

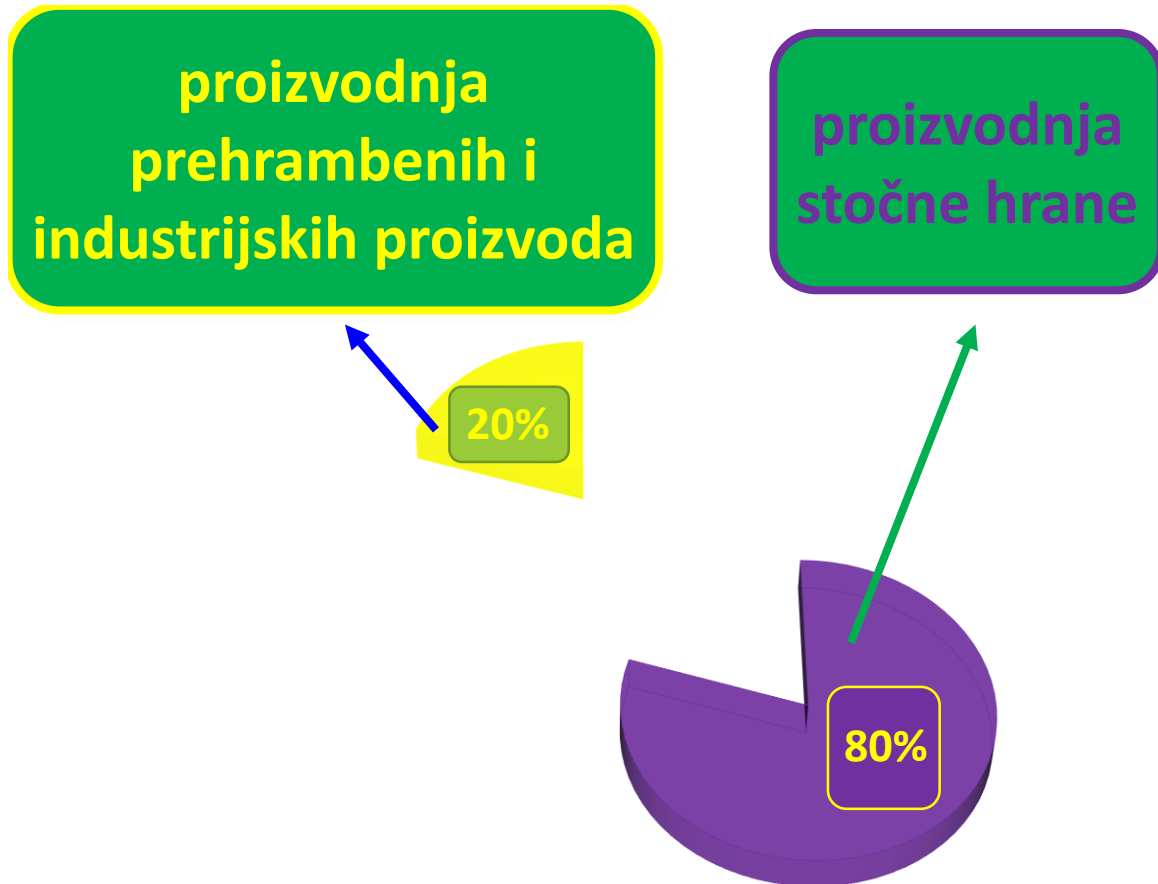
***Aspergillus parasiticus* Speare –
toksigena vrsta gljive na zrnu
kukuruzu u proizvodnim
uslovima Srbije**

Milica Nikolić, mast. inž.

Doktorska disertacija

PRIVREDNI ZNAČAJ KUKURUZA

RAZVIJENE ZEMLJE



NERAZVIJENE ZEMLJE I ZEMLJE U RAZVOJU

Ljudska ishrana

Stopa porasta od 1,3% do 2020. godine

Usev sa najvećom proizvodnjom do 2025.

Potreba za kukuruzom će se udvostručiti do 2050.

PRIVREDNI ZNAČAJ KUKURUZA U SRBIJI

- Po proizvodnji kukuruz zauzima prvo mesto



- Proizvodnja kukuruza zadovoljava domaće potrebe, a takođe predstavlja i strateški proizvod namenjen izvozu



- Primarni cilj: ostvarivanje stabilnog i visokog prinosa zrna velike hranljive vrednosti, koje je u isto vreme zdravstveno bezbedno i ekonomski isplativo



TRULEŽ KLIPA I ZRNA KUKURUZA

- NAJŠTETNIJE OBOLJENJE KUKURUZA
- U POVOLJNIM USLOVIMA SMANJUJE PRINOS I DO 50%
- POGORŠAVA KVALITET KUKURUZA
- OZBILJNI GUBICI U PROIZVODNJI

PROUZROKUJU JE MNOGE PATOGENE I TOKSIGENE
VRSTE GLJIVA



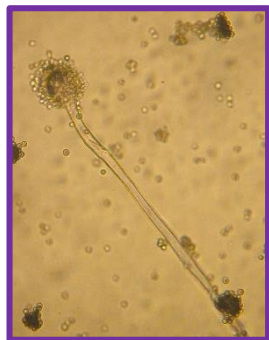
Vrste roda *Aspergillus*



Vrste roda *Fusarium*



Toksigene vrste gljiva

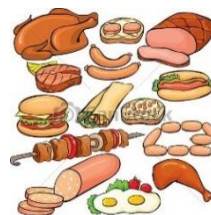
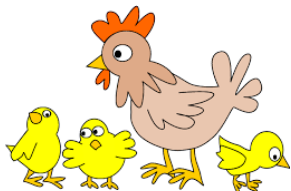
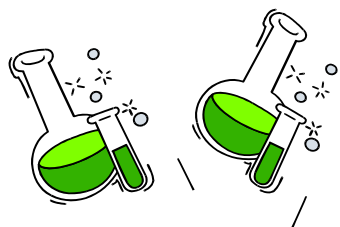


Mikoze



Pored direktnih gubitaka od infekcije zrna kukuruza, vrste *Aspergillus flavus* Link i *Aspergillus parasiticus* Speare stvaraju aflatoksine, štetne po zdravlje ljudi i životinja.

Mikotoksini



***ASPERGILLUS PARASITICUS* SPEARE** (Teleomorf: *Petromyces parasiticus*)

- Prouzrokovatelj aspergiliozne plesnivosti klipa i zrna kukuruza

- 1912. godine – vrsta *A. parasiticus* prvi put identifikovana na šećernoj trsci na Havajima
- 2009. godine – opisan teleomorfni stadijum → *Petromyces parasiticus*
- Vrsta *A. parasiticus* sintetiše aflatoksin G1, koji je direktno toksičan za čoveka.



AGROKLIMATSKI USLOVI ZA POJAVU I ŠIRENJE *ASPERGILLUS* VRSTA

KLIMATSKI FAKTORI

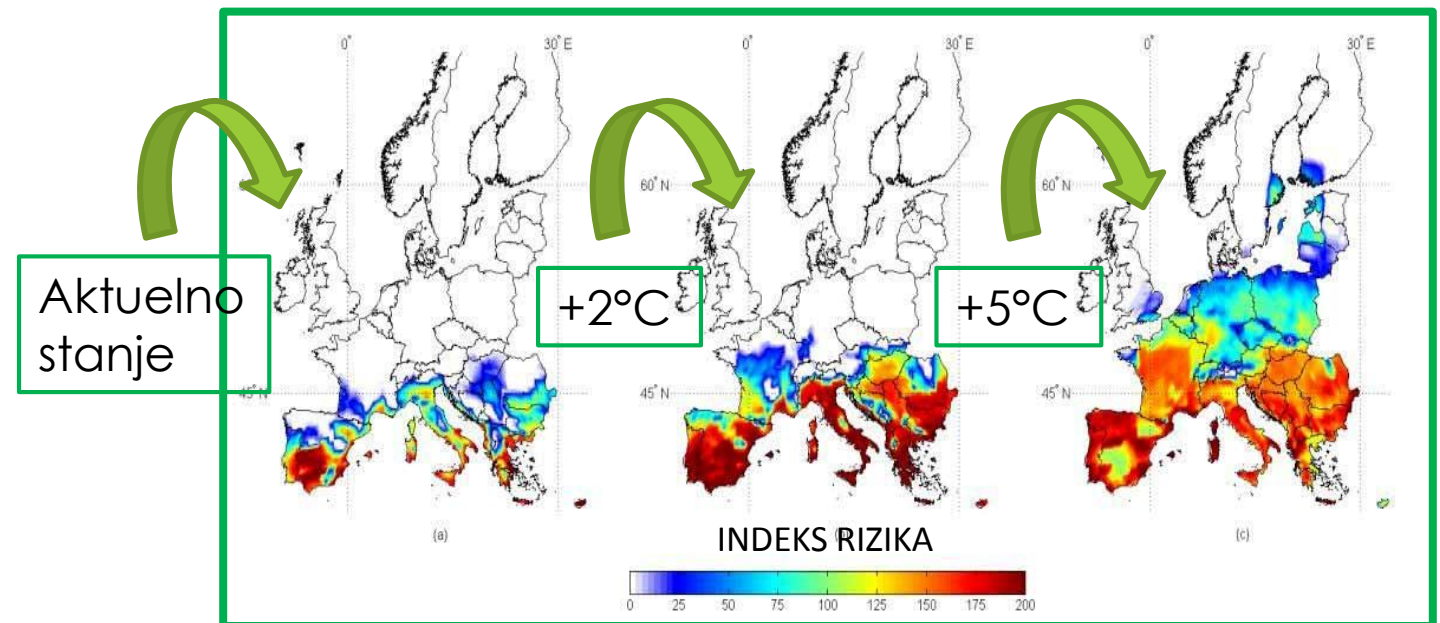
Tokom rasta kukuruza na njivi:

- VISOKE TEMPERATURE (naročito noćne)
- SUMA KLIMA ILI DUGI SUŠNI PERIODI

Nakon sazrevanja:

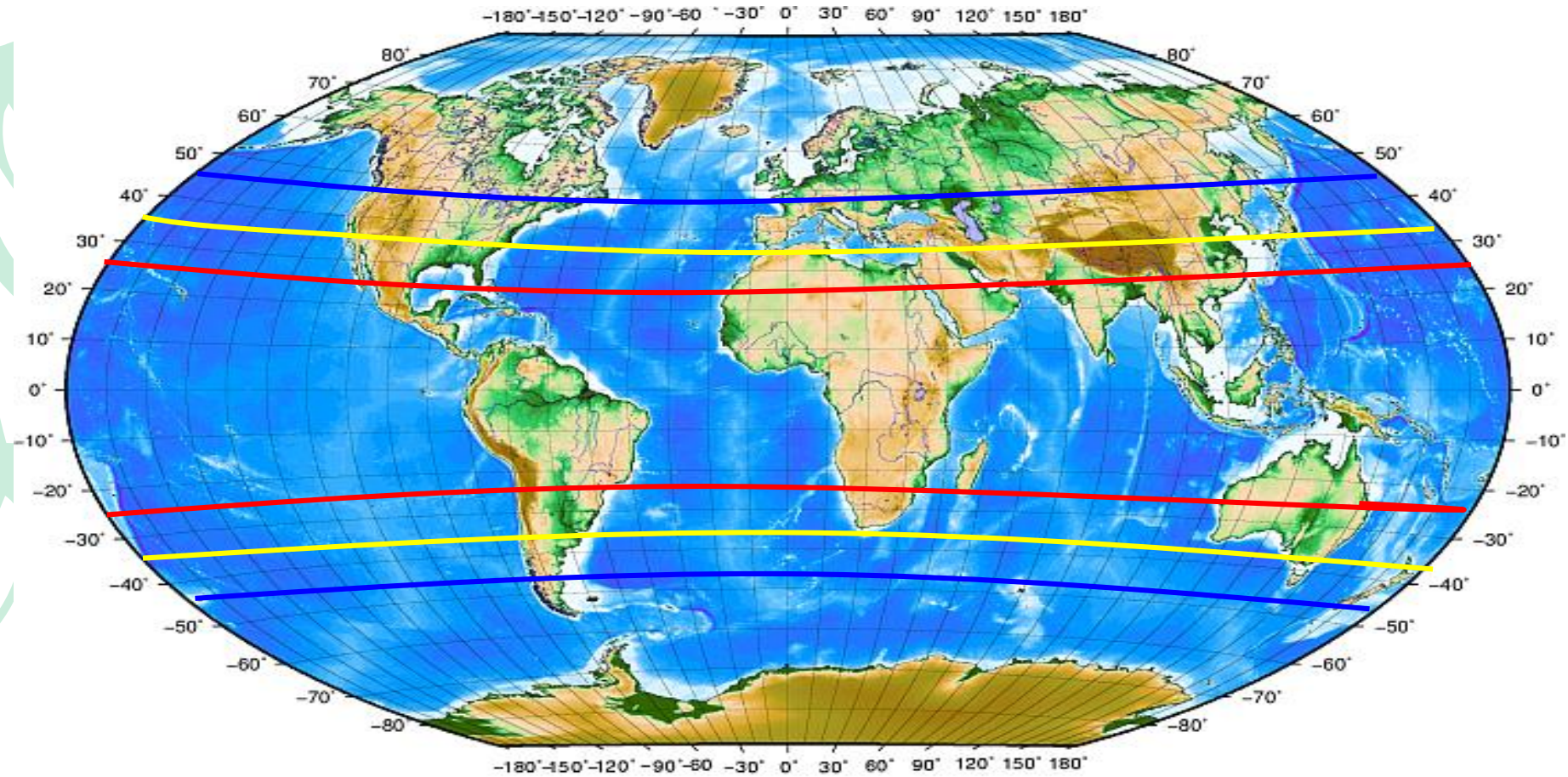
- VELIKA VLAGA I VISOKE TEMPERATURE (pre berbe ili u skladištu)

PROGNOZA!



GEOGRAFSKA DISTRIBUCIJA *ASPERGILLUS* VRSTA

KAO POSLEDICA GLOBALNOG ZAGREVANJA





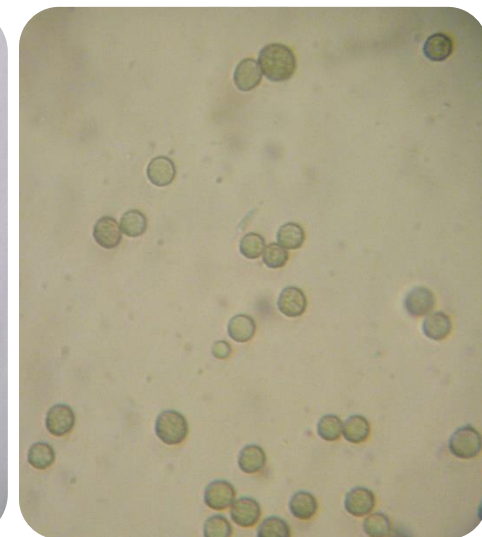
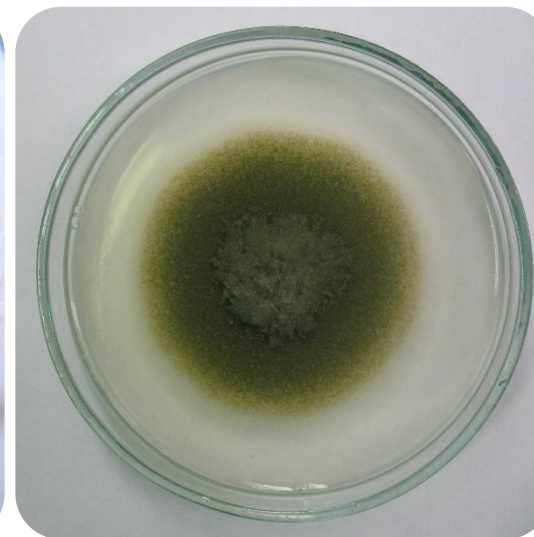
Vrste roda *Aspergillus* mogu se naći u namirnicama biljnog porekla – **žitarice** (kukuruz, pirinač, pšenica, proso), **uljarice** (kikiriki, suncokret, soja, seme pamuka), **orašasti plodovi** (badem, lešnik, orah), **sušeno voće** (urma, kajsija), **začini**.

