



**УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ  
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ**

**Департман за Фитомедицину и заштиту  
животне средине**



**Јозеф Гашпаровски**

дипл. инж. пољопривреде

**ТОКСИГЕНИ КАПАЦИТЕТ *Fusarium* spp. СА СЕМЕНА  
КУКУРУЗА ШЕЋЕРЦА**

МАСТЕР РАД

**Нови Сад, 2021**



**УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ  
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ**

**Департман за Фитомедицину и заштиту  
животне средине**



Кандидат  
Јозеф Гашпаровски

Ментор  
проф. др Мила Граховац,

**ТОКСИГЕНИ КАПАЦИТЕТ *Fusarium* spp. СА СЕМЕНА  
КУКУРУЗА ШЕЋЕРЦА**

МАСТЕР РАД

Нови Сад, 2021

## КОМИСИЈА ЗА ОЦЕНУ И ОДБРАНУ МАСТЕР РАДА

---

**др Мила Граховац**, ментор  
ванредни професор,  
ужа н.о. Фитопатологија  
Универзитет у Новом Саду, Пољопривредни факултет

---

**др Драгана Будаков**, председник  
ванредни професор,  
ужа н.о. Фитопатологија  
Универзитет у Новом Саду, Пољопривредни факултет

---

**др Срђан Шеремешкић**, члан  
ванредни професор,  
ужа н.о. ратарство и повртарство  
Универзитет у Новом Саду, Пољопривредни факултет

# Садржај

1. УВОД .....	1
2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ .....	3
2.1. Кукуруз.....	3
2.1.1. Значај кукуруза.....	3
2.1.2. Употреба кукуруза .....	4
2.1.3. Захтеви кукуруза за гајење .....	5
2.1.4. Најзначајније болести кукуруза .....	7
2.2. <i>Fusarium</i> spp. на кукурузу .....	7
2.3. Микотоксини .....	10
2.3.1. Историјат микотоксикоza .....	10
2.3.2. Услови појаве микотоксина .....	11
2.3.3. Зеараленон .....	13
2.3.4. Деоксиниваленол.....	14
2.4. Аналитичке технике и методе за одређивање микотоксина .....	16
3. ЗАДАТАК И ЦИЉ РАДА .....	22
4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД.....	23
4.1. Изолација патогена из узорака семена .....	23
4.2. Добијање моноспоријалних култура изолата .....	24
4.3. Идентификација изолата на основу морфолошких критеријума.....	24
4.4. Молекуларна карактеризација изолата .....	25
4.5. Вештачка инокулација неконтаминираног семена кукуруза .....	26
4.6. Анализа инокулисаног кукуруза методама HPLC и ELISA на присуство микотоксина .....	26
5. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА .....	28
5.1. Изолација патогена из узорака семена и формирање моноспоријалних изолата .....	28
5.2. Идентификација изолата на основу морфолошких критеријума.....	28
5.3. Молекуларна карактеризација изолата .....	30
5.4. Анализа инокулисаног кукуруза методама HPLC и ELISA на присуство микотоксина .....	31
6. ЗАКЉУЧАК .....	36
7. ЛИТЕРАТУРА .....	37

## РЕЗИМЕ

### Токсигени капацитет *Fusarium* spp. са семена кукуруза шећерца

Врсте рода *Fusarium* су значајни патогени великог броја биљака у пољопривредној производњи, па тако и кукуруза као једног од стратешких пољопривредних производа наше земље. Поред директних штета које припадници овог рода причињавају у производњи кукуруза кроз губитак приноса, негативан аспект њиховог деловања огледа се и у способности производње микотоксина, контаминаната који изузетно штетно утичу како на здравље људи, тако и на здравље животиња. Род *Fusarium* обухвата велики број врста које могу производити различите микотоксине. У овом раду, из семена кукуруза шећерца изоловани су изолати рода *Fusarium* који су на основу морфолошких и молекуларних карактеристика идентификовани као врста *Fusarium verticillioides*. Иако се *F. verticillioides* превасходно везује за производњу фумонизина, поједини литературни наводи указују да ова врста може производити и зеараленон и деоксиниваленол. У раду је доказан капацитет испитиваних изолата за производњу ових микотоксина и утврђено је постојање значајних разлика у капацитету производње између испитиваних изолата.

## SUMMARY

### Toxigenic potential of *Fusarium* spp. originating from sweet corn seed

Species of the genus *Fusarium* are pathogens of many different plant species in agricultural production, corn being among them as one of strategic agricultural commodities of our country. Besides direct losses by affecting yield, negative aspects of their activity is reflected in mycotoxin production, contaminants with pronounced harmful effect on human and animal health. Genus *Fusarium* has many different species which can produce different mycotoxins. In this study, isolates of *Fusarium* genus were isolated from sweet corn seeds and based on morphological and molecular traits, were identified as *Fusarium verticillioides*. Although *F. verticillioides* is primarily connected to fumonisin production, some literature data suggest that this species may also produce zearalenone and deoxynivalenol. Capacity of tested isolates to produce these mycotoxins was confirmed in this study and also significant differences in production capacity was recorded among different isolates.

## 1. УВОД

Постизање високих и стабилних приноса зрна високе хранљиве вредности који су економски исплативи и у исто време здравствено безбедни, представља примарни циљ гајења кукуруза. Иако постоји само једна врста кукуруза, гајење различитих хибрида је веома варијабилно по својим морфолошким, физиолошким и другим особинама, те представља најпроменљивију културу. Спада у групу биљака које остварују највеће приносе органске материје по јединици површине, што има висок привредни значај јер је могуће искористити скоро целокупну надземну биомасу биљке и има изузетно високи биолошки потенцијал за родност. Од биљака кукуруза могуће је произвести више од 1.500 разних индустријских прерађевина помоћу различитих технолошких поступака (Гламочлија, 2012).

У нашој земљи кукуруз се највише користи као основа у исхрани животиња у зрну, али и као цела биљка у виду силаже. Постоји и велики број производа за људску исхрану који су добијени од зрна кукуруза и саставни део многих намирница. Због високих приноса и многоструке употребе, кукуруз представља једну од најважнијих гајених житарица на свету, а у Србији се по производњи налази на првом месту (FAO.org). Обим производње у нашој земљи премашује домаће потребе, те представља стратешки производ намењен за извоз. Међу најштетнија обољења кукуруза на нашем поднебљу убрајају се трулеж зрна и клипа. У повољним условима ова болест може да смањи принос и до 50%, значајно смањује квалитет зрна и на тај начин доводи до озбиљних губитака у производњи. Иако трулеж клипа и зрна кукуруза могу да проузрокују многе патогене и токсигене врста гљива, врсте рода *Fusarium* имају највећи значај по штетама које наносе. Јављају се широм света као проузроковачи трулежи корена и приземног дела стабла, трулежи клипа кукуруза, као и увенућа великог броја биљака. У Србији су гљиве из овог рода изоловане са више од 100 биљних врста, те су са економског аспекта најзначајнији проузроковачи фузариоза кукуруза (Левић, 2008). Иако подаци о фузариозама биљака постоје више од два века, детаљнија истраживања су почела тек током последњих деценија XX

века (Logrieco et al., 2003). Поред смањења квалитета зрна, ови патогени променом физичко-хемијских својстава зрна смањују енергију клијања семена. Значај представника овог рода се огледа не само у смањењу приноса, већ и у смањењу квалитета зрна због њиховог токсигеног капацитета за синтезу микотоксина у зараженим биљкама и токсичног деловања на људе и животиње. *Fusarium* врсте и њихови микотоксини су једни од најчесталијих контаминаната кукуруза и пшенице. Неки од најважнијих микотоксина које продукују врсте овог рода су трихотецени, зеараленон, деоксиниваленол и фумонизини, који се разликују по механизму деловања и карактеристичним симптомима обољења које проузрокују код људи и животиња. Ови микотоксини су по хемијском саставу веома хетерогене супстанце које настају различитим метаболичким путевима. Врсте рода *Fusarium* продукују широк спектар микотоксина и њихова концентрација није увек пропорционална интензитету инфекције (Крњаја и сар., 2015). Токсиколошки профил не зависи само од доминантних врста, већ и других врста које могу истовремено извршити инфекцију. Бројни физички и агротехнички фактори, заједно са климатским чиниоцима утичу на варирање појаве токсигених врста, као и на интензитет синтезе микотоксина (Обрадовић, 2017). Агроеколошки услови у Србији одговарају захтевима патогеним и токсигеним врстама рода *Fusarium* у ширим размерама. Утврђено је да поједине токсигене врсте пореклом из Србије имају висок потенцијал за синтезу микотоксина, као и да су ови токсини заступљени у високом проценту на зрнима жита у нашој земљи (Станковић и сар., 2007).

Већи је број врста рода *Fusarium* које могу производити микотоксине, али немају све врсте способност производње истих микотоксина. Стога, идентификација до нивоа врсте је веома значајна у случају овог рода. С обзиром да сама припадност одређеној врсти не значи сигуран капацитет за производњу микотоксина својствених датај врсти, поред утврђивања присуства и идентификације припадника рода *Fusarium* до нивоа врсте у неком супстрату, веома је значајно и доказивање способности производње микотоксина, детектовањем њиховог присуства. Присуство микотоксина у неком супстрату може се утврдити различитим лабораторијским техникама, од којих се најчешће примењују ензимски имуноадсорпциони тест (ELISA) и течна хроматографија високих перформанси (HPLC).

## 2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

### 2.1. Кукуруз

#### 2.1.1. Значај кукуруза

Кукуруз је једна од најзначајнијих и најзаступљенијих пољопривредних култура у читавом свету. Узгаја се на 197.204.250 хектара и остварена производња у свету износи 1.148.487.291 тона зрна (FAOSTAT, 2019). Кукуруз је биљка која потиче из тропских крајева, пореклом је из централне Америке и захваљујући развоју хибрида, данас се гаји у готово целом свету. За прве фазе органогенезе потребне су релативно високе температуре и због тога кукуруз припада у групи термофилних биљака (Ковачевић и сар., 2014). Слабо подноси температуре испод нуле и такве температуре редовно доводе до пропадања биљака. Добром кондицијом биљака и правилним ђубрењем можемо повећати отпорност кукуруза на ниске температуре. По површинама на којима се гаји заузима треће место и налази се иза пшенице и пиринча. Површине засејане кукурузом стално се повећавају јер су многе земље саме почеле производити кукуруз и приноси по хектару стално се повећавају. Кукуруз може дати изузетно високе приносе по јединици површине, па је постигнут максимални принос око 26.000 kg/ha у САД-у. Међутим, у стварној производњи у сегменту приноса кукуруз карактерише велика варијабилност. Приноси се крећу од 3 – 15 t/ha сувог зрна, а нажалост, у Србији су просечни приноси нижи од 6 t/ha (<https://www.stat.gov.rs/>). Такав принос и потенцијалне могућности нуде велики простор за стручно деловање како би се у будућности приноси значајно повећали.

