. Тестови провере патогености обављени вештачком инокулацијом листа јечма у лабораторијским условима, као и инокулацијом клипа кукуруза и класа пшенице у пољу показали су да су сви испитивани изолати били патогени. Петог дана након инокулације листа јечма, уочена је појава некротичне пеге са жутим ореолом која је у каснијој фази развоја прекривена беличастом превлаком мицелије паразита. Код већине испитиваних изолата 7 дана након инокулације дошло је до потпуне некрозе и пропадања читавих листова. Патогеност изолата на инокулисаном клипу кукуруза испољила се појавом карактеристичног симптома црвено-ружичасте трулежи. Три недеље након инокулације оцењена је патогеност изолата на класу пшенице на основу карактеристичних симптома на незрелом класу. Резултати испитивања патогености изолата у лабораторијским и пољским условима показали су да је агресивност између појединих изолата варијабилна како у контролисаним условима, тако и у пољу, али исто тако и између изолата пореклом са различитих биљака домаћина (пшеница, кукуруз, јечам). Није уочена повезаност између порекла изолата и патогености на изворној биљци домаћину. Утврђено је да су изолати *F. vorosii* и *F. boothii* показали генерално слабију патогеност у односу на остале изолате *F. graminearum ss* код сва три теста патогености (*Провера патогености*). У потпоглављу *Варијабилност токсигених својстава* проучаван је потенцијал продукције микотоксина ДОН и ЗЕА помоћу ELISA методе и уочена је значајна варијабилност између испитиваних изолата. Највећи број изолата имао је потенцијал продукције ДОН између 50 и 100 $\mu\text{g/g}$, док је концентрација ЗЕА код већине испитиваних изолата била између 10 и 50 $\mu\text{g/kg}$. Изолати пореклом са пшенице синтетисали су у просеку највеће количине микотоксина ДОН и ЗЕА, док су изолати пореклом са јечма синтетисали најмање количине оба испитивана микотоксина. Резултати ELISA теста показали су да постоји статистички високо значајна корелација између потенцијала продукције ДОН и ЗЕА код изолата пореклом са кукуруза, док код изолата пореклом са пшенице и јечма није уочена статистички значајна корелација између синтетисаних микотоксина. Резултати квалитативне и

квантитативне анализе помоћу HPLC методе показали су да постоји велики диверзитет у производњи ДОН деривата. Већина испитиваних изолата (88/101) припадала је 15АДОН хемотипу, 3АДОН хемотип детектован је у мањем броју (13/101), док ниједан испитивани изолат из Србије није припадао НИВ хемотипу. Изолати врсте *F. boothii* и *F. vorosii* синтетисали су само 15АДОН, док 3АДОН и НИВ није детектован. Са циљем одређивања трихотеценских хемотипова помоћу генетичких анализа урађена је мултиплекс PCR реакција коришћењем два сета специфичних прајмера TRI3 и TRI12. Утврђено је да су сви испитивани изолати припадали 15АДОН хемотипу. Након секвенцирања амплификованих фрагмената свих испитиваних изолата на основу *Ef 1 алфа* гена, уочено је да су неки изолати имали идентичне секвенце, па је тако за даље филогенетске анализе одабрано 12 изолата који су имали различите секвенце. Молекуларна идентификација и карактеризација одабраних изолата обављена је и секвенцирањем гена хистон *H3* и β -*tubulin*. У GenBank базу података депоновано је укупно 36 секвенци одабраних изолата добијених у овим истраживањима. Коришћењем GCPSR (genealogical concordance phylogenetic species recognition) приступа заснованом на филогенетској сагласности три независна гена омогућено је раздвајање врста које није било могуће на основу морфолошких карактеристика. Ген *Ef 1 алфа* није био довољно информативан да раздоји све присутне врсте у оквиру *Fg* комплекса, иако су на основу поменутог гена детектоване разлике чак и у неколико нуклеотида између изолата исте врсте. На основу *Ef 1 алфа* гена идентификован је један изолат као *F. vorosii*, док су сви остали изолати идентификовани као *F. graminearum* ss. Гени *Ef 1 алфа* и β -*tubulin* омогућили су детектовање врста *F. graminearum* ss и *F. vorosii*, док *F. boothii* није раздвојен од *F. graminearum* ss. На основу *histon H3* гена идентификоване су све три врсте (*F. graminearum* ss- 9, *F. vorosii*- 1 и *F. boothii*- 2 изолата). Добијени резултати представљају основу протокола за молекуларну идентификацију и разликовање врста у оквиру *Fg* комплекса (*Молекуларна детекција, идентификација и карактеризација*).

