

UNIVERZITET U NOVOM SADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET NOVI SAD

Jovana Đisalov

**Identifikacija *Alternaria* spp. na zrnu spelte i uticaj
zaraze na komponente prinosa, sadržaj mikotoksina i
tehnološki kvalitet**

-Doktorska disertacija-

Novi Sad, 2015

UNIVERZITET U NOVOM SADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacijski 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	Jovana Đisalov
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	dr Ferenc Bagi, vanredni profesor
Naslov rada: NR	Identifikacija <i>Alternaria</i> spp. na zrnju spelte i uticaj zaraze na komponente prinosa, sadržaj mikotoksina i tehnološki kvalitet
Jezik publikacije: JP	srpski (latinica)
Jezik izvoda: JI	srp./eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	AP Vojvodina
Godina: GO	2015.
Izdavač: IZ	Autorski reprint
Mesto i adresa:	Poljoprivredni fakultet Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 8, Novi Sad, Srbija. Departman za fitomedicinu i zaštitu životne sredine
Fizički opis rada: FO	(broj poglavlja/ stranica/ slika/ grafikona/ referenci/ priloga) 8 poglavlja/ 142 strane/ 26 slika/45 tabela/ 3 grafikona/342 reference/ 4 priloga
Naučna oblast: NO	Biotehničke nauke
Naučna disciplina: ND	Fitopatologija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	<i>Alternaria</i> spp., spelta, identifikacija, mikotoksini, tehnološki kvalitet
UDK	632(043.3)
Čuva se: ČU	Biblioteka Poljoprivrednog fakulteta Novi Sad
Važna napomena: VN	-
Izvod: IZ	

Savremeni trendovi na tržištu utiču na sve veću potražnju za speltom (*Triticum aestivum* ssp. *spelta*), alternativnom, plevičastom formom pšenice visoke nutritivne vrednosti, koja doprinosi održavanju agroekoloških sistema gajenja. Smatra se da prisustvo plevičastih omotača pruža zaštitu zrna od različitih bolesti i štetočina, što je od naročitog značaja za organsku proizvodnju gde upotreba hemijske zaštite nije dozvoljena. Rod *Alternaria* obuhvata veliki broj izrazito varijabilnih i široko rasprostranjenih saprofitnih i fitopatogenih vrsta. Značaj *Alternaria* spp. se ogleda ne samo u smanjenju prinosa i narušavanju kvaliteta zrna pšenice, već i u tome što mnoge vrste ovog roda produkuju toksične metabolite, koji su štetni za zdravlje ljudi i životinja. U cilju preduzimanja blagovremenih i efikasnih mera suzbijanja fitopatogenih vrsta roda *Alternaria* i monitoringa dominantnih toksigenih vrsta, veoma je značajna njihova pouzdana i precizna identifikacija.

Istraživanja su obuhvatila identifikaciju i molekularnu karakterizaciju *Alternaria* spp. na zrnu spelte u Republici Srbiji uz analizu intenziteta zaraze posebno plevičastih i oljuštenih zrna spelte kako bi se ispitala efikasnost plavičastih omotača u zaštiti zrna spelte. Istovremeno je određen sadržaj najznačajnijih *Alternaria* toksina (alternariol-AOH i alternariol monometil-etar-AME), kao i sveobuhvatni uticaj ovih gljiva na komponente prinosa, zdravstvenu bezbednost i tehnološki kvalitet spelte. Izolovano je ukupno 25 *Alternaria* spp. sa zrna spelte roda 2011. god. iz različitih regiona Vojvodine i na osnovu morfoloških, patogenih i molekularnih karakteristika utvrđeno je prisustvo dve vrste: *A. tenuissima* (22 izolata) i *A. infectoria* (3 izolata). Dobijeni