Зрело зрно кукуруза је састављено из три основна дела: перикарпа (омотача), клице и ендосперма. На основу карактеристика зрна постоји пет основних типова кукуруза: зубан, тврдунац, брашнасти, кокичар и шећерац. Комерцијално највише гајени хибриди кукуруза код нас али и у свету су зубани жутог зрна (Радосављевић,



2007). Резултати испитивања структуре и састава зрна показују да се добро сазрело зрно стандардног зубана састоји од: 6-7% омотача, 10-12% клице и око 80% ендосперма (Бекрић, 1997). Стабљика кукуруза је грађена из интернодија и нодија. Испуњена је паренхимом, а може нарасти до 7 м, док се код нас креће у распону између 2-4 м. Листови су издужени, зелене боје са израженом нерватуром. Кукуруз карактерише и раздвојеност мушких и женских цветова. На метлици која је на врху стабљике се формира мушка цваст, а састоји се од централне и бочних грана. Женску цваст чини клип који је најчешће налази на петом до седмом нодију стабљике. На једној биљци се формирају и развију 1-2 клипа.

### **2.1.2. Употреба кукуруза**

Највећи део произведеног зрна кукуруза у нашој земљи као и у свету се троши у традиционалном домену његове примене – за исхрану домаћих животиња. У последње време, нарочито у светским размерама, остали видови потрошње кукуруза добијају све већи значај у индустријској преради. Индустријска прерада се дели на три основна процеса прераде: мокро мљење или скробарска прерада, сува или млинарска прерада и биотехнолошка, односно ферментациона прерада. Мокрим мљењем кукуруза зрно се раздваја на своје основне састојке: скроб, протеин (глутен), уље (клицу) и влакна (мекиње). Сувом прерадом се добијају различити типови кукурузног брашна, док се биотехнолошком прерадом добијају различите хемикалије, полимери, лекови, ензими, биоразградива пластика и многих других прехранбених и еколошки безбедни производи. Поред тога што је важан део нашег свакодневног живота и савремене здраве исхране кукуруз има и значајну економску и еколошку улогу у нашој и свакој другој земљи у којој се производи.

Обновљивост кукуруза као сировине и све већа загађеност животне средине продуктима нафте представљају два основна разлога да кукуруз постане једна од главних сировина за производњу енергије и производа. Производња нових еколошки безбедних и биолошки вредних производа на бази кукуруза добија све већу пажњу водећих светских истраживачких центара из области хемије и технологије. Поред етанола који се користи као гориво, постоје и бројни други начини којима кукуруз доприноси одрживом развоју. Само угљенохидратни део зрна се конвертује у етанол, док се све остало искористи као вредан споредни производ

такозвани суви остатак после дестилације, који се продаје као висококвалитетна храна за животиње.

Богат је извор угљених хидрата односно скроба, који представља полазну сировину за низ продуката:

- модификовани скроб (скробни естри и етри, декстрини, оксидовани скроб, фракционисани скроб)
- скробни заслађивачи (скробни сируп, малтодекстрин, скробни шећер, кристална глукоза и фруктоза, шећерни алкохоли – сорбитол, манитол, ликазин),
- биотехнолошки производи (антибиотици, витамини, ензими - амилазе и протеазе, киселине - лимунска, млечна и оксална, аминокиселинелизин и глутаминске, етанол
- конзумни, технички и погонски, биоразградива пластика, ликазин).

Једна од најновијих индустријских примена кукуруза је производња већ споменутих биополимера односно биоразградиве пластике. Ови резистентни скробови данас провлаче много пажње са нутритивне стране. За то постоје два повода: њихов потенцијални позитиван ефекат на здравље људи јер доприносе превенцији неких болести као и њихова јединствена функционална особина у храни. Водећи светски произвођачи хране нуде тржишту нову врсту ових производа ниског глукозног индекса који се у људском организму физиолошки слично понашају као прехранбена односно функционална влакна (Радосављевић, 2007).

### **2.1.3. Захтеви кукуруза за гајење**

За правилан раст и развој биљака, осим воде, неопходне су и минералне материје. У случају њиховог дефицита настаје стање стреса које се манифестује бројним визуелним симптомима, специфичним за дефицит појединог елемента. Дефицит неког елемента у биљкама је пропорционалан његовој заступљености и доступности у земљишту, али и дужини периода у којем га биљка може апсорбовати. Ако дође до дефицита неких минералних материја, биљке активирају механизме којима покушавају ублажити ове недостатке. Тако у условима минералног стреса биљке кукуруза могу премештати елементе из старијих и мање активних ткива (старији листови и стабљика) у млађа и активнија ткива. Елементи се прво ремобилишу а након тога транслоцирају ксилемом и флоемом, те се на крају уграђују у нове

молекуле на местима где су најпотребнији. Међутим, нису сви елементи једнако покретљиви у биљкама те је одговор биљака у случају дефицита покретних елемената (N, K, Mg, Cl, Mn) и непокретљивих (Ca, S, Fe, Cu, Zn, B, Mo) значајно другачији (Vukadinović и сар., 1998).

На сам принос кукуруза највећи утицај имају климатски фактори, агротехничке мере и избор хибрида. Од свих претпоставки, најзначајнији су захтеви кукуруза према земљишту, води, температури и дужини дана (светлости). Према истраживањима на производњу кукуруза око 40% утиче агротехника (потенцијал родности тла, обрада, ђубрење, обрада земљишта), недостатак падавина 20%, избор хибрида и квалитет семена око 15%, присутност штеточина и полагање 10%, високе температуре 10% и 5% остали чиниоци (Шимић, 2008). Кукуруз најбоље успева на дубоким, плодним и структурним типовима земљишта, слабо киселе или неутралне реакције са добрим топлотним, водним и ваздушним режимом.

Недостатак воде је данашње време проблем са којим се суочавају готово све гајене биљке. Водени стрес доводи до низа физиолошких процеса и активира механизме отпорности на сушу као што су економичнија потрошња воде, складиштење воде, добро развијен коренов систем. Први показатељ недостатке воде код биљака је смањење и губитак тургора, па су сви процеси који зависе од тургора угрожени (деоба и повећање ћелија). Као последица тога, инхибирани су процеси раста биљке, ћелије се контрахију и смежурају, ћелијски сокови постају концентрованији, листови се уврћу и смањује се лисна површина изложена директном сунчевом зрачењу. Ако до воденог стреса дође након што је биљка развила велику лисну масу, листови убрзано старе и опадају, што је последица повећања синтезе етилена. И на тај начин се биљка брани од суше, јер се губитком листова смањује транспирациона површина, што побољшава изгледе биљке за преживљавањем сушног периода (Pevalek-Kozlina, 2003). Водни стрес делује и на корен биљке кукуруза. Раст корена усмерава према дубљим и влажним деловима земљишта. Као и инхибиција повећавања ћелија и лисне површине, раст корена у влажно тло још је један од начина којима се биљка брани од суше, а у ту сврху може послужити и затварање сома које узрокује апсцисинска киселина. Један начин прилагођавања сушним стаништима је и развој Ц4 и ЦАМ метаболизма (Pevalek-Kozlina, 2003).

#### 2.1.4. Најзначајније болести кукуруза

Неке од најзначајнијих болести кукуруза пламењача, сива пегавост, мехураста гар, прашна гар, фузариозна трулеж корена и стабле, плесниност клипа, црвенило кукуруза.

Пламењачу кукуруза коју изазива гљива *Sclerophthora macrospora*. Ова гљива проузрокује патуљаст раст биљака, многобројне заперке, и уске, хлоротичне листове. На метлици се јавља пролиферација цветних грана а уместо клипа формира се мноштво уских листова и болест захвата целу биљку. Оптимални услови за заразу су обилне падавине и висока влага земљишта.

Сива пегавост (*Helminthosporium turcicum*) изазива симптоме на листовима у виду елиптично издужених пега сиве боје. Болест најпре захвата доње листове, одакле се шири према врху биљке и цела биљка изгледа као да је оштећена мразом. За развој болести потребна слободна вода на листовима а симптоми се испољавају недељу дана након инфекције.

Мехураста гар (*Ustilago maydis*) се јавља готово сваке године и захвата целу биљку али најкарактеристичнији симптоми се јављају на клипу. На местима инфекције се формирају гале уместо зрна а сачињене су од црне масе коју чине споре гљиве. Није познато да гљива продукује микотоксине, те зараже биљке могу бити погодне за исхрану животиња. До повећане инфекције долази у годинама са високим температурама и повећаном влагом земљишта.

#### 2.2. *Fusarium* spp. на кукурузу

Из рода *Fusarium* на кукурузу се најчешће срећу врсте *F. graminearum*, *F. moniliforme*, *F. glutinans*, *F. verticillioides* итд. Могу проузроковати пропадање семена и палеж клијанаца, трулеж корена и стабла, црвенило кукуруза и плесниност клипа. Поред штета које наносе у смислу губитка приноса, штете се огледају и у способности ових гљива да производе микотоксине који испољавају токсично деловање на људе и животиње. У овом раду изолати *Fusarium* spp. су изоловани из зрна кукуруза, као проузроковачи плесниности клипа.

Већина проузроковача плесновости клипа кукуруза је распрострањена у свим пределима гајења кукуруза у свету, али ипак највеће штете причињавају у влажним регионима, посебно када су падавине изнад просека у фенофазама од свилања до зрења клипа. Према наводима Панчића (1990), седамдесетих година прошлог века, када су касностасни хибриди били најчешће гајени, ФАО 700 група, често је била присутна епифитотична плесниност клипа. У нашим условима, када су спољашњи фактори одговарајући, обољење се јавља у јачем интензитету, штете су веома значајне. Штетност овог обољења се огледа у смањењу приноса и у смањењу хранљиве вредности зрна.