Vrsta *A. parasiticus*

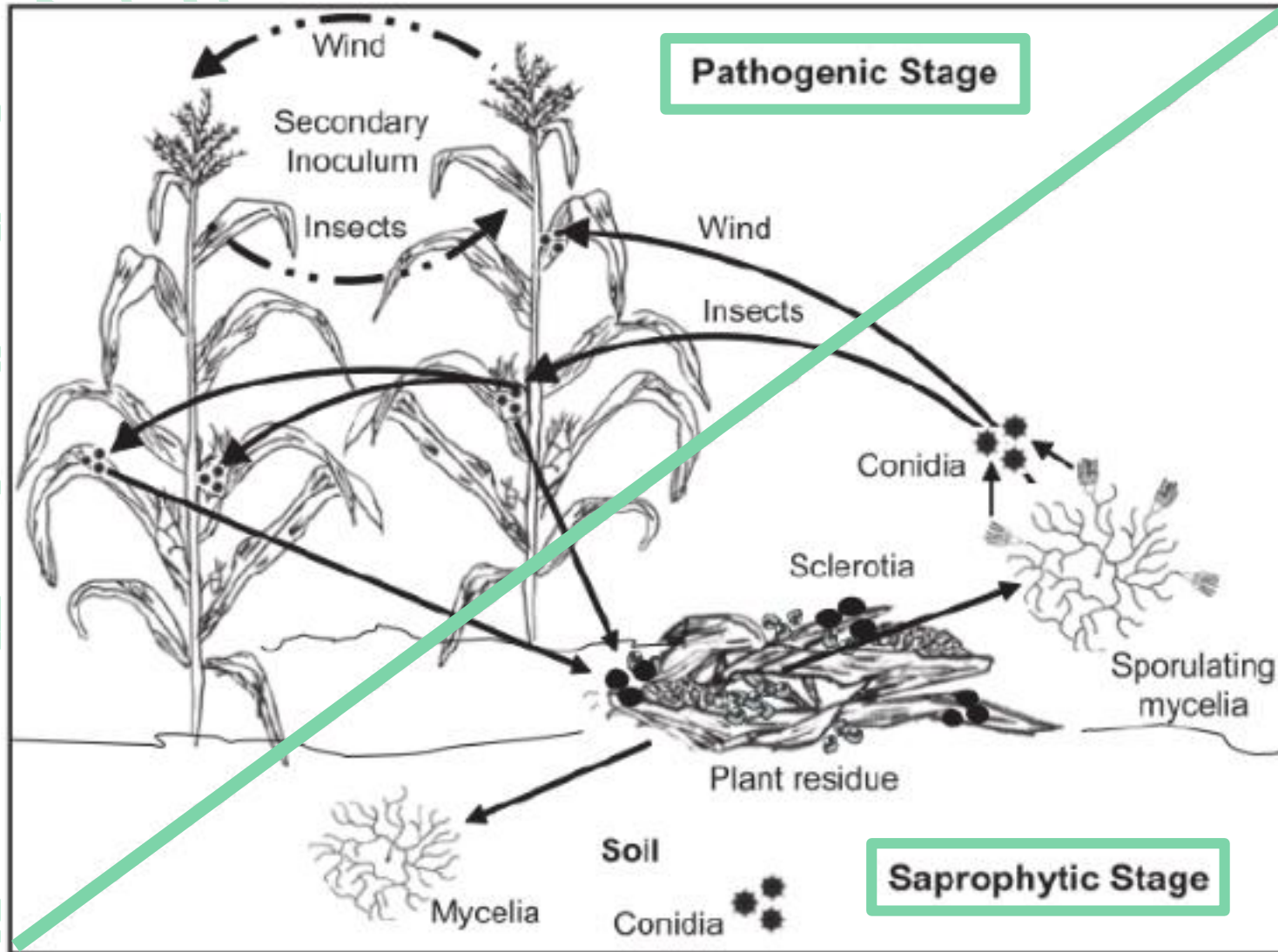
- najčešće je izolovana iz zemljišta na kojima se uzgaja kikiriki u SAD, Australiji, Argentini, Ugandi i Bocvani.
- manje zastupljena u žitnim poljima (u Srbiji prvi put identifikovana na zrnju pšenice 2017. godine).
- istraživanja u svetu ukazala su na prisustvo ove vrste u slabijem intenzitetu na kukuruzu.



- Prisustvo vrste *A. parasiticus* utvrđeno je, **po prvi put na zrnju kukuruza, 2015. godine u Srbiji**
- Klimatske promene se ogledaju u povećanju temperaturnog gradijenta, i u skladu s tim areal vrsta roda *Aspergillus* se sve više širi. Stoga se može očekivati intenzivna pojava ove vrste u našim agroekološkim uslovima.



CIKLUS RAZVOJA GLJIVE *A. PARASITICUS*



- Prezimljava u biljnim ostacima i u zemljištu u obliku sklerocija i delova micelije - **Saprofit**
- U povoljnim uslovima na sklerocijama se formiraju konidije i konidiofore, od juna do septembra
- Konidije se šire vazдушnim strujanjima ili insektima, i na taj način dospevaju na biljku

CILJEVI ISTRAŽIVANJA

U programu istraživanja ove doktorske disertacije postavljeni su sledeći ciljevi:

- Utvrđivanje rasprostranjenosti, biodiverziteta i značaja vrste *A. parasiticus* izolovane sa zrna kukuruza u Srbiji;
- Precizna i pouzdana identifikacija izolata, dobijenih iz uzoraka zrna kukuruza, do nivoa vrste primenom morfoloških i molekularnih metoda identifikacije;
- Utvrđivanje makroskopskih i mikroskopskih, kao i patogenih, i toksigenih karakteristika ove vrste;
- Ispitivanje toksigenog potencijala sinteze ukupnih aflatoksina i aflatoksina B1, B2, G1 i G2 izolata *A. parasiticus*.

PREGLED TERENA I UZORKOVANJE ASPERGILIOZNIH KLIPOVA



37 lokacija

2013-2016. godine



27 lokacija

Mapa lokacija uzorkovanja zrna kukuruza **u toku vegetacije**

Mapa lokacija uzorkovanja zrna kukuruza iz **skladišta**

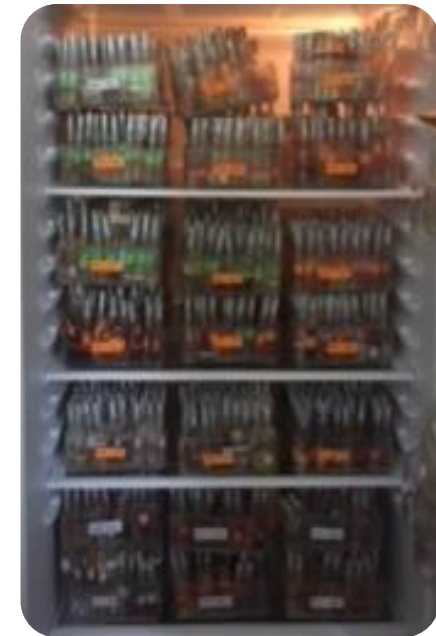
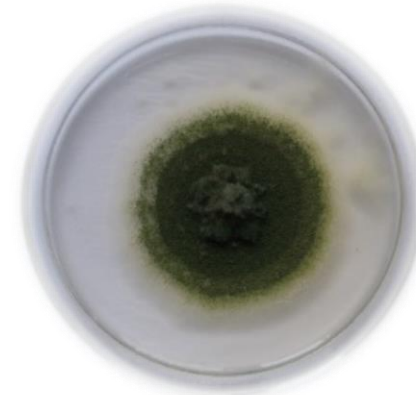
IZOLACIJA GLJIVA I IZDVAJANJE ČISTIH KULTURA

- Izolacija gljiva iz uzoraka
- Dobijanje monospornih izolata
- Kohovi postulati
- Čuvanje kultura

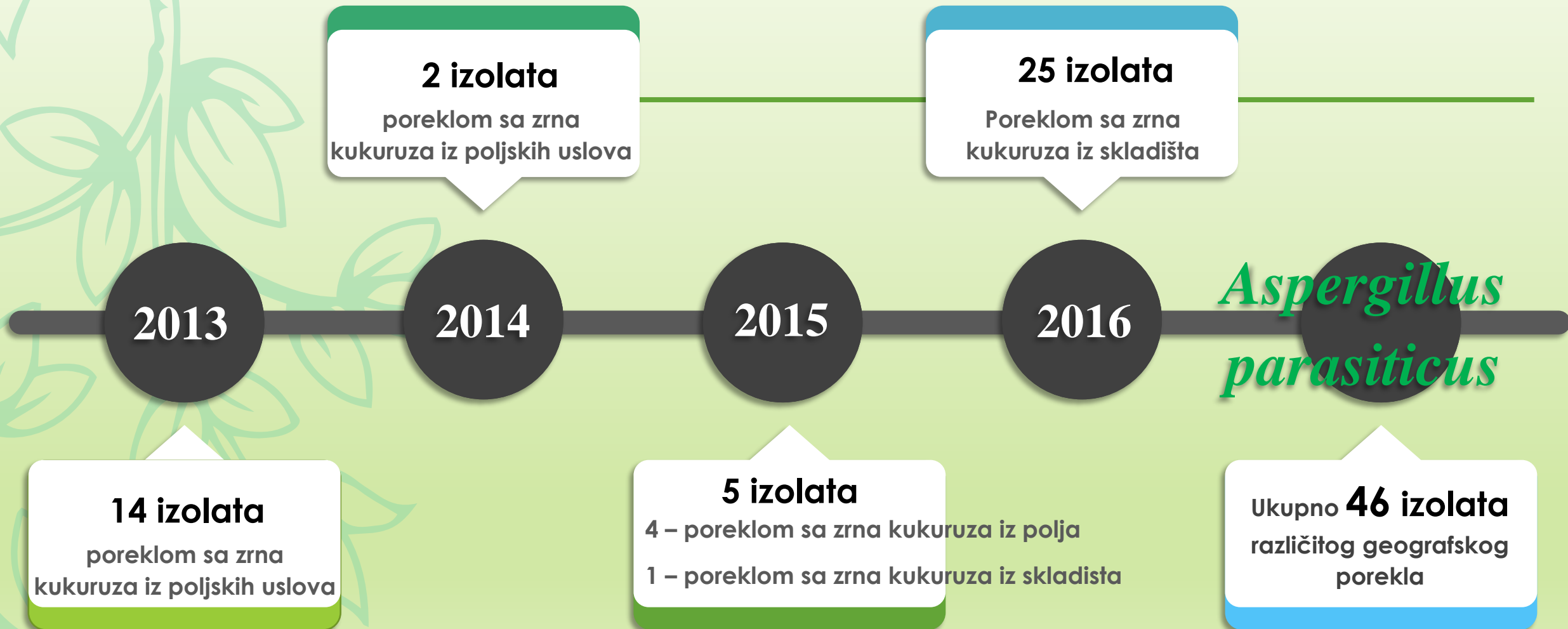


PDA, 7 dana, 25°C, lice kolonije

PDA, 7 dana, 25°C, naličje kolonije



ODABRANI IZOLATI ZA DALJA PROUČAVANJA



**Identifikacija
izolata *Aspergillus
parasiticus* na
osnovu**

• **MORFOLOŠKIH
KARAKTERISTIKA**

• **PATOGENIH
KARAKTERISTIKA**

• **EKOLOŠKIH
KARAKTERISTIKA**

• **ODGAJIVAČKIH
KARAKTERISTIKA**

• **TOKSIKOLOŠKIH
KARAKTERISTIKA**

• **MOLEKULARNIH
KARAKTERISTIKA**

MORFOLOŠKE KARAKTERISTIKE IZOLATA

MAKROSKOPSKE

PDA, 7dana, 25°C, 24h mrak

★ IZGLED, PORAST I BOJA KOLONIJA

★ FORMIRANJE SKLEROCIJA

★ PIGMENTACIJA PODLOGE

★ PRISUSTVO EKSUDATA

MIKROSKOPSKE

MEA, 7dana, 25°C, 24h mrak

★ IZGLED I OBLIK STIPA, VEZIKULA I FIJALIDA

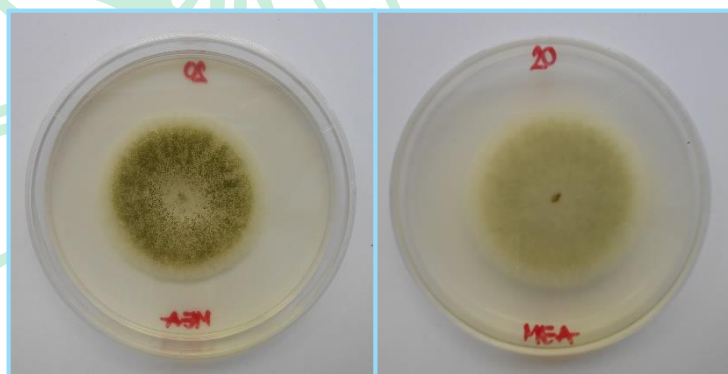
★ PRISUSTVO I ODSUSTVO METULA

★ NAZUBLJENOST POVRŠINSKOG ZIDA SPORA

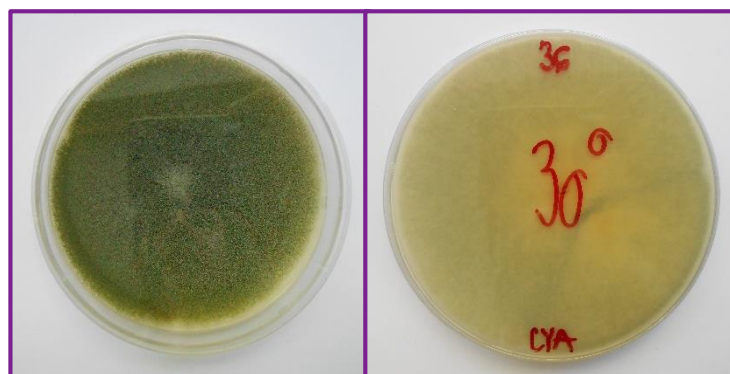
★ VELIČINA I OBLIK SPORA

MAKROSKOPSKE KARAKTERISTIKE IZOLATA

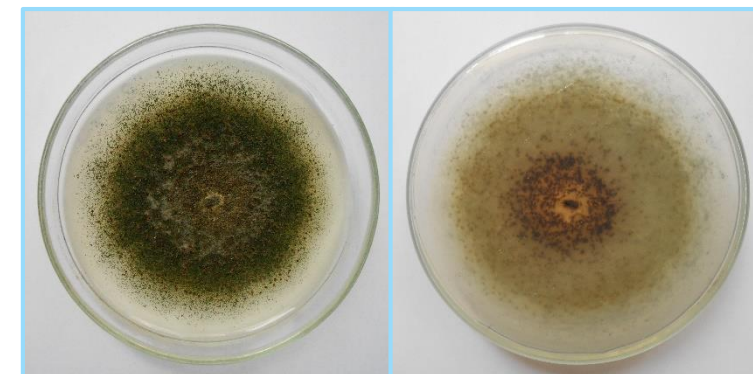
- gajenje izolata na diferencijalnim hranljivim podlogama, kvašćevom autolizatu po Čapeku (*Czapek yeast extract agar*, CYA) i na agaru od sladnog ekstrakta (*malt extract agar*, MEA) 7 dana u tami na 25°C i CYA podlozi 7 dana u tami na 30°C i 37°C (Samson et al., 2014).



