



**УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ**

**Департман за Фитомедицину и
заштиту животне средине**



Добрила Ковачевић
дипл. инж. пољопривреде

**МИКОТОКСИГЕНИ ПОТЕНЦИЈАЛ ИЗОЛАТА
Alternaria spp. СА ПШЕНИЦЕ**

МАСТЕР РАД

Нови Сад, 2021.



**УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ**

**Департман за Фитомедицину и
заштиту животне средине**



Кандидат
Добрила Ковачевић

Ментор
проф. др Драгана Будаков

**МИКОТОКСИГЕНИ ПОТЕНЦИЈАЛ ИЗОЛАТА
Alternaria spp. СА ПШЕНИЦЕ**

МАСТЕР РАД

Нови Сад, 2021.

Садржај:

1.	УВОД.....	1
2.	ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ.....	2
2.1.	ПШЕНИЦА.....	2
2.2.	ПАТОГЕНИ ПШЕНИЦЕ	4
2.3.	РОД <i>ALTERNARIA</i> SPP.....	5
2.3.1.	Систематско место рода <i>Alternaria</i>	6
2.3.2.	Процес инфекције.....	7
2.3.3.	Методe детекције <i>Alternaria</i> spp.....	8
2.4.	ТОКСИНИ РОДА <i>Alternaria</i> spp.	9
2.4.1.	Фактори животне средине који утичу на токсине <i>Alternaria</i> spp.....	12
2.4.2.	Утицај токсина.....	13
2.5.	МЕТОДЕ ОДРЕЂИВАЊА ТОКСИНА.....	14
2.6.	ПРЕВЕНЦИЈА ПОЈАВЕ МИКОТОКСИНА	14
3.	ЗАДАТАК И ЦИЉ РАДА.....	16
4.	МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД РАДА	17
4.1.	ПРИКУПЉАЊЕ ИЗОЛАТА.....	17
4.2.	ИДЕНТИФИКАЦИЈА ИЗОЛАТА.....	18
4.2.1.	PCR реакција.....	18
4.2.2.	Визуелизација продукта PCR реакције.....	19
4.2.3.	Секвенционирање ДНК фрагмената	21
4.3.	ИНОКУЛАЦИЈА СЕМЕНА ПШЕНИЦЕ	21
4.4.	ИНОКУЛАЦИЈА ХРАНЉИВЕ ПОДЛОГЕ	22
4.5.	ЕКСТРАКЦИЈА И ОДРЕЂИВАЊЕ МИКОТОКСИНА	23

4.6	СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА.....	24
5.	РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА СА ДИСКУСИЈОМ.....	25
4.3.	ИДЕНТИФИКАЦИЈА ИЗОЛАТА <i>Alternaria</i> spp.	25
4.4.	ОДРЕЂИВАЊЕ САДРЖАЈА МИКОТОКСИНА	28
5.	ЗАКЉУЧАК	32
6.	ЛИТЕРАТУРА	33
ПРИЛОГ 1:	ITS 1/ITS4 Секвенца изолата PŠ1	40
ПРИЛОГ 2:	ITS 1/ITS4 Секвенца изолата PŠ2	42
ПРИЛОГ 3:	ITS 1/ITS4 Секвенца изолата PŠ4	44

МИКОТОКСИГЕНИ ПОТЕНЦИЈАЛ ИЗОЛАТА *Alternaria spp.* СА ПШЕНИЦЕ

Добрила Ковачевић

САЖЕТАК

Микотоксини су секундарни метаболити које производе неке врсте гљива и представљају озбиљан проблем у производњи пшенице јер уласком у ланац исхране могу озбиљно нарушити здравље људи и животиња. Врсте из рода *Alternaria* су значајни проузроковачи црне пегавости пшенице. Инфекција овим гљивама поред губитка приноса доводи до смањења квалитета зрна због промене боје, губитка хранљивих вредности и контаминације микотоксинима. Према томе, идентификација и мониторинг присутних врста *Alternaria spp.* на семену пшенице, као и испитивање микотоксигеног капацитета изолата су од великог значаја првенствено да би се утврдило да ли се у зрнима пшенице и њиховим прерађевинама може очекивати присуство микотоксина.

У овом раду биће утврђен састав врста из рода *Alternaria* које су изоловане са узорака пшенице применом класичних фитопатолошких и молекуларних техника. Такође ће се испитати њихова способност производње алтернариола, алтернариол монометил етра и тентоксина из хранљиве ПДБ подлоге и са вештачки инокулисаног стерилног семена пшенице применом LC-MS/MS анализе.

Кључне речи: *Alternaria spp.*, пшеница, алтернариол, алтернариол монометил етар, тентоксин.

MYCOTOXIGENIC POTENTIAL OF *ALTERNARIA SPP.* ISOLATES FROM WHEAT

Dobriła Kovačević

SUMMARY

Mycotoxins are secondary metabolites produced by some species of fungi and pose a serious problem in wheat production. Once in food chain, they can seriously harm human and animal health. *Alternaria spp.* causes black spot in wheat. Infection with these fungi, in addition to loss of yield, leads to a decrease in grain quality due to changes in color, loss of nutritional values and mycotoxin contamination. Therefore, the identification and monitoring of *Alternaria* species on wheat grain in addition to investigation of mycotoxigenic potential are of great importance mainly in order to predict if *Alternaria* mycotoxins can be expected in wheat grains and their processed products.

In this paper, the composition of species from genus *Alternaria* that have been isolated from wheat samples by using classical phytopathological and molecular techniques will be determined and their ability to produce mycotoxin alternariol, alternariol monomethyl ether and tentoxin on PDB medium and artificially inoculated sterile wheat seed using LC-MS / MS analysis.

Key words: *Alternaria* spp., wheat, alternariol, alternariol monomethyl ether, tentoxin.

Чланови комисије за оцену и одбрану мастер рада

Др Драгана Будаков, ванредни професор

Ужа научна област Фитопатологија
Пољопривредни факултет, Нови Сад
Ментор

Др Мила Граховац, ванредни професор

Ужа научна област Фитопатологија
Пољопривредни факултет, Нови Сад
Председник

Др Војислава Бурсић, ванредни професор

Ужа научна област Фитофармација
Пољопривредни факултет, Нови Сад
Члан

1. УВОД

Пшеница (*Triticum sp.*) је еуриотопна биљка (има велики ареал распрострањања). Захваљујући полиморфизму пшеница је распрострањена готово у целом свету. Жита представљају примарни извор људске исхране, при чему у светској производњи пшеница заузима треће место по произведеној количини, а у Србији заузима друго место, одмах иза кукуруза. Пшеница се на територији Србије узгаја на 577 499 хектара, а остварена укупна производња износи 2 534 643 тона. Пшеница се пре свега користи као хлебна биљка. Пшеничним хлебом се данас храни око 70% светског становништва. Велики број патогена може да паразитира на пшеници од којих су значајније гљиве које производе микотоксине који су веома штетни по људско здравље. Најчешће изоловане врсте из зрна пшенице припадале су роду *Alternaria* (41,7%), затим *Fusarium* (15,2%) *Aspergillus flavus* је идентификован у 40,0% узорака пшенице, са учесталošћу од 2,0%. Врсте рода *Alternaria* су широко распрострањене и обухватају велики број сапрофитних и фитопатогених врста. Главни су контаминанти стрних жита и произроковачи карактеристичног обољења „црне пгавости“. Поред штета на пољу, *Alternaria* spp. могу узроковати и кварљивост производа у процесу прераде, током транспорта и складиштења, што може довести до великих економских губитака. У многим земљама сматра се карантинским патогеном и биће потребно истражити учесталост и значај ове болести у пшеничним подручјима. У Републици Србији су откривене врсте на пшеници *A. alternata* и *A. longipes*. Будући да је велики значај рода *Alternaria* везан за безбедност хране и квалитет стрних житарица и производа на бази житарица, овај рад представља преглед врста *Alternaria* на пшеници са фокусом на ризике од микотоксина у ланцу исхране.

2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

2.1. ПШЕНИЦА

Пшеница се пре свега користи као хлебна биљка. Пшеничним хлебом се данас храни око 70% светског становништва. Пшеница има велики значај у низу индустрија: млинарској, пивској, фармацеутској, кекса, хлеба и колача... Пшеничне мекиње које представљају спорени производ при сложеној мељави – од омотача клице и алеуронског слоја, користе се у сточарству као цењена концентрована храна. У екстензивном сточарству, слама, а нарочито плева, служе за исхрану стоке. У смеши са махунаркама (грашком и грахорицом), у зеленом или сувом стању, пшеница је квалитетна сточна храна. Ситно и слабије зрно које отпадне при селектирању служи за исхрану стоке. Слама служи: као простирка, за израду хартије, целулозе, грађевинских плоча. Има велики агротехнички значај, јер представља одличан предусев за кукуруз и све индустријске културе, оставља земљиште чисто од корова, на коме се у условима наводњавања могу гајити пострни усеви.

Култура пшенице је била позната у Ираку 6 500 година п.н.е. У то време пшеница је гајена у условима наводњавања као главна култура. 5000-6000 година п.н.е. пшеница је гајена у старом Египту, Малој Азији и Кини. У Немачку су пшеницу донели Римљани при својим кретањима на север око 1. века нове ере. У Нови свет пшеница је донета после његовог открића (Јужна Америка 1529. године, САД 1602. године). Словени су пшеницу познавали још у својој старој прапостојбини. При насељавању Балканског полуострва затекли су пшеницу и наставили њено гајење.

Што се тиче хемијског састава вода се налази у границама 10-14%. Изнад 15% садржај воде је неповољан, јер се зрно тешко чува. Маст се у зрну налази 1,5-2% и то највећим делом у клици. Целулоза се налази у омотачу плода и семена око 2-3%. Угљени хидрати чине 64-69% и углавном су смештени у ендосперму и главни део чини скроб (око 90%

од окупних угљених хидрата), а остало су: тршчани шећер, малтоза и др. Количина беланчевина у нашим рејонима креће се од 15-18%. У зрну пшенице углавном се налазе: албумин, глобулин, глијадин и глутенин. У погледу аминокиселинског састава пшенично зрно је богато свим есенцијалним аминокиселинама, а нарочито глутаминском киселином и лизином. Минералне материје (1,7-2% заступљене су у омотачу зрна и њих чине P (50%), K (20-30%), Ca, Mg, Si, Fe и др. Витамини се највише налазе у клици, а мање у другим деловима зрна и то: витамини B₁, B₂, E, K, PP.

Као што је приказано на графикону 1, више од 40% укупне светске производње пшенице сконцентрисано је на територији Азије, где је Кина главни произвођач са површином од преко 23 милиона хектара и произведених 133 596 300 тона годишње (FAOSTAT, 2019). На европском континенту у производњи пшенице предњаче Француска и Немачка.

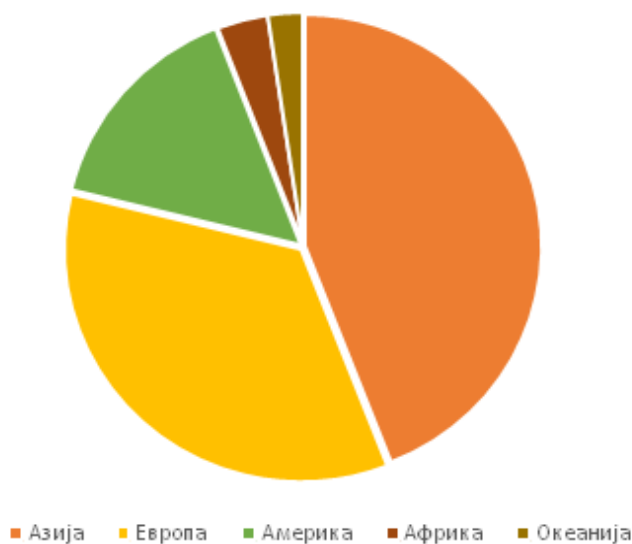


График бр.1: Производња пшенице у свету по континентима у 2019. години (FAOSTAT, 2019)

<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>

Житарице у Републици Србији су заступљене на преко 65% укупних површина под ораницама и баштама. Услови за узгој ових врста су углавном повољни, а доминанти производни региони је Северна Србија. Највећи просечни принос остварен је у Војводини и износи 5,1 t по хектару. Удео пшенице у укупној производњи жита износи око 34%, што говори о већем интензитету гајења ове житарице у односу на друге (РЗС, 2020).