*Fusarium* врсте формирају дуге, вишећелијске вретенасте макроконидије и представљају морфолошку карактеристику одређеног рода. Многе врсте формирају и ситне, најчешће једноћелијске микроконидије које варирају од овалног до сферичног облика. Такође, неке врсте формирају резистентне хламидоспоре које имају улогу у преживљавању неповољних услова, посебно сушних периода (Glenn, 2007).

Гљиве из рода *Fusarium* се најчешће налазе у биљним намирницама као контаминанти, посебно у оним произведеним од житарица. Животиње чешће носе последице штетног деловања микотоксина рода *Fusarium* јер се хране сточном храном коју чини високи удео житарица. Токсини се могу таложити у месу, млеку и јајима, те конзумирање ових намирница може имати негативно деловање и на здравље људи.

Многе *Fusarium* врсте су биљни патогени, а остале су сапрофити, те их највише егзистира у земљи (Chelkowski, 2011). Гљиве овог рода најчешће контаминирају зрна житарица, посебно кукуруз и пшеницу, затим уљарице и грахорице. Нешто ређе могу контаминирати културе као што су јечам, рижу, раж, просо.

Род *Fusarium* обухвата велики број врста које могу проузроковати болести семена, клијанаца, стабла, корена, клипа, класа и зрна. *Fusarium* spp. се у зараженим посејаним семенима развија и касније се шири унутар стабла, клипа, што значи да се гљива може преносити из семена у биљке и поново у семе (Васон et al., 2001). Иако је овакав системични развој из семена могућ, најчешћи начин инфекције је спорама путем свиле или класића.

Агроеколошки услови у Србији погодују појави патогених и токсигених врста рода *Fusarium* у ширим размерама, које у појединим годинама могу проузроковати значајно смањење приноса и повећању контаминираност зрна кукуруза и пшенице микотоксинима (Станковић и сар., 2007).

Постоји 12 група унутар рода *Fusarium*, од којих 4 секције имају најтоксичније врсте: *Sporotrichiella* (*F. sporotrichioides*, *F. poae*), *Gibbosum* (*F. equiseti*), *Discolor* (*F. graminearum*, *F. culmorum*) и *Liseola* (*F. moniliforme*, *F. proliferatum*, *F. subglutienans*) (Nelson et al., 1983.) Представници ових врста производе мноштво биолошких активних једињења који су структурно али и по начину деловања врло различити. Многа једињења која продукују ове гљиве могу штетно деловати на имунолошки систем, потискујући имунолошке функције. У Србији су рода *Fusarium* изоловане са преко 100 биљних врста, а са економског аспекта су, биле врсте и остале, најзначајније као проузроковачи фузариоза кукуруза и пшенице (Левић, 2008). Од ових врста је *F. graminearum* најзначајнија патогена врста, која проузрокује трулеж корена, стабла и клипа кукуруза.

*Fusarium* врсте и њихови микотоксини су једни од најучесталијих контаминаната кукуруза и пшенице. Неки од најважнијих микотоксина које продукују врсте овог рода су трихотецени, зеараленон, деоксиниваленол и фумонизини. *Fusarium* врсте синтетишу и микотоксине као што су фузапролиферин, беауверидин, ениатини и монилиформин, фузарини А-Д и глиотоксин, који су мање истражени (Santini et al., 2012). Поред негативних ефеката на здравље људи и животиња, фузариозна зрна значајно утичу на смањење технолошког квалитета зрна. Насупрот томе, инфекција зрна *Fusarium* spp. и контаминација микотоксинима као што су деоксиниваленол, не утиче негативно на квалитет, што представља проблем с аспекта безбедности хране, јер зрна доброг технолошког квалитета могу бити високо контаминирана микотоксинима (Prange et al. 2005).

У годинама са великом количином падавина у вегетационом периоду биљке израженија је појава *Fusarium* врста на зрну, док гљиве рода *Aspergillus* преовлађују у годинама са топлим и сушним временским условима (Rodrigues, 2011). Раст и развој тзв. пољских врста плесни као што су представници родова *Alternaria*, *Cladosporium* и *Fusarium* фаворизују потпуно другачији екофизиолошки чиниоци од оних карактеристичних за раст тзв. плесни складишта *Aspergillus* spp. и

*Penicillium* spp. Прва група гљива је прилагођена хладнијим и влажнијим условима, док друга група има израженију ксерофилну и термофилну природу.

### 2.3. Микотоксини

Микотоксини (гр. *mykes*– гљива, лат. *toxicon*– отров) представљају секундарне токсичне метаболите одређених филаментозних гљива, које гљиве синтетишу од великог броја биохемијски једноставних једињења примарног метаболизма (ацетата, малоната, мавалоната и неких аминокиселина) у низу реакција уз помоћ ензима (Косић-Танасков и сар., 2013). Иако је до данас идентификовано више хиљада врста гљива, само око 250 су токсигене, односно у одговарајућим условима средине могу да синтетишу микотоксине. Токсигене плесни најчешће припадају родовима *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Mucor*, *Alternaria* и *Cladosporium* (Scudamore, 2008).

По хемијској структури представљају разноврсна, релативно стабилна органска једињења, мале молекулске тежине (200–700 Da), која варирају од простих Ц4 једињења до комплексних једињења (Милићевић и сар., 2014). Иако физиолошка улога микотоксина није сасвим позната, највећи број истраживања указује да немају биохемијски значај и нису неопходни за раст гљива. Сматра се да поседују регулаторну и заштитну улогу, имају функцију у стицању конкуритивне предности, јер инхибирају раст осталих микроорганизама који се налазе у истој еколошкој ниши (Brase et al., 2009). Познато је да више различитих гљива могу да продукују исти микотоксин, али такође неке врсте могу продуковати два или више микотоксина истовремено (Бурсић и сар., 2012). Иако је данас откривено око 400 микотоксина, највећа пажња се придаје онима који се најчешће јављају као контаминанти хране и имају највећи утицај на људско здравље.

#### 2.3.1. Историјат микотоксикога

Микотоксини су присутни у храни још од давнина, а на то упућују писани подаци о изненадним болестима великог броја људи и животиња усред конзумирања плесниве хране. Једна од најстаријих познатих микотоксикога је изазвана ерготалкалоидима

гљиве *Claviceps purpurea*, проузроковача ражене главнице. Ерготизам је био узрок смрти десетине хиљада људи у Европи у средњем веку а болест је тада названа Ватра Светог Антона. Обољење бубрега које се јавља и у Србији, Балканска ендемска нефропатија, такође се повезује са деловањем микотоксина и то охратоксина А. Много је сличних података, али специфичан узрок тровања дуго није био познат.

Проучавање токсичних ефеката и повезивање обољења човека и животиња са деловањем микотоксина почело је од 1960. године. Услед акутног тровања дошло је до угинућа 100.000 ћурака а обољење је названо „turkey X disease“ у Великој Британији од акутне некрозе јетре.

Анализом сачме кикирикија са којом су се храниле животиње изолована је гљива *Aspergillus flavus* и откривено је до тада непозната једињења - микотоксини. Откриће ових једињења представља прекретницу и почетак интензивних проучавања токсигених гљива и њихових микотоксина.

### **2.3.2. Услови појаве микотоксина**

Развој и интензитет појављивања микотоксина је уско повезан са микроклиматским условима у различитим деловима света и уз погодне еколошке прилике трајно угрожавају производњу и складиштење пољопривредних производа.

Географска распрострањеност различитих микотоксина је уско повезана уз климатске услове одређених врста гљива. Охратоксини, зеараленон и трихотецени које углавном продукују *Penicillium* и *Fusarium* spp., налазе се у умереном климатском подручју (Северна Америка, Еуропа, Азија и Русија), док се афлатоксини које продукују *Aspergillus* spp. чешће налазе у већим концентрацијама у пољопривредним производима у тропском и суптропском подручју (Јужна Америка, Океанија, Индонезија). Због све чешћих и бржих климатских промена, микотоксигене гљиве се шире на нова подручја.

Готово све намирнице могу бити одговарајућа подлога за раст и развој токсигених гљива у неком стадијуму производње, транспорта, прераде и складиштења. Неки од најчешће контаминираних производа микотоксинима су: стрна жита (пшеница, раж, зоб, јечам, рижа), жита великог зрна (кукуруз), уљарице



(кикирики, соја, сунцокрет, памук, сирак), коштуњаво (ораси, лешник, бадем) и суво воће (смокве, грожђе), пиво и вино (од контаминираног грожђа, јечма и других житарица), зачини, какао, млеко и млечни производи (Weidenborner, 2001). Истраживања показују да је данас око 25% житарица у свету контаминирано микотоксинима (Kabak et al., 2006). Појава микотоксина зависи и од врсте гљива гљиве, климатских услова, физичко-хемијских фактора спољашње средине и изражене промене температуре и количина падавина у току вегетације. Поред тога, данашњи хибриди су селекционисани да би остварили високе приносе, а често им је због тога смањена биолошка отпорност на стрес те постају погодни домаћини за развој токсигених гљива.

Лоша агротехника, која подразумева непоштовање плодореда, редуковану основну обраду, повећање густине склопа биљака, гајење у монокултури и закоровљеност, погодује развоју токсигених гљива и контаминацију микотоксинима још на пољу. Затим жетва при повећаној влази кукуруза и повећани лом зрна изузетно погодују развоју гљива у складиштима. Међутим, од напада неких гљива нису поштеђена ни вештачки осушена зрна у силосима. Често се користе и импровизована складишта без проветравања и регулације влаге, са великим бројем штеточина које оштећују зрна и често долази до мешања здраве и заражене културе.

Количина микотоксина у храни није увек у корелацији са степеном заражености гљивама, већ зависи од више фактора. Најважнији су: температура, количина слободне воде која је расположива за раст гљива, релативна влажност ваздуха, аеробна средина, врста супстрата на којем се развија гљива, рН, итд. (Адамовић, 2003).

Одсуство могућности визуелног опажања присуства гљива на неком производу није показатељ да тај производ није контаминиран микотоксинима. Често се у производима као што су месо, млеко и јаја налазе микотоксини или резидуе микотоксина ако су животиње храњене контаминираном сточном храном, што представља секундарну контаминацију или индиректан начин контаминације. Примарна или директна контаминација хране последица је раста плесни на житарицама, поврћу и воћу.

