



UNIVERZITET U NOVOM SADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

***ASPERGILLUS PARASITICUS* SPEARE – TOKSIGENA
VRSTE GLJIVE NA ZRNU KUKURUZA U PROIZVODNIM
USLOVIMA SRBIJE
*-Doktorska disertacija-***

Mentor: Prof. dr Ferenc Bagi

Kandidat: dipl.inž – master Milica Nikolić

Novi Sad, 2018. godine

**УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ**

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Milica Nikolić
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	dr Ferenc Bagi, redovni profesor, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad
Naslov rada: NR	<i>Aspergillus parasiticus</i> Speare – toksigena vrsta gljive na zrnu kukuruza u proizvodnim uslovima Srbije
Jezik publikacije: JP	srpski
Jezik izvoda: JI	srpski/engleski
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	AP Vojvodina
Godina: GO	2018.
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Departman za fitomedicinu i zaštitu životne sredine, Trg Dositeja Obradovića 8, 21000 Novi Sad

Fizički opis rada: FO	(broj poglavlja 9/ stranica 144/ tabela 20/ grafikona 7/ slika 26/ referenci 257/ biografija)
Naučna oblast: NO	Biotehničke nauke
Naučna disciplina: ND	Fitopatologija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	<i>A. parasiticus</i> , aflatoksini, kukuruz
UDK	561.28:633.15(043.3)
Čuva se: ČU	Biblioteka, Poljoprivredni fakultet, Trg Dositeja Obradovića 8, 21000 Novi Sad
Važna napomena: VN	-
Izvod: IZ	<p>U toku četvorogodišnjih ispitivanja (2013-2016) identifikovana je, po prvi put u Srbiji, vrsta <i>Asperigillus parasiticus</i> kao prouzrokovatelj aspergilozne truleži zrna i klipa kukuruza u polju i skladištima. Sa ciljem da se ispita rasprostranjenost i diverzitet ove vrste obavljena su proučavanja morfoloških, patogenih, molekularnih, odgajivačkih i toksigenih svojstava 46 odabranih izolata ove vrste poreklom sa zrna kukuruza. Ispitivanjem makroskopskih morfoloških karakteristika izolata ukazano je na mali biodiverzitet proučavanih izolata. Kolonije izolata na PDA hranljivoj podlozi formirale su obilnu tamnozelenu, gustu prevlaku od micelije gljive, pamučastog izgleda. Svi izolati <i>A. parasiticus</i> obrazuju jednoćelijske, nazubljene konidije na MEA hranljivoj podlozi. Prečnik konidija ispitivanih izolata varirao je od 4,08μm do</p>

6,86 μ m.

Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je statistički značajan uticaj interakcije ispitivanih izolata, svetlosnog režima i temperature ($p < 0.01$) na dnevni porast prečnika kolonija.

Test patogenosti ukazao je da su svi ispitivani izolati *A. parasiticus* patogeni na klipu kukuruza, kao i da postoji divergentnost u ispoljavanju virulentnosti.

Poređenjem koncentracija sintetisanih 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 (50%) su u najvećem procentu sintetisali AFB1 (84,78%), dok je procenat izolata koji su sintetisali AFG1 bila znatno manja (15,22%). Međutim, 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 ($r = 0,63^{**}$).

	<p>Multiplex PCR detekcijom potvrđen je identitet svih izolata prethodno okarakterisanih na osnovu morfoloških, ekoloških, odgajivačkih i toksigenih karakteristika kao vrsta <i>A. parasiticus</i>. Primenom RFLP-PCR metode korišćenjem restrikcionih enzima, omogućeno je razlikovanje vrste <i>A. parasiticus</i> od morfološki slične vrste <i>A. flavus</i>, što je ujedno i prva identifikacija ove patogene vrste na molekularnom nivou u Srbiji.</p>
<p>Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP</p>	<p>24.05.2018.</p>
<p>Datum odbrane: DO</p>	
<p>Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO</p>	<p>Mentor:</p> <p>_____</p> <p>Dr Ferenc Bagi, redovni profesor, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad</p> <p>Predsednik:</p> <p>_____</p> <p>Dr Vera Stojšin, redovni profesor, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad</p> <p>Članovi:</p> <p>_____</p> <p>Dr Slavica Stanković, naučni savetnik, Institut za kukuruz „Zemun Polje”, Beograd</p>

UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF AGRICULTURE
Key word documentation

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD thesis
Author: AU	Milica Nikolić
Mentor: MN	Dr Ferenc Bagi, professor, Faculty of agriculture, Novi Sad
Title: TI	<i>Aspergillus parasiticus</i> Speare – a toxigenic species on maize kernels under production conditions in Serbia
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	Serbian/English
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	AP Vojvodina
Publication year: PY	2018.
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	University of Novi Sad, Faculty of Agriculture, Department for Environmental and Plant Protection, Dositeja Obradovića sq. 8, 21000 Novi Sad

Physical description: PD	9 chapters and attachment/ 144 pages/ 20 tables/ 7 graphs/ 26 photos/ 257 references/ biography
Scientific field SF	Biotechnical Sciences
Scientific discipline SD	Phytopathology
Subject, Key words SKW	<i>A. parasiticus</i> , aflatoxins, maize
UC	561.28:633.15(043.3)
Holding data: HD	Library of the Faculty of Agriculture, Novi Sad
Note: N	-
Abstract: AB	<p>In the course of four-year studies (2013-2016), the species <i>Aspergillus parasiticus</i> was identified in Serbia for the first time as a causal agent of aspergillus kernel and ear rot in both fields and storages. In order to examine the distribution and diversity of this species, the study of morphological, pathogenic, molecular and toxigenic properties of 48 isolates of this species selected from maize kernels was carried out. Studies of macroscopic morphological traits of isolates showed that biodiversity of observed isolates was low. Colonies of the isolates formed on PDA the abundant dark green, dense cottony mycelium coating. All isolates of <i>A. parasiticus</i> formed unicellular denticulate conidia on MEA. The diameter of conidia of observed isolates varied from 4.08µm to 6.86µm.</p>

Two factorial analysis of variance showed that the effects of interactions of studied isolates, light regime and temperatures ($p < 0.01$) on daily growth of the colony diameters were statistically significant.

The pathogenicity test pointed out that all observed isolates of *A. parasiticus* were pathogens of maize ears, as well as that there was divergence in the virulence expression.

The comparison of concentrations of synthesised mycotoxins in isolates obtained by ELISA showed a statistically highly significant positive correlation between potential to produce AFB1 and AFLA in tested isolates ($r = 0.66^{**}$).

The observed isolates *A. parasiticus* that synthesised aflatoxins (50%) mostly synthesised AFB1 (84.78%), while the number of isolates that synthesised AFG1 was significantly lower (15.22%). However, it was established that eight isolates synthesised AFG1 at higher concentrations than AFB1. Mycotoxin concentrations in *A. parasiticus* isolates were compared by using the results obtained by the HPLC method. The comparison indicated that there was a highly statistically positive correlation between synthesised concentrations of AFB1 and AFG1 ($r = 0.82^{**}$), as well as between AFB2 and AFG2 ($r = 0.63^{**}$).

The identity of all isolates previously

	<p>characterised on the basis of morphological, ecological and toxigenic properties as species <i>A. parasiticus</i> was confirmed by the multiplex PCR detection method. Distinguishing between species <i>A. parasiticus</i> and morphologically similar species <i>A. flavus</i> was enabled by the application of the RFLP-PCR method, using restriction enzymes. This was also the first identification of this pathogenic species at the molecular level in Serbia.</p>
<p>Accepted on Senate on: AS</p>	<p>24.05.2018.</p>
<p>Defended: DE</p>	
<p>Thesis Defend Board: DB</p>	<p>Mentor:</p> <p>_____</p> <p>Ferenc Bagi, PhD, Professor, Faculty of Agriculture, Novi Sad</p> <p>President:</p> <p>_____</p> <p>Vera Stojšin, PhD, Professor, Faculty of Agriculture, Novi Sad</p> <p>Members:</p> <p>_____</p> <p>Slavica Stanković, PhD, Principal Research Fellow, Maize Research Institute “Zemun Polje”, Belgrade</p>

Zahvalnica

Zahvalujem se Institutu za kukuruz „Zemun Polje” na materijalnoj i tehničkoj podršci prilikom izrade doktorske disertacije. Ovo istraživanje je podržano/finansirano od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (evidencioni broj projekta TR 31023) “Redukcija toksigenih gljiva roda Fusarium i njihovih mikotoksina u proizvodnji zdravstveno bezbedne hrane na bazi žita”, pod rukovodstvom dr Slavice Stanković.

Najveću zahvalnost dugujem Rukovodiocu Laboratorije za fitopatologiju Instituta za kukuruz „Zemun Polje“, dr Slavici Stanković na ogromnom prenesenom znanju, stručnosti, kontinuiranom praćenju mog rada, dragocenim savetima, podršci i svemu ostalom što me je oblikovalo u istraživačkom radu i omogućilo izradu disertacije. Njena pomoć je bila dragocena svih ovih godina, stoga ovu avanturu dugujem njoj.

Zahvaljujem svom mentoru prof. dr Ferencu Bagiju na idejama, predlozima i savetima koje su uobličile disertaciju.

Zahvaljujem se dr Ani Nikolić, rukovodiocu eksperimentalnog dela koji se odnosio na molekularnu karakterizaciju, na pomoći u obuci za sprovođenje analize, tumačenju rezultata i pisanju disertacije.

Iskazujem zahvalnost i prof. dr Veri Stojšin na interesovanju i stručnim savetima u toku izrade disertacije.

Hvala celom istraživačkom timu Laboratorije za fitopatologiju Instituta za kukuruz “Zemun Polje“: Mirjani Živković, Danijeli Medić i Dušici Mitić na tehničkoj i organizacionoj pomoći. Hvala mojim dragim kolegama iz Instituta za kukuruz “Zemun Polje”, a naročito mas. inž. Ivi Savić na ogromnoj pomoći u laboratorijskom radu.

Hvala svim mojim prijateljima za razumevanje, moralnu i emotivnu podršku.

Posebnu zahvalnost dugujem svojoj porodici, koji su mi pružali potporu, podršku, bili strpljivi i verovali.

SADRŽAJ

1 UVOD	3
2 PREGLED LITERATURE	6
2.1 Privredni značaj kukuruza.....	6
2.2 Gljive roda <i>Aspergillus</i>	7
2.3 Klasifikacija i taksonomija roda <i>Aspergillus</i>	8
2.4 Taksonomija vrste <i>Aspergillus parasiticus</i>	9
2.5 Biodiverzitet i biogeografija vrste <i>Aspergillus parasiticus</i>	10
2.6 Ciklus razvoja i epidemiologija vrste <i>Aspergillus parasiticus</i>	14
2.7 Polifazni pristup u identifikaciji gljive <i>Aspergillus parasiticus</i>	15
2.7.1 Morfološka svojstva <i>Aspergillus parasiticus</i>	17
2.7.2 Ekološka i odgajivačka svojstva <i>Aspergillus parasiticus</i>	18
2.7.3 Toksigena svojstva <i>Aspergillus parasiticus</i>	19
2.7.4 Molekularna svojstva <i>Aspergillus parasiticus</i>	19
2.8 Aflatoksini	20
2.8.1 Vrste roda <i>Aspergillus</i> sekcije Flavi koje sintetišu aflatoksine.....	21
2.8.2 Faktori koji utiču na sintezu aflatoksina	22
2.8.3 Aflatoksikoze.....	23
2.8.4 Zakonska regulativa/Dozvoljene koncentracije aflatoksina u kukuružu.....	25
5 MATERIJAL I METODE	30
5.1 Izolacija i identifikacija vrste <i>Aspergillus parasiticus</i>	30
5.1.1 Pregled terena i uzorkovanje aspergilioznih klipova	30
5.1.2 Izolacija gljiva i dobijanje čistih kultura.....	32
5.1.3 Dobijanje monospornih izolata i čuvanje cultura	33
5.1.4 Identifikacija izolata <i>Aspergillus parasiticus</i> na osnovu morfoloških svojstava ...	34
5.1.5 Proučavanje patogenih svojstava izolata <i>Aspergillus parasiticus</i>	38
5.1.6 Toksikološki profil izolata <i>Aspergillus parasiticus</i>	40

5.1.7 Molekularna detekcija izolata <i>Aspergillus parasiticus</i>	47
6 REZULTATI	51
6.1 Izolacija i identifikacija izolata <i>Aspergillus parasiticus</i>	51
6.1.1 Pregled terena i uzorkovanje aspergilioznih klipova	51
6.1.2 Izolacija gljiva, odabir izolata i dobijanje monospornih izolata	52
6.1.3 Identifikacija izolata <i>Aspergillus parasiticus</i> na osnovu morfoloških svojstava ...	56
6.1.4 Proučavanje patogenih svojstava izolata <i>Aspergillus parasiticus</i>	77
6.1.5 Toksikološki profil izolata <i>Aspergillus parasiticus</i>	90
6.1.6 Molekularna identifikacija izolata <i>Aspergillus parasiticus</i>	98
7 DISKUSIJA	101
7.1 Morfološka karakterizacija <i>Aspergillus parasiticus</i>	101
7.2 Ekološke i odgajivačke karakteristike <i>Aspergillus parasiticus</i>	104
7.3 Patogene odlike <i>Aspergillus parasiticus</i>	106
7.4 Toksigena svojstva <i>Aspergillus parasiticus</i>	108
7.5 Molekularne odlike <i>Aspergillus parasiticus</i>	111
8 ZAKLJUČAK	114
9 LITERATURA	117

1 UVOD

Dobijanje stabilnih i visokih prinosa zrna velike hranljive vrednosti koji su zdravstveno bezbedni i ekonomski isplativi, predstavlja primarni cilj proizvodnje kukuruza. U najštetnija oboljenja kukuruza u našoj zemlji ubrajaju se trulež zrna i klipa. Ova bolest u povoljnim uslovima za nastanak infekcije smanjuje prinos i do 50%, pogoršava kvalitet kukuruza i na taj način dovodi do ozbiljnih gubitaka u proizvodnji.

Trulež klipa i zrna kukuruza prouzrokuju mnoge patogene i toksigene vrsta gljiva, među kojima su po štetnosti najznačajnije vrste roda *Fusarium*, kao i vrste roda *Aspergillus* sekcije Flavi. Najznačajnije vrste u svetu na ovom usevu, koje sintetišu aflatoksine su vrste koje pripadaju rodu *Aspergillus*, *Aspergillus flavus* Link i *A. parasiticus* Speare (Bennett i Klich, 2003).

Vrste roda *Aspergillus* se javljaju širom sveta na velikom broju gajenih vrsta biljaka u toku vegetacije, kao i za vreme skladištenja. Patogene vrste gljiva koje prouzrokuju trulež klipa su u većini slučajeva i toksigene, odnosno imaju sposobnost sinteze mikotoksina, koji u lancu ishrane dospevaju u hranu za ljude i životinje i izazivaju oboljenja tipa mikotoksikoza.

Mnoge vrste roda *Aspergillus* su i korisne, jer se upotrebljavaju u proizvodnji raznih antibiotika, organskih kiselina, lekova ili enzima, ili kao agensi u mnogim prehrambenim fermentacijama.

Kontaminacija kukuruza aflatoksinima zavisi od osetljivosti domaćina, pogodnih uslova spoljašnje sredine za infekciju, i u nekim slučajevima aktivnosti vektora (Munkvold, 2003). Kod kukuruza, ranija setva u umerenom klimatskom pojasu smanjuje rizik od kontaminacije, ali godišnja fluktuacija vremenskih uslova može ugroziti pozitivne rezultate ove mere.

Agroklimatski uslovi i dinamika leta kukuruznog moljca (*Ostrinia nubilalis* Hbn.) su važni faktori za pojavu i širenje *Aspergillus* vrsta u usevu u toku vegetacije (Lević i sar., 2013). Temperatura i vlaga su abiotički faktori sa najvećim uticajem na rast i razvoj *Aspergillus* vrsta (Dhanasekaran i sar., 2011). Uslovi povišene temperature i smanjene količine padavina znatno doprinose intenzitetu pojave vrsta gljiva ovog roda. U uslovima suše i visoke temperature razvoj ostalih patogenih vrsta gljiva uglavnom je onemogućen, čime se smanjuje njihova sposobnost konkurencije, što doprinosi razvoju *Aspergillus* vrsta (Payne, 1998). Obzirom da su vrste roda

Aspergillus oportunistički patogeni, većina izvrši infekciju biljnih proizvoda u skladištima koja su neuslovna.

Mikotoksini su stabilna jedinjenja, koja se mogu naći i u gotovom proizvodu koji je prošao tehnološki proces obrade. S obzirom da većina nema ukus ni miris, posebna opasnost nastaje zbog odsustva receptornog upozorenja prilikom konzumiranja hrane koja koja je kontaminirana, kao i zbog njihove visoke toksičnosti u malim količinama (Giovati i sar., 2015).

Aflatoksini su najtoksičniji i najkancerogeniji prirodno stvoreni toksini (Bennett i Klich, 2003; Yu i sar. 2004). Oni predstavljaju rizik po ljudsko zdravlje zbog visoke koncentracije u kontaminiranom kukuruzu, pamuku, soji, kikirikiju i orašastim plodovima pre žetve. Osim toga, veoma brzo nakon unosa aflatoksina B1 putem hrane u organizam sisara, dolazi do njegove transformacije u aflatoksin M1 i ekskrecije u mleko. Aflatoksini izazivaju kancerogene, mutagene, teratogene i imunomodulatorne promene kod ljudi i životinja. Tipični su hepatotoksini koji oštećuju morfološku i funkcionalnu strukturu ćelija jetre i stimulišu razvoj karcinoma jetre (Sinovec i sar., 2006).

Vrsta *A. parasiticus* prvi put je identifikovana na šećernoj trski 1912. godine na Havajima (Speare, 1912). Značajnost vrste *A. parasiticus* ogleda se u njenoj sposobnosti sinteze aflatoksina G grupe, koji su direktno toksični za čoveka.

Iako se vrste roda *Aspergillus* mogu pronaći u svim klimatskim zonama, njihova pojava je češća u subtropskom pojasu (geografska širina 26-35°), u odnosu na tropske i hladnije umerene zone, a retko kad je prisutna na geografskim širinama preko 45° (Klich, 2002b).

Populacije vrste *A. parasiticus* se uglavnom javljaju na zemljištima na kojima se uzgaja kikiriki u SAD i Australiji (Horn, 2003). Klich i Pitt (1988) navode da je ova vrsta izolovana iz kikirikija u SAD, Australiji i Ugandi. *A. parasiticus* je izolovan i iz kikirikija u Argentini (Vaamonde i sar., 2003) i Bocvani (Mphande i sar., 2004), Australiji (Pitt i Hocking, 2009).

A. parasiticus na pirinču i drugim pirinčanim derivatima se retko javlja (Sales i Yoshizawa, 2005). Ostali izvori uključuju soju (Vaamonde i sar., 2003), prerađeno meso (El-Tabiy, 2006), crni biber (Gatti i sar., 2003) kao i grickalice od korenjača, lekovi na biljnoj bazi, seme sirka i crnačkog prosa (Pitt i Hocking, 1997).

Ova vrsta je detektovana u manjem obimu u žitnim poljima (Horn, 2003). Infekcija useva žitarica vrstama roda *Aspergillus* je blaga u klimatskim uslovima koji preovladavaju u evropskim

zemljama: Austriji (Öhlinger i sar., 2004), Belgiji (Chandelier i sar., 2004), Nemačkoj (Curtui i sar., 2004), Mađarskoj (Varga i sar., 2004), Poljskoj (Perkowski i sar., 2004), Rumuniji (Ittu i sar., 2004), Engleskoj (Scudamore, 2004). Dobijeni izolati sa zrna pšenice identifikovani su kao *A. parasiticus*, po prvi put u klimatskim uslovima Srbije 2017. godine (Nikolić i sar., 2018).

Istraživanja u svetu su ukazala da se vrsta *A. parasiticus* pojavljuje u slabijem intenzitetu na kukuruзу (Aja-Nwachukwu and Emejuaiwe, 1994). Nedavno istraživanje na kukuruзу u Italiji je ukazalo na prisustvo ove vrsta *A. parasiticus* u slabom intenzitetu i u umerenom klimatskom pojasu u toku vegetacije (Giorni i sar., 2007). Postoji nekoliko izveštaja (Bennett i Klich, 2003; Dutton i Westlake, 1985) iz Južnoafričke Republike o kontaminaciji krmnih smeša vrstom *A. parasiticus*. Vrsta *A. parasiticus* identifikovana je u Nigeriji (Atehnkeng i sar., 2008), u Keniji (Okun i sar., 2015), u Kini (Gao i sar., 2007, kao i u Iranu (Razzaghi-Abyaneh i sar., 2006) na kukuruзу. Vrste roda *Aspergillus* sekcije Flavi su široko rasprostranjene u Izraelu, a u okviru nje, u nešto manjem procentu i *A. parasiticus* (Cotty, 1997; Joffe, 1969; Lisker et al., 1993; Schroeder and Boller, 1973).

Kao posledica klimatskih promena, poslednjih godina, utvrđene su promene u okviru mikopopulacija na kukuruзу u proizvodnim uslovima Srbije. Visoke temperature i dugotrajne suše pogoduju povećanoj učestalosti *Aspergillus* vrsta, dok umerene temperature više odgovaraju *Fusarium* vrstama (Nikolić i sar., 2015). Detaljnim mikotoksikološkim proučavanjima populacije roda *Aspergillus*, koja je prozrokovala intenzivnu pojavu aspergiloze klipa kukuruза u 2012. godini, utvrđeno je prisustvo vrste *A. parasiticus*, po prvi put na zrnu kukuruза u Srbiji (Stanković i sar., 2015).

Klimatske promene ogledaju se u povećanju temperaturnog gradijenta, i u skladu s tim areal vrsta roda *Aspergillus* se sve više širi. Iz pomenutih razloga može se očekivati intenzivna pojava *A. parasiticus* i u našim agroekološkim uslovima.

Obzirom na rasprostranjenost i štetnost aspergiloze klipa i zrna kukuruза u skladištima, a sada i prisustvo *A. parasiticus* u poljskim uslovima Srbije, neophodna su dalja istraživanja ovog biljnog patogena kroz detaljnu identifikaciju i karakterizaciju.

Istraživanja obuhvaćena ovom doktorskom disertacijom, usmerena su na utvrđivanje rasprostranjenosti, divergentnosti i značaja gljive *A. parasiticus* na zrnu kukuruза u našoj zemlji.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 Privredni značaj kukuruza

Kukuruz (*Zea mays* L.) je biljka sa izuzetno visokim biološkim potencijalom rodnosti. Pripada grupi biljaka sa najvećom proizvodnjom organske materije po jedinici površine. Osnovni privredni značaj kukuruza ogleda se u njegovoj raznovrsnosti upotrebe u ishrani ljudi, domaćih životinja i industrijskoj preradi, kao i u obimu proizvodnje. Poseban privredni značaj kukuruza ogleda se u mogućnosti iskorišćenja skoro celokupne nadzemne biomase biljke. Različitim tehnološkim postupcima moguće je od biljke kukuruza proizvesti više od 1.500 raznih industrijskih prerađevina (Glamočlija, 2012).

U celokupnoj svetskoj poljoprivrednoj proizvodnji najvažnija mesta pripadaju kukuruзу, pšenici i pirinču. Kukuruz, po ukupnim zasejanim površinama u svetu, zauzima treće mesto. Na osnovu podataka Organizacije za hranu i poljoprivredu (eng. *Food i Agriculture Organisation*, FAO) iz 2016. godine gajenje kukuruza odvijalo se na površini od 187.959.116 ha. Po ukupnoj svetskoj proizvodnji od 1.060.107.470 tona u 2016. bio je na drugom mestu.

U razvijenim zemljama, primarna upotreba kukuruza usmerena je na proizvodnju stočne hrane (78% od ukupne svetske proizvodnje), a potom na proizvodnju prehrambenih i industrijskih proizvoda, kao što su skrob, ulje, zaslađivači i alkohol. Iskorišćenost kukuruza za proizvodnju bioetanola poprima velike razmere poslednjih godina (Ragauskas i sar., 2006; Farrell i sar., 2006). U nerazvijenim i zemljama u razvoju, primarna upotreba kukuruza je prvenstveno namenjena za ljudsku ishranu, gde se predviđa i stopa porasta od 1,3% do 2020. godine (Ortiz i sar., 2010). Na osnovu globalnih predviđanja, kukuruz će postati usev sa najvećom proizvodnjom do 2025. godine, a potreba za ovom kulturom će se udvostručiti u zemljama u razvoju do 2050. godine (Rosegrant i sar., 2008).

Zbog velikog privrednog značaja, površine pod kukuruzom se u svetu povećavaju iz godine u godinu, a proizvodnja se širi i na nova geografska područja. Prema FAO podacima, u 2016. godini kukuruz je najviše gajen u Severnoj i Južnoj Americi (70.072.218 ha), Aziji (63.452.629 ha), Africi (36.610.956 ha) i u Evropi (17.746.047 ha) (FAO, 2018).

Najveće površine u Evropi u 2013. godini pod kukuruzom bile su u Ukrajini (4.252.200 ha), Rusiji (2.777.019 ha), Rumuniji (2.578.523 ha), Francuskoj (1.487.041 ha), Mađarskoj (1.198.207 ha) i Srbiji (1.010.097 ha) (FAO, 2018).

Kukuruz je jedna od najvažnijih gajenih žitarica na svetu, a u Srbiji se po proizvodnji nalazi na prvom mestu. Ova ratarska kultura zadovoljava domaće potrebe, a takođe predstavlja i strateški proizvod namenjen izvozu. Primarni cilj proizvodnje kukuruza je ostvarivanje stabilnih i visokih prinosa zrna velike hranljive vrednosti, koje je u isto vreme i zdravstveno bezbedno. U Srbiji se kukuruz u periodu 2014-2016. godine gajio na površini od oko 1.026.067 ha, sa prosečnim prinosom od oko 6,7 t/ha, i ukupnom godišnjom proizvodnjom od oko 6,9 miliona tona (Republički zavod za statistiku, 2017). Prema FAO podacima, 2011. godine Srbija je izvezla više od 1,6 miliona tona (FAO, 2014).

U našoj zemlji kukuruz se najviše koristi u ishrani životinja u zrnju, ali i u vidu silaže, kao cela biljka. Postoji veliki broj proizvoda za ljudsku ishranu, kao što su brašno, griz, škrob, ulje i sirup. Sastavni deo je i mnogih namirnica (hleb, kolači, keks, supe, sosovi, kaše, kokice). U industrijskoj proizvodnji, procesima fermentacije i destilacije dobija se alkohol (čak i neki tipovi viskija), a kukuruz se sve više koristi i za proizvodnju bioetanolu i biorazgradive plastike (Torney i sar., 2007; Schgiwietzke i sar., 2008).

2.2 Gljive roda *Aspergillus*

Aspergillus je jedan od najvažnijih rodova patogenih vrsta gljiva, i uključuje veliki broj vrsta koje imaju značajan uticaj kao humani, animalni i biljni patogeni, kao posrednici u kvarenju hrane i producenti toksičnih supstanci. Međutim, neke od najvažnijih vrsta ovog roda koriste se u fermentaciji i biotehnologiji hrane za proizvodnju antibiotika, organskih kiselina, lekova i enzima (Samson i sar., 2014).

Aspergillus je anamorfni rod koji pripada porodici Aspergillaceae, redu Eurotiales, podklasi Eurotiomycetidae, klasi Eurotiomycetes, pododeljku Pezizomycotina, odeljku Ascomycota, carstvu Fungi. Karakteriše ga okruglasta do izdužena aspergila koja nosi duge lance konidija, zbog kojih gljiva ima karakterističnu morfologiju. Neke vrste roda se seksualno razmnožavaju, imaju teleomorfe, koji su po pravilu kleistotecije koje nose nepravilno raspoređene askospore u raspuknutim/pucajućim askusima.

Za vrste roda *Aspergillus* karakteristično je da obrazuju konidiofore sa velikom, pojačanom drškom/stipom i uvećanim vrhovima koji se nazivaju vezikule. Vezikule su uglavnom okrugle, ali mogu biti i izdužene. Vezikule nose veliki broj fialida, ili metula i fialida, koje se sve obrazuju u isto vreme. Još dva svojstva su karakteristična za većinu, ali ne i za sve vrste roda *Aspergillus*. Prvo, stipe su obično obrazovane iz kratkih ćelija koje se nazivaju *ćelije stopala* unutar fertilne hife. Drugo, stipe su obično neseptirane, tako da vezikula, stipa i ćelija stopala zajedno obrazuju jednu jedinu veliku ćeliju (Pitt i Hocking, 2009).

Vrste *Aspergillus* spp. se smatraju oportunističkim patogenima mnogih useva (kukuruz, pamuk, kikiriki, razne vrste oraha) jer su im potrebne povrede ili već oslabljeni domaćini da bi ih kolonizovali (Raper i Fennell, 1965). Vrsta *A. flavus* ima ograničene parazitske sposobnosti, a u nekim slučajevima može direktno da zarazi seme i kolonizuje živa tkiva (Payne i Brown, 1998). Ova vrsta sintetiše mnoge sekundarne metabolite, uključujući aflatoksine, najtoksičnija i najkancerogenija prirodna jedinjenja koja mogu izazvati rak kod ljudi. Ove vrste ne snižavaju samo prinos poljoprivrednih kultura, već i smanjuju kvalitet zrna.

Rod *Aspergillus* je podeljen u dve osnovne grupe, na osnovu sposobnosti sinteze aflatoksina. Prva grupa obuhvata vrste *A. flavus*, *A. parasiticus* i *A. nomius*, koje sintetišu aflatoksine, dok druga uključuje vrste *A. oryzae*, *A. sojae* i *A. tamarii*, koje su atoksigene i koriste se u procesu fermentacije u zemljama Azije (Kumeda i Asao, 2001).

2.3 Klasifikacija i taksonomija roda *Aspergillus*

Taksonomija roda *Aspergillus* je složena i stalno se razvija. Klasična sistematika roda *Aspergillus* bazirana je pre svega na morfološkim i odgajivačkim karakteristikama (Raper i Fennell, 1965; Samson, 1979; Klich i Pitt, 1988; Kozakiewicz, 1989). U pojedinim sekcijama ovog roda javljaju se značajna morfološka variranja, čiji je rezultat kompleksna taksonomska šema. Poslednjih decenija, taksonomija ovog roda evoluirala je od jednostavnog morfološkog koncepta do polifaznog pristupa uključujući biohemijske, ekološke, genetičke i molekularne karakteristike. S obzirom da metode vremenom postaju osetljivije i preciznije, vrste konstantno bivaju dodate ili reklasifikovane u okviru roda (Peterson, 2000, 2008; Rigó i sar., 2002; Klich i sar., 2003; Samson i sar., 2004b; Frisvad i sar., 2005; Hong i sar., 2005; Serra i sar., 2006; Varga i sar., 2007a, 2007b; Mares i sar., 2008; Peterson i sar., 2008; Pildain i sar., 2008).

Raper i Fennell (1965) su objavili prvu monografiju o rodu *Aspergillus*, u kojoj su opisali 132 vrste i 18 varijeteta. Oni su podělili vrste u 18 neformalnih grupa, koje ne poseduju kategoriju klasifikacije u Međunarodnom kodeksu botaničke nomenklature (*International Code of Botanical Nomenclature*, ICBN). Oni su zadržali generički naziv *Aspergillus* za savršeni (teleomorf) i nesavršeni stadijum (anamorf). Samson (1979) identifikovao je još 90 novih taksona, od kojih je samo 34 prihvaćeno.

Taksonomija roda je prerađena i uvedene su kategorije kao što su sekcije i podrodovi (Gams i sar., 1985). Pitt i sar. (2000) su objavili spisak prihvaćenih vrsta i sinonima u okviru familije Trichocomaceae. Ova lista obuhvatala je 204 vrste u okviru roda *Aspergillus*. Peterson je iste godine, nakon filogenetskih istraživanja koristeći ribozomalne RNK od 215 *Aspergillus* vrsta, predložio izmene na postojećoj nomenklaturi, grupisanjem vrsta u tri podroda i 16 sekcija (Peterson, 2000).

Tokom kratkog perioda od sedam godina, Geiser i sar. (2007) su identifikovali novih 40 vrsta. Peterson i sar. (2008) su predložili da se rod podeli u 8 podrodova i 18 sekcija, s 12 povezanih teleomorfni rodova. Nakon toga, identifikovane su brojne vrste (Mares i sar., 2008; Pildain i sar., 2008), tako da je ukupan broj vrsta iznosio 260. Ovaj broj ukazuje na poteškoće u formiranju stabilne, funkcionalne i taksonomski pouzdane šeme za ovaj rod.

Poslednja revizija roda datira iz 2014. godine kada su Houbraken i sar. (2014) i Hubka i sar. (2014) predložili 4 podroda (*Aspergillus*, *Circumdati*, *Fumigati* i *Nidulantes*) i 20 sekcija. Filogenetska istraživanja (Berbee i sar. 1995, Ogawa i sar. 1997, Tamura i sar. 2000, Geiser i sar. 2008, Peterson 2008, Peterson i sar. 2008, Houbraken i Samson 2011) rasvetlila su odnose između vrsta, ali su ostala nerešena pitanja u vezi generičkog koncepta. Zbog nove nomenklature gljiva (McNeill i sar. 2012), od velike važnosti je definisati filogenetske odnose vrsta u okviru roda *Aspergillus* i blisko povezanih rodova. Morfološka identifikacija roda *Aspergillus* se uglavnom pridržava protokola koje su opisali Raper i Fennell (1965), Klich (2002), Pitt i Hocking (2009) i Samson i sar. (2010).

2.4 Taksonomija vrste *Aspergillus parasiticus*

Raznolikost staništa u kojima se javljaju vrste roda *Aspergillus* sekcije Flavi i sposobnost nekih vrsta da produkuju aflatoksine čini ovu grupu najproučavanijom u okviru roda *Aspergillus*. Raper i Fennell (1965) su prvobitno uključili devet vrsta i dva varijeteta u tadašnju *A. flavus*

grupu: *A. flavus*, *A. flavus* var. *columnaris*, *A. parasiticus*, *A. oryzae*, *A. oryzae* var. *effesus*, *A. zonatus*, *A. clavato-flavus*, *A. tamaris*, *A. flavofurcatus*, *A. subolivaceus* i *A. avenaceus*. Od tada su usledile brojne izmene dodavanjem novih vrsta ili premeštanjem već postojećih u okviru sekcije Flavi.

Imajući u vidu najtipičnije šeme identifikacije, rod *Aspergillus* sekcija Flavi obuhvata šest ekonomski važnih vrsta: *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*, *A. oryzae*, *A. sojae* i *A. tamaris* po svojim morfološkim i filogenetskim svojstvima. Iako ove vrste dele značajan broj svojstava, razlikuju se u glavnom: sposobnosti da sintetišu aflatoksine. Vrste roda *Aspergillus* sekcije Flavi su podeljene u dve grupe. Grupa kojoj pripadaju široko rasprostranjene aflatoksigene vrste, *A. flavus*, *A. parasiticus* i *A. nomius* predstavlja ozbiljan problem po zdravlje ljudi i domaćih životinja, jer vrste ove grupe mogu da se razvijaju u skoro svim usevima ili hrani.

Raper i Fennell (1965) su razlikovali vrste *A. parasiticus* i *A. flavus* samo po obrazovanju fialida. Klich i Pitt (1985, 1988) su pokazali da ovaj kriterijum nije zadovoljavajući, jer neke *A. flavus* vrste obrazuju veoma mali broj metula. Pažljivim ispitivanjem ukazano je na nekoliko razlika između ove dve vrste, od kojih su najkorisnije nazubljenost površinskog zida spora i sinteza mikotoksina.

Kurtzman i sar. (1986) su snizili status vrste *A. parasiticus* na podvrstu, kao *A. flavus* podvrsta *parasiticus* (Speare) Krutzman i sar., ali postoje obavezujući razlozi za očuvanje različitih naziva vrsta za ove takson. *A. parasiticus* i srodne vrste, iako manje problematične od *A. flavus*, su takođe predmet kontroverzi. *A. sojae* čiji su status Kurtzman i sar. (1986) redukovali na varijetet/podvrstu, izgleda da je oblik kulturne vrste/odomaćena forma *A. parasiticus*. Kao i *A. oryzae*, *A. sojae* se široko koristi u fermentaciji/vrenju hrane, i njeno priznavanje kao posebne vrste je praktično neophodno. Pored *A. sojae*, vrsta *A. toxicarius* nije jasno razdvojena od *A. parasiticus* (Pildain i sar., 2008). Druge vrste srodne vrsti *A. parasiticus*, takođe produkuju AFB1, AFB2, AFG1 i AFG2, morfološki su slične vrsti *A. flavus*, a opisane kao *A. arachidicola* (Pildain i sar., 2008).

2.5 Biodiverzitet i biogeografija vrste *Aspergillus parasiticus*

U pogledu distribucije i ekonomskog značaja aflatoksigenih vrsta, samo vrste koje pripadaju sekciji Flavi značajne su za zdravstvenu bezbednost hrane i prehrambenih proizvoda. Vrste *A. flavus* i *A. parasiticus* su reprezentativni predstavnici aflatoksigenih vrsta koji se

prirodno javljaju u prehrambenim proizvodima širom sveta. Dugi niz godina, istraživači nisu, u poljskim uslovima, razlikovali vrstu *A. flavus* od *A. parasiticus*, što je dovelo do konfuzije u pogledu njihove distribucije. Čak i danas, kada nove vrste bivaju stalno opisivane, neke sumnje i dalje ostaju vezane za stvarnu identifikaciju pojedinih izolata koji fenotipski podsećaju na pomenute vrste. Stoga bi, biodiverzitet i biogeografiju aflatoksigenih vrsta trebalo razmatrati s oprezom.

Vrsta *A. parasiticus* prvi put je identifikovana na šećernoj trski 1912. godine na Havajima. Iako se vrste roda *Aspergillus* mogu pronaći u svim klimatskim zonama, njihova pojava je češća u suptropskom pojasu (geografska širina 26-35°), u odnosu na tropske i hladnije umerene zone, a retko kad je prisutna na geografskim širinama preko 45° (Klich, 2002b). Stoga ne iznenađuje činjenica da su hronični aflatoksikološki problemi povezani s usevima koji se gaje na geografskoj širini manjoj od 35° i zato ne predstavljaju glavni problem u usevima koji se gaje u Evropi.

Vrste roda *Aspergillus* su široko rasprostranjene u raznim prehrambenim proizvodima, a najčešće su pronađeni u semenu uljarica, orasima, žitaricama i suvom voću. Takođe, visoko varijabilni aflatoksikološki profil vrsta roda *Aspergillus* zavisi kako od geografskog porekla, tako i od biljne vrste. Na primer, izolati ovih vrsta poreklom iz kikirikija su uglavnom toksigeni (70-100% od svih izolata) i proporcionalno značajno više od drugih useva, nezavisno od geografskog porekla (Joffe, 1969; Schroeder i Boller, 1973; Lisker i sar., 1993; Barros i sar., 2003, 2005; Vaamonde i sar., 2003; Pildain i sar., 2004; Nakai i sar., 2008). Isto tako, brazilski orah (Arrus i sar., 2005), suvo grožđe bez koštica i suve smokve (Iamanaka i sar., 2007) su povezani s veoma visokim količinama toksigenih izolata. S druge strane, populacije iz useva kao što su kukuruz, pšenica, zrna kafe i pamuk poseduju aflatoksigene izolate u opsegu 5-50% (Cotty, 1997; Wicklow i sar., 1998; Vaamonde i sar., 2003; Razzaghi-Abyaneh i sar., 2006; Atehnkeng i sar., 2008).

Vrsta *A. parasiticus* je manje rasprostranjen u prirodi, i više je adaptiran na uslove preživljavanja u zemljištu i u manjoj meri zavisi od infekcije useva u odnosu na *A. flavus* (Horn, 2007). Ova vrsta je retko izolovana iz većine prehrambenih proizvoda i smatra se da je značajnija u zemljištu i biljkama koje se razvijaju ispod površine zemlje (Klich, 2002b; Vaamonde i sar., 2003; Horn, 2005). Geografski je ograničena na SAD, Južnu Ameriku i Australiju (Frisvad i sar., 2006), a retko se javlja i u jugoistočnoj Aziji (Pitt i sar., 1993a).

Vrsta *A. parasiticus* je široko rasprostranjen u SAD, ali u manjem obimu od *A. flavus* (Horn, 2005). Ova vrsta izolovana je i u Argentini (Nesci i Etcheverry, 2002). Iako je vrsta *A. parasiticus* široko rasprostranjen u zemljištima i krmnoj hrani u SAD, Južnoj Americi, južnoj Africi, Indiji i Australiji, skoro je u potpunosti nepoznat u jugoistočnoj Aziji (Pitt i sar., 1993a, 1994, 1998). Odsustvo *A. parasiticus* iz jugoistočne Azije ukazuje na njegovu ograničenu rasprostranjenost. U zemljištima, populacije vrste *A. parasiticus* se uglavnom javljaju na kikirikiju u SAD i Australiji (Horn, 2003). Ova vrsta je detektovana u manjem obimu u žitnim poljima (Horn, 2003). Klich i Pitt (1988) navode da je najvažniji izvor iz hrane kikiriki, u kome je *A. parasiticus* endemičan, ali o ovom podatku skoro da nema pouzdanih podataka. Isti autori navode da je ova vrsta izolovana iz kikirikija u SAD, Australije i Ugandi. *A. parasiticus* je izolovan i iz kikirikija u Argentini (Vaamonde i sar., 2003) i Bocvane (Mphande i sar., 2004). Broj izolata *A. parasiticus* iz australijskog kikirikija je mnogo veći od broja izolata *A. flavus* (Pitt i Hocking, 2009). Ostali tipovi jezgrastog voća mogu, takođe, biti zaraženi: lešnik, orah, pistači i pekan orasi (Pitt i Hocking, 1997).

Istraživanja u svetu su ukazala da se vrsta *A. parasiticus* pojavljuje u slabijem intenzitetu u kukuruzu (Aja-Nwachukwu and Emejuiwe, 1994). Nedavno istraživanje na kukuruzu u Italiji je ukazalo na prisustvo ove vrste *A. parasiticus* u slabom intenzitetu i u umerenom klimatskom pojasu u toku vegetacije (Giorni i sar., 2007). *A. parasiticus* na pirinču i drugim pirinčanim derivatima se retko javlja (Sales i Yoshiziwa, 2005). Ostali izvori uključuju soju (Vaamonde i sar., 2003), prerađeno meso (El-Tabiy, 2006), crni biber (Gatti i sar., 2003) kao i grickalice od korenjača, lekovi na biljnoj bazi, seme sirka i crnačkog prosa (Pitt i Hocking, 1997).

Postoji nekoliko izveštaja (Bennett i Klich, 2003; Dutton i Westlake, 1985) iz Južnoafričke Republike o kontaminaciji poljoprivrednih proizvoda vrstom *A. parasiticus*. Prisustvo vrste *A. parasiticus* je utvrđeno i u Nigeriji (Atehnkeng i sar., 2008), u Keniji (Okun i sar., 2015) na kukuruzu.

U Kini (Gao i sar., 2007), kao i u Iranu (Razzaghi-Abyaneh i sar., 2006) identifikovana je vrsta *A. parasiticus*. Vrste roda *Aspergillus* sekcije Flavi su široko rasprostranjene u Izraelu, a u okviru nje, u nešto manjem procentu i *A. parasiticus* (Cotty, 1997; Joffe, 1969; Lisker et al., 1993; Schroeder and Boller, 1973).

Infekcija useva žitarica vrstama roda *Aspergillus* je blaga u klimatskim uslovima koji preovladavaju u evropskim zemljama: Austriji (Öhlinger i sar., 2004), Belgiji (Chandelier i sar., 2004), Nemačkoj (Curtui i sar., 2004), Mađarskoj (Varga i sar., 2004), Poljskoj (Perkowski i sar., 2004), Rumuniji (Ittu i sar., 2004), Engleskoj (Scudamore, 2004).

Poslednjih godina, klimatske promene pogodovale su neuobičajeno visokom intenzitetu pojave patogenih i toksigenih vrsta roda *Aspergillus* u agroekološkim uslovima u toku vegetacije kukuruza u Srbiji (Nikolić i sar., 2015). Visoke temperature, kao i visoka relativna vlažnost vazduha su neophodne za pojavu i intenzivniji razvoj aspergiloze klipa u poljskim uslovima. U Srbiji vrsta *A. parasiticus* prvi put izolovana je sa zrna kukuruza u vegetaciji 2012. godine (Stanković i sar., 2015). Dobijeni izolati sa zrna pšenice identifikovani su kao *A. parasiticus*, po prvi put u klimatskim uslovima Srbije 2017. godine (Nikolić i sar., 2018).

Razlike u strukturi zajednica aflatoksigenih gljiva ogledaju se u povećanoj brojnosti aflatoksina grupe B i G u usevima proizvedenim u pojedinim regionima (Cotty, 1997). Prosečni potencijal produkcije aflatoksina zajednica gljiva varira po regionima (Cotty, 1997; Jaime-Garcia i Cotty, 2006). Na primer, učestalost geografske divergentnosti kod visoko aflatoksigenih S-sojeva se povezuje sa povećanim sadržajem aflatoksina u usevima. Takođe, regioni i kulture u kojima je više prisutna vrsta *A. parasiticus* se obično vezuju za više nivoe kontaminacije aflatoksinima G za razliku od regiona u kojima dominira vrsta *A. flavus*.

Faktori odgovorni za toksikološki profil gljive *A. parasiticus* u nekom regionu ili supstratu nisu dovoljno razjašnjeni. Bilgrami i sar. (1988) ukazuju da štetni/negativni uticaji sredine koji su uobičajeni u prirodi (kompeticija s drugim mikroorganizmima i izloženost stresnim uslovima) stabilizuje sposobnost produkcije aflatoksina, i ostala svojstva divljeg tipa, koji su izgubljeni u nutritivno bogatim sredinama. Perrone i sar. (2007) dalje ukazuju na to da su izolati sekcije Flavi pre svega saprofiti, da poliketidni metaboliti kao što su aflatoksini mogu da povećavaju preživljavanje gljiva u zemljištu, kao i da su ti benefiti nepotrebni u okruženjima bogatim ugljenikom, u kojima sposobnost produkcije aflatoksina može biti suvišna funkcija. Prilagođenost vrsta roda *Aspergillus* određenim usevima pre svega onima bogatim ugljenikom, možda doprinosi gubitku gena, jer mnogi izolati koji nisu sposobni da produkuju aflatoksine imaju višestruke mutacije u svojim genskim klasterima aflatoksina (Chang i sar., 2005).