Дискутовани су добијени резултати у оквиру шест потпоглавља уз јасна тумачења. Потпоглавље *Варијабилност морфолошких својстава Fusarium graminearum* је обухватило дискусију о идентификацији врста *Fg* комплекса које није било могуће разликовати само на основу морфолошких карактеристика, што потврђују и резултати истраживања у свету. Проучавања патогених својства указала су на велику варијабилност изолата *F. graminearum* пореклом из Србије, али није уочена повезаност између испољавања патогености изолата и њиховог порекла у сва три теста патогености (*Варијабилност патогених својстава изолата Fusarium graminearum*). Треће потпоглавље (*Варијабилност токсигених својстава изолата Fusarium graminearum*) обухватило је дискусију о најзначајнијим микотоксинима које синтетишу испитивани изолати *F. graminearum* као и о њиховој међузависности. У четвртном потпоглављу дискутовано је о распрострањености и значају хемотипова у свету и Србији. Резултати дисертације су указали да већина изолата припада 15АДОН хемотипу, као и у већини земаља у окружењу. У оквиру петог потпоглавља истичу се молекуларне методе као поуздан начин да се идентификују врсте у оквиру *Fg* комплекса с обзиром да су врсте из овог комплекса филогенетски веома блиске. Неопходно је применити GCPSR приступ који захтева анализирање више гена који су информативни за раздвајање врста у оквиру *Fg* комплекса. Филогенетска анализа пружила је увид у ближу генетичку карактеризацију, као и познавање биодиверзитета врста *Fg* комплекса из чега може настати успешна стратегија у сузбијању ових штетних патогена (*Молекуларна идентификација и карактеризација врста Fg комплекса*). У последњем потпоглављу пружен је увид у присуство, распрострањеност и значај врста овог рода како на територији Србије, тако и у другим деловима света.

Дискутовано је о променама у структури популације врста у оквиру *Fg* комплекса као и њихово ширење.

Закључци који су изведени у потпуности произилазе из добијених резултата. У Србији је по први пут детектовано присуство врсте *F. vorosii* на пшеници и *F. boothii* на пшеници и кукурузу. Проучавањем морфолошких карактеристика испитиваних изолата уочена је велика варијабилност у изгледу макроскопских својстава на основу којих није било могуће утврдити морфолошке разлике између врста *Fg* комплекса. На основу проучавања микроскопских карактеристика уочено је да просечне вредности у дужини и ширини макроконидија могу значајно варирати, па се ови параметри не могу користити за морфолошко раздвајање испитиваних изолата. Тестови патогености показали су да су сви испитивани изолати били патогени, као и да су изолати *F. vorosii* и *F. boothii* испољили генерално слабију патогеност у односу на изолате *F. graminearum* ss. Највећи потенцијал продукције микотоксина ЗЕА и ДОН синтетисали су изолати пореклом са пшенице док су изолати пореклом са јечма имали најмањи потенцијал продукције оба микотоксина. Изолати *F. boothii* синтетисали су у просеку ниске концентрације ДОН и ЗЕА, док је изолат *F. vorosii* синтетисао највеће концентрације ЗЕА од свих испитиваних изолата. Помоћу HPLC методе одређен је хемотип испитиваних изолата и уочено да *F. boothii* и *F. vorosii* припадају 15АДОН хемотипу. Најдоминантнији хемотип био је 15АДОН са 86,7%, док је 3АДОН детектуван само код 13,3% изолата. Поређењем резултата добијених хемијским анализама са молекуларним анализама које одређују припадност хемотипова, уочено је да постоје разлике у детекцији 3АДОН хемотипа. Филогенетска истраживања представљају почетак проучавања дистрибуције врста *Fg* комплекса у Србији, као и њихово поређење са другим изолатима у свету. Предложен је молекуларни протокол за идентификацију и разликовање врста у оквиру *Fg* комплекса, што ће допринети бољем познавању биодиверзитета *Fg* комплекса, као и успешној стратегији у сузбијању.