### 2.3.3. Зеараленон

Зеараленон синетишу токсигене гљиве врсте *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium sporotrichioides*. Најинтензивнији раст *Fusarium* гљива се дешава при повећаној релативној влажности ваздуха, преко 70%, док магловито време и обилне росе током вегетације додатно поспешују развој гљива. Оптималне температуре за раст су од 18 до 24°C, с тим да је највећа продукција микотоксина забележена приликом наизменичног смењивања средњих и виших температура. Контаминација је присутна широм света на бројим житарицама, као што су кукуруз, пшеница, јечам, овас, пиринач и сирак. Иако се инфекција житарица гљивама рода *Fusarium* у одвија у пољу, синтеза овог микотоксина се може наставити и у складиштима ако је зрно ускладиштено у неодговарајућим условима, односно са повећаном влагом зрна. Оптимална рН вредност подлоге за раст гљиве и продукцију микотоксина је од 4 до 6.5 (Синовец и сар., 2006).

Иако зеараленон нема карциногена својства, може изазвати низ нежељених ефеката по здравље како људи, тако и животиња (Радуловић и сар., 2016). Зеараленон је нестероидни микотоксин са веома израженим екстрогеним, утеротропним и анаболичким деловањем код сисара. Изазива разне репродуктивне поремећаје код домаћих животиња, посебно свиња. Везује се за естрогене рецепторе и тиме изазива хормонски дисбаланс што доводи до хиперестрогенизма, ресорпције фетуса и побачаја. Поред тога, изложеност високим дозама зеараленона у храни доводи се у везу с преурањеним пубертетом (Репелјњак и сар., 2008).

Зеараленон је термостабилно једињење, односно не подлеже процесима деградације приликом излагања високим температурама током процеса индустријске обраде, припремања хране и складиштења.

Максимална дозвољене количине микотоксина зеараленон у кукурузу намењеном за непосредну исхрану људи износи 100 µg/kg (Табела1), док се генерално у намирницама од кукуруза за људску исхрану дозвољени нивои контаминације крећу у опсегу 50 – 400 µg/kg (Сл. гласник РС, 2014). Микотоксини најчешће контаминирају житарице, али се путем ланца исхране преносе и до људи. С обзиром на акутне и хроничне токсичне ефекте, у циљу заштите здравља људи и животиња, веома је важна контрола микотоксина у храни и храни за животиње

#### 2.3.4. Деоксиниваленол

Деоксиниваленол (ДОН) припада групи трихотецена, микотоксина који су изузетно распрострањени у усевима широм света. Овај микотоксин синтетишу гљиве из рода *Fusarium* (WHO, 1990), најчешће контаминира пшеницу, кукуруз и јечам, а његово присуство је забележено и у ражи, овсу и пиринчу (Kuiper-Goodman, 2002). Деоксиниваленол је секундарни метаболит *Fusarium graminearum* која инфицира поменуте житарице проузрокујући труљење зрна и њихово пропадање. Као последица заразе житарица овим патогеном, поред контаминације микотоксинима, долази и до смањења приноса и квалитета зрна (Prom et al., 1999).

Велики проблем присуства деоксиниваленола у намирницама је његова термичка стабилност. Када једом доспе у ланац исхране, остаје стабилно током целог поступка складиштења, процеса производње и обраде. На срећу, не долази до акумулације овог микотоксина у органима и телесним течностима, већ процесима детоксикације прелази у депокси-деоксиниваленол и коњуговањем са глукуронском киселином се избацује из организма (WHO, 1990). На ћелијском нивоу деоксиниваленол инхибира синтезу ДНК и РНК, као и синтезу протеина у рибозомима. Такође, овај токсин је познат по хемолитичком ефекту на еритроците (Rotter et al., 1996), док веће количине негативно утичу на рад срца, слезине, јетре и тимуса (Kuiper-Goodman, 2002).

Акутно тровање деоксиниваленолом се најчешће манифестује типичним токсиколошким ефектима као што су смањење узимања хране и повраћање. Сматра се да оба симптома изазива повећана активност централног серотонинског система у мозгу (Rotter et al., 1996). Током дуже изложености овом токсину, код већине животињских врста се јавља смањење и ограничење раста и развоја. Максимална дозвољена количина деоксиниваленола у зрну кукуруза намењеног за непосредну исхрану људи износи 750 µg/kg (Табела 1).

Најосетљивија врста на присуство деоксиниваленола су свиње, које већ при концентрацијама од 1 ppm овог токсина у храниву одређени проценат (око 5%) одбија храну (Canadian Grain Commission, 1999). Управо зато је ова количина деоксиниваленола максимално дозвољена у храни намењеној овој животињској врсти у већини земаља широм света.

Табела 1. Максимално дозвољене количине микотоксина зеараленон и деоксиниваленол у кукурузу (Сл. гласник РС, 2014)

Храна	Максимално дозвољена концентрација деоксиниваленола (µg/kg)
Непрерађене житарице, осим дурум пшенице, овса и кукуруза	1.250
Непрерађена дурум пшеница и овас	1.750
Непрерађени кукуруз, осим непрерађеног кукуруза намењеног за прераду влажним млевењем	1.750
Житарице намењене за непосредну исхрану људи, брашно, мекиње и клице као коначни производи стављен на тржиште за непосредну исхрану људи	750
Тестенина (сува)	750
Хлеб (укључујући мале пекарске производе), пециво, кекс, снек производи од житарица и житарице за доручак	500
Фракције млевеног кукуруза са величином честица > 500 микрона	750
Фракције млевеног кукуруза са величином честица ≤ 500 микрона	1.250
	Максимално дозвољена концентрација зеараленона (µg/kg)
Непрерађене житарице, осим кукуруза	100
Непрерађени кукуруз, осим непрерађеног кукуруза намењеног за прераду влажним млевењем	350
Житарице намењене за непосредну исхрану људи, брашно, мекиње и клице као коначни производи стављен на тржиште за непосредну исхрану људи	75
Рафинисано кукурузно уље	400
Хлеб (укључујући мале пекарске производе), пециво, кекс, снек производи и житарице за доручак, осим снек производа од кукуруза и житарица за доручак на бази кукуруза	50
Кукуруз намењен за непосредну исхрану људи, снек производи од кукуруза и житарице за доручак на бази кукуруза	100

## 2.4. Аналитичке технике и методе за одређивање микотоксина

Метод који се примењује за детекцију познатих и непознатих супстанци, према установљеној системској токсиколошкој анализи (СТА), мора бити поуздан, једноставан, поновљив и довољно специфичан и брз да истовремено обједини већи број токсиколошких релевантних једињења. Интернационалне организације као што су АОАС (Association of Official Analytical Chemists) и Европски комитет за стандардизацију (Comité Européen de Normalisation – CEN) су прописале методе за анализу микотоксина, које се стално унапређују.

Међутим, због разноврсности хемијских структура није могуће користити само једну технику за анализу микотоксина, те је развијен и валидиран велики број аналитичких метода. Процес анализе микотоксина у храни за људе и храни за животиње се састоји од узорковања, припреме узорка, екстракције микотоксина из матрикса, идентификације и квантификације микотоксина (Körpen et al., 2010). Иако су сви кораци у анализи микотоксина у храни изразито битни, поступак узорковања је кључни корак и доприноси поузданости методе.

У сврху заштите здравља потрошача и редуковања економских губитака, контрола микотоксина у храни за људе и животиње постала је водећи циљ произвођача, научника али и законодавних тела.

Микотоксини као контаминирајуће материје хране за људе и животиње, налазе се у изразито ниским концентрацијама ( $\mu\text{g}/\text{kg}$  или  $\text{ng}/\text{kg}$ ) и за њихово одређивање су потребне изузетно осетљиве и прецизне методе. Техника и метода која ће бити одабрана зависи од самог узорка који се анализира, расположиве опреме, концентрације микотоксина, осетљивости, брзине и цене методе.

Ове технике укључују танкослојну хроматографију (TLC), ензимску анализу, капиларну гасну хроматографију са масеном спектрометријом (GC-MS), капиларну електрофоретску масену спектрометрију (CE-MS), течну хроматографију (LC) са UV или флуоресцентном детекцијом у комбинацији са дериватизацијом (Бурсић и сар., 2012).

Хроматографске методе служе за раздвајање, идентификацију и квантитативно одређивање хемијских састојака у сложеним смешама. Назив “хроматографија” потиче од грчких речи цхрома-боја и графеин-писати. Касније се назив

хроматографија почео примењивати за све методе раздвајања, у којима се анализирана супстанца раздваја између покретне и непокретне фазе.

Хроматографија се заснива на принципу да различите компоненте испитиване смеше другачије интерагују са једом истом супстанцом са којом се доводе у контакт. Узорак смеше која се испитује се прво раствара у неком унапред одређеном растварачу, а затим се овај раствор (који се назива покретна фаза или мобилна фаза) преводи преко непокретне (или стационарне) фазе. У контакту са стационарном фазом, свака супстанца смеше ће појединачно интераговати са њом. Као најчешћи облици интеракције су растварање у непокретној фази, адсорпција на њу или хемијска реакција са њом (Ристић, 2019). Услед ове интеракције, компоненте испитиваног узорка ће се раздвојити јер ће оне које слабо интерагују са непокретном фазом да се крећу готово истом брзином као и струјање покретне фазе. Оне компоненте које јаче интерагују са непокретном фазом да заостају и дуже се задржавају у простору интеракције који се назива хроматографска колона.

Танкослојна хромаографија (thin layer chromatography – TLC) представља најједноставнију, јефтину и најраспрострањенију методу којом се квалитативно доказује присуство микотоксина преко РФ вредности (растојање од старта до средине мрље) стандарда и узорка. Код позитивног узорка мрље треба да имају карактеристичну боју која је видљива на дневном светлу или флуоресцира под UV светлом. Квантификација TLC се најчешће постиже упоређивањем интензитета обојености мрље узорка и мрље стандарда познате концентрације. Међутим прилоком квантификације могуће је направити грешку и до 20% због субјективности људског ока.