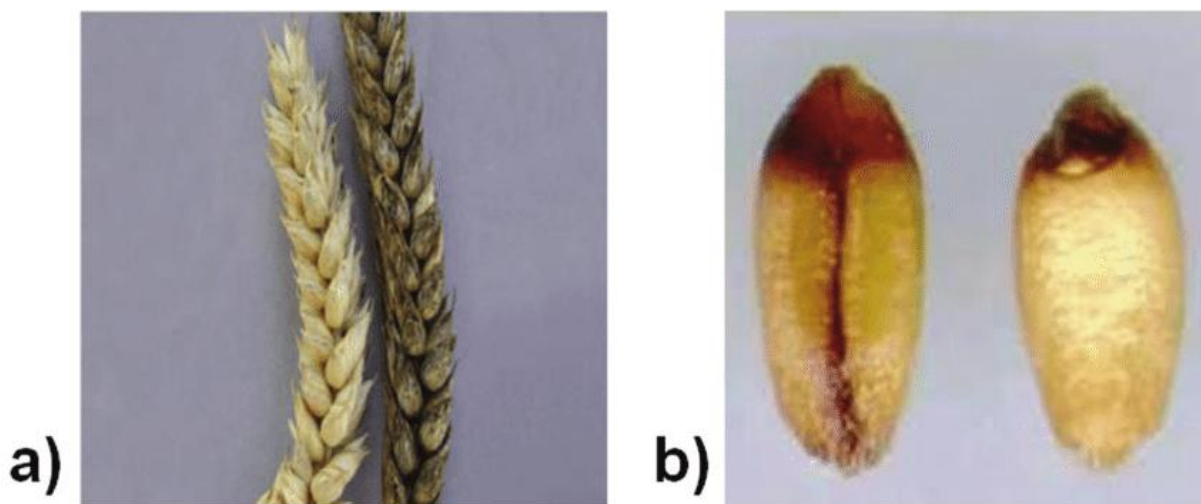
2.2. ПАТОГЕНИ ПШЕНИЦЕ

За разлику од 70-их и 80-их година прошлог века, када су врсте *Fusarium* доминирале на зрну пшенице, болести узроковане *Alternaria* spp. недавно су распрострањене. Године 2004. *Alternaria* spp. и неке друге гљиве изазвале су изузетно низак технолошки квалитет зрна пшенице (Балаж, 2010). Гљиве из рода *Fusarium* имају висок економски значај узрокујући смањење приноса и квалитета зрна. У годинама са просечним нивоом падавина, учесталост микоза пшенице је око 5%. Истражена је учесталост гљива на обичној пшеници (*Triticum aestivum*) прикупљеним током жетве 2015. године. Најчешће изоловане врсте из зрна пшенице припадале су роду *Alternaria* (41,7%), затим *Fusarium* (15,2%) *Aspergillus flavus* је идентификован у 40,0% узорак пшенице, са учесталошћу од 2,0% (Krulj и сар., 2016).

Насељавају зрна пшенице узрокујући значајне губитке, контаминација гљивама узрокује значајно смањење приноса, али су губици још већи због микотоксина које производе ове гљиве. Житарице загађене *Alternaria* spp. и други произвођачи микотоксина, не представљају само ризик по здравље људи и животиња, већ утичу и на смањена технолошка својства (Prange и сар., 2005; Havlova и сар., 2006; Suchowilska и сар., 2010). Врсте рода *Alternaria* су широко распрострањене и обухватају велики број сапрофних и фитопатогених врста. *Alternaria* spp. су главни контаминанти стрних жита и произроквачи карактеристичног обољења „црне пегавости“. Поред штета на пољу, *Alternaria* spp. могу узроковати и кварљивост производа у процесу прераде, током транспорта и складиштења, што може довести до великих економских губитака.

2.3. ПОД *ALTERNARIA* SPP.

Житарице су често заражене врстама из рода *Alternaria*, које могу проузроковати црну пегавост пшенице. До промене боје класа и зрна (нарочито код ембрионалног краја зрна) долази због присуства мицелије и масе конидија са тамним пигментом, меланином, што је карактеристично за род *Alternaria* (Thomma, 2003). Висока влажност или честе падавине од фазе млечнозрелог зрења често могу погодити инфекцији овом гљивом и могу изазвати озбиљне губитке (Logrieco и сар., 2003). Значај црне пегавости не одражава се на смањење приноса колико на квалитет млевења пшенице за прераду. Већина микобиота у пшеничном брашну потиче од иницијално заражених зрна на пољу (Plavšić и сар., 2007). Неадекватна боја брашна и мекиња због промене боје зрна може имати значајан економски утицај, а уз смањену нутритивну вредност долази до смањења технолошког квалитета производа од житарица (Kosiak и сар., 2004). Осим оштећења на класу и зрну (Слика бр. 1), болест се може појавити и на лишћу у облику пега, обично узрокованих врстом *A. triticina*. *Alternaria* spp. могу настати у складишту узрокујући кварење житарица и производа на бази житарица.



Слика бр. 1: Симптом инфекције са *Alternaria* spp. (a) на класу, (b) и на зрну пшенице

<http://www.hgca.com/> (a)

<http://www.agropedia.iitk.ac.in/content/black-point-disease-wheat/> (b)

Након жетве, углавном физички фактори диктирају да ли ће гљиве расти и/или производити микотоксине. Примарни фактори који утичу на раст гљива у ускладиштеним прехрамбеним производима су садржај влаге и температура робе. Међутим, раст врста из рода *Alternaria* може се фаворизовати у зрнима ускладиштеним у влажном складишту, али се инфекција такође може проширити са контаминираних биљних производа на суседне здраве секундарним инфекцијама (Barkai-Golan&Nachman, 2008). Постоји велик број врста *Alternaria* spp. које су распрострањене широм света у влажним и полусушним регионима. Осим пшенице, заступљеност *Alternaria* spp. забележена је и на другим стрним житима, као што су јечам (Medina и сар., 2006; Hudec, 2007), зоб (Kwasna и Kosiak, 2003) и раж (Grabarkiewicz Szczesna и сар., 1989).

Будући да се поједине врсте овог рода гљиве у многим земљама сматрају карантинским патогеном, биће потребно истражити учесталост и значај ових проузроковача болести у пшеничним подручјима широм света. У Републици Србији су откривене врсте на пшеници *A. alternata* и *A. longipes* (Ivanović и сар., 2001), Док су у истраживањима микобиоте на спелти преовлађујуће врсте *A. alternata* и *A. tenuissima* (Vučković и сар., 2012).

2.3.1. Систематско место рода *Alternaria*

Род *Alternaria*, припада царству *Fungi*. сврстан је у раздео *Ascomycota*, класу *Dothideomycetes* и фамилију *Pleosporaceae*. Будући да га је 1816. године описао Nees (Nees von Esenbeck 1816-1817), са *A. alternata* (*A. tenuis*) као једини тип рода. Врсте *Alternaria* су широко распрострањене и инфицирају широк спектар економски важних усева.

Талус гљива из рода *Alternaria* чини вишећелијска мицелија. Репродукција је помоћу конидија које су кључна таксономска карактеристика овог рода и оне су крупне, вишећелијске, тамно обојене (меланизиране) са уздужним и попречним преградама облика „буздована”, или ваљкасто издужене. За разлику од других врста овог рода, немају изражене „дршке”. Конидије се формирају у низовима појединачним или разгранатим на кратким, усправним конидиофорима. *Alternaria* формира конидије које

настају као избочине протопласта кроз поре у ћелијском зиду конидиофора. Као плодносна тела формирају псеудотеције, које често код појединих врста могу да изостану. Псеудотеција изгледа слично као перитеција. Основна разлика између ове две структуре је у зиду плодносног тела, који у случају псеудотеције није присутан. Чврстину псеудотецији обезбеђује строма у коју је уроњена, док перитеција има свој зид иако може бити уроњена у строму. Аскуси се образују у отворима унутар вегетативног ткива гљиве које се назива аскострома и битуникатни су. Због честог изостанка полне фазе, гљива може дуго преживети као мицелија или споре на распаднутим биљним остацима или као латентна инфекција у зрну (Rotem, 1994).

У роду *Alternaria*, врсте су првенствено дефинисане према карактеристикама конидија. Описано је преко 100 врста које се појављују широм света (Simmons, 1992). Међутим, грешке у таксономији врсте *Alternaria* настале су због варијабилности њених морфолошких карактеристика, на које не утичу само унутрашњи фактори, већ и услови околине. Као резултат тога, могуће је да су поједине врсте случајно подељене на неколико (Rotem, 1994). Ово је илустровано запажањем да је само врста *A. alternata* способна да нападне преко 100 домаћина, а уз то су Groves и Skolko (1944) открили да ова врста типично показује морфолошке варијације. Због морфолошке сличности, али патолошких разлика, сојеви одређене врсте, посебно *A. alternata*, дефинисани су као *formae speciales* или „патотипови“ (Nishimura и Kohmoto, 1983).

Alternaria spp. су космополитске гљиве и могу се наћи у земљишту, биљкама, храни, храни за животиње и ваздуху у затвореном простору. Род *Alternaria* укључује и сапробе и биљне патогене за које је у целом свету пријављено да инфицирају усеве на пољу и изазивају пропадање многих биљних производа након жетве (Thomma, 2003). Изолати су груписани у две главне класе: комплекс врста мале споре *Alternaria* укључујући *A. alternata*, *A. tenuissima* и *A. arborescens* и комплекс врста *A. infectoria*, који укључује *A. infectoria* и *A. triticina*.

2.3.2. Процес инфекције

Врсте *Alternaria* су фолијарни патогени који узрокују релативно споро уништавање ткива домаћина смањењем фотосинтетског потенцијала. Инфекција доводи до стварања

некротичних лезија, које понекад имају изглед мете због прекида раста узроковног неповољним условима. Гљива се налази у центру лезије, која је окружена хлоротичним ореолом, симптом који се обично примећује у процесу инфекције некротрофним патогенима. Ова зона настаје ширењем гљивичних метаболита попут токсина (Tewari, 1983). Припадници рода *Alternaria* често узрокују инфекције у којима гљива улази у ткиво где остаје у стању мировања све док промењени услови не погодују инфекцији. Врсте *Alternaria* генерално не утичу на транспорт воде или хранљивих материја у целој биљци, јер не циљају посебно на корење или судове (Rotem, 1994).

Ако се преноси семеном, гљива може напасти садницу након што је семе проклијало. У другим случајевима, након што се споре произведу, углавном се шире ветром на површине биљака где може доћи до инфекције. Обично су ослабљена ткива, било због напрезања, старења или рањавања, подложнија инфекцији *Alternaria* него здрава ткива. Упркос таксономским и патогеним разликама између врста *Alternaria*, оне изазивају сличне обрасце инфекције. Споре у стању мировања имају јако меланизоване зидове који, под повољним условима, производе једну или више клициних цеви. Након тога, оне продиру у стоме, кутикулу или ране са или без стварања малих апресорија. Код мање вирулентних врста циљају се ране и стоме, док вирулентније врсте могу и директно продрети (Rotem, 1994). Ензимски процеси у инфекцијама алтернарије су у суштини слични онима код других болести. Кутикула, која се састоји од комбинације кутина и воскова, представља прву линију одбране коју треба савладати директним продирањем патогена.

2.3.3. Методе детекције *Alternaria* spp.

Род *Alternaria* обухвата скоро 300 описаних таксона (Simmons, 2007). С обзиром на специфичан профил микотоксина различитих *Alternaria* spp., тачна идентификација је изузетно важна за правилну процену ризика. Међутим, проблематично је изоловати гљиве од значаја због присуства конкурентних гљива које могу брже расти или стварати антагонистичка једињења. Да би се превазишао овај проблем, у поступцима откривања пожељни су потпуно селективни медији. Према подацима из литературе, већина аутора препоручује агар од кромпира и шаргарепе (Potato Carrot Agar - PCA) и агар од сока V-8

који су селективни за врсте *Alternaria* и подстичу обилну спорулацију (Maškova и сар., 2012). Dichloram Chloramphenicol Malt Extract Agar (DCMA) показао се као веома ефикасан за откривање сојева *Alternaria* према Patriarca и сар., (2007). За даље откривање, већина аутора следи упуте Simmons-а (2007).