U odsustvu normalnih uslova, izolati vrste *A. parasiticus* mogu izgubiti neke od svojih osnovnih razvojnih funkcija, pa je tako gubitak produkcije aflatoksina obično povezan s gubitkom obrazovanja konidija (Guzman-de-Pena i Ruiz-Herrera, 1997; Kale i sar., 2003; Wilkinson i sar., 2004). Nedostatak izolata vrste *A. parasiticus* opravdava činjenicu da su skoro svi izolati aflatoksigeni. Ova teorija može biti podržana činjenicom da je pregledom zemljišta ili biljaka koje rastu ispod površine zemlje (kikiriki) zapažena veća učestalost vrste *A. parasiticus* i aflatoksigenih vrsta *A. flavus*, u odnosu na useve koji nemaju direktan kontakt sa zemljištem, kao što su kukuruz i badem (Barros i sar., 2003, 2005). Takođe, prisustvo vrste *A. parasiticus* je obično veće u zemljištu, nego u odgovarajućem usevu koji se gaji na tom zemljištu (Doster i sar., 1996).

2.6 Ciklus razvoja i epidemiologija vrste *Aspergillus parasiticus*

Vrste *A. flavus* i *A. parasiticus* su srodne gljive, koje se razvijaju kao saprofit na semenu i biljnim ostacima. Vrsta *A. parasiticus* je više adaptirana na zemljište, uglavnom naseljavajući kikiriki u tropskim i subtropskim krajevima, dok je vrsta *A. flavus* više prilagođena vazдушnim i folijarnim uslovima i u najvećoj meri kontaminira kukuruz (Diener i sar., 1987). Vrste roda *Aspergillus* sekcije Flavi su veoma rasprostranjene gljive koje se mogu naći u zemljištu, vazduhu i ostacima biljnog materijala (Horn i sar., 1998). Ukoliko postoje odgovarajući povoljni uslovi, do pojave razvoja i razmnožavanja gljiva roda *Aspergillus* i sinteze aflatoksina može doći tokom rasta kukuruza na njivi, za vreme žetve, transporta, skladištenja i prerade kukuruza (Bankole i Adebanjo, 2003).

Ciklus razvoja gljive *A. parasiticus* se, kao i kod ostalih vrsta sekcije Flavi, može podeliti u dve glavne faze. Prva faza podrazumeva kolonizovanje ostataka biljaka u zemljištu, a druga infekciju delova semena i biljke u razvoju (Horn, 2007). Gljiva prezimljava u vidu micelije u zaraženim biljnim ostacima ili u obliku sklerocija u zemljištu (Diener i sar., 1987). U povoljnim uslovima temperature i vlažnosti vazduha tokom vegetacionog perioda, iz sklerocija se stvaraju konidije koje se dalje raspršuju u zemljištu i vazduhu (Bennett i sar., 1986). Posredstvom vetra ili insekata, spore gljiva se prenose na velika rastojanja i tako dospevaju na kukuruz.

Kada je kukuruz izložen stresnim uslovima suše, odnosno deficitu vlage u kritičnim periodima svoga razvoja, infekcija se obavlja preko svile ili oštećenja na klip (O'Brian i sar.,

2007). Ukoliko su insekti, ptice ili glodari oštetili pojedine delove biljke kukuruza, prodor gljive u biljku će biti intenzivniji (Payne i sar., 1998).

Infekcija se obavlja preko svile ili oštećenja na klipku kukuruza. Konidije kličaju na svili i obrazovana micelija dalje prodire niz klip, kolonizirajući komušinu i površinu zrna, a retko i kočanku. Prisustvo gljiva na površini zrna omogućava brzo naseljavanje klipa posle oštećenja tkiva od mehaničkih uzroka ili od insekata.

Infekcija se ostvaruje na visokoj temperaturi i relativnoj vlažnosti vazduha (Marić i sar., 2002). Vrste roda *Aspergillus* sekcije Flavi su široko rasprostranjene u tropskom i suptropskom klimatu (Raper i Fennell, 1965), između 26° i 35° severne i južne geografske širine (Klich, 2007). Minimalne temperature za porast gljiva ovog roda su 10-12,8°C, maksimalne 43-48,8°C, dok su optimalne oko 34°C. Optimalna vrednost aktivnosti vode na temperaturi 25,8°C je 0,82, na 30,8°C je 0,81, a na 37,8°C predstavlja 0,80 (Pitt i Hocking, 2009).

2.7 Polifazni pristup u identifikaciji gljive *Aspergillus parasiticus*

Vrste roda *Aspergillus* su tradicionalno identifikovane prema morfološkim karakteristikama. Obeležje roda karakteriše jedinstven konidiofor, pri čemu je identifikacija na nivou vrste značajno složenija. U stvari, struktura slična aspergili koja nosi spore predstavlja karakteristično stvojestvo roda. Tokom diferencijacije micelije određene ćelije se uvećavaju, razvijaju masivan ćelijski zid i stvaraju ćelije pojačanih hifa u obliku slova 'T' ili 'L' koje stvaraju jednu konidioforu upravnu na dugačku osu ćelije. Ova uspravna grana hife se uvećava na vrhu i formira zaobljenu, eliptičnu ili vezikulu u obliku palice. Kod nekih vrsta, fertilna površina vezikule se izdiže do sloja ćelija koje se nazivaju fialide koje stvaraju dugačke lance mitotskih spora, koje se nazivaju konidije ili konidiospore. Ovaj tip se naziva jednoredni. U drugim slučajevima, sloj ćelija zvanih metule se stvara između vezikule i filijada, a aspergile su raspoređene u dva niza. Taj tip se naziva dvoredni.

Veličina i ornamentacija konidiofora koji nosi konidije, kao i boja spora koje nose predstavljaju važne karakteristike na osnovu kojih se vrši identifikacija. Mikromorfološka karakterizacija, takođe, zavisi od morfologije stipa, ornamentacije konidija, prisustva *hülle* ćelija, kao i od morfologije kleistotecija i askospora, ako su prisutne (Kozakiewicz, 1989; Klich,

2002a). Kleistotecije predstavljaju seksualno reproduktivne tvorevine koje sadrže askuse sa askosporama. *Hülle* ćelije su zadebljale, često okruglaste, ćelije koje se povezuju s kleistotecijom, i čija funkcija nije poznata (Rodrigues, 2011).

Boja i prečnik kolonija, stvaranje eksudata i rastvorljivih pigmenata, brzina porasta, otpornost na visoke temperature, kao i prisustvo sklerocija i kleistotecija predstavljaju glavna makromorfološka i fiziološka svojstva koja se koriste u identifikaciji vrsta. Sklerocije su okrugle mase micelije, melanizovane sa spoljne strane. Veruje se da je njihova uloga značajna prilikom održavanja vrste u nepovoljnim uslovima. Morfološke karakteristike sklerocija (boja, oblik, dimenzije), takođe pomažu u identifikaciji. Pored ovih svojstava, izolati vrsta roda *Aspergillus* odlikuju se svojim fiziološkim odgovorima na različite uslove: porast na određenim temperaturama (Samson i sar., 2007), aktivnost vode i pH vrednost, porast na različitim podlogama (Samson i sar., 2007), stvaranje ekstracelularnih/izvanćelijskih enzima, profili masnih kiselina (Blomquist i sar., 1992; Fraga i sar., 2007).

Savremena identifikacija vrsta *A. flavus* i *A. parasiticus* zasniva se na opisima i ključnim odrenicama istraživača Raper i Fennell (1965). Osnovno razdvajanje ovih dveju vrsta je prisustvo metula i fjalida (glava konidije raspoređena u dva niza) za vrstu *A. flavus* i samo fjalida (glava konidije raspoređena u jednom nizu) za vrstu *A. parasiticus*. Jedini izazov je što, u ključu za vrstu *A. parasiticus* reči "strogo/isključivo raspoređen u jednom nizu/jednoredni" su zamenile ranije izraze "obično" ili "uglavnom jednoredni", kao što je korišćeno u prethodnim ključevima (Thorn i Raper, 1945). Kozakiewicz (1995) je ispitivanjem većeg broja izolata *A. parasiticus* pokazao da do 10% glava konidija u koloniji *A. parasiticus* može da ima metule i fjalide (raspored u dva niza). Pored toga, svi izolati vrste *A. flavus* ne stvaraju stalno metule (Klich i Pitt, 1988). Ornamentacija zida konidija se sada smatra primarnim znakom za utvrđivanje razdvajanja ove dve vrste. Konidije vrste *A. flavus* imaju relativno tanke zidove, koji su fino ili umereno hrapavi/neravni. Njihov oblik može da varira od okruglog do eliptičnog. Konidije *A. parasiticus* su više loptaste/sferične, imaju relativno debele zidove i primetno su bodljikaste ili čekinjaste. Takođe, vezikule vrste *A. flavus* su veće, prečnika do 50 μm , i obično imaju metule, dok prečnik vezikule *A. parasiticus* retko prelazi 30 μm , a metule nisu uobičajene.

Nijedan metod koji se primenjuje u identifikaciji (morfološki, fiziološki, molekularni) ovih vrsta nije savršen/pouzdan. To je razlog zašto taksonomisti svoja istraživanja zasnivaju na osnovu kombinacija svih podataka. Karakteristike koje se koriste u klasifikaciji i identifikaciji

vrsta roda *Aspergillus* su: morfološke u kombinaciji s fiziološkim i ekološkim, sekundarni metabolizam i DNK sekvence. Što je više parametara dostupno, pouzdanost klasifikacije je veća. U slučaju da nisu svi pristupi polifazne šeme u saglasnosti, klasifikacija treba da bude kompromis koji sadrži minimum protivrečnosti (Samson i Varga, 2009).

2.7.1 Morfološka svojstva *Aspergillus parasiticus*

Kolonije vrste *A. parasiticus* na CYA podlozi iznose 50-70 mm u prečniku. Ravne su, niske, guste i prekrivene gustim, pravim, dugačkim i mekim trihomama. Micelija je neupadljiva/neprijetna, bele boje. Glavice konidija su u ujednačenom, gustom sloju, tamnožućkasto zelene. Povremeno se obrazuju sklerocije. Naličje kolonije je bezbojno ili mrko. Kolonije na MEA podlozi iznose 50-65 mm u prečniku, u osnovi su slične kao na CYA podlozi, ali mnogo manje guste i sa bezbojnim naličjem. Nema porasta na 5°C. Na 37°C, kolonije izolata slične su onima na CYA podlozi na 25°C, tamnozelene ili mrkaste/smeđkaste. Naličje kolonije je blede. Sklerocije se povremeno obrazuju, i one su u početku bele, a zatim postaju crne, okrugle, 400-800 µm u prečniku (Pitt i Hocking, 2009). Otkriven je i polni stadijum razmnožavanja, čiji se teleomorf nalazi u okviru roda *Petromyces*, prema kome je ova vrsta dobila ime *Petromyces parasiticus* (Horn i sar, 2009).

Konidiofori se stvaraju pod površinom i na površini hifa; stipe su duge 250-500 µm, sa bezbojnim ili bledomrkim, glatkim zidovima; vezikule su loptaste, 20-35 µm u prečniku, fertile na više od ¾ površine, uglavnom samo sa fialidama, ali kod nekih izolata i do 20% glavica ima i metule; fialide su duge 7-11µm; konidije su loptaste, uglavnom 4,0-6,0 µm u prečniku, sa izrazito hrapavim zidovima, obično se nalaze u "zrakastim" glavicama (Pitt i Hocking, 2009).

Ono što je zajedničko vrstama *A. parasiticus* i *A. flavus* je da brzo rastu i na 25 i na 37°C, kao i izrazito sjajna žuto-zelena boja konidija. Ono po čemu se *A. parasiticus* razlikuje od *A. flavus* je obrazovanje okruglih konidija sa masivnim, hrapavim zidovima, dok je oblik konidija *A. flavus* promjenljiv, a zidovi relativno tanki, obično fino hrapavi (Pitt i Hocking, 2009).

U okviru roda, identifikacija vrsta koje pripadaju sekciji Flavi se bazira na morfološkim i toksigenim karakteristikama.

Osim mikroskopije, postoji još nekoliko izabраниh podloga, koje mogu biti korišćene da se na jednostavan način utvrdi razlika između vrsta: (i) podloga za diferencijaciju *Aspergillus flavus* i *parasiticus* (AFPA); (ii) *Coconut Cream* agar (CCA) i (iii) *Czapek Dox* podloga (CZ).

AFPA je selektivna identifikaciona podloga za detekciju vrsta roda *Aspergillus* sekcije Flavi (Pitt i sar., 1983). Ovim metodom je moguće razlikovati ove vrste od ostalih *Aspergillus* vrsta na osnovu narandžaste boje koja se razvija sa naličja petri kutija. U ovoj podlozi, smeša hloramfenikola i dihlorana, ograničava širenje kolonije gljive, sprečava rast bakterija i pomaže u identifikaciji gljiva. Smeša peptičkog rastvarača od životinjskog tkiva i kvašćev ekstrakt ubrzavaju rast vrsta gljiva koje stvaraju aflatoksine, a naročito vrste roda *Aspergillus*, kao što je vrsta *A. parasiticus*. Vrsta *A. flavus* razvija intenzivnu žuto-narandžastu boju u osnovi kolonija, što je karakteristika na osnovu koje se ove vrste razlikuju od drugih vrsta. Assante i sar. (1981) su pokazali da je narandžastožuta boja posledica reakcije jona gvožđa iz ferocitrata sa molekulima aspergilne kiseline koja formira obojeni kompleks, a svojstva kulture se razvijaju posle inkubacije na 30°C u trajanju od 48-72 h. CCA podloga se koristi za otkrivanje/detektovanje sojeva producenata aflatoksina. Stvaranje aflatoksina se detektuje plavom fluorescijom kada su sojevi izloženi UV-svetlosti (Davis i sar., 1987). Tokom njihovog porasta na Čapekovej podlozi (CZ), kolonije ove dve vrste se mogu taksonomski razdvojiti. Izgled kolonije vrste *A. flavus* je žuto-zelen, dok je kod vrste *A. parasiticus* karakteristično tamnozelen, skoro kao bršljen (Klich, 2002a; Samson et al., 2004a).

Problem u oceni fizioloških svojstava za *A. flavus* i srodne vrste je neprecizna identifikacija. Većina fizioloških istraživanja o vrsti *A. flavus* do 1990. godine, su zapravo bila istraživanja o vrsti *A. parasiticus* ili *A. nomius* (Pitt, 1993b).

2.7.2 Ekološka i odgajivačka svojstva *Aspergillus parasiticus*

Brojna istraživanja koja su se bavila vrstom *A. flavus* su se u stvari bavili pogrešno identifikovanim sojevima vrste *A. parasiticus* (Pitt, 1993b). Ove dve vrste su fiziološki veoma slične, tako da istraživanja koja su saopštavala rezultate o vrsti *A. flavus* se podjednako mogu odnositi i na vrstu *A. parasiticus*. Vrsta *A. parasiticus* raste u temperaturnom opsegu 12-42°C, sa optimalnom temperaturom od 32°C (ICMSF, 1996). Minimalna aktivnost vode (a_w) za rast na 25°C je 0,82, na 30 °C je 0,81, a na 37 °C je 0,80 (Pitt i Miscamble, 1995). Porast vrste *A. parasiticus* je registrovan na pH vrednostima podloge od 2,4 do 10,5 na temperaturama od 25, 30 i 37 °C, ali ga nije bilo na pH 2,2 na 25 °C. Optimalan rast se javljao na pH vrednostima podloge u opsegu 3,5-8, dok je rast na pH 10,5 još uvek bio za 50% manji nego u optimalnim uslovima (Wheeler i sar., 1991).

2.7.3 Toksigena svojstva *Aspergillus parasiticus*

Biohemijska identifikacija izolata rutinski se izvodi na osnovu mikotoksikološkog profila AFB, AFG i CPA. Sojevi vrste *A. parasiticus* su obično izrazito aflatoksigeni, i produkuju AFB, AFG, ali ne i CPA. Atoksigeni sojevi se retko javljaju (Horn i sar., 1996; Razzaghi-Abyaneh i sar., 2006; Tran-Dinh i sar., 1999; Vaamonde i sar., 2003). S druge strane, populacija *A. flavus* podeljena je u grupe u zavisnosti od toksikološkog profila (Vaamonde i sar., 2003; Razzaghi-Abyaneh i sar., 2006; Giorni i sar., 2007). Vaamonde i sar., 2003, su predložili podelu na pet grupa: (i) hemotip I za AFB i CPA producente; (ii) hemotip II za AFB, AFG i CPA producente; (iii) hemotip III za AFB producente; (iv) hemotip IV za CPA producente; i (v) hemotip V za atoksigene izolate (Tabela 1).

Tabela 1. Uporedni prikaz osnovnih morfoloških i biohemijskih karakteristika koje se koriste za razlikovanje vrsta roda *Aspergillus* sekcije Flavi

Vrsta	Seri- jacija	Građ- a/tek- stura konid- ija	Veliči- na konidij- a (µm)	Sklerocij- e	Boja kolon- ije	Naličje AFPA	Ø kolonij- e na CZ42 (cm)	AF B	AF G	CP A
<i>Aspergillus flavus</i>	d ili d/j*	glatk- e	3.5-4.5	okruglast- e/loptaste	žuto- zelen- a	narandžast- o	2.4-3.6	+	-	+
<i>Aspergillus parasiticus</i>	j ili j/d*	nazu- bljen- e	3.5-5.5	izdužene	tamn- o zelen- a	narandžast- o	1.8-3.3	+	+	-

*Dvoredni ili dvoredni/jednoredni

*Jednoredni ili jednoredni/dvoredni

2.7.4 Molekularna svojstva *Aspergillus parasiticus*

Vreme kao parametar i nepouzdanost identifikacije na osnovu morfoloških i biohemijskih karakteristika zahteva molekularne metode koje su testirane za identifikaciju i razlikovanje vrsta i sojeva u okviru sekcije Flavi, kao i za uspostavljanje filogenetskih odnosa između vrsta. Još od

devedesetih godina prošlog veka, primenjivano je nekoliko metoda s ciljem pronalaženja molekularnih markera pogodnih za razlikovanje bliskih vrsta *A. flavus*, *A. oryzae*, *A. parasiticus*, *A. sojae* i *A. nomius*. Metode otiska (*fingerprinting methods*), kao što su AFLP, RFLP, RAPD i ISSR su primenjene u brojnim istraživanjima (Klich i Mullaney, 1987; Moody i Tyler, 1990; Yuan i sar., 1995; Montiel i sar., 2003; Batista i sar., 2008; Godet i Munaut, 2010). Takođe se koriste i druge metode koje se baziraju na analizi amplifikovanih produkata PCR reakcija: PCR-SSCP, PCR-RFLP, PCR-HPA, SNP (Chang i sar., 1995; Kumeda i Asao, 1996, 2001; Somashekar i sar., 2004). I analiza DNK sekvenci iz jedarne i mitohondrijalne DNK je našla primenu (Wang i sar., 2001). Druge inovativne metode, kao što su masena spektrometrija i spektroskopija se, takođe, koriste u identifikaciji i razdvajanju vrsta (Li i sar., 2000; Garon i sar., 2006).

Iako ova istraživanja obezbeđuju važne informacije o filogenetskim odnosima između vrsta, nijedna od njih zasebno nije pouzdana prilikom identifikacije. Jako velika sličnost između vrsta u okviru sekcije Flavi, kao i visok stepen unutarćelijske varijabilnosti, onemogućava dizajniranje jedinstvenih bioloških markera pogodnih za dosledno razlikovanje između vrsta.

2.8 Aflatoksini

Pored direktnih gubitaka od zaraza zrna kukuruza, vrsta *A. parasiticus* sintetiše aflatoksine, koji sa aspekta uticaja na zdravlje ljudi i životinja predstavljaju najznačajniju grupu mikotoksina (Bennett i Klich, 2003). Usled izražene toksičnosti, zakonom je regulisana njihova maksimalno dozvoljena količina u hrani, u Evropi i kod nas.

Aflatoksini su sekundarni metaboliti koji stvaraju poliketide. Njih mogu sintetisati šest vrsta roda *Aspergillus* sekcije Flavi: *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*, *A. bombycis*, *A. pseudotamarii* i *A. tamarii* (Goto i sar., 1996; Ito i sar., 2001; Varga i sar., 2003). Međutim, *A. flavus* i *A. parasiticus*, su dve najvažnije vrste koje sintetišu aflatoksine. Vrsta *A. flavus* proizvodi samo aflatoksine grupe B (AFB1 i AFB2) i ciklopiazoničnu kiselinu (CPA), ali takson sličan S sojevima, nazvan S_{BG}, može da sintetiše i aflatoksine grupe G (AFG1 i AFG2). S druge strane, vrsta *A. parasiticus* je sposobna za sintezu sva četiri aflatoksina (AFB1, AFB2, AFG1 i AFG2), ali ne i CPA (Amaike i Keller, 2011).

Nisu svi aflatoksini jednako toksični. AFB1 je najfrekventniji, a ujedno i najtoksičniji, i ima veoma izraženo kancerogeno i mutageno dejstvo (IARC, 1993).

Aflatoksini su dobili ime po plavoj (*blue*, B) ili zelenoj boji (*green*, G) fluorescencije koja se ispoljava kada su izloženi ultraljubičastoj svetlosti (366 nm) u tankoslojnoj hromatografiji na silika gelu (Hartley i sar., 1963). Pored toga, veoma su značajni aflatoksini grupe M (metaboliti aflatoksina grupe B) u mleku krava, što je posledica korišćenja hrane koja je kontaminirana AFB1 i AFB2 (Van Egmond, 1989).

Kontaminacija hrane i hrane za životinje mikotoksinima predstavlja globalni problem. Prema literaturnim podacima više od 25% žita u svetu kontaminirano je mikotoksinima (Charmley i Prelusky, 1995; Kabak i sar., 2006), što povećava potrebu za stalnim istraživanjima u oblasti mikotoksikologije. Pojava mikotoksina pored negativnog uticaja na zdravlje ljudi i životinja (Atroshi i sar., 2002; Azziz-Baumgartner i sar., 2005), uslovljava i velike ekonomske izdatke/gubitke (Robens i Cardwell, 2003; CAST, 2003; Coulibaly i sar., 2008).

2.8.1 Vrste roda *Aspergillus* sekcije Flavi koje sintetišu aflatoksine

Većina poznatih aflatoksigenih vrsta pripadaju rodu *Aspergillus*. Veliki broj vrsta koje sintetišu aflatoksine pripada sekciji Flavi. Neke vrste teleomorfno stadijuma roda *Emericella* sintetišu aflatoksine (Frisvad i sar., 2005). Do sad je identifikovano 14 vrsta koje imaju sposobnost sinteze najmanje jednog od četiri vrste aflatoksina. Devet od njih pripada sekciji Flavi, među kojima su najznačajnije *A. flavus* i *A. parasiticus*, koje su odgovorne za većinu kontaminacija aflatoksinima. Vrsta *A. flavus* je naročito raznovrsna u pogledu toksičnosti i samo 40% poznatih izolata produkuje aflatoksine (Frisvad i sar., 2006). *A. parasiticus* sojevi su ujednačeniji što se tiče toksigenih sposobnosti: oni su obično strogo aflatoksigeni, produkuju aflatoksine grupe B i G. Atoksigeni sojevi se retko javljaju (Horn i sar., 1996; Tran-Dinh i sar., 1999; Vaamonde i sar., 2003; Razzaghi-Abyaneh i sar., 2006). Izolati vrste *A. parasiticus* koji se prirodno javljaju, a ne produkuju aflatoksine kreću se od 3 do 6% (Horn i sar., 1996; Vaamonde i sar., 2003; Barros i sar., 2006). Razzaghi-Abyaneh i sar., (2006) su objavili prisustvo 100% aflatoksigenih sojeva vrste *A. parasiticus*, a samo 27,5% aflatoksigenih sojeva vrste *A. flavus*. Rodrigues i sar. (2009) su pronašli 77% atoksigenih izolata vrste *A. flavus*, dok su svi izolati

vrste *A. parasiticus* bili aflatoksigeni. Ostale vrste ovog roda imaju ograničenu distribuciju/rasprostranjenost (EFSA, 2007). Druge vrste roda *Aspergillus* sekcije Flavi, kao što su *A. nomius*, *A. bombycis*, *A. ochraceoroseus*, *A. tamaris* i *A. pseudotamaris* takođe sintetišu aflatoksine, ali se ređe javljaju u prirodi (Alberts i sar., 2006). Vrsta *A. parasiticus* ne stvara ciklopiazoničnu kiselinu (Vaamonde i sar., 2003; Horn, 2003, Frisvad i sar., 2005), ali stvara kojik kiselinu ($C_6H_6O_4$), metabolit niske toksičnosti koji ima široku primenu u medicini i kozmetici (El-Aasar, 2006).

2.8.2 Faktori koji utiču na sintezu aflatoksina

Ukoliko je na kukuruzu došlo do razvoja *Aspergillus* vrsta, do sinteze aflatoksina će doći ako: gljive imaju gensku predispoziciju za sintezu aflatoksina, kao i ako postoje odgovarajući spoljašnji uslovi (Widstrom, 1996; Abbas i sar., 2009).

Genetska predispozicija podrazumeva postojanje određenih gena koji omogućavaju sintezu aflatoksina. Vrsta *A. flavus* sintetiše aflatoksine na osnovu postojanja 25 identifikovanih gena grupisanih na 70-kb DNK hromozoma III (Bhatnagar i sar., 2006; Cary i Calvo, 2008).

Najvažniji faktori koji utiču na sintezu aflatoksina i porast gljiva su relativna vlažnost vazduha, koja u najvećem broju slučajeva iznosi 88-95% (Park i Liang, 1993), kao i temperatura vazduha 25-27°C za maksimalnu produkciju aflatoksina, i 36-38°C za maksimalni porast gljiva (Abbas i sar., 2005). Uslovi pod kojima *A. parasiticus* stvara aflatoksine slični su uslovima pod kojima ih stvara *A. flavus*. Dostupni podaci koji ukazuju na sintezu aflatoksina su temperaturni opseg 12-40°C, a_w do 0,86 i pH opseg 3-8 ili iznad (ICMSF, 1996).

Značajnom povećanju verovatnoće prisustva gljiva ovog roda i sinteze aflatoksina u kukuruzu doprinose uslovi povišene temperature vazduha i smanjene količine padavina, tj. sušni uslovi (Payne, 1998). Suša je abiotički faktor koji ima izrazito negativan efekat na biljku, jer biljka gubi vodu koja je neophodna za sve biohemijske procese. Nedostatak vode uslovljava slabljenje odbrane i otpornosti biljke, čime se povećava verovatnoća razvoja gljiva i sinteze aflatoksina (Gosal i sar., 2009; Guevara-González i sar., 2011). Prisustvo vlage u zemljištu, kao vid stresa, pogoršava sintezu aflatoksina u polju. Kukuruz koji je izložen stresu suše u polju ima više zaraženih zrna vrstom *A. flavus* od onih koji su navodnajvani.

Faktori koji, takođe, mogu uticati na produkciju aflatoksina su: sastav podloge, aktivnost vode, pH, atmosfera (koncentracija kiseonika i ugljen dioksida), konkurentna borba mikroorganizama, mehaničke povrede semena, specifičnost soja i varijacije, nestabilnost produkcije aflatoksina, stres biljke, prisustvo insekata i primena fungicida ili đubriva (Gonçalez i sar., 2001; Hussein i Brasel, 2001; Magan i Olsen, 2004). Vreme žetve ili sušenja, kao i uslovi skladištenja mogu igrati važnu ulogu u sintezi aflatoksina (Prandini i sar., 2009).

Količina vlage u znu utiče na njegov kvalitet i uspeh skladištenja. Dva najvažnija faktora koja utiču na životni ciklus svih mikroorganizama, uključujući mikotoksigene gljive, su raspoloživost/pristupačnost vode i temperatura skladištenja (Magan, 2006). Ova dva interaktivna faktora utiču na klijanje, porast, sporulaciju i sintezu mikotoksina (Sanchis i Magan, 2004). Optimalna vlažnost zrna za porast *Aspergillus* vrsta i sintezu aflatoksina iznosi 13-20%, sa relativnom vlažnošću okolnog vazduha 62-99% (Sumner i Lee, 2012).

Povezanost sinteze aflatoksina u kukuruзу umnogome zavisi i od sorte kukuruza. Stoga, novija istaživanja su usmerena na stvaranje novih sorti kukuruza koje će imati veću toleranciju na sušne uslove i pojavu toksigenih vrsta gljiva (Marin i sar., 2001; Guevara-González i sar., 2011).

Razvoj *Aspergillus* vrsta i sinteza aflatoksina uglavnom se dešava na njivi a, u slučaju kontinuiranog razvoja povoljnih uslova za dalji razvoj gljiva i sinteze toksina, može se nastaviti i tokom berbe i skladištenja kukuruza.

2.8.3 Aflatoksikoze

Iako je vrstu *A. flavus* prvi put opisao Link 1809. godine, pouzdana istaživanja biologije i patogenosti vrste nisu započeta do otkrića aflatoksina koje je povezano sa smrću više od 100.000 ćurki u Engleskoj 1961. godine. Nekropsijom uginulih životinja je utvrđena akutna nekroza jetre. Uzrok smrti prvobitno nije bio poznat i zbog toga je ova bolest nazvana X bolest ćuraka. Kasnija istaživanja pokazala su da su korišćena hraniva od samlevenog kikirikija bila kontaminirana toksičnim metabolitima koje su stvorili određeni sojevi vrste *A. flavus*. Opisana su hemijska svojstva jedinjenja, koje je nazvano aflatoksin (AF) kao skraćenica za *Aspergillus flavus* toksini (Forgacs i Carll, 1962).

Učestalost i količina unosa, pol, starost, imunološki sistem i zdravstveno stanje individue koja konzumira hranu kontaminiranu aflatoksinima može uzrokovati različite bolesti, koje se

nazivaju aflatoksikoze (IARC, 2002). Razlikujemo akutne i hronične aflatoksikoze. Akutna aflatoksikoza se javlja kada se udišu ili se u organizam unosi hrana kontaminirana visokim nivoom aflatoksina.

Zavisnost koncentracije aflatoksina i vremena izloženosti ukazuje u kojoj meri će se ispoljiti negativno dejstvo aflatoksina na organizam. Hronične aflatoksikoze izaziva unošenje malih doza aflatoksina u dužem vremenskom periodu, dok su akutne aflatoksikoze izazvane visokim koncentracijama aflatoksina tokom jednog ili ograničenog broja izlaganja aflatoksinima. Simptomi hronične aflatoksikoze su usporen rast, imunološka supresija/suzbijanje otpornosti i u nekim slučajevima može doći do razvoja karcinoma jetre (Cardwell i Henry, 2004; Gong i sar., 2004).

Do sredine 90-ih godina prošlog veka, ozbiljne bolesti i smrtni ishodi zabeleženi su u zemljama u razvoju, unutar zone rizika. Siromašno stanovništvo prinuđeno je da koristi hranu lošijeg kvaliteta, koja je obično i kontaminirana. Simptomi akutne hroničnosti su: povišena temperatura, jaka obojenost urina, povraćanje, oticanje stopala, hipertenzija i visoka stopa smrtnosti (Keeler i Tu, 1983; loc. cit. Dhanasekaran i sar, 2011). Akutna aflatoksikoza je veliki problem u zemljama u razvoju, posebno u Aziji i Africi. U Keniji su prijavljene epidemije bolesti 1981-1982, 2001, 2004-2006. i 2008. godine (Ngindu i sar., 1982; Farombi, 2006; Probst i sar., 2007). Više od 150 ljudi je umrlo u periodu 2004-2005. godine nakon konzumiranja kukuruza kontaminiranog aflatoksinima (Strosnider i sar., 2006). U zemljama u razvoju, kao posledica unosa aflatoksina putem žitarica, oko 4,5 milijardi ljudi izloženo je hroničnim oboljenjima (Gebrehiwet i sar., 2007).

Akutnu toksičnost karakteriše brz početak sa jasno definisanim simptomima, za razliku od hronične gde je teže uspostaviti dijagnozu jer su organizmi izloženi manjim dozama toksina u dužem vremenskom periodu, što može dovesti do kancera i ostalih nepovratnih efekata (James, 1985; loc. cit. Bennett i sar., 2007). Nije uvek moguće jasno ustanoviti razliku između akutnih i hroničnih efekata. Hepatocelularni karcinom nalazi se na vodećem mestu kao uzrok mortaliteta ljudi u svetu (Magnussen i Parsi, 2013). Brojna istraživanja su dokazala korelaciju između pojave hepatocelularnog karcinoma i izloženosti ljudi aflatoksinu B1 (Sinovec i sar., 2006). Aflatoksin predstavlja jedan od etioloških faktora koji dovodi do ispoljavanja Rejovog sindroma kod dece, što je ustanovljeno istraživanjima koja su sprovedena na Tajlandu i Novom Zelandu. Rejov sindrom se manifestuje masnom degeneracijom parenhimatoznih organa. Ustanovljena je i

povezanost aflatoksina sa Kwashiorkor proteinskom deficijencijom koja se manifestuje pojavom edema, dermatozom i oštećenjima jetre (Dhanasekaran i sar., 2011).

Aflatoksini su takođe opasni i za životinje. Pored navedenih epidemija kod ćuraka u Engleskoj, u SAD uginulo je preko stotinu pasa, kao posledica konzumiranja suvog hraniva koje je bilo kontaminirano aflatoksinima grupe B (Stenske i sar., 2006; Dereszynski i sar., 2008). Kontaminacije aflatoksinima predstavljaju problem i u mlekarskim farmama za proizvodnju mleka. Tako su, u Italiji 2003. godine, otkriveni visoki nivoi aflatoksina grupe M u kravljem mleku kao posledica povišenih koncentracija aflatoksina grupe B u kukuruznim hranivima (Giorni i sar., 2007; Piva i sar., 2006).

Osetljivost na dejstvo aflatoksina zavisi od količine i vrste unetog aflatoksina, dužine unošenja, opšteg stanja organizma, kao i od pola i starosne granice ljudi. Mladi organizmi ispoljavaju najveću osetljivost. Muški pol je često osetljiviji na negativno dejstvo aflatoksina, obzirom da se osetljivost povećava u zavisnosti od nivoa testosterona. Jetra je primarni organ na koji deluju aflatoksini (Williams i sar., 2004). U organizmu životinja citohrom P450 enzim prevodi AFB1 u 8,9-epoksid. Reakcija 8,9-epoksida sa proteinima uslovljava različite toksične efekte, a reakcija sa DNK dovodi do kancera (Eaton i Groopman, 1994).

Po klasifikaciji kancerogenih jedinjenja iz 1993. godine, Internacionalna agencija za ispitivanje kancera (IARC) uvrstila je aflatoksin B1 u prvu grupu, u kojoj se nalaze jedinjenja sa izrazitim kancerogenim efektom, dok su aflatoksini B2, G1, G2 i M1 klasifikovani u 2B grupu. Klasifikacija iz 2002. godine (IARC) uvrstila je navedene aflatoksine u jedinjenja prve grupe po kancerogenosti. Klasifikacijom iz 2012. godine (IARC) aflatoksini B1, B2, G1 i G2 pripadaju prvoj grupi, dok aflatoksin M1 pripada 2B grupi.

2.8.4 Zakonska regulativa/Dozvoljene koncentracije aflatoksina u kukuruzu

Na nivou Evropske unije postoji jedinstven pravilnik koji propisuje maksimalno dozvoljene količine (MDK) za mikotoksine u prehrambenim proizvodima (European Commission, EC/1881/2006). Od 2006. godine do danas usledilo je nekoliko izmena navedenog Pravilnika. U Republici Srbiji kontrola aflatoksina u prehrambenim proizvodima vrši se na osnovu Pravilnika ("Službeni glasnik RS", 28/2011) koji je 2011. godine delimično usklađen sa Pravilnikom Evropske unije. Od 2011. godine do danas usledilo je nekoliko izmena navedenog Pravilnika u Srbiji ("Službeni glasnik RS", 20/13; "Sl. glasnik RS", 29/14; "Sl. glasnik RS",

37/14, 39/14, 37/14-ispravka, 39/14, 72/14, 80/15, 84/15, 35/16, 81/16, 21/17, 81/17) sa ciljem njegovog potpunog usklađivanja sa evropskim (Tabela 2, Tabela 3).

Tabela 2. Referentne vrednosti za maksimalno dozvoljene količine (MDK) mikotoksina u kukuruzu-hrani za ljude za AFB1 i ukupne aflatoksine

Zemlja	Pravilnici	MDK (µg/kg)	
		AFB1	Ukupni AFLA
Kukuruz namenjen za ljudsku ishranu			
Srbija	„Službeni glasnik RS“ 28/2011.	5	10
	„Službeni glasnik RS“ 20/2013, RS 29/2014.	5	10
EU	European Commission 1881/2006.	5	10
SAD	Food i Drug Administration, 2000.	20	

Tabela 3. Referentne vrednosti za maksimalno dozvoljene količine (MDK) mikotoksina u kukuruzu-hrani za životinje za AFB1 i ukupne aflatoksine

Zemlja	Pravilnici	MDK (µg/kg)	
		AFB1	Ukupni AFLA
Kukuruz za životinjsku ishranu			
Srbija	„Službeni glasnik RS“ 4/2010, RS 113/2012		50
	„Službeni glasnik RS“ 27/2014.	30	
EU	European Commission 32/2002.	20	
SAD	Food i Drug Administration, 2011.	20-300	

Tabela 4. Referentne vrednosti za maksimalno dozvoljene količine (MDK) mikotoksina u mleku AFM1

Zemlja	Pravilnici	MDK ($\mu\text{g/kg}$)
		AFM1
Mleko i mlečni proizvodi		
Srbija	„Službeni glasnik RS“ 81/2017	0.25
EU	European Commission 1881/2006.	0.05
SAD	Food i Drug Administration 2011.	0.5

Vrednosti MDK za AFM1 u mleku najviše puta su promenjene u Republici Srbiji. Naime, MDK za AFM1 u mleku često je menjana u rasponu 0,50 $\mu\text{g/kg}$, preko 0,25 $\mu\text{g/kg}$, do 0,05 $\mu\text{g/kg}$. Trenutna vrednost MDK AFM1 u mleku, koju reguliše Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede iznosi 0,25 $\mu\text{g/kg}$ (Tabela 4).

3 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;
- U cilju utvrđivanja diverziteta ove vrste, detaljno će se proučiti morfološke makroskopske i mikroskopske karakteristike, kao i patogene, i toksigene odlike pomenute vrste;
- Ispitivanje toksigenog potencijala produkcije ukupnih aflatoksina i aflatoksina B1, B2, G1 i G2 izolata *A. parasiticus*.

4 RADNA HIPOTEZA

- Rezultati dosadašnjih istraživanja, osim pojave i prisustva aspergiliozne truleži zrna i klipa kukuruza, ukazuju da sastav mikopopulacije koja prouzrokuje ovo oboljenje, kao i druge karakteristike ovih patogena, nisu dovoljno proučavani. U istraživanjima ove doktorske disertacije pošlo se od pretpostavke da je došlo do značajnijeg rasprostranjenja vrste *A. parasiticus* na zrnju kukuruza, obzirom na promenu agroklimatskih uslova u Srbiji;
- Pretpostavka je da će ova doktorska disertacija ukazati na puteve i načine širenja ovog patogena i da će doprineti unapređenju metoda identifikacije, molekularne karakterizacije patogena i pouzdanosti dijagnozi oboljenja na kukuruzu, što je osnova za odgovarajuće mere kontrole bolesti;
- S obzirom da rezultati istraživanja u svetu ukazuju na diverzitet vrste *A. parasiticus*, pretpostavka je da će i ispitivani izolat poreklom iz Srbije pokazati veliku varijabilnost u ispoljavanju proučavanih karakteristika;
- Vrste roda *Aspergillus* sekcije Flavi imaju sposobnost sinteze velikih koncentracija mikotoksina, pa se pošlo od pretpostavke da će ispitivani izolati imati ovu sposobnost, kao i da će ispoljiti različit potencijal sinteze aflatoksina B1, B2, G1 i G2 i ukupnih aflatoksina;
- Rezultati ovih ispitivanja doprineće potpunijem sagledavanju prisustva ovog oboljenja na području Srbije u usevu kukuruza kao jednom od najvažnijih biljaka domaćina.

5 MATERIJAL I METODE

5.1 Izolacija i identifikacija vrste *Aspergillus parasiticus*

5.1.1 Pregled terena i uzorkovanje aspergilioznih klipova

Istraživanja u okviru ove doktorske disertacije obuhvatila su pregled useva kukuruza i skladišta tokom petogodišnjeg perioda (2012-2016). Kao izvorni materijal za izolaciju patogena korišćene su biljke sa simptomima maslinastozelene praškaste prevlake na klipovima i zrnima kukuruza. Sakupljanje početnog materijala za ispitivanje obavljeno je sa oko 70 lokacija iz različitih okruga na teritoriji Republike Srbije.

Uzorkovanje klipova kukuruza sa simptomima aspergiloze vršeno je dijagonalno na svakoj parceli u različitim agroekološkim uslovima. Sa deset klipova kukuruza po lokaciji, uzet je poduzorak od 10 zrna po klipovima za izolaciju i identifikaciju vrsta roda *Aspergillus*, što iznosi 100 zrna po lokaciji. U toku vegetacije, klipovi kukuruza sa simptomima oboljenja, prikupljeni su u periodu 2012-2016. godine iz useva sa 37 lokacija: Slatina, Zminjak, Lozničko Polje, Valjevska Loznica, Stublenica, Južni Banat, Orlovat, Radojevo, Ostojićevo, Zemun Polje, Bajmok, Velika Plana, Sakule, Debeljača, Feketić, Bajša, Padina, Telečka, Sremska Mitrovica, Nova Crnja, Bečej, Kraljevo, Izbište, Banatsko Novo Selo, Crepaja, Padina, Jabuka, Belosavci, Šalinac, Lađevci, Kovin, Skobalj, Toponica, Sibac, Deronje, Zmajevina i Gospođinci.



Slika 1. Mapa lokacija uzorkovanja zrna kukuruza u toku vegetacije

Uzorkovanje zrna kukuruza iz skladišta vršeno je tokom 2016. godine sa 27 lokacija: Mramorak, Kikinda, Gakovo, Žarkovac, Apatin, Pančevo, Počekovina, Medveđa, Knjaževac, Zemun Polje, Kruševac, Kraljevo, Buđanovci, Platičevo, Prahovo, Kozarica, Veliki Šiljegovac, Novo Selo, Adrani, Kamenica, Leskovac, Bojnik, Lebane, Gornja Dobrinja, Trešnjevica, Trnava i Stupčevići.



Slika 2. Mapa lokacija uzorkovanja zrna kukuruza iz skladišta

Analiza zrna uzoraka vršena je iz poduzoraka mase 2 kg koji su izdvojeni od osnovnog uzorka. Osnovni uzorak je dobijen mešanjem više manjih uzoraka, uzetih sa više različitih mesta u skladištu. Dobijena količina osnovnog uzorka podeljena je na četiri dela i od svake četvrtine uzorkovano je po 0,5 kg zrna, ukupno 2 kg. Ovaj uzorak je pomoću separatora podeljen na osam jednakih delova, od kojih su četiri nasumična dela korišćena za dalje analize. Za analizu vrsta roda *Aspergillus* korišćeno je po 25 zrna u četiri ponavljanja iz svakog poduzorka (ukupno 100 zrna).

Nakon formiranja, uzorak je obeležen, upakovan u papirne kese i dopremljen do Laboratorije za fitopatologiju, Instituta za kukuruz, za dalja proučavanja.

5.1.2 Izolacija gljiva i dobijanje čistih kultura

Izolacija gljiva sa uzorkovanih zrna kukuruza rađena je prema standardizovanoj metodi Laboratorije za fitopatologiju Instituta za kukuruz „Zemun Polje“ na sledeći način:

- a) Ispitivana zrna kukuruza sterilisana su rastvorom NaClO i H₂O u odnosu (1:3) u trajanju 3-5 minuta.

b) Ispiranje uzoraka destilovanom vodom.

c) Sterilisana zrna su osušena na sterilnom filter papiru i stavljana na krompir dekstroznu podlogu (*potato dextrose agar*, PDA). Po pet zrna kukuruza je stavljano u svaku Petri kutiju.

d) Identifikacija vrsta vršena je nakon sedmodnevne inkubacije u termostatu na temperaturi od 25°C u mraku, mikroskopskim pregledom *in situ* kolonija razvijenih na i oko zrna, kao i pregledom nativnih mikroskopskih preparata.

e) Nakon sedam dana, kolonije koje su razvijene na i oko zrna kukuruza, a mikroskopskim pregledom identifikovane kao *Aspergillus* spp., presejane su na agar sladnog ekstrakta (*malt extract agar*, MEA) radi dobijanja čistih kultura.

Inkubacija gljiva zasejanih u Petri kutijama vršena je u termostatu na temperaturi od 25°C u mraku, do trenutka razvoja kolonija gljiva.

Kohovi postulati su korišćeni za dokazivanje patogenosti prouzrokovaca oboljenja. Reizolacijom patogena iz inokulisanih klipova kukuruza dobijene su kulture koje su po svojim morfološkim svojstvima bile identične kao i izolovana gljiva, čime je potvrđena patogenost izolata i zadovoljeni su Kohovi postulati.

5.1.3 Dobijanje monospornih izolata i čuvanje cultura

Proučavanja svih značajnih svojstava *Aspergillus* vrsta u ovoj disertaciji su izvršena na monospornim kulturama (Burgess i sar., 1994), koje su dobijene gajenjem odabranih kultura *Aspergillus* spp. na sobnoj temperaturi na PDA u trajanju od sedam dana.