GC и HPLC су фаворизоване анализе микотоксина због поузданости, високој осетљивости и доследности резултата (Бурсић и сар., 2012).

GC (гасна хроматографија) се користи за супстанце које су термостабилне и довољно испарљиве. Због тога је потребно урадити дериватизацију хидроксилних група да би се постигла боља испарљивост, а самим тиме и боља осетљивост анализе супстанци у траговима. Код ове методе мобилна фаза је уједно и носећи гас као што је хелијум или неки нереактивни гас као што је азот. Стационарна фаза је микроскопски слој течности или полимер на инертној чврстој подлози, унутар дела стакла или металне цеви која се назива колона. У односу на стање самих фаза разликујемо течну и гасну хроматографију.

Течна гоматографија подразумева сваку хроматографску методу која има покретну фазу у течном агрегатном стању, док стационарна фаза може бити течна или чврста. Уколико се користи чврста стационарна фаза, компоненте узорка се адсорбују на њој и техника се назива течна адсорпциона хроматографија. Употребом течне стационарне фазе, која је нанета на чврст носач, компоненте узорка се растварају у тој течности и техника се назива течна подеона хроматографија (Ристић, 2019). Елуент представља растварач који носи испитивану супстанцу у хроматографску колону, а поступак његовог увођења се зове елуирање. Време које је потребно некој супстанци из анализирание смеше да прође кроз хроматографску колону при унапред одређеним условима као што су притисак, температура, елуент, брзина елуирања и врста непокретне фазе, називамо ретенционо време,  $R_t$  (време задржавања анализата на колони). Компоненте се идентификују на основу поређења њиховог  $R_t$  са  $R_t$  стандарда.  $R_t$  неке компоненте зависи од њених хемијских и физичких својстава при одређеним условима и представља карактеристику дате компоненте помоћу које се врши њена идентификација (Ристић, 2019).

Течна хроматографија високих перформанси (течна хроматографија при високим притисцима), позната и као HPLC (High performance liquid chromatography ili high pressure liquid chromatography) представља вид хроматографије на колони којом се постиже ефикасно раздвајање компонената из узорка, чак и код врло сложених смеша. Ова хроматографска метода се користи за раздвајање, идентификацију и квантитативно одређивање различитих једињења у аналитичкој хемији и биохемији. Предност овог апарата је могућност вршења анализе на собној температури.

Принцип рада ове методе се заснива на ињектовању узорка анализата у растварач (мобилна фаза) и под дејством пумпе узорак и мобилна фаза бивају ношени кроз систем и унети на колону. Растварачи (елуенси) која служе као покретна фаза морају бити високе чистоће и без присуства растворених гасова или суспендираних честица. Најчешће се употребљава поларни аоргански сорбенс силикагел ( $SiO_2 \cdot H_2O$ ) који се може употребити за готово све анализе због великог капацитета и великог броја примјењивих облика.

Само раздвајање компонената из анализата се базира на различитој редистрибуцији супстанце између мобилне и стационарне фазе. Различита интеракција која се јавља између анализата и стационарне фазе има за последицу различито време њиховог задржавања у колони и на основу тога се врши њихова анализа. Компоненте се

идентификују на основу поређења њиховог Рт са Рт стандарда. Сваки HPLC систем је повезан са детектором и компјутером са специјалним софтверским програмом, помоћу којих се добијају и обрађују хроматограми, и идентификују и квантификују компоненте. Издвојене компоненте са колоне долазе у детектор, који их региструје и шаље електрични сигнал компјутеру (Кос, 2015).

Детектор у HPLC-у није универзалан и правилан избор детектора је кључан код развоја методе. Од зависности компонената које се испитују могу се користити различити типови детектора:

- UV-детектор (енг. „ultra violet“, UV) када компонента абсорбује у UV области, - Детектор са низом диода (енг. „diode array detector“, DAD) када компонента абсорбује у UV области,
- флуоресцентни детектор (енг. „fluorescence detector“, FLD) уколико компонента има способност да флуоресцира,
- -ELSD детектор (енг. „evaporative light-scattering“),
- масени детектор (енг. „mass spectrometer“, MS)

Постоји могућност да се користи и више детектора при једној анализи.

Сви наведени детектори, као излазни сигнал једињења које се одређује, дају пикове који се зову хроматограми. На основу површине пикова стандарда различитих концентрација формира се калибрациона крива из које се на основу површине пика одређиваног једињења израчуна његова концентрација у узорку (Кос, 2015).

HPLC се разликује од осталих метода тиме што је мобилна фаза изложена деловању високог притиска (до око 600 bar). Висок притисак обезбеђује континуирани проток мобилне фазе и тиме је обезбеђена динамичка равнотежа са стационарном фазом. Ова равнотежа пружа добре селективне расподеле компоненти у испитиваној смеси, одвајање и идентификацију једињења која су присутна у траговима. Предност HPLC апарата је могућност вршења анализе на собној температури.

Овај апарат се састоји од: резервоара за растварач, пумпе високог притиска, ињектора (систем за убризгавање), колоне и детектора. Апарат најчешће садржи најмање два резервоара за растварач (мобилна фаза). Пумпа обезбеђује унапред одређени притисак а самим тим и проток мобилне фазе. Колона представља



најбитнији део HPLC апарата. Колоне су густо пуњене честицама стационарне фазе. Честице стационарне фазе су углавном малих димензија, 3-5  $\mu\text{m}$  у пречнику, и велике специфичне површине која омогућава боље раздвајање компоненти. Колоне су најчешће направљене од челика како би издржале висок притисак, док пуњења могу бити од силика-гела, полиетилена, итд. Ињектор уноси растварач са узорком (мобилна фаза) у колону високог притиска у којој се налази стационарна фаза.

ELISA (eng. Enzyme-linked immunosorbent assay) се дефинише као полуквантитативна или квантитативна имуноензимска метода за одређивање различитих једињења. Доступан је велики број сет китова за детекцију микотоксина као што су афлатоксини, ократоксини, зеараленон, деоксиниваленол, фумонизини, Т-2 токсин. Ова техника је јефтина, брза и специфична и заснива се на реверзибилном везивању антигена (микотоксина) и одговарајућих антитела, стварајући антиген-антитело комплекс. Главни недостатак ELISA методе је “цросс-реактивитету”, односно могућност добијања лажно позитивних резултата.

#### Брзе методе

Последњих година постоји све већи интерес за употребом техника које укључују тест траке. Користе се на лицу места и детектују различите патогене, њихове метаболите, пестициде, алергене и микотоксине. Базирају се на имунохроматографском тесту и осмишљени су за коришћење на месту инспекције, ван лабораторија, помоћу једноставних преносних уређаја или без употребе инструмента.

Свака аналитичка метода се састоји од неколико ступњева као што су:

- Израда плана узорковање
- Узорковање
- Методе припреме узорка

## Израда плана узорковања

Има за циљ да обезбеди репрезентативан узорак. Регулатива у вези са узимањем узорака за анализу микотоксина је прописана на нивоу ЕУ.

### Узорковање

Један од најважнијих корака у анализи микотоксина у храни је поступак узорковања од којег зависи поузданост методе. Микотоксини нису равномерно распоређени у храни и због тога је неопходно пажљиво спровести план узорковања ради добијања репрезентативног узорка.

### Методе припреме узорка

Лабораторијски узорак је потребно припремити за микотоксиколошку анализу. Припрема се састоји из следећих корака: екстракција, пречишћавање узорка и концентровање одређиваног анализата. Процес уситњавања, млевења врши се на узорцима чврсте конзистенције. Након тога приступа се хомогенизацији. Хомогенизација се врши на различит начин у зависности од агрегатног стања узорка и од физичко-хемијских особина узорака и самих микотоксина који би требало да се утврде.

### 3. ЗАДАТАК И ЦИЉ РАДА

Задатак овог рада био је да се изврши изолација из узорка семена кукуруза шећерца, те да се идентификују изолати рода *Fusarium*. Такође, задатак је био и да се утврди капацитет изолата за продукцију микотоксина зеараленон и деоксиниваленол.

Циљ рада био је да се утврди да ли изолати рода *Fusarium* присутни у узорку могу контаминирати узорак микотоксинима зеараленон и деоксиниваленол изнад дозвољених граница и тиме га учинити небезбедним за здравље људи.

Очекује се да се утврди присуство микотоксина зеараленон и деоксиниваленол у вештачки зараженим зрнима кукуруза, односно да добијени изолати покажу капацитет за продукцију микотоксина чиме би били окарактерисани као токсигени.

## 4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД

### 4.1. Изолација патогена из узорака семена

Узорци семена кукуруза шећерца, за потребе сетве, су допремљени у Лабораторију за биолошка истраживања и пестициде од стране увозника ради испитивања здравственог стања. По достави узорака, приступљено је изолацији врста рода *Fusarium*.

Зрна кукуруза су површински стерилисана у раствору 5 ml натријум–хипохлорита (NaOCl, комерцијална варикина) и 100 ml дестиловане воде у трајању од три минута и испирани у стерилној, дестилованој води. Након дезинфекције обављена је изолација на кромпир–декстрозну подлогу (potato dextrose agar, PDA), према стандардним фитопатолошким методама.

Подлога је припремана од 250 g кромпира, 17–20 g декстрозе, 20 g агара (Агар–агар) и 1 g дестиловане воде. Пре изолације, подлога је стерилисана аутоклавирањем на 121°C и при притиску од 121,6 Pa. Површински стерилисана зрна су осушена на стерилном филтер папиру, а затим су правилно распоређена по површини PDA подлоге и инкубирана 5-7 дана у термостату при температури 25°C, у условима мрака.

Издавање чистих култура гљива које су се развијале извршено је у асептичким условима пресејавањем фрагмената мицелије на нову PDA подлогу, седам дана после инкубације. По развоју, колоније које су морфолошки одговарале *Fusarium* sp. су поново пресејане на PDA подлогу и приступљено је издавању моноспоријлних култура изолата.