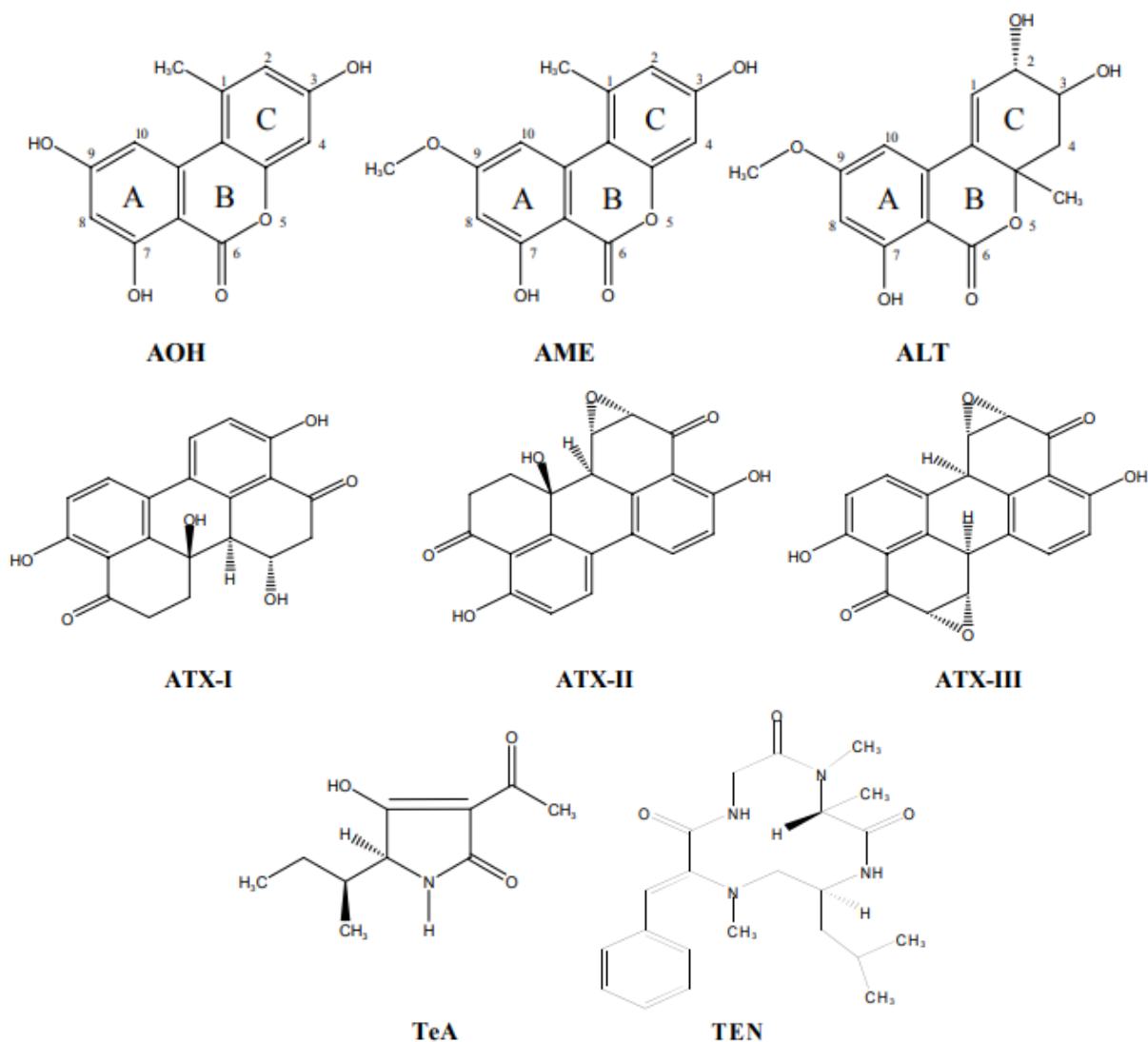
Молекуларне технике, попут система заснованог на ланчаној реакцији полимеразе (PCR), примењене су као алтернативни тестови који замењују проблематичне и дуготрајне микробиолошке и хемијске методе за откривање и идентификацију најозбиљнијих произвођача микотоксина (Niessen, 2007). У PCR методи, „универзални“ прајмери се користе за изолацију специфичних региона ДНК, након чега следи поређење секвенце циљне врсте са секвенцом других врста у базама података. Кодирајући делови многих гљивичних гена 18S, 5.8S и 28S rDNA су високо конзервирани и створени су прајмери за ове регионе (White и сар., 1990). Они омогућавају изолацију интерних транскрибованих одстојних секвенци (Internal transcribed spacer sequences ITS-1 и ITS-2), које се налазе између кодирајућих региона и генерално су одговорне за полиморфизам на нивоу врсте. ITS регион се појачава из циљне гљиве и секвенцира ради идентификације региона ДНК јединствених за гљиве од интереса (Magan и Olsen, 2004). ITS регион је такође коришћен за дизајнирање прајмера за разликовање великог спектра врста *Alternaria* (Toth и сар., 2010).

2.4. ТОКСИНИ РОДА *Alternaria* spp.

Микотоксини су секундарни метаболити, које производи низ гљивичних врста. Уопштено говорећи, микотоксини су хемијски и термички стабилна једињења, која преживљавају складиштење и услове прераде хране и стога опстају до крајњих производа (Matić и сар., 2008). Микотоксини у храни од житарица и сточној храни глобално су питање које изазива велику забринутост због њихових потенцијалних здравствених ризика за људе и/или стоку (Körpen и сар., 2010). Род *Alternaria* производи више од 70 микотоксина и фитотоксина, али се само неколико њих природно налази у намирницама или су од великог токсиколошког значаја и мали део њих је хемијски окарактерисан. Најважнији токсини *Alternaria* су подељени у главне

структурне класе према Ostry (2008), Logriesso и сар. (2009), Battilani и сар. (2009), da Cruz Cabral и сар. (2016) (Слика бр. 2):

- деривати дибензо- α -пирона: алтернариол (АОН), алтернариол монометил етар (АМЕ), алтенуен (АЛТ), алтенуисол (АS);
- деривати тетраминске киселине: тенуазојева киселина (ТеА)
- деривати перилена: алтертоксини I, II, III (АТХ-I,-II,-III)
- друге различите структуре: циклични тетрапептид тентоксин (TEN).



Слика бр. 2: Хемијска структура АОН, АМЕ, АЛТ, АТХ-I, АТХ-II, АТХ-III ТеА, TEN

<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.2903/j.efsa.2011.2407>

На основу селективности, фитотоксини се могу поделити у две категорије: токсини неспецифични за домаћина и токсини специфични за домаћина. Генерално, токсини који нису специфични за домаћина имају релативно благе фитотоксичне ефекте, утичу на широк спектар биљних врста и сматра се да су додатни фактор болести поред, на пример, механизма продирања и ензимских процеса. Иако делују као фактори вируленције и појачавају симптоме болести, нису потпуно неопходни за успостављање болести јер су такође токсични за биљне врсте изван распона домаћина патогена. Они само предодређују домаћина за болест (Ballio, 1991). У роду *Alternaria* је идентификовано много токсина који нису специфични за домаћина, иако је тачно дејство само неколико њих детаљно проучено. Тенуазонска киселина и тентоксин су примери токсина које производи неколико врста *Alternaria*. За TEN је утврђено да поседује и неспецифично фитотоксично деловање и да може проузроковати хлорозу сејанаца великог броја биљних врста (Lou и сар., 2013). Тенуазонска киселина инхибира синтезу протеина, а тентоксин производи неколико врста из рода *Alternaria* и делује као инхибитор фотофосфорилације путем специфичног везивања за хлоропластну АТП синтазу, изазивајући инхибицију хидролизе АТП и синтезе АТП (Steele и сар., 1978). Пошто су ти токсини често усмерени на основне ћелијске процесе, често су моћни микотоксини.

Токсини специфични за домаћина укључени су у развој неколико деструктивних болести. Они генерално показују озбиљне ефекте на прилично узак распон врста који служи као домаћин гљивама и неопходни су за болести. Постоји најмање 12 биљних патогених врста *Alternaria* које производе токсине специфичне за домаћина, од којих се већина чини варијантама *A. alternata*. Предложено је да се ове варијанте сматрају патотипима *A. alternata* (Nishimura и Kohmoto, 1983), што је хипотеза подржана молекуларном анализом (Kusaba и Tsuge, 1997). Токсини које производе ови патотипи су хемијски различити, у распону од секундарних метаболита ниске молекулске масе до пептида. У студији о патогеним (токсини специфичан за домаћина) и непатогеним (за гљиве који не стварају токсине) врста *A. alternata*, утврђено је да сви тестирани патотипи носе (мале) додатне хромозоме, док непатогени нису носили ове додатне хромозоме (Akamatsu и сар., 1999).

Токсини алтернарије откривени су у широком спектру житарица и производа од житарица, попут хлеба и пецива, муслија, фине пекарске робе, тестенине итд. (EFSA, 2011). Микотоксингени потенцијал зависи од врсте и соја гљиве, састава матрикса и фактора околине, попут температуре и влаге, а посебно активности воде (a_w) (Fernandez-Sruz и сар., 2010). Према Magan и сар. (1984) *A. alternata* треба прилично високу активност воде ($a_w = 0,98$) за производњу микотоксина на зрну пшенице. Познавање производње микотоксина под маргиналним или неоптималним температурама и условима за раст може бити важно јер неправилни услови складиштења праћени повећањем температуре и садржаја влаге у зрну могу погодовати даљој производњи микотоксина и довести до смањења квалитета зрна (Oviedo и сар., 2011).

2.4.1. Фактори животне средине који утичу на токсине *Alternaria* spp.

Биосинтезу микотоксина регулише неколико фактора животне средине: генерално услови који погодују производњи микотоксина повезани су са погодним условима за раст гљива. Међу родовима гљива који производе микотоксине, главни стресни фактори који утичу на производњу микотоксина су извори азота и угљеника, температура, активност воде и рН. Еколошки захтеви за инфекцију зависе од врсте *Alternaria* и домаћина, али интеракција одговарајуће температуре и воде настале кишом, росом кондензацијом или наводњавањем су увек неопходни. Оптимална температура за раст мицелије је око 18-25 °C, али споре могу клијати и инфицирати у распону од 4 до 35 °C. Под оптималним температурним условима, потребно је најмање 5-8 сати влажности за инфекцију (Barkai Golan, 2008). Неке врсте имају дневни образац спорулације, где светлост изазива стварање структура које носе споре и производња спора је појачана мраком. Оптималне температуре за спорулацију различитих врста крећу се од 15 до 30°C. Влага је такође неопходна за спорулацију, релативна влажност испод засићење може бити довољна. Ослобађање спора је изазвано кишом и наглим променама у влажности. Споре *Alternaria* се шире углавном ваздушним струјама, али могу бити и прскане кишом (Rotem, 1994). Оптимални рН за раст мицелија је између 4 и 6,6, али *Alternaria* толерише опсег од 2,7 до 8. Анализа коју су извршили Magan и сар. (1984) утврђени су оптимални услови за производњу *A. alternata* токсина на агару из екстракта

пшенице и на зрну пшенице откривајући да су и a_w и температура утицали на производња алтенуена (АЕ), алтернариола (АОН) и алтернариол монометил етра (АМЕ). Највиша производња је забележена на 0,98 a_w и 25 °C, док је нижа a_w смањила производњу микотоксина. Рад Brzonkalik и сар., (2012) показао да је производња микотоксина у *Alternaria alternata* регулисана нутритивним факторима и условима гајења.

Pose и сар. (2010) су спровели систематску студију о утицају активности воде и температуре на производњу три главна токсина *Alternaria* spp. (АОН, АМЕ и ТА) на синтетичкој подлози од парадајза од стране *A. alternata*. Оптимални услови за производњу АОН били су 21°C, 0,954 a_w и 24 дана инкубације; максимална концентрација АМЕ је одређена на 0.954 a_w , 21°C и 35°C, док су оптимални услови за акумулацију ТА били 0.982 a_w , 21°C.