Fragmenti micelije su sterilnom laboratorijskom iglom preneti u epruvetu u kojoj se nalazilo 10 ml sterilne destilovane vode. Sadržaj epruvete, koji čine micelija i spore, je potpuno homogenizovan brzim, vrtožnim mešanjem na mućkalici (*vortex*) u trajanju od 10-15 sekundi, nakon čega je 1 ml ove suspenzije (10^{-1}) nanesen na površinu MEA u Petri kutiji. Zatim je ponovo 1 ml suspenzije prenet iz te epruvete u epruvetu sa 9 ml sterilne destilovane vode, kako bi se dobila suspenzija razređenja 10^{-2} . Razblažene suspenzije su takođe brzo, vrtožno mešane, a disperzija spora i razblaženja su potvrđena na mikroskopu pomoću Neubauerove komore za brojanje. Suspenzija koja pokazuje smanjen broj spora po mikrolitru, i što je najvažnije, manji broj klastera spora, korišćena je za inokulaciju 4 Petri kutije (prečnika 9 cm) u kojima se nalazio veoma tanak sloj (približno 10 ml) MEA sa 2% agara. Posle mešanja na mućkalici (*vortex*), 1 ml

suspenzije je prenet na MEA. Inokulacija ovih kutija vršena je tako što je kružnim pokretima sadržaj Petri kutije razliven po celoj površini hranljive podloge. Zatim su kutije postavljene pod uglom od 30° i kultura je inkubirana na sobnoj temperaturi tokom 24h, što je neophodno vreme za klijanje spora. Posle inkubacije, klijanje je proveravano na stereomikroskopu, a zatim je sterilnom ezom isečen komadić podloge sa pojedinačnom prokljalom sporom. Komadić podloge sa kljalom sporom je postavljen u centar Petri kutije sa 10 ml MEA, da bi se dobile 4 monosporne kulture, koje su inkubirane sedam dana u mraku na temperaturi od 25°C.

Na ovaj način dobijene su genetički čiste monosporne kulture za dalja istraživanja. Monosporne kulture čuvane su za dalji rad u ampulama sa zakošenim PDA, MEA i kvašćevog autolizata po Čapeku (Czapek yeast extract agar, CYA). Obložene su aluminijumskom folijom i parafilmom, odložene u frižider i čuvane na +4°C za dalja proučavanja.

5.1.4 Identifikacija izolata *Aspergillus parasiticus* na osnovu morfoloških svojstava

Za identifikaciju monospornih izolata ispitivane su makroskopske (izgled, porast i boja kolonija s lica i naličja kulture, formiranje sklerocija, pigmentacija podloge, prisustvo eksudata), kao i mikroskopske (izgled i oblik stipa, vezikula i fjalida, prisustvo ili odsustvo metula, nazubljenost površinskog zida spora, njihova veličina i oblik) morfološke karakteristike. Makroskopska svojstva posmatrane su na PDA i CYA nakon sedmodnevne inkubacije na temperaturi od 25°C u mraku. Mikroskopska svojstva proučena su na MEA posle inkubacije na temperaturi 25°C u mraku u trajanju od sedam dana (Samson i sar., 2014).

Pored morfološke karakterizacije svi identifikovani izolati *Aspergillus* gajeni su na *Aspergillus flavus* i *parasiticus* agar (AFPA; Dindori, Nashik, India) u trajanju od 48-72h na 30°C u tami da bi se potvrdila identifikacija na nivou sekcije Flavi putem boje naličja kolonije.

Gajenje gljiva na CZ pomaže pri diferenciranju boje kolonija za slične vrste roda *Aspergillus* sekcije Flavi.

5.1.4.1 Proučavanje morfoloških svojstava izolata *Aspergillus parasiticus*

Za morfološku karakterizaciju odabrani su izolati *Aspergillus* spp. na osnovu pripadnosti vrsti, geografskog porekla, kao i ispoljenih morfoloških svojstava. Referentni izolat A.

parasiticus (CBS 100926), koji je deponovan u CBS-KNAW kolekciji u Holandiji, korišćen je u daljim istraživanjima.

Proučavani izolati gljive su zasejani na hranljive podloge nanošenjem fragmenata kolonija čistih kultura proučavanih izolata u centar Petri kutija pomoću kopljaste igle. Nakon toga, kulture su inkubirane u termostatu na temperaturi od 25°C, bez prisustva svetlosti.

5.1.4.1.1 Makroskopska morfološka svojstva proučavanih izolata

Makroskopska svojstva ispitivanih izolata proučavana su na PDA posmatranjem izgleda, porasta i boje kolonija s lica i naličja kulture, formiranja sklerocija, pigmentacija podloge, prisustva eksudata. Sa oboda sedmodnevnih kultura koje su odgajane na PDA, uzeti su fragmenti micelije koji su nanoseni na PDA, a inkubacija u trajanju od 7 dana vršena je na temperaturi od 25°C u termostatu. Tokom perioda inkubacije, svakodnevno je meren porast kolonije, koji je prikazan kao prosečni porast (mm/dan).

5.1.4.1.2 Mikroskopska morfološka svojstva proučavanih izolata

Mikroskopska svojstva odabranih izolata *A. parasiticus* proučavana su na PDA i MEA prema metodi Samson i sar. (2014), posmatranjem izgleda hifa i reproduktivnih organa gljiva pod svetlosnim mikroskopom. Privremeni mikroskopski preparati pripremani su nanošenjem fragmenata micelije na površinu predmetnog stakla, u kapi destilovane vode. Ljuspicom/zaštitnim (pokrovnim) staklom je prekriven nanet materijal i posmatran pod mikroskopom.

Kod odabranih izolata *A. parasiticus* proučavani su oblik i dimenzije konidija, tako što je iz kultura ispitivanih izolata starih sedam dana posmatrano po 30 slučajno izabranih konidija pomoću svetlosnog mikroskopa Carl Zeiss Axiolab A1. Dobijeni rezultati statistički su obrađeni jednofaktorskom analizom varijanse (ANOVA) po potpuno slučajnom planu sa po 30 konidija po izolatu. Upotrebom Dankanovog testa (*Duncan's test*), pri $p < 0,05$ utvrđene su značajnosti razlike između pojedinih vrednosti podataka.

Pojava sklerocija praćena je na CZ podlozi u kulturama starim 14 dana, održavanim u mraku na temperaturi od 25°C. Sklerocije su isprane u 96% alkoholu i direktno mikroskopirane. Prećnik sklerocija odrećen je prosekom obraćunatim za 30 ponovljenih merenja.

5.1.4.1.3 Praćenje brzine porasta izolata *Aspergillus parasiticus*

Odabrano je 10 izolata koji su uzeti sa ivice sedam dana stare kolonije koja je gajena na PDA i nanošeni su na PDA. Period inkubacije je iznosio 7 dana, a vršena je na temperaturi od 25°C. Merenje je izvedeno u dva pravca pod pravim uglom, nakon ćega je izraćunat dnevni porast izolata. Ogled je izveden u tri ponavljanja.

5.1.4.2 Proućavanje ekoloških i odgajivaćkih svojstava izolata *Aspergillus parasiticus*

Ispitivanje uticaja ekoloških i odgajivaćkih faktora obuhvatilo je ispitivanje porasta i prećnika micelije na razlićitim vrstama hranljive podloge, na razlićitim temperaturama i u uslovima razlićitog kvaliteta svetlosti.

5.1.4.2.1 Uticaj temperature na razvoj izolata *Aspergillus parasiticus*

Ispitivanje uticaja temperature na porast izolata posmatrano je na PDA podlozi pri temperaturama 15°C, 25°C, 30°C, 37°C i 42°C. Porast i prećnik kolonije praćeni su svakodnevno u periodu od sedam dana. Ogled je postavljen u tri ponavljanja.

5.1.4.2.2 Uticaj razlićitih uslova osvetljavanja na razvoj izolata *Aspergillus parasiticus*

Uticaj svetlosti na morfologiju kolonija i porast izolata ispitivan je na PDA podlozi u razlićitim uslovima osvetljenja pri temperaturi 25°C tokom 7 dana. Izolati su izlagani stalnom mraku i smeni 12h svetlo/12h tama. Porast micelije na razlićitim hranljivim podlogama praćen je svakodnevno merenjem prećnika kolonije i izraćunavan je prosećan dnevni porast. Ogled je postavljen u tri ponavljanja.

5.1.4.2.3 Uticaj različitih hranljivih podloga na razvoj izolata *Aspergillus parasiticus*

Ispitivanje uticaja hranljivih podloga na morfologiju i porast izolata vršeno je na 3 različite podloge: CYA podloga, MEA i PDA. Fragmenti micelije izolata (precnika 5 mm) gajenih 7 dana na PDA podlozi, zasejavani su u centar Petri kutije i postavljeni na inkubaciju u termostatu na temperaturu od 25°C u mraku. Porast izolata na različitim hranljivim podlogama praćen je svakodnevno merenjem prečnika kolonije i izračunavan je prosečan dnevni porast. Opisivani su boja, izgled i tekstura micelije, ivice kolonije, izgled naličja kolonije. Eksperiment je postavljen u tri ponavljanja.

Hranljive podloge korišćene u ispitivanjima:

Krompir dekstrozna podloga (PDA) pripremljena je od:

- 42 g ekstrakta podloge (PDA, Biolife, Italiana S.r.l. Viale Monza, Milano, Italia)
i 1000 ml destilovane vode.

Agar sladnog ekstrakta (MEA) pripremljena je od:

- 35,6 g ekstrakta podloge (MEA, Biolife, Italiana S.r.l. Viale Monza, Milano, Italia)
i 1000 ml destilovane vode.

Podloga kvašćevog autolizata po Čapeku (CYA) pripremljena je od:

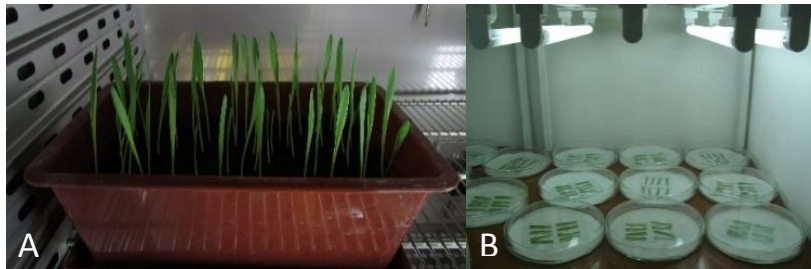
- Koncentrata po Čapeku: 10 ml
- Saharoze: 30 g
- Ekstrakta kvasca: 5 g
- K_2HPO_4 : 1 g
- $CuSO_4 \cdot 5H_2O$: 0,005 g
- $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$: 0,01 g
- Agara: 20 g, i
- 1000 ml destilovane vode prema recepturi Pitt i sar. (1979).

5.1.5 Proučavanje patogenih svojstava izolata *Aspergillus parasiticus*

5.1.5.1 Provera patogenosti i reizolacija patogena u laboratorijskim uslovima

Metoda koju su opisali Imathiu i sar. (2009) korišćena je u cilju provere patogenosti ispitivanih izolata u laboratorijskim uslovima. Izvršena je inokulacija prvog lista ječma pomoću suspenzije spora ispitivanih izolata *A. parasiticus*.

Priprema listova ječma. Površinski sterilisana semena ozime sorte ječma Nektar su posejana u saksiju (27x15 cm), u supstratu za cveće i gajena u fitotronu dve nedelje na 20°C sa dužinom fotoperioda od 12h. Zalivanje biljaka vršeno je po potrebi u zavisnosti od vlažnosti supstrata. Prvi list klijanca presečen je na dužinu od 4 cm od vrha. U Petri kutije Ø 150 mm obložene filter papirom koji je navlažen sterilnom destilovanom vodom, stavljano je po osam isečaka lista.

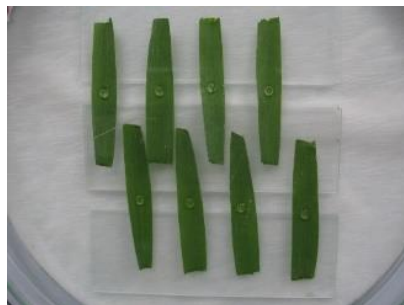


Slika 3. Porast listova ozime sorte ječma Nektar u fitotronu na 20°C sa dužinom fotoperioda od 12h (A); Petri kutije obložene filter papirom sa isečcima listova (B)

Priprema suspenzije spora. Izolati *A. parasiticus* su održavani na PDA na temperaturi od 25°C u mraku. Po 10 ml sterilne vode sa 0,01% Tween 20 nanoseno je u Petri kutije Ø 100 mm sa razvijenom kolonijom gljive, a zatim je sterilnim štapićem, skinuta micelija gljive u cilju oslobađanja formiranih konidija. Nakon sedam dana dobijena je suspenzija spora koja je proceđena kroz sterilnu gazu, a koncentracija konidija je podešena pomoću hemocitometra na približno 1×10^7 konidija/ml.

Inokulacija i inkubacija. Prema ovoj metodi izvršena je inokulacija prvog lista ječma, pomoću suspenzije spora gljive *A. parasiticus*, unošenjem 10 µl suspenzije koncentracije 3×10^7 spora/ml sa Tween 20. Kao pozitivna kontrola korišćeni su listovi inokulisani suspenzijom spora gljive *A. flavus*. Negativni kontrolni listovi inokulisani su unošenjem iste količine sterilne

destilovane vode. Tako pripremljenom suspenzijom konidija inokulisano je osam listova u četiri ponavljanja, što je ukupno 32 lista po izolatu, i održavani su u termostatu na temperaturi od $27\pm 0,5^{\circ}\text{C}$. U cilju obezbeđivanja uslova povišene vlažnosti, filter papir je po potrebi kvašen sa 2 ml sterilne destilovane vode. Pojava simptoma i intenzitet bolesti posmatran je svakodnevno, a nakon 3, 5. i 7. dana ocenjen je intenzitet bolesti ocenom od 1 do 5. U cilju potvrde Kohovih postulata, patogen je reizolovan iz inokulisane biljke.



Slika 4. Listovi ječma inokulisani suspenzijom spora gljive *A. parasiticus*

5.1.5.2 Provera patogenosti i reizolacija patogena u poljskim uslovima

Za testiranje patogenosti izolata *A. parasiticus*, u poljskim uslovima izvršena je veštačka inokulacija klipa kukuruza injektiranjem suspenzije spora gljive *A. parasiticus* u kanal svile, po metodi koju su opisali Reid i sar. (1996).

Na ogednoj parceli Instituta za kukuruz u Zemun Polju tokom 2016. i 2017. godine proveravana je patogenost svih 50 *A. parasiticus* izolata na hibridima kukuruza FAO grupa zrenja 300, 500 i 800. Oged je postavljen po slučajnom split-plot eksperimentalnom dizajnu.

Setva kukuruza je obavljena u 100 redova, po 20 biljaka u redu, na međurednom rastojanju od 70 cm, dok je razmak između biljaka u redu iznosio 25 cm. Trećeg dana po svilanju biljaka izvršena je veštačka inokulacija biljaka, tj. injektiranje 2 ml suspenzije koncentracije približno 3×10^7 konidija/ml u kanal svile klipa kukuruza, sa posebnom pažnjom da se ne povredi klip, prilikom unošenja patogena.

Priprema inokuluma izvršena je na isti način, kao u testovima provere patogenosti u laboratorijskim uslovima. Sterilnim špricom i iglom je direktno unošen patogen u tkivo domaćina. Ukupno 40 biljaka je inokulisano po izolatu, odnosno 10 biljaka u 4 ponavljanja. Kod

pozitivne kontrole injektirane su suspenzije spora gljive *A. flavus*, dok je kod kontrolnih biljaka, kao inokulum, korišćena sterilna voda.

Intenzitet aspergiloze klipa ocenjen je u fazi tehnološke zrelosti kukuruza prema skali od 1 do 7, na osnovu prisustva maslinastozelenih simptoma, karakterističnih za pomenutog patogena (Reid i sar., 1996):

- ocena 1– bez simptoma aspergiloze klipa,
- ocena 2– 1-3% zaražene površine klipa,
- ocena 3– 4-10% zaražene površine klipa,
- ocena 4– 11-25% zaražene površine klipa,
- ocena 5– 26-50% zaražene površine klipa,
- ocena 6– 51-75% zaražene površine klipa,
- ocena 7– potpuno zahvaćen klip (76-100%).

5.1.6 Toksikološki profil izolata *Aspergillus parasiticus*

Obzirom da se aflatoksini, kao kontaminanti hrane za ljude i životinje, nalaze u izuzetno niskim koncentracijama ($\mu\text{g}/\text{kg}$ ili ng/g) pri kojima ispoljavaju i toksično dejstvo, za njihovo određivanje potrebne su izuzetno osetljive i precizne metode (Turner i sar., 2009).

Različite analitičke metode koriste se za određivanje mikotoksina. Među njima najzastupljenije su tečna hromatografija visokog učinka (*High Performance Liquid Chromatograph*, HPLC) sa fluorescentnim detektorom (*fluorescence detector*, FLD), imunoenzimatske metode - enzimski imunosorpcioni test (The enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), kao i kombinovana tehnika tečne hromatografije sa masenom spektrometrijom (*liquid chromatography-mass spectrometry*, LC-MS/MS) (Lin i sar., 1998).

Pomoću ELISA metode urađene su kvalitativne i kvantitativne analize mikotoksina dobijenih iz micelije, kao i potencijala produkcije aflatoksina B1 i ukupnih aflatoksina ispitivanih izolata. Princip ELISA testa zasniva se na sledećim koracima: priprema uzoraka za ekstrakciju, ekstrakcija mikotoksina iz uzoraka i kvantifikacija rezultata mikotoksina.

PRIPREMA UZORKA za mikotoksikološke analize je neophodan postupak za određivanje potencijala produkcije mikotoksina, i izvršena je po metodi koju su opisali Logrieco i sar. (1995). Uslovi izvođenja sastojali su se iz sledećih koraka:

Umnožavanje kulture gljive. Izolati *A. parasiticus* su presejani na PDA, a inkubacija je vršena na temperaturi od 25°C u trajanju od 7 dana.

Priprema supstrata. U erlenmajer kolbi od 250 ml pomešano je 50 g zrna kukuruza i 22,5 ml destilovane vode, nakon čega je zatvorena aluminijumskom folijom i ostavljena 24 h na sobnoj temperaturi. Na taj način je zrnima kukuruza povišena vlaga do 40%, koji su poslužili kao idealna sredina za razvoj gljiva. Posle 24 h, kolba je sterilisana 30 minuta u autoklavu na 120°C pod pritiskom od 1,2 bara.



Slika 5. Erlenmajer kolbe sa zrnima kukuruza i destilovanom vodom

Inokulacija supstrata. Sterilna zrna kukuruza inokulisana su izolatima *A. parasiticus* koji su se prethodno razvijali sedam dana na PDA podlozi u mraku. Tri isečka kolonije gljive (veličine 0,5x0,5 cm) pomešana su sa sterilnim zrnima kukuruza u Erlenmajer kolbi, koja je nakon toga bila obložena aluminijumskom folijom i čuvana 7 dana u termostatu na temperaturi od 25°C. U cilju ravnomernog razvoja gljive i sprečavanja slepljivanja (konglomeracije) uzorka, boca je protresana svakog dana.



Slika 6. Erlenmajer kolbe sa zrnima kukuruza inokulisanim izolatima *A. parasiticus*

Sušenje, mlevenje i čuvanje inokuluma. Radi bolje ekstrakcije mikotoksina inokulisana zrna su se sušila u ventilacionoj sušnici na temperaturi od 60°C u trajanju od dva dana. Nakon toga su zrna samlevena do praškastog stanja u mlinu i odložena u plastične kese u frižider na +4°C do analize mikotoksina. Pre mlevenja svakog sledećeg uzorka, obavezno je čišćenje mlina, u cilju sprečavanje kontaminacije.



Slika 7. Samlevena zrna kukuruza u plastičnim kesama koja se do analize mikotoksina odlažu u frižider na +4°C

5.1.6.1 Određivanje potencijala produkcije aflatoksina ELISA testom

ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) je polukvantitativna (Munari i sar., 2003) i/ili kvantitativna (Reiter i sar., 2009) skrining tehnika koja se koristi za detekciju supstanci koje imaju antigena svojstva. Ovi testovi su visoko osetljivi i specifični.

Slobodni toksini iz uzorka i standarda su u kompeticiji sa enzim-vezanim toksinom (konjugatom) u bunarićima za vezivna mesta antitela. Nakon inkubacije bunarići se ispiraju rastvorom za ispiranje, kada se svi nevezani molekuli toksina i enzimskog konjugata uklanjaju. Dodaje se supstrat koji reaguje sa vezanim konjugatom i dolazi do razvijanja boje. Posle određenog perioda inkubiranja, dodaje se stop reagens i vrši očitavanje intenziteta boje na ELISA čitaču. Koncentracija aflatoksina određuje se na osnovu kalibracione krive standarda i koncentracija je obrnuto proporcionalna intenzitetu razvijene boje. Merenje apsorbance vrši se na 450 nm. Optička gustina uzorka poredi se sa optičkom gustinom standarda na osnovu kojih ELISA čitač preračunava koncentraciju toksina u uzorku.

Prednosti ELISA tehnike su: jednostavnost izvođenja, minimalna priprema uzorka, i niska cena analize, dok se kao nedostaci navode pojava "crossreactivity", što ukazuje na mogućnost dobijanja lažno pozitivnih rezultata. "Cross-reactivity" predstavlja sposobnost jedinjenja slične hemijske strukture da reaguje sa antitelima. Usled toga, potrebno je svaki detektovani aflatoxin ELISA metodom potvrditi i nekom hromatografskom tehnikom, posebno ako je koncentracija aflatoksina blizu MDK vrednosti (Anklam i sar., 2002).

ELISA metoda se sastoji iz dva koraka: ekstrakcije mikotoksina iz uzorka određenim rastvaračem i određivanje koncentracije mikotoksina pomoću ELISA čitača.

EKSTRAKCIJA MIKOTOKSINA za kvalitativnu i kvantitativnu analizu potencijala produkcije mikotoksina obavljena je prema uputstvu proizvođača: za AFB1 korišćen je Celer AFB1 Test Kit (Tecna S.r.l., Italy). za AFLA korišćen je Celer AFLA Test Kit (Tecna S.r.l., Italy):

- masa samlevenog uzorka kukuruza od $5 \pm 0,001$ g ekstrahovana je sa 25 ml 70% MeOH (70% rastvor metanola i destilovane vode) i homogenizovana u mikseru (Osterizer blender) na 1300 obrtaja u trajanju od 3 min

- homogenizovana smeša uzorka je nakon ekstrakcije i filtriranja kroz Whatman No. 1 filter papir spremna za analizu, a filtrat je sakupljen u staklene bočice.

U slučaju povišene koncentracije mikotoksina u uzorcima preko 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ kod AFB1, odnosno preko 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ kod AFLA, filtrati ovih uzoraka se razblažuju prema uputstvu proizvođača.

ELISA postupak

Analiza se odvijala kroz sledeće korake:

- 100 µl aflatoksin HRP-konjugata i 50 µl standarda tj. uzorka dodaje se višekanalnom mikropipetom u bele bunariće.
- sadržaj u bunarićima se promeša tri puta mikropipetom i 100 µl se prenese u bunariće, čije je dno obloženo antitelima.
- Nakon perioda inkubacije (10 minuta) bunarići se ispiraju puferom za ispiranje i suše na papirnoj vati.
- dodaje se 100 µl supstrata koji reaguje sa vezanim konjugatom uz razvoj plave boje i inkubira na sobnoj temperaturi 5 minuta.
- Nakon toga, u svaki bunarić dodaje se 50 µl stop reagensa za zaustavljanje procesa, koji plavi rastvor boji u žuto. Koncentracija aflatoksina obrnuto je proporcionalna intenzitetu žute boje.

Celer AFB1 Test kit sadrži pet standarda koncentracija od 0; 1; 5; 20 i 40 µg/kg. Celer AFLA Test kit sadrži standardne koncentracije 0; 2; 8; 30 i 80 µg/kg.

KVANTIFIKACIJA KONCENTRACIJE MIKOTOKSINA vrši se na 450 nm talasne dužine, pomoću ELISA čitača (BioTek EL x 800TM) koji preračunava koncentraciju mikotoksina za AFB1 i AFLA izraženu u µg/kg.

5.1.6.2 Kvalitativno i kvantitativno određivanje aflatoksina metodom visoko efikasne tečne

Visoko efikasna tečna hromatografija (High Performanse Liquid Chromatography – HPLC) predstavlja savremenu analitičku tehniku pomoću koje se vrši razdvajanje, identifikacija i kvantifikacija jedinjenja od interesa iz uzoraka na osnovu različite raspodele između stacionarne (nepokretne) i mobilne (pokretne) faze. Mala količina (µl) profiltriranog ekstrakta se injektuje u sistem, pomoću autosemplera, i u struji odgovarajuće mobilne faze biva uneta na kolonu. Na koloni dolazi do interakcija između komponenata uzorka i stacionarne faze (punjenja kolone) gde se u zavisnosti od njihove hemijske prirode, analizirane komponente različito zadržavaju. Vreme koje je potrebno da se neko jedinjenje eluira („ispre“) sa kolone naziva se retenciono vreme („*retention time*“, t_R). Izdvojene komponente sa kolone dolaze u detektor, koji ih registruje, prevodi u električni signal i pretvara u pikove koji formiraju hromatogram. Pomoću

specijalnog softverskog programa dobijeni hromatogrami se mogu koristiti za identifikaciju i kvantifikaciju. Identifikacija se vrši na osnovu poređenja t_R analizirane komponente sa t_R standarda. Na osnovu površine pikova stiču različite koncentracije formira se kalibraciona kriva pomoću koje se na osnovu površine pika željenog jedinjenja izračunava njegova koncentracija u uzorku.

Fluorescentni detektor (FLD)

Fluorescencija je sposobnost ekscitacije (pobuđivanja) jedinjenja sa specifičnim funkcionalnim grupama) pri kraćim talasnim dužinama i emisija zračenja na višim talasnim dužinama. Jedinjenja koja imaju sposobnost da fluoresciraju ili jedinjenja koja se procesom derivatizacije prevode u oblik koji može da fluorescira moguće je detektovati pomoću fluorescentnog detektora (Fluorescence detector - FLD).

Prirodnu fluorescenciju visokog inteziteta pokazuju aflatoksini B2 i G2. Nasuprot njima, AFB1 i AFG1 moraju biti derivatizovani pre detekcije na FLD detektoru, zbog slabije prirodne fluorescencije. Prekolonska (trifluorsircetna kiselina - TFA) i poslekolonska derivatizacija (jodidi, bromidi, Kobra celija) koriste se u cilju povećanja njihove fluorescencije. U prisustvu TFA, AFB1 i AFG1 prelaze u derivatizovane oblike AFB2A i AFG2A, respektivno koji pokazuju znatno jaču fluorescenciju. Do povećanja fluorescencije dolazi usled ubacivanja vode u furanski prsten AFB1 i AFG1 (Reiter i sar., 2009). Nakon što se uzorak prečisti i upari, u njega se dodaje TFA. Radi izdvajanja aflatoksina sa zidova suda u kome je vršeno uparavanje, dodaje se n-heksan, a potom TFA. Nakon završene derivatizacije, smesa n-heksana i TFA se upari i uzorak se rastvori u mobilnoj fazi (Oliveira i sar., 2009).

Za identifikaciju i kvantifikaciju aflatoksina B1, B2, G1 i G2 pored ELISA, korišćena je i visoko efikasna tečna hromatografija i sa fluorescentnim detektorom (HPLC-FLD). Uzorci za ekstrakciju pripremljeni su po metodi koju su opisali Abbas i sar. (2004). Izolati *A. parasiticus*, prethodno presejani na PDA, gajeni su na temperaturi od $28 \pm 1^\circ\text{C}$ u tami u trajanju od pet dana. Kao pozitivna kontrola korišćen je izolat *A. flavus*. Posle pet dana sa površine kulture prikupljana je micelija, koja je prebačena u staklene mikrotube. Dodat je rastvor acetonitril-voda (90:10 v/v) koji je mućkan 30 minuta na mućkalici/tresilici. Uzet je 1 mL supernatanta i centrifugiran 10 minuta. Nakon filtriranja (*Whatman No.1*) i prečišćavanja pomoću *Mycosep 224AflaZon*®

(*Romer Labs, USA*) kolone, ekstrakti su derivatizovani smešom trifluorsirćetne kiseline/glacijalne sirćetne kiseline/vode (20:10:70; v/v/v). Derivatizacija je vršena u vremenskom periodu od 10 minuta, u vodenom kupatilu na 65°C (AOAC Official Method 994.08). Nakon završene derivatizacije, ekstrakti su profiltrirani kroz PTFE filter (17mm, 0,45 µm) i injektovani u *Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific, Germany)* tečni hromatografski sistem povezanim sa fluorscentnim detektorom (*Thermo Scientific, Germany*). Hromatografsko razdvajanje aflatoksina (B1, B2, G1, G2) izvršeno je na koloni *Acclaim Polar Advantage II, C18* (150×4,6 mm, 3 µm). Za razdvajanje ispitivanih aflatoksina kao mobilna faza korišćena je smeša acetonitril/metanol/voda (1:1:4; v/v/v) pri linearnom protoku od 1 mL/min, u toku 20 min (AOAC Official Method 994.08). Injekciona zapremina iznosila je 10 µL, dok je kolona termostatirana na 30°C. U cilju detekcije aflatoksina, talasne dužine za eksitaciju podešene su na 365 nm, odnosno za emisiju na 455 nm.

Početne koncentracije standardnih rastvora aflatoksina (B1, B2, G1, G2) (SUPELCO) iznosile su 3000 µg/kg za svaki. Njihovim razblaživanjem na krajnje koncentracije: 1; 3; 5,62; 15; i 30 µg/kg, dobijeni su radni rastvori, pomoću kojih je konstruisana i kalibraciona kriva, postavljanjem površine pika (odgovor detektora) prema datoj koncentraciji standarda. Granica detekcije za AFLA G1, B1, G2 i B2 iznosila je 0,53, 0,57, 0,30 i 0,14 µg/L, respektivno, a granica kvantifikacije 0,65, 0,71, 0,42, 0,28, respektivno. Ispitivani aflatoksini su identifikovani poređenjem sa retencionim vremenom standarda, dok je kalibraciona kriva odgovarajućih standarda korišćena za kvantitativna izračunavanja. Kalibraciona kriva dobijena je unošenjem određene vrednosti površine pika i odgovarajuće koncentracije standarda u kompjuterskom programu Empower pro. Sadržaj aflatoksina je izražen u µg/kg, kao srednja vrednost tri nezavisna injektovanja.

5.1.6.3 Erlich-ov test

Ehrlich-ovim testom, korišćenjem filter papir metode (Lund, 1995) ispitivana je proizvodnja ciklopiazonične kiseline dobijenih izolata. Izolati su gajeni 7 dana na CYA podlozi. Isečeni su fragmenti kolonije (Ø 1 cm) na koje je postavljen filter papir (Whatman No. 1) natopljen Ehrlich-ovim reagensom (2g 4-dimetil aminobenzaldehid + 85 ml 96% etanola + 15ml 10 NHCl). Promena boje filter papira praćena je nakon 2 minuta.

5.1.7 Molekularna detekcija izolata *Aspergillus parasiticus*

Izolati koji su prethodno identifikovani na osnovu patogenih, morfoloških, ekoloških, odgajivačkih i toksikoloških karakteristika, potvrđeni su molekularnom detekcijom i identifikacijom, primenom RFLP-PCR metode (Khoury i sar., 2011) koja može detektovati male varijacije u sekvencama. Iz ispitivanih izolata prvo je izolovana genomska DNK primenom metode prema Atoui i sar. (2007). Sledeći korak ove metode je umnožavanje fragmenta DNK koji sadrži varijaciju. Nakon toga sledi digestija produkta umnožavanja odgovarajućim restrikcionim enzimom. Prisustvo/odsustvo mesta prepoznavanja restrikcionih enzima rezultira nastajanjem restrikcionih fragmenata različite dužine koji mogu biti detektovani elektroforetskim razdvajanjem.

IGS region (*intergenic spacer*) gena *aflJ* i *aflR* uključenih u biosintezu aflatoksina poslužio je za detekciju i razdvajanje vrsta *A. flavus* i *A. parasiticus*. Za ovu analizu, i kultura *A. parasiticus* (CBS 100926), koja je deponovana u CBS-KNAW kolekciji u Holandiji, je korišćena kao pozitivna kontrola.

Za potrebe molekularne detekcije i identifikacije vrste *A. parasiticus* odabrani izolati zasejavani su na CYA podlogu i inkubacija je vršena u termostatu na temperaturi od 25°C, u trajanju od dva dana. Micelija je sastrugana sterilnim skalpelom iz razvijene kolonije gljive, a potom je korišćena za ekstrakciju nukleinskih kiselina. Posebna pažnja prilikom sakupljanja micelije usmerena je na izbegavanje unošenja fragmenata podloge u pocetni materijal za ekstrakciju DNK.

Hranljiva podloga korišćena u ovim istraživanjima:

CYA podloga pripremljena je od:

- Saharoze: 30 g
- 1 ml (Cu + Zn) rastvora
- 1 g K₂HPO₄
- Koncentrata po Čapeku: 10 ml
- Ekstrakta kvasca: 5 g (Pitt i Hocking, 1997).

5.1.7.1 Ekstrakcija nukleinskih kiselina

Micelija ispitivanih izolata (oko 100 mg) sastrugana je sa površine podloge sterilnim štapićem i naneta u mikrotest tube zapremine 1,5 ml. U mikrotest tube je prethodno naliveno 500 ml lizinskog pufera. Tube sa suspenzijom su zatim lagano okretane kako bi se sadržaj promešao i stavljene u vodeno kupatilo na 65°C u trajanju od 15 minuta uz povremeno mešanje sadržaja tokom inkubacije, kako bi se ćelijski zid razgradio. Zatim su tube ostavljene na sobnoj temperaturi 10 minuta. Nakon dodavanja 150 ml kalijum acetata, sadržaj tuba je dobro promešan na vorteksu, a zatim centrifugiran na 10.000 obrtaja/minuti na 20°C u trajanju od 1 minuta. Dodavanjem ovog pufera omogućeno je taloženje proteina i polisaharida. Posle centrifugiranja, gornja faza sadržaja tuba je prenetu u nove tube (1,5 ml). U svaku tubu je zatim dodato po 150 ml izopropanola. Usledilo je centrifugiranje na 10.000 obrtaja/minuti u trajanju od 2 minuta. Na ovaj način uklonjene su sve nečistoće koje su se vezale za filter, a ostala je samo DNK. Po centrifugiranju gornja faza je pažljivo odlicena, a talog je ispran korišćenjem 1 ml hladnog 70% etanola. Otvorene mikrotest tube su ostavljene na sobnoj temperaturi u trajanju od 30 min. Posle sušenja, talog dezoksiribonukleinske kiseline (deoxyribonucleic acid, DNA) je resuspendovan u 30 ml dejonizovane vode. Koncentracija i kvalitet izolovane DNK je proverena na Eppendorf BioSpectrometer uređaju merenjem absorbance na 280nm, 260nm i 230nm. Napravljena su radna razblaženja od 50 ng/μl koja su korišćena u daljim analizama.

5.1.7.2 Lančana reakcija polimeraze (*Polymerase Chain Reaction, PCR*)

Pripremljena je PCR reakciona smeša zapremine 50 μl koja je sadržala: 1xPCR pufera, 10mM dNTPs, 50 mM MgCl₂, 1U Taq DNK polimeraze (ThermoFisher Scientific, SAD), 1 mM svakog prajmera, sdH₂O 2 μl i 100 ng ciljane DNK.

PCR amplifikacija dobijenih uzoraka izvedena je na TProfessional Stiard Thermocycler-u (Biometra, Nemačka) prema sledećem programu:

- Početna denaturacija na 94°C u trajanju od 4 minuta.
- 35 ciklusa (denaturacija na 94°C u trajanju od 40 s; vezivanje prajmera na 58°C u trajanju od 40 s i izduživanje prajmera na 72°C u trajanju od 1 min)
- Finalno izduživanje na 72°C u trajanju od 10 min.

Pozitivnom reakcijom smatrana je pojava traka produkata očekivane veličine od 674 bp.

5.1.7.3 Vizuelizacija i analiza produkata PCR reakcije

Analiza dobijenih PCR proizvoda urađena je nakon elektroforetskog razdvajanja dobijenih produkata u 1% agaroznom gelu i 0,5X–TBE puferu. Priprema agaroznog gela podrazumeva rastvaranje odgovarajuće količine agaroze (Lonza, *Switzerli*) u 0,5X TBE puferu i zagrevanje do temperature ključanja u mikrotalasnoj pećnici. Potom se pristupa hlađenju, nakon čega se gel razliva u kalupe aparata za horizontalnu elektroforezu. Češalj se uranja u gel tako što se postavi u odgovarajuća ležišta kalupa i kada gel očvrstne vadi se iz kalupa, nakon čega se kalup sa gelom postavlja u aparat za elektroforezu. U aparat se sipa 0,5X TBE pufer do nivoa kada je gel potpuno uronjen u pufer. Pre unošenja, 5 μ l svakog uzorka je pomešano sa 1,5 μ l boje za nalivanje (*MBI Fermentas*, Vilnius, Litvanija). Pri elektroforezi korišćen je marker *100 bp ladder* (ThermoFisher Scientific, SAD), radi određivanja veličine produkata poređenjem sa očekivanom veličinom DNK fragmenata markera.

Elektroforeza je izvedena pri naponu od 60 V u trajanju od 1h 45 minuta. Nakon završene elektroforeze agarozni gel je inkubiran u rastvoru etidijum-bromida (0,5 μ g/ml) u trajanju od 15 minuta. Amplifikovani fragmenti u gelu posmatrani su pod UV svetlom pomoću transiluminatora i fotografisani.

Prajmeri IGS-F/IGS-R specifični za IGS region su korišćeni za umnožavanje ciljnog DNK fragmenta veličine 674bp primenom PCR metode. Khoury i sar. (2011) su pokazali da je fragment ove veličine detektovan samo kod vrsta *A. flavus* i *A. parasiticus*. U Uniplex PCR metodi pozitivnom reakcijom smatrana je pojava amplikona veličine oko 674 bp specifičnih za *A. parasiticus* i *A. flavus*.

5.1.7.4 ITS rDNK region izolata *Aspergillus parasiticus* za RFLP analizu

Sekvence IGS rDNK regiona su korišćenjem paketa Clustal X verzija 1.83 analizirane na prisustvo specifičnih mesta za restrikcione enzime koji se mogu koristiti za specifičnu detekciju i razdvajanje *A. parasiticus* od *A. flavus*. Za ovu analizu korišćene su sekvence izolata *A. parasiticus* poreklom iz Srbije. Takođe je korišćena i kultura *A. parasiticus* koja je deponovana u CBS-KNAW kolekciji. Potvrda dobijenih razlika u virtuelnoj restrikcionoj analizi je urađena digestijom amplifikovanih IGS-F/IGS-R produkata izolata *A. parasiticus* *Bgl*III restrikcionim

enzimom (Sigma, Nemačka) prema uputstvu proizvođača. Reakcije RFLP analize su se odvijale u reakcionoj smeši od 40 µl, koja se sastojala od 15 jedinica (U) *BglIII* restrikcionog enzima, 4 µl pufera za restrikcioni enzim i 15 µl PCR produkta, i sterilne vode. Reakcione smeše su inkubirane na temperaturi od 37°C u trajanju od 1h. Produkti RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism* - polimorfizam restrikcionih fragmenata za različite dužine) analize razdvojeni su u 2% agaroznom gelu i obojeni prema već opisanom postupku za vizuelizaciju PCR produkata.

6 REZULTATI

6.1 Izolacija i identifikacija izolata *Aspergillus parasiticus*

6.1.1 Pregled terena i uzorkovanje aspergilioznih klipova

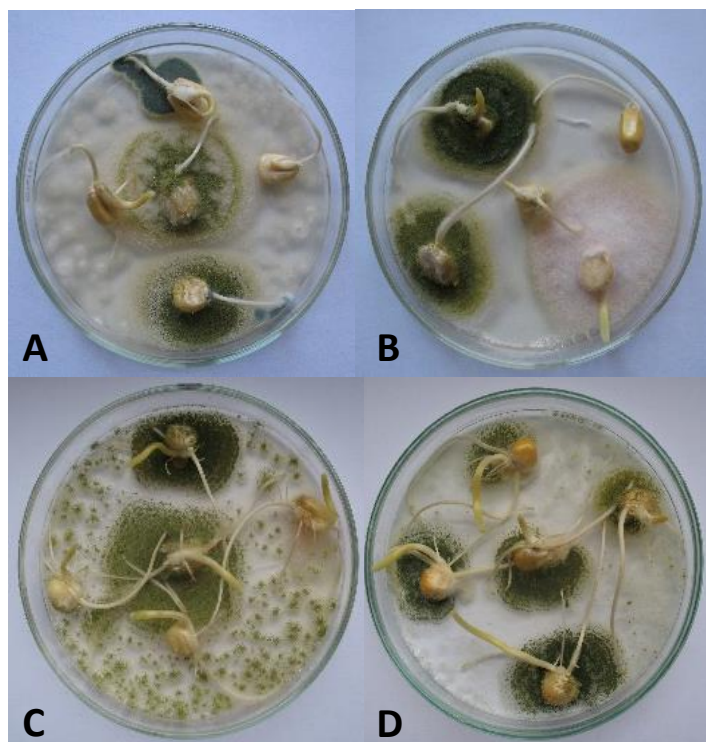
Prikupljanje uzoraka obolelih klipova kukuruza za istraživanja obuhvatila su pregled useva kukuruza i skladišta na prisustvo maslinasto zelene praškaste prevlake na pojedinim zrnima ili celom klipu u Srbiji, u periodu 2013-2016. godine (Slika 8). Klipovi kukuruza sa simptomima oboljenja prikupljeni su iz useva sa 37 lokaliteta u toku vegetacije. Uzorkovanje zrna kukuruza iz skladišta vršeno je tokom 2016. godine sa 27 lokaliteta.



Slika 8. *Aspergillus parasiticus*. Simptomi bolesti koje ispoljeni na klipu kukuruza sa karakterističnom sporulacijom patogena (A, B)

6.1.2 Izolacija gljiva, odabir izolata i dobijanje monospornih izolata

Za izolaciju gljiva odabrani su fragmenti biljnog tkiva na prelazu između zdravog i obolelog, koji su površinski sterilisani i postavljeni na PDA podlogu. Posle inkubacije u trajanju od 5 dana, oko zrna kukuruza razvile su se kolonije gljiva i odabrane su one koje su ispoljile morfološke odlike (izdvojene na osnovu vizuelnih pregleda i mikroskopiranjem) karakteristične za vrste roda *Aspergillus* (Slika 9).



Slika 9. Izgled kolonija gljiva *Aspergillus* spp. petog dana nakon inkubacije (A, B, C, D)

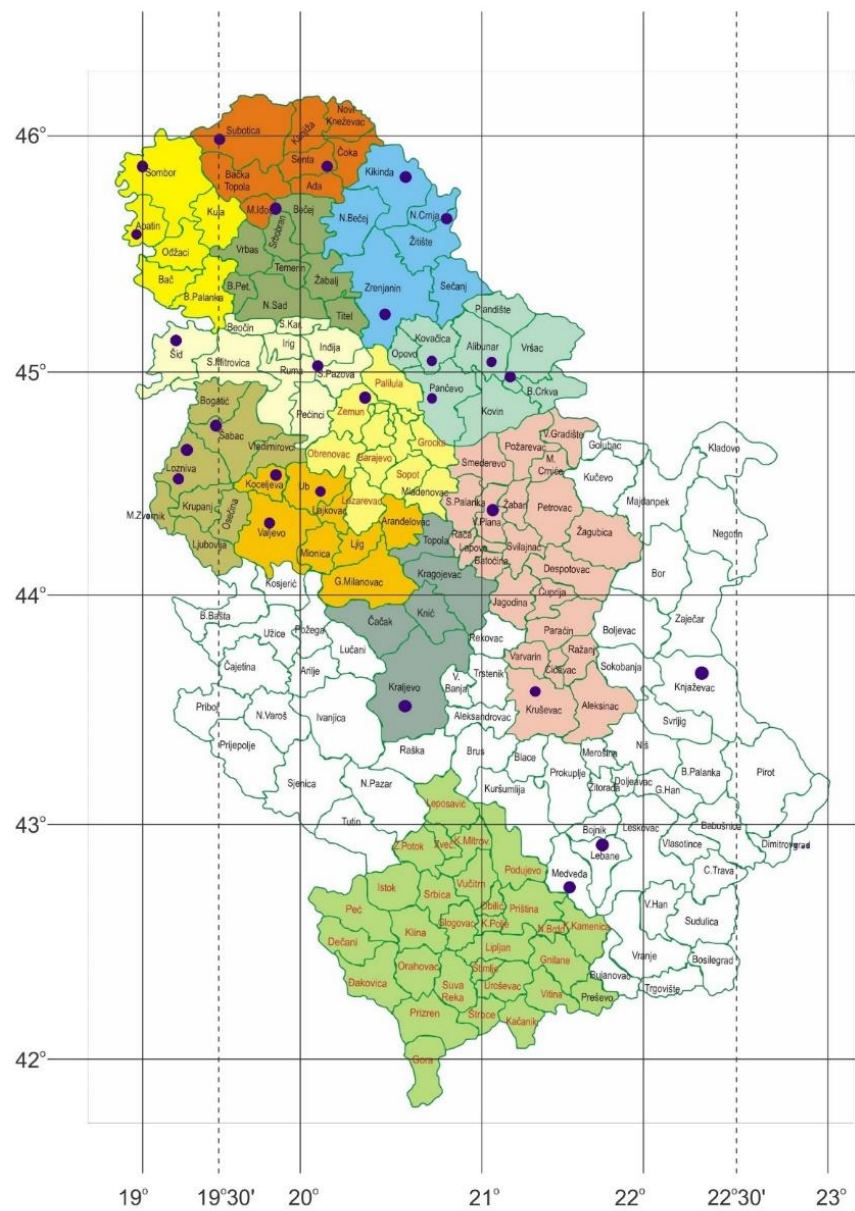
Izolati su grupisani prema makroskopskim morfološkim osobinama, a zatim su odabrani predstavnici grupa. Na taj način je dobijeno ukupno 46 izolata različitog geografskog porekla, od čega je 20 izolata poreklom sa zrna uzetog iz polja, a 26 izolata sa zrna iz skladišta. Kao pozitivna kontrola korišćeni su izolat MRI 3937 (*A. flavus*) i referentni izolat *A. parasiticus* (CBS100926) deponovan u kolekciji CBS Culture Collection of Fungi, Yeast, Bacteria, Plasmids and Phages, Netherlands (Tabela 5, Slika 10).