#### **4.2. Добијање моноспоријалних култура изолата**

Моноспоријалних изолати формирану су по методи Burgess и сар. (1994). У епрувету са стерилном водом, из културе гљиве је асептично унета једна конидиомата пронађена под бинокуларом. Садржај епрувете је вортексиран и 1000  $\mu$ l овако добијене суспензије нането је на подлогу од воде и агара (WA подлога, 20 g агара и 1 l дестиловане воде) у Петри кутије пречника 90 mm. Потресањем кутије, унета суспензија је равномерно распоређена по површини подлоге. Петри кутије су закошене и вишак суспензије је асептично уклоњен из Петри кутије, под пламеном. Петри кутије у косом положају инкубиране 24 х у термостату при 25°C. Под микроскопом је пронађена једна проклијала спора и асептично пренета на PDA подлогу и инкубирана у термостату на 25°C до формирања колоније. Формиране колоније су пресејане на косе PDA подлоге и чуване у трајној колекцији микробиолошких култура Лабораторије за биолошка истраживања и пестициде за даља истраживања.

#### **4.3. Идентификација изолата на основу морфолошких критеријума**

За потребе идентификације на основу морфолошких критеријума изолати су засејани на PDA подлогу и подлогу са листом каранфила (carnation leaf piece agar, CLA). Припремљена је од 15-20 g агара (Агар-агар), 1 l дестиловане воде и неколико стерилних листова каранфила. Ова врста подлоге делује стимулативно на спорулацију гљиве. Засејане Петри кутије инкубиране су у термостату на температури од 25°C. После 7 дана развијена мицелија гљиве око засејаних фрагмената је микроскопирана, у потрази за репродуктивним структурама.

Идентификација врста вршена је на основу макроскопских (PDA подлога) и микроскопских одлика (CLA подлога) изолата. Макроскопске одлике подразумевају изглед и брзину развоја колонија на PDA подлози, пигментацију супстрата и др. Микроскопске одлике подразумевају присуство или одсуство микроконидија, облик и начин формирања микроконидија и конидиогених ћелија, одлике макроконидија, присуство или одсуство хламидоспора и др. (Павловић и сар., 2006).

Од култура су припремљени и нативни препарати ради посматрања формираних микроскопских морфолошких структура. Препарати су припремљени тако што је у кап дестиловане воде стерилном иглом нанет фрагмент колоније и прекривен покровним стаклом. Препарати је посматран помоћу микроскопа.

#### 4.4. Молекуларна карактеризација изолата

Молекуларна испитивања изолата су спроведена у Лабораториј за биолошка истраживања и пестициде, Департмана за фитомедицину и заштиту животне средине, Пољопривредног факултета, Универзитета у Новом Саду. Коришћени изолати су део трајне микробиолошке колекције исте лабораторије.

Изолати пореклом са семена кукуруза шећерца, који су на основу морфолошких карактеристика претходно идентификовани као *Fusarium* spp., ревитализовани и пресејани на PDA хранљиву подлогу и инкубирани седам дана у термостату на температури од 25 °C.

Екстракција ДНК вршена је применом комерцијалног сета за изолацију (DNeasy Plant MiniKit - Qiagen, Hilden, Germany), према упутствима произвођача.

Метода ланчане реакције полимеразе (PCR) извршена је у циљу молекуларне идентификације изолата применом универзалних прајмера ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCG-3') и ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3').

PCR реакција је изведена у радној запремини од 50 µl, коришћењем 25 µl Master mix смеше, 10 µl воде без трагова ДНК, по 5 µl сваког прајмера и 5 µl изоловане ДНК. Негативна, контролна варијанта припремљена је без прајмера и ДНК.

PCR реакција је изведена у Agilent SureCycler 8800, а услови реакције били су следећи: фаза иницијалне денатурације у трајању од 2 минута одвијала се на 95°C, након чега су у 35 циклуса поновљени следећи услови – температура од 94°C у трајању од 30 секунди, 56°C у трајању од једног минута, 72°C у трајању од два минута. Финална екстензија у трајању од осам минута се одвијала на 72°C.

Продукти PCR реакције су раздвојени методом хоризонталне електрофорезе, у 1,5 % агарозном гелу и 1 % SB пуферу и упућени на даље секвенцирање (Macrogen Europe

B.V.), а потом је извршена анализа и поређење секвенци са секвенцама доступним у NCBI бази применом BLASTn алгоритма.

#### **4.5. Вештачка инокулација неконтаминираних семена кукуруза**

За вештачку инокулацију издвојено је 300 грама незараженог зрна кукуруза, за које је претходно HPLC анализом утврђено одсуство контаминације микотоксинима. Сваки узорак је пребачен у засебну ерленмајерову боцу, које су претходно стерилисане у аутоклаву. Поклопац на боцама треба да пропушта ваздух али не и споре гљиве, те је за ову намену коришћен „Tyvek“ папир.

Измерена је влажност семена помоћу влагометра и додата воду да би влажност семена износила 25% јер за инокулацију је оптимална влага 18-20%, док се око 5% изгуби током аутоклавирања. Мерењем влаге добијена је вредност 10% те је додано 45 ml воде у сваки узорак. Да би влага била равномерно заступљена у сваком семену, након додавања воде, семе је у боци потресано у кратим временским интервалима неколико сати, све док семе није упило сву воду. Након тога, семе је аутоклавирано. По аутоклавирању и хлађењу, незаражена зрна кукуруза су инокулисана додавањем фрагмента гљиве у боцу, након чега су боце инкубиране 5-7 дана при 30°C. За сваки изолат, инокулисано је по две боце.

#### **4.6. Анализа инокулисаног кукуруза методама HPLC и ELISA на присуство микотоксина**

Узорци кукуруза вештачки инокулисаног изолатима MFUS2, MFUS4, MFUS6, MFUS7 су анализирани на присуство микотоксина зеараленон и деоксиниваленон методама HPLC и ELISA. Иако се *F. verticillioides* превасходно везује за производњу фумонизина, ова врста може производити и зеараленон (Mostrom, 2016). Истраживање Рамакрисна (1989) потврдило је да ова врста има способност производње деоксиниваленола под повољним условима средине. Стога је у овом раду испитан капацитет изолата врсте *F. verticillioides* за производњу ових, ретко везиваних микотоксина са наведеном врстом, под повољним условима за њихову појаву.

## HPLC

Хроматографска детерминација зearаленона и деоксиниваленола је извршена на HPLC систему 1260 серије (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) са DAD и FLD детекторима (Agilent Technologies, USA) и Hypersil ODS (150 x 4.6 mm i.d., величине честика 5  $\mu\text{m}$ ), и колони (Agilent Technologies, USA). 12.5 g узорка је екстаховано коришћејем 50 ml ацетонитрила (St. Louis, MO, United States) и мешавине вод (84:16, v/v). Екстракти су пречишћени помоћу Mucosep™ 224, Mucosep™ 225 и Mucosep™ 224 колони (Romer Labs. Inc., Union, MO, USA). Након тога, узето је 3 ml пречишћеног екстракта који је загреван на 60°C испод благог млаза паре азота, све док се узорак није у потпуности осушио. Добијена резидуа је растворена у 300  $\mu\text{l}$  мобилне фазе. HPLC параметри за ДОН су подешени према протоколу који су предложили Абрамовић и сар. (2005), за ОТА према Сугита-Кониски ет ал. (2006), док је АФ детерминисан према протоколу Оливеира и сар. (2009). Све анализе су одрађене у два понављања.

## ELISA

Имунохемијска анализа зearаленона и деоксиниваленола је изведена користећи Veratox for Zearalenone, Neogen Corporation, USA/Canada (Neogen, Lansing, MI, USA) и Veratox 5/5, Quantitative DON Test, USDA-GIPSA 2002-106 (Neogen, Lansing, MI, USA). Квантификација микотоксина је одрађена на ELISA читачу опремљеним са филтером од 630 nm (BioTec Instruments, USA). Све анализе су одрађене у два понављања.



## 5. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

### 5.1. Изолација патогена из узорака семена и формирање моноспоријалних изолата

По извршеној изолацији, добијено је 20 изолата који су по изгледу колоније одговарали *Fusarium* spp. Будући да су изолати били уједначеног изгледа, за даљи рад је одабрано четири изолата и припремљене су моноспоријалне културе које су постале део трајне колекције микробиолошких култура Лабораторије за биолошка истраживања и пестициде. Шифре изолата су: MFUS2, MFUS4, MFUS6 и MFUS7.

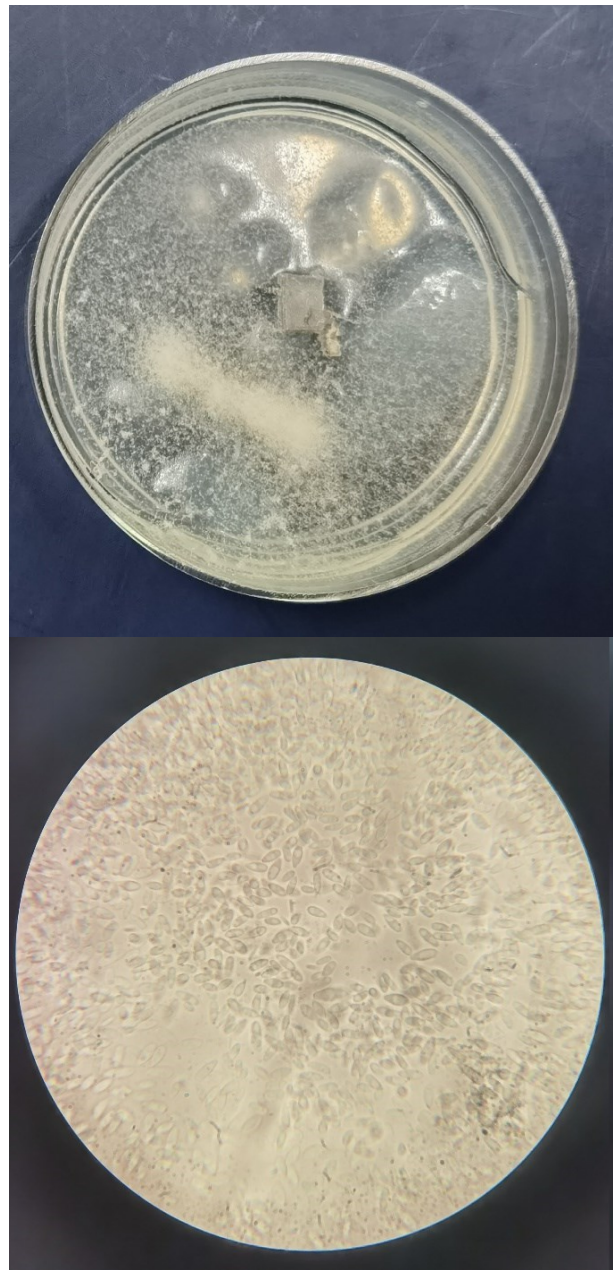
### 5.2. Идентификација изолата на основу морфолошких критеријума

На PDA подлози сви изолати су формирали ружичасто-белу, ваздушасту мицелију која потпуно испуњава Петри кутију у року од седам дана (Слика 1.).