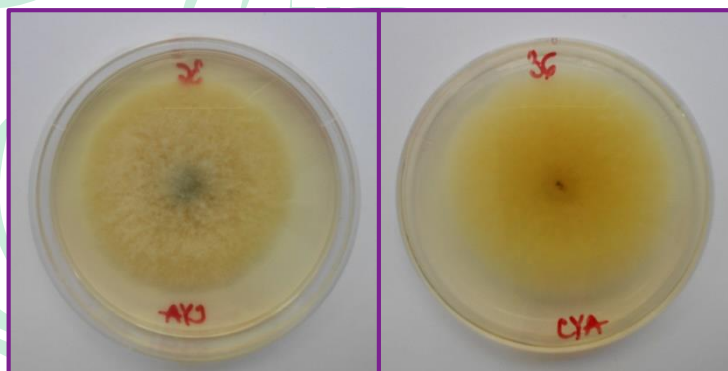
MEA, 25°C



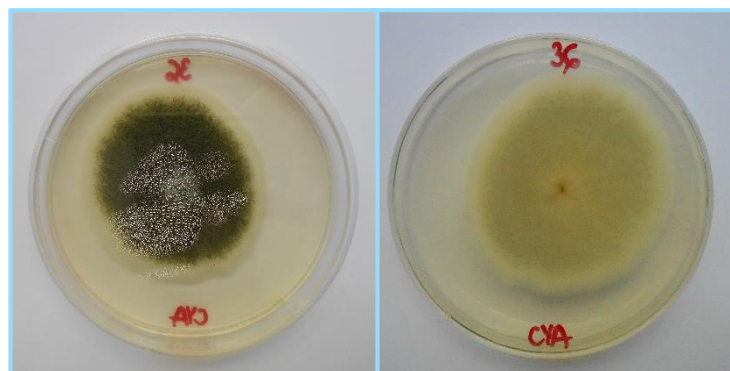
CYA, 30°C



CZ 30°C



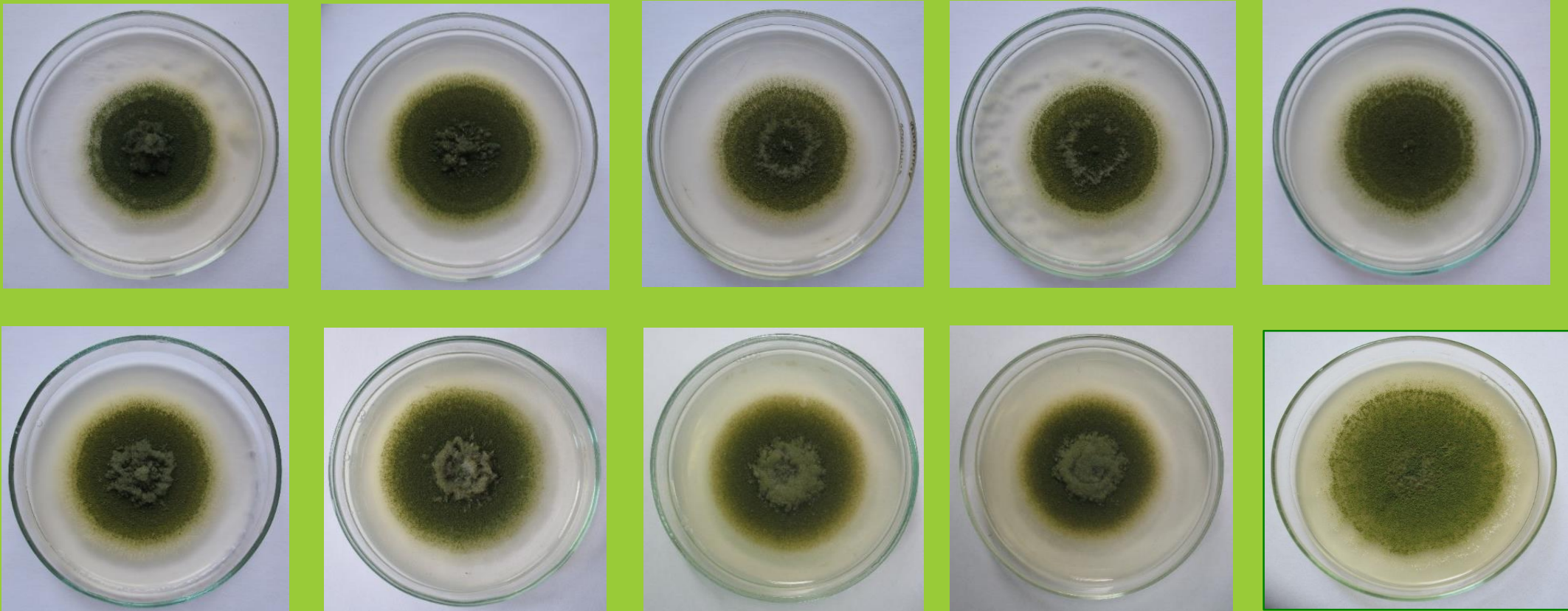
CYA, 25°C



CYA, 37°C



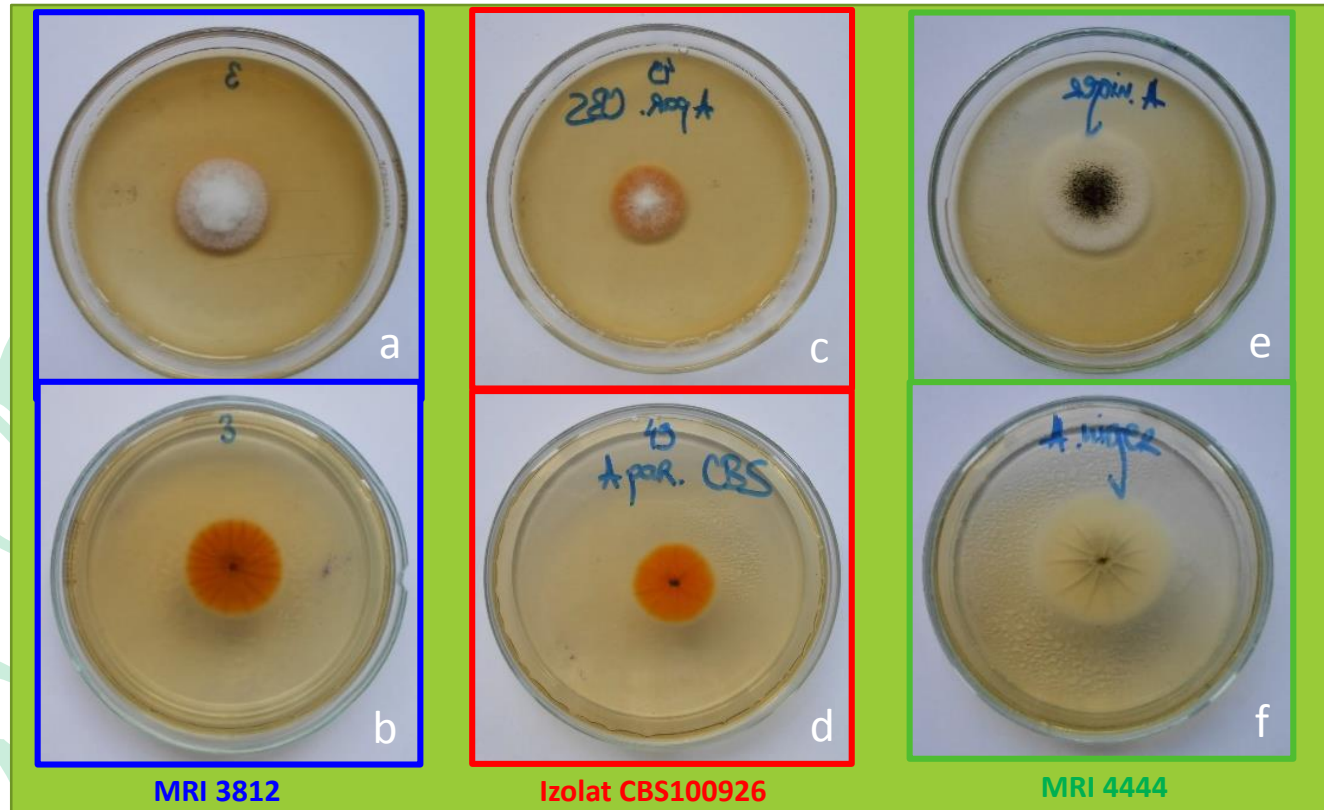
MAKROSKOPSKE KARAKTERISTIKE IZOLATA



Izolati *A. parasiticus* – PDA, 7dana, 25°C, 24h mrak

Izolat *A. flavus*

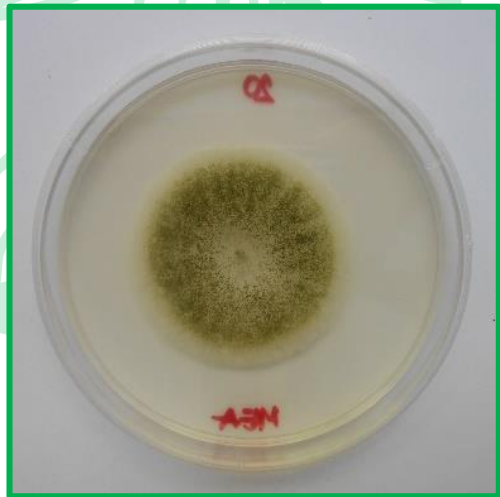
- Osim identifikacije na osnovu makroskopskih karakteristika, izvršena je **identifikacija na nivou sekcije Flavi na *Aspergillus flavus* i *parasiticus* agar (AFPA)** podlozi u trajanju od 72h na 30°C u tami, na osnovu boje naličja kolonije.



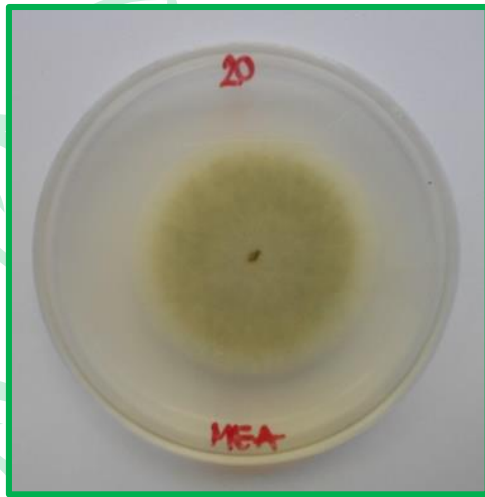
Izgled kolonija izolata **MRI 3812** (a-lice kolonije; b-naličje kolonije), **referentnog izolata CBS100926 (*A. parasiticus* CBS)** (c-lice kolonije; d-naličje kolonije) i izolata ***A. niger* (*A. niger*, MRI 4444)** (e-lice kolonije; f-naličje kolonije) nakon 48-72h inkubacije u tami na temperaturi od 30°C na AFPA podlozi

MIKROSKOPSKE KARAKTERISTIKE IZOLATA

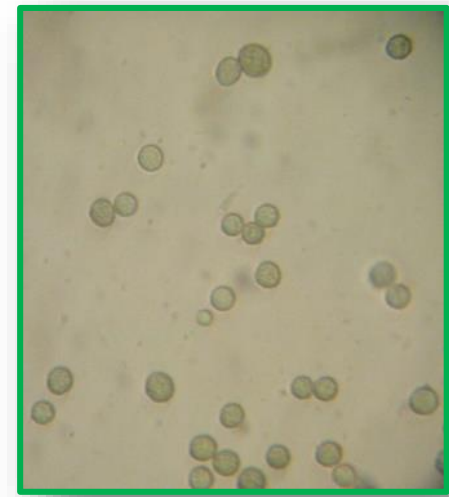
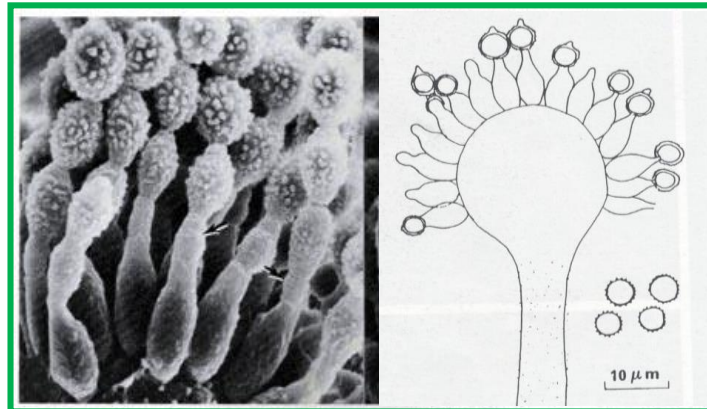
- gajenje izolata na MEA podlozi u tami na $25\pm 1^\circ\text{C}$
- posle sedam dana inkulacije izvršen je mikroskopski pregled i meren je prečnik konidija i širina vezikula