Tabela 5. Izolati *Aspergillus* sp. odabrani za dalja ispitivanja

	Oznaka izolata	Lokalitet	Godina izolacije
1.	MRI 3802	Slatina (Podrinje)	2013
2.	MRI 3808	Zminjak (Mačva)	2013
3.	MRI 3812	Lozničko Polje (Podrinje)	2013
4.	MRI 3817	Valjevska Loznica	2013
5.	MRI 3819	Valjevska Loznica	2013
6.	MRI 3822	Stublenica	2013
7.	MRI 3930	Južni Banat	2013
8.	MRI 3937 (<i>A. flavus</i>)	Orlovat	2013
9.	MRI 3977	Radojevo	2013
10.	MRI 3990	Ostojićevo	2013
11.	MRI 3994	Zemun Polje	2013
12.	MRI 4003	Zemun Polje	2013
13.	MRI 4008	Zemun Polje	2013
14.	MRI 4033	Zemun Polje	2013
15.	MRI 4045	Bajmok	2013
16.	MRI 4194	Velika Plana	2014
17.	MRI 4195	Zemun Polje	2014
18.	MRI 4197	Zemun Polje	2015
19.	MRI 4198	Zemun Polje	2015
20.	MRI 4196	Sakule	2015
21.	MRI 4232	Debeljača	2015
22.	MRI 4239	Feketić	2015
23.	MRI 4251	Mramorak	2016
24.	MRI 4252	Mramorak	2016
25.	MRI 4253	Mramorak	2016
26.	MRI 4254	Mramorak	2016

Tabela 5. (nastavak)

27.	MRI 4255	Kikinda	2016
28.	MRI 4256	Gakovo	2016
29.	MRI 4257	Gakovo	2016
30.	MRI 4258	Gakovo	2016
31.	MRI 4259	Gakovo	2016
32.	MRI 4260	Žarkovac	2016
33.	MRI 4261	Kikinda	2016
34.	MRI 4262	Apatin	2016
35.	MRI 4263	Pančevo	2016
36.	MRI 4264	Medveđa	2016
37.	MRI 4265	Medveđa	2016
38.	MRI 4266	Medveđa	2016
39.	MRI 4267	Medveđa	2016
40.	MRI 4268	Medveđa	2016
41.	MRI 4269	Medveđa	2016
42.	MRI 4270	Knjaževac	2016
43.	MRI 4271	Zemun Polje	2016
44.	MRI 4272	Zemun Polje	2016
45.	MRI 4273	Zemun Polje	2016
46.	MRI 4274	Kruševac	2016
47.	MRI4275	Kraljevo	2016



Slika 10. Geografska distribucija dobijenih izolata *Aspergillus* sp.

Patogenost izolata je potvrđena veštačkom inokulacijom klipova kukuruza. Sa inokulisanih klipova obavljena je reizolacija patogena i reizolati su upoređeni sa izolatima korišćenim za inokulaciju. Dobijeni reizolati su, po izgledu kolonije i morfologiji reproduktivnih organa, u potpunosti odgovarali izvornim izolatima čime je potvrđena patogenost izolata i ispunjeni Kohovi postulati.

Svi dobijeni izolati *Aspergillus* spp. prečišćeni su do monospornih i korišćeni za dalji rad.

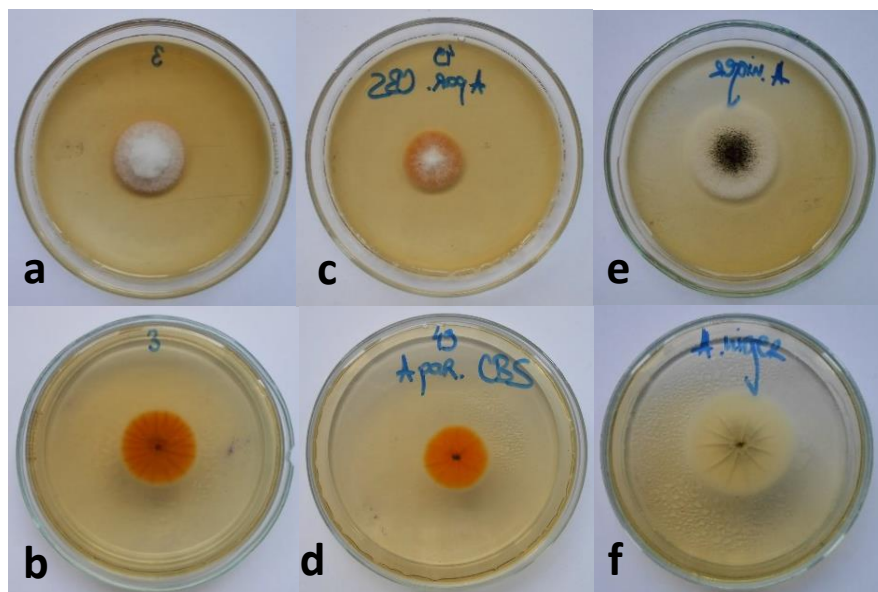
6.1.3 Identifikacija izolata *Aspergillus parasiticus* na osnovu morfoloških svojstava

6.1.3.1 Proučavanje morfoloških svojstava izolata

Identifikacija fitopatogenih gljiva u pogledu morfoloških karakteristika predstavlja važan taksonomski karakter. Od makroskopskih morfoloških odlika proučavane su osnovne karakteristike kolonija (boja, izgled i struktura, pigmentacija podloge), pored kojih je određena i brzina porasta micelije. Od mikroskopskih karakteristika proučavani su izgled i oblik stipa, vezikula i fialida, prisustvo ili odsustvo metula, nazubljenost površinskog zida spora, njihova veličina i oblik. Praćeno je obrazovanje i porast sklerocija. Na osnovu makroskopskog i mikroskopskog pregleda monospornih kultura 46 izolata vrste *A. parasiticus* utvrđena je intraspecijska varijabilnost ove vrste.

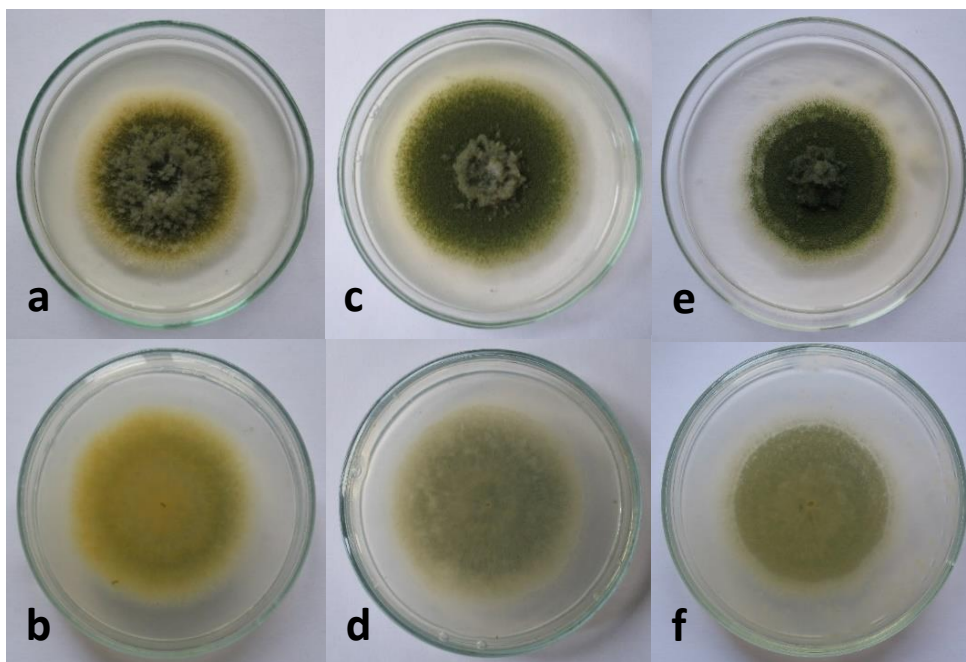
6.1.3.1.1 Makroskopska morfološka svojstva proučavanih izolata

Svi izolati koji su na CYA podlozi imali boju kolonije u nijansi zelene ili bronzanomrke, testirani su i na AFPA podlozi. U ranijim istraživanjima potvrđeno je da su oni izolati koji su istovremeno imali zelenu boju kolonije na CYA i kadmijum narandžastu na AFPA pripadali rodu *Aspergillus* sekciji Flavi. Za razliku od pripadnika ove sekcije, vrste roda *Aspergillus* koje pripadaju drugim sekcijama ne stvaraju ovu boju u podlozi (Slika 11).



Slika 11. Izgled kolonija izolata MRI 3812 (3) (a-lice kolonije; b-naličje kolonije), referentnog izolata CBS100926 (*A. par. 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

Svi izolati *A. parasiticus* na PDA podlozi, 24 h nakon zasejavanja, obrazuju začetak micelije, bele boje i vazdušastog izgleda, prečnika oko 3-4 mm. Nakon par dana dolazi do promena u konzistenciji i obojenosti kultura, a primetan je i neujednačen porast ispitivanih izolata. Posle sedam dana porasta na PDA podlozi na temperaturi 25°C, ispitivani izolati *A. parasiticus* ispoljili su divergentnost u makroskopskim svojstvima (izgled, boja i porast kolonije). Na PDA podlozi ispitivani izolati formirali su obilnu tamnozelenu, vazdušnu, gustu miceliju, pamučastog izgleda (Slika 12).

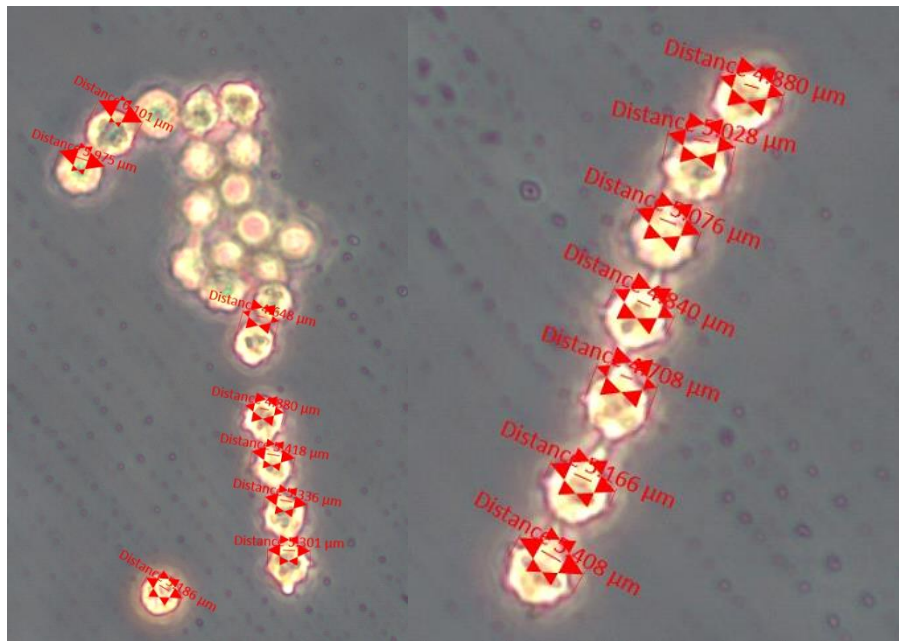


Slika 12. Izgled kolonija izolata prve (a-lice kolonija; b-naličje kolonija), druge (c-lice kolonija; d-naličje kolonija) i treće (e-lice kolonija; f-naličje kolonija) grupe na KDA podlozi.

Prva grupa izolata na PDA podlozi formira tamno zelenu vazдушnu koloniju s primesama sive, ravnih ivica. Obod kolonije je žućkasto-beličast. U podlozi je uočena pigmentacija u vidu žute boje (Slika 12: a-lice kolonija; b-naličje kolonija). Druga grupa od 15 izolata obrazovala je vazdušne kolonije tamno zelene boje, ravnih ivica, dok su mase spora sivkaste boje obrazovane na njoj, u središnjem delu kolonije (Slika 12: c-lice kolonija; d-naličje kolonija). Centralna zona kolonije je maslinasto zelene do sive boje. Na naličju Petri kutija nije uočena pigmentacija kolonija. Obod kolonije je žućkaste boje. Izgled treće grupe izolata je tamno zelene boje (boja bršljena), ravnih do blago talasastih oboda kolonije, sa prisutnim koncentričnim prstenovima spora. Na naličju Petri kutija kolonije nisu imale pigmentaciju (Slika 12: e-lice kolonija; f-naličje kolonija). Ivična zona je bela do prljavo bela. Referentni izolat CBS100926, poreklom iz Holandije, obrazovao je koloniju sličnog izgleda kao i izolati poreklom iz Srbije, koji su svrstani u ovu grupu.

6.1.3.1.2 Mikroskopska morfološka svojstva proučavanih izolata

Mikroskopskim pregledom kolonija izolata *A. parasiticus*, gajenih na PDA i MEA podlogama pri temperaturi od 25°C, proučavani su izgled i oblik stipa, vezikula i fikalida, prisustvo ili odsustvo metula, nazubljenost površinskog zida spora, njihova veličina i oblik. Svi odabrani izolati *A. parasiticus* obrazuju jednoćelijske, nazubljene konidije sedam dana nakon zasejavanja (Slika 13).



Slika 13. Izolat *A. parasiticus* MRI 3808: izgled i prečnik konidija

Oblik konidija je okruglast, dok su dimenzije u opsegu 3,41-6,86 µm. Uporedni prikaz prosečnih prečnika konidija izolata *A. parasiticus* uključenih u ispitivanjima mikroskopskih odlika prikazan je u Tabeli 6. Izolati *A. parasiticus* varirali su u prečniku konidija. Konidije najmanjeg prosečnog prečnika 4,27 µm obrazovao je izolat MRI 3937 (*A. flavus*), koji je korišćen kao pozitivna kontrola. Izolat MRI 4197 obrazovao je konidije koje su u prosečnoj vrednosti imale najmanji prečnik (4,95 µm), dok je izolat MRI 4265 formirao konidije prosečno najvećeg prečnika (5,79 µm). Ostali izolati obrazovali su konidije prečnika prosečnih dužina od 4,95-5,79 µm. Referentni izolat CBS100926 formirao je konidije prečnika prosečne vrednosti

5,49 μm . Kada su u pitanju minimalne i maksimalne vrednosti, prečnik konidija među izolatima varirao je od 3,41 μm MRI 3937 (kontrolni izolat *A. flavus*) do 6,86 μm (MRI 3802, MRI 4254) (Tabela 6, Grafikon 1).

Proučavani izolati razlikovali su se u pogledu formiranja metula, dok su svi izolati formirali fjalide i konidije. Konidije su sferične, nazubljene i sa debelim zidovima. Vezikule su loptaste, 14-25 μm u prečniku (Slika 14).



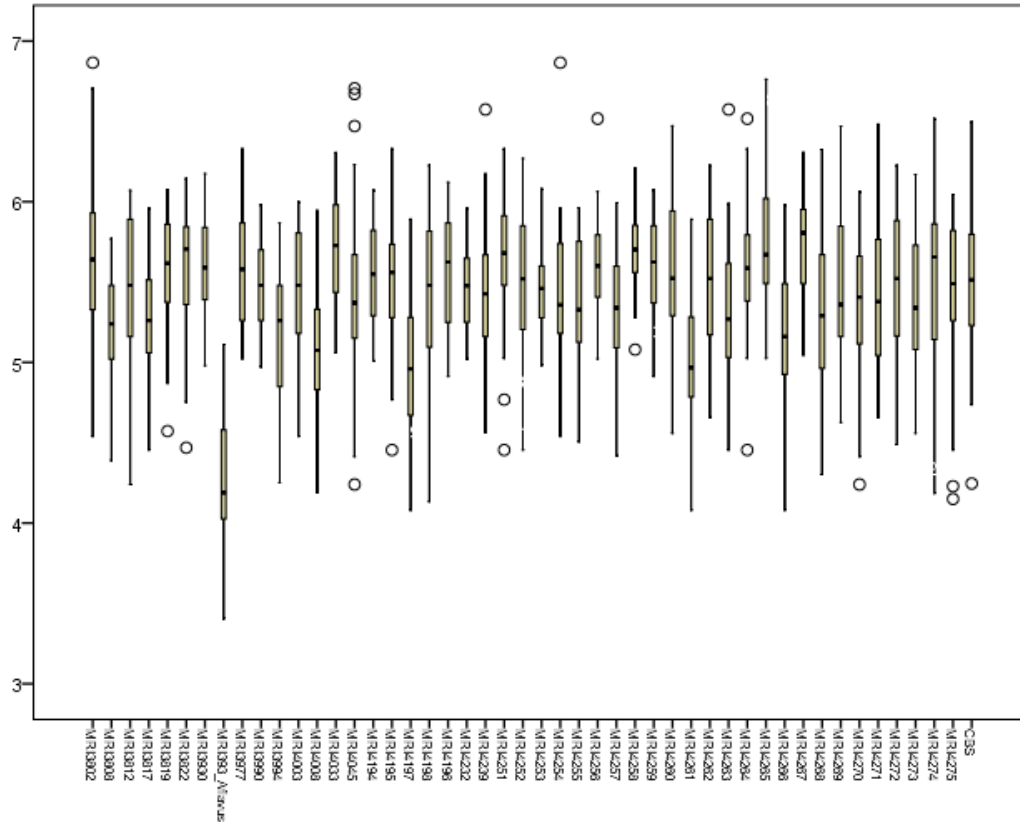
Slika 14. Izgled vezikule izolata *A. parasiticus* MRI 3802

Tabela 6. Prečnik konidija izolata *A. parasiticus* na MEA podlozi, nakon sedam dana na 25 °C

IZOLAT	Srednja vrednost	St. dev.	Minimum	Maksimum	CV (%)
MRI 3802	5.67	0.45	4.54	6.86	7.9
MRI 3808	5.22	0.33	4.39	5.77	6.4
MRI 3812	5.44	0.46	4.24	6.07	8.4
MRI 3817	5.29	0.35	4.45	5.96	6.6
MRI 3819	5.57	0.36	4.57	6.07	6.4
MRI 3822	5.58	0.37	4.47	6.14	6.6
MRI 3930	5.58	0.30	4.98	6.17	5.4
MRI 3937 (<i>A. flavus</i>)	4.27	0.42	3.41	5.11	9.8
MRI 3977	5.56	0.34	5.02	6.33	6.1
MRI 3990	5.47	0.29	4.97	5.98	5.3
MRI 3994	5.15	0.43	4.25	5.87	8.3
MRI 4003	5.46	0.37	4.54	6.00	6.8
MRI 4008	5.07	0.42	4.19	5.95	8.3

MRI 4033	5.70	0.33	5.06	6.31	5.8
MRI 4045	5.43	0.53	4.24	6.70	9.8
MRI 4194	5.56	0.30	5.01	6.07	5.4
MRI 4195	5.50	0.36	4.45	6.33	6.5
MRI 4197	4.95	0.46	4.08	5.89	9.3
MRI 4198	5.43	0.45	4.13	6.23	8.2
MRI 4196	5.57	0.34	4.91	6.12	6.2
MRI 4232	5.45	0.27	5.02	5.96	5.0
MRI 4239	5.42	0.41	4.57	6.57	7.5
MRI 4251	5.63	0.38	4.45	6.33	6.8
MRI 4252	5.52	0.38	4.45	6.27	6.9
MRI 4253	5.46	0.28	4.98	6.08	5.0
MRI 4254	5.46	0.40	4.54	6.86	7.3
MRI 4255	5.37	0.43	4.51	5.96	7.9
MRI 4256	5.60	0.31	5.02	6.52	5.6
MRI 4257	5.36	0.33	4.42	5.99	6.1
MRI 4258	5.71	0.22	5.08	6.21	3.8
MRI 4259	5.58	0.29	4.91	6.07	5.2
MRI 4260	5.53	0.44	4.56	6.47	7.9
MRI 4261	5.02	0.42	4.08	5.89	8.5
MRI 4262	5.54	0.41	4.66	6.23	7.4
MRI 4263	5.30	0.43	4.45	6.57	8.0
MRI 4264	5.60	0.35	4.45	6.52	6.3
MRI 4265	5.79	0.47	5.03	6.76	8.1
MRI 4266	5.18	0.47	4.08	5.98	9.1
MRI 4267	5.72	0.32	5.04	6.31	5.6
MRI 4268	5.27	0.49	4.30	6.32	9.2
MRI 4269	5.46	0.41	4.63	6.47	7.5
MRI 4270	5.40	0.44	4.24	6.06	8.1
MRI 4271	5.42	0.43	4.66	6.48	8.0
MRI 4272	5.50	0.41	4.49	6.23	7.5
MRI 4273	5.41	0.39	4.56	6.17	7.3
MRI 4274	5.55	0.42	4.19	6.52	7.6
MRI 4275	5.45	0.45	4.15	6.04	8.2
CBS	5.49	0.43	4.25	6.50	7.9

Legenda: St. dev-standardna devijacija; Min-najmanja izmerena veličina; Max-najveća izmerena veličina; CV-koeficijent varijacije.



Grafikon 1. Prečnik konidija izolata *A. parasiticus*. Legenda: vertikalni bar označava standardnu grešku sredine.

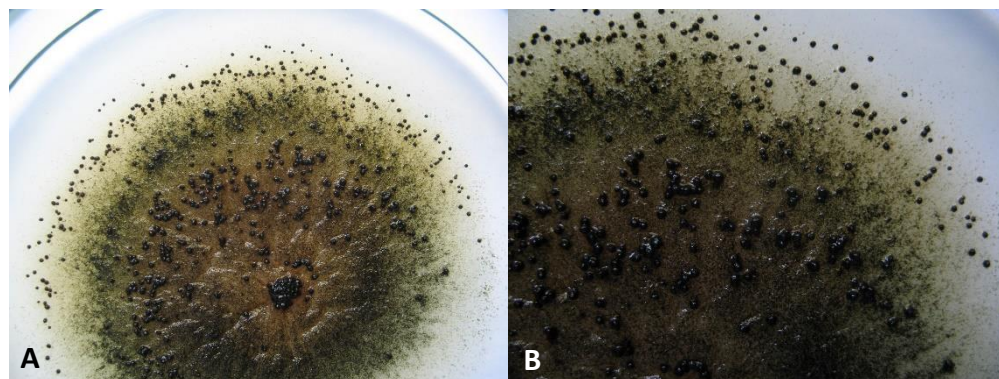
6.1.3.1.2.1 Morfologija sklerocija

Četrnaest dana posle zasejavanja na CZ podlozi, u miceliji se kod pojedinih izolata uočavaju sklerocije – crne tvorevine, loptastog oblika, sastavljene od gusto isprepletenih hifa (Slika 15).

Na osnovu prosečnih dimenzija, najveće sklerocije formirao je izolat MRI 3990 (1168,6 μm), dok je najmanje obrazovao izolat MRI 3937 (*A. flavus*) (517,9 μm), koji je korišćen kao pozitivna kontrola. Među ispitivanim izolatima najmanje sklerocije obrazovao je izolat MRI 4198 (549,3 μm). Prečnik sklerocija je varirao među izolatima od 395,2 μm (MRI 4194) do 1550,6 μm (MRI 3990). Referentni izolat (CBS100926) nije obrazovao sklerocije.

Tokom praćenja izgleda i porasta kolonija izolata na CZ podlozi na 30°C uočene su sklerocije kod velikog broja (73%) izolata (MRI 3802, MRI 3808 (Slika 13), MRI 3817, MRI

3930, MRI 3977, MRI 3990, MRI 3994, MRI 4008, MRI 4033, MRI 4045, MRI 4194, MRI 4195, MRI 4197, MRI 4198, MRI 4232, MRI 4239, MRI 4254, MRI 4255, MRI 4256, MRI 4257, MRI 4260, MRI 4261, MRI 4262, MRI 4264, MRI 4268, MRI 4269, MRI 4270, MRI 4271, MRI 4272, MRI 4273, MRI 4274, MRI 4275, MRI 3937 (*A. flavus*)) nakon 14-odnevne inkubacije, dok ostali izolati nisu formirali sklerocije (Tabela 7, Grafikon 2). Samo je izolat MRI 4033 formirao sklerocije već nakon pet dana inkubacije.



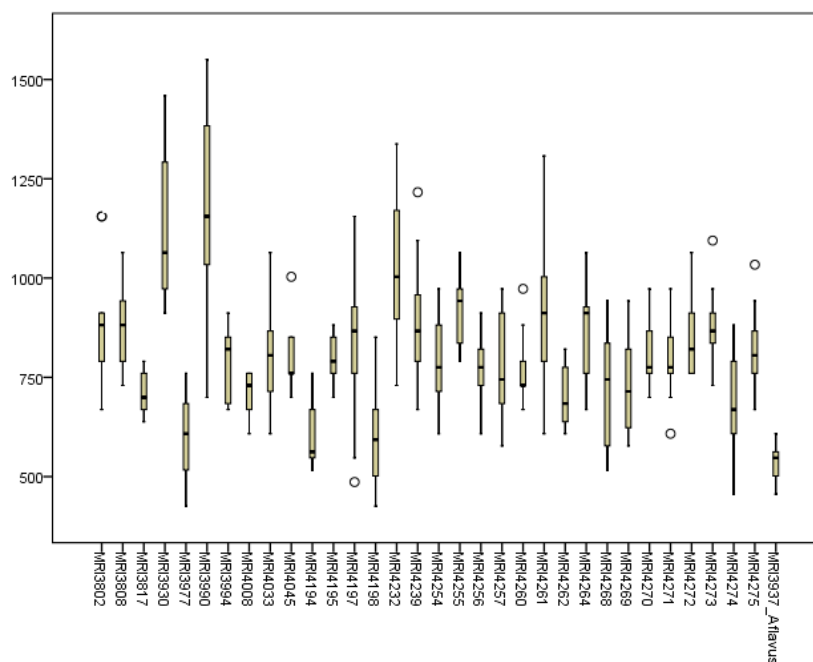
Slika 15. Izgled sklerocija kod izolata MRI 3808 na CZ podlozi (A, B)

Tabela 7. Prečnik sklerocija izolata *Aspergillus parasiticus* na CZ podlozi, nakon 14-odnevne inkubacije na 30°C

IZOLAT	Srednja vrednost	St. dev.	Minimum	Maksimum	CV (%)
MRI3802	954.7	152.5	668.9	1216.1	16.0
MRI3808	886.8	87.1	729.7	1064.1	9.8
MRI3817	757.0	91.9	638.5	1094.5	12.1
MRI3930	1086.4	204.0	760.1	1459.3	18.8
MRI3977	598.7	105.6	425.6	760.1	17.6
MRI3990	1168.6	226.4	699.3	1550.6	19.4
MRI3994	821.9	123.3	608.1	1124.9	15.0
MRI4008	743.9	82.5	547.3	912.1	11.1
MRI4033	791.5	97.9	608.1	1064.1	12.4
MRI4045	851.3	109.8	699.3	1216.1	12.9
MRI4194	584.7	82.9	395.2	760.1	14.2
MRI4195	836.1	147.5	699.3	1276.9	17.6
MRI4197	894.9	163.6	486.5	1276.9	18.3
MRI4198	549.3	125.0	395.2	851.3	22.7
MRI4232	966.8	181.4	608.1	1337.7	18.8
MRI4239	868.5	122.3	668.9	1216.1	14.1
MRI4254	765.1	120.8	547.3	1064.1	15.8

MRI4255	870.5	108.1	699.3	1094.5	12.4
MRI4256	828.0	118.6	608.1	1276.9	14.3
MRI4257	773.2	113.7	577.7	972.9	14.7
MRI4260	820.9	130.7	608.1	1094.5	15.9
MRI4261	920.3	176.8	608.1	1307.3	19.2
MRI4262	766.2	128.8	608.1	1064.1	16.8
MRI4264	867.5	124.9	638.5	1094.5	14.4
MRI4268	759.1	151.8	516.9	1216.1	20.0
MRI4269	736.8	96.0	577.7	942.5	13.0
MRI4270	778.3	91.6	608.1	972.9	11.8
MRI4271	802.6	83.6	608.1	972.9	10.4
MRI4272	834.1	131.4	608.1	1124.9	15.7
MRI4273	878.6	78.8	729.7	1094.5	9.0
MRI4274	728.7	140.9	395.2	942.5	19.3
MRI4275	831.0	94.6	668.9	1033.7	11.4
MRI3937 (<i>A.flavus</i>)	517.9	54.4	425.6	608.1	10.5

Legenda: St. dev-standardna devijacija; Min-najmanja izmerena veličina; Max-najveća izmerena veličina; CV-koeficijent varijacije.



Grafikon 2. Prečnik sklerocija izolata *A. parasiticus* sa CZ podloge. Legenda: vertikalni bar označava standardnu grešku sredine.

6.1.3.2 Praćenje ekoloških i odgajivačkih svojstava izolata

6.1.3.2.1 Uticaj različitih uslova osvetljenja na razvoj izolata

Za ispitivanje uticaja svetlosnog režima, na prosečan dnevni porast prečnika kolonija na KDA podlozi, korišćena je dvofaktorska analiza varijanse po potpuno slučajnom planu:

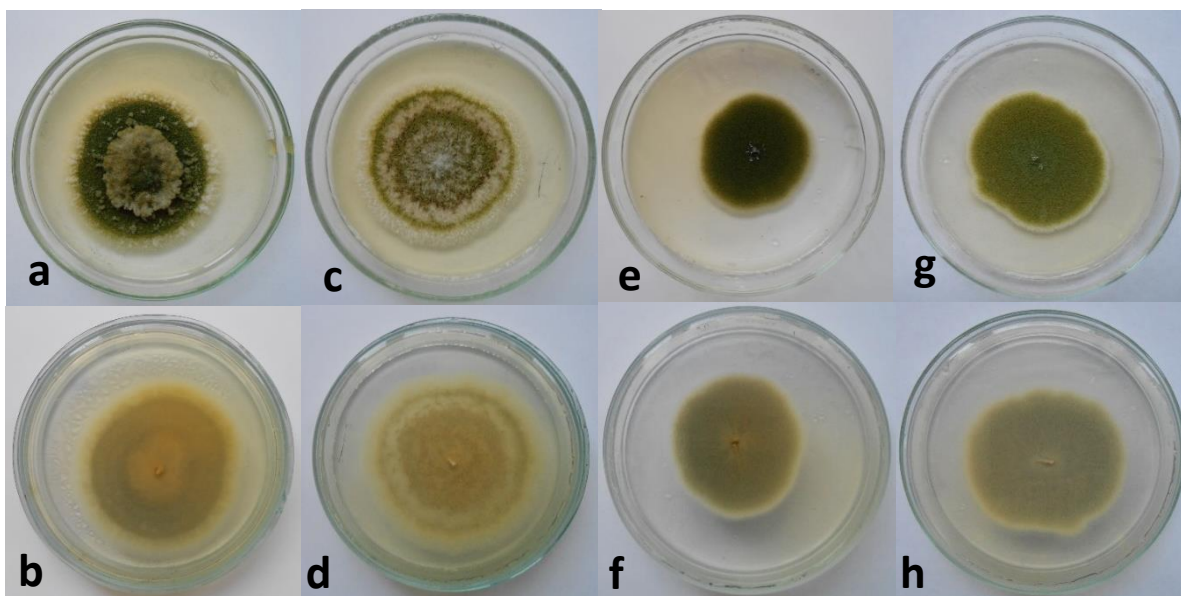
$$X_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk},$$

gde je X_{ijk} vrednost prosečnog rasta prečnika u i -tom izolatu, j -tom svetlosnom režimu (odnosno temperaturi), i k -tom ponavljanju, α_i efekat i -tog izolata, β_j efekat j -tog svetlosnog režima (odnosno temperature), $(\alpha\beta)_{ij}$ efekat interakcije prvog reda i -tog izolata i j -tog svetlosnog režima (odnosno temperature), dok je ε_{ijk} slučajna greška koja po pretpostavci ima normalnu raspodelu sa nultim prosekom i varijansom koja odgovara slučajnim varijacijama.

Za naknadna poređenja (*post-hoc* analizu) korišćen je Dankanov test. U svim testiranjima je korišćen 5%-tni nivo značajnosti.

Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je statistički značajan uticaj interakcije izolata i svetlosnog režima ($p < 0.01$) na dnevni porast prečnika kolonija. Ova značajnost nameće potrebu ispitivanja statističke značajnosti razlika pojedinih izolata posebno za dva svetlosna režima. Ove razlike su ispitane Dankanovim testom, a njegovi rezultati grafički su dati na slikama 1 i 2. Crvenim linijama su spojeni izolati koji se međusobno ne razlikuju.

Porast 46 ispitivanih izolata proučavan je u različitim uslovima osvetljenja (24h mrak i svetlosni režim 12 h svetlost/12 h mrak) na PDA podlozi. Rezultati ispitivanja su ukazali da različiti uslovi osvetljenja mogu uticati na morfologiju i porast ispitivanih izolata (Slika 16).



Slika 16. Kolonije izolata *A. parasiticus* (MRI 3812: a, b-24h noć i e, f-12h dan/12h) i *A. flavus* (MRI 3937: c, d-24h noć i g, h-12h dan/12h noć) pri različitim svetlosnim režimima (gornji red-lice kolonija, donji red-naličje kolonija).

Prosečan dnevni porast ispitivanih izolata *A. parasiticus* prikazan je u Tabeli M i Grafiku 13. Izolati su, nakon inkubacije od sedam dana, imali brži prosečni porast u mraku. Izuzeci su izolati MRI 3930, MRI 3977, MRI 3990, MRI 3994, MRI 4033, MRI 4252, MRI 4257, MRI 4258, MRI 4259, MRI 4260, MRI 4264, MRI 4272, MRI 4275 i CBS 100926, koji su imali brži prosečan porast u svetlosnom režimu 12h svetlost/12h mrak. Od svih ispitivanih izolata jedino izolati MRI 4008, MRI 4194, MRI 4257, MRI 4259, MRI 4262 i MRI 4270 nisu ispoljili variranje u prosečnom dnevnom porastu u svim svetlosnim režimima (Tabela 8, Grafikon 3).

U svetlosnom režimu 12h svetlo/12h tama trećeg, petog i sedmog dana po inokulaciji najbrži porast imao je izolat MRI 3994. Najmanji porast trećeg i petog dana imao je izolat MRI 4256, dok je sedmog dana nakon inokulacije imao izolat MRI 3812 (40,88 mm). U svetlosnom režimu 24h mrak trećeg i petog dana po inokulaciji najbrži porast imao je izolat 4265, dok je nakon sedam dana izolat 4045 (73,50 mm). Trećeg i petog dana po inokulaciji najmanji porast zabeležen je kod izolata 4257, dok je nakon sedam dana izolat 4256 (41,25 mm).

Tabela 8. Uticaj različitih svetlosnih režima na dnevni porast kolonija izolata *A. parasiticus* na KDA podlozi

Izolot	Svetlosni režim									
	12h/12h					Noć				
	Prosek	St. dev	Min	Max	CV (%)	Prosek	St. dev	Min	Max	CV (%)
MRI 3802	7.22	0.67	6.38	7.88	9.31	9.97	0.16	9.75	10.13	1.58
MRI 3808	7.72	0.24	7.38	7.88	3.07	9.13	0.14	9	9.25	1.58
MRI 3812	4.38	1.6	2.88	6	36.66	8.81	0.22	8.5	9	2.46
MRI 3817	10.25	0.54	9.75	11	5.27	10.91	0.34	10.5	11.25	3.16
MRI 3819	7.53	0.5	7	8.13	6.69	9.66	0.41	9.38	10.25	4.28
MRI 3822	6.28	0.68	5.38	7	10.82	8.94	0.13	8.75	9	1.4
MRI 3930	11.13	0.97	10.25	12.5	8.7	10.25	1.04	8.75	11.13	10.11
MRI 3937 (<i>A. flavus</i>)	7.47	0.98	6.5	8.38	13.13	8.69	0.22	8.5	8.88	2.49
MRI 3977	10.69	0.43	10.25	11.25	3.99	10.03	0.62	9.5	10.63	6.14
MRI 3990	11.81	1.32	10.5	13.63	11.15	10.06	1.1	8.5	11	10.95
MRI 3994	11.13	1.17	9.63	12.38	10.54	8.69	1.68	6.25	9.88	19.39
MRI 4003	5.69	0.52	5.13	6.38	9.06	6.88	2.38	3.75	9.13	34.59
MRI 4008	9.81	0.48	9.38	10.5	4.93	9.47	0.19	9.25	9.63	1.98
MRI 4033	8.97	1.09	8.13	10.5	12.17	9.34	0.99	7.88	10	10.56
MRI 4045	9.53	0.36	9.25	10	3.77	10.38	0.1	10.25	10.5	0.98
MRI 4194	10.5	4.19	4.25	13.25	39.94	10.59	0.16	10.38	10.75	1.48
MRI 4195	9.88	0.14	9.75	10	1.46	10.28	0.21	10	10.5	2.08
MRI 4197	9.31	0.07	9.25	9.38	0.77	9.63	0.14	9.5	9.75	1.5
MRI 4198	10.63	0.92	10	12	8.7	10.19	0.24	10	10.5	2.35
MRI 4196	10.25	0.54	9.75	11	5.27	10.91	0.34	10.5	11.25	3.16
MRI 4232	8.31	0.16	8.13	8.5	1.94	9.91	0.66	9	10.5	6.63
MRI 4239	8.97	0.33	8.5	9.25	3.67	9.69	0.16	9.5	9.88	1.67
MRI 4251	9.78	0.06	9.75	9.88	0.64	10.44	0.13	10.25	10.5	1.2
MRI 4252	10.84	0.4	10.5	11.25	3.69	9.97	1.53	7.75	11.25	15.34
MRI 4253	8.56	0.31	8.25	9	3.67	9.69	0.47	9	10	4.89
MRI 4254	8.5	0.61	7.75	9	7.2	10.44	0.59	10	11.25	5.66
MRI 4255	8.72	1.09	7.75	10	12.52	9.88	0.14	9.75	10	1.46
MRI 4256	9.88	0.32	9.5	10.25	3.27	8.66	3.45	3.5	10.75	39.87
MRI 4257	9.31	1.14	8.63	11	12.23	9.34	0.8	8.75	10.5	8.56
MRI 4258	11.97	0.41	11.5	12.38	3.45	10.44	0.33	10	10.75	3.17
MRI 4259	9.81	0.48	9.38	10.5	4.93	9.53	0.19	9.25	9.63	1.97
MRI 4260	9.91	1.07	8.5	11	10.77	10	0.47	9.5	10.63	4.68
MRI 4261	9.13	0.77	8	9.75	8.44	8.5	2.09	5.38	9.63	24.55
MRI 4262	9.75	0.29	9.5	10	2.96	9.78	0.34	9.38	10.13	3.52
MRI 4263	9.75	0.94	8.38	10.5	9.65	9.56	0.22	9.25	9.75	2.26
MRI 4264	11.5	0.59	10.63	11.88	5.1	9.56	0.16	9.38	9.75	1.69

MRI 4265	10.53	1.18	9.13	11.63	11.19	10.06	0.38	9.75	10.5	3.73
MRI 4266	8.44	2.08	6.88	11.5	24.63	10.03	0.43	9.5	10.38	4.24
MRI 4267	7.75	1.57	5.63	9	20.27	8.31	0.83	7.25	9.25	9.94
MRI 4268	9.5	0.34	9	9.75	3.56	10.13	0.49	9.5	10.63	4.83
MRI 4269	9.38	0.18	9.25	9.63	1.89	11.22	0.78	10.5	12.25	6.95
MRI 4270	9.72	0.33	9.38	10	3.38	9.91	0.39	9.38	10.25	3.91
MRI 4271	9.81	0.63	9.25	10.63	6.45	11.41	1.31	10	13	11.51
MRI 4272	10.53	0.45	10.13	11.13	4.27	10.03	0.6	9.5	10.88	5.97
MRI 4273	8.91	0.61	8.13	9.5	6.82	10.59	0.12	10.5	10.75	1.13
MRI 4274	8.84	1.9	6.5	10.88	21.45	10.34	0.12	10.25	10.5	1.16
MRI 4275	9.19	2.2	7.13	11.5	23.94	10.53	0.74	9.5	11.13	7.01
CBS100926	9.66	0.47	9	10.13	4.89	11.13	0.4	10.75	11.63	3.55

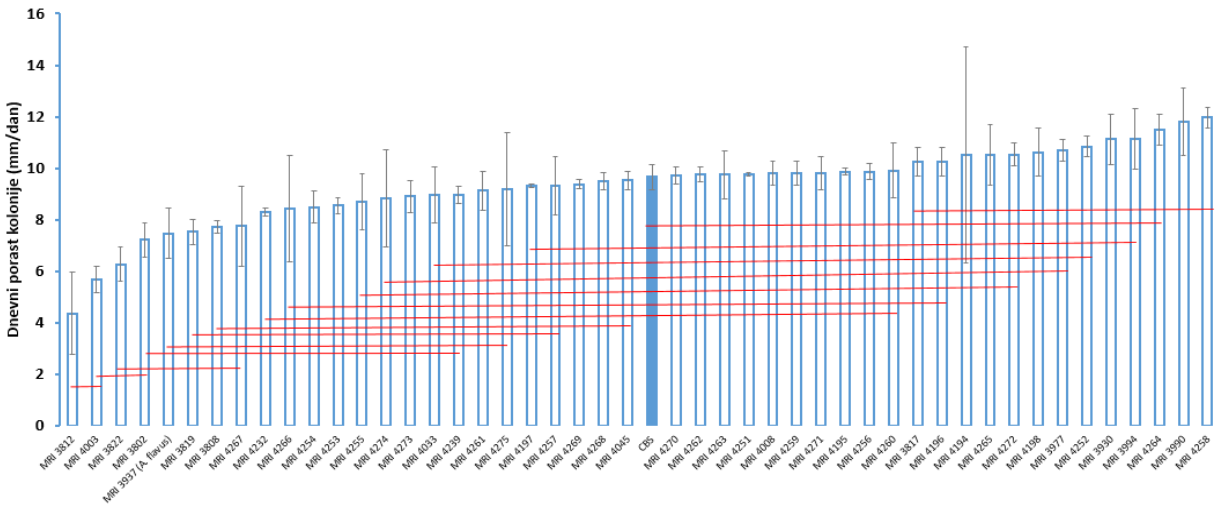
Legenda: St. dev-standardna devijacija; Min-najmanja izmerena veličina; Max-najveća izmerena veličina; CV-koeficijent varijacije.

Dnevni porast micelije, kao i porast micelije trećeg, petog i sedmog dana nakon presejavanja, izraženi vrednostima prečnika kolonija, na PDA podlozi na 25°C u mraku, ukazali su na intraspecijsku varijabilnost. Prosečan dnevni porast kolonije za sve ispitivane izolote iznosio je 9,83 mm, međutim uočeno je značajno variranje u porastu. Najsporiji prosečni dnevni porast u mraku ispoljio je izolat MRI 4256 (3,5 mm), dok je najbrži prosečan dnevni porast od 13 mm ispoljio je izolat MRI 4271. Prosečni dnevni porast ostalih izolata iznosio je od 9,79 mm, a referentnog izolata CBS100926 iznosio je 11,13 mm (Grafikon 4). Varijabilnost u dnevnom porastu micelije najviše je bila izražena kod izolata MRI 4256, opseg variranja bio je od 3,5 do 10,75 mm. Najmanja varijabilnost porasta micelije zabeležena je kod izolata MRI 3808 (9-9,25 mm), MRI 3822 (8,75-9 mm), MRI 4045 (10,25-10,5 mm), MRI 4197 (9,5-9,75 mm), MRI 4251 (10,25-10,5 mm), MRI 4273 (10,5-10,75 mm) i MRI 4274 (10,25-10,5 mm) (Tabela 8).

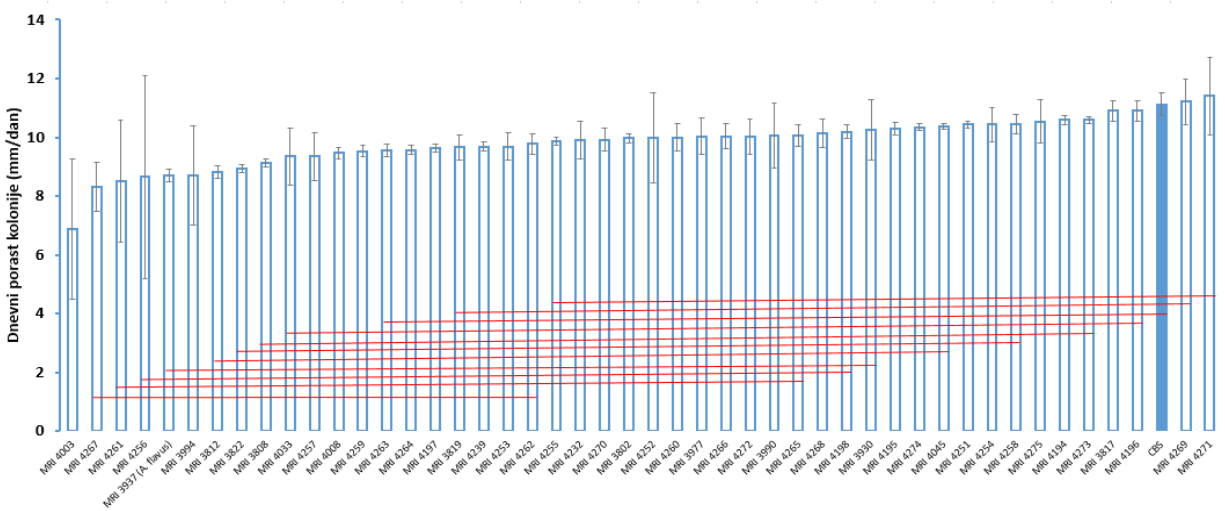
Prilikom ispitivanja porasta micelije na PDA podlozi uočeno je da su se svi ispitivani izolati *A. parasiticus* brzo razvijali. Najintenzivniji porast micelije ispoljio je izolat MRI 4045 (73,5 mm), dok je kod izolata MRI 4257 uočen najslabiji porast (49,9 mm).

Petog dana nakon inokulacije, kod izolata MRI 4265 (54,3 mm), uočen je maksimalni porast kolonije, a minimalni kod izolata MRI 4257 (30,9 mm).

Najveća divergentnost u brzini porasta kolonija izolata pokazala se trećeg dana po presejavanju (27-59,6 mm), poredeći sa petim i sedmim danom.