Излагање светлости такође може утицати на производњу микотоксина *A. alternata*: инкубација под плавим и белим светлом имала је инхибиторни ефекат на производњу АОН и АМЕ од стране *A. alternata*. Систематска студија Schmidt- Heydt и сар. (2011). изведено коришћењем светлости одређене таласне дужине и интензитета показало је да *A. alternata* скоро не утиче на светлосни третман у односу на раст и морфологију, показујући благо повећану брзину раста под кратком таласном дужином, нпр. под плавим светлом. Поред тога, црвено и плаво светло је имало инхибиторни ефекат на биосинтезу АМЕ анализираног соја.

2.4.2. Утицај токсина

Постоји релативно велики број студија о утицају инфекције гљивом на безбедност хране и параметре приноса (Plavšić и сар., 2010), али су информације о утицају инфекције микобиотом на технолошке параметре прилично оскудне. Значајно смањење технолошког квалитета пшенице у зрнима нападнутим од *Fusarium* spp. и *Alternaria* spp. доказано је у истраживањима Šarić и сар., (1997). Према овим ауторима, повећана ензимска активност пољских плесни у узорцима са тешком инфекцијом негативно утиче на физичка својства теста, што доводи до потпуне бескорисности пшенице за даљу прераду. Vodroža и сар., (2012) открили су да је брашно добијено од пшенице заражене

Alternaria spp. показало мање воде и мању стабилност током мешања и веће слабљење протеина током загревања у поређењу са брашном из пшенице третираном фунгицидом. Токсичност, мутагеност и генотоксичност секундарних метаболита су доказани и *in vitro* и *in vivo* тестовима. Метаболити које продукује *A. alternata* су токсични за лабораторијске животиње и културе људских ћелија, а тератогени и фетотоксични за мишеве. Екстракти културе *A. alternata* изоловане из житарица били су мутагени у различитим микробним и ћелијским системима, а канцерогене код глодара. АОН и АМЕ се могу везати за ДНК епителних ћелија једњака људског фетуса и покренути онкогенезу феталног епитела *in vitro*. *Alternaria* врсте су биле најчешће гљиве које су инфицирале главне пољопривредне културе у подручјима са високом учесталošћу рака једњака у Кини. Употреба житарица које је заразила *Alternaria* spp. и контаминирала микотоксинима изазвала је хронични здравствени ризик за рак једњака код људи у овим регионима. Споре *Alternaria* spp. се сматрају једним од најпотентнијих гљивичних алергена, који је повезан са респираторним алергијама и кожним инфекцијама (Corden и сар., 2003; Kilic и сар., 2010; Pavon и сар., 2010).

2.5. МЕТОДЕ ОДРЕЂИВАЊА ТОКСИНА

Имајући у виду токсичност метаболита које продукују поједине врсте гљива рода *Alternaria* у систему од њиве до трпезе, за спровођење систематске контроле појаве *Alternaria* токсина неопходе су специфичне и осетљиве аналитичке методе. Течна хроматографија у спрези са масеним детектором (LC-MS/MS) постала је преовлађујућа техника за детекцију и квантификацију *Alternaria* токсина у храни и храни за животиње због њене осетљивости, селективности и специфичности. Ограничавајући фактори су између осталог и понекад лоша ефикасност пречишћавања узорака и недостатак референтних материјала. Референтни стандарди су доступни за само неке од *Alternaria* токсина.

2.6. ПРЕВЕНЦИЈА ПОЈАВЕ МИКОТОКСИНА

Појава микотоксина у ланцу исхране је неизбежан и озбиљан проблем са којим се свет суочава. Након што су намирнице контаминирани токсинима, немогуће их је елиминисати. Свакако, најбоља заштита од микотоксина је праћење њиховог присуства у храни и сточној храни (Matić и сар., 2008). Превенција гљивичне контаминације, а тиме и производња токсина, може се постићи или у фазама пред жетву добром пољопривредном праксом, као и током фаза након жетве, применом одговарајућих поступака сушења, складиштења и транспорта (FAO, 2001). Примена фунгицида на терену може смањити гљивичну инфекцију која резултира смањењем производње микотоксина. Међутим, савремени трендови иду ка еколошки прихватљивим алтернативама на терену, уместо да се ослањају на хемикалије (Bhaat и сар., 2010). Развој отпорних сорти уз примену савремених биотехнолошких метода показао би се као ефикасан начин за спречавање и сузбијање опасних гљива и њихових микотоксина. Потребан је проверен систем управљања складиштењем који укључује сушење, избегавање оштећења зрна и осигуравање одговарајућих услова складиштења. Да би се смањила или спречила производња већине микотоксина, сушење треба извршити што је пре могуће након бербе и што је брже могуће. Гљиве не могу расти (или се микотоксини не могу произвести) у правилно осушеној храни. Оштећено зрно је склоније инвазији гљива и контаминацији микотоксинима, па је важно избећи оштећења пре и током сушења, као и приликом складиштења. Инсекти и штеточине у складишту могу напасти зрно и због својих активности накупљена влага пружа идеалне услове за раст гљива.

Међутим, осим токсичности и појаве, хемијско понашање микотоксина током прераде хране мора се разумети при процени ризика повезаних са конзумацијом хране направљене од загађених сировина. Siegel и сар. (2010) истраживали су стабилност АОН, АМЕ и АЛТ при печењу хлеба коришћењем интегралног пшеничног брашна. Добијени резултати указују на то да се микотоксини *Alternaria* једва разграђују током мокрог печења, док се значајна разградња јавља при сувом печењу, при чему се стабилност смањује следећим редоследом АМЕ > АОН > АЛТ.

3. ЗАДАТАК И ЦИЉ РАДА

Задатак рада је прикупљање и детерминација изолата гљиве рода *Alternaria* spp. са семена пшенице, као и испитивање способности ових изолата да продукују микотоксине алтернариол (АОН), алтернариол монометил етар (АМЕ) и тентоксин (TEN) на течној хранљивој ПДБ подлози и са вештачки инокулисаног стерилног семена пшенице.

Основни циљ истраживања је да се утврди састав врста из рода *Alternaria* које су изоловане са узорак семена пшенице из производње у Србији применом класичних фитопатолошких и молекуларних техника. Одређивање способности производње микотоксина алтернариола (АОН), алтернариол монометил етра (АМЕ) и тентоксина (TEN) и утврђивање разлика у потенцијалу приодукције ових токсина на различитим супстратима. Резултати истраживања ће указати на постојање токсигених врста из рода *Alternaria* које имају потенцијал да контаминирају семе пшенице, али и производе од ове сировине. Такође ће бити уочене разлике у количини произведених микотоксина (алтернариола (АОН), алтернариол монометил етра (АМЕ) и тентоксина (TEN)) на различитим супстратима. Ови резултати ће допринети мониторингу *Alternaria* микотоксина на производном подручју наше земље.

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД РАДА

Испитивања изолата су спроведена у Лабораторији за дијагностику патогена, штеточина и корова, Департмана за фитомедицину и заштиту животне средине, Пољопривредног факултета, Универзитета у Новом Саду, док је одређивање садржаја микотоксина спроведено на Универзитету у Београду, Пољопривредни факултет, Земун.

4.1. ПРИКУПЉАЊЕ ИЗОЛАТА

Alternaria spp., је изолована са семена пшенице прикупљеног са 3 парцеле на локалитету Чуруг, Република Србија. Примењен је стандардни поступак испитивања здравствене исправности семена на филтер папиру у циљу утврђивања присуства *Alternaria* spp. (Mathur и Kongsdal, 2003; Basim и сар., 2018). Поступак је следећи:

1. Сто зрна пшенице се потопи у 1% раствор натријум хипохлорита у трајању од 10 минута. Након потапања се оцеди.
2. Семе се поставља у Петри кутије (пречника 150 mm) на филтер хартију навлажену дестилованом водом.
3. Инкубација траје 7 дана на 22-25 °C у термостату.
4. Преглед се врши визуелним путем и тражи се мицелија карактеристична за *Alternaria* spp.
5. Провера се врши микроскопским прегледом у циљу налажења карактеристичних конидија.

Изолати који су образовали карактеристичне конидије за *Alternaria* spp. су прихваћени ради добијања чисте културе и инкубирани на 25 °C у трајању од седам дана, а потом је из униформне чисте културе извршена моноспоријална изолација.

4.2. ИДЕНТИФИКАЦИЈА ИЗОЛАТА

Идентификација *Alternaria* spp. извршена је описивањем морфолошких карактера: мицелије, хифа и спора које гљива образује на РСА хранљивој подлози (РСА-Potato Carrot Agar) након 7 дана инкубације на 25 °C. Морфолошке одлике изолата су детерминисане на основу описа Mathur и Kongsdal (2003).

Резултати идентификације класичним методама су потврђени молекуларном детекцијом на основу ланчане реакције полимеразе (PCR) применом прајмера ITS1 и ITS4. За ову реакцију употребљен је претходно изолован ДНК молекул изолован применом СТАВ методе (Saghai-Marooф и сар., 1984). Према овој методи, 0,5-0,7 g мицелије је хомогенизовано у течном азоту. Додато је 600 µl СТАВ екстракционог пуфера по 0,5 g мицелије, који је претходно загрејан на 65 °C. Мешавина је инкубирана на 65 °C у трајању од 30 минута. Након хлађења, додат је 1 vol хлороформ: IAA (24:1). Вортекс и центрифугирање 10 мин на собној температури. Супернатант је пребачен у чисте епендорф тубе и додат је 1 vol изопропанола. Мешавина је лагано промешана и центрифугирана 10 мин на собној температури. Добијен пелет је испран са 800 µl 70% етанола. Пелет је осушен и додат је 40 µl ТЕ пуфера са 20 µg/ml РНазе. Пелет је остављен да се раствори 10 мин на 65 °C.

4.2.1. PCR реакција

ДНК изолата је пре реакције разређена потпуно чистом водом без трагова ДНК у односу 1/10. За PCR реакцију употребљен је пар прајмера. (Табела 1)

Табела бр. 1: Прајмери и њихове секвенце (5' - 3') примењене за PCR реакцију

Назив	Секвенца (5' - 3')
ITS 1	TCCGTAGGTGAACCTGCG
ITS 4	TCCTCCGCTTATTGATATGC

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 концентрације 25 $\text{pmol } \mu\text{L}^{-1}$ и 5 μL изоловане ДНК, која је претходно разблажена са потпуно чистом водом без трагова ДНК у односу 1/10. Негативна, контролна варијанта је припремљена без прајмера и ДНК.

PCR реакција је изведена Agilent SureCycler 8800, а услови реакције дефинисани по Singha и сар., (2016), били су следећи: циклус започиње почетном денатурацијом на 95°C током 2 минута, након чега следи 35 циклуса на 94°C током 30 s, 56 °C током једног минута, 72 °C током 2 минута и финална екстензија 72 °C током 8 минута (Слика бр. 3).

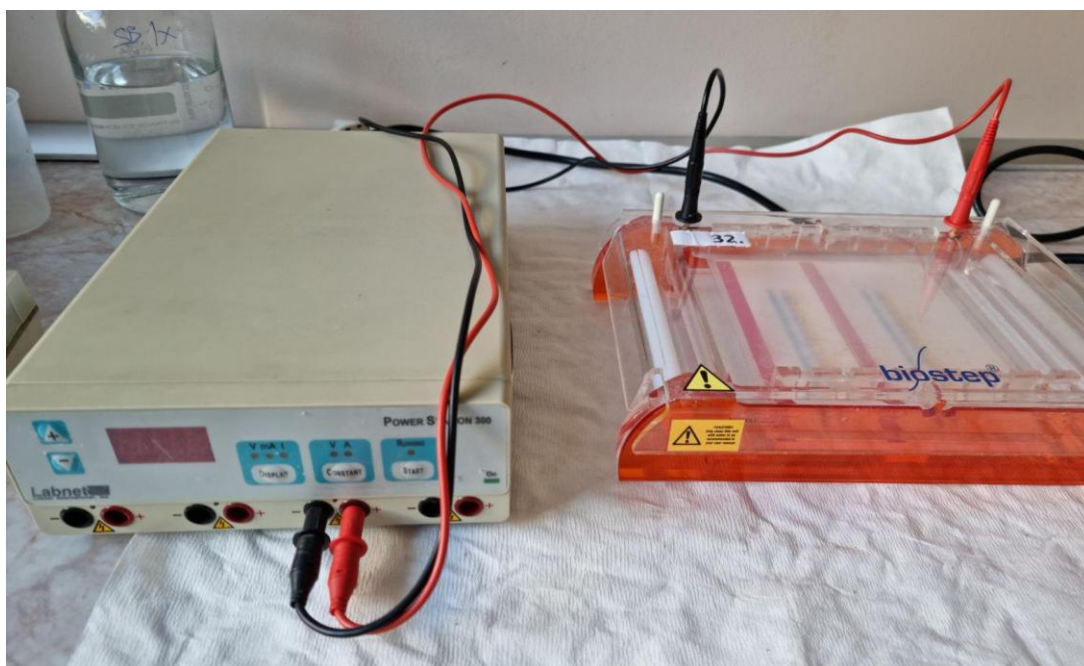


Слика бр. 3: Уређај Agilent SureCycler 8800 са покренутим условима PCR реакције (Фото: ориг)

4.2.2. Визуелизација продуката PCR реакције

Продукти PCR реакције су раздвојени методом хоризонталне електрофорезе, у 1,5 % агарозном гелу и 1% SB пуферу. Агарозни гел је припремљен растварањем 1,5 g агарозе у 100 ml SB пуфера загревањем до температуре кључања у микроталасној пећници. Након хлађења, садржају је додато 1,5 μL раствора етидијум бромид, те је разливен у калуп за хоризонталну електрофорезу у који су претходно постављени сепаратори и чешљеви. После хлађења и полимеризације гела чешљеви су уклоњени, а калуп уроњен у кадицу за хоризонталну електрофорезу са 1% SB пуфером.