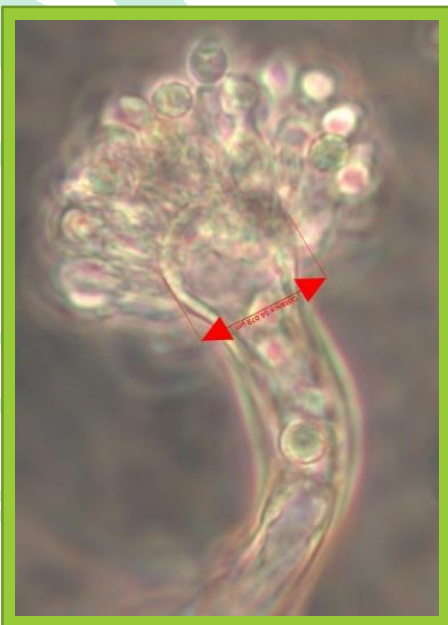
MEA, 7dana, 25°C ,
lice kolonije



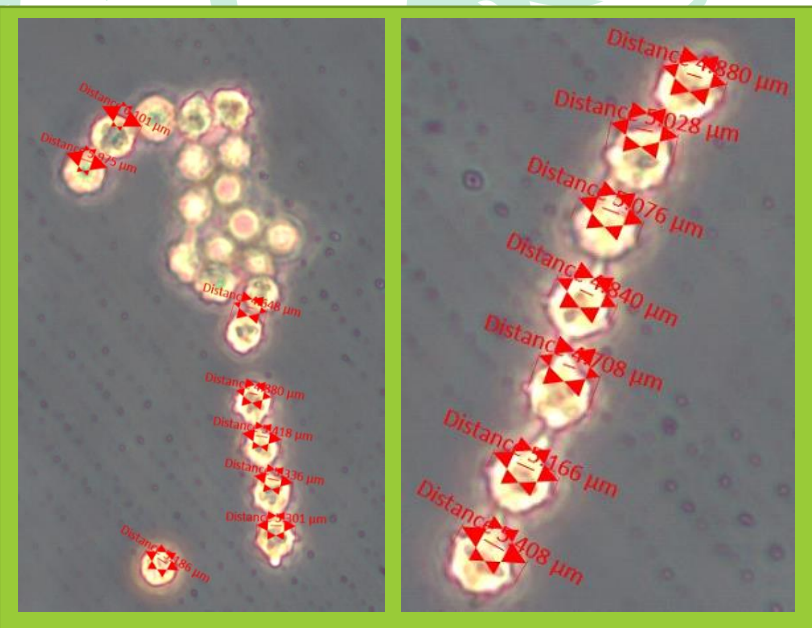
MEA, 7dana, 25°C ,
naličje kolonije



Veličina i oblik konidija

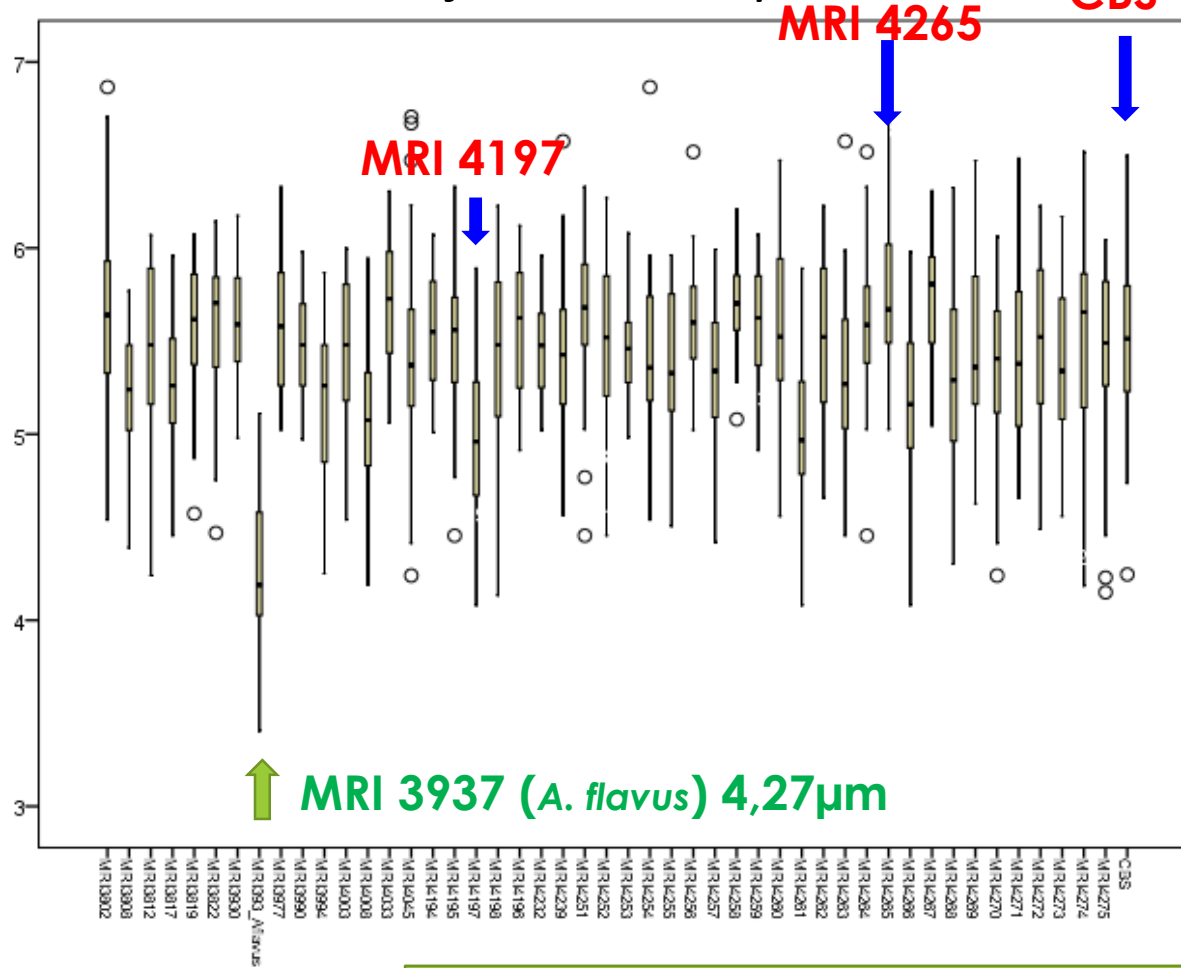


Prečnik vezikula: 14 - 25 μm



Prečnik konidija: 4,95 – 5,79 μm

Prečnik konidija izolata *A. parasiticus*



- Svi izolati *A. parasiticus* obrazuju jednoćelijske, nazubljene konidije na MEA podlozi.

Veličina sklerocija

Prečnik sklerocija izolata *A. parasiticus*

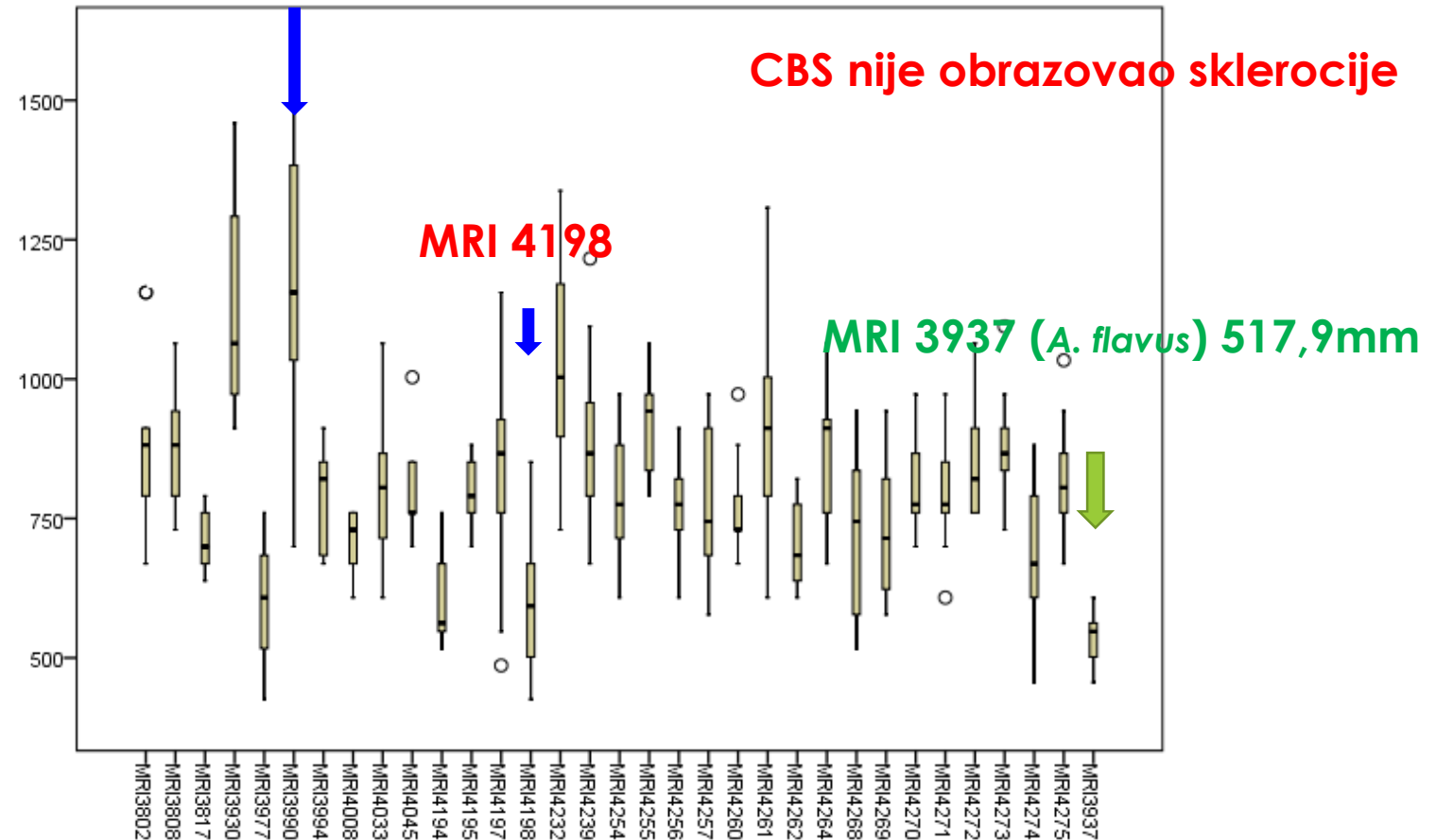


Prečnik sklerocija: 549,3 – 1168,6 μm



MRI 3990

CBS nije obrazovao sklerocije



- Formiranje sklerocija zabeleženo je u miceliji kod 32 izolata (73%), 14 dana posle zasejavanja na CZ podlozi.

EKOLOŠKE I ODGAJIVAČKE KARAKTERISTIKE IZOLATA

- UTICAJ RAZLIČITIH TEMPERATURA NA RAZVOJ IZOLATA

25°C

30°C

37°C

42°C

- UTICAJ RAZLIČITIH USLOVA OSVETLJENJA NA RAZVOJ IZOLATA

12H SVETLO/12H MRAK

24H MRAK

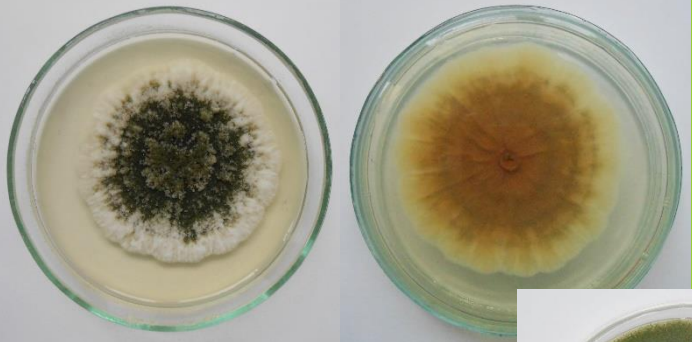
- UTICAJ RAZLIČITIH HRANLJIVIH PODLOGA NA RAZVOJ IZOLATA

CYA

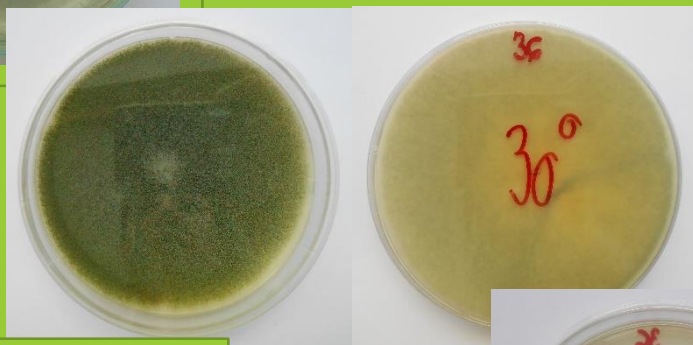
MEA

PDA

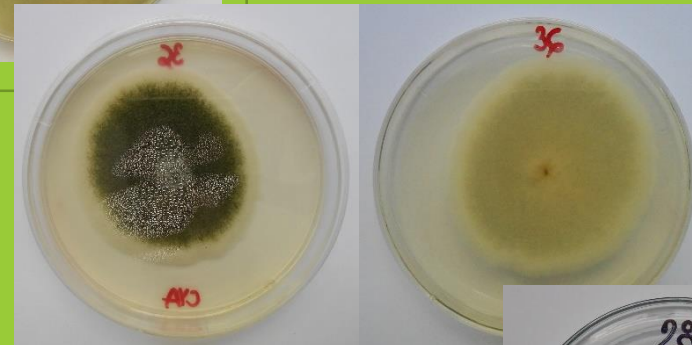
UTICAJ TEMPERATURE NA RAZVOJ IZOLATA



25°C



30°C



37°C



42°C

- Ispitivani izolati rasli su u temperaturnom opsegu 13-42°C. Najveći broj ispitivanih izolata **nakon sedam dana** (65,2%) ispoljio je najveći prosečan porast na temperaturi od 30°C, a preostalih 34,8% na 37°C. Na temperaturama od 12°C i 43°C prestaje porast ispitivanih izolata.

Prosečan **dnevni** porast:

19,23 mm (37°C)

10,75 mm (30°C)

8,91 mm (25°C)

Uticaj temperature na razvoj izolata nije dovoljan kriterijum za izdvajanje određenih grupa izolata.

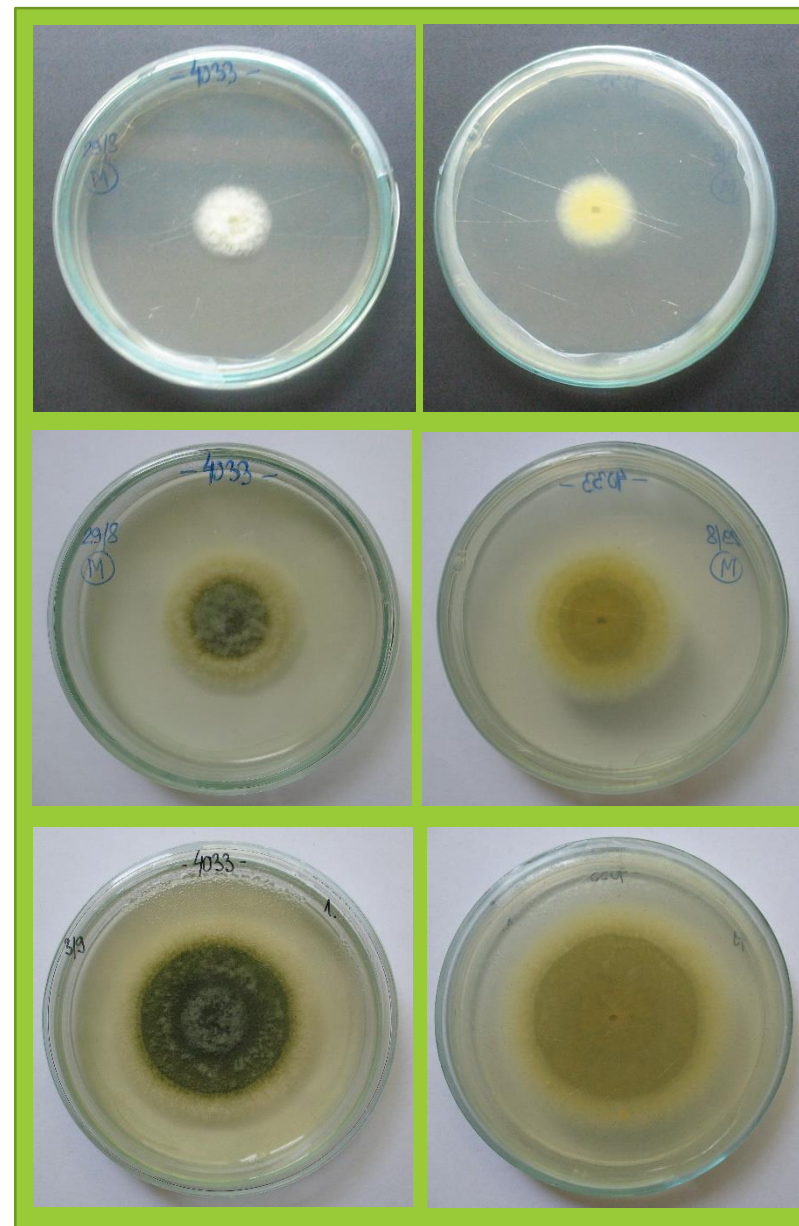
UTICAJ RAZLIČITIH USLOVA OSVETLJENJA NA RAZVOJ IZOLATA

46 izolata, PDA, 25°C, 24h mrak i 12h svetlo/12h tama

Praćen dnevni porast micelije, kao i sedmog dana nakon presejavanja

Dvofaktorijalna analiza varijanse po potpuno slučajnom planu

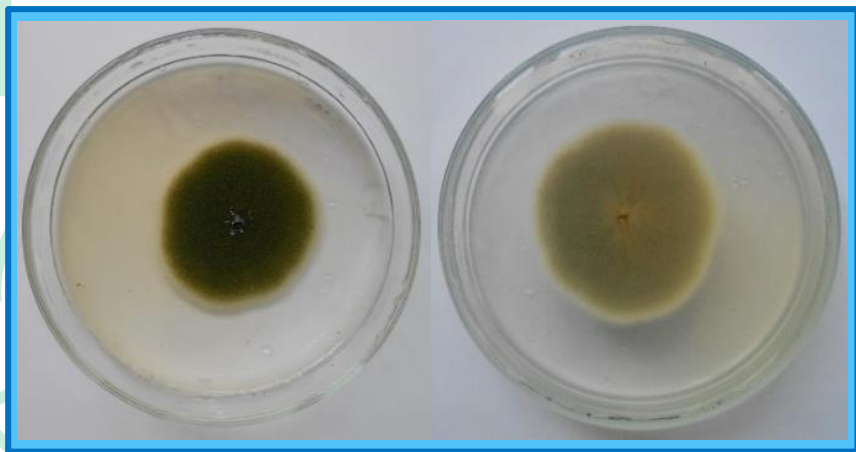
- U svetlosnom režimu 12h svetlo/12h tama na PDA podlozi sedmog dana po inokulaciji najbrži porast imao je izolat MRI 3994, dok je najmanji porast pokazao izolat MRI 3812 (40,88 mm). U svetlosnom režimu 24h mrak sedmog dana po inokulaciji najbrži porast imao je izolata MRI 4045 (73,50 mm), a najmanji porast nakon zabeležen je kod izolata MRI 4256 (41,25 mm).
- Većina izolata je, nakon sedmodnevne inkubacije imala brži prosečni porast u mraku.
- Poređenjem porasta kolonija, ustanovljena je pozitivna korelacija (0,5-osrednja povezanost) između prosečnog porasta kolonija izolata pri 12h/12h i 24h mrak.



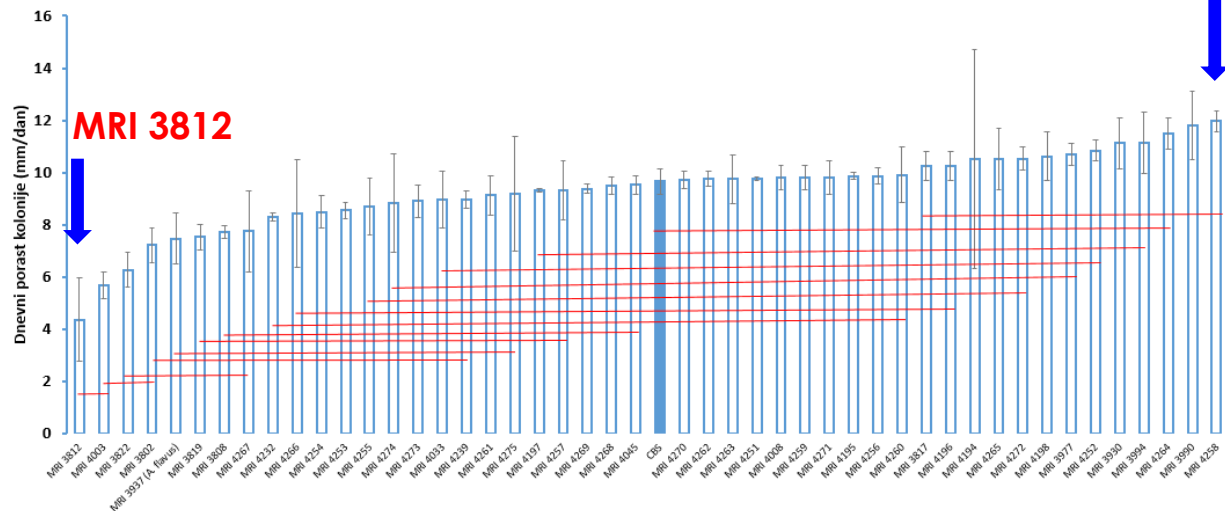
72h

120h

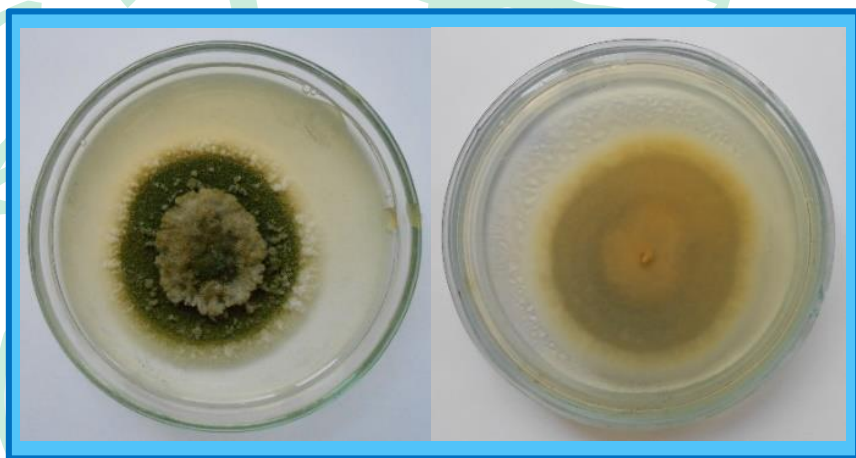
168h



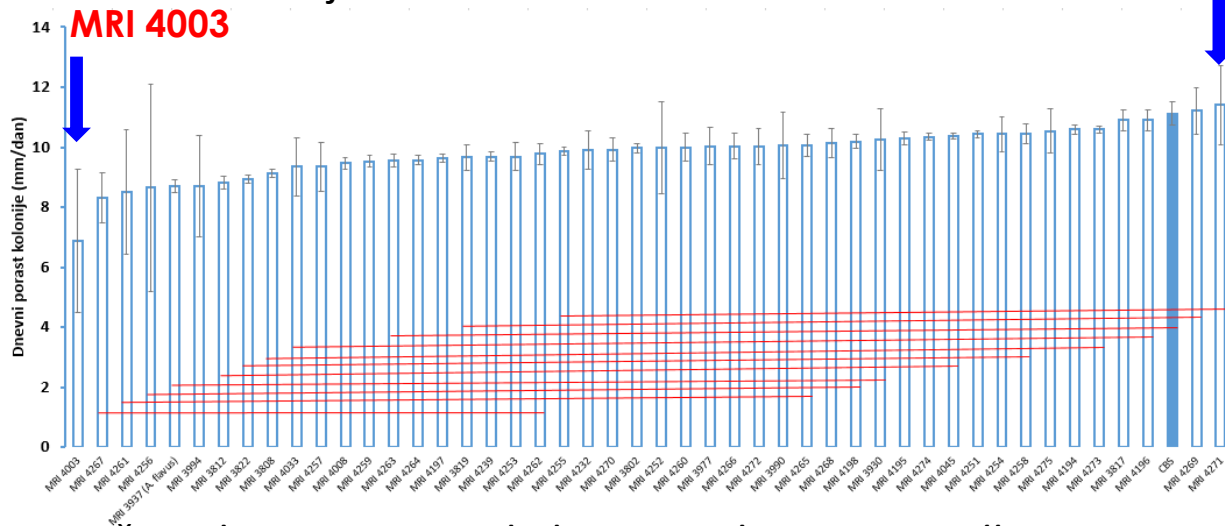
Izolat *A. parasiticus*, KDA podloga,
12h svetlo/12h mrak



Prosečan dnevni porast kolonije izolata *Aspergillus parasiticus*, na KDA podlozi, u svetlosnom režimu 12h svetlo/12h mrak i rezultati ispitivanja statističke značajnosti Dankanovim testom.

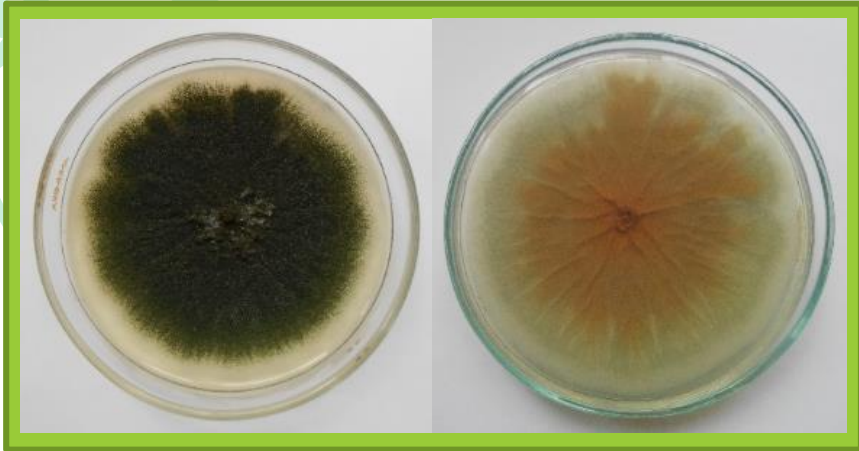


Izolat *A. parasiticus*, KDA podloga,
24h mrak



Prosečan dnevni porast kolonije izolata *Aspergillus parasiticus*, na KDA podlozi, u noćnom svetlosnom režimu i rezultati ispitivanja statističke značajnosti Dankanovim testom.

UTICAJ HRANLJIVIH PODLOGA NA RAZVOJ IZOLATA

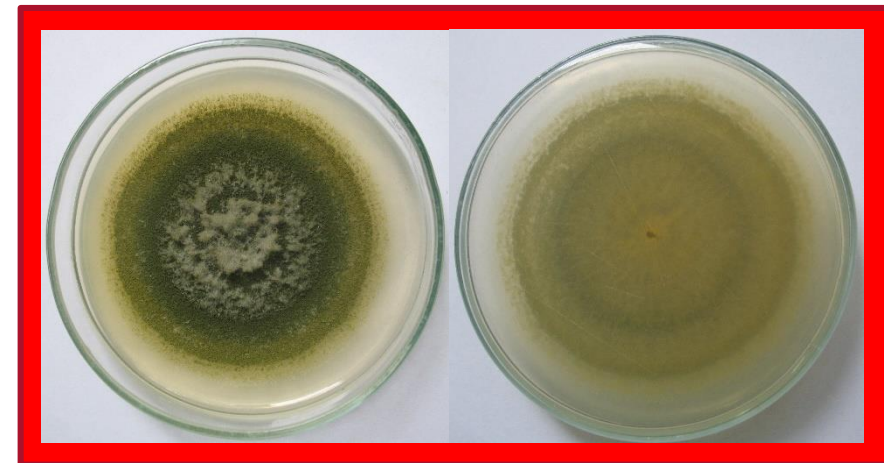


CYA



MEA

- Veliki broj (78,72%) izolata vrste *A. parasiticus* najbrže je rastao na PDA podlozi, na kojoj je prosečan porast **nakon sedam dana** bio u intervalu od 41,2-73,50 mm. Sporiji prosečan porast uočen je na CYA podlozi (36,5-69,25 mm). Najsporiji porast za sve ispitivane izolate je uočen je na MEA podlozi, i iznosio je od 40,63 do 62,25 mm.



PDA

Prosečan **dnevni** porast kolonije:

9,86 mm (PDA)

8,91 mm (CYA)

8,46 mm (MEA)

PATOGENOST IZOLATA NA LISTU JEČMA

- Inokulacija lista ječma **u laboratoriji**, po metodi Imathiu et al. (2009):

46 izolata → 32 lista → 10 μl suspenzije spora

Priprema listova ječma:

- Seme ječma posejano u saksije
- Biljke gajene u fitotronu 2 nedelje ($\approx 20^{\circ}\text{C}$)
- Listovi sečeni na 4 cm dužine

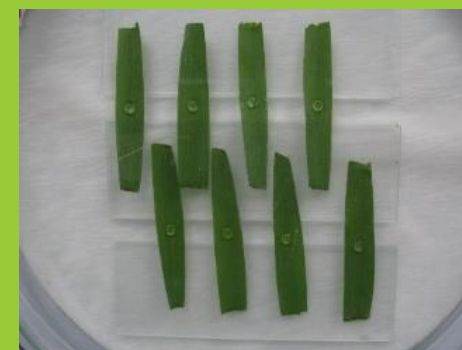
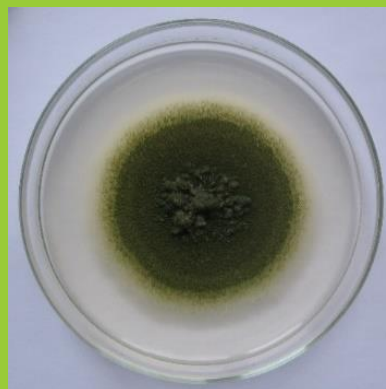


Inokulacija i inkubacija

Patogenost je ocenjena nakon 5 dana

Priprema suspenzije spora:

- Izolati gajeni 7 dana na PDA podlozi na 25°C
- Koncentracija 3×10^7 konidija/ml



PATOGENOST IZOLATA NA LISTU JEČMA



Najveći broj izolata (34%) ispoljio je srednju patogenost (ocena 3 i 4), a samo 4% izolata je ispoljilo najveću agresivnost (ocena 5).

A. parasiticus: pojava smeđih pega na listovima ječma sorte Nektar inokulisanim izolatima 3802 (ocena 2), 3812 (ocena 3), 3808 (ocena 4), 3819 (ocena 5) sedam dana nakon veštačke inokulacije.

PATOGENOST IZOLATA NA KLIPU KUKURUZA

- Inokulacija klipa kukuruza **u polju**, po metodi Reid et al. (1996):

46 izolata → 40 biljaka → 2 ml suspenzije 3×10^7 spora/ml

- Priprema inokuluma pripremljena na isti način, kao u testovima provere patogenosti u laboratorijskim uslovima
- Intenzitet aspergiloze klipa ocenjen je u fazi tehnološke zrelosti kukuruza prema skali 1-7, na osnovu prisustva maslinastozelenih simptoma, karakterističnog za ovog patogena :

Ocena 1 – klip bez simptoma;

Ocena 2 – (1-3%);

Ocena 3 – (4-10%);

Ocena 4 – (11-25%);

Ocena 5 – (26-50%);

Ocena 6 – (51-75%);

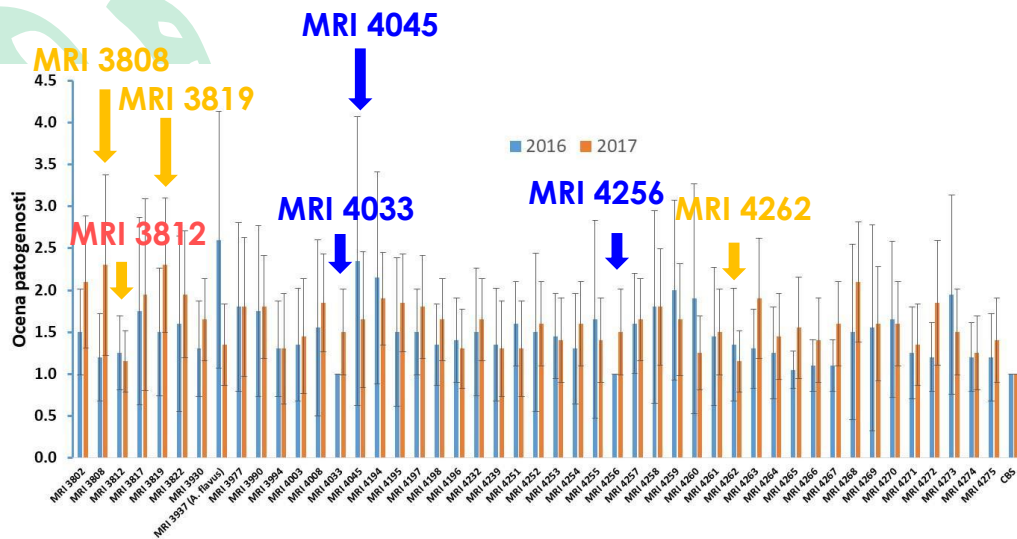
Ocena 7 – (76-100%) zaražene površine klipa.



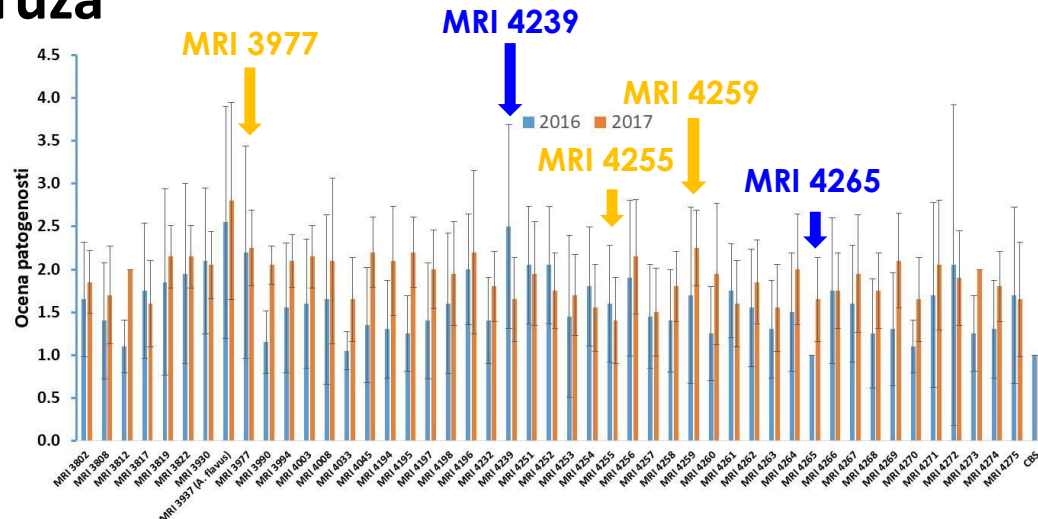


Varijabilnost ispitivanih izolata u ispoljavanju patogenosti na klipu kukuruza

Varijabilnost ispitivanih izolata u ispoljenoj patogenosti na klipu kukuruza



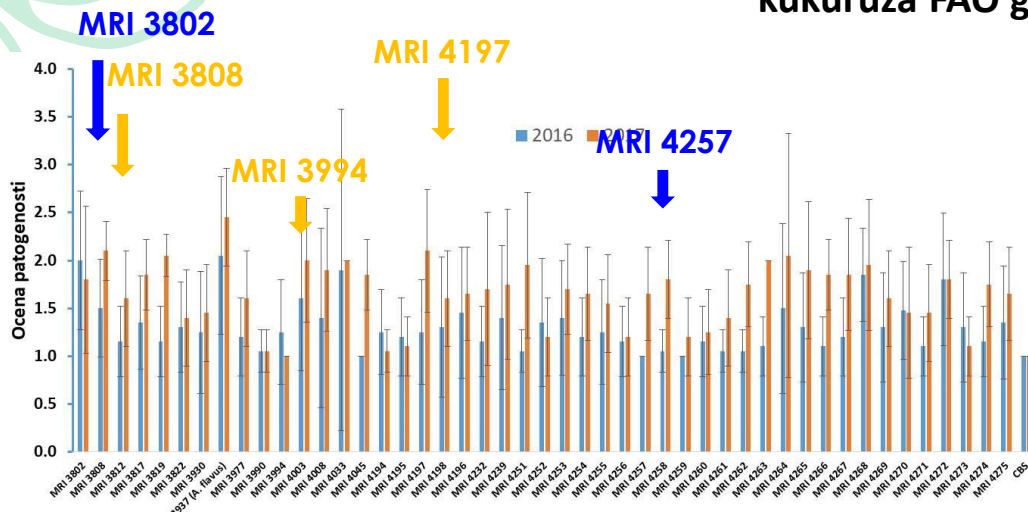
Ocena patogenosti izolata *A. parasiticus* na hibridima kukuruza FAO grupe 300



Ocena patogenosti izolata *A. parasiticus* na hibridima kukuruza FAO grupe 500

Prosečna ocena za 2016. godinu: 1,46.

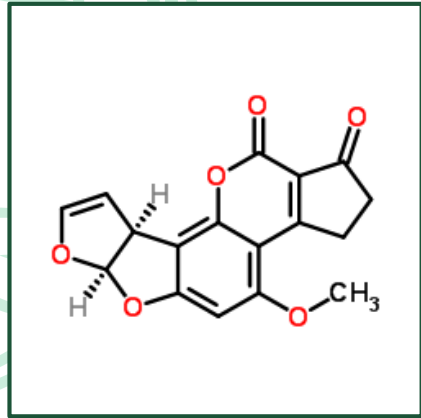
Prosečna ocena za 2017. godinu: 1,71.



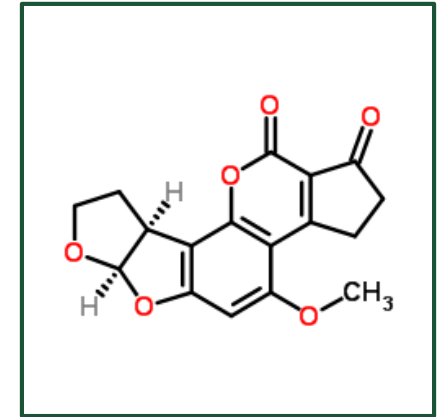
Ocena patogenosti izolata *A. parasiticus* na hibridima kukuruza FAO grupe 800

2017. godine najveću otpornost (1,6) pokazali su hibridi FAO grupe 300 prema patogenu *A. parasiticus*.

TOKSIGENA SVOJSTVA ISPITIVANIH IZOLATA



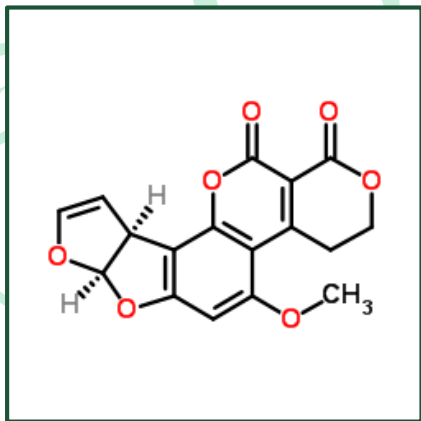
B₁*



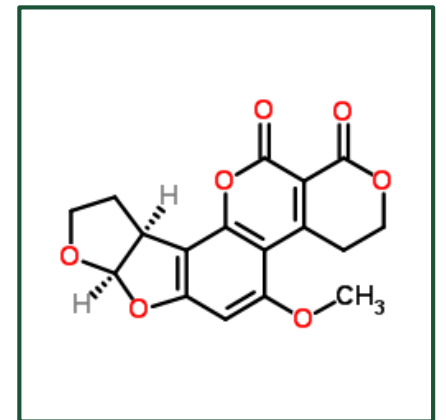
B₂*

A. parasiticus

Skoro svi sojevi toksigeni



G₁**



G₂**

*B = Blue (plava) fluorescencija

**G = Green (zelena) fluorescencija

TOKSIKOLOŠKE KARAKTERISTIKE

- Potencijal sinteze AFB1 i AFLA, po metodi Logrieco et al. (1995):

1) PRIPREMA UZORAKA ZA EKSTRAKCIJU AFLATOKSINA

PRIPREMA SUPSTRATA

Erlenmajer kolbe – 50g zrna kukuruza i 22,8 ml destilovane vode, nakon 24h sterilizacija (vlaga 45%)



INOKULACIJA SUPSTRATA

Sterilna zrna inokulisana sa 3 isečka kolonije gljive razvijene na PDA podlozi – inkubacija sedam dana na 25°C u mraku



SUŠENJE, MLEVENJE I ČUVANJE SUPSTRATA

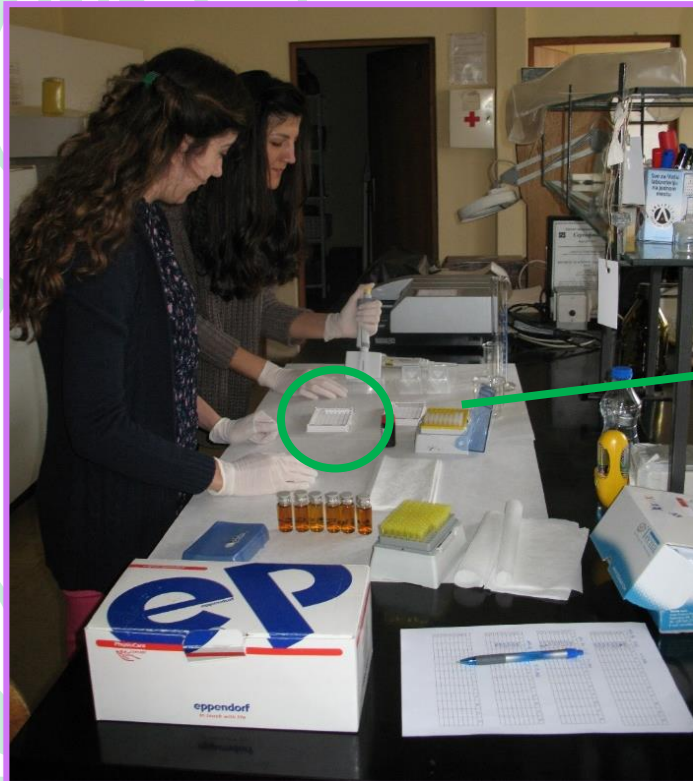
Inokulisana zrna nakon inkubacije sušena dva dana na 50°C, a potom mlevena do praškastog stanja i čuvana na 4°C



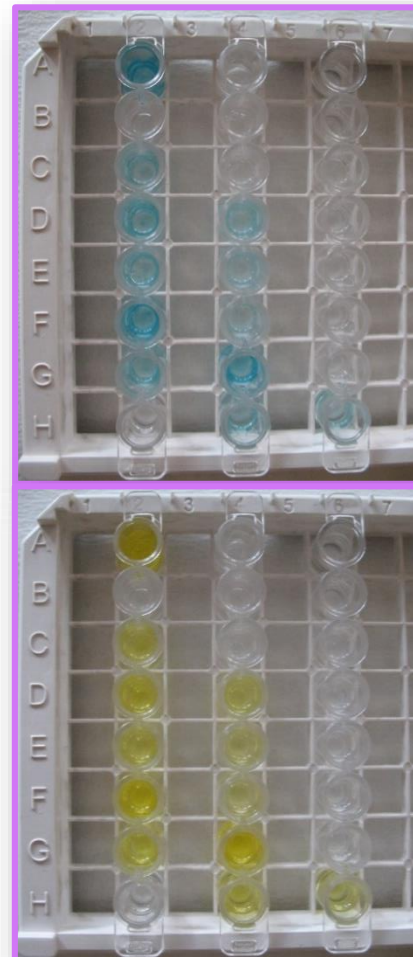
ELISA metod

2) EKSTRAKCIJA AFLATOKSINA IZ UZORAKA

- 5g samlevenog uzorka
- 1g NaCl
- 25 ml rastvarača (70% rastvor MeOH i H₂O)
- Homogenizacija u blenderu na 1300 obrtaja u trajanju od 3 minuta



3) KVANTIFIKACIJA KONCENTRACIJA aflatoksina izvršena je na 450 nm talasne dužine, pomoću ELISA čitača.



Potencijal sinteze **ukupnih aflatoksina (AFLA)** izolata *Aspergillus parasiticus* analiziranih ELISA metodom (Tecna Italy)

Koncentracioni opseg (µg/kg)					
1-10		10-50		>50	
Izolat	AFLA	Izolat	AFLA	Izolat	AFLA
MRI 4267	5.57	MRI 3812	36.34	MRI 3802	Toxic
		MRI 3822	21.26	MRI 3808	Toxic
		MRI 4256	42.60	MRI 3817	Toxic
		MRI 4257	32.82	MRI 3819	78.09
		MRI 4265	49.00	MRI 3930	Toxic
		MRI 4270	29.36	MRI 3937	Toxic
		MRI 4273	44.85	MRI 3977	Toxic
		MRI 4275	29.68	MRI 3990	Toxic
				MRI 3994	Toxic
				MRI 4003	65.24
				MRI 4008	Toxic
				MRI 4033	Toxic
				MRI 4045	Toxic
				MRI 4194	Toxic
				MRI 4195	Toxic
				MRI 4197	Toxic
				MRI 4198	Toxic
				MRI 4196	Toxic
				MRI 4232	Toxic
				MRI 4239	Toxic
				MRI 4251	Toxic
				MRI 4252	Toxic
				MRI 4253	Toxic
				MRI 4254	Toxic
				MRI 4255	76.13
				MRI 4258	Toxic
				MRI 4259	78.26
				MRI 4260	Toxic
				MRI 4261	Toxic
				MRI 4262	65.81
				MRI 4263	Toxic
				MRI 4264	Toxic
				MRI 4266	Toxic
				MRI 4268	51.75
				MRI 4269	75.21
				MRI 4271	61.89
				MRI 4272	79.36
				MRI 4274	Toxic

Većina izolata je pokazala veliki toksigeni potencijal

U najmanjem procentu detektovane su koncentracije AFLA 1-10 µg/kg, tačnije samo kod jednog izolata. Sinteza AFLA bila je, u najvećem procentu, u koncentracijama višim od 50 µg/kg, među ispitivanim izolatima (82%).

Potencijal sinteze **aflatoksina B1 (AFB1)** izolata *Aspergillus parasiticus* analiziranih ELISA metodom (Tecna Italy)

Koncentracioni opseg (µg/kg)					
1-10		10-50		>50	
Izolat	AFB1	Izolat	AFB1	Izolat	AFB1
MRI 3819	4.86	MRI 3808	17.74	MRI 3802	toxic
MRI 4265	7.20	MRI 3812	15.91	MRI 3930	toxic
MRI 4267	3.68	MRI 3817	16.40	MRI 3937	toxic
MRI 4270	4.62	MRI 3822	35.18	MRI 3977	toxic
MRI 4273	4.92	MRI 3994	32.86	MRI 3990	toxic
MRI 4275	8.92	MRI 4033	36.13	MRI 4003	78.31
		MRI 4255	36.30	MRI 4008	78.20
		MRI 4256	25.16	MRI 4045	toxic
		MRI 4257	19.14	MRI 4194	toxic
		MRI 4259	28.23	MRI 4195	toxic
		MRI 4260	37.75	MRI 4197	toxic
		MRI 4262	37.42	MRI 4198	toxic
		MRI 4268	19.21	MRI 4196	toxic
		MRI 4269	22.48	MRI 4232	toxic
		MRI 4271	13.96	MRI 4239	66.10
		MRI 4272	20.34	MRI 4251	toxic
				MRI 4252	toxic
				MRI 4253	toxic
				MRI 4254	62.17
				MRI 4258	toxic
				MRI 4261	toxic
				MRI 4263	toxic
				MRI 4264	toxic
				MRI 4266	toxic
				MRI 4274	toxic

Većina izolata je pokazala veliki toksigeni potencijal

Najmanji broj izolata (13%) je sintetisao AFB1 u koncentraciji 1-10 µg/kg. Sinteza AFB1 bila je, u najvećem procentu (54% izolata), u koncentracijama višim od 50 µg/kg.

- Korelacija između sinteze aflatoksina B1 i ukupnih aflatoksina kod izolata *Aspergillus parasiticus* dobijenih ELISA metodom

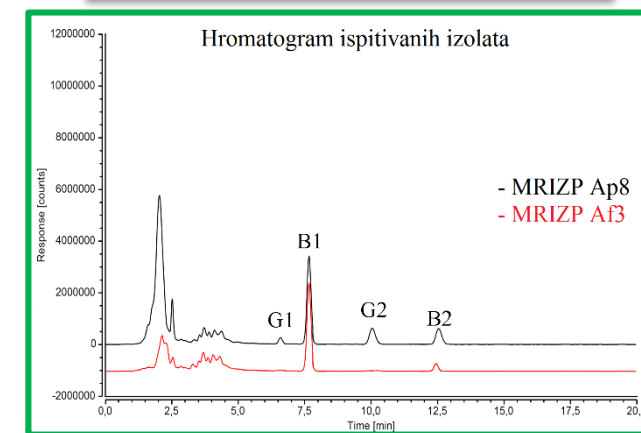
Mikotoksin	Koeficijent korelacije (r)
	AFLA
AFB1	0,66**

*Statistički značajna razlika (p<0,05);

**Statistički visoko značajna razlika (p<0,01)

HPLC metoda

- Za određivanje prisustva aflatoksina pored skrining metode (ELISA), koristili smo i konfirmatornu HPLC metodu, pomoću koje je ustanovljena sposobnost sinteze svakog pojedinačnog aflatoksina (B1, B2, G1, G2)
- Uzorci za ekstrakciju pripremljeni su po metodi koji su opisali Abbas et al. (2004).
- Uzorak se profiltrira (Whatman No. 1), prečišćava pomoću MycoSep®224AflaZon kolone, derivatizuje sa TCA i analizira Dionex UltiMate 3000 hromatografskim sistemom (Thermo Scientific, Germany) povezanim sa FLD detektorom.
- U cilju detekcije aflatoksina, talasne dužine za ekscitaciju podešene su na 365 nm, odnosno za emisiju na 455 nm.



Rezultati HPLC metode

Toksikološki profil izolata *Aspergillus parasiticus* poreklom sa kukuruza

Izolat	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2
	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg
3802	3429.82	544.25	3461.35	260.47
B ₁ → 3808	14.24	×	3.27	×
3930	3438.01	331.92	3437.81	306.65
3937 (<i>A. flavus</i>)	646.05	0.27	12.04	×
3977	911.03	561.35	554.22	47.69
3990	5698.47	303.94	6518.88	90.52
4045	6716.42	1543.80	5189.43	181.76
B ₁ → 4194	7361.03	995.41	3085.11	×
4195	6431.77	287.25	7191.62	110.11
4197	5850.87	527.31	7122.59	395.18
4198	6741.07	652.58	7421.58	374.93
4196	4409.10	143.97	5357.14	68.92
4232	5708.12	142.81	6495.07	86.92
4251	5918.46	254.03	6606.65	98.25
4252	6816.08	721.28	2166.36	×
4258	6884.01	1.590,6	2946.52	10.43
4261	5198.68	403.79	5.13	128.02
4262	5776.73	629.68	5746.97	217.83
4265	5968.77	1733.52	634.79	×

← G₁

- Kvantitativna i kvalitativna analiza potencijala sinteze HPLC metodom pokazala je da postoji velika varijabilnost u sposobnosti sinteze pojedinačnih aflatoksina među izolatima.

← G₁

- Prosečna sinteza AFB1 4385,63 µg/kg; AFG1 3880,12 µg/kg

Rezultati HPLC metode

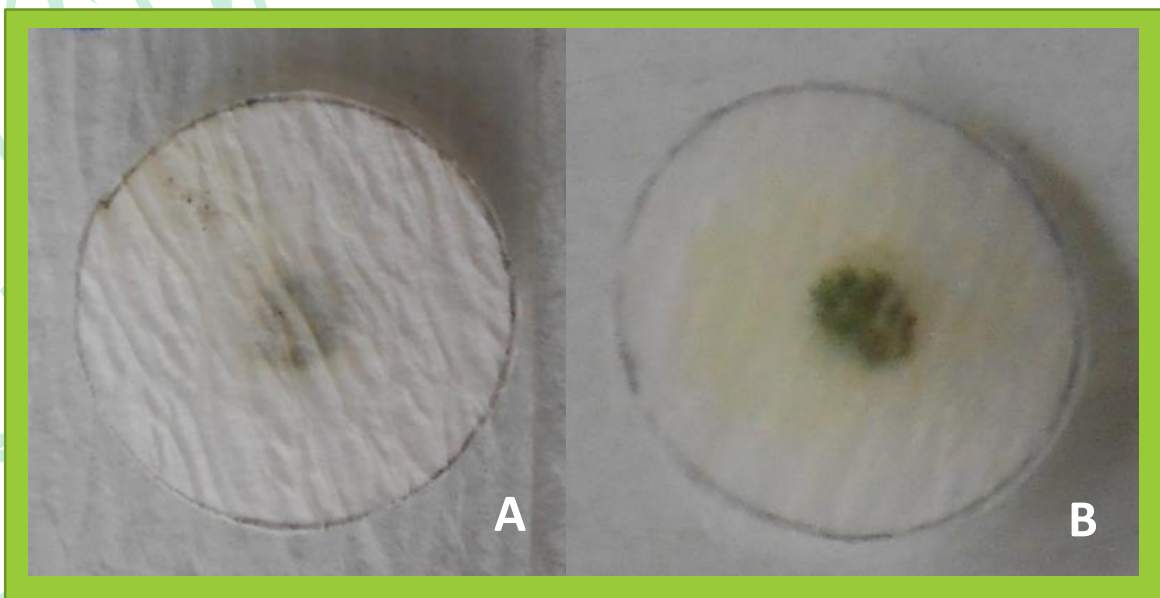
- Kod izolata MRI 4194, MRI 4252 i MRI 4265 nije došlo do sinteze AFG2, dok izolati MRI 3808 i MRI 4275 nisu bili sposobni za sintezu AFB2 i AFG2
- Utvrđeno je i osam izolata koji su sintetisali AFG1 u višim koncentracijama, u odnosu na AFB1
- Korelacija između sinteze aflatoksina B1 i G1, kao i aflatoksina B2 i G2 kod izolata *Aspergillus parasiticus* dobijenih HPLC metodom

Mikotoksin	Koeficijent korelacije (r)	
	AFG1	AFG2
AFB1	0,82**	
AFB2		0,63**

*Statistički značajna razlika ($p < 0,05$);

**Statistički visoko značajna razlika ($p < 0,01$)

EHRlich-ov TEST



Obrazovanje žutog prstena kod MRI 3937 (*A. flavus*) (B) i njegov izostanak kod MRI 3808 (A)

- Izolati *A. parasiticus* gajeni 7 dana na CYA podlozi
- Fragmenti kolonije (Ø 1 cm)
- Ehrlich-ov reagens
- Promena boje filter papira praćena nakon 2 minuta

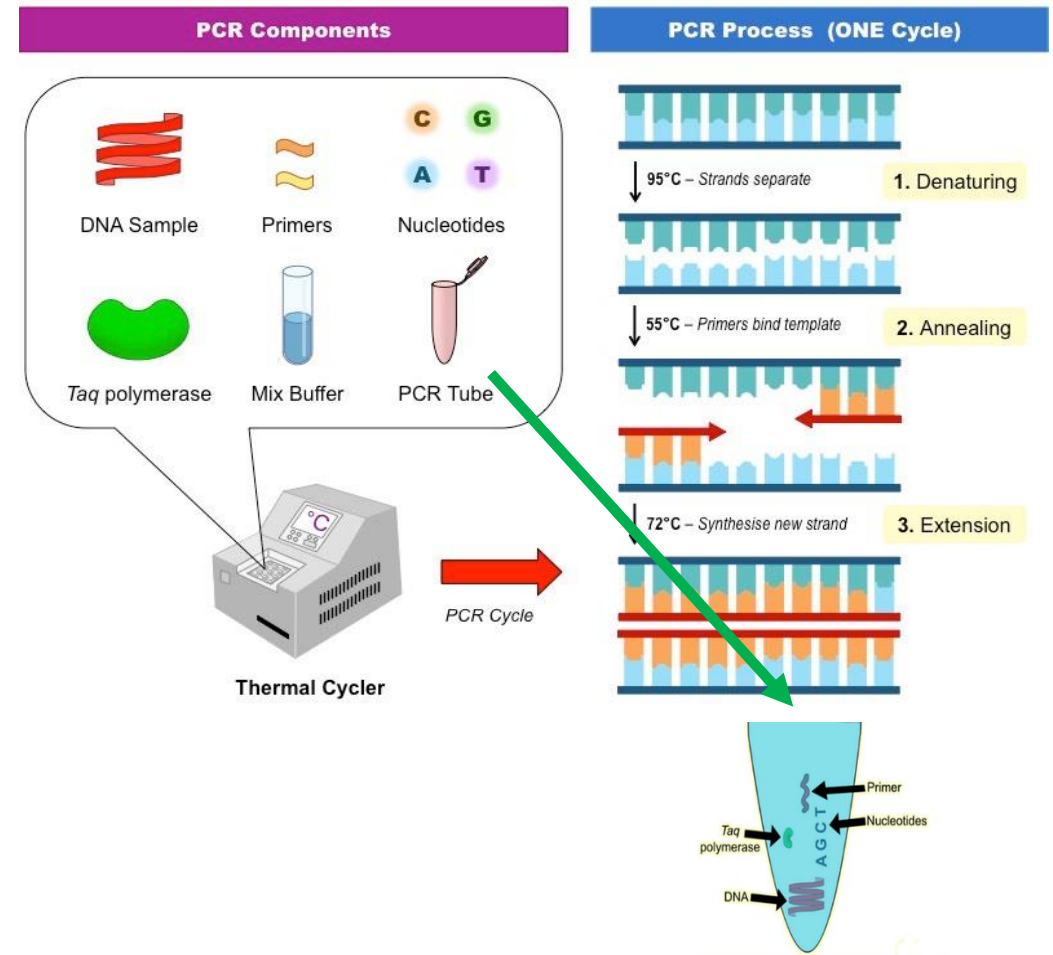
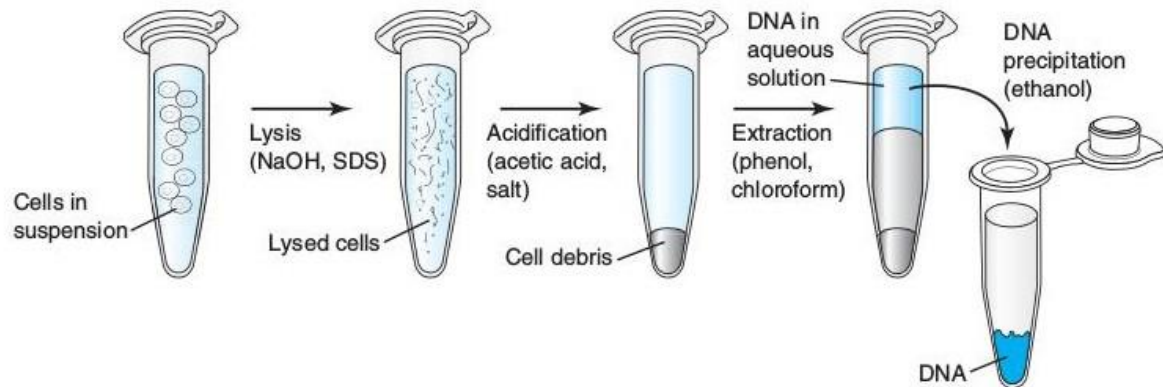
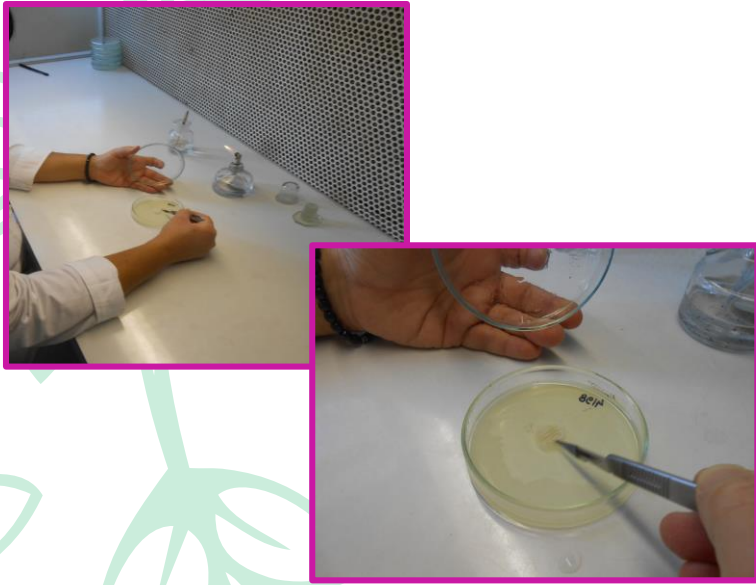
Ehrlich-ov test na filter papiru je pokazao da svi izolati *A. parasiticus* daju **negativnu reakciju**. Izostala je pojava žutog prstena, što ukazuje da ovi izolati **ne stvaraju ciklopiazoničnu kiselinu**. Kao kontrola korišćen je izolat MRI 3937 (*A. flavus*), koji daje pozitivnu reakciju pojavom žutog prstena, što ukazuje da kod ovog izolata dolazi do obrazovanja ciklopiazonične kiseline.

MOLEKULARNA DETEKCIJA ISPITIVANIH IZOLATA

- Dobijeni izolati su identifikovani polifaznim pristupom, analizom morfoloških, patogenih, odgajivačkih i toksigenih svojstava. Identifikacija je potvrđena i molekularnom detekcijom i identifikacijom, primenom **RFLP-PCR metode**.

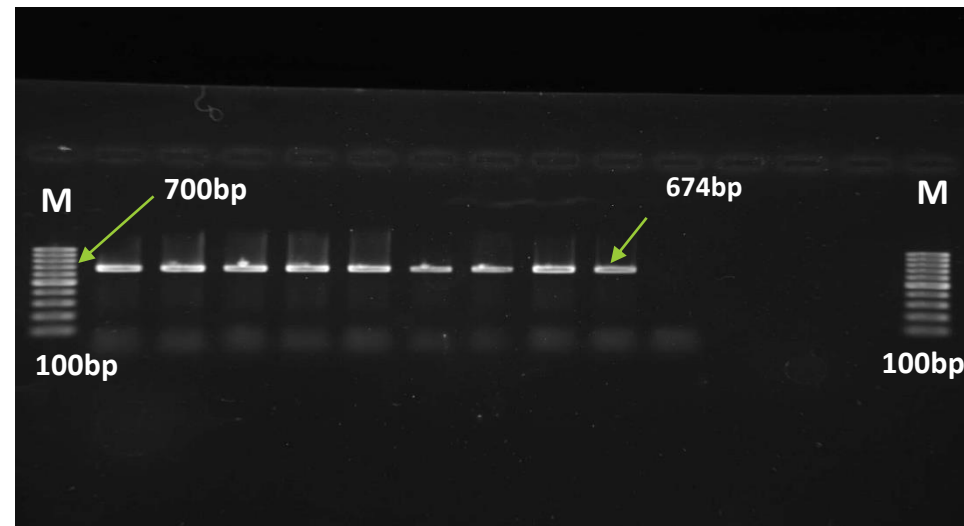
Izolacija DNK

(Polymerase Chain Reaction – lančana reakcija polimeraze)



VIZUELIZACIJA PRODUKATA PCR REAKCIJE

- IGS region (*intergenic spacer*) gena *aflJ* i *aflR* uključenih u biosintezu aflatoksina poslužio je za detekciju i razdvajanje vrsta *A. flavus* i *A. parasiticus*.
- Prajmeri IGS-F/IGS-R specifični za IGS region korišćeni su za umnožavanje ciljnog DNK fragmenta veličine 674bp primenom PCR metode.



Elektroforetska analiza PCR proizvoda dobijenih korišćenjem para prajmera IGSF/IGSR: 1 – izolat MRI 3937 (*A. flavus*); 2-8 – *A. parasiticus*; 9 – *A. parasiticus* CBS100926; M – 100 bp DNA marker.

RESTRIKCIONA DIGESTIJA

- Restriktivni enzimi – preseca DNK na specifičnim prepoznatljivim sekvencama
- *A. flavus* i *A. parasiticus* – restriktivni enzim *Bgl II*

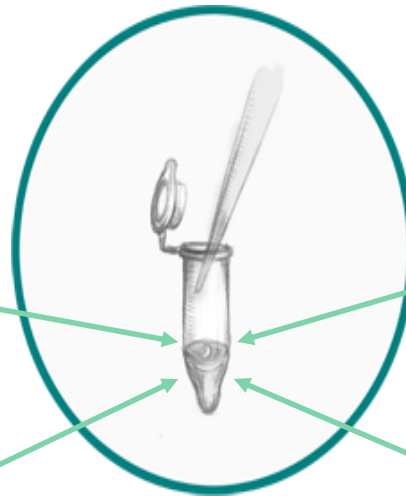


Bgl II

5'...AGATCT...3'
3'...TCTAGA...5'

PCR produkt

Pufer



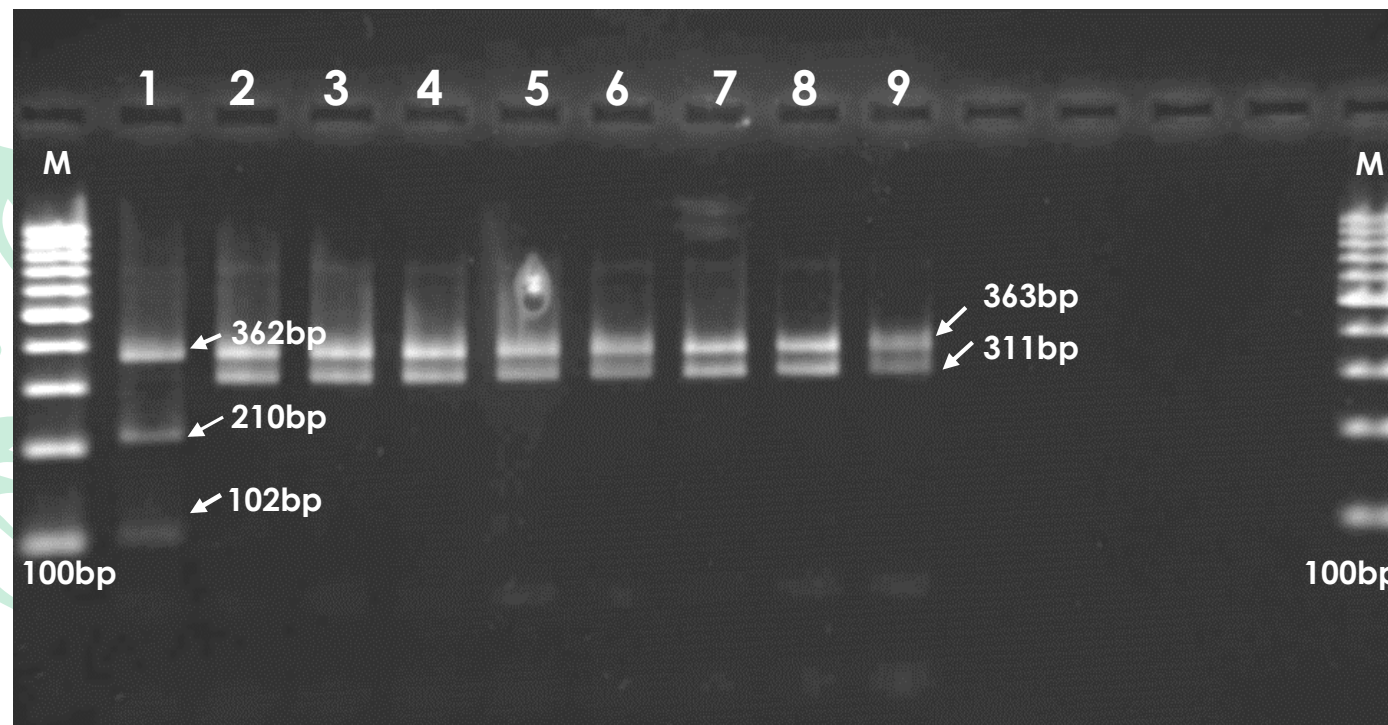
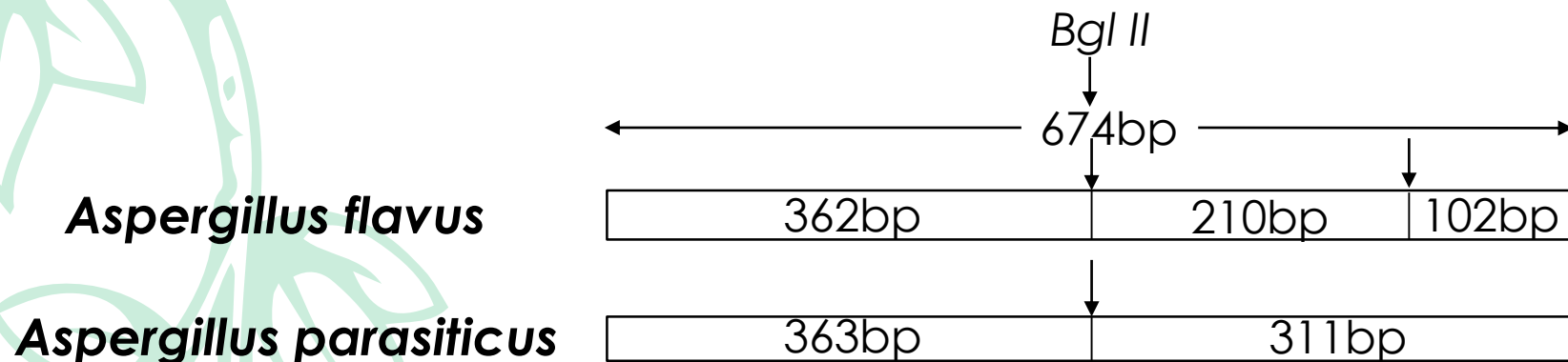
Inkubacija u vodenom kupatilu, 37°C, 1h

Bgl II

Destilovana voda



ELEKTROFOREZA PRODUKATA RESTRIKCIONE DIGESTIJE



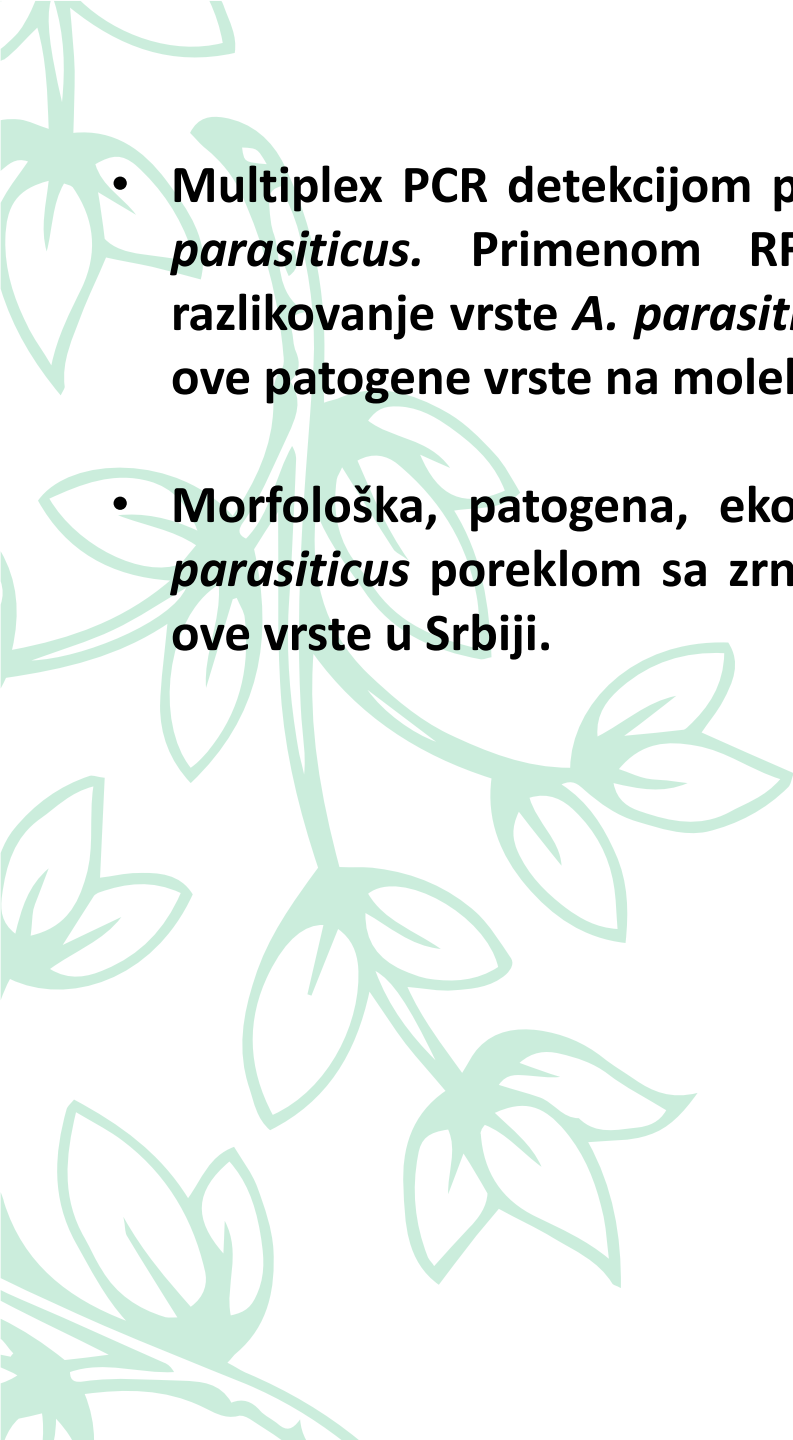
Detaljno poređenje restrikcionih mapa PCR produkta *aflR-aflI* intergenskog regiona omogućilo je identifikaciju restrikcionih mesta za enzim *Bgl*II koja mogu biti korišćena za razdvajanje vrsta *A. flavus* i *A. parasiticus*.

2% agarozni gel sa restrikcionim profilima IGSF / IGSR amplikona posle digestije *Bgl*III enzimom. 1 – izolat *A. flavus* (MRI 3937 (*A. flavus*)); 2-8 – izolati *A. parasiticus*; 9 – *A. parasiticus* CBS100926; M - 100 bp DNA marker.

ZAKLJUČAK

- U toku četvorogodišnjih ispitivanja (2013-2016) identifikovana je, po prvi put u Srbiji, vrsta *A. parasiticus* kao prouzrokovatelj aspergilozne truleži zrna i klipa kukuruza u polju i skladištima.
- Ispitivanjem makroskopskih morfoloških karakteristika izolata *A. parasiticus* ukazano je na mali biodiverzitet proučavanih izolata. Kolonije izolata na PDA podlozi formirale su obilnu tamnozelenu, gustu navlaku od micelije gljive, pamučastog izgleda.
- Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je statistički značajan uticaj interakcije ispitivanih izolata i svetlosnog režima ($p < 0,01$) na dnevni porast prečnika kolonija.
- Različite temperature uticale su statistički značajno na porast kolonija ispitivanih izolata *A. parasiticus* ($P < 0,01$).
- Svi ispitivani izolati *A. parasiticus* ispoljili su statistički značajnu razliku u brzini porasta kolonije na različitim hranljivim podlogama ($P < 0,01$).
- Test patogenosti ukazao je da su svi ispitivani izolati *A. parasiticus* patogeni na klipu kukuruza, jer su prouzrokovali simptome aspergiloze klipa, kao i da postoji divergentnost u ispoljavanju virulentnosti. Patogenost izolata je potvrđena reizolacijom i ponovnom identifikacijom, čime su zadovoljeni Kohovi postulati.

- Test patogenosti u laboratorijskim uslovima ukazao je da su svi ispitivani izolati prouzrokovali simptome na listu ječma. Uočena je velika varijabilnost u agresivnosti izolata.
- Ispitivanje potencijala sinteze mikotoksina, na osnovu rezultata Elisa testa, pokazalo je da su svi izolati *A. parasiticus* sintetisali aflatoksine.
- Poređenjem koncentracija mikotoksina kod izolata dobijenih Elisa testom, pokazali su da postoji statistički visoko značajna pozitivna korelacija između potencijala produkcije AFB1 i AFLA kod ispitivanih izolata ($r=0,66^{**}$).
- Ispitivani izolati *A. parasiticus* koji su sintetisali aflatoksine su u najvećem procentu sintetisali AFB1 (84,78%), dok je procenat izolata koji su sintetisali AFG1 bila znatno manja (15,22%). Utvrđeno je osam izolata koji su sintetisali AFG1 u višim koncentracijama, u odnosu na AFB1.
- Poređenjem koncentracija mikotoksina kod izolata *A. parasiticus*, na osnovu rezultata HPLC metode, uočeno je da postoji visoko statistički značajna pozitivna korelacija između sintetisanih koncentracija AFB1 i AFG1 ($r=0,82^{**}$), kao i između AFB2 i AFG2 ($r=0,63^{**}$).
- Ehrlich-ov test na filter papiru je pokazao da svi ispitivani izolati *A. parasiticus* daju negativnu reakciju. Izostala je pojava žutog prstena, što ukazuje da ovi izolati ne stvaraju ciklopiazoničnu kiselinu.

- 
- **Multiplex PCR detekcijom potvrđen je identitet svih izolata prethodno okarakterisanih kao vrsta *A. parasiticus*. Primenom RFLP-PCR metode korišćenjem restrikcionih enzima, omogućeno je razlikovanje vrste *A. parasiticus* od morfološki slične vrste *A. flavus*, što je ujedno i prva identifikacija ove patogene vrste na molekularnom nivou u Srbiji.**
 - **Morfološka, patogena, ekološka, odgajivačka, toksigena i molekularna karakterizacija izolata *A. parasiticus* poreklom sa zrna kukuruza, pružila je uvid u prisustvo, rasprostranjenost i biodiverzitet ove vrste u Srbiji.**

HVALA NA PAŽNJI