Grafikon 3. Prosečan dnevni porast kolonije izolata *Aspergillus parasiticus*, na KDA podlozi, u svetlosnom režimu 12h/12h i rezultati ispitivanja statističke značajnosti Dankanovim testom. Legenda: vertikalni bar označava standardnu grešku sredine. Crvenim linijama su spojene grupe izolata koji se ne razlikuju statistički značajno



Grafikon 4. Prosečan dnevni porast kolonije izolata *Aspergillus parasiticus*, na KDA podlozi, u noćnom svetlosnom režimu i rezultati ispitivanja statističke značajnosti Dankanovim testom. Legenda: vertikalni bar označava standardnu grešku sredine. Crvenim linijama su spojene grupe izolata koji se ne razlikuju statistički značajno.

Poređenjem porasta kolonija, ustanovljena je pozitivna korelacija (0,5-osrednja povezanost) između prosečnog porasta kolonija izolata ispitivane vrste pri 24h mrak i 12h svetlost/12h mrak.

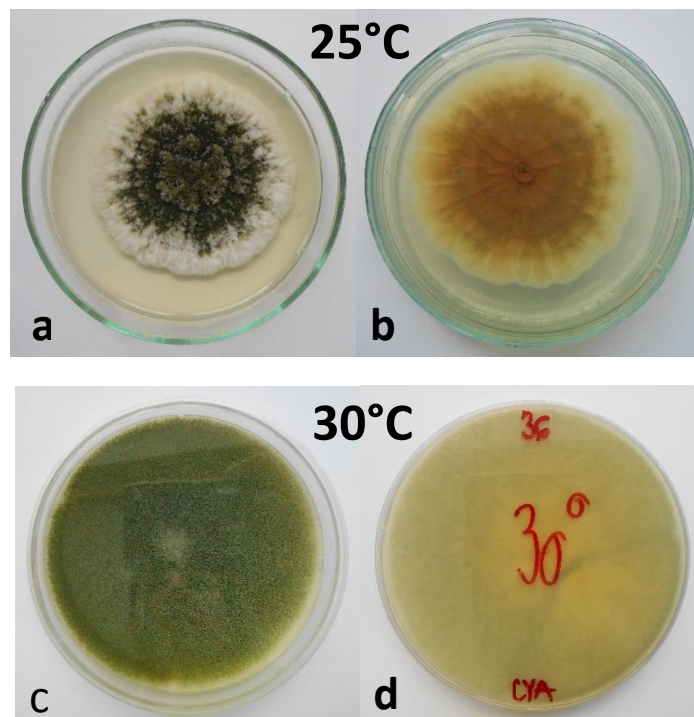
6.1.3.2.2 Uticaj temperature na razvoj izolata

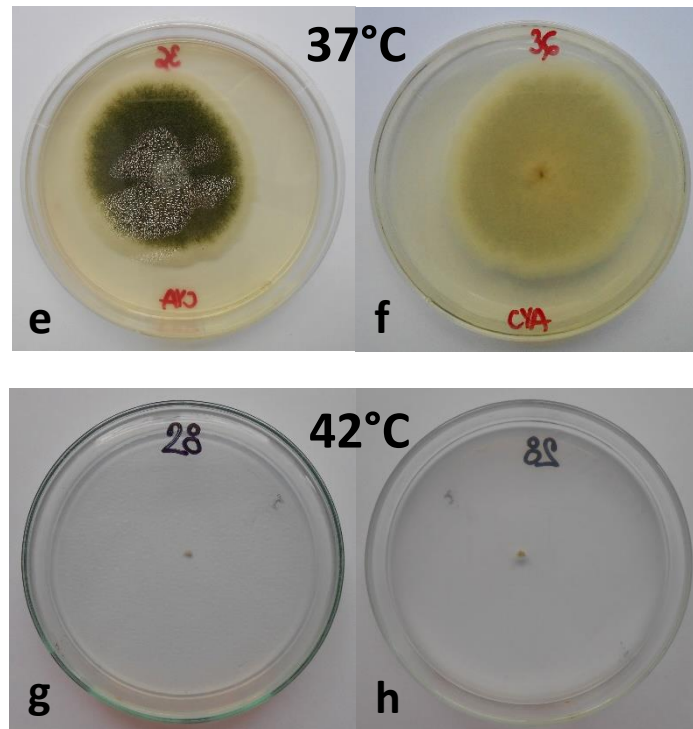
Uticaj temperatura (12, 25, 30, 37, 42 i 43°C) na porast 46 odabranih izolata praćen je na CYA podlozi. Nakon 7 dana porasta ispitivane su morfološke karakteristike izolata. Različite temperature uticale su statistički značajno na porast kolonija ispitivanih izolata ($P < 0,01$).

Ispitivani izolati *A. parasiticus* su rasli u temperaturnom opsegu od 12-42°C. Veliki broj (65,2%) ispitivanih izolata ispoljio je najveći prosečan porast na temperaturi od 30°C nakon sedam dana inkubacije, dok su pojedini izolati (34,8%) ispoljili najveći prosečan porast na temperaturi od 37°C.

Najveći prosečan porast kolonija (90 mm, odnosno ispunili su Petri kutije) ostvarili su izolati MRI 3802, MRI 3937 (*A. flavus*), MRI 4045, MRI 4261 i MRI 4263 na 30°C. Najmanji prosečan porast (44,5 mm) na pomenutoj temperaturi imao je izolat MRI 4232. Na 37°C najveći prosečan porast zabeležen je kod izolata MRI 4263 (80,75 mm), a najmanji kod MRI 3977 (59,13 mm). Nakon sedmodnevne inkubacije na 25°C zabeležen je značajno niži porast kolonija izolata, gde je najveći porast ostvario izolat MRI 4045 (69,25 mm), dok je najmanji MRI 4232 (36,5 mm).

Temperature inkubacije nisu uticale na izgled kolonije izolata *A. parasiticus*, odnosno izolati nisu ispoljili variranje u morfološkim odlikama (Slika 17). Uticaj različitih temperatura na porast i morfološke karakteristike kolonija izolata *A. parasiticus* prikazan je na Slici M.





Slika 17. Uticaj različitih temperatura na porast kolonija izolata *A. parasiticus* (MRI 4263; a,c,e,g-lice kolonije; b,d,f,h-naličje kolonije)

Tabela 9. Uticaj različitih temperatura na prosečan dnevni porast kolonija ispitivanih izolata *A. parasiticus*

Izolat	Temperatura														
	25°C					30°C					37°C				
	Sr. vred	St. dev	Min	Max	CV	Sr. vred	St. dev	Min	Max	CV	Sr vred	St. dev	Min	Max	CV
MRI 3802	7.56	0.9	6.4	8.38	12	12.22	1.05	11	13.8	8.6	22.69	1.11	22	23.8	4.9
MRI 3808	9	0	9	9	0	9.13	0.14	9	9.25	1.6	20.81	0.55	20	21.5	2.7
MRI 3812	5.88	0.7	4.9	6.5	12	8.19	0.65	7.5	9	7.9	19.81	0.55	19	20.5	2.8
MRI 3817	10.19	0.13	10	10.3	1.2	12.38	1.03	11	13.6	8.3	19.38	0.95	18	20	4.9
MRI 3819	6.19	0.22	5.9	6.38	3.5	7.97	0.68	7.3	8.88	8.5	21.63	0.78	21	22.5	3.6
MRI 3822	5.72	0.33	5.3	6	5.8	8.81	0.52	8.1	9.38	5.9	18.94	0.77	18	20	4.1
MRI 3930	10	0.74	9.3	10.8	7.4	11.66	0.28	11	11.9	2.4	17.44	0.83	17	18.3	4.7
MRI 3937 (<i>A. flavus</i>)	8.56	0.71	7.5	9	8.3	11.06	0.56	10	11.5	5.1	15.94	0.43	16	16.5	2.7

MRI 3977	9.69	0.58	8.9	10.3	6	11.53	0.37	11	11.9	3.2	15.69	0.24	16	16	1.5
MRI 3990	9.09	0.19	9	9.38	2.1	10.84	0.43	10	11.3	3.9	22.19	0.38	22	22.5	1.7
MRI 3994	8.94	0.3	8.6	9.25	3.3	11.88	1.02	11	13.4	8.6	19.38	0.14	19	19.5	0.7
MRI 4003	7.34	0.41	6.9	7.88	5.6	9.28	0.16	9.1	9.5	1.7	17.44	0.24	17	17.8	1.4
MRI 4008	8.84	0.62	8.4	9.75	7.1	9.78	0.33	9.5	10.1	3.4	17.25	0.54	17	17.8	3.1
MRI 4033	8.81	0.16	8.6	9	1.8	11.16	0.28	11	11.5	2.5	18.88	0.25	19	19	1.3
MRI 4045	9.53	0.21	9.3	9.75	2.2	11.75	0	12	11.8	0	17.31	0.38	17	17.5	2.2
MRI 4194	9.44	0.39	9	9.88	4.1	11.75	0.35	11	12	3	16.81	0.55	16	17.5	3.3
MRI 4195	9.97	0.7	9.3	10.6	7	11.56	0.47	11	12.3	4.1	18.81	0.24	19	19	1.3
MRI 4197	10.13	0.48	9.8	10.8	4.7	8.66	0.37	8.1	9	4.3	19.19	0.38	19	19.8	2
MRI 4198	9.5	0.1	9.4	9.63	1.1	11.28	0.36	11	11.8	3.2	16.81	0.38	16	17	2.2
MRI 4196	10.19	0.24	10	10.5	2.4	12.38	1.03	11	13.6	8.3	18.63	0.25	19	19	1.3
MRI 4232	5.66	0.57	5	6.38	10	7.81	0.38	7.5	8.25	4.8	18.75	0.2	19	19	1.1
MRI 4239	8.44	0.13	8.3	8.5	1.5	10.28	0.19	10	10.4	1.8	19.13	0.25	19	19.3	1.3
MRI 4251	9.41	0.31	9	9.75	3.3	10.75	0.74	9.8	11.5	6.9	22.88	0.72	22	23.8	3.2
MRI 4252	10.13	1.52	9.1	12.4	15	11	0.29	11	11.3	2.6	16.31	0.24	16	16.5	1.5
MRI 4253	10.31	0.24	10	10.5	2.3	6.44	0.24	6.3	6.75	3.7	22	0.41	22	22.5	1.9
MRI 4254	8.41	0.4	8	8.75	4.8	9.53	0.56	9.3	10.4	5.9	23.13	0.6	22	23.5	2.6
MRI 4255	7.78	0.06	7.8	7.88	0.8	9.94	0.16	9.8	10.1	1.6	19.44	0.43	19	20	2.2
MRI 4256	7.78	0.21	7.5	8	2.7	10.56	0.81	9.8	11.4	7.6	17.5	0.35	17	18	2
MRI 4257	9.13	0.14	9	9.25	1.6	11.19	0.13	11	11.3	1.1	19.13	0.32	19	19.5	1.7
MRI 4258	9.19	0.78	8.1	10	8.5	11.13	0.27	11	11.5	2.4	17.69	0.47	17	18	2.7
MRI 4259	8.84	0.62	8.4	9.75	7.1	9.69	0.33	9.4	10.1	3.4	19.75	0.54	19	20.3	2.7
MRI 4260	9.69	0.81	8.9	10.5	8.3	12.13	0.32	12	12.5	2.7	20.88	0.52	20	21.5	2.5
MRI 4261	8.88	1.98	6	10.5	22	12.81	0.13	13	13	1	19.88	0.25	20	20	1.3
MRI 4262	9.19	0.86	8	9.88	9.3	12.38	1.11	12	14	9	19.75	0.29	20	20	1.5
MRI 4263	9.66	0.16	9.5	9.88	1.6	13.28	0.16	13	13.5	1.2	21	0.41	21	21.5	1.9
MRI 4264	10	0.2	9.8	10.3	2	11.53	0.28	11	11.8	2.4	21	0.82	20	22	3.9
MRI 4265	7.81	0.13	7.8	8	1.6	9.22	1.24	8.4	11	13	16.75	0.29	17	17	1.7
MRI 4266	9.94	0.26	9.6	10.3	2.6	11.84	0.67	11	12.6	5.7	13.38	0.25	13	13.5	1.9
MRI 4267	7.22	0.54	6.8	8	7.5	9.59	0.8	8.8	10.5	8.3	20	0.61	19	20.5	3.1
MRI 4268	10.13	0.18	10	10.4	1.8	11.69	0.54	11	12.4	4.7	21.31	0.38	21	21.8	1.8
MRI 4269	9.5	0.37	9.1	9.88	3.9	11.44	0.73	11	12.4	6.3	19.31	0.38	19	19.8	1.9
MRI 4270	9.63	0.92	8.4	10.4	9.5	11.16	0.98	9.8	11.9	8.8	17.25	0.87	17	18.5	5
MRI 4271	10.34	0.21	10	10.6	2.1	11.66	0.19	12	11.9	1.6	17.31	0.8	17	18	4.6
MRI 4272	9.69	0.3	9.4	10	3.1	11.56	0.39	11	11.9	3.4	19.38	0.48	19	20	2.5
MRI 4273	9.06	0.63	8.3	9.63	7	11.56	0.13	12	11.8	1.1	21.38	0.63	21	22	2.9
MRI 4274	8.88	0.4	8.4	9.25	4.5	10.78	0.41	11	11.4	3.8	18.5	0.41	18	19	2.2
MRI 4275	9.09	0.26	8.8	9.38	2.8	11.19	0.66	10	11.8	5.9	22.81	0.55	22	23.5	2.4
CBS	8.88	0.25	8.8	9.25	2.8	11.88	0.32	12	12.3	2.7	17.75	0.29	18	18	1.6

Prosečan dnevni porast izolata *A. parasiticus* prikazan je u Tabeli 9. Svi ispitivani izolati ispoljili su najveći prosečan dnevni porast (19,23 mm) na temperaturi od 37°C. Na temperaturi od 30°C, prosečan dnevni porast ispitivanih izolata bio je značajno niži nego na temperaturi od 37°C i iznosio je 10,75 mm. Približno prosečnim dnevnim vrednostima zabeleženim na temperaturi od 30°C, kretao se i prosečan dnevni prosek na 25°C (8,91 mm).

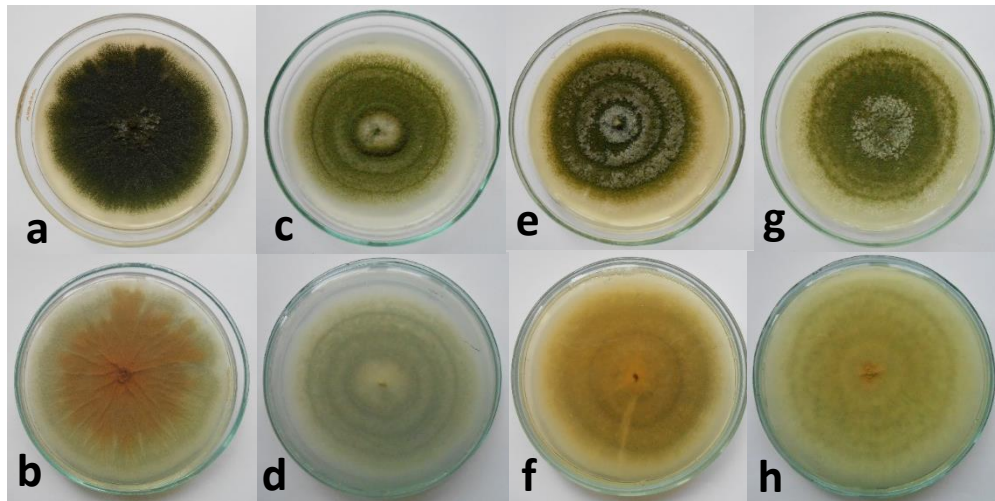
Na osnovu rezultata se može zaključiti da uticaj temperature na razvoj i izgled kolonija izolata nije dovoljan kriterijum za izdvajanje određenih grupa izolata.

6.1.3.2.3 Uticaj različitih hranljivih podloga na razvoj izolata

Praćen je uticaj različitih hranljivih podloga (PDA, CYA, MEA) na porast 46 ispitivanih izolata. Nakon 7 dana porasta ispitivane su morfološke karakteristike izolata.

Ispitivani izolati rasli su različitom brzinom, pri čemu je najveći porast zabeležen na PDA podlozi, dok je najmanji bio na MEA podlozi (Tabela 10). Svi ispitivani izolati ispoljili su statistički značajnu razliku u brzini porasta kolonije na različitim hranljivim podlogama ($P < 0,01$).

Pored razlika u brzini porasta ispoljene su značajne razlike u makroskopskim morfološkim osobinama izolata na hranljivim podlogama (Slika 18). Na PDA podlozi svi ispitivani izolati imali su kompaktnu, somotastu miceliju, dok je na CYA podlozi micelija izolata bila slična, ali gusta, a na MEA podlozi micelija je imala karakteristične koncentrične prstenove spora tamno zelene boje, koji nisu zabeleženi na ostalim ispitivanim podlogama. Ispitivani izolati su na PDA i MEA podlozi obrazovali kolonije ravnog oboda, dok su kolonije na CYA podlozi bile neravnog ruba. Na naličju Petri kutija bila je vidljiva pigmentacija kolonija izolata u vidu žute boje (Slika 18).



Slika 18. Kolonije izolata *A. parasiticus* na različitim hranjivim podlogama: **CYA podloga** (a, b-MRI 3812; c, d-MRI 3937 (*A. flavus*)); **MEA podloga** (CYA podloga; e, f-MRI 3812; g, h-MRI 3937 (*A. flavus*)) (gornji red-lice kolonija, donji red-naličje kolonija).

Veliki broj izolata (78,72%) vrste *A. parasiticus* najbrže su rasli na PDA podlozi nakon sedmodnevne inkubacije, na kojoj je prosečan porast nakon sedam dana bio u intervalu od $41,25 \pm 13,86$ do $73,50 \pm 0,29$ mm. Nešto sporije razvijali su se na CYA podlozi ($36,5 \pm 1,32$ - $69,25 \pm 0,48$ mm). Prosečno najsporiji porast ispitivanih izolata uočen je na MEA podlozi, i kretao se od $40,63 \pm 0,47$ do $62,25 \pm 0,32$ mm.

Izolati *A. parasiticus* su ispoljili najbrži prosečni dnevni porast kolonije na PDA podlozi (9,86 mm), dok su na CYA (8,91 mm) i MEA (8,46 mm) podlozi sporije rasli. Prosečan dnevni porast izolata *A. parasiticus* na PDA podlozi iznosio je 6,88-11,41 mm, na CYA podlozi od 5,66-10,34 mm, na MEA podlozi od 7,28-9,19 mm (Tabela 10).

Tabela 10. Uticaj različitih hranljivih podloga na prosečan dnevni porast kolonija ispitivanih izolata *A. parasiticus*

Izolot	Hranljiva podloga														
	CYA					MEA					PDA				
	Sr. vred	St. dev	Min	Max	CV	Sr. vred	St. dev	Min	Max	CV	Sr. vred	St. dev	Min	Max	CV (%)
MRI 3802	7.56	0.9	6.38	8.38	11.9	9.06	0.3	8.6	9.25	3.28	9.97	0.16	9.75	10.1	1.58
MRI 3808	9	0	9	9	0	7.94	0.13	7.8	8	1.57	9.13	0.14	9	9.25	1.58
MRI 3812	5.88	0.7	4.88	6.5	11.9	7.91	0.19	7.8	8.13	2.37	8.81	0.22	8.5	9	2.46
MRI 3817	10.19	0.13	10	10.3	1.23	8.94	0.33	8.6	9.38	3.7	10.91	0.34	10.5	11.3	3.16
MRI 3819	6.19	0.22	5.88	6.38	3.5	7.72	0.28	7.5	8.13	3.59	9.66	0.41	9.38	10.3	4.28
MRI 3822	5.72	0.33	5.25	6	5.75	8.16	0.9	7.6	9.5	11	8.94	0.13	8.75	9	1.4
MRI 3930	10	0.74	9.25	10.8	7.36	9.03	0.21	8.8	9.25	2.36	10.25	1.04	8.75	11.1	10.11
MRI 3937 (<i>A. flavus</i>)	8.56	0.71	7.5	9	8.3	8.38	0.67	8	9.38	7.99	8.69	0.22	8.5	8.88	2.49
MRI 3977	9.69	0.58	8.88	10.3	6.01	8.56	0.96	8	10	11.2	10.03	0.62	9.5	10.6	6.14
MRI 3990	9.09	0.19	9	9.38	2.06	9.19	0.13	9.1	9.38	1.36	10.06	1.1	8.5	11	10.95
MRI 3994	8.94	0.3	8.63	9.25	3.33	7.94	0.83	6.8	8.63	10.5	8.69	1.68	6.25	9.88	19.39
MRI 4003	7.34	0.41	6.88	7.88	5.62	7.28	0.21	7	7.5	2.93	6.88	2.38	3.75	9.13	34.59
MRI 4008	8.84	0.62	8.38	9.75	7.06	7.94	0.33	7.5	8.25	4.17	9.47	0.19	9.25	9.63	1.98
MRI 4033	8.81	0.16	8.63	9	1.83	8.72	0.28	8.5	9.13	3.18	9.34	0.99	7.88	10	10.56
MRI 4045	9.53	0.21	9.25	9.75	2.24	8.06	0.16	7.9	8.25	2	10.38	0.1	10.3	10.5	0.98
MRI 4194	9.44	0.39	9	9.88	4.12	8.78	0.16	8.6	9	1.79	10.59	0.16	10.4	10.8	1.48
MRI 4195	9.97	0.7	9.25	10.6	6.97	9.16	0.26	8.9	9.38	2.81	10.28	0.21	10	10.5	2.08
MRI 4197	10.13	0.48	9.75	10.8	4.73	8.81	0.33	8.4	9.13	3.75	9.63	0.14	9.5	9.75	1.5
MRI 4198	9.5	0.1	9.38	9.63	1.07	8.56	0.16	8.4	8.75	1.88	10.19	0.24	10	10.5	2.35
MRI 4196	10.19	0.24	10	10.5	2.35	8.94	0.33	8.6	9.38	3.7	10.91	0.34	10.5	11.3	3.16
MRI 4232	5.66	0.57	5	6.38	10.1	7.91	0.12	7.8	8	1.51	9.91	0.66	9	10.5	6.63
MRI 4239	8.44	0.13	8.25	8.5	1.48	8.31	0.16	8.1	8.5	1.94	9.69	0.16	9.5	9.88	1.67
MRI 4251	9.41	0.31	9	9.75	3.32	8.47	0.24	8.1	8.63	2.79	10.44	0.13	10.3	10.5	1.2
MRI 4252	10.13	1.52	9.13	12.4	15.1	8.44	0.13	8.3	8.5	1.48	9.97	1.53	7.75	11.3	15.34
MRI 4253	10.31	0.24	10	10.5	2.32	8.31	0.52	7.9	8.88	6.2	9.69	0.47	9	10	4.89
MRI 4254	8.41	0.4	8	8.75	4.76	8.09	0.7	7.5	8.88	8.68	10.44	0.59	10	11.3	5.66
MRI 4255	7.78	0.06	7.75	7.88	0.8	8.38	0.18	8.1	8.5	2.11	9.88	0.14	9.75	10	1.46
MRI 4256	7.78	0.21	7.5	8	2.74	8.63	0.37	8.1	9	4.27	8.66	3.45	3.5	10.8	39.87
MRI 4257	9.13	0.14	9	9.25	1.58	8.41	0.31	8	8.75	3.72	9.34	0.8	8.75	10.5	8.56
MRI 4258	9.19	0.78	8.13	10	8.5	8.53	0.94	7.1	9	11	10.44	0.33	10	10.8	3.17
MRI 4259	8.84	0.62	8.38	9.75	7.06	7.94	0.33	7.5	8.25	4.17	9.53	0.19	9.25	9.63	1.97
MRI 4260	9.69	0.81	8.88	10.5	8.33	8.59	0.12	8.5	8.75	1.39	10	0.47	9.5	10.6	4.68
MRI 4261	8.88	1.98	6	10.5	22.4	9.13	0.4	8.8	9.63	4.33	8.5	2.09	5.38	9.63	24.55

MRI 4262	9.19	0.86	8	9.88	9.33	8.56	0.16	8.4	8.75	1.88	9.78	0.34	9.38	10.1	3.52
MRI 4263	9.66	0.16	9.5	9.88	1.63	9.16	0.06	9.1	9.25	0.68	9.56	0.22	9.25	9.75	2.26
MRI 4264	10	0.2	9.75	10.3	2.04	8.41	0.24	8.3	8.75	2.81	9.56	0.16	9.38	9.75	1.69
MRI 4265	7.81	0.13	7.75	8	1.6	8.56	0.22	8.3	8.75	2.53	10.06	0.38	9.75	10.5	3.73
MRI 4266	9.94	0.26	9.63	10.3	2.62	9.19	0.07	9.1	9.25	0.79	10.03	0.43	9.5	10.4	4.24
MRI 4267	7.22	0.54	6.75	8	7.53	8	0.18	7.9	8.25	2.21	8.31	0.83	7.25	9.25	9.94
MRI 4268	10.13	0.18	10	10.4	1.75	8.06	0.46	7.4	8.38	5.73	10.13	0.49	9.5	10.6	4.83
MRI 4269	9.5	0.37	9.13	9.88	3.87	7.59	1.27	5.8	8.5	16.8	11.22	0.78	10.5	12.3	6.95
MRI 4270	9.63	0.92	8.38	10.4	9.54	8.59	0.33	8.1	8.88	3.83	9.91	0.39	9.38	10.3	3.91
MRI 4271	10.34	0.21	10.1	10.6	2.06	8.03	1.39	6	9	17.4	11.41	1.31	10	13	11.51
MRI 4272	9.69	0.3	9.38	10	3.07	8.56	0.96	8	10	11.2	10.03	0.6	9.5	10.9	5.97
MRI 4273	9.06	0.63	8.25	9.63	6.99	8.47	0.21	8.3	8.75	2.52	10.59	0.12	10.5	10.8	1.13
MRI 4274	8.88	0.4	8.38	9.25	4.45	8.91	0.19	8.8	9.13	2.11	10.34	0.12	10.3	10.5	1.16
MRI 4275	9.09	0.26	8.75	9.38	2.83	9.13	0.32	8.8	9.5	3.54	10.53	0.74	9.5	11.1	7.01
CBS	8.88	0.25	8.75	9.25	2.82	9.25	0.2	9	9.5	2.21	11.13	0.4	10.8	11.6	3.55

Na PDA podlozi trećeg (32,75 mm) i petog dana (54,25 mm) po inokulaciji najbrži porast imao je izolat MRI 4265, dok je nakon sedam dana MRI 4045 (73,5 mm). Trećeg (12,5 mm) i petog dana (30,88 mm) po inokulaciji najmanji porast zabeležen je kod izolata MRI 4257, dok je nakon sedam dana kod MRI 4256 (41,25 mm).

Na CYA podlozi trećeg dana po inokulaciji najveći porast imao je izolat MRI 3937 (*A. flavus*) (33,75 mm), koji je u ispitivanjima korišćen kao pozitivna kontrola i pored njega MRI 3802 (31,88 mm), dok je najmanji porast zabeležen kod MRI 4256 (5,63 mm). Nakon pet dana, najbrži je bio izolat MRI 4045 (50,13 mm), a najsporiji je i dalje bio MRI 4256 (20,88 mm), dok je nakon sedam dana najbrži bio, takođe MRI 4045 (69,25 mm), a najsporiji MRI 4232 (36,5 mm).

Na MEA podlozi tri dana posle inokulacije najbrže su se razvijali izolati MRI 3930, MRI 3937 i MRI 4266 (25,5 mm), dok je najsporije MRI 4033 (5,75 mm). Petog (44,75 mm) i sedmog dana (62,25 mm) nakon inokulacije najbrže se razvijao MRI 4266, a najsporiji porast i dalje je imao izolat MRI 4033 (24,13 mm), što se nastavilo i nakon merenja sedmog dana (40,63 mm).

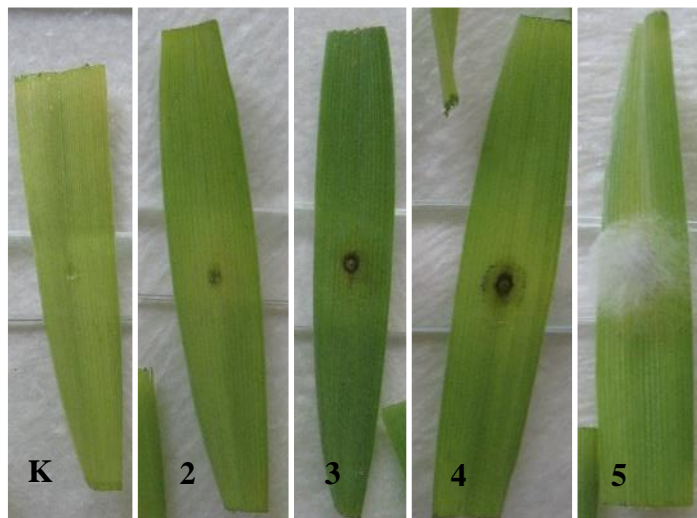
6.1.4 Proučavanje patogenih svojstava izolata *Aspergillus parasiticus*

6.1.4.1 Provera patogenosti i reizolacija patogena u laboratorijskim uslovima

Patogenost dobijenih izolata *A. parasiticus* proverena je u laboratorijskim uslovima (*in vitro*) inokulacijom povređenih listova ječma, kao test biljke. Kao pozitivna kontrola korišćeni su listovi inokulisani suspenzijom spora vrste *A. flavus*, a kao negativna kontrola listovi inokulisani sterilnom destilovanom vodom. Provera patogenosti 46 dobijenih monospornih izolata *A. parasiticus* primenom veštačkih inokulacija povređenih listova ječma, pokazala je da su svi proučavani izolati tri dana nakon inkubacije na temperaturi od 28°C prouzrokovali pojavu nekrotičnih pega na inokulisanim listovima svetlo smeđe boje i oni su smatrani patogenim izolatima (Slika 19).

Prvi simptomi se javljaju dva dana nakon inokulacije u vidu internervalne hloroze praćene blagim žućenjem listova na svim listovima ječma sorte Nektar inokulisanim izolatima *A. parasiticus*. Simptomi se dalje razvijaju u vidu pege smeđe boje nepravilnog oblika oko mesta inokulacije. Petog dana po inokulaciji, najagresivniji sojevi sporulisali su na površini listova. Kod pojedinih izolata primećena je pojava micelije na naličju listova.

Od mesta inokulacije trulež se širila zahvatajući veću površinu lista. Uočena je razlika u intenzitetu sporulacije na listovima inokulisanim vrstom *A. parasiticus*, od toga da nije došlo do formiranja spora, do veoma intenzivne sporulacije. Sa inokulisanih listova obavljena je reizolacija patogena i reizolati su upoređeni sa izolatima korišćenim za inokulaciju. Dobijeni reizolati su, po izgledu kolonije i morfologiji reproduktivnih tvorevina, u potpunosti odgovarali izvornim izolatima čime je potvrđena patogenost izolata i ispunjeni Kohovi postulati.



Slika 19. Kontrola i *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.

Ispitivani izolati su pokazali različitu patogenost koja je merena ocenom pega (1-5). Na listovima koji su kao negativna kontrola inokulisani sterilnom destilovanom vodom nije došlo do pojave simptoma tipa truleži, niti bilo kakvih drugih promena (Slika 19).

Od svih ispitanih izolata *A. parasiticus*, prema intenzitetu ispoljavanja simptoma, izdvajaju se izolati MRI 3819 i MRI 4265, koji su ocenjeni ocenom 5.

Obzirom da izolati MRI 3819 i MRI 4265 predstavljaju izolate sa statistički značajno najvećom sposobnošću da prouzrokuju simptome na listu ječma, mogu se smatrati izolatima koji ispoljavaju najveću agresivnost u laboratorijskim uslovima. Izolati koji spadaju u grupu sa nižim nivoom patogenosti u laboratorijskim uslovima su MRI 3802, MRI 3930, MRI 3937, MRI 3994, MRI 4008, MRI 4033, MRI 4256, MRI 4257, MRI 4258, MRI 4260, MRI 4269, MRI 4270, MRI 4275 (Tabela 11).

Najveći broj izolata (po 34%) ocenjenom je ocenama 3 i 4, dok je 27% izolata ocenom 2, dok je svega 4% ocenom 5.

Tabela 11. Patogenost izolata *A. parasiticus* poreklom sa kukuruza na listu ječma

R. br.	Izolat	Ocena patogenosti
1	MRI 3802	2
2	MRI 3808	4
3	MRI 3812	3
4	MRI 3817	4
5	MRI 3819	5
6	MRI3822	3
7	MRI 3930	2
8	MRI 3937 (<i>A. flavus</i>)	2
9	MRI 3977	4
10	MRI 3990	4
11	MRI 3994	2
12	MRI 4003	3
13	MRI 4008	2
14	MRI 4033	2
15	MRI 4045	3
16	MRI 4194	3
17	MRI 4195	3
18	MRI 4197	3
19	MRI 4198	4
20	MRI 4196	4
21	MRI 4232	4
22	MRI 4239	3
23	MRI 4251	3
24	MRI 4252	4
25	MRI 4253	4
26	MRI 4254	4
27	MRI 4255	3
28	MRI 4256	2
29	MRI 4257	2
30	MRI 4258	2
31	MRI 4259	3
32	MRI 4260	2
33	MRI 4261	4
34	MRI 4262	4
35	MRI 4263	3

36	MRI 4264	4
37	MRI 4265	5
38	MRI 4266	4
39	MRI 4267	4
40	MRI 4268	3
41	MRI 4269	2
42	MRI 4270	2
43	MRI 4271	3
44	MRI 4272	3
45	MRI 4273	3
46	MRI 4274	4
47	MRI 4275	2

6.1.4.2 Provera patogenosti i reizolacija patogena u poljskim uslovima

Za odabranih 46 monospornih izolata vrste *A. parasiticus* potvrđena je patogenost nakon veštačke inokulacije klipova kukuruza koja je sprovedena u dvogodišnjim poljskim ogledima (2016. i 2017. godine) na lokalitetu Zemun Polje. Na svim inokuliranim klipovima kukuruza različitih FAO grupa zrenja (FAO 300, 500 i 800) došlo je do pojave karakterističnog simptoma, u vidu maslinastozelene praškaste prevlake (Slika 20). Klipovi su bili delimično ili potpuno obuhvaćeni micelijom gljive, što je zavisilo od virulentnosti izolata. Pojava simptoma bila je učestalija u vršnom delu klipa, dok je samo kod pojedinih ona obuhvatala osnovu klipa. Na klipovima koji su, kao pozitivna kontrola, inokulisani vrstom *A. flavus* došlo je do pojave simptoma maslinastozelene praškaste prevlake, ali svetlije zelene boje u odnosu na ispitivane izolate. Kao negativna kontrola, korišćena je sterilna destilovana voda i na tim klipovima nije došlo do pojave simptoma bolesti. Za ispitivanje uticaja izolata, FAO grupa zrenja i godina na patogenost korišćena je trofaktorska ANOVA. Za naknadna poređenja je korišćen Dankanov test.



Slika 20. Simptomi *Aspergillus parasiticus* posle veštačke inokulacije klipa kukuruza u vreme berbe (A, B, C)

Sa inokulisanih klipova kukuruza obavljena je reizolacija patogena i reisolati su upoređeni sa izolatima korišćenim za inokulaciju. Dobijeni reisolati su, po izgledu kolonije i morfologiji reproduktivnih tvorevina, u potpunosti odgovarali izvornim izolatima čime je potvrđena patogenost izolata i zadovoljeni Kohovi postulati.

Rezultati su ukazali na različitu patogenost koja je ocenjena na osnovu stepena infekcije prema skali 1-7 u vreme berbe kukuruza. Skala za ocenu intenziteta patogenosti izolata posle veštačke inokulacije:

- Ocena 1 – klip bez simptoma;
- Ocena 2 – (1-3%);
- Ocena 3 – (4-10%);

Ocena 5 – (26-50%);

Ocena 6 – (51-75%);

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



Slika 21. Skala za ocenu intenziteta patogenosti izolata posle veštačke inokulacije: 1- klip bez simptoma; 2- (1-3%); 3- (4-10%); 4- (26-50%); 5- (51-75); 6- (76-100%) zaražene površine klipa

U uslovima veštačke inokulacije, tokom prve godine ispitivanja (2016. godina), ispitivani izolati ispoljili su prosečnu ocenu intenziteta zaraze u opsegu 1,00-2,35 na hibridima FAO grupe 300. Najmanju patogenost ispoljili su izolati MRI 4033 i MRI 4256, a najveću (prosečna ocena: 2,60) izolat MRI 3937 (*A. flavus*) koji je u ispitivanjima korišćen kao pozitivna kontrola. Pored njega, najveću prosečnu patogenost ispoljio je izolat MRI 4045. Na hibridima FAO grupe 500 ispitivani izolati ispoljili su prosečnu ocenu intenziteta zaraze u opsegu 1,00-2,50. Najmanju patogenost ispoljio je izolat MRI 4265, dok je najveću (prosečna ocena: 2,55) izolat MRI 3937 (*A. flavus*), a pored njega izolat MRI 4239. Ispitivani izolati ispoljili su prosečnu ocenu intenziteta zaraze u opsegu 1,00-2,00 na hibridima FAO grupe 800. Najmanju patogenost

ispoljio je izolat MRI 4257, dok je najveću (prosečna ocena: 2,05) izolat MRI 3937 (*A. flavus*), a pored njega izolat MRI 3802 (Slika 21).

Prosečna ocena intenziteta zaraze u drugoj godini ispitivanja, 2017. godini, kretala se u rasponu 1,15-2,30 na hibridima FAO grupe 300. Najmanju patogenost ispoljili su izolati MRI 3812, 4262, a najveću MRI 3808 i MRI 3819. Na hibridima FAO grupe 500 ispitivani izolati ispoljili su prosečnu ocenu intenziteta zaraze u opsegu 1,40-2,25. Najmanju patogenost ispoljio je izolat MRI 4255, dok je najveću (prosečna ocena: 2,80) izolat MRI 3937 (*A. flavus*), a pored njega MRI 3977 i MRI 4259. Ispitivani izolati ispoljili su prosečnu ocenu intenziteta zaraze u opsegu 1,00-2,10 na hibridima FAO grupe 800. Najmanju patogenost ispoljio je izolat MRI 3994, dok je najveću (prosečna ocena: 2,45) izolat MRI 3937 (*A. flavus*) koji je u ispitivanjima korišćen kao pozitivna kontrola, a pored njega izolat MRI 3808 i MRI 4197 (Slika 21).

Uporednim prikazom prosečnih ocena stepena infekcije tokom dve ispitivane godine (prosečna ocena za 2016. godinu: 1,46; prosečna ocena za 2017. godinu: 1,71) uočavamo da izolati nisu ispoljili ujednačenu patogenost (Tabela 12).

Tabela 12. Patogenost izolata *Aspergillus parasiticus* na klipku kukuruza

Izolati	2016. godina			2017. godina		
	FAO 300	FAO 500	FAO 800	FAO 300	FAO 500	FAO 800
MRI 3802	1.50	1.65	2.00	2.10	1.85	1.80
MRI 3808	1.20	1.40	1.50	2.30	1.70	2.10
MRI 3812	1.25	1.10	1.15	1.15	2.00	1.60
MRI 3817	1.75	1.75	1.35	1.95	1.60	1.85
MRI 3819	1.50	1.85	1.15	2.30	2.15	2.05
MRI3822	1.60	1.95	1.30	1.95	2.15	1.40
MRI 3930	1.30	2.10	1.25	1.65	2.05	1.45
MRI 3937 (<i>A. flavus</i>)	2.60	2.55	2.05	1.35	2.80	2.45
MRI 3977	1.80	2.20	1.20	1.80	2.25	1.60
MRI 3990	1.75	1.15	1.05	1.80	2.05	1.05
MRI 3994	1.30	1.55	1.25	1.30	2.10	1.00
MRI 4003	1.35	1.60	1.60	1.45	2.15	2.00
MRI 4008	1.55	1.65	1.40	1.85	2.10	1.90
MRI 4033	1.00	1.05	1.90	1.50	1.65	2.00
MRI 4045	2.35	1.35	1.00	1.65	2.20	1.85
MRI 4194	2.15	1.30	1.25	1.90	2.10	1.05

MRI 4195	1.50	1.25	1.20	1.85	2.20	1.10
MRI 4197	1.50	1.40	1.25	1.80	2.00	2.10
MRI 4198	1.35	1.60	1.30	1.65	1.95	1.60
MRI 4196	1.40	2.00	1.45	1.30	2.20	1.65
MRI 4232	1.50	1.40	1.15	1.65	1.80	1.70
MRI 4239	1.35	2.50	1.40	1.30	1.65	1.75
MRI 4251	1.60	2.05	1.05	1.30	1.95	1.95
MRI 4252	1.50	2.05	1.35	1.60	1.75	1.20
MRI 4253	1.45	1.45	1.40	1.40	1.70	1.70
MRI 4254	1.30	1.80	1.20	1.60	1.55	1.65
MRI 4255	1.65	1.60	1.25	1.40	1.40	1.55
MRI 4256	1.00	1.90	1.15	1.50	2.15	1.20
MRI 4257	1.60	1.45	1.00	1.65	1.50	1.65
MRI 4258	1.80	1.40	1.05	1.80	1.80	1.80
MRI 4259	2.00	1.70	1.00	1.65	2.25	1.20
MRI 4260	1.90	1.25	1.15	1.25	1.95	1.25
MRI 4261	1.45	1.75	1.05	1.50	1.60	1.40
MRI 4262	1.35	1.55	1.05	1.15	1.85	1.75
MRI 4263	1.30	1.30	1.10	1.90	1.55	2.00
MRI 4264	1.25	1.50	1.50	1.44	2.00	2.05
MRI 4265	1.05	1.00	1.30	1.55	1.65	1.90
MRI 4266	1.10	1.75	1.10	1.40	1.75	1.85
MRI 4267	1.10	1.60	1.20	1.60	1.95	1.85
MRI 4268	1.50	1.25	1.85	2.10	1.75	1.95
MRI 4269	1.55	1.30	1.30	1.60	2.10	1.60
MRI 4270	1.65	1.10	1.48	1.60	1.65	1.45
MRI 4271	1.25	1.70	1.10	1.35	2.05	1.45
MRI 4272	1.20	2.05	1.80	1.85	1.90	1.80
MRI 4273	1.95	1.25	1.30	1.50	2.00	1.10
MRI 4274	1.20	1.30	1.15	1.25	1.80	1.75
MRI 4275	1.20	1.70	1.35	1.40	1.65	1.65
Kontrola	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Prosek	1.49	1.59	1.30	1.60	1.89	1.64
Min	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Max	2.60	2.55	2.05	2.30	2.80	2.45
Prosek po godini		1.46			1.71	

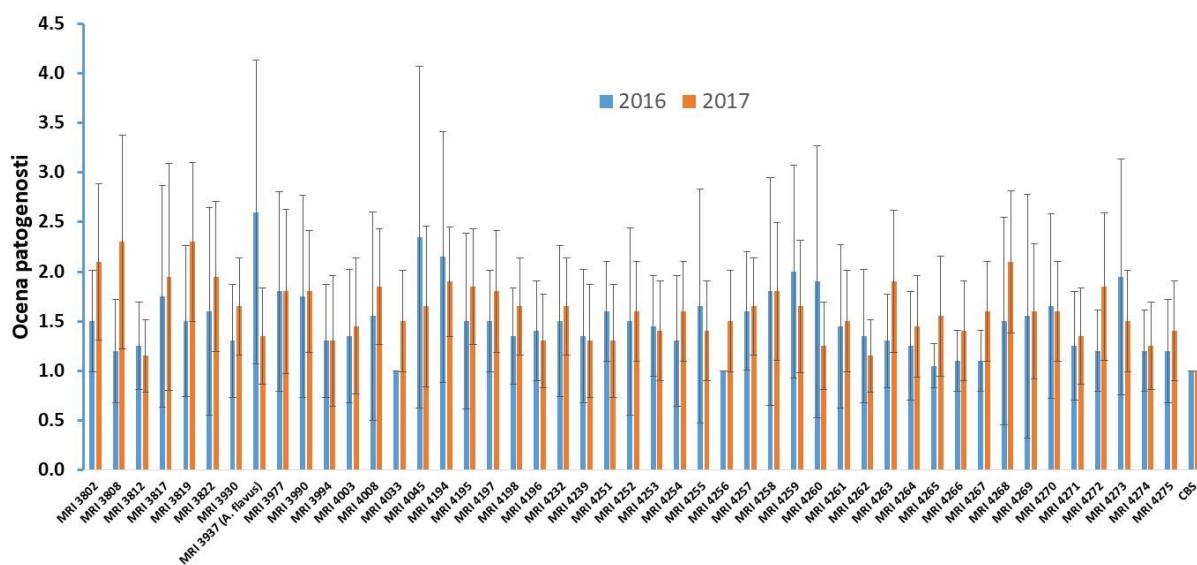
Rezultati Dankanovog testa ukazali su da je izolat MRI 4239 ispoljio najviši nivo patogenosti (prosečna ocena: 2,50) (Tabela 12).

Prosečna ocena patogenosti kod ostalih izolata je na statistički značajno nižem nivou u odnosu na pomenuti izolat. Izolati MRI 4033, MRI 4256 na hibridima FAO grupe 300, zatim izolat MRI 4265 na hibridima FAO grupe 500, kao i MRI 4045, MRI 4257, MRI 4259 na hibridima FAO grupe 800, ispoljili su najslabiju patogenost, koja se nije statistički značajno razlikovala u odnosu na patogenost ostalih izolata (Tabele 13, 14, 15; Grafikoni 5, 6, 7).