Узорци су припремљени тако што је на парафилму помешано 5 μ l продуката PCR реакције са 2 μ l боје (Blue Loading Buffer - бромфенол плаво и ксилен цијанол, Thermo Scientific) и одмах уношени у бунариће по одговарајућем распореду. При електрофорези коришћен је маркер GeneRuler DNA Ladder (550 базних парова) произвођача Thermo Scientific, ради одређивања величине продуката поређењем са познатом величином ДНК фрагмената маркера. Електрофореза је изведена при константној струји од 65 V, у трајању од 150 минута помоћу уређаја Power station 300 (Labnet International, Inc.) (Слика бр. 4).



Слика бр. 4: Раздвајање продуката PCR реакције методом хоризонталне електрофорезе и уређај Power station 300 (Labnet International, Inc.) (Фото: ориг)

Визуелизација умножених фрагмената PCR реакције је извршена након електрофоретског раздвајања у мрачној комори под УВ светлошћу на УВ-трансилуминатору. Посматрањем гела одређена је дужина умноженог фрагмента. Присуство ДНК фрагмента очекиване величине 550 базних парова сматрано је позитивном реакцијом. Фотографисањем агарозног гела су добијени резултати документовани.

4.2.3. Секвенционирање ДНК фрагмената

Секвенционирање добијених PCR продуката је услужно извршено у компанији „Macroген Еуроге BV“, Амстердам, Холандија. Након извршене услуге, компанија Макроген је испоручила секвенце у електронском облику које се анализирају путем софтвера, а потом је извршена анализа и поређење секвенце са секвенцама доступним у NCBI бази података применом BLASTn алгорита (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

4.3. ИНОКУЛАЦИЈА СЕМЕНА ПШЕНИЦЕ

За потребе одређивања потенцијала за продукцију микотоксина, изолати *Alternaria* spp. су узгајани на семену пшенице (Слика бр. 5) пратећи модификовани протокол Garber и сар. (2012) на следећи начин:

1. 50 g семена супстрата које ће служити као носач за гљиву се поставља у тегле. Поклопац мора пропуштати ваздух, али не сме испуштати споре напоље. На поклопцу од тегле се направи мала рупа и затвори се ватом.
2. Влага семена се подеси на 25%. Наиме, за инокулацију је оптимално 18-20% док се око 5% изгуби током аутоклавирања. Поступак за постизање оптималне влажности семена је:
 - а. Као почетну влажност узети % влаге у зрну који је присутан приликом жетве па још мало мањи за губитак влаге током стајања. На дату количину семена се прерачуна количина воде коју је потребно додати да би влажност семена износила 25%.

Прерачун: $50 \text{ g семена} \times 0,10 \text{ (10\% влаге)} = 5 \text{ g воде имамо}$

$50 \text{ g семена} \times 0,25 \text{ (до 25\% воде)} = 12,5 \text{ g воде нам треба.}$

Разлику ове две вредности додајемо ($\text{g} = \text{ml}$)

3. Додату воду је потребно да упије семе и то се постиже тако што се неколико сати семе протреса веома често. Влага треба да буде равномерно заступљена у сваком семену.

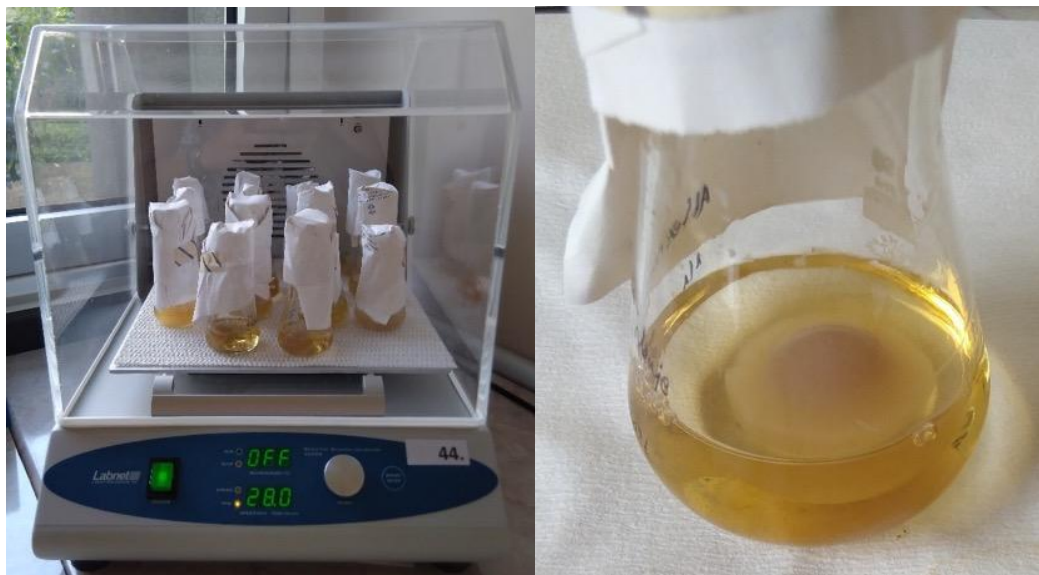
4. Аутоклавира се семе.
5. Након хлађења се инокулише фрагментима гљиве.
6. Инкубира се 5-7 дана на 30°C.



Слика бр. 5: Инокулисано семе пшенице (Фото: ориг.)

4.4. ИНОКУЛАЦИЈА ХРАНЉИВЕ ПОДЛОГЕ

Поред семена пшенице, изолати су за потребе утврђивања потенцијала за продукцију микотоксина узгајани и у течној хранљивој PDB подлози (PDB – Potato Dextrose Broth). PDB подлога се припрема од 200 g кромпира 20 g декстрозе у укупној запремини од 1000 ml дестиловане воде. Подлога се затим разлије у колбе које се затворе ватеним чепом и папиром, након чега се аутоклавира. Када се охлади, подлога се инокулише фрагментима гљиве и инкубира 3-4 дана на собној температури на орбиталном шејкеру ИКА KS4000ic (Слика бр. 6).



Слика бр. 6: Инокулисана ПДБ подлога на орбиталном шејкеру ИКА KS4000iс (Фото: ориг.)

4.5. ЕКСТРАКЦИЈА И ОДРЕЂИВАЊЕ МИКОТОКСИНА

Екстракција микотоскина: алтернариол (АОН), алтернариол монометил етар (АМЕ) и тентоксин (TEN) из инокулисаног семена пшенице, као и из инокулисане течне PDB подлоге је урађена применом QuEChERS технике.

За потребе екстракције одмерено је 5 g инокулисаног семена пшенице који се пре екстракције хомогенизује (самеље). Узорак из подлоге се припрема тако што се одмери 5 g развијене мицелије, а додатно је екстракција урађена из 5 ml течног дела подлоге у којој се развијала гљива, али који није садржао мицелију.

QuEChERS техника се изводи тако што у 5g или 5ml једног од наведених узорака додаје 5 ml воде и 10 ml MeCN (1% F.A.) и затим се мућка 1 минут на вортексу.. Потом се у смешу додају соли (1 g натријум хлорида (NaCl) и 4 g магнезијум сулфата (MgSO₄)). Након мућкања од 2 минута, узорци се стављају у центрифугу на 4000 обртаја/минути током 5 минута. Укупно 6 ml аликуота се пипетира у киветуу којој се налазе MgSO₄, PSA и C18. Поново се мућка и центрифугира 5 минута на 4000 обртаја/минути. Добијени екстракт се профилира преко најлонског филтра од 45 µm у вијале и анализира на LC-MS/MS.

За одређивање садржаја алтернариола, алтернариол монометил етра и тентоксина коришћена је валидована метода течне хроматографије са тандем масеном спектрофотометријом (LC-MS/MS) у складу са документом SANTE/12682/2019.

4.6 СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА

Резултати ће бити обрађени путем двофакторијалне АНОВА, а значајност између парова Фишеровим НЗР тестом на нивоу значајности од 5%. Сви резултати ће бити приказани табеларно и/или графички.

5. РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА СА ДИСКУСИЈОМ

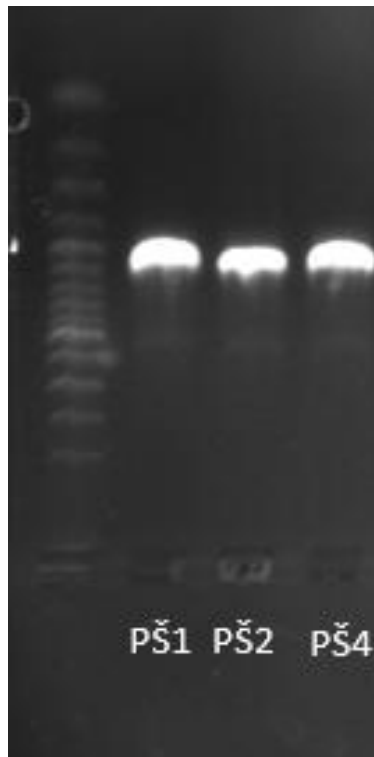
4.3. ИДЕНТИФИКАЦИЈА ИЗОЛАТА *Alternaria spp.*

За потребе овог истраживања је прикупљено укупно 3 изолата са 3 различите парцеле са локалитета Чуруг, Србија под шифрама PŠ1, PŠ2 и PŠ4. Семе са којег су изоловане културе гљиве било је без симптома црне пегавости. Сва три изолата су на РСА подлози формирали колонију, мицелију и конидије типичне за врсту *Alternaria tenuissima* (Слика бр. 7). Образована колонија је у првих неколико дана пораста била беличасто сиве боје са јасно израженим централним делом колоније који је концентрично зониран светло и тамно зеленом бојом. Мицелија је веома брзо расла на 25 °C и већ након 4-5 дана је у потпуности испунила Петри кутију (пречника 90 mm), док је боја мицелије попримила тамно сиво-зелену боју. До спорулације сва 3 изолата је дошло након 7 дана и микроскопским прегледом су уочене конидије у виду дугих неразгранатих ланаца. Конидије су полиморфне када је у питању величина и број септи, овалног до цилиндричног облика, маслинасто до тамно браон боје. Дршке конидија су такође полиморфне, кратке или дуге, по боји исте или светлије од саме конидије.



Слика бр. 7: Полиморфне конидије *Alternaria tenuissima* (Фото: ориг)

Након извођења PCR реакције са ITS1/ITS4 паром прајмера и електрофоретског раздвајања, на агарозном гелу визуелизацијом су уочени фрагменти величине 550 bp (Слика бр 8).



Слика бр. 8: Визуелизација умножених фрагмената ДНК

Анализом и поређењем секвенци са секвенцама доступним у NCBI бази применом BLASTn алгоритма, изолати су идентификовани као *Alternaria tenuissima* показујући 100% поклапање са секвенцом изолата ове врсте која је под шифром OK067695 депонована у NCBI бази секвенци (ncbi.nlm.nih.gov) (Yang и сар., непубликовани подаци). У Табели 2 су приказане секвенце изолата PŠ1, PŠ2 и PŠ4, њихова дужина и % хомологије са секвенцом исте врсте депонованој у NCBI бази.

Табела бр. 2: Дужина добијене секвенце испитиваних изолата (forward ITS1)

Шифра изолата	Добијена секвенца	Дужина секвенционираних дела ДНК	% хомологије са изолатом OK067695 <i>A. tenuissima</i> из ncbi.nlm.nih.gov
PŠ1	ATTATTACCCCTTGTCTTTTGCCTACTTCTTG TTTCCTTGGTGGGTTCGCCCACCACTAGGAC AAACATAAACCTTTTGTAAATTGCAATCAGC GTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTTC AACAAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGAT GAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGT GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAA TCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATT CCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTT GTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTTGGGCGT CTTGTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTT AAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTC GGAGCGCAGCACAAGTCGCACTCTCTATCA GCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGCCTTTTTT TCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGAT ACCCGCTGAACTTAAGCATATC	478	100%
PŠ2	TCTTTTGCCTACTTCTTGTTTCCTTGGTGGGT TCGCCCACCACTAGACAAACATAAACCTTT TGTAATTGCAATCAGCGTCAGTAACAAATT AATAATTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTT GGTCTTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA ATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAAATTCA GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTG CGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGT TCGAGCGTCATTTGTACCCAAGCTTTGCTTG GTGTTGGGCGTCTTGTCTCTAGCTTTGCTGG AGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGC CTACTGGTTTCGGAGCGCAGCACAAGTCGC ACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATT AAGCCTTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATC AGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATA T	463	100%

PŠ4	GCCTTGCTGAATTATTCACCCCTGTCTTTTG CGTACTTCTTGTTTCTTGGTGGGTTGCCCCA CCACTAGGACAAACATAAACCTTTTGTAAT TGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAAT TACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCT GGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCG ATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGA ATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCC TTTGGTATTCCAAAGGGCATGCTGTTGAGC GTCATTTGTACCCCTCAAGCTTTGCTTGGTGT TGGGCGTCTTGTCTCTAGCTTTGCTGGAGAC TCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTAC TGGTTTCGGAGCGCAGCACAAAGTCGCACTC TCATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGC CTTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGT AGGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATC	488	100%
------------	---	-----	------

4.4. ОДРЕЂИВАЊЕ САДРЖАЈА МИКОТОКСИНА

Валидована LC-MS/MS метода је примењена у квантитативном одређивању алтернариола, алтернариол монометил етра и тентоксина из узорача пшенице вештачки инокулисаних испитиваним изолатима, као и из мицелије и течне фазе PDB подлоге.

Резултати обраде података садржаја алтернариола (АОН), алтернариол монометил етра (АМЕ) и тентоксина (ТЕН) путем двофакторијалне ANOVA су приказани у Табелама 3-5.

Табела бр. 3: Двофакторијална анализа варијансе концентрације алтернариола (АОН) у испитиваним узорцима

Утицај ефеката	SS	Степени слободе	MS	F вредност	p вредност
супстрат	1416,066	2	708,0331	61704441	0,00
изолат	1218,698	2	609,3490	53104207	0,00
супстрат+изолат	2394,110	4	598,5275	52161123	0,00

Табела бр. 4: Двофакторијална анализа варијансе концентрације алтернариол монометил етра (АМЕ) у испитиваним узорцима

Утицај ефеката	SS	Степени слободе	MS	F вредност	p вредност
супстрат	245,4449	2	122,7224	10582320	0,00
изолат	250,9075	2	125,4537	10817838	0,00
супстрат+изолат	485,1130	4	121,2782	10457786	0,00

Табела бр. 5: Двофакторијална анализа варијансе концентрације тентоксина (TEN) у испитиваним узорцима

Утицај ефеката	SS	Степени слободе	MS	F вредност	p вредност
супстрат	0,003318	2	0,001659	148,7959	0,000000
изолат	0,000461	2	0,000230	20,6645	0,000022
супстрат+изолат	0,000922	4	0,000230	20,6645	0,000002

С обзиром да су „p“ вредности у табелама 3-5 мање од 0,05, утицај врсте супстрата и изолата на садржај свих испитиваних микотоскина је значајан.

Вредности садржаја микотоксина алтернариол (АОН), алтернариол монометил етар (АМЕ) и тентоксин (TEN) који су добијени путем LC-MS/MS анализе за микотоксине алтернариол (АОН), алтернариол монометил етар (АМЕ) и тентоксин (TEN) анализе су приказани у Табели бр. 6. Када је у питању алтернариол, изолат са највећим потенцијалом продукције био је PŠ2 са инокулисаног семена пшенице, као и директно из мицелије. Код овог изолата је регистрована значајно највиша концентрација алтернариола у односу на све остале изолате и супstrate приликом одређивања садржаја из мицелије из PDB течне хранљиве подлоге. Слично овим резултатима, алтернариол монометил етар је у највишој концентрацији детектован код изолата PŠ2 из мицелије из PDB. Тентоксин је детектован једино у узорцима вештачки инокулисаног семена пшенице. Иако је тенденција код тентоксина показала да је инокулисано семе пшенице најпогоднији супстрат, што је у складу са животним циклусом патогена из рода *Alternaria* који се одржавају на семену, као и судбином микотоскина, код осталих микотоксина се као најбољи супстрат показала мицелија из PDB хранљиве подлоге.

Табела бр. 6: Концентрација микотоксина у различитим супстратима (mg/kg)

Супстрат	Изо лат	Алтернариол (АОН)	Ранг	Алтернариол монометил етар (АМЕ)	Ранг	Тентоксин (TEN)	Ранг
Семе пшенице	PŠ1	0,05071	b	0,01726	a	0,013612	b
Семе пшенице	PŠ2	0,34339	f	0,06160	c	0,015945	b
Семе пшенице	PŠ4	0,08652	d	0,01560	a	0,040991	c
Мицелија из PDB	PŠ1	2,48394	g	0,10257	d	0,000000	a
Мицелија из PDB	PŠ2	43,82167	h	19,24333	f	0,000000	a
Мицелија из PDB	PŠ4	0,24653	a	0,01886	a	0,000000	a
Течна фаза PDB	PŠ1	0,24602	a	0,04215	b	0,000000	a
Течна фаза PDB	PŠ2	0,13247	e	0,20159	e	0,000000	a
Течна фаза PDB	PŠ4	0,06928	c	0,01702	a	0,000000	a

Врста *Alternaria tenuissima*, као и *A. alternata* су најчешће врсте у микопопулацији семена пшенице из наведеног рода. Поред тога што се често могу изоловати са семена пшенице без видљивих симптома обољења, у већем броју литературних података је описана као проузроковач црне пегавости семена пшенице, али и осталих надземних делова (da Cruz Cabral и сар., 2016). Роду *Alternaria* припадају врсте које могу паразитирати гајене биљке и проузроковати обољења усева у пољу, али им такође могу нашкодити сапрофитном разградњом, и као такве најчешће прозрокују штете током периода складиштења, односно након жетве.

A. alternata синтетише бројне секундарне метаболите. Осим што изазивају производне и економске губитке могли би довести до озбиљног ризика по исхрану људи и животиња, због њихових токсичних ефеката (EFSA, 2011, Arcella и сар., 2016). АОХ је описан као фактор вируленције и колонизације током инфекције јабуке, цитруса и парадајза гљивама из рода *Alternaria* (Wenderoth и сар., 2019). Стога је откривање присуства токсина *Alternaria* у пшеници и прецизна идентификација врста које их производе важан корак за бољу процену токсигеног ризика повезаног са зараженим зрном.

Различити супстрати доводе до варијабилности у производњи микотоксина. Уочена је већа просечна концентрација АОХ (84 mg/kg) у пшеници него у пиринчу (76 mg/kg).

Већина врста *Alternaria* је способна да инфицира пшеницу у пољу и прерађевине од пшенице и да производе низ микотоксина, при чему су АОХ, АМЕ и TEN најчешћи и

најопаснији метаболити (Amatulli и сар., 2013). Потрошња пшенице коју је напала *Alternaria* не значи нужно присуство микотоксина у зрну, али указује на потенцијални ризик од контаминације. Микотоксини *Alternaria* још увијек нису добили исту пажњу као микотоксини које производе други родови гљива иако су повезани с многим болестима код људи, животиња и биљака (Logrieco и сар., 2009).

5. ЗАКЉУЧАК

На три испитана узорка семена пшенице са подручја наше земље, латентно су присутне врсте из рода *Alternaria*. Узорци семена са којег су прикупљени изолати нису имали симптоме црне пегавости.

Укупно три прихваћена изолат (PŠ1, PŠ2 и PŠ4) су на основу морфолошких и генетских карактеристика идентификована су као врста *Alternaria tenuissima*.

Код сва три испитивана изолат утврђено је присуство алтернариола у мицелији, течној подлози и на вештачки инокулисаном семену пшенице. Концентрација алтернариола је значајно варирала у односу на изолат, као и на супстрат. Највиша концентрација је детектована директно из мицелије код изолат PŠ2, а најнижа из семена пшенице инокулисаног изолатом PŠ1.

Код сва три изолат детектовано је присуство алтернариол монометил етра и то у највишој концентрацији у мицелији изолат PŠ2, а најнижа из семена пшенице инокулисаног изолатом PŠ4.

Тентоксин је детектован једино у узорцима вештачки инокулисаног семена пшенице. Изолат са највишим потенцијалом за продукцију тентоксина је PŠ4.

Потенцијал изолат са асимптоматског семена пшенице да продукују алтернариол, алтернариол монометил етар и тентоксин и њихова доказана токсичност код људи и животиња, указује на потребу увођења редовног мониторинга семена пшенице, али и других супстрата који могу бити контаминирани гљивама из рода *Alternaria* у циљу добијања здравствено безбедних сировина и њихових производа.

6. ЛИТЕРАТУРА

- Akamatsu, H., Taga, M., Kodama, M., Johnson, R., Otani, H. and Kohmoto, K. (1999) Molecular karyotypes for *Alternaria* plant pathogens known to produce host-specific toxins. *Curr. Genet.* 35, 647–656.
- Amatulli, M.T.; Fanelli, F.; Moretti, A.; Mulè, G.; Logrieco, A.F. *Alternaria* species and mycotoxins associated to black point of cereals. *Mycotoxins* 2013, 63, 39-46.
- Arcella, D.; Eskola, M.; Gómez Ruiz, J.A. Scientific report on the dietary exposure assessment to *Alternaria* toxins in the European population. *EFSA J.* 2016, 14. DOI: 10.2903/j.efsa.2016.4654
- Balaž, F. (2010). *Alternaria* spp. značajan patogen semena pšenice i mogućnosti hemijske zaštite, X Savetovanje o zaštiti bilja, Zlatibor, Book of abstracts, 88-89.
- Ballio, A. (1991) Non-host-selective fungal phytotoxins—biochemical aspects of their mode of action. *Experientia*, 47, 783–790.
- Barkai-Golan, R., Nachman, P. (2008). *Alternaria* mycotoxins. In *Mycotoxins in fruits and vegetables*, Eds. Barkai-Golan, R. & Nachman, P. Academic Press, San Diego, CA, USA, 185- 203.
- Basım, H., Basım, E., Baki, D., Abdulai, M., Öztürk, N., Balkic, R. (2018): Identification and characterization of *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler causing *Ceratonia* Blight disease of carob (*Ceratonia siliqua* L.) in Turkey. *Eur J Plant Pathol* 151, 73–86.
- Battilani, P., Costa, L.G., Dossena, A., Gullino, M.L., Marchelli, R., Galaverna, G., Pietri, A., Dall'Asta, C., Giorni, P., Spadaro, D., Gualla, A. (2009). Scientific information on mycotoxins and natural plant toxicants, Scientific/Technical report submitted to EFSA, 8214 (10)

- Bhaat, R. V., Rai, R.V., Karim, A.A. (2010). Mycotoxins in Food and Feed: Present Status and Future Concerns, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9, 57-81.
- Bodroža-Solarov, M., Brkljača, J., Vučković, J., Balaž, F. (2012). Changes in technological quality of winter wheat with different intensity of *Fusarium* spp. and *Alternaria* spp. contamination. In *Proceedings of 15th International Feed Technology Symposium „FEED-TOFOOD/COST FEED FOR HEALTH joint Workshop*, Novi Sad, Serbia, 366-370.
- Brzonkalik, K., Hümmer, D., Syltatk, C., Neumann, A.: Influence of pH and carbon to nitrogen ratio on mycotoxin production by *Alternaria alternata* in submerged cultivation. *AMB Express*, 20, 2-28 (2012)
- Corden, J., Millington, W., Mullins, J. (2003). Long-term trends and regional variation in the aeroallergen *Alternaria* in Cardiff and Derby UK – are differences in climate and cereal production having an effect?, *Aerobiologia* 19, 191–195.
- da Cruz Cabral, L., Terminiello, L., Fernández Pinto, V., Fog Nielsen, K., Patriarca, A. (2016): Natural occurrence of mycotoxins and toxigenic capacity of *Alternaria* strains from mouldy peppers. *International Journal of Food Microbiology* 236: 155–160.
- EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain. (2011). Scientific opinion on the risks for animal and public health related to the presence of *Alternaria* toxins in feed and food. *EFSA J*, 9, 2407
- FAO, 2019. FAOSTAT, Crops and livestock products. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL> (Датум приступа страници: 10. септембар, 2021).
- FAO, 2019. FAOSTAT, Crops and livestock products. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize> (Датум приступа страници 10. септембар 2021).
- Fernández-Cruz, M.L., Mansilla, M.L, Tadeo, J.L. (2010). Mycotoxins in fruits and their processed products: Analysis, occurrence and health implications. *Journal of Advanced Research*, 1, 113–122.
- Food and Agriculture Organization. (2001). Manual on the application of the HACCP system in Mycotoxin prevention and control. *FAO Food and Nutrition Paper*, 73, 1-124.

- Garber, N, Ortega-Beltran, A., Barker, G.H.M., Probst, C., Callicott, K.A., Jaime, R., Mehl, H.L., Cotty, P.J. (2012): Brief Protocols for Research and Management of Aflatoxin-Producing Fungi. School of Plant Sciences, The University of Arizona, Tucson, USA.
- Grabarkiewicz-Szczęsna, J., Chelkowski, J., Zajkowski, P. (1989). Natural occurrence of *Alternaria* mycotoxins in the grain and chaff of cereals, *Mycotoxin Research*, 5 (2), 77-80.
- Groves, J.W. and Skolko, A.J. (1944) Notes on seed-borne fungi; II. *Alternaria*. *Can. J. Bot.* 22, 219–234.
- Havlova, P., Lancova, K., Vanova, M., Havel, J., Hajslova, J. (2006): The effect of fungicidal treatment on selected quality parameters of barley and malt, *Journal of Agricultural and food chemistry*, 54: 1353-1360.
- Hudec, K. (2007). Influence of harvest date and geographical location on kernel symptoms, fungal infestation and embryo viability of malting barley, *Journal of Food Microbiology*, 113, 125–132.
- Ivanović, M., Martić, M., Đurić, N., Dragović, G. (2001). The most common wheat disease in the conditions of Pančevački rit. In *Proceedings of research papers, Institut PKB Agroekonomika*, 7, 27-31.
- Kilic, M., Altintas, U., Yilmaz, M., Kendirli, G., Karakoc, B., Taskin, E., Ceter, T., Pinar, N.M. (2010). The effects of meteorological factors and *Alternaria* spore concentrations on children sensitised to *Alternaria*. *Allergologia et Immunopathologia*, 38(3), 122-128.
- Köppen, R., Koch, M., Siegel, D., Merkel, S., Maul, R., Nehls, I. (2010). Determination of mycotoxins in foods: current state of analytical methods and limitations. *Appl Microbiol Biotechnol*, 86, 1595-1612.
- Kosiak, B., Torp, M., Skjerve, E., Andersen, B. (2004). *Alternaria* and *Fusarium* in Norwegian grains of reduced quality—a matched pair sample study. *Int J Food Microbiol*, 93, 51– 62.
- Krulj, J., Bočarov–Stančić, A., Krstović, S., Jajić, I., Kojić, J., Vidaković, A., Bodroža–Solarov, M. (2016). Mycobiota on common wheat (*Triticum aestivum*) and

spelt (*Triticum aestivum* ssp. *spelta*) grains from the region of Vojvodina in 2015. Food and Feed Research, 43, (1), 1-8.

- Kusaba, M. and Tsuge, T. (1997) Mitochondrial DNA variation in hostspecific toxin-producing pathogens in the genus *Alternaria*. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 63, 463–469.
- Kwasna, H., Kosiak, B. (2003). *Lewia avenicola* sp. nov. and its *Alternaria* anamorph from oat grain, with a key to the species of *Lewia*. Mycological Research, 107 (3), 371–376.
- Logrieco, A., Bottalico, A., Mul'e, 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.
- Logrieco, A., Moretti, A., Solfrizzo, M. (2009). *Alternaria* toxins and plant diseases: an overview of origin, occurrence and risks. World Mycotoxin Journal, 2, 129-140
- Lou, J., Fu, L., Peng, Y., Zhou, L., 2013. Metabolites from *Alternaria* fungi and their bioactivities. Molecules 18, 5891–5935.
- Magan, N. and Lacey, J. Effect of temperature and pH on water relations of field and storage fungi. Transact British Mycol Soc, 82, 71-81 (1984).
- Magan, N., Olsen, M. (2004). Mycotoxins in food. Woodhead Publishing Ltd, Cambridge England and CRC Press LLC, USA.
- Mašková , Z., Tančinová, D., Barboráková, Z., Felšöciová, S., Císarová, M. (2012). Comparison of occurrence and toxigenity of *Alternaria* spp. isolated from samples of conventional and new crossbreed wheat of Slovak origin. Journal of Microbiology Biotechnology and Food Sciences, 1, 552-562.
- Mathur S. B., Kongsdal Olga (2003): Common Laboratory Seed Testing Methods for Detecting Fungi. International Seed Testing Association.
- Matic, J., Mandić, A., Mastilović, J., Mišan, A., Beljkaš, B., Milovanović, I. (2008). Contaminations of raw materials and food products with mycotoxins in Serbia. Food Processing, Quality and Safety, 35(2), 65-7.
- Medina, A., Valle-Algarra, F., Mateo, R, Gimeno-Adelantado, J., Mateo, F, Jiménez, F.(2006). Survey of the mycobiota of Spanish malting barley and evaluation of the mycotoxin producing potential of species of *Alternaria*, *Aspergillus* and *Fusarium*, International Journal of Food Microbiology, 108, 196–203.

- Nees von Esenbeck, C. G. (1816-1817). Das system der Pilze und Schwärme. Würzburg: Stahelsche Buchhandlung.
- Niessen, L. (2007). PCR-based diagnosis and quantification of mycotoxin producing fungi. International Journal of Food Microbiology, 119, 38-46.
- Nishimura, S. and Kohmoto, K. (1983) Host-specific toxins and chemical structures from *Alternaria* species. Annu. Rev. Phytopathol. 21, 87–116.
- Ostry, V. (2008). *Alternaria* mycotoxins: an overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs, World Mycotoxin Journal, 1(2), 175-188.
- Oviedo, M.S., Ramirez, M.L., Barros, G.G., Chulze, S.N. (2011). Influence of water activity and temperature on growth and mycotoxin production by *Alternaria alternata* on irradiated soya beans. Int J Food Microbiol, 149, 127-132.
- Patriarca, A., Azcarate, M.P., Terminiello, L., Fernández, V. (2007). Mycotoxin production by *Alternaria* strains isolated from Argentinean wheat. International Journal of Food Microbiology, 119, 219–222.
- Pavón, M. A., González, I., Pegels, N., Martín, R., García, T. (2010). PCR detection and identification of *Alternaria* species-groups in processed foods based on the genetic marker Alt a 1, Food Control, 21, 1745-1756.
- Plavšić, D., Sakač, M., Čabarkapa, I., Šarić, L., Psodarov, Đ. (2007). Microbiological safety of wheat flour. Žito-hleb, 34(5-6), 83-90.
- Plavšić, D.V., Psodarov, Đ.B., Kalenjuk, B.M., Tešanović, D.V., Šarić, L.Ć., Čabarkapa, I.S., Filipović, J.S. (2010). Comparison of microbiological safety of pasta and pasta related products depending on the conditions of production. Food and Feed Research, 37(2), 51-58.
- Pose, G., Patriarca, A., Kyanko, V., Pardo, A., Fernández Pinto, V.: Water activity and temperature effects on mycotoxin production by *Alternaria alternata* on a synthetic tomato medium. Int J FoodMicrobiol, 142, 348-353 (2010).
- Prange, A., Birzele, B., Johannes Krämer, Meier, A., Modrow, H., Köhler, P. (2005): Fusarium inoculated wheat: deoxynivalenol contents and baking quality in relation to infection time, Food Control 16, 739–745.

- Rotem J, 1994. The genus *Alternaria*: biology, epidemiology and pathogenicity. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN, 326 pp
- Saghai-Maroo, M.A., Soliman, K.M., Jorgensen, R.A. i Allard, R.W. (1984): Ribosomal DNA spacer-length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 8010-8018.
- Šarić, M., Škrinjar, M., Dimić, G., Filipović, N., Rasić, J. (1997). Changes in hygienic and technological wheat quality caused by mould infection, *Acta Alimentaria*, 26 (3), 255-269.
- Schmidt-Heydt, M., Rüfer, C., Raupp, F., Bruchmann, A., Perrone, G., Geisen, R.: Influence of light on food relevant fungi with emphasis on ochratoxin producing species. *Int J Food Microbiol*, 145, 229-37 (2011)
- Siegel, D., Feist, M., Proske, M., Koch, M., Nehls, I. (2010). Degradation of the *Alternaria* mycotoxins alternariol, alternariol monomethyl ether, and alternuene upon bread baking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 9622-9630.
- Simmons, E.G. (1992) *Alternaria* taxonomy: current status, viewpoint, challenge. In: *Alternaria Biology, Plant Diseases and Metabolites* (Chelkowski, J. and Visconti, A., eds), pp. 1–35. Amsterdam, Netherlands: Elsevier Science Publishers.
- Simons, E.G. (2007). *Alternaria*. An identification manual. Utrecht the Netherlands: CBS Biodiversity Series, 1-775
- Singha Irom Manoj, Yelena Kakoty, Bala Gopalan Unni, Jayshree Das, Mohan Chandra Kalita (2016): Identification and characterization of *Fusarium* spp. using ITS and RAPD causing *Fusarium* wilt of tomato isolated from Assam, North East India, *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, Volume 14, Issue 1, Pages 99-105, ISSN 1687-157X, <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2016.07.001>.
- Steele, J.A., Durbin, R.D., Uchytel, T.F. and Rich, D.H. (1978) Tentoxin—uncompetitive inhibitor of lettuce chloroplast coupling factor-1. *Biochim. Biophys. Act.* 501, 72–82.
- Suchowilska, E., Kandler, W., Sulyok, M., Wiwarta, M., Krska, R. (2010): Mycotoxin profiles in the grain of *Triticum monococcum*, *Triticum dicoccum* and

Triticum spelta after head infection with *Fusarium culmorum*, J Sci Food Agric, 90, 556–565.

- Tewari, J.P. (1983) Cellular alterations in the blackspot of rapeseed caused by *Alternaria brassicae*. *Phytopathology*, 73, 831.
- Thomma, B. (2003). *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathology*, 4 (4), 226-236.
- Toth, B., Csosz, M., Szabo-Hever, A. (2011). *Alternaria hungarica* sp. nov., a minor foliar pathogen of wheat in Hungary. *Mycologia*, 103, 94–100.
- Vučković, J., Bagi, F., Bodroža-Solarov, M., Stojšin, V., Budakov, D., Ugrenović, V., Aćimović, M. (2012). *Alternaria* spp. on spelt kernels (*Triticum aestivum* ssp. *spelta*). *Plant Doctor*, 1, 50-55.
- Wenderoth, M.; Garganese, F.; Schmidt-Heydt, M.; Soukup, S.T.; Ippolito, A.; Sanzani, S.M.; Fischer, R. Alternariol as virulence and colonization factor of *Alternaria alternata* during plant infection. *Mol Microbiol* **2019**, 112, 131–146. DOI:10.1111/mmi.14258
- White, T.J., Bruns, T., Kee, S., Taylor J.(1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In PCR protocols: a guide to methods and applications, Eds. M.A. Innis, D.H Gelfand, J.J. Snysky, T.J White, Academic Press, San Diego, CA, USA, 315-322.
- Републички завод за статистику Србије (2020): Статистички годишњак Републике Србије, 2020 <https://publikacije.stat.gov.rs/G2020/Pdf/G20202053.pdf> (Датум приступа страници: 10. септембар, 2021).

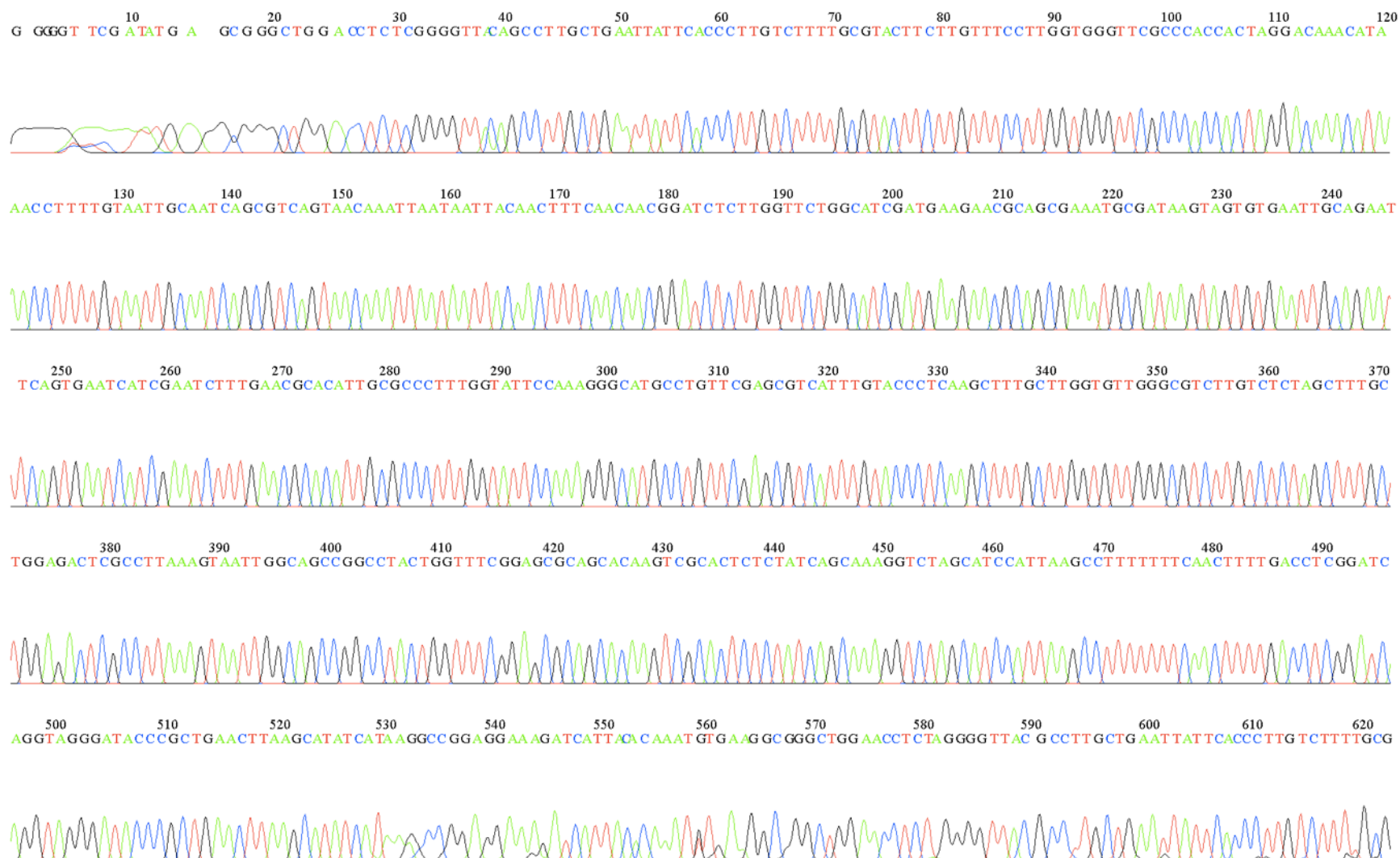
<http://www.hgca.com/>

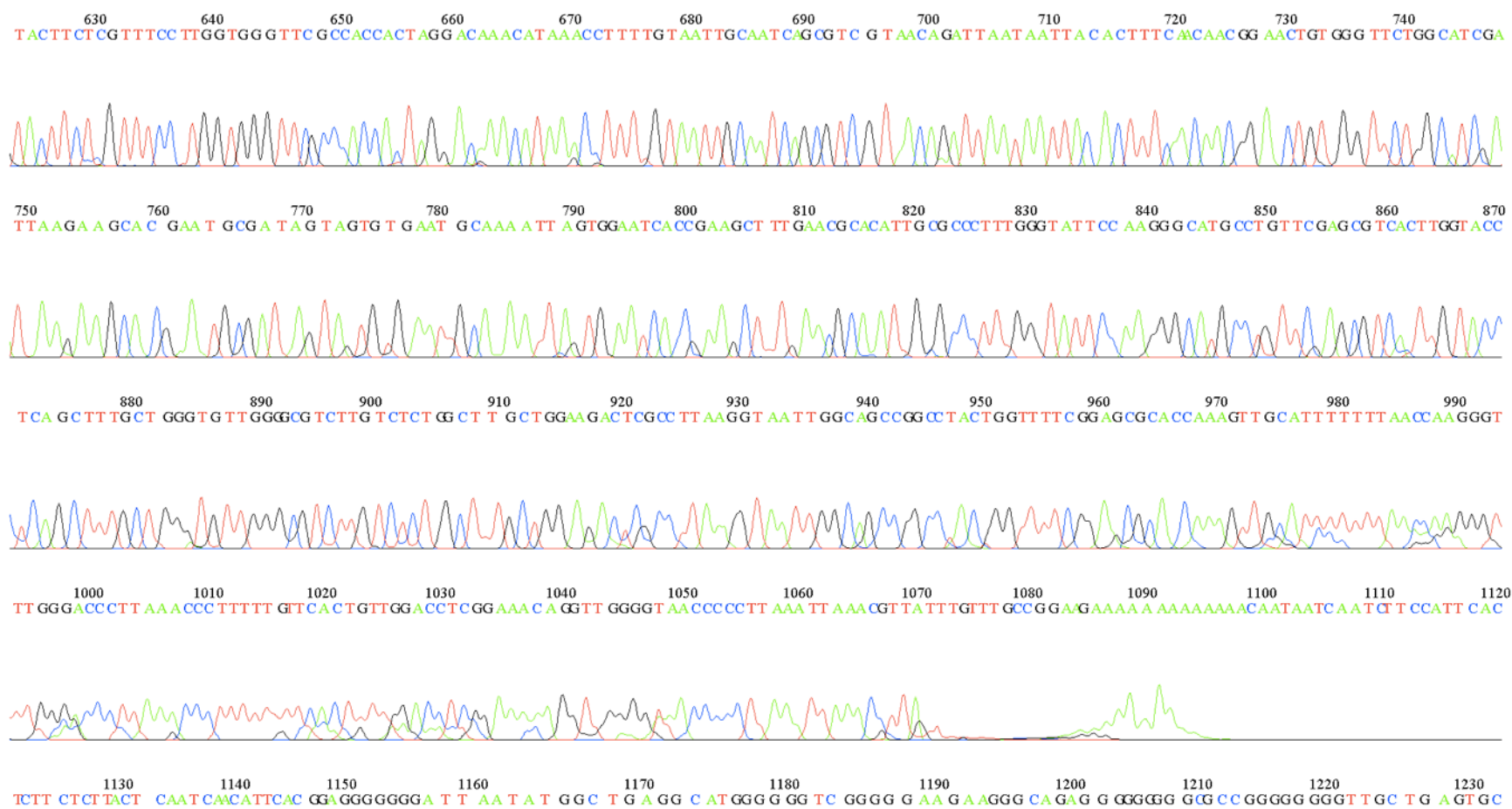
<http://www.agropedia.iitk.ac.in/content/black-point-disease-wheat/>

https://www.frontiersin.org/files/Articles/242185/fmicb-08-00071-HTML/image_m/fmicb-08-00071-g002.jpg

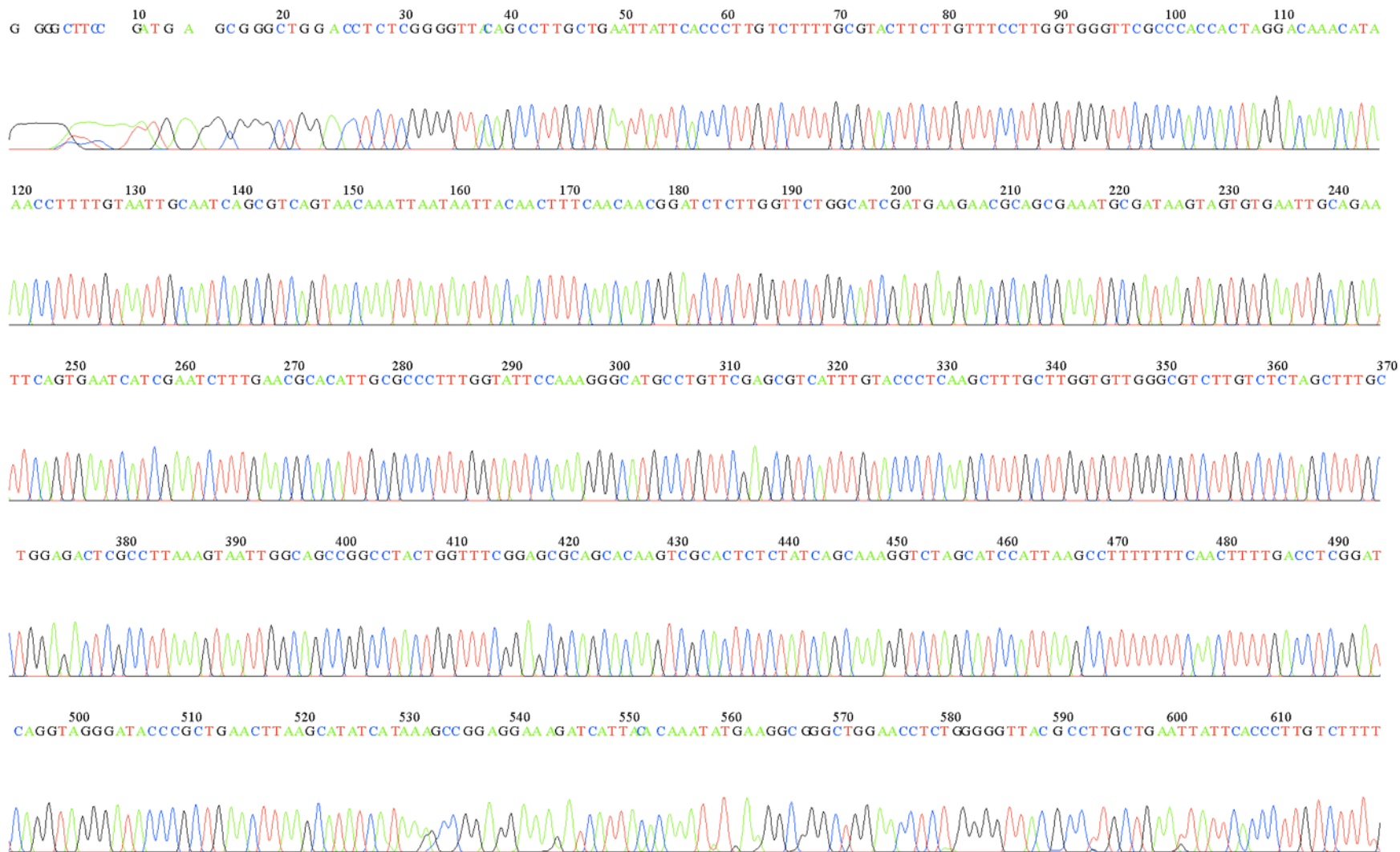
<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

ПРИЛОГ 1: ITS 1/ITS4 Секвенца изолата PŠ1





ПРИЛОГ 2: ITS 1/ITS4 Секвенца изолата PŠ2



ПРИЛОГ 3: ITS 1/ITS4 Секвенца изолата PŠ4