Литература у дисертацији је на правилан начин наведена и обухватила је 236 референци, које одговарају предмету проучавања.

3. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ

Докторска дисертација Ане Обрадовић, дипл. инж., под насловом: „ДИВЕРЗИТЕТ КОМПЛЕКСА ВРСТЕ *Fusarium graminearum* ПАТОГЕНА СТРНИХ ЖИТА И КУКУРУЗА У СРБИЈИ“ је оригиналан научни рад са фундаменталним и примењивим значајем. Дисертација представља успешно изведен самостални експериментално-истраживачки научни рад кандидата, који је у сагласности са планом и програмом предвиђеним у пријави докторске дисертације. Научни допринос ове дисертације огледа се у томе што је по први пут указано на велики диверзитет врсте *F. graminearum*, проузроковача црвено-ружичасте трулежи корена, стабла, плесивости клипа кукуруза и фузариозе класа пшенице у Србији. Посебан значај овом истраживању даје идентификација врсте *F. vorosii* и *F. boothii*, које су по први пут изоловане са зрна жита у Србији. Од великог значаја су добијени резултати о биодиверзитету трихотеценских хемотипова о чему до сада нису постојали подаци за наше агроколошке услове. Резултати филогенетских проучавања дали су увод у карактеризацију комплексне врсте *Fusarium graminearum*. Секвенцирање три геномска региона одабраних изолата је допринело расветљавању еволутивне међуповезаности врста *F. vorosii*, *F. boothii* и *F. graminearum* ss и одредило њихово место у односу на остале врсте *Fg* комплекса у свету. Ова проучавања омогућила су развијање протокола за молекуларну идентификацију и биће од великог значаја за успостављање успешне стратегије у сузбијању ових штетних патогених врста.

Имајући у виду све изнето, Комисија позитивно оцењује докторску дисертацију кандидата Ане Обрадовић, дипл. инж., под насловом: „ДИВЕРЗИТЕТ КОМПЛЕКСА ВРСТЕ *Fusarium graminearum* ПАТОГЕНА СТРИХ ЖИТА И КУКУРУЗА У СРБИЈИ“ и предлаже Научно-наставном већу Пољопривредног факултета, Универзитета у Београду, да ову позитивну оцену усвоји и тиме омогући кандидату да пред истом Комисијом јавно брани докторску дисертацију.

Чланови Комисије:

др Горан Делибашић, редовни професор
(област Фитопатологија)
Универзитет у Београду-Пољопривредни факултет

др Славица Станковић, научни саветник
(област Фитопатологија)
Институт за кукуруз Земун Поље, Београд

др Александра Булајић, редовни професор
(област Фитопатологија)
Универзитет у Београду-Пољопривредни факултет

др Ана Николић, научни сарадник
(област Молекуларна генетика)
Институт за кукуруз Земун Поље, Београд

др Драгана Игњатовић-Мицић, научни саветник
(област Молекуларна генетика)
Институт за кукуруз Земун Поље, Београд

Београд,
1.12.2017. године

Прилог:

Сепарати објављених радова Ане Обрадовић, дипл. инж., у научним часописима на SCI листи

Vesna Krnjaja, Violeta Mandić, Jelena Lević, Slavica Stanković, Tanja Petrović, Tanja Vasić, **Ana Obradović** (2015): Influence of N-fertilization on Fusarium head blight and mycotoxin levels in winter wheat. *Crop Protection*, Vol. 67: 251-256.