Tabela 13. Ocena patogenosti izolata *A. parasiticus* na hibridima kukuruza FAO grupe 300

Izolat	Godina									
	2016					2017				
	Prosek	St. dev	Min	Max	CV (%)	Prosek	St. dev	Min	Max	CV (%)
MRI 3802	1.50	.51	1	2	34.2	2.10	.79	1	3	37.5
MRI 3808	1.20	.52	1	3	43.6	2.30	1.08	1	4	47.0
MRI 3812	1.25	.44	1	2	35.5	1.15	.37	1	2	31.9
MRI 3817	1.75	1.12	1	5	63.9	1.95	1.15	1	4	58.8
MRI 3819	1.50	.76	1	4	50.7	2.30	.80	1	3	34.8
MRI 3822	1.60	1.05	1	4	65.4	1.95	.76	1	3	38.9
MRI 3930	1.30	.57	1	3	43.9	1.65	.49	1	2	29.7
MRI 3937 (<i>A. flavus</i>)	2.60	1.54	1	6	59.1	1.35	.49	1	2	36.2
MRI 3977	1.80	1.01	1	4	55.8	1.80	.83	1	3	46.3
MRI 3990	1.75	1.02	1	4	58.3	1.80	.62	1	3	34.2
MRI 3994	1.30	.57	1	3	43.9	1.30	.66	1	3	50.5
MRI 4003	1.35	.67	1	3	49.7	1.45	.69	1	3	47.3
MRI 4008	1.55	1.05	1	5	67.7	1.85	.59	1	3	31.7
MRI 4033	1.00	.00	1	1	0.0	1.50	.51	1	2	34.2
MRI 4045	2.35	1.73	1	5	73.4	1.65	.81	1	3	49.3
MRI 4194	2.15	1.27	1	5	59.0	1.90	.55	1	3	29.1
MRI 4195	1.50	.89	1	4	59.2	1.85	.59	1	3	31.7
MRI 4197	1.50	.51	1	2	34.2	1.80	.62	1	3	34.2
MRI 4198	1.35	.49	1	2	36.2	1.65	.49	1	2	29.7
MRI 4196	1.40	.50	1	2	35.9	1.30	.47	1	2	36.2
MRI 4232	1.50	.76	1	3	50.7	1.65	.49	1	2	29.7
MRI 4239	1.35	.67	1	3	49.7	1.30	.57	1	3	43.9
MRI 4251	1.60	.50	1	2	31.4	1.30	.57	1	3	43.9
MRI 4252	1.50	.95	1	5	63.1	1.60	.50	1	2	31.4
MRI 4253	1.45	.51	1	2	35.2	1.40	.50	1	2	35.9
MRI 4254	1.30	.66	1	3	50.5	1.60	.50	1	2	31.4
MRI 4255	1.65	1.18	1	5	71.6	1.40	.50	1	2	35.9
MRI 4256	1.00	.00	1	1	0.0	1.50	.51	1	2	34.2

MRI 4257	1.60	.60	1	3	37.4	1.65	.49	1	2	29.7
MRI 4258	1.80	1.15	1	4	64.0	1.80	.70	1	3	38.7
MRI 4259	2.00	1.08	1	4	53.8	1.65	.67	1	3	40.7
MRI 4260	1.90	1.37	1	5	72.2	1.25	.44	1	2	35.5
MRI 4261	1.45	.83	1	4	56.9	1.50	.51	1	2	34.2
MRI 4262	1.35	.67	1	3	49.7	1.15	.37	1	2	31.9
MRI 4263	1.30	.47	1	2	36.2	1.90	.72	1	3	37.8
MRI 4264	1.25	.55	1	3	44.0	1.44	.51	1	2	35.4
MRI 4265	1.05	.22	1	2	21.3	1.55	.60	1	3	39.0
MRI 4266	1.10	.31	1	2	28.0	1.40	.50	1	2	35.9
MRI 4267	1.10	.31	1	2	28.0	1.60	.50	1	2	31.4
MRI 4268	1.50	1.05	1	5	70.1	2.10	.72	1	3	34.2
MRI 4269	1.55	1.23	1	5	79.6	1.60	.68	1	3	42.5
MRI 4270	1.65	.93	1	5	56.6	1.60	.50	1	2	31.4
MRI 4271	1.25	.55	1	3	44.0	1.35	.49	1	2	36.2
MRI 4272	1.20	.41	1	2	34.2	1.85	.75	1	3	40.3
MRI 4273	1.95	1.19	1	5	61.1	1.50	.51	1	2	34.2
MRI 4274	1.20	.41	1	2	34.2	1.25	.44	1	2	35.5
MRI 4275	1.20	.52	1	3	43.6	1.40	.50	1	2	35.9
CBS	1.00	.00	1	1	0.0	1.00	.00	1	1	0.0

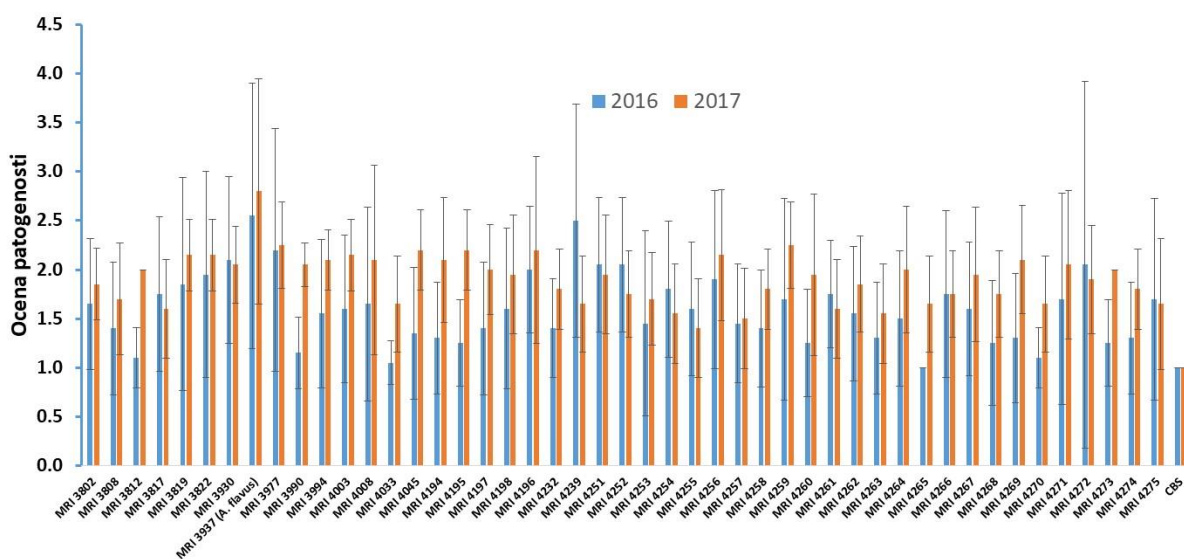


Grafikon 5. Ocena patogenosti izolata *A. parasiticus* na hibridima kukuruza FAO grupe 800. Legenda: vertikalni bar označava standardnu grešku sredine

Tabela 14. Ocena patogenosti izolata *A. parasiticus* na hibridima kukuruza FAO grupe 500

Izolat	Godina									
	2016					2017				
	Prosek	St. dev	Min	Max	CV (%)	Prosek	St. dev	Min	Max	CV (%)
MRI 3802	1.65	.67	1	3	40.7	1.85	.37	1	2	19.8
MRI 3808	1.40	.68	1	3	48.6	1.70	.57	1	3	33.6
MRI 3812	1.10	.31	1	2	28.0	2.00	.00	2	2	0.0
MRI 3817	1.75	.79	1	4	44.9	1.60	.50	1	2	31.4
MRI 3819	1.85	1.09	1	4	58.9	2.15	.37	2	3	17.0
MRI 3822	1.95	1.05	1	4	53.8	2.15	.37	2	3	17.0
MRI 3930	2.10	.85	1	4	40.6	2.05	.39	1	3	19.2
MRI 3937 (<i>A. flavus</i>)	2.55	1.36	1	5	53.2	2.80	1.15	2	5	41.1
MRI 3977	2.20	1.24	1	5	56.3	2.25	.44	2	3	19.7
MRI 3990	1.15	.37	1	2	31.9	2.05	.22	2	3	10.9
MRI 3994	1.55	.76	1	4	49.0	2.10	.31	2	3	14.7
MRI 4003	1.60	.75	1	3	47.1	2.15	.37	2	3	17.0
MRI 4008	1.65	.99	1	4	59.9	2.10	.97	1	4	46.1
MRI 4033	1.05	.22	1	2	21.3	1.65	.49	1	2	29.7
MRI 4045	1.35	.67	1	3	49.7	2.20	.41	2	3	18.7
MRI 4194	1.30	.57	1	3	43.9	2.10	.64	1	3	30.5
MRI 4195	1.25	.44	1	2	35.5	2.20	.41	2	3	18.7
MRI 4197	1.40	.68	1	3	48.6	2.00	.46	1	3	22.9
MRI 4198	1.60	.82	1	3	51.3	1.95	.60	1	3	31.0
MRI 4196	2.00	.65	1	3	32.4	2.20	.95	1	4	43.2
MRI 4232	1.40	.50	1	2	35.9	1.80	.41	1	2	22.8
MRI 4239	2.50	1.19	1	5	47.7	1.65	.49	1	2	29.7
MRI 4251	2.05	.69	1	3	33.5	1.95	.60	1	3	31.0
MRI 4252	2.05	.69	1	3	33.5	1.75	.44	1	2	25.4
MRI 4253	1.45	.94	1	5	65.1	1.70	.47	1	2	27.7
MRI 4254	1.80	.70	1	3	38.7	1.55	.51	1	2	32.9
MRI 4255	1.60	.68	1	3	42.5	1.40	.50	1	2	35.9
MRI 4256	1.90	.91	1	5	48.0	2.15	.67	1	3	31.2
MRI 4257	1.45	.60	1	3	41.7	1.50	.51	1	2	34.2
MRI 4258	1.40	.60	1	3	42.7	1.80	.41	1	2	22.8
MRI 4259	1.70	1.03	1	4	60.7	2.25	.44	2	3	19.7
MRI 4260	1.25	.55	1	3	44.0	1.95	.83	1	4	42.3
MRI 4261	1.75	.55	1	3	31.4	1.60	.50	1	2	31.4
MRI 4262	1.55	.69	1	3	44.3	1.85	.49	1	3	26.5
MRI 4263	1.30	.57	1	3	43.9	1.55	.51	1	2	32.9
MRI 4264	1.50	.69	1	3	45.9	2.00	.65	1	3	32.4
MRI 4265	1.00	.00	1	1	0.0	1.65	.49	1	2	29.7

MRI 4266	1.75	.85	1	4	48.6	1.75	.44	1	2	25.4
MRI 4267	1.60	.68	1	3	42.5	1.95	.69	1	3	35.2
MRI 4268	1.25	.64	1	3	51.1	1.75	.44	1	2	25.4
MRI 4269	1.30	.66	1	3	50.5	2.10	.55	1	3	26.3
MRI 4270	1.10	.31	1	2	28.0	1.65	.49	1	2	29.7
MRI 4271	1.70	1.08	1	5	63.6	2.05	.76	1	3	37.0
MRI 4272	2.05	1.88	1	7	91.6	1.90	.55	1	3	29.1
MRI 4273	1.25	.44	1	2	35.5	2.00	.00	2	2	0.0
MRI 4274	1.30	.57	1	3	43.9	1.80	.41	1	2	22.8
MRI 4275	1.70	1.03	1	4	60.7	1.65	.67	1	3	40.7
CBS	1.00	.00	1	1	0.0	1.00	.00	1	1	0.0



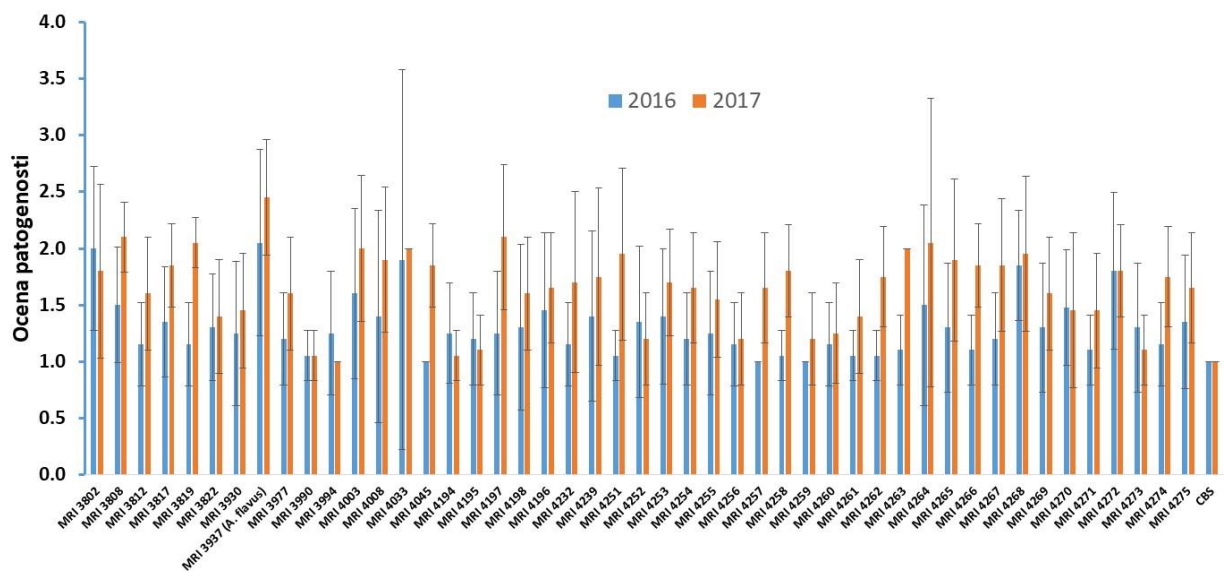
Grafikon 6. Ocena patogenosti izolata *A. parasiticus* na hibridima kukuruza FAO grupe 500. Legenda: vertikalni bar označava standardnu grešku sredine

Tabela 15. Ocena patogenosti izolata *A. parasiticus* na hibridima kukuruza FAO grupe 800

Izolat	Godina									
	2016					2017				
	Prosek	St. dev	Min	Max	CV (%)	Prosek	St. dev	Min	Max	CV (%)
MRI 3802	2.00	.73	1	4	36.3	1.80	.77	1	3	42.7
MRI 3808	1.50	.51	1	2	34.2	2.10	.31	2	3	14.7
MRI 3812	1.15	.37	1	2	31.9	1.60	.50	1	2	31.4
MRI 3817	1.35	.49	1	2	36.2	1.85	.37	1	2	19.8
MRI 3819	1.15	.37	1	2	31.9	2.05	.22	2	3	10.9
MRI 3822	1.30	.47	1	2	36.2	1.40	.50	1	2	35.9

MRI 3930	1.25	.64	1	3	51.1	1.45	.51	1	2	35.2
MRI 3937 (<i>A. flavus</i>)	2.05	.83	1	3	40.3	2.45	.51	2	3	20.8
MRI 3977	1.20	.41	1	2	34.2	1.60	.50	1	2	31.4
MRI 3990	1.05	.22	1	2	21.3	1.05	.22	1	2	21.3
MRI 3994	1.25	.55	1	3	44.0	1.00	.00	1	1	0.0
MRI 4003	1.60	.75	1	3	47.1	2.00	.65	1	3	32.4
MRI 4008	1.40	.94	1	5	67.2	1.90	.64	1	3	33.7
MRI 4033	1.90	1.68	1	6	88.6	2.00	.00	2	2	0.0
MRI 4045	1.00	.00	1	1	0.0	1.85	.37	1	2	19.8
MRI 4194	1.25	.44	1	2	35.5	1.05	.22	1	2	21.3
MRI 4195	1.20	.41	1	2	34.2	1.10	.31	1	2	28.0
MRI 4197	1.25	.55	1	3	44.0	2.10	.64	1	3	30.5
MRI 4198	1.30	.73	1	4	56.4	1.60	.50	1	2	31.4
MRI 4196	1.45	.69	1	3	47.3	1.65	.49	1	2	29.7
MRI 4232	1.15	.37	1	2	31.9	1.70	.80	1	3	47.1
MRI 4239	1.40	.75	1	3	53.9	1.75	.79	1	3	44.9
MRI 4251	1.05	.22	1	2	21.3	1.95	.76	1	3	38.9
MRI 4252	1.35	.67	1	3	49.7	1.20	.41	1	2	34.2
MRI 4253	1.40	.60	1	3	42.7	1.70	.47	1	2	27.7
MRI 4254	1.20	.41	1	2	34.2	1.65	.49	1	2	29.7
MRI 4255	1.25	.55	1	3	44.0	1.55	.51	1	2	32.9
MRI 4256	1.15	.37	1	2	31.9	1.20	.41	1	2	34.2
MRI 4257	1.00	.00	1	1	0.0	1.65	.49	1	2	29.7
MRI 4258	1.05	.22	1	2	21.3	1.80	.41	1	2	22.8
MRI 4259	1.00	.00	1	1	0.0	1.20	.41	1	2	34.2
MRI 4260	1.15	.37	1	2	31.9	1.25	.44	1	2	35.5
MRI 4261	1.05	.22	1	2	21.3	1.40	.50	1	2	35.9
MRI 4262	1.05	.22	1	2	21.3	1.75	.44	1	2	25.4
MRI 4263	1.10	.31	1	2	28.0	2.00	.00	2	2	0.0
MRI 4264	1.50	.89	1	4	59.2	2.05	1.28	1	5	62.3
MRI 4265	1.30	.57	1	3	43.9	1.90	.72	1	3	37.8
MRI 4266	1.10	.31	1	2	28.0	1.85	.37	1	2	19.8
MRI 4267	1.20	.41	1	2	34.2	1.85	.59	1	3	31.7
MRI 4268	1.85	.49	1	3	26.5	1.95	.69	1	3	35.2
MRI 4269	1.30	.57	1	3	43.9	1.60	.50	1	2	31.4
MRI 4270	1.48	.51	1	2	34.7	1.45	.69	1	3	47.3
MRI 4271	1.10	.31	1	2	28.0	1.45	.51	1	2	35.2
MRI 4272	1.80	.70	1	3	38.7	1.80	.41	1	2	22.8
MRI 4273	1.30	.57	1	3	43.9	1.10	.31	1	2	28.0
MRI 4274	1.15	.37	1	2	31.9	1.75	.44	1	2	25.4
MRI 4275	1.35	.59	1	3	43.5	1.65	.49	1	2	29.7

CBS	1.00	.00	1	1	0.0	1.00	.00	1	1	0.0
-----	------	-----	---	---	-----	------	-----	---	---	-----



Grafikon 7. Ocena patogenosti izolata *A. parasiticus* na hibridima kukuruza FAO grupe 800. Legenda: vertikalni bar označava standardnu grešku sredine

6.1.5 Toksikološki profil izolata *Aspergillus parasiticus*

Koncentracije aflatoksina B1 i ukupnih aflatoksina u kulturama *A. parasiticus* na zrnu kukuruza određene su ELISA testom, a koncentracije pojedinačnih aflatoksina B1, B2, G1 i G2, HPLC metodom. Statističkom obradom podataka utvrđeno je da postoji pozitivna korelacija između koncentracija dobijenih pomoću ovih metoda.

6.1.5.1 Određivanje potencijala produkcije aflatoksina ELISA metodom

Rezultati kvantitativne analize potencijala produkcije aflatoksina B1 i ukupnih aflatoksina ELISA metodom ukazali su na prisustvo mikotoksina u zrnu kukuruza inokulisanih izolatima *A. parasiticus*. Kvalitativna analiza potencijala produkcije ELISA testom ukazala je na varijabilnost izolata u sintezi različitih koncentracija AFB1.

Prosečna sinteza ovog toksina ne može se precizno utvrditi, zbog prisustva velikog broja izolata čiji je potencijal produkcije AFB1 bio viši od praga detekcije upotrebljenog kita.

Najveće prosečne koncentracije AFB1 detektovane su kod izolata MRI 3802, MRI 3930, MRI 3937, MRI 3977, MRI 3990, MRI 4045, MRI 4194, MRI 4195, MRI 4197, MRI 4198, MRI 4196, MRI 4232, MRI 4251, MRI 4252, MRI 5253, MRI 4258, MRI 4261, MRI 4263, MRI 4264, MRI 4266, MRI 4274 (koncentracije uzoraka su izvan opsega primenjenog test kita). Najmanje prosečne koncentracije ovog mikotoksina detektovane su kod izolata MRI 4267 (3.68 µg/kg), MRI 4270 (4.62 µg/kg) i kod MRI 3819 (4.86 µg/kg) (Tabela 16).

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 (Tabela 16).

Tabela 16. Potencijal produkcije 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

Toxic-uzorci koji su sadržali koncentracije koje su izvan opsega primenjenog test kita

Prosečna sinteza ovog toksina ne može se precizno utvrditi, zbog prisustva velikog broja izolata čiji je potencijal produkcije AFLA bio izvan opsega koncentracija upotrebljenog kita.

Najveće koncentracije AFLA detektovane su kod izolata MRI 3802, MRI 3808, MRI 3817, MRI 3930, MRI 3937, MRI 3977, MRI 3993, MRI 3994, MRI 4008, MRI 4033, MRI 4045, MRI 4194, MRI 4195, MRI 4197, MRI 4198, MRI 4196, MRI 4232, MRI 4239, MRI 4251, MRI 4252, MRI 4253, MRI 4254, MRI 4258, MRI 4260, MRI 4261, MRI 4263, MRI 4264, MRI 4266, MRI 4274 (koncentracije uzoraka su izvan opsega primenjenog test kita) (Tabela K). Najmanje koncentracije ovog mikotoksina detektovane su kod izolata MRI 4267 (5,57 µg/kg) (Tabela 17).

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%) (Tabela 17).

Tabela 17. Potencijal produkcije 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

Toxic-uzorci koji su sadržali koncentracije koje su izvan opsega primenjenog test kita

Rezultati Elisa testa pokazali su da postoji statistički visoko značajna pozitivna korelacija između potencijala produkcije AFB1 i AFLA kod izolata *A. parasiticus* ($r=0,66^{**}$) (Tabela 18).

Tabela 18. Korelacija između sinteze aflatoksina B1 i ukupnih aflatoksina kod izolata *Aspergillus parasiticus* dobijenih HPLC metodom

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

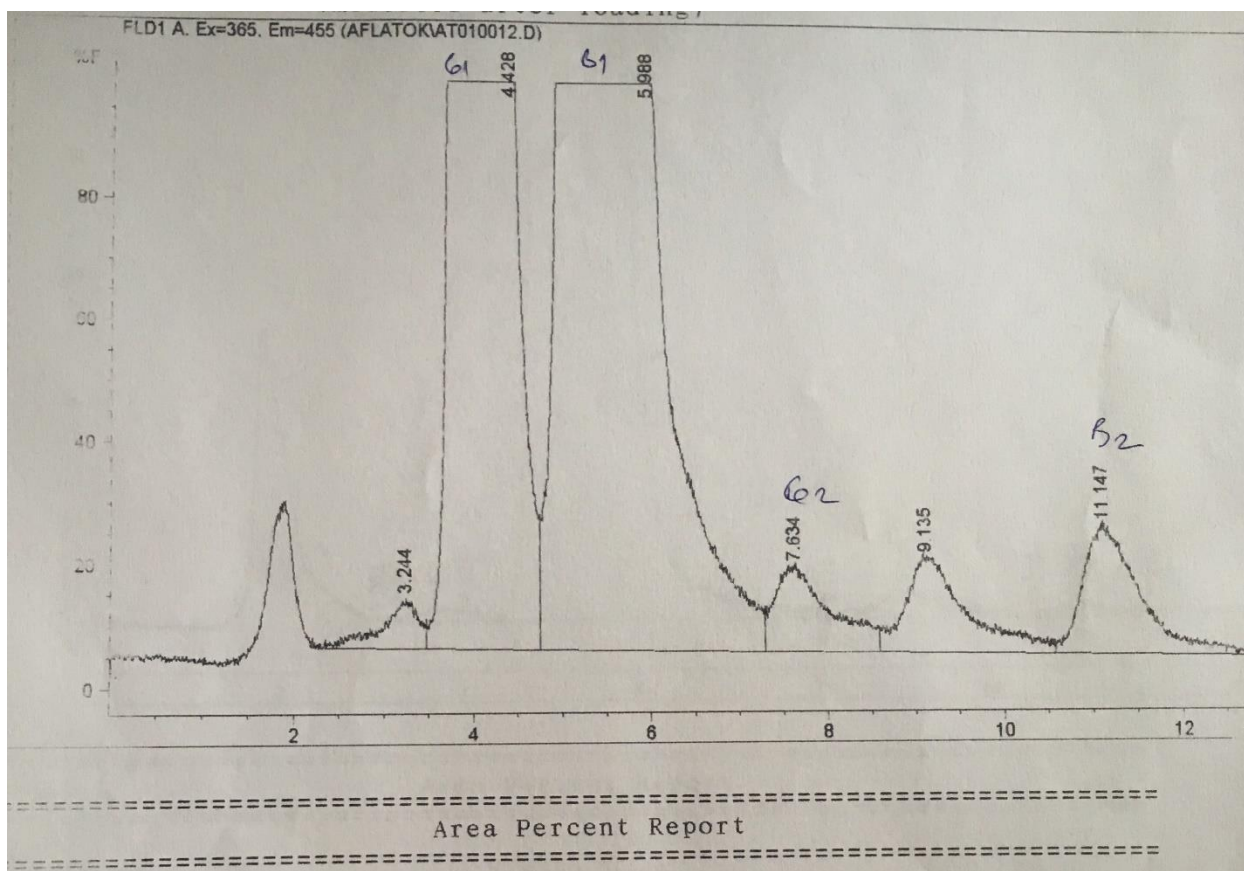
*Statistički značajna razlika ($p<0,05$);

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

6.1.5.2 Kvantitativno i kvalitativno određivanje pojedinačnih aflatoksina metodom visoko efikasne tečne hromatografije sa FLD detekcijom (HPLC-FLD)

Kvantitativna i kvalitativna analiza potencijala produkcije HPLC metodom pokazala je da postoji velika varijabilnost koncentracija pojedinačnih aflatoksina (B1, B2, G1 i G2) među izolatima.

Određivanje pojedinačnih aflatoksina izolata *A. parasiticus* urađeno je pomoću hemijskih analiza, primenom visoko efikasne tečne hromatografije sa FLD detekcijom (HPLC/FLD). Toksikološki profil izolata *A. parasiticus*, odnosno sposobnost sinteze aflatoksina B1 (AFB1), aflatoksina B2 (AFB2), aflatoksina G1 (AFG1) i aflatoksina G2 (AFG2) dobijen je primenom ove metode (Slika 22).



Slika 22. Hromatogram aflatoksina B1, B2, G1, G2 u inokulisanom uzorku kukuruza izolatom MRI 3930

Prosečna sinteza aflatoksina B1 bila je 4385,63 µg/kg, što izolate ove vrste svrstava u jake producente AFB1. Prosečna sinteza aflatoksina B2 bila je 559,47 µg/kg. Prosečna sinteza aflatoksina G1 bila je 3880,12 µg/kg, što izolate ove vrste svrstava u jake producente AFG1, dok je prosečna sinteza aflatoksina G2 iznosila 168,65 µg/kg.

Najveće koncentracije AFB1 detektovane su kod izolata MRI 4194 (7361,03 µg/kg), dok su najmanje koncentracije zabeležene kod izolata MRI 3808 (14,24 µg/kg). Najveće koncentracije AFG1 detektovane su kod izolata MRI 4198 (7421,58 µg/kg), MRI 4195 (7191,62 µg/kg), MRI 4197 (7122,59 µg/kg). Najmanje koncentracije ovog mikotoksina detektovane su kod izolata MRI 3808 (3,27 µg/kg) (Tabela 20).

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.

Međutim, utvrdili smo i osam izolata koji su sintetisali AFG1 u višim koncentracijama, u odnosu na AFB1. Ipak, dominantan aflatoxin izolata *A. parasiticus* poreklom iz Srbije bio B1, dok je u značajno nižem procentu zabeležen aflatoxin G1 (84,78%, odnosno 15,22%).

Veliki procenat (50%) isipitanih izolata nije sintetisalo aflatoksine B1, B2, G1 i G2 ili jeste u veoma niskim koncentracijama uz nemogućnost određivanja njihovih vrednosti (Tabela 20).

Na osnovu dobijenih rezultata uočava se veliki diverzitet u produkciji svih pojedinačnih aflatoksina.

Rezultati HPLC metode ukazali su na postojanje statistički visoko značajne pozitivne korelacije između potencijala produkcije AFB1 i AFG1 kod izolata *A. parasiticus* ($r=0,82^{**}$), kao i između potencijala produkcije AFB2 i AFG2 ($r=0,63^{**}$) (Tabela 19).

Tabela 19. Korelacija između sinteze aflatoksina B1, B2, G1, 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 začajna razlika ($p<0,01$)

Tabela 20. Toksikološki profil izolata *Aspergillus parasiticus* poreklom sa kukuruza

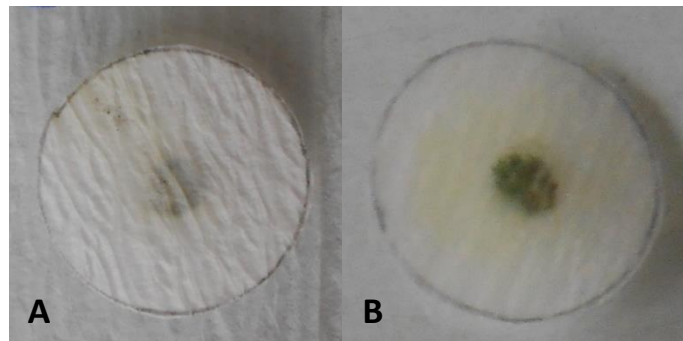
Izolat	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2
	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg
3802	3429.82	544.25	3461.35	260.47
3808	14.24	×	3.27	×
3812	×	×	×	×
3817	×	×	×	×
3819	×	×	×	×
3822	×	×	×	×
3930	3438.01	331.92	3437.81	306.65
3937 (<i>A. flavus</i>)	646.05	0.27	12.04	×
3977	911.03	561.35	554.22	47.69
3990	5698.47	303.94	6518.88	90.52
3994	×	×	×	×
4003	×	×	×	×
4008	×	×	×	×
4033	×	×	×	×
4045	6716.42	1543.80	5189.43	181.76
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
4239	×	×	×	×
4251	5918.46	254.03	6606.65	98.25
4252	6816.08	721.28	2166.36	×
4253	15.46	×	×	×
4254	×	×	×	×
4255	89.67	×	×	×
4256	×	×	×	×
4257	×	×	×	×
4258	6884.01	1.590,6	2946.52	10.43
4259	×	×	×	×
4260	×	×	×	×
4261	5198.68	403.79	5.13	128.02
4262	5776.73	629.68	5746.97	217.83
4263	×	×	×	×
4264	×	×	×	×
4265	5968.77	1733.52	634.79	×

4266	5168.79	351.97	5157.56	119.18
4267	×	×	×	×
4268	×	×	×	×
4269	×	×	×	×
4270	×	×	×	×
4271	×	×	×	×
4272	×	×	×	×
4273	×	×	×	×
4274	6029.33	500.80	6240.54	201.47
4275	33.05	×	8.03	×

x – uzorci koji su sadržali veoma niske koncentracije koje su izvan opsega primenjenih Mycoseb kolona

6.1.5.3 Erlich-ov test

Ehrlich-ov test na filter papiru je pokazao da 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 (Slika 23).



Slika 23. Obrazovanje žutog prstena kod MRI 3937 (*A. flavus*) (B) i njegov izostanak kod MRI 3808 (A)

6.1.6 Molekularna identifikacija izolata *Aspergillus parasiticus*

6.1.6.1 RFLP analiza ITS rDNK regiona

Za RFLP-PCR analizu korišćeno je ukupno 46 izolata okarakterisanih kao *A. parasiticus*, i referentni izolat CBS100926. Kao pozitivna kontrola poslužio je izolat vrste *A. flavus*, MRI 3937 (*A. flavus*).

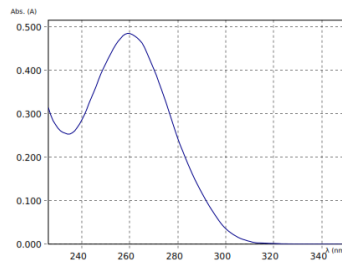
Kao rezultat lančane reakcije polimeraze, korišćenjem prajmera IGS-F/IGS-R, po protokolu koji su opisali Khoury et al. (2011), amplifikovani su fragmenti nukleinske kiseline očekivane veličine 674bp. Kod 48 uzoraka došlo je do amplifikacije fragmenta veličine 674 bp, specifičnog za izolate vrsta *A. flavus* i *A. parasiticus* (Slika 25).

PCR produkti dobijeni umnožavanjem parom prajmera IGS-F/IGS-R koji umnožavaju region introna gena za glutamin sintetazu (GS) tretirani su sa restrikcionim enzimom *Bgl*II. Analizom RFLP proizvoda u agaroznom gelu dobijeni su restrikcioni profili koji su jasno pokazali razlike između analiziranih uzoraka. Virtuelna RFLP analiza dobijenih sekvenci ITS rDNK regiona sa odabranim *Bgl*II restrikcionim enzimom pokazala je dva restrikciona mesta za ovaj enzim kod izolata *A. flavus* poreklom iz Srbije, dok su sekvence izolata *A. parasiticus* imale jedno restrikciono mesto. Posle digestije *Bgl*II enzimom, očekivane veličine fragmenata kod vrste *A. flavus* su 102 bp, 210 bp i 362 bp, a kod vrste *A. parasiticus* 311 bp i 363 bp. RFLP analiza sa *Bgl*II enzimom IGS-F/IGS-R PCR produkata odabranih izolata *A. parasiticus* i *A. flavus*, potvrdila je rezultate virtualne RFLP analize (Slika 26).

Nakon digestije *Bgl*II restrikcionim enzimom svi ispitivani izolati *A. parasiticus* imali su međusobno identične elektroforetske profile, koji su se razlikovali od izolata MRI 3937 (*A. flavus*) vrste *A. flavus*. Fragmenti veličina 363 i 311 bp amplifikovani su kod svih uzoraka detektovanih kao *A. parasiticus*, kao i kod referentnog izolata *A. parasiticus* (CBS100926), dok su veličine fragmenata 102 bp, 210 bp i 362 bp amplifikovane kod izolata MRI 3937 (*A. flavus*) (Slika 26). Do amplifikacije nije došlo kod negativne kontrole. Multiplex PCR detekcijom potvrđen je identitet svih izolata prethodno okarakterisanih na osnovu morfoloških, ekoloških, odgajivačkih i toksigenih karakteristika kao vrsta *A. parasiticus*.

dsDNA 1mm 2017-02-07 09:02:59

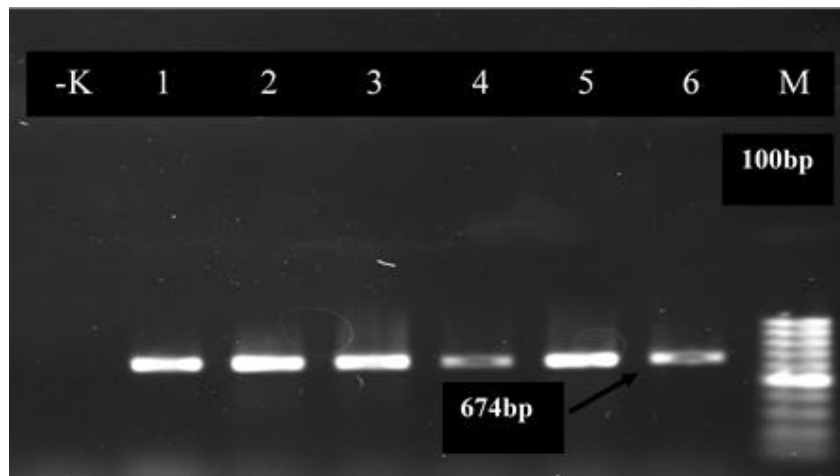
09:03 B#01 0.000 A₂₆₀



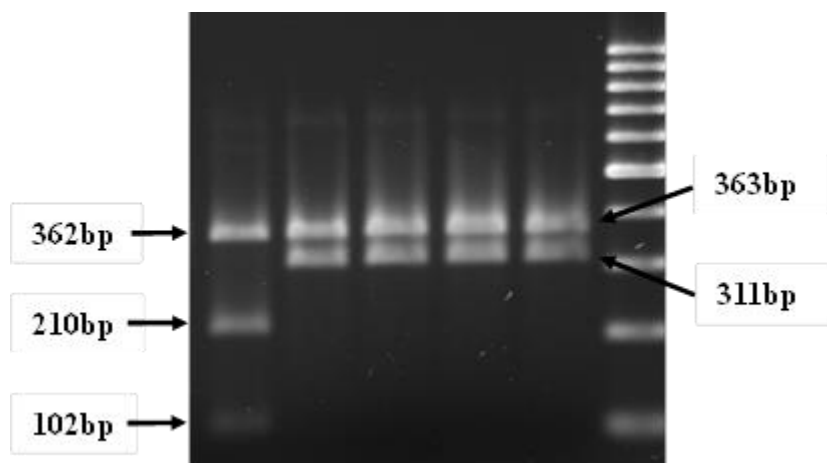
09:05 #001

	240.8	µg/mL	A ₂₆₀ 1mm
A260/A280	0.483	2.01	
A260/A230		1.82	
A230	0.266		A ₂₃₀ 1mm
A280	0.240		A ₂₈₀ 1mm
Background	0.001		A ₂₆₀ 1mm

Slika 24. Određivanje koncentracije i provera kvaliteta DNK



Slika 25. Elektroforetska analiza PCR proizvoda dobijenih korišćenjem para prajmera IGSF/IGSR: -K negativna kontrola; 1 – izolat MRI 3937 (*A. flavus*); 2, 3, 4, 5 – *A. parasiticus*; 6 – *A. parasiticus* CBS100926; M – 100 bp DNA marker.



Slika 26. 2% agarozni gel sa restrikcionim profilima IGSF / IGSR amplikona posle digestije BglII enzimom. 1 - izolat *A. flavus* (MRI 3937 (*A. flavus*)); 2, 3, 4 - izolati *A. parasiticus* (MRI XXXX, MRI BBBB, MRI CCCC i MRI DDDD); 5 - *A. parasiticus* CBS100926; M - 100 bp DNA marker.

7 DISKUSIJA

7.1 Morfološka karakterizacija *Aspergillus parasiticus*

Na osnovu ispoljenih makroskopskih morfoloških karakteristika kolonija na PDA podlozi, uočavamo da je došlo do varijabilnosti među ispitivanim izolatima *A. parasiticus*, u okviru ove disertacije. Izolate *A. parasiticus* nije bilo potrebno grupisati u morfološke grupe (boja i izgled kolonije). Uočena je divergentnost u makroskopskim morfološkim karakteristikama između ispitivanih izolata *A. parasiticus*. Prvu grupu čini 26 izolata koji na PDA podlozi imaju tamno zelenu koloniju s primesama sive, ravnih ivica. Obod kolonije je žućkasto-beličast. Na naličju kolonija uočena je pigmentacija, ivica u vidu žute boje. Druga grupa od 15 izolata obrazovala je somotaste kolonije tamno zelene boje, ravnih, koje su vunaste u središnjem delu kolonije. Centralna zona kolonije je maslinasto zelene do sive boje. Na površini micelije obrazovale su se mase spora. Na naličju Petri kutija nije uočena pigmentacija kolonija. Obod kolonije je žućkaste boje. U treću grupu svrstano je 5 izolata tamno zelene boje (boja bršljena), ravnih do blago talasastih oboda kolonije, sa prisutnim koncentričnim prstenovima spora. Na naličju Petri kutija kolonije nisu imale pigmentaciju. Ivična zona je bela do prljavo bela. Referentni izolat CBS100926, poreklom iz Holandije, obrazovao je koloniju sličnog izgleda kao i izolati poreklom iz Srbije, koji su svrstani u ovu grupu.

Na PDA podlozi svi ispitivani izolati imali su kompaktnu, somotastu miceliju, dok je na CYA podlozi micelija izolata bila slična, ali gusta, a na MEA podlozi micelija je imala karakteristične koncentrične prstenove spora tamno zelene boje, koji nisu zabeleženi na ostalim ispitivanim podlogama. Ispitivani izolati su na PDA i MEA podlozi obrazovali kolonije ravnog oboda, dok su kolonije na CYA podlozi bile neravnog ruba. Na naličju Petri kutija bila je vidljiva pigmentacija kolonija izolata u vidu žute boje. Međutim, Pitt i Hocking (2009) su ispitujući vrste roda *Aspergillus* opisali morfološke odlike vrste *A. parasiticus*, koje su se razlikovale u odnosu na izgled kolonija izolata opisanih u ovoj doktorskoj disertaciji. Ova vrste je na CYA podlozi formirala kolonije ravne, niske, guste i prekrivene gustim, pravim, dugačkim i mekim trihomama. Micelija je bila neupadljiva, bele boje. Glavice konidija su u ujednačenom, gustom sloju, tamno zelene. Naličje kolonije je bezbojno ili mrko.

Rezultati naših istraživanja ukazali su da izolati *A. parasiticus* imaju prosečan porast micelije, jer nakon sedam dana gajenja na PDA podlozi na 25°C dostižu prečnik kolonije 50-70

mm. Oscilacije u prosečnom dnevnom porastu *A. parasiticus* nisu ispoljene. Prema Pitt i Hocking (2009), kolonije vrste *A. parasiticus* na CYA podlozi iznosile su 50-70 mm u prečniku. Kolonije na MEA podlozi iznose 50-65 mm u prečniku, u osnovi su slične kao na CYA podlozi, ali mnogo manje guste i sa bezbojnim naličjem. Nema porasta na 5°C. Na 37°C, kolonije izolata slične su onima na CYA podlozi na 25°C, ili sa kolonijama tamnozeleno ili smeđkaste boje. Naličje kolonije je bledo. Nikolić i sar. (2018) su, ispitujući diferencijaciju između izolata toksigenih vrsta *A. flavus* i *A. parasiticus* poreklom sa zrna pšenice, utvrdili da prosečan porast micelije izolata *A. parasiticus* ostvaruju nakon sedam dana gajenja (65 mm) na PDA podlozi, a izolati *A. flavus* nešto veći porast (75 mm). Zabeležili su i da je boja kolonija izolata *A. parasiticus* tamno zelene boje, za razliku od izolata *A. flavus*, koji su formirali maslinasto zelenu miceliju.

Postoji nekoliko izabраниh podloga, koje mogu biti korišćene da se na jednostavan način utvrdi razlika između vrsta: (i) podloga za diferencijaciju *Aspergillus flavus* i *parasiticus* (AFPA); (ii) *Coconut Cream* agar (CCA) i (iii) *Čapek Dox* podloga (CZ). AFPA je selektivna identifikaciona podloga za detekciju vrsta roda *Aspergillus* sekcije Flavi (Pitt i sar., 1983). Tokom njihovog porasta na Čapekovoј podlozi (CZ), kolonije ove dve vrste se mogu taksonomski razdvojiti. Izgled kolonije vrste *A. flavus* je žuto-zelen, dok je kod vrste *A. parasiticus* karakteristično tamnozelen, skoro kao bršljen (Klich, 2002a; Samson i sar., 2004a).

Naličje kolonije *A. parasiticus* u eksperimentu koji je postavljen u ovoj doktorskoј disertaciji je bilo narandžaste boje kod svih ispitivanih izolata, nakon inkubacije od 48-72h na AFPA hranljivoј podlozi. Baquiao i sar. (2013) su posmatrali porast izolata na CZ podlozi na temperaturama od 25, 37 i 42°C, i zabeležili da se prečnik kolonija kretao od 50-70 mm, 50-70 mm i 1,8-3,3 mm. Posmatrali su i izgled izolata na AFPA hranljivoј podlozi i zabeležili narandžastu boju s naličja kolonije, kao znak pripadnosti rodu *Aspergillus* sekciji Flavi. Do sličnih rezultata došli su i Rodrigues i sar. (2007), Dovičićova i sar. (2012). Rodrigues i sar. (2011) su zabeležili tamno zelenu boju kolonije, kao i dobar porast kolonija na 25°C na različitim podlogama, premašujući prečnik od 70 mm. Dovičićova i sar. (2012) su zabeležili dobar porast kolonija izolata na 25°C i 37°C. Ehrlich i sar. (2007) su zabeležili porast izolata *A. parasiticus* na temperaturi od 42°C, u Tajlandu. Frisvad i sar. (2019) su zabeležili solidan porast izolata (>50 mm) na CYA i MEA podlogama i tamno žuto-zelene kolonije izolata.

Mikroskopske morfološke odlike opisali su Pitt i Hocking (2009). Konidiofori se stvaraju pod površinom i na površini hifa; stipe su duge 250-500 μm , sa bezbojnim ili bledomrkim, glatkim zidovima. Vezikule su loptaste, 20-35 μm u prečniku, fertile na više od $\frac{3}{4}$ površine, uglavnom samo sa fijalidama, ali kod nekih izolata i do 20% glavica ima i metule. Fijalide su duge 7-11 μm . Konidije su loptaste, uglavnom 4,0-6,0 μm u prečniku, sa izrazito hrapavim zidovima, obično se nalaze u "zrakastim" glavicama. Izgled i oblik stipa, vezikula i fijalida, prisustvo ili odsustvo metula, veličina i oblik spora su manje pouzdani pokazatelji u identifikaciji *Aspergillus* vrsta. Međutim, ornamentacija zida konidija se smatra pouzdanim kriterijumom za razlikovanje morfološki sličnih vrsta. Konidije *A. parasiticus* su loptaste/sferične, imaju relativno debele zidove i primetno su bodljikaste ili čekinjaste. Pečnik vezikula *A. parasiticus* retko prelazi 30 μm , a metule nisu uobičajene.

U ovoj disertaciji, mikroskopske morfološke odlike izolata, proučavane su i u kulturama starim sedam dana na MEA podlozi. Pripremom nativnih preparata i posmatranjem pod binokularom i svetlosnim mikroskopom, posebna pažnja posvećena je utvrđivanju sferičnih konidija, nazubljenih površina, što su svi ispitivani izolati i potvrdili. Kao što literatura nalaže, prečnik vezikula nije prelazio 30 μm kod svih ispitanih izolata. Kod pojedinih izolata *A. parasiticus* poreklom iz Srbije, došlo do obrazovanja i metula i fijalida 15%, što je u skladu sa procentualnom zastupljenošću metula po ugledu na literaturno opisane vrednosti za vrstu *A. parasiticus* (Kozakiewicz, 1995). Baquiao i sar. (2013) su zabeležili nazubljene, sferične konidije debelih zidova i prisustvo vezikula sa fijalidama, ali i sa fijalidama i metulama. Međutim, minimalne i maksimalne vrednosti izmerenih prečnika konidija odstupale su, u pojedinim slučajevima, u odnosu na ekstremne vrednosti prečnika konidija (3,41-6,86 μm). Prosečan prečnik konidija izolata *A. parasiticus* na MEA podlozi poreklom iz Srbije bio je u opsegu 4,95-5,79 μm (prosek 5,43 μm), po ugledu na literaturne podatke za pomenutu vrstu. Ove dimenzije konidija slične su prosečnim dimenzijama konidija (4,4 μm) ispitivanih izolata *A. parasiticus* u istraživanjima Nikolić i sar. (2018). Dovičićova i sar. (2012) su objavili rezultate svojih istraživanja, u kojima ukazuju da su stipe nazubljene, da su vezikule sferične, fertile na gornjoj polovini ili duž čitave površine, uglavnom samo sa fijalidama (9,5 μm), kao i na prisustvo nazubljenih konidija (4,9-5,2 μm). Nyongesa i sar. (2015) su zabeležili prisustvo i metula i fijalida, prečnik vezikula od 24-30 μm , a prečnik konidija 4-5,8 μm kod izolata *A.*

parasiticus. Podatak o veličini konidija vrsta roda *Aspergillus* je više informativan i ne smatra se osnovnim pokazateljem pri identifikaciji (Pitt i Hocking, 2009).

Pitt i Hocking (2009) su u opisu vrste *A. parasiticus* objavili da se sklerocije sporadično stvaraju, da su u ranom stadijumu razvoja bele boje i da vremenom postaju crne, kružnog oblika, kao i da su veličine 400-800 μm .

Zapažanja u okviru ove doktorske disertacije ukazuju da je većina obrazovanih sklerocija, kada su u pitanju minimalne i maksimalne vrednosti, bila izvan tog opsega (395,2-1550,6 μm). Na osnovu prosečnih dimenzija, najveće sklerocije formirao je izolat MRI 3990 (1168,6 μm), dok je najmanje izolat MRI 3937 (*A. flavus*) (517,9 μm), koji je korišćen kao pozitivna kontrola. Među ispitivanim izolatima najmanje sklerocije obrazovao je izolat MRI 4198 (549,3 μm). U ovoj doktorskoj disertaciji zabeleženo je da je većina izolata formirala sklerocije (73%).

Slično rezultatima do kojih smo došli u okviru ove doktorske, došli su i Giorni (2007), Giorni i sar. (2007) u Italiji koji su zabeležili da je čak 80% izolata *A. parasiticus* obrazovalo sklerocije na CZ podlozi, na temperaturi od 30°C. U Portugalu, Rodrigues i sar. (2011) su ustanovili da je 52,6% ispitanih izolata *A. parasiticus* obrazovalo sklerocije. Okoth i sar. (2012) su zabeležili formiranje sklerocija, veličine 935-1590 μm poreklom iz okruga Nandi, ali i začuđujuće sitne sklerocije (240-280 μm) u okrugu Makueni, u Keniji. Frisvad i sar. (2019) ustanovili su obrazovanje krupnijih sklerocija kod većine ispitanih izolata na CYA podlozi na 25°C i 37°C. Slični rezultati zabeleženi su i u okviru ove disertacije, samo što je su se sklerocije formirale na 30°C.

7.2 Ekološke i odgajivačke karakteristike *Aspergillus parasiticus*

Proučavan je porast kolonija *A. parasiticus* pod uticajem različitih svetlosnih režima i uočena je heterogenost među ispitivanim izolatima. Utvrđeno je da je većina izolata brže rasla pri svetlosnom režimu konstantnog mraka (24h). Jedino su izolati (MRI 3930, MRI 3977, MRI 3990, MRI 3994, MRI 4033, MRI 4252, MRI 4257, MRI 4258, MRI 4259, MRI 4260, MRI 4264, MRI 4272, MRI 4275 i CBS 100926) ispoljili brži prosečni porast pri svetlosnom režimu 12h svetlo/12h mrak.

Prilikom ispitivanja porasta micelije na PDA podlozi u mraku uočeno je da su se svi ispitivani izolati *A. parasiticus* brzo razvijali. Najintenzivniji prosečni porast micelije nakon sedam dana inkubacije ispoljio je izolat MRI 4045 (73,5 mm), dok je kod izolata MRI 4257 uočen najslabiji porast (49,9 mm). Pri svetlosnom režimu 12h dan/12h noć najsporije se razvijao izolat MRI 3812 (40,9 mm), a najbrže MRI 3990 (79,8 mm).

Prema navodima literature, porast kolonija vrste *A. parasiticus* ispoljen je u temperaturnom intervalu 12-42°C, s optimalnom temperaturom od 37°C (EFSA, 2012). Rezultati naših istraživanja ukazali su da je porast kolonija bio u opsegu 12-42°C, dok je optimalna temperatura za porast kolonija bila 30°C. Izolati vrste *A. parasiticus* zabeležili su najbolji dnevni razvoj na temperaturi od 37°C, što su zabeležili i Pitt i Hocking (2009).

U istraživanjima u okviru ove disertacije uočili smo pozitivnu korelaciju između porasta kolonije izolata *A. parasiticus* i povećanja temperatura gajenja, što je u skladu s navodima iz svetske literature (Pitt i Hocking, 2009).

Ispitivani izolati ispoljili su najveći prosečan dnevni porast (19,23 mm) na temperaturi od 37°C. Na temperaturi od 30°C, prosečan dnevni porast ispitivanih izolata bio je značajno niži nego na temperaturi od 37 °C i iznosio je 10,75 mm. Približno prosečnim dnevnim vrednostima zabeleženim na temperaturi od 30°C, kretao se i prosečan dnevni prosek na 25°C (8,91 mm). Međutim, najveći prosečan porast nakon sedmodnevne inkubacije izolata zabeležen je na temperaturi 30°C (90 mm), nešto niži na 37°C (80,75 mm) i značajno najmanji na 25°C (69,25 mm).

Ispitivani izolati *A. parasiticus* su rasli u temperaturnom opsegu od 12-42°C. Temperature inkubacije nisu uticale na izgled kolonije izolata *A. parasiticus*, odnosno izolati nisu ispoljili variranje u morfološkim odlikama.

Rodrigues i sar. (2011) su zabeležili dobar porast kolonija na 25°C na različitim podlogama, premašujući prečnik od 70 mm. Dovičićova i sar. (2012) su uočili dobar porast kolonija izolata na temperaturama od 25°C i 37°C. Ehrlich i sar. (2007) su zabeležili porast izolata *A. parasiticus* na temperaturi od 42°C, u Tajlandu. Frisvad i sar. (2019) ukazuju na brz porast kolonija izolata *A. parasiticus* na CYA i MEA podlogama, nakon sedmodnevne inkubacije (>50 mm). Zabeležen je i prečnik kolonija (>5 mm) na CYA podlozi na 42°C.

Na ispitivanim hranljivim podlogama, svi izolati su ostvarili porast kolonija. Najbrži porast zabeležen je na CYA podlozi. Pitt i Hocking (2009) su utvrdili da *A. parasiticus* najbrže raste na CYA podlozi, takođe.

Izolati vrste *A. parasiticus* najbrže su rasli na PDA podlozi, na kojoj je prosečan porast nakon sedam dana bio u intervalu od $41,25 \pm 13,86$ do $73,50 \pm 0,29$ mm. Nešto sporije razvijali su se na CYA podlozi ($36,5 \pm 1,32$ - $69,25 \pm 0,48$ mm). Prosečno najsporiji porast ispitivanih izolata uočen je na MEA podlozi, i kretao se od $40,63 \pm 0,47$ do $62,25 \pm 0,32$ mm.

Izolati *A. parasiticus* su ispoljili najbrži prosečni dnevni porast kolonije na PDA podlozi (9,86 mm), dok su na CYA (8,91 mm) i MEA (8,46 mm) podlozi sporije rasli. Prosečan dnevni porast izolata *A. parasiticus* na PDA podlozi iznosio je 6,88-11,41 mm, na CYA podlozi od 5,66-10,34 mm, na MEA podlozi od 7,28-9,19 mm.

7.3 Patogene odlike *Aspergillus parasiticus*

U Indiji su ispitivali proveru patogenosti vrste *A. terreus* Thom na listovima krompira metodom nanošenja inokuluma na listove ručnom prskalicom (Louis i sar., 2013). Prema ovim autorima, simptomi su se uglavnom razvijali duž glavnog lisnog nerva. Zaraženi listovi su požuteli u odmaklom stadijumu bolesti. Pomenutu metodu su primenili i Iranci koji su izolovali vrstu *A. niger* (Fr.) P. Karst s listova đumbira, i na istoj potvrdili patogenost (Pawar i sar, 2008). Pored opisanih metoda, u Americi je rađena provera patogenosti na listovima pasulja injektiranjem inokuluma u središnji lisni nerv (Leger i sar., 2000). Prema rezultatima koje su oni objavili simptomi su počeli da se pojavljuju 2 dana nakon inokulacije. Početni simptomi su se razvijali oko mesta povrede, a potom su se širili na zdravo tkivo. Petog dana po inokulaciji najagresivniji sojevi su sporusali na listovima. Slično ovim rezultatima, i u našem istraživanju, prvi simptomi javili posle drugog dana, kao i da je došlo do žućenja listova i obrazovanja micelije kod najagresivnijih sojeva.

Testovi patogenosti ispitivanih izolata ukazali su na statistički značajnu razliku u agresivnosti među izolatima, u poljskim uslovima. Izolati *A. parasiticus* ispoljili su značajnu varijabilnost, u oba primenjena testa patogenosti. Na inokulisanim klipovima kukuruza svi monosporijalni izolati prouzrokovali su karakterističan simptom maslinasto zelene praškaste

prevlake. Nakon izolacije sa inokulisanih klipova dobijeni su reizolati koji su po izgledu kolonije i morfološkim svojstvima u potpunosti odgovarali izvornim izolatima, čime je potvrđena patogenost svih ispitivanih izolata i ispunjeni Kohovi postulati. U okviru ove doktorske disertacije, u testovima patogenosti u poljskim i laboratorijskim uslovima, svi izolati vrste *A. parasiticus* bili su sposobni da ostvare infekciju.

Ispitivani izolati su na osnovu dobijenih rezultata pokazali različitu patogenost u laboratorijskim uslovima koja je merena ocenom pega (1-5). Najveći broj izolata (34,78%) ocenjen je ocenama 3 i 4. U nešto manjem procentu (28,26%) izolata ocenom 2, dok su samo dva izolata (4,35%) ocenjena ocenom 5.

Do sličnih rezultata istraživanja došli su i Nikolić i sar. (2016) koji su ispitivali patogenost izolata poreklom iz Srbije i utvrdili da se tokom 7 dana praćenja, kod svih izolata veličina pega povećavala sa dužinom inkubacije. Dva izolata (8%) su se izvojila kao najvirulentnijija posle 7 dana inokulacije i svrstana su u grupu koja je ocenjena ocenom 5. Oni predstavljaju izolate sa statistički značajno najvećom sposobnošću da prouzrokuju simptome na listu ječma, mogu se smatrati izolatima koji ispoljavaju najjaču agresivnost u laboratorijskim uslovima. Na kraju istraživanja, najveći broj izolata (40%) imao je ocenu 3, slede izolati okarakterisani ocenom 4 (36%), pa izolati ocenom 2 (20%).

Rezultati testova patogenosti u poljskim uslovima, ukazali su na varijabilnost u ispoljavanju agresivnosti ispitivanih izolata. U uslovima veštačke inokulacije, tokom prve godine ispitivanja (2016. godina), ispitivani izolati ispoljili su prosečnu ocenu intenziteta zaraze u opsegu 1,00-2,35 na hibridima FAO grupe 300. Na hibridima FAO grupe 500 ispitivani izolati ispoljili su prosečnu ocenu intenziteta infekcije u opsegu 1,00-2,50. Ispitivani izolati ispoljili su prosečnu ocenu intenziteta zaraze u opsegu 1,00-2,00 na hibridima FAO grupe 800. Prosečna ocena intenziteta infekcije u drugoj godini ispitivanja, 2017. godini, kretala se u rasponu 1,15-2,30 na hibridima FAO grupe 300. Na hibridima FAO grupe 500 ispitivani izolati ispoljili su prosečnu ocenu intenziteta infekcije u opsegu 1,40-2,25. Ispitivani izolati ispoljili su prosečnu ocenu intenziteta zaraze u opsegu 1,00-2,10 na hibridima FAO grupe 800.

Uporednim prikazom prosečnih ocena stepena infekcije tokom dve ispitivane godine (prosečna ocena za 2016. godinu: 1,46; prosečna ocena za 2017. godinu: 1,71) uočavamo da su izolati nisu ispoljili ujednačenu patogenost, ali i da je ona bila slabijeg intenziteta.

Rezultati do kojih smo došli u okviru ove doktorske disertacije slični su podacima o varijacijama u patogenosti koje je u okviru svoje doktorske disertacije zabeležila Giorni (2007). Rezultati ukazuju da je prosečna patogenost izolata bila 2,45 za istraživanja sprovedena 2005. godine, dok je 2006. godine agresivnost izolata bila znatno niža i iznosila je 1,30. Patogenost se kretala 1-5,1 (2005. godina), a 1-1,8 (2006. godina). Smatra se da su različiti vremenski uslovi tokom ispitivanih godina (2005, 2006) umnogome uticali na drastične razlike u ostvarivanju infekcije.

Bagi i sar. (2012) su, ispitujući patogenost izolata vrsta roda *Fusarium* i *Aspergillus*, uočili da je prosečna ocena intenziteta infekcije izolata *A. flavus* bila 1,81 na različitim hibridima kukuruza, ispitivanih u dvogodišnjem eksperimentu, što je ukazalo na njihovu slabu patogenost.

Szabo i sar. (2018) su, proučavajući novi koncept zaštite bezbednosti hrane od vrsta rodova *Fusarium* i *Aspergillus*, zabeležili da se u testovima otpornosti/resistentnosti hibrida kukuruza procenat intenziteta infekcije vrstom *A. flavus* kretao 0,3-1,52, s prosečnom vrednosti 0,78.

Malo je zabeleženih podataka o patogenosti vrste *A. parasiticus*. Pretpostavlja se da je to zbog značajnosti ove vrste na toksigenom nivou, pa se više pažnje poklanja identifikaciji toksikološkog profila.

7.4 Toksigena svojstva *Aspergillus parasiticus*

Utvrđena je varijabilnost toksigenih svojstava, odnosno razlike u kvantitativnoj i kvalitativnoj sintezi mikotoksina, među ispitivanim izolatima *A. parasiticus*. Sposobnost sinteze mikotoksina AFB1 i AFLA, kao i njihova kvantifikacija utvrđeni su pomoću ELISA metode. Rezultati ELISA testa u okviru disertacije ukazali su da su najmanje prosečne koncentracije aflatoksina B1 detektovane kod izolata MRI 4267 (3,68 µg/kg), MRI 4270 (4,62 µg/kg) i kod MRI 3819 (4,86 µg/kg). U najmanjem procentu detektovane su koncentracije AFB1 1-10 µg/kg

(13%). Sinteza AFB1 bila je, u najvećem procentu, u koncentracijama višim od 50 µg/kg, između ispitivanih izolata (54%). Najmanje prosečne koncentracije ukupnih aflatoksina detektovane su kod izolata MRI 4267 (5,57 µg/kg). 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%).

Nikolić i sar. (2017) su ispitujući, komparaciju metoda za utvrđivanje toksigenog potencijala vrsta *A. flavus* i *A. parasiticus* izolovanih sa kukuruza, odredili sadržaj ukupnih aflatoksina pomoću ELISA metode. Koncentracija aflatoksina bila je u opsegu 2,11-7,49 µg/kg.

U okviru ove disertacije urađena je i sposobnost sinteze (kvalitativna i kvantitativna analiza) pojedinačnih aflatoksina (B1, B2, G1 i G2) kod izolata *A. parasiticus* pomoću HPLC-FLD metode. Rezultati disertacije ukazuju da je bilo značajnih razlika u prosečnoj produkciji AFB1 i AFG1, u odnosu na AFB2 i AFG2. Prosečna koncentracija aflatoksina B1 iznosila je 4385,63 µg/kg, što izolate ove vrste svrstava u jake producente AFB1. Prosečna sinteza aflatoksina B2 bila je 559,47 µg/kg. Prosečna sinteza aflatoksina G1 bila je 3880,12 µg/kg, što ih svrstava u jake producente AFG1, dok je prosečna sinteza aflatoksina G2 iznosila 168,65 µg/kg. Uočeno je da je dominantan aflatoksin izolata *A. parasiticus* u Srbiji bio B1, dok je u značajno nižem procentu zabeležen aflatoksin G1 (84,78%, odnosno 15,22%). 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.

Tokom ispitivanja potencijala sinteze kod izolata *A. parasiticus*, Donner i sar. (2009) zabeležili su prosečne koncentracije AFB1 (90-2092 µg/kg), AFG1 (99-3450 µg/kg). Opseg koncentracija sintetisanih AFB1 i AFG1 u ovim istraživanjima bio je 90-4957 µg/kg, odnosno 0-6131 µg/kg. U Portugalu, Rodrigues (2011) je zabeležila da je većina ispitanih izolata (86%) pokazala tipičan toksikološki profil vrste *A. parasiticus*. Dakle, jaki producenti aflatoksina B1 i G1, i odsustvo proizvodnje CPA. Međutim, ispitivanja su pokazala i da 8 izolata (4%) nisu sintetisali aflatoksine G grupe, kao i 7% izolata koji su sintetisali aflatoksin G1 u višim koncentracijama, u odnosu na aflatoksin B1. Prilikom istraživanja potencijala produkcije ukupnih aflatoksina kod izolata *A. parasiticus* poreklom iz okruga Nandi u Keniji, Okoth i sar. (2012) detektovali su znatno veće opsege variranja koncentracija, od 9982 do 13662 µg/kg. Koncentracije pojedinačnih aflatoksina su se kretale u rasponu: AFB1 603-11077 µg/kg, AFB2

208-2876 µg/kg, AFG1 24-5982 µg/kg i AFG2 0-7798 µg/kg. Potencijal produkcije izolata koji vode poreklo iz okruga Makueni, ukazali su na značajno veće vrednosti sintetisanih ukupnih aflatoksina (22-55419 µg/kg), kao i pojedinačnih: AFB1 (22-15139 µg/kg), AFB2 (0-3141 µg/kg), AFG1 (0-28728 µg/kg), AFG2 (0-8411 µg/kg). Ovi autori nisu pronašli razlike u povećanoj sintezi AFG1, nego li AFB1.

Baquiao i sar. (2013) su ustanovili prosečne koncentracije sintetisanih pojedinačnih aflatoksina ovom vrstom na orašastim plodovima u Brazilu: AFB1 6172 µg/kg, AFB2 184 µg/kg, AFG1 16,776 µg/kg i AFG2 313 µg/kg. Okun i sar. (2015) su zabeležili znatno veće koncentracije ukupnih aflatoksina (1742-1670000 µg/kg) koje su sintetisali izolati *A. parasiticus*. Svi izolati su bili sposobni da proizvedu aflatoksine B i G grupe, izuzev dva koji su sintetisali samo aflatoksine B grupe.

Nikolić i sar. (2017) su ispitujući, komparaciju metoda za utvrđivanje toksigenog potencijala vrsta *A. flavus* i *A. parasiticus* izolovanih sa kukuruza, ustanovili i koncentracije pojedinačnih aflatoksina grupe G pomoću HPLC-FLD metode, koje su bile u opsegu 8,03-7421,58 µg/kg za AFG1 i 0-395,18 µg/kg za AFG2. Nikolić i sar. (2018) su ispitivali potencijal produkcije izolata *A. parasiticus* poreklom sa zrna pšenice iz različitih agroklimatskih uslova u Srbiji i utvrdili da su svi izolati imali sposobnost sinteze AFB1, u opsegu koncentracija 4859,15-7361,03 µg/kg, AFB2 od 142,81 do 1543,8 µg/kg, kao i AFG1 3085,11-7191,62 µg/kg. Jedan izolat nije sintetisao AFG2, dok su ostali bili u rasponu 86,92-181,76 µg/kg. Međutim, utvrdili su i dva izolata koji su sintetisali AFG1 u višim koncentracijama, u odnosu na AFB1.

Rodrigues (2011) je u okviru istraživanja svoje doktorske disertacije, zabeležila postojanje izolata koji nisu sintetisali aflatoksine. Vaamonde i sar. (2003), Barros i sar. (2006) su ukazali na izolate *A. parasiticus* koji se prirodno javljaju, ali nisu sposobni da sintetišu aflatoksine, i kreću se od 3 do 6%. Istraživanja sprovedena u okviru ove disertacije, ukazala su na veliki procenat (50%) ispitanih izolata, koji nisu sintetisali aflatoksine B1, B2, G1 i G2 ili jesu u veoma niskim koncentracijama, uz nemogućnost određivanja njihovih vrednosti. Postojanje atoksigenih izolata ove vrste može predstavljati značajan pomak za Srbiju, jer oni svoju primenu sve češće nalaze u biološkoj borbi virulentnih sojeva gljiva.

Prema navodima literature, vrsta *A. parasiticus* ne stvara ciklopiazoničnu kiselinu (Vaamonde i sar., 2003; Horn, 2003; Frisvad i sar., 2005a). Istraživanja u okviru ove doktorske

disertacije, ukazala su da ni kod jednog od ispitivanih izolata nije došlo do stvaranja ciklopiazonične kiseline. Do istih rezultata došli su Razzaghi-Abyaneh i sar. (2006), Giorni i sar. (2007), Giorni (2007), Rodrigues (2011), Baquiao i sar (2013), Wee (2015), Frisvad i sar. (2019). Klich i Pitt (1988) su utvrđujući razlike između vrsta *A. flavus* i *A. parasiticus*, došli do zaključka da ciklopiazonična kiselina nije ustanovljena ni kod jednog izolata vrste *A. parasiticus*. U Iranu su Razzaghi-Abyaneh i sar. (2006) ispitujući distribuciju vrsta roda *Aspergillus* sekcije Flavi u zemljištu u kojem se gaji kukuruz, zasnovanih na sintezi aflatoksina, ciklopiazonične kiseline i obrazovanju sklerocija, zaključili da nijedan od ispitanih izolata vrste *A. parasiticus* nije obrazovao ciklopiazoničnu kiselinu. Isto tako, Giorni i sar. (2007) su ispitujući vrste roda *Aspergillus* sekcije Flavi poreklom s kukuruza u severnoj Italiji ustanovili da 61% od svih izolata koji su bili uključeni u istraživanje stvaraju ciklopiazoničnu kiselinu. Među njima, nijedan izolat vrste *A. parasiticus* nije obrazovao ciklopiazoničnu kiselinu. Ispitujući polifazne pristupe u identifikaciji vrsta roda *Aspergillus*, Baquiao i sar. (2013) su utvrdili da kod izolata vrste *A. parasiticus* ne dolazi do obrazovanja ciklopiazonične kiseline, za razliku od izolata vrste *A. flavus*. Do zanimljivih zaključaka došla je Rodrigues (2011) u svojoj doktorskoj disertaciji. Ona je ustanovila četiri različita hemotipa kod izolata vrste *A. parasiticus*. Većina ispitanih izolata (81%) su pokazali tipičan profil vrste *A. parasiticus*, odnosno visoku sintezu aflatoksina B i G, i odsustvo obrazovanja ciklopiazonične kiseline. Pronašli su samo 4% izolata koji ne stvaraju aflatoksine G, i njihov hromatogram je pokazao slične pikove kao kod vrste *A. flavus*. Svega 7% izolata je ukazalo na atipične rezultate, odnosno veću sintezu aflatoksina G, nego li B, i oni su pokazali različite hromatograme produkcije ciklopiazonične kiseline.

7.5 Molekularne odlike *Aspergillus parasiticus*

Nakon završene PCR analize, umnožena DNK tretira se restrikcijom enzimima. Dobijeni fragmenti razdvajaju se elektroforezom. Princip metode ukazuje da u zavisnosti od prisustva odgovarajućih restrikcijonih mesta nastaju DNK fragmenti različitih dužina koji zajedno čine profil karakterističan za odgovarajuću vrstu. Poređenjem dva profila utvrđuje se pripadnost izolata istoj ili različitim vrstama. RFLP markeri daju realnu sliku polimorfizma i mogu biti upotrebljeni za detaljno određivanje razlika između bliskih vrsta gljiva.

Sekvence ITS rDNK regiona 46 izolata *Aspergillus* spp. analizirane su u cilju detekcije i identifikacije vrste *A. parasiticus*, primenom PCR-RFLP metode. Nedovoljna pouzdanost konvencionalnih metoda identifikacije vrsta roda *Aspergillus* sekcije Flavi, ukazala je na potrebu razvoja neospornih molekularnih metoda identifikacije.

U ovom istraživanju primenjena je PCR-RFLP metoda za molekularnu detekciju i identifikaciju vrste *A. parasiticus*. Virtuelnom RFLP analizom dobijenih sekvenci i sekvenci ITS rDNK regiona deponovanih u GenBank bazi podataka sa *Bgl*III restrikcionim enzimom utvrđeno je prisustvo jednog restrikcionog mesta kod *A. parasiticus*. Kao kontrolni izolat, korišćen je CBS 100926, kod koga je digestijom IGS-F/IGS-R PCR produkata *Bgl*III enzimom dobijen identičan elektroforetski profil. Izolat MRI 3937 (*A. flavus*), korišćen u cilju pozitivne kontrole, je nakon digestije pokazao prisustvo dva restrikciona mesta za ovaj enzim, i njegov elektroforetski profil se jasno razlikovao od profila *A. parasiticus*.

Objavljeno je više publikacija koje takođe koriste ovu metodu za dokazivanje vrsta roda *Aspergillus* (Khoury i sar., 2011, Ahmad i sar., 2014, Nikolić i sar., 2018., Nikolić i sar., 2018), kao i u knjizi „Mikotoksigene gljive – metode i protokoli“, poglavlje – vrste roda *Aspergillus* i mikotoksini koje sintetišu (Atoui i Khoury, 2017) koji je opisuju kao pouzdanu i dovoljnu za identifikaciju vrsta *A. flavus* i *A. parasiticus*. Khoury i sar. (2011) su molekularnim razdvajanjem izolata iz čistih kultura primenom PCR-RFLP metode, ukazali na postojanje dvaju vrsta, *A. flavus* i *A. parasiticus*. Ahmad i sar. (2014) su detektovali i razdvojili izolate vrsta *A. flavus* i *A. parasiticus* poreklom s kikirikija, primenom ove metode. Nikolić i sar. (2018) su radili na polifaznom pristupu identifikacije izolata poreklom sa zrna pšenice, i primenom PCR-RFLP metode ustanovili prisustvo vrste *A. parasiticus*. Somashekar i sar. (2004) su, takođe, primenom ove metode razdvojili ispitivane izolate poreklom s zrna kukuruza. Primenom restrikcionih enzima (*Hinc*II i *Pvu*II) ukazali su na postojanje dve vrste izolata, *A. flavus* i *A. parasiticus*.

Dobijeni rezultati primene PCR-RFLP za razlikovanje vrsta roda *Aspergillus* sekcije Flavi patogenih za kukuruz i pšenicu u Srbiji ukazuju da ova metoda ima mogućnost velikog značaja za brzu i pouzdanu rutinsku dijagnostiku. Primenljivost restrikcionih enzima ukazali su na mogućnost jasnog razdvajanja *A. parasiticus* od ostalih srodnih vrsta. Molekularna proučavanja u okviru sekcije Flavi na kukuruzu u Srbiji, započeta su u okviru ove doktorske

disertacije. Dobijene su sekvence izolata iz naše zemlje, po prvi put, što je omogućilo uslov za izbor novih enzima koji bi se mogli primeniti u budućim dijagnostičkim protokolima.

U Laboratoriji za fitopatologiju Instituta za kukuruz „Zemun Polje“ je, po prvi put u proizvodnim uslovima Srbije, otkriveno prisustvo vrste *A. parasiticus* na zrnju kukuruza i pšenice. Nema mnogo podataka o rasprostranjenosti i diverzitetu vrste. S obzirom na klimatske promene, moglo se i očekivati intenzivnije prisustvo pomenute vrste na zrnju kukuruza u Srbiji, ali i Evropi, što su rezultati ove disertacije i potvrdili.

8 ZAKLJUČAK

Na osnovu rezultata dobijenih istraživanjem u okviru ove doktorske disertacije mogu se izvesti sledeći zaključci:

- 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 tamnozeleno, gustu navlaku od micelije gljive, pamučastog izgleda.
- Svi izolati *A. parasiticus* obrazuju jednoćelijske, nazubljene konidije na MEA podlozi. Prečnik konidija ispitivanih izolata varirao je od 4,08 μ m (MRI 4197, MRI 4261, MRI 4266) do 6,86 μ m (MRI 3802, MRI 4254). Formiranje sklerocija zabeleženo je u miceliji kod 32 izolata, 14 dana posle zasejavanja na CZ podlozi.
- Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je statistički značajan uticaj interakcije ispitivanih izolata i svetlosnog režima ($p < 0.01$) na dnevni porast prečnika kolonija. U svetlosnom režimu 12h svetlo/12h tama na PDA podlozi trećeg, petog i sedmog dana po inokulaciji najbrži porast imao je izolat MRI 3994. Najmanji porast trećeg i petog dana imao je izolat MRI 4256, a sedmog dana izolat MRI 3812 (40,88 mm). U svetlosnom režimu 24h mrak trećeg i petog dana po inokulaciji najbrži porast imao je izolat MRI 4265, a nakon sedam dana kod izolata MRI 4045 (73,50 mm). Trećeg i petog dana po inokulaciji najmanji porast zabeležen je kod izolata MRI 4257, a nakon sedam dana kod izolata MRI 4256 (41,25 mm).
- Različite temperature uticale su statistički značajno na porast kolonija ispitivanih izolata *A. parasiticus* ($P < 0,01$). Najveći broj ispitivanih izolata ispoljio je najveći prosečan porast na temperaturi od 30°C, dok su pojedini izolati ispoljili nešto manji prosečan porast na temperaturama od 37°C i 25°C. Na temperaturama od 12°C i 43°C prestaje porast ispitivanih izolata.
- Svi ispitivani izolati *A. parasiticus* ispoljili su statistički značajnu razliku u brzini porasta kolonije na različitim hranljivim podlogama ($P < 0,01$). 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 41,25 \pm 13,86 do 73,50 \pm 0,29 mm. Sporiji prosečan porast uočen je

na CYA podlozi (36,5±1,32-69,25±0,48 mm). Najsporiji porast za sve ispitivane izolate je uočen je na MEA podlozi, i iznosio je od 40,63±0,47 do 62,25±0,32 mm.

- 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. Izolati su, u najmanjem procentu (13%), sintetisali AFB1 u koncentracijama 1-10 µg/kg, a u najvećem (54%) u koncentracijama višim od 50 µg/kg. Izolati su, u najvećem procentu, sintetisali AFLA u koncentracijama višim od 50 µg/kg. Samo kod izolata MRI 4267 detektovana je koncentracija AFLA u najmanjem procentu (1-10 µg/kg).
- 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 ($r=0,66^{**}$).
- Ispitivanje potencijala sinteze mikotoksina, na osnovu rezultata HPLC metode, pokazalo je da je najveće koncentracije AFB1 sintetisao izolat MRI 4194 (7361,03 µg/kg), dok je najmanje koncentracije MRI 3808 (14,24 µg/kg). Najveće koncentracije AFG1 stvorili su izolati MRI 4198 (7421,58 µg/kg), MRI 4195 (7191,62 µg/kg), MRI 4197 (7122,59 µg/kg). Najmanje koncentracije ovog mikotoksina sintetisali su izolati MRI 3808 (3,27 µg/kg). 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.
- Ispitivani izolati *A. parasiticus* koji su sintetisali aflatoksine (50%) su u najvećem procentu sintetisali AFB1 (84,78%), dok je procenat izolata koji su sintetisali AFG1 bila znatno manja (15,22%). Međutim, 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 ($r=0,63^{**}$).

- Veliki procenat (50%) isipitanih izolata nije sintetisalo aflatoksine B1, B2, G1 i G2 ili jeste u veoma niskim koncentracijama uz nemogućnost određivanja njihovih vrednosti.
- 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 na osnovu morfoloških, ekoloških, odgajivačkih i toksigenih karakteristika 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.
- Obzirom da su utvrđeni izolati *A. parasiticus* koji ne sintetišu aflatoksine, treba razmotriti mogućnost proučavanja atoksigenih izolata, i njihovu primenu u svojstvu bioloških agenasa u zaštiti bilja
- 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.

9 LITERATURA

1. Abbas, H. K., Weaver, M. A., Zablutowics, R. M., Horn, B. W., Shier, W. T. (2005): Relationships between aflatoxin production, sclerotia formation and source among Mississippi Delta *Aspergillus* isolates. *European Journal of Plant Pathology*, 112, 283-287.
2. Abbas, H. K., Wilkinson, J. R., Zablutowics, R. M., Accinelli, C., Abel, C. A., Bruns, H. A., Weaver, M. (2009): Ecology of *Aspergillus flavus*, regulation of aflatoxin production, and management strategies to reduce aflatoxin contamination of corn. *Toxin Reviews*, 28: 142-153.
3. Ahmad S., Khan Z., Hagen F., Meis J. F. (2014): Occurrence of triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* with TR34/L98H mutations in outdoor and hospital environment in Kuwait. *Environmental Research*, 133: 20–26.
4. Aja-Nwachukwu, J., Emejuiwe, S.O. (1994): Aflatoxin -producing fungi associated with Nigerian maize. *Environmental Toxicology and Water Quality banner*, 9: 17–23.
5. Akande, K., Abubakar, M., Adegbola, T., Bogoro, S. (2006): Nutritional and Health Implications of mycotoxins in Animal Feeds: A Review. *Pakistan Journal of Nutrition*, 5: 398–403. 10.3923/pjn.2006.398.403.
6. Alberts, J.F., Engelbrecht, Y., Steyn, P.S., Holzapfel, W.H., van Zyl, W.H. (2006): Biological degradation of aflatoxin B1 by *Rhodococcus erythropolis* cultures. *International Journal of Food Microbiology*, 109: 121–126.
7. Almaši, R., Bača, F., Bošnjaković, A., Čamprag, D., Drinić, G., Ivanović, D., Lević, J., Marić, A., Marković, M., Penčić, V., Sekulić, R., Stefanović, L., Šinžar, B., Videnović, Ž. (2002): Štetočine kukuruza i njihovo suzbijanje. U: Bolesti, štetočine i korovi kukuruza i njihovo suzbijanje. Institut za kukuruz, Zemun Polje, str. 128.
8. Amaike, S., Keller, N. P. (2011): *Aspergillus flavus*. *Annual review of phytopathology*, 49: 107-133.
9. Anklam, E., Stroka, J., Boenke, A. (2002): Acceptance of analytical methods for implementation of EU legislation with a focus on mycotoxins. *Food Control*, 13, 173–183.

10. AOAC Official Method No. 995.15. 2000. Official methods of analysis of the association AOAC International. 17th ed. Horwitz W, editor. Gaithersburg (MD): AOAC International. Chapter 49; p. 44–46.
11. Arrus, K., Blank, G., Clear, R., Holley, R.A., Abramson, D. (2005): Microbiological and aflatoxin evaluation of Brazil nut pods and the effects of unit processing operations. *Journal of Food Protection*, 68: 1060–1065.
12. Assante, G., Camarda, L., Locci, R., Merlini, L., Nasini, G., Papadopoulos, E. (1981): Isolation and structure of red pigments from *Aspergillus flavus* and related species, grown on a differential medium. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 29: 785–787.
13. Atayde, and B. Correa. 2013. Polyphasic approach to the identification
14. Atayde, and B. Correa. 2013. Polyphasic approach to the identification
15. Atehnkeng, J., Ojiambo, P. S., Donner, M., Ikotun, T., Sikora, R. A., Cotty, P. J., Bandyopadhyay, R. (2008): Distribution and toxigenicity of *Aspergillus* species isolated from maize kernels from three agro-ecological zones in Nigeria. *International Journal of Food Microbiology*, 122 (1-2), 74–84.
16. Atoui, A., Khoury, A. (2017): PCR-RFLP for *Aspergillus* Species In: Antonio Moretti, Antonia Susca (Eds.), *Mycotoxigenic Fungi. Methods in Molecular Biology*, 1542: 313-320.
17. Atoui, A., Mathieu, F., Lebrihi, A. (2007): Targeting a polyketide synthase gene for *Aspergillus carbonarius* quantification and ochratoxin A assessment in grapes using real-time PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 115: 313–318.
18. Atroshi, F., Rizzo, A., Wastermack, T., Ali-Vehmas, T. (2002): Antioxidant nutrients and mycotoxins. *Toxicology*, 180: 151-167.
19. Azzis-Baumgartner, E., Lindblade, K., Gieseke, K., Rogers, H., S., Kieszak, S., Njapau, H., Schleicher, R., McCoy, L., Misore, A., DeCock, K., Rubin, C., Slutsker, L. (2005): The Aflatoxin Investigative Group Case control study of an acute aflatoxicosis outbreak, Kenya, 2004. *Environmental Health Perspectives*, 113: 1779-1783.
20. Bagi, F., Stojšin, V., Budakov, D., Mesterhazy, A., Varga, J., Vučković, J., Toth, B. (2012): Pathogenicity of *Fusarium* spp. and *Aspergillus flavus* on maize ears.

International Symposium: Current Trends in Plant Protection, Belgrade, 25-28 September, 282–286. ISBN: 978-86-910951-1-6.

21. Bankole, S. A., Adebajo, A. (2003): Mycotoxins in food in West Africa: current situation and possibilities of controlling it. *African Journal of Biotechnology*, 2:254-263.

22. Baquião, A. C., de Oliveira, M. M. M., Reis, T. A., Zorzete, P., Atayde, P. P., Correa. B. (2013): Monitoring and Determination of Fungi and Mycotoxins in Stored Brazil Nuts. *Journal of Food Protection*, 76: 1414-1420.

23. Baquião, A.C., M.M.M. de Oliveira, T.A. Reis, P. Zorzete, D.D.

24. Baquião, A.C., M.M.M. de Oliveira, T.A. Reis, P. Zorzete, D.D.

25. Barros, G., Torres, A., Palacio, G, Chulze, S. (2003): *Aspergillus* species from section Flavi isolated from soil at planting and harvest time in peanut-growing regions in Argentina. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83: 1303–1307.

26. Barros, G., Torres A., Chulze S. (2005): *Aspergillus flavus* population isolated from soil of Argentina's peanut growing region. Sclerotia production and toxigenic profile. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 85(14): 2349-2353.

27. Barros, G., Chiotta, M.L., Torres, A. and Chulze, S. (2006): Genetic diversity in *Aspergillus parasiticus* population from the peanut agroecosystem in Argentina. *Letters of Applied Microbiology*, 42: 560-566.

28. Barug, D., van Egmond, H., López Garzía, R., van Osenbruggen, T., Visconti, A. (2004): Meeting the Mycotoxin Menace. Wageningen Academic Publishers, The Netherlands.

29. Batista, P. P., Santos, J. F., Oliveira, N. T., Pires, A. P. D., Motta, C. M. S., Luna-Alves Lima, E. A. (2008): Genetic characterization of Brazilian strains of *Aspergillus flavus* using DNA markers. *Genetics and Molecular Resistance*, 7 (3): 706–717.

30. Bennett, J. W., Leong, P. M., Kruger, S., Keyes, D. (1986): Sclerotial and low aflatoxigenic morphological variants from haploid and diploid *Aspergillus parasiticus*. *Experientia*, 42 (7): 841-851.

31. Bennett, J. W., Klich, M. (2003): Mycotoxins. *Clinical Microbiological Review*, 16: 497-516.

32. Bennett, J. W, Kale, S, Yu, J. (2007): Aflatoxins: Background, Toxicology and Molecular Biology In: Simjee S. Infectious Disease: Foodborne Diseases. Humana Press Inc, Totowa NJ; 355-373.
33. Berbee, M. L., Yoshimura, A., Sugiyama, J. (1995): Is *Penicillium* monophyletic – an evaluation of phylogeny in the family *Trichocomaceae* from 18S, 5.8S and ITS ribosomal DNA-sequence data. *Mycologia*, 87: 210–222.
34. Bhatnagar, D., Cary, J. W., Ehrlich, K. C., Yu, J., Cleveland, T. E. (2006): Understanding the genetics of regulation of aflatoxin production and *Aspergillus flavus* development. *Mycopathologia*, 162: 155-166.
35. Bilgrami, K. S, Sinha, S. P., Jeswal, P. (1988): Loss of toxigenicity of *Aspergillus flavus* strains during subculturing—a genetic interpretation. *Current Science*, 57: 551-552.
36. Blomquist, G., Anderson, B., Anderson, K., Brondz, I. (1992): Analysis of fatty acids. A new method for characterization of moulds. *Journal of Microbiological Methods*, 16: 59-68.
37. Burgess, L. W., Summerell, B. A., Bullock, S., Gott, K. P., Backhouse, D. (1994): *Laboratory Manual for Fusarium Research*, 3rd ed. University of Sydney/Royal Botanic Gardens, Sydney, Australia.
38. Cardwell, K. F., Henry, S. H. (2004): Risk of exposure to and mitigation of effects of aflatoxin on human health: a west African example. *Journal of Toxicology Toxin Reviews*, 23: 217-247.
39. Cary, J. W., Calvo, A. M. (2008): Regulation of *Aspergillus* mycotoxin biosynthesis. *Toxin Reviews*, 27: 347-370.
40. Chandelier, A., Michelt, J. Z., Tangni, E. K., Baert, K., Moons, E., Vinkx, C. (2004): Mycotoxins survey in Belgium and toxic *Fusarium* in Belgian wheat. In A. Logrieco & A. Visconti (Eds.), *An Overview on Toxigenic Fungi and Mycotoxins in Europe*. (pp. 11-32). Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publishers.
41. Chang, P. K, Horn, B. W, Dorner, J. W. (2005): Sequence breakpoints in the aflatoxin biosynthesis gene cluster and flanking regions in non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* isolates. *Fungal Genetics and Biology* 42: 914-923.

42. Chang, P. K., Bhatnagar, D., Cleveland, T. E., Bennett, J. W. (1995): Sequence variability in homologs of the aflatoxin pathway gene aflR distinguishes species in *Aspergillus* section Flavi. *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (1): 40-43.
43. Charmley L. L., Prelusky D. B. (1995): Decontamination of *Fusarium* mycotoxins. *Applied and Environmental Microbiology*, 1: 421–435.
44. Cotty, P. J. (1997): Aflatoxin-producing potential of communities of *Aspergillus* section Flavi from cotton producing areas in the United States. *Mycological Research*, 101: 698-704.
45. Cotty, P. J., Cardwell, K. F. (1999): Divergence of West African and North American communities of *Aspergillus* section Flavi. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 2264-2266.
46. Coulibaly, O., Hell, K., Bandyopadhyay, R., Hounkponou, S., Leslie, J. F. (2008): In: *Mycotoxins: Detection Methods, Management, Public Health and Agricultural Trade*, J. F. Leslie, R. Bandyopadhyay, A. Visconti (Eds.), Economic impact of aflatoxin contamination in Sub-Saharan Africa (pp. 67-76). Cromwell Press, United Kingdom.
47. Council for Agricultural Science and Technology, CAST (2003): *Mycotoxins: risks in plant, animal, and human systems*. Report No 139. Ames, IA: Council for Agricultural Science and Technology.
48. Curtui, V., Seidler, C., Schneider, E., Usleber, E. (2004): Mycotoxins in food in Germany. In A. Logrieco & A. Visconti (Eds.), *An Overview on Toxigenic Fungi and Mycotoxins in Europe*. (pp. 109-121). Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publishers.
49. Dalcero, A. M., Rosa, C. A. R. (2007): Potential groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B1, sterigmatocystin and 3-o-methylsterigmatocystin *Aspergillus rabelli* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 28: 442-453.
50. Davis, N. D., Iver, S. K. , Diener, U. L. (1987): Improved method of screening for aflatoxin with a Coconut Agar Medium. *Applied and Environmental Microbiology*, 53: 1593.

51. Dereszynski, D. M., Center, S. A., Randolph, J. F., Brooks, M. B., Hadden, A. G., Palyada, K. S., McDonough, S. P., Messick, J., Stokol, T., Bischoff, K. L., Gluckman, S., Sanders, S. Y. (2008): Clinical and clinicopathologic features of dogs that consumed foodborne hepatotoxic aflatoxins: 72 cases (2005-2006). *Journal of American Veterinary Medical Association*, 232: 1329-1337.
52. Dhanasekaran, D., Shanmugapriya, S., Thajuddin, N., Panneerselvam, A. (2011): In *Aflatoxins – Biochemistry and Molecular Biology*. R. G. Guevara-Gonzalez (Ed.), *Aflatoxins and Aflatoxicosis in Human and Animals* (pp. 221-254), In Tech Europe, Rijeka, Croatia.
53. Diener, U. L., Cole, R. J., Sanders, T. H., Payne, G. A., Lee, L. S., Klich, M. A. (1987): Epidemiology of aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. *Annual Review of Phytopathology*, 25: 249-270.
54. Donner, M., Atehnkeng, J., Sikora, R. A., Bandyopadhyay, R., Cotty, P. J. (2009): Distribution of *Aspergillus* section Flavi in soils of maize fields in three agroecological zones of Nigeria. *Soil Biology and Biochemistry*, 41: 37–44.
55. Doster, M. A., Michailides, T. J., Morgan, D. P. (1996): *Aspergillus* species and mycotoxins in figs from California orchards. *Plant Disease*, 80: 484–489.
56. Dovičičová, M., Tančinová, D., Labuda, R., Sulyok, M. (2012): *Aspergillus parasiticus* from Wheat grain of Slovak origin and its toxigenic potency. *Czech Journal of Food Science*, 30(5): 483–487.
57. Dutton, M. F., Westlake, M. (1985): Occurrence of mycotoxins on cereals and animal feedsuffs in Natal, South Africa. *Journal of AOAC International: Ingenta Connect Publication*, 68: 839-842.
58. Eaton, D. L., Groopman, J. D. (1994): *The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary, and agricultural significance*. San Diego: Academic Press. 544.
59. Ehrlich, K. C., Montalbano, B. G., Cotty, P. J. (2007): Analysis of single nucleotide polymorphisms in three genes shows evidence for genetic isolation of certain *Aspergillus flavus* vegetative compatibility groups. *FEMS Microbiology Letters*, 268: 231–236.
60. El Khoury, A., Atoui, A., Rizk, T., Kallassy, M., Lebrihi, A. (2011): Differentiation between *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* from pure culture

and aflatoxin-contaminated grapes using PCR-RFLP analysis of aflR-aflJ intergenic spacer. *Journal of food science*, 76 (4): 247-253.

61. El-Aasar, S. A. (2006): Cultural conditions studies on kojic acid production by *Aspergillus parasiticus*. *International Journal of Agriculture and Biology*, 8: 468–473.

62. El-Tabiy, A. A. (2006): Mycological study on some processed meat products exposed for sale in markets. *Assiut Veterinary Medical Journal*, 52 (110): 121–131.

63. European Commission (2006): Commission Regulation 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards *Fusarium* toxins in maize and maize products. *Official Journal of the European Union*, L 364: 5-18.

64. European Food Safety Authority, EFSA (2007): Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to the potential increase of consumer health risk by a possible increase of the existing maximum levels for aflatoxins in almonds, hazelnuts and pistachios and derived products. *The EFSA Journal*, 446: 1–127.

65. European Food Safety Authority, EFSA (2012): Modelling, predicting and mapping the emergence of aflatoxins in cereals in the EU due to climate change.

66. Faostat (2004): [<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>].

67. Faostat (2014): [<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>].

68. Faostat (2016): [<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>].

69. Faostat (2018): [<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>].

70. Farombi, E. O. (2006): Aflatoxin contamination of foods in developing countries: implications for hepatocellular carcinoma and chemopreventive strategies. *African Journal of Biotechnology*, 5: 1–14.

71. Farrell, A. E., Plevin, R. J., Turner, B. T., Jones, A. D., O’Hare, M., Kammen, D. M. (2006): Ethanol can contribute to energy and environmental goals. *Science*, 311: 506-508.

72. Food and Drug Administration, FDA (2011): Guidance for Industry: Action Levels for Poisonous or Deleterious Substances in Human Food and Animal Feed.

73. Forgacs, J., Carll, W. T. (1962): Mycotoxicoses. *Advances in animal and veterinary sciences*, 7: 273-383.
74. Fraga, M. E., Curvello, F. A., Gatti, M. J., Cavaglieri, L. R., Dalcero, A. M., Rosa, C.A.R. (2007): Potential aflatoxin and ochratoxin A production by *Aspergillus* species in poultry feed processing. *Veterinary Research and Communications*, 31: 343–353.
75. Frisvad, J.C., Skouboe, P., Samson, R.A. (2005): Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B₁, sterigmatocystin and 3-O-methylsterigmatocystin *Aspergillus rambellii* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 28: 442-453.
76. Frisvad, J. C., Nielsen, K. F., Samson, R. A. (2006): Recommendations concerning the chronic problem of misidentification of mycotoxigenic fungi associated with foods and feeds. In *Advances in Food Mycology – Advances in Experimental Medicine and Biology*. Vol. 571, eds A.D. Hocking, J.I. Pitt, R.A. Samson and U. Thrane. Berlin: Springer-Verlag pp. 33–46.
77. Frisvad, J. C., Hubka, V., Ezekiel, C. N., Hong, S. B., Nováková, A., Chen, A. J., Arzanlou, M., Larsen, T. O., Sklenar, F., Mahakarnchanakul, W., Samson, R. A., Houburken, J. (2019): Taxonomy of *Aspergillus* section Flavi and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. *Studies in Mycology*, 93: 1–63. <http://doi.org/10.1016/j.simyco.2018.06.001>
78. Gams, W., Christensen, M., Onions, A. H. (1985): Infrageneric taxa of *Aspergillus*. In: Samson R.A., Pitt J.I., editors. *Advances in Penicillium and Aspergillus Systematics*. Plenum Press; New York: 1985. pp. 55–62.
79. Gao, J., Liu, Z., Yu, J. (2007): Identification of *Aspergillus* section Flavi in maize in northeastern China. *Mycopathologia*, 164: 91–95.
80. Garon, D., Richard, E., Sage, L., Bouchart, V., Pottier, D., Lebailly, P. (2006): Mycoflora and multimycotoxin detection in corn silage: experimental study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 3479–3484.
81. Gatti, M. J., Fraga, M. E., Magnoli, C., Dalcero, A. M., da Rocha Rosa, C.A. (2003): Mycological survey for potential aflatoxin and ochratoxin producers and

their toxicological properties in harvested Brazilian black pepper. *Food Additives & Contaminants*, 20: 1120–1126.

82. Gebrehiwet, Y., Ngqangweni, S., Kirsten, J., F. (2007): Quantifying the trade effect of sanitary and phytosanitary regulations of OECD countries on South African foods exports. *Agrekon*, 46: 23-38.

83. Geiser, D. M., Klich, M. A., Frisvad, J. C., Peterson, S. W., Varga, J., Samson, R. A. (2007): The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, 59: 1–10.

84. Geiser, D. M., Samson, R. A., Varga, J. A. (2008): Review of molecular phylogenetics in *Aspergillus* and prospects for a robust genus-wide phylogeny. In: Varga K., Samson R.A., editors. *Aspergillus in the genomic era*. Academic Publishers; Wageningen: 2008. pp. 17–32.

85. Gibson, A. M., Baranyi, J., Pitt, J. I., Eyles, M. J., Roberts, T. A. (1994): Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Aspergillus flavus* and related species. *International Journal of Food Microbiology*, 23: 419–431.

86. Giorni, P. (2007): Impact on Environmental and Plant actors on *Aspergillus* section Flavi isolated from maize in Italy, Ph.D. Thesis. Faculty of Medicine and Biosciences, Cranfield Univesity, Italy.

87. Giorni, P., Magan, N., Pietri, A., Bertuzzi, T., Battilani, P. (2007): Studies on *Aspergillus* section Flavi isolated from maize in northern Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 113: 330–338.

88. Giovati, L., Magliani, W., Ciociola, T., Santinoli, C., Conti, S., Polonelli, L. (2015): AFM In Milk: Physical, biological, and prophylactic methods to mitigate contamination. *Toxins*, 7: 4330–4349.

89. Glamoclija, Đ. (2012): Posebno ratarstvo, žita i zrnene mahunarke. Poljoprivredni fakultet, Beograd, str. 19-37.

90. Godet, M., Munaut, F. (2010): Molecular strategy for identification in *Aspergillus* section *Flavi*. *FEMS Microbiology Letters*, 304: 157-168. Gonçalez, E., Felicio, J. D., Pinto, M. M.

91. Gonçalves, E., Felicio, J. D., Pinto, M. M. (2001): Biflavonoids inhibit the production of aflatoxin by *Aspergillus flavus*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 34: 1453-1456.
92. Gong, Y., Hounsa, A., Egal, S., Turner, P. C., Sutcliffe, A. E., Hall, A. J., Cardwell, K., Wild, C. P. (2004): Postweaning exposure to aflatoxin results in impaired child growth: a longitudinal study in Benin, West Africa. Environmental Health Perspectives, 112: 1334-1338.
93. Gosal, S. S., Wani, S. H., Kang, M. S. (2009): Biotechnology and Drought Tolerance. Journal of Crop Improvement, 23: 19-54.
94. Goto, T, Wicklow, D. T, Ito, Y. (1996): Aflatoxin and cyclopiazonic acid production by a sclerotium-producing *Aspergillus tamaris* strain. Applied Environmental Microbiology, 62: 4036–4038.
95. Guevara-González, R. G., Chapa-Oliver, A. M., Mejía-Teniente, L., Torres Pacheco, I., Vazquez-Cruz, M. A., Cervantes-Landaverde, J. J., Preciado-Ortiz, R. E., Moreno-Martinez, E. (2011): In: Aflatoxins–Biochemistry and Molecular Biology, Genetic resistance to drought in maize and its relationship in aflatoxins production (pp. 151-160). In TechEurope, Rijeka, Croatia.
96. Guzman-de-Pena, D., Ruiz-Herrera, J. (1997): Relationship between aflatoxin biosynthesis and sporulation in *Aspergillus parasiticus*. Fungal Genetics and Biology, 21: 198–205.
97. Hartley, R. D., Nesbitt, B. F., O'Kelly, J. (1963): Toxic metabolites of *Aspergillus flavus*. Nature, 198: 1056-1058.
98. Hong, S. B., Go, S. J., Shin, H. D., Frisvad, J. C., Samson, R. A. (2005): Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. Mycologia, 97: 1316–1329.
99. Horn, B. W., Greene, R. L., Sobolev, V. S., Dorner, J. W., Powell, J. H., Layton, R. C. (1996): Association of morphology and mycotoxin production with vegetative compatibility groups in *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, and *A. tamaris*. Mycologia, 88: 574-587.

100. Horn, B. W., Dorner, J. W. (1998): Soil populations of *Aspergillus* species from section *Flavi* along a transect through peanut-growing regions of the United States. *Mycologia*, 90: 767–776.
101. Horn, B. W., Dorner, J. W. (1999): Regional differences in production of aflatoxin B1 and cyclopiazonic acid by soil isolates of *Aspergillus flavus* along a transect within the United States. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 1444 -1449.
102. Horn, B. (2003): Ecology and population biology of aflatoxigenic fungi in soil. *Journal of Toxicology and Toxin Review*, 22: 351-379.
103. Horn, B. W. (2005): Ecology and population biology of aflatoxigenic fungi in soil. In: *Aflatoxin and Food safety*. Edited by Abbas H K CRC Press, Boca Raton, Fla. Pp 95-116.
104. Horn, B. W. (2007): Biodiversity of *Aspergillus* section *Flavi* in the United States: a review. *Food Additives & Contaminants*, 24: 1088–1101.
105. Horn, B. W., Ramirez-Prado, J. H., Carbone, I. (2009): The sexual state of *Aspergillus parasiticus*. *Mycologia*, 101: 275–280.
106. Houbraken, J., Samson, R. A. (2011): Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of *Trichocomaceae* into three families. *Studies in Mycology*, 70: 1–51.
107. Houbraken, J., Vries, R. P., Samson R. A. (2014): Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Advances in Applied Microbiology*, 86: 199–249.
108. Hubka, V., Nováková, A., Kolarík, A. (2014): Revision of *Aspergillus* section *Flavipedes*: seven new species and proposal of section *Jani* sect. nov. *Mycologia*, 107(1): 169-208.
109. Hussein, H. S., Brasel, J. M. (2001): Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, 167: 101-134.
110. Iamanaka, B. T., Menezes, H. C., Vicente, E., Leite, R. S. F., Taniwaki, M. H. (2007): Aflatoxigenic fungi and Aflatoxins occurrence in sultanas and dried figs commercialized in Brazil. *Food Control*, 18: 454–457.
111. International Commission on Microbiological Specifications for Foods, ICMSF (1996): Toxigenic fungi: *Aspergillus*. In *Microorganisms in Foods*. 5.

Characteristics of Food Pathogens. London: Blackie Academic and Professional. pp. 347–381.

112. Imathiu, M. S., Ray, V. R., Back, M., Hare, C. M., Edwards, G. S. (2009): *Fusarium langsethiae* pathogenicity and aggressiveness towards oats and wheat in wounded and unwounded in vitro detached leaf assays. *European Journal of Plant Pathology*, 124: 117–126.

113. International Agency for Research on Cancer, IARC (1993): Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic amines and mycotoxins. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, No. 56. IARC, Lyon, France.

114. International Agency for Research on Cancer, IARC (2002): Aflatoxins in traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. IARC monograph on the evaluation of carcinogenic risks to humans. IARC, Lyon 82: 171-300.

115. International Agency for Research on Cancer, IARC (2012): IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, 1-104.

116. Ito, Y., Peterson, S. W., Wicklow, D. T., Goto, T. (2001): *Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section Flavi. *Mycological Research*, 105: 233–239.

117. Ittu, M., Trif, A., Belc, N. (2004): Toxigenic fungi and mycotoxins in Romania: challenges and approaches. In A. Logrieco & A. Visconti (Eds.), *An Overview of Toxigenic Fungi and Mycotoxins in Europe*. (pp. 185-194). Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publishers.

118. Jaime-Garcia, R., P. J. Cotty. (2006): *Aspergillus flavus* in soils and corn cobs in south Texas: implications for management of aflatoxins in corn-cotton rotations. *Plant Disease*, 88: 1366–1371.

119. Joffe, A. Z. (1969): The mycoflora of fresh and stored groundnut kernels in Israel. *Mycopathologia et Mycologia Applicata*, 39: 255–264.

120. Kabak, B., Dobson, A. D., Var, I. (2006): Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. *Critical Review of Food Science and Nutrition*, 46: 593-619.

121. Kale, S. P, Cary, J. W, Baker, C., Walker, D., Bhatnagar, D., Bennett, J. W. (2003): Genetic analysis of morphological variants of *Aspergillus parasiticus* deficient in secondary metabolite production. *Mycological Research*, 107: 831–840.
122. Khoury, A., Atoni, A., Rizk, T., Lteif, R., Kallasy, M., Mebrihi, A. (2011): Differentiation between *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* from pure culture and aflatoxin and aflatoxin contaminated grapes using PCR-RFLP analysis of aflR-aflJ intergenic spacer. *Journal of Food Science*, 76(4): 247-253.
123. Klich, M. A., Pitt, J. I. (1985): The theory and practice of distinguishing species of the *Aspergillus flavus* group. In *Advances in Penicillium and Aspergillus Systematics*, eds. R. A. Samson and J. I. Pitt. New York: Plenum Press. pp. 211–220.
124. Klich, M. A., Mullaney, E. J. (1987): DNA restriction enzyme fragment polymorphism as a tool for rapid differentiation of *Aspergillus flavus* from *Aspergillus oryzae*, *Experimental Mycology*, 11: 170-175.
125. Klich, M. A., Pitt, J. I. (1988): Differentiation of *Aspergillus flavus* from *A. parasiticus* and other closely related species. *Transactions of the British Mycological Society*, 91: 99-108.
126. Klich, M. (2002a): *Identification Of Common Aspergillus Species*. Utrecht, The Netherlands. Centraalbureau voor Schimmelcultures.
127. Klich, M. A. (2002b): Biogeography of *Aspergillus* species in soil and litter. *Mycologia*, 94: 21–27. Lyon, France.
128. Klich, M. A., Cary, J. W., Beltz, S. B., Bennett, C. A. (2003): Phylogenetic and morphological analysis of *Aspergillus ochraceoroseus*. *Mycologia*, 95: 1252–1260.
129. Klich, M. A. (2007): Environmental and developmental factors influencing aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Mycoscience*, 48: 71-80.
130. Kozakiewicz, Z. (1989): *Aspergillus* species on stored products. *Mycology Papers*, 161: 1–188.
131. Kozakiewicz, Z. (1995): In: *Fungal Identification Techniques*, Paper presented at the Proceedings from the Workshop in Barcelona, Spain, 5 to 8 April, EUR 16510, 183.

132. Kumeda, Y., Asao, T. (1996): Single-strand conformation polymorphism analysis of PCR amplified ribosomal DNA internal transcribed spacers to differentiate species of *Aspergillus* section *Flavi*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 2947-2952.
133. Kumeda, Y., Asao, T. (2001): Heteroduplex panel analysis, a novel method for genetic identification of *Aspergillus* section *Flavi* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 4084-4090.
134. Kurtzman, C. P., Smiley, M. J., Robnett, C. J., Wicklow, D. T. (1986): DNA relatedness among wild and domesticated species in the *Aspergillus flavus* group. *Mycologia*, 78: 955–959.
135. Kurtzman, C. P., Horn, B. W., Hesseltine, C. W. (1987): *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarii*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 53 (3): 147-158.
136. Leger, R., Screen, S., Shams-Pirzadeh, B. (2000): Lack of Host Specialization in *Aspergillus flavus*, *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (1): 320-324.
137. Lević, J., Gošić-Dondo, S., Ivanović, D., Stanković, S., Krnjaja, V., Bočarov Stančić, A., Stepanić, A. (2013): An outbreak of *Aspergillus* species in response to environmental conditions in Serbia. *Pesticides and Phytomedicine*, 28 (3): 167-179.
138. Li, S. Z., Marquardt, R. R., Abramson, D. (2000): Immunochemical detection of molds: a review. *Journal of Food Protection*, 63: 281–291.
139. Lin, L., Zhang, J., Wang, P., Wang, Y., Chen, J. (1998): Thin-layer chromatography of mycotoxins and comparison with other chromatographic methods. *Journal of Chromatography A*, 815: 3-20.
140. Lisker, N., Michaeli, R., Frank, Z.R. (1993): Mycotoxigenic potential of *Aspergillus flavus* strains isolated from groundnuts growing in Israel. *Mycopathologia*, 122: 177-183.
141. Logrieco, A., Moretti A., Ritieni, A., Bottalico, A., Corda P. (1995): Occurrence and toxigenicity of *F. proliferatum* from preharvest maize ear rot and associated mycotoxins in Italy. *Plant Disease*, 79: 727-723.

142. Louis, B., Roy, P., Sayanika, D. W., Talukdar, N. C. (2013): *Aspergillus terreus* Thom a new pathogen that causes foliar blight of potato. *Plant Pathology & Quarantine Journal*, 3: 29–33.
143. Lund, F. (1995): Differentiating *Penicillium* species by detection of indole metabolites using a filter paper method. *Letters in Applied Microbiology*, 20: 228-231.
144. Magan, N, Olsen, M. (2004): *Mycotoxins in Food: detection and Control*. Abington, UK: Woodhead Publishing. p 17.
145. Magan, N. (2006): Mycotoxin contamination of food in Europe: early detection and prevention strategies. *Mycopathologia*, 162: 245–253.
146. Magnussen, A., Parsi, M. A. (2013): Aflatoxins, hepatocellular carcinoma and public health. *World Journal of Gastroenterology*, 19 (10): 1508–1512.
147. Mandeel, Q. A. (2005): Fungal contamination of some imported spices. *Mycopathologia*, 159: 291–298.
148. Mares, D., Andreotti, E., Maldonado, M. E., Pedrini, P., Colalongo, C., Romagnoli, C. (2008): Three new species of *Aspergillus* from Amazonian forest soil (Ecuador). *Current Microbiology*, 57: 222–229.
149. Marin, S., Albareda, X., Ramos, A. J., Sanchis, V. (2001): Impact of environment and interactions of *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* with *Aspergillus parasiticus* on fumonisin B1 and aflatoxins on maize grain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81: 1060–1068.
150. McNeill, J., Barrie, F. F., Buck, W. R. (eds.) (2012): *International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Melbourne Code)* Koeltz Scientific Books; Königstein.
151. Montiel, D., Dickinson, M. J., Lee, H. A., Dyer, P. S., Jeenes, D. J., Roberts, I. N., James, S., Fuller, L. J., Matsuchima, K, Archer, D. B. (2003): Genetic differentiation of the *Aspergillus* section Flavi complex using AFLP fingerprints. *Mycological Research*, 107: 1427–1434.
152. Moody, S. F., Tyler, B. M. (1990): Restriction enzyme analysis of mitochondrial DNA of the *Aspergillus flavus* group: *A. flavus*, *A. parasiticus*, and *A. nomius*. *Applied and Environmental Microbiology*, 56: 2441-2452.

153. Mphande, F. A., Siame, B. A., Taylor, J. E. (2004): Fungi, aflatoxins and cyclopiazonic acid associated with peanut retailing in Botswana. *Journal of Food Protection*, 67: 96–102.
154. Munari, L., Charchat, S., Rodrigues, L., Alberto von Muhlen, C., Rosebau, A, Lavinsky, L., Bonorino, C. (2003): An ELISA serum assay for autoantibodies to HSP70 in immune-mediated hearing loss. *Journal of Immunological Methods*, 283: 155–161.
155. Munkvold, G. P. (2003): Cultural and genetic approaches to managing mycotoxins in maize. *Annual Review of Phytopathology*, 41: 99–116.
156. Nakai, V. K., Rocha, L. de O., Gonzalez, E., Fonseca, H., Ortega, E. M. M., Correa, B. (2008): Distribution of fungi and aflatoxins in a stored peanut variety. *Food Chemistry*, 106: 285–290.
157. Nesci, A., Etcheverry, M. (2002): *Aspergillus* section Flavi populations from field maize in Argentina. *Letters in applied microbiology*, 34 (5): 343-348.
158. Ngindu, A., Johnson, B. K., Kenya, P. R., Ngira, J. A., Ocheng, D. M., Nandwa, H., Omondi, T. N., Jansen, A. J., Kaviti., J., Siongok, T. (1982): Outbreak of acute hepatitis caused by aflatoxin poisoning in Kenya. *Lancet*, 319: 1346–1348.
159. Nikolić, A., Nikolić, M., Ignjatović-Micić, D., Marković, K., Stanković, S. (2018): Identification of *A. flavus* and *A. parasiticus* in different crops using molecular genetic methods. 4th Congress of Croatian Geneticists with international participation, September 26-29, 2018, Krk, 57.
160. Nikolić, M., Nikolić, A., Jauković, M., Savić, I., Petrović, T., Bagi, F., Stanković, S. (2018): Differentiation between *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* isolates originated from wheat. *Genetika*, 50 (1): 143-150.
161. Nikolić, M., Savić, I., Stanković, S., Vico, I., Duduk, N. (2015): Uticaj temperature na razvoj toksigenih vrsta gljiva. VII Simpozijum sa međunarodnim učešćem „Inovacije u ratarskoj i povrtarskoj proizvodnji“, 11.12.2015., Beograd.
162. Nikolić, M., Stanković, S., Savić, I. (2017): Comparison of methods for determination of the toxigenic potential of *Aspergillus parasiticus* Speare and *Aspergillus flavus* Link isolated from maize. Presented on the 6th International Scientific Meeting:

Mycology, Mycotoxicology and Mycoses, September 27-29, 2017, Novi Sad, Serbia, published in *Matica Srpska J. Nat. Sci.* 133: 95–104.

163. Njapau, H., Ong, C. N., Onsongo, M. T. K., Page, S. W., Park, D., Patel, M., Phillips, T., Pineiro, M., Pronczuk, J., Rogers, H. S., Rubin, C., Sabino, M., Schaafsma, A., Shephard, G., Stroka, J., Wild, C., Williams, J. T., Wilson, D. (2006): Workgroup report: Public health strategies for reducing aflatoxin exposure in developing countries. *Environmental Health Perspectives*, 114: 1898–1903.

164. Nyongesa, B., Okoth, S., Ayugi, V. (2015): Identification key for *Aspergillus* species isolated from maize and soil of Nandi County, Kenya. *Advances in Microbiology*, 5: 205-229.

165. O'Brian, G. R., Georgianna, D. R., Wilkinson, J. R., Abbas, H. K., Wu, J., Bhatnagar, D., Cleveland, T. E., Nierman, W., Payne, G. A. (2007): The effect of elevated temperature on gene expression and aflatoxin biosynthesis. *Mycologia*, 90: 232–239.

166. of *Aspergillus* section Flavi isolated from Brazil nuts. *Food Chem.*

167. of *Aspergillus* section Flavi isolated from Brazil nuts. *Food Chem.*

168. Ogawa, H., Yoshimura, A., Sugiyama, J. (1997): Polyphyletic origins of species of the anamorphic genus *Geosmithia* and the relationships of the cleistothecial genera: evidence from 18S, 5S and 28S rDNA sequence analyses. *Mycologia*, 89: 756–771.

169. Öhlinger, R., Adler, A., Kräutler, O., Lew, H. (2004): Occurrence of toxigenic fungi and related mycotoxins in cereals, feeds and foods in Austria. In A. Logrieco & A. Visconti (Eds.), *An Overview on Toxigenic Fungi and Mycotoxins in Europe*. (pp. 1-10). Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publishers.

170. Okoth, S., Nyongesa, B., Ayugi, V., Kang'ethe, E., Korhonen, H., Joutsjoki, V. (2012): Toxigenic potential of *Aspergillus* species occurring on maize kernels from two agro-ecological zones in Kenya. *Toxins*, 4: 991–1007.

171. Okun, D. O., Khamis, F. M., Muluvi, G. M., Ngeranwa, J. J., Ombura, F. O., Yongo, M. O., Kenya, E. U. (2015): Distribution of indigenous strains of atoxigenic and toxigenic *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in maize and peanuts agro-ecological zones of Kenya. *Agriculture & Food Security*, 4:14.

172. Oliveira, C. A. F., Goncalves, B., Rosim, R. E., Fernandes, M. (2009): Determination of Aflatoxins in Peanut Products in the Northeast Region of Sao Paulo, Brasil. *International journal of Molecular Sciences*, 10: 174-183.
173. Ortiz, R. S., Taba, S., Chavez Tovar, V. H., Mezzalama, M., Xu, Y., Yan, J., Crouch, J. H. (2010): Conserving and enhancing maize genetic resources as global public goods – A perspective from CIMMYT. *Crop Science*, 50: 13-28.
174. Park, D. L., Liang, B. (1993): Perspectives on aflatoxin control for human food and animal feed. *Trends in Food Science & Technology*, 4: 334–342.
175. Pawar, N., Patil, V., Kamble, S., Dixit, G. (2008): First report of *Aspergillus niger* as a plant pathogen on *Zingiber officinale* from India. *Plant Disease*, 92(9): 1368.
176. Payne, G. P., Brown, M. P. (1998): Genetics and physiology of aflatoxin biosynthesis. *Annual Review of Phytopathology*, 36: 329-362.
177. Payne, G., A. (1998): Process of contamination of aflatoxin-producing fungi and their impact on crops. In: *Mycotoxins in Agriculture and Food Safety*. K. K. Sinha and D. Bhatnagar, ed. Marcel Dekker, Inc., New York. pp. 279-306.
178. Payne, G., A., Hagler, W., M., Adkins, C., R. (1998): Aflatoxin accumulation in inoculated ears of field-grown maize. *Plant Disease*, 72: 422–424.
179. Perkowski, J., Chełkowski, J., Goliński, P. (2004): Occurrence of mycotoxins in cereals, plants, foods and feeds in Poland. In A. Logrieco & A. Visconti (Eds.), *An Overview on Toxigenic Fungi and Mycotoxins in Europe*. (pp. 161-172). Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publishers.
180. Perrone, G., Susca, A., Cozzi, G., Ehrlich, K., Varga, J., Frisvad, J. C., Meijer, M., Noonim, P., Mahakarnchanakul, W., Samson, R. A. (2007): Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. *Studies in Mycology*, 59: 53–66.
181. Peterson, S. W. (2000): Phylogenetic relationships in *Aspergillus* based on rDNA sequence analysis. Amsterdam: Harwood Academic Publishers.
182. Peterson, S. W., Varga, J., Frisvad, J. C. (2008): Phylogeny and subgeneric taxonomy of *Aspergillus*. In: Varga J., Samson R.A., editors. *Aspergillus in the genomic era*. Wageningen Academic Publishers; Wageningen: 2008. pp. 33–56.

183. Peterson, S.W. (2008): Phylogenetic analyses of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. *Mycologia*, 100: 205–226.
184. Pildain, M. B., Vaamonde, G., Cabral, D. (2004): Analysis of population structure of *Aspergillus flavus* from peanut based on vegetative compatibility, geographic origin, mycotoxin and sclerotia production. *International Journal of Food Microbiology*, 93: 31–40.
185. Pildain, M. B., Frisvad, J. C., Vaamonde, G., Cabral, D., Varga, J., Samson, R. A. (2008): Two novel aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58: 725-735.
186. Pitt, J. I., Hocking, A. D., Glenn, D. R. (1983): An improved medium for the detection of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. *Journal of Applied Bacteriology*, 54: 109–114.
187. Pitt, J. I., Hocking, A. D., Bhudhasamai, K., Miscamble, B. F., Wheeler, K. A., Tanboon-Ek, P. (1993a): The normal mycoflora of commodities from Thailand. 1. Nuts and oilseeds. *International Journal of Food Microbiology*, 20: 211–226.
188. Pitt, J. I. (1993b): Corrections to species names in physiological studies on *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Journal of Food Protection*, 56: 265–269.
189. Pitt, J. I., Hocking, A. D., Bhudhasamai, K., Miscamble, B. F., Wheeler, K. A., Tanboon-Ek, P. (1994): The normal mycoflora of commodities from Thailand. 2. Beans, rice, small grains and other commodities. *International Journal of Food Microbiology*, 23: 35–53.
190. Pitt, J. I., Miscamble, B. F. (1995): Water relations of *Aspergillus flavus* and closely related species. *Journal of Food Protection*, 58: 86–90.
191. Pitt, J. I., Hocking, A. D. (1997). *Fungi and Food Spoilage*, 2nd edn. London: Blackie Academic and Professional.
192. Pitt, J.I., Hocking, A.D., Miscamble, B.F., Dharmaputra, O.S., Kuswanto, K.R., Rahayu, E.S., and Sardjono. (1998): The mycoflora of food commodities from Indonesia. *Journal of Food Mycology*, 1: 41–60.
193. Pitt, J.I., Samson, R.A. and Frisvad, J.C. (2000): List of accepted species and their synonyms in the family Trichocomaceae. In *Integration of Modern Taxonomic*

Methods for Penicillium and Aspergillus Classification, eds R.A. Samson and J.I Pitt. Amsterdam: Hardwood Academic.

194. Pitt J. I., Hocking, A. D. (2009): *Aspergillus* and Related Teleomorphs, pp. 275-337. In: Fungi and Food Spoilage, Springer Science+Business Media, New York, USA.

195. Piva, G., Battilani, P., and Pietri, A. (2006): Emerging issues in southern Europe: Aflatoxins in Italy. Pages 139-153 in: The Mycotoxin Factbook: food and feed topics. D. Barug, D. Bhatnagar, H. P. van Egmond, J. W. van der Kamp, W.A. van Osenbruggen, and A. Visconti, eds. Wageningen Academic Publisher, Wageningen, The Netherlands.

196. Prandini, A., Tansini, G., Sigolo, S., Filippi, L., Laporta, M., Piva, G. (2009): On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. Food and Chemical Toxicology, 47: 984-991.

197. Pravilnik o maksimalno dozvoljenim količinama ostataka sredstava za zaštitu bilja u hrani i hrani za životinje za koju se utvrđuju maksimalno dozvoljene količine ostataka sredstava za zaštitu bilja (Službeni glasnik Republike Srbije broj 28/2011, ispravke 20/2013, 29/2014, 37/2014 – ispravka i 39/2014; 79/2014).

198. Probst, C., Njapau, H., Cotty, P. J. (2007): Outbreak of an acute aflatoxicosis in Kenya in 2004: identification of the causal agent. Applied and Environmental Microbiology, 73: 2762–2764.

199. Ragauskas, A.J., Williams, C.K., Davison, B.H., Britovsek, G., Cairney, J., Eckert, C.A., Frederick, W.J. Jr., Hallett, J.P., Leak, D.J., Liotta, C.L. Mielenz, J.R., Murphy, R. (2006): The path forward for biofuels and biomaterials, Science 311: 484-489.

200. Raper, K.B., Fennell, D.I., (1965): The genus *Aspergillus*. Williams and Wilkins, Baltimore.

201. Razzaghi-Abyaneh, M., Shams-Ghahfarokhi, M., Allameh, A., Kazeroon-Shiri, A., Ranjbar-Bahadori, S., Mirzahoseini, H., Rezaee, M.B. (2006): A survey on distribution of *Aspergillus* section flavi in corn field soils in Iran: Population patterns based on aflatoxins, cyclopiazonic acid and sclerotia production. Mycopathologia, 161: 183-192.

202. Reid, L. M., Hamilton, R. I., Mather, D. E. (1996): Screening Maize for Resistance to Gibberella Ear Rot. Research Branch Agriculture and Agri-Food Canada, Technical Bulletin 5E.
203. Reiter, E., Zentek, J., Razzazi, E. (2009): Review on sample preparation strategies and methods used for the analysis of aflatoxins in food and feed. *Molecular Nutrition and Food Research*, 53: 508-524.
204. Republicki zavod za statistiku (2017): Statistički godišnjak Srbije 2017, Poglavlje 9: Poljoprivreda -Biljna proizvodnja, Beograd, pp. 242–270.
205. Rigó, K., Varga, J., Tóth, B., Mesterházy, Á., Kozakiewicz, Z. (2002): Evolutionary relationships within *Aspergillus* section Flavi based on sequences of the intergenic transcribed spacer regions and the 5.8S rRNA gene. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 48: 9–16.
206. Robens, J., Cardwell, K. (2003): The Costs of Mycotoxin Management to the USA: Management of Aflatoxins in the United States. *Toxin Reviews*, 22 (2-3): 139-152.
207. Rodrigues, P., Soares, C., Kozakiewicz, Z., Paterson, R.R.M., Lima, N., Venâncio, A. (2007): Identification and characterization of *Aspergillus flavus* and aflatoxins. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, 527-534.
208. Rodrigues P, Venâncio A, Kozakiewicz Z, Lima N (2009): A polyphasic approach to the identification of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus* Section Flavi isolated from Portuguese almonds. *International Journal of Food Microbiology*, 129: 187–193.
209. Rodrigues, P. (2011): Mycobiota and aflatoxigenic profile of Portuguese almonds and chestnuts from production to commercialisation, Ph.D. thesis, Universidade do Minho, Braga, Portugal, 2011.
210. Rodrigues, P., Santos, C., Venâncio, A., Lima, N. (2011): Species identification of *Aspergillus* section *Flavi* isolates from Portuguese almonds using phenotypic, including MALDI-TOF ICMS, and molecular approaches. *Journal of Applied Microbiology*, 111: 877–892. 10.1111/j.1365-2672.2011.05116.

211. Rodriguez-Romero, J., Hedtke, M., Kastner, C., Muller S., Fischer, R. (2010): Fungi, hidden in soil or up in the air: light makes a difference. *Annual Review of Microbiology*, 64: 585–610.
212. Rosengrant, M., C. Ringler, S. Msangi, T. Sulser, T. Zhu, S. Cline (2008): *International Model for Policy Analysis of Agricultural Commodities and Trade (IMPACT): Model Description*, International Food Research Institute: Washington, D.C.
213. Saito, M., Tsuruta, O. (1993): A new variety of *A. flavus* from tropical soil in Thailand and its aflatoxin productivity. *Proceedings of the Japan Association of Mycotoxicology*, 37: 31-36.
214. Sales, A. C., Yoshizawa, T. (2005): Updated profile of aflatoxin and *Aspergillus* section Flavi contamination in rice and its byproducts from the Philippines. *Food additives and contaminants*, 22 (5): 429-436.
215. Samson, R. A. (1979): A compilation of the Aspergilli described since 1965. *Studies in Mycology*, 18: 1–38.
216. Samson, R. A., Hoekstra, E. S, Frisvad J. C. (2004a): *Introduction to food- and airborne fungi*. 7th edition. Utrecht, Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures.
217. Samson, R. A., Houbraken, J., Kuijpers, A.F.A., Frank, J. M., Frisvad, J.C. (2004b): New ochratoxin or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Studies in Mycology*, 50: 45-61.
218. Samson, R. A., Noonim, P., Meijer, M., Houbraken, J., Frisvad, J.C., Varga, J. (2007): Diagnostic tools to identify black aspergilli. *Studies in Mycology*, 59: 129-145.
219. Samson, R. A., Varga, J. (2009): What is a species in *Aspergillus*? *Medical Mycology*, 47(Suppl 1): S13–S20.
220. Samson, R. A., Houbraken, J., Thrane, U. (2010): *CBS KNAW Biodiversity Center; Utrecht: Food and indoor fungi*.
221. Samson, R. A., Visagie, C. M., Houbraken, J., Hong, S.-B., Hubka, V., Klaassen, C. H. W., Perrone, G., Seifert, K. A., Susca, A., Tanney, J. B., Varga, J., Kocsubé, S., Szigeti, G., Yaguchi, T., Frisvad, J. C. (2014): Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, 78: 141–173.

222. Samson, R.A., Visagie, C.M., Houbraken, J., Hong, S. B., Hubka, B., c.h.w. Klaassen, C. H. W., Perrone, G., Seifert, K. A., Susca, A., Tanney J. B., Varga, J., Kocsubé, S., Szigeti, G., Yaguchi, T., Frisvad, J. C. (2014): Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, 78: 141-173.
223. Sanchis, V., Magan, N. (2004): Environmental profiles for growth and mycotoxin production, Chapter 8, in *Mycotoxins in Food: Detection and Control*, eds Magan N., Olsen M., editors. (Cambridge, MA: Woodhead Publishing Ltd.), 174–189.
224. Schgiwietzke, S., Kim, Y., Ximenez, E., Mosier, N., Ladisch, M. (2008): Ethanol production from maize. *Molecular Genetic Approaches to Maize Improvement* (book), part VI: 347-364.
225. Schroeder, H. W., Boller, R. A. (1973): Aflatoxin production by species and strains of the *Aspergillus flavus* group isolated from field crops. *Applied Microbiology*, 25: 885-889.
226. Scudamore, K. A. (2004): Occurrence of mycotoxins in UK food commodities. In A. Logrieco & A. Visconti (Eds.), *An Overview on Toxigenic Fungi and Mycotoxins in Europe*. (pp. 247-252). Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publishers.
227. Serra, R., Cabanes, F. J., Perrone, G., Castella, G., Venancio, A., Mule, G., Kozakiewicz, Z. (2006): *Aspergillus ibericus*: a new species of section Nigri isolated from grapes. *Mycologia*, 98: 295–306.
228. Sinovec, Z., Resanović, R., Sinovec, S. (2006): Mikotoksini-pojava, efekti i prevencija. Univerzitet u Beogradu. Fakultet veterinarske medicine.
229. Somashekar, D., Rati, E. R., Chandrashekar, A. (2004): PCR-restriction fragment length analysis of aflR gene for differentiation and detection of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in maize. *International Journal of Food Microbiology*, 93: 101-107.
230. Speare, A. T. (1912): Fungi parasitic upon insects injurious to sugar cane. *Pathology and Physiological Series, Bulletin No. 12*. Honolulu: Hawaiian Sugar Planters' Association Experiment Station, 62.

231. Stanković, S., Lević, J., Nikolić, M., Krnjaja, V., Jauković, M. (2015): Prvi nalaz *Aspergillus parasiticus* u proizvodnji kukuruza u Srbiji. Savetovanje o zaštiti bilja, Zlatibor 23-27, str. 32-33.

232. Stenske, K. A., Smith, J. R., Newman, S. J., Newman, L. B., and Kirk, C. A. (2006): Aflatoxicosis in dogs and dealing with suspected contaminated commercial foods. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 228: 1686-1691.

233. Strosnider, H., Azziz-Baumgartner, E., Banziger, M., Bhat, R.V., Breiman, R., Brune, M. N., DeCock, K., Dilley, A., Groopman, J., Hell, K., Henry, S. H., Jeffers, D., Jolly, C., Jolly, P., Kibata, G. N., Lewis, L., Liu, X., Lubber, G., McCoy, L., Mensah, P., Miraglia, M., Misore, A., Njapau, H., Ong, C. N., Onsongo, M. T. K., Page, S. W., Park, D., Patel, M., Phillips, T., Pineiro, M., Pronczuk, J., Rogers, H. S., Rubin, C., Sabino, M., Schaafsma, A., Shephard, G., Stroka, J., Wild, C., Williams, J.T., Wilson, D. (2006): Workgroup Report: Public health strategies for reducing aflatoxin exposure in developing countries. *Environmental Health Perspectives*, 114 (12): 1898–1903.

234. Sumner, P. E., Lee, D. (2012): Reducing Aflatoxin in Corn during Harvest and Storage. Atlanta, GA: The University of Georgia, Georgia College of Agriculture and Environmental Sciences.

235. Szabo, B., Toth, B., Toth Toldine, E., Varga, M., Kovacs, N., Varga, J., Kocsube, S., Palagyi, A., Bagi, F., Budakov, D., Stojšin, V., Lazić, S., Bodroža-Solarov, M., Čolović, R., Bekavac, G., Purar, B., Jocković, Dj., Mesterházy, A. (2018): A new concept to secure food safety standards against *Fusarium* species and *Aspergillus flavus* and their toxins in maize. *Toxins*, 10(9), 372-396. <http://doi.org/10.3390/toxins10090372>

236. Tamura, M., Kawahara, K., Sugiyama, J. (2000): Molecular phylogeny of *Aspergillus* and associated teleomorphs in the *Trichocomaceae* (*Eurotiales*) In: Samson R.A., Pitt J.I., editors. Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. Harwood Academic Publishers; Amsterdam: pp. 357–372.

237. Thorn, C., Raper, K. B. (1945): *Manual of the Aspergilli*, Baltimore: Williams and Wilkins.

238. Torney, F., Moeller, L., Scarpa, A., Wang, K. (2007): Genetic engineering approaches to improve bioethanol production from maize. *Current Opinion in Biotechnology*, 18: 193-199.
239. Tran-Dinh, N., Pitt, J. I., Carter, D. A. (1999): Molecular genotype analysis of natural toxigenic and nontoxigenic isolates of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. *Mycological Research*, 103: 1485–1490.
240. Turner, N., Subrahmanyam, S., Piletsky, S. (2009): Analytical methods for determination of mycotoxins. *Analytica Chimica Acta*, 632: 168-180.
241. Vaamonde, G., Patriarca, A., Pinto, V.F., Comerio, R., Degrossi, C. (2003): Variability of aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus* section *flavi* from different substrates in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 88: 79-84.
242. Vale-Silva, L., Silva, J., Oliveira, D., Goncalves, J., Cavaleiro, C., Salgueiro, L., Pinto, E. (2012): Correlation of the chemical composition of essential oils from *Origanum vulgare subsp. virens* with their in vitro activity against pathogenic yeasts and filamentous fungi. *Journal of Medical Microbiology*, 61: 252-257.
243. Van Egmond, H. P. (1989): Aflatoxin M1: occurrence, toxicity, regulation. Pages 11-55 in: *Mycotoxins in Dairy Products*. H. P. van Egmond, ed. Elsevier Applied Science, London, New York.
244. Varga, J., Rigó, K., Molnár, J., Tóth, B., Szencz, S., Téren, J. and Kozakiewicz, Z. (2003): Mycotoxin production and evolutionary relationships among species of *Aspergillus* section *Clavati*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 83: 191–200.
245. Varga, J., Tóth, B., Mesterházy, Á., Téren, J. and Fazekas, B. (2004): Mycotoxigenic fungi and mycotoxins in foods and feeds in Hungary. In A. Logrieco & A. Visconti (Eds.), *An Overview on Toxigenic Fungi and Mycotoxins in Europe*. (pp. 123-139). Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publishers.
246. Varga, J., Due, M., Frisvad, J. C., Samson, R. A. (2007a): Taxonomic revision of *Aspergillus* section *Clavati* based on molecular, morphological and physiological data. *Studies in Mycology*, 59: 89–106.

247. Varga, J., Frisvad, J. C., Samson, R. A. (2007b): Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Candidi* based on molecular, morphological and physiological data. *Studies in Mycology*, 59: 75–88.
248. Wang, L., Yokoyama, K., Takahashi, H., Kase, N., Hanya, Y., Yashiro, K., Miyaji, M. and Nishimura, K. (2001): Identification of species in *Aspergillus* section *Flavi* based on sequencing of the mitochondrial cytochrome b gene. *International Journal of Food Microbiology*, 71: 75-86.
249. Wheeler, K.A., Hurdman, B.F. and Pitt, J.I. (1991): Influence of pH on the growth of some toxigenic species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. *International Journal of Food Microbiology*, 12: 141–150.
250. Whitaker, T., Horwitz, W., Albert, R., Nesheim, S. (1996): Variability associated with analytical methods used to measure aflatoxin in agricultural commodities, *Journal of AOAC International Main*, 79(2): 476-485.
251. Wicklow, D. T., Weaver, D. K., Throne, J. E. (1998): Fungal colonists of maize grain conditioned at constant temperatures and humidities. *Journal of Stored Products Research*, 34: 355–361.
252. Widstrom, N. W., Sparks, A. N., Lillehoj, E. B., Kwolek, F. W. (1975): Aflatoxin production and lepidopteran insect injury on corn in Georgia. *Journal of Economic Entomology*, 68: 855–856.
253. Widstrom, N., W. (1996). *Advances in Agronomy*, In: D. Sparks (Ed.). *The aflatoxin problem with corn grain* (pp. 219-280). Academic Press, New York, USA.
254. Wilkinson, H. H., Ramaswamy, A., Sim, S.C., Keller, N.P. (2004): Increased conidiation associated with progression along the sterigmatocystin biosynthetic pathway. *Mycologia*, 96: 1190–1198.
255. Williams, J. H., Phillips, T. D., Jolly, P. E., Stiles, J. K., Jolly, C. M., Aggarwal, D. (2004): Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80: 1106-1122.
256. Yu, J., Chang, P. K., Ehrlich, K. C., Cary, J. W., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., Payne, G. A., Linz, J. E., Woloshuk, C. P., Bennett, J. W. (2004): Clustered

pathway genes in aflatoxin biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (3):1253–1262. doi: 10.1128/AEM.70.3.1253-1262.2004.

257. Yuan, G. F., Liu, C. S., Chen, C. C. (1995): Differentiation of *Aspergillus parasiticus* from *Aspergillus sojae* by random amplification of polymorphic DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 2384–2387.

BIOGRAFIJA

Milica Nikolić rođena je 10.10.1987. u Beogradu. Pohađala je Zemunsku gimnaziju. Poljoprivredni fakultet, Univerziteta u Beogradu, završila je 2012., na Odseku za zaštitu bilja i prehrambenih proizvoda, sa prosečnom ocenom 8,82. Milica je bila stipendista „15 najboljih studenata Poljoprivrednog fakulteta“.

Doktorske studije na Poljoprivrednom fakultetu u Beogradu, smer Poljoprivredne nauke, modul: Fitomedicina upisala je školske 2013/2014. godine. Od februara 2015. godine radi u Institutu za kukuruz „Zemun Polje“ u svojstvu mlađeg istraživača u Laboratoriji za fitopatologiju. U periodu od 2015. godine je angažovana na projektima Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije TR 31023 pod nazivom: „Redukcija toksigenih gljiva roda *Fusarium* i njihovih mikotoksina u proizvodnji zdravstveno bezbedne hrane na bazi žita“ i „Poboljšanje svojstava kukuruza i soje molekularnim i konvencionalnim oplemenjivanjem“- evidencioni broj projekta TR 31068. Doktorske studije na Poljoprivrednom fakultetu u Novom Sadu, smer Agronomija, modul: Fitomedicina upisala je školske 2017/2018. godine.

Član je Društva za zaštitu bilja Srbije i Društva genetičara Srbije.

Autor i koautor je više naučnih radova.

Govori engleski jezik.