Слика 1. Изолат MFUS4 на PDA подлози након 7 дана инкубације

Микроскопирањем репродуктивних структура формираних на CLA подлози, утврђено је присуство великог броја једноћелијских микроконидија које одговарају микроконидијама врста рода *Fusarium* – овалне или са једним заостреним врхом (Слика 2.), док макроконидије нису формиране, као ни хламидоспоре.



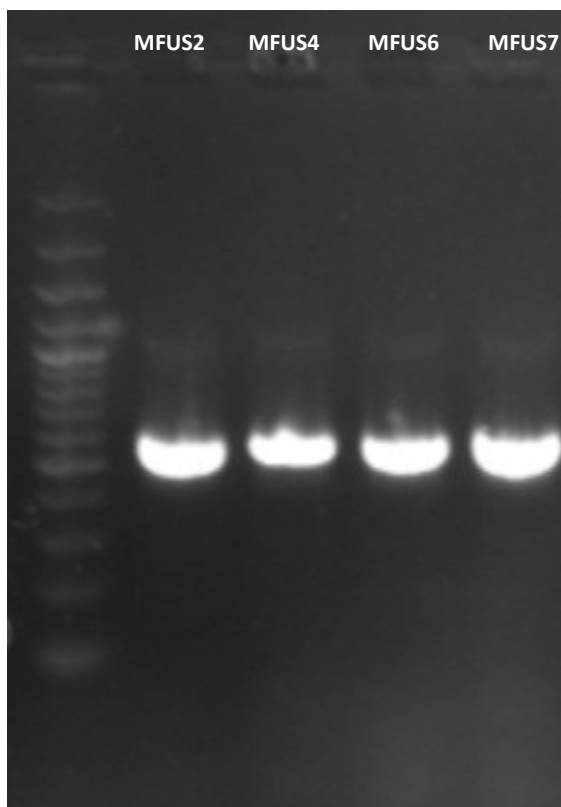
Слика 2. Изглед колоније *Fusarium* spp.. на CLA подлози (горе), приказ микроскопског препарата – микроконидије изолата (доле)

Како наводе Glenn и сар. (2004) морфолошке карактеристике које су регистроване при микроскопском испитивању изолата у овом раду, изглед мицелије и обилно

формирање микроконидија без попречних преграда одговарају врсти *F. verticillioides*.

### 5.3. Молекуларна карактеризација изолата

Молекуларном методом ланчане реакције полимеразе (PCR) успешно су умножени фрагменти величине 550 bp (Слика 3.), који су припремљени за секвенционирање.



Слика 3. Електрофоретска анализа PCR (агарозни гел) производа добијених коришћењем пара прајмера ITS1/ ITS4; Фрагменти величине 550 bp умножени за испитиване изолате (MFUS2, MFUS4, MFUS6, MFUS7)

По пријему секвенци, приступљено је њиховој обради и успешно је спроведена идентификација и карактеризација испитиваних изолата *Fusarium* spp. Анализом и поређењем добијених секвенци са секвенцама доступним у NCBI бази применом BLASTn алгорита, сва четири изолата су идентификована као *Fusarium verticillioides*, са процентом поклапања 100%.

Припадност изолата врсти *Fusarium verticillioides* указала је на потребу испитивања токсигеног капацитета изолата, те је приступљено вештачкој инокулацији зрна кукуруза и испитивањима контаминације истих микотоксинима зеараленон и деоксиниваленол. Иако се *F. verticillioides* превасходно везује за производњу фумонизина, ова врста може производити и зеараленон (Mostrom, 2016). Са друге стране, одувек је било различитих ставова поводом способности *F. verticillioides* (некадашњи *F. moniliforme*) да производи деоксиниваленол. Истраживање Рамакрисхна (1989) потврдило је да ова врста има способност производње деоксиниваленола под повољним условима средине. Стога је у овом раду испитан капацитет изолата врсте *F. verticillioides* за производњу ових, ретко везиваних микотоксина са наведеном врстом, под повољним условима за њихову појаву.

#### **5.4. Анализа инокулисаног кукуруза методама HPLC и ELISA на присуство микотоксина**

Анализа инокулисаних узорака кукуруза показала је значајан степен контаминације кукуруза микотоксинима зеараленон и деоксиниваленол, потврђујући токсигени капацитет изолата *F. verticillioides* када су ова два микотоксина у питању. Сви изолати су контаминирали кукуруз са оба испитана микотоксина далеко изнад дозвољене границе предвиђене у Сл. гласнику Р. Србије. Међутим, утврђене су значајне разлике између изолата у количинама произведених микотоксина.

#### **Присуство микотоксина зеараленон**

Анализа варијансе је показала да су изолати којима је вршена инокулација били значајан извор варирања ( $p \leq 0,05$ ) у количини микотоксина зеараленон детектованој у узорцима кукуруза (Табела 2), независно од примењене методе детекције.

Табела 2. Анализа варијансе: Утицај изолата *Fusarium verticillioides* којим се врши инокулација кукуруза на степен контаминације кукуруза микотоксином зеараленон (методе HPLC I ELISA)

Извор варирања	Сума квадрата SS	Степени слободе df	Средина квадрата MS	F	p
HPLC					
Изолат	162,99	4,00	40,75	5745,56	0,00
Грешка	0,04	5,00	0,01		
ELISA					
Изолат	269,27	4,00	67,32	22419,75	0,00
Грешка	0,02	5,00	0,00		

Данканов пост хок тест (Табеле 3 и 4) је показао да најизраженији капацитет за производњу микотоксина зеараленон испољава изолат MFUS6, значајно виши од преостала три испитана изолата, независно од методе детекције и квантификације, HPLC ili ELISA. Такође, најнижи капацитет за производњу зеараленона испољава изолат MFUS4, значајно нижи од свих осталих испитаних изолата, Значајно виши капацитет за производњу микотоксина зеараленон у односу на изолат MFUS4 испољава изолат MFUS7, док значајно виши капацитет од њега има изолат MFUS2. У неинокулисаној, контролној варијанти није детектовано присуство микотоксина.

Табела 3. Дунцан пост хок тест: Утицај изолата *Fusarium verticillioides* којим се врши инокулација кукуруза на степен контаминације кукуруза микотоксином зеараленон (метода HPLC)

Изолат	Количина микотоксина (mg/kg)
MFUS4	1,29 <sup>b</sup>
MFUS7	2,07 <sup>c</sup>
MFUS2	8,43 <sup>d</sup>
MFUS6	9,95 <sup>e</sup>
Контрола	0,00 <sup>a</sup>

Применом методе ELISA, потврђени су налази методом HPLC, како у случају изолата са најизраженијим капацитетом за производњу микотоксина зеараленон,

тако и у случају капацитета за продукцију код свих осталох изолата.

Табела 4. Дунцан пост хок тест: Утицај изолата *Fusarium verticillioides* којим се врши инокулација кукуруза на степен контаминације кукуруза микотоксином зеараленон (метода ELISA)

Изолат	Количина микотоксина (mg/kg)
MFUS4	1,59 <sup>b</sup>
MFUS7	2,45 <sup>c</sup>
MFUS2	10,55 <sup>d</sup>
MFUS6	12,86 <sup>e</sup>
Контрола	0,00 <sup>a</sup>

#### Присуство микотоксина деоксиниваленол

Анализа варијансе је показала да су изолати којима је вршена инокулација били значајан извор варирања ( $p \leq 0,05$ ) у количини микотоксина деоксиниваленол детектованој у узорцима кукуруза (Табела 5), независно од примењене методе детекције.

Табела 5. Анализа варијансе: Утицај изолата *Fusarium verticillioides* којим се врши инокулација кукуруза на степен контаминације кукуруза микотоксином деоксиниваленол (методе HPLC и ELISA)

Извор варирања	Сума квадрата SS	Степени слободе df	Средина квадрата MS	F	p
HPLC					
Изолат	4,59	4,00	1,15	1135,32	0,00
Грешка	0,01	5,00	0,00		
ELISA					
Изолат	6,09	4,00	1,52	708,11	0,00
Грешка	0,01	5,00	0,00		

Према Данкановом пост хок тесту у случају анализе степена контаминације методом HPLC (Табела 6), највиши капацитет за производњу микотоксина деоксиниваленол испољио је изолат MFUS2, док је најнижи капацитет установљен за изолат MFUS7.

На значајно вишем нивоу у односу на изолат MFUS7, микотоксин деоксиниваленол је произвео изолат MFUS4, а од њега значајно виши ниво контаминације је остварио изолат МФУС6.

Табела 6. Дунцан пост хок тест: Утицај изолата *Fusarium verticillioides* којим се врши инокулација кукуруза на степен контаминације кукуруза микотоксином деоксиниваленол (метода HPLC)

Изолат	Количина микотоксина (mg/kg)
MFUS7	0,41 <sup>b</sup>
MFUS4	0,63 <sup>c</sup>
MFUS6	1,48 <sup>d</sup>
MFUS2	1,81 <sup>e</sup>
Контрола	0,00 <sup>a</sup>

Анализом вештачки инокулисаних узорака кукуруза методом ELISA на присуство микотоксина деоксиниваленол остварени су резултати који у потпуности одговарају HPLC анализи извршеној на истим узорцима (Табела 7).

Табела 7. Дунцан пост хок тест: Утицај изолата *Fusarium verticillioides* којим се врши инокулација кукуруза на степен контаминације кукуруза микотоксином деоксиниваленол (метода ELISA)

Изолат	Количина микотоксина (mg/kg)
MFUS7	0,52 <sup>b</sup>
MFUS4	0,77 <sup>c</sup>
MFUS6	1,57 <sup>d</sup>
MFUS2	2,19 <sup>e</sup>
Контрола	0,00 <sup>a</sup>

Остварени резултати су показали да је анализиран узорак кукуруза контаминиран гљивом *Fusarium verticillioides*, као и да сви изолати који су добијени испољавају капацитет за производњу микотоксина зеараленон и деоксиниваленол. Такође, утврђено је да је капацитет за продукцију варијабилна карактеристика између

изолата, односно да постоје значајне разлике у количинама произведених микотоксина између изолата.

Генерално, два изолата која су испољила најизраженији капацитет за производњу микотоксина зеараленон (MFUS6 и MFUS2) су испољила и највећи капацитет за производњу микотоксина деоксиниваленол. Код изолата код којих је регистрована значајно нижа контаминација микотоксином зеараленон, регистрована је и нижа контаминација микотоксином деоксиниваленол.

Остварени резултати су показали да сви испитани изолати врсте *Fusarium verticillioides* у условима вештачке инокулације зрна кукуруза и инкубације под повољним условима за производњу микотоксина, испољавају капацитет за производњу зеараленона и деоксиниваленола, што није својствено овој врсти. Основна врста микотоксина за коју се везује ова врста јесу фумонизини (Ferrigo et al., 2016; Moss, 2009).



## 6. ЗАКЉУЧАК

Анализирано семе кукуруза шећерца заражено је гљивом *Fusarium verticillioides*, што је утврђено анализом морфолошких и молекуларних карактеристика добијених изолата.

Изолацијом је добијено четири изолата врсте *Fusarium verticillioides*.

Сви испитани изолати формирају ваздушасту, ружичасту мицелију на PDA подлози и мноштво једноћелијских микроконидија на CLA подлози.

Код свих испитаних изолата умножени су фрагменти величине 550 базних парова у PCR реакцији са паром универзалних прајмера ITS1/ ITS4.

Анализом секвенци умноженог региона утврђена је припадност изолата врсти *Fusarium verticillioides*.

Применом HPLC и ELISA методе у анализи контаминације вештачки инокулисаног семена кукуруза испитиваним изолатима, испитивани изолати *F. verticillioides* су окарактерисани као токсигени.

Иако се *F. verticillioides* превасходно везује за производњу фумонизина, анализирани изолати су показали капацитет за продукцију микотоксина зеараленон и деоксиниваленон, у условима вештачке инокулације зрна кукуруза и инкубације у повољним условима средине за синтезу микотоксина.

Ниво контаминације вештачки инокулисаних зрна кукуруза изолатима *F. verticillioides* био је преко дозвољених граница за зеараленон и деоксиниваленон, у кукурузу за људску употребу.

Капацитет за производњу микотоксина зеараленон и деоксиниваленон се значајно разликује међу испитаним изолатима *F. verticillioides*.

Изолати који имају израженији капацитет за производњу зеараленон такође показују израженији капацитет за производњу деоксиниваленола.

## 7. ЛИТЕРАТУРА

- Ана М, Обрадовић (2017): Диверзитет комплекса врсте *Fusarium graminearum* патогена стрних жита и кукуруза у Србији. Докторска дисертација, Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет, Београд.
- Бурсић В., Вуковић Г., Лазић С, Ференц Б., Стојановић Т., Брзаковић Н. (2012): Аналитичке методе одређивања микотоксина. Биљни лекар, 40, 4, 346-353.
- Bacon, C.W., Yates I.E., Hinton, D.M., Meredith, F. (2001): Biological control of *Fusarium moniliforme* in maize, *Enveronmental Health Perspectives*, 109: 325-332.
- Bekrić, V. (1997): *Upotreba kukuruza*. Београд, Институт за кукуруз „Земин поље“, 201-204.
- Bräse, S., Encinas, A., Keck, J., Nising, C., F. (2009). Chemistry and biology of mycotoxins and related fungal metabolites. *Chemical Reviews*, 109, 3903-3990
- Burgess, L, W, Summerell, A,B,, Bullock, S,, Gott, P,K,, Backhouse, D, (1994): *Laboratory for Fusarium research*, Third Edition, University of Sydney and Royal Botanic Gardens, 133.
- Canadian Grain Commission (1999): *Grading tolerances for fusarium-damaged grain and DON feeding gueidelines*, Winnipeng MB,
- Ferrigo D., Raiola A., Causin R. (2016): *Fusarium Toxins in Cereals: Occurrence, Legislation, Factors Promoting the Appearance and Their Management*. *Molecules*, 21, 627. doi:10.3390/molecules21050627
- Pavlović, S., Vuković, G. (2007): *Gibberella moniliformis* Win, Anamorf: *Fusarium verticillioides* in medicinal plants in Serbia. *Zbornik radova Tehnološkog fakulteta, Leskovac*, (16), 108-116.

- Гламочлија Ђ. (2012): Посебно ратарство, жита и зрнене махунарке, Пољопривредни факултет, Београд, 19-37.
- Krnjaja V., Mandić V., Lević J., Stanković S., Petrović T., Vasić T., Obradović A. (2015): Influence of N-fertilization on Fusarium head blight and mycotoxin levels in winter wheat. *Crop Protection*, 67: 251-256.
- Glen A.E. (2007): Mycotoxigenic Fusarium species in animal feed. *Animal Feed Science and Technology* 213–240.
- Glenn A, Richardson E., Bacon C. (2004): Genetic and morphological characterization of a *Fusarium verticillioides* conidiation mutant. *Mycologia* 96(5):968-80.
- Kabak, B., Dobson, A., D., W., Var, I, (2006), Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: A review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46, 593-619.
- Коцић-Танацков С., Димић Р. (2013): Гљиве и микотоксини – контаминенти хране. *Хем. Инд.* 67 (4): 639–653.
- Кос Ј. (2015): Афлатоксини: анализа појаве, процена ризика и оптимизација методологије одређивања у кукурузу и млеку. Докторска дисертација, Универзитет у Новом Саду Технолошки Факултет.
- Kovačević V., Rastija, M. (2014): *Žitarice*, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek.
- Kuiper-Goodman T. (2002): Recent developments in the risk assessment of deoxynivalenol, *Toxicology, quality and impact on industry*, Second Canadian workshop on Fusarium head blight, Ottawa.
- Lević J., Stanković S., Krnjaja V., Kovačević T., Tančić S., Bočarov-Stančić, A. (2008): Fusarium head blight and grain yield losses of Serbian wheat. *Cereal Research Communications, Supplementum B*, 26: 513-514.
- Logrieco A., Bottalico A., Mule G., Moretti A., Perrone G. (2003): Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops, *European Journal of Plant Pathology*, 109: 645-667.

Милићевић М., Недељковић-Траиловић Ј., Машић З. (2014): Микотоксини у ланцу исхране – анализа ризика и значај за јавно здравство. *Технологија меса* 55 (2014) 1, 22–38.

Moss M. (2009): Toxigenic fungi. In: *Foodborne Pathogens (Second edition). Hazards, Risk Analysis and Control*, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, 1042-1059.

Mostrom M. (2016): Mycotoxins: classification. In: *Encyclopedia of Food and Health*, Academic Press, 29-34.

Mašić Z., Adamović S., Đilas S., Mihaljev Ž. (2003): Mycotoxins in pathophysiology of cattle diet. *Veterinarski glasnik* 2003 Volume 57, Issue 3-4, Pages: 191-199.

Pepeljnjak S., Cvetnić Z., Šegvić-Klarić M. (2008): Okratoksin A i Zearalenon: Kontaminacija žitarica i krmiva u Hrvatskoj (1977-2007) i utjecaj na zdravlja životinja i ljudi, *Krmiva*, Vol, 50, 147-159.

Pevalek-Kozlina B. (2003): *Fiziologija bilja*. Profil International, Zagreb.

Prange, A., Birzele, B., Krämer, J., Meier, A., Modrow, H. and Köhler, P. (2005). Fusarium inoculated wheat: deoxynivalenol contents and baking quality in relation to infection time. *Food Control*, 16(8), 739-745

Prom L.K., Horsley R.D., Steffenson B.J., Schwarz P.B. (1999): Development of Fusarium Head Blight and accumulation of deoxynivalenol in barley sampled at different growth stages. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 57, 60-63.

Радосављевић М. (2007): Кукуруз - обновљив извор енергије и производа, *Часопис за процесну технику и енергетику у пољопривреди / ПТЕП*, вол, 11, бр, 1-2, стр, 6-8.

Ramakrishna Y., Bhat R., Ravindranath V. (1989): Production of Deoxynivalenol by Fusarium Isolates from Samples of Wheat Associated with a Human Mycotoxicosis Outbreak and from Sorghum Cultivars. *Applied and environmental microbiology*, 1989, 2619-2620.

Rodrigues P.C.A., (2011): *Mycobiota and aflatoxigenic profile of Portuguese almonds and chestnuts from production to commercialization*. Doctoral dissertation, Instituto Politecnico de Braganca, Portugal.

Rotter B.A., Prelusky D.B., Pestka J.J., (1996): Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). *J, Toxicol, Environ, Health* 48, 1-34.

Scudamore K., (2008): Bioactive compounds in Food. In: Mycotoxins, J, Gilbert, H, Z, Senyuva (Eds,), (pp. 134-172), Blackwell Publishing Ltd., United Kingdom.

Синовец З., Ресановић Р., Синовец С. (2006): Микотоксини, појава, ефекти и превенција. Београд.

Сл, гласник РС (2014): Правилник о максимално дозвољеним количинама остатака средстава за заштиту биља у храни и храни за животиње и о храни и храни за животиње за коју се утврђују максимално дозвољене количине остатака средстава за заштиту биља ("Сл, гласник РС", бр, 29/2014 и 7/2014 - испр.), Министарство пољопривреде, шумарства и водопривреде.

Stanković S., Lević J., Krnjaja V., Bočarov-Stančić A., Tančić S., Kovačević T., (2007): Frequency of toxigenic Fusarium species and fusariotoxins in wheat grain in Serbia, Matica Srpska Proceedings for Natural Sciences, Novi Sad, 113: 93-102,

Vukadinović, V. (1998): Gnojidba usjeva. Poljoprivredni fakultet, Osijek

Weidenborner M. (2001): Encyclopedia of food mycotoxins, Springer, Verlag Heidelberg, Berlin

WHO (1990): Environmental health criteria 105, Selected mycotoxins: Ochratoxins, trichothecenes, ergot, <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc105.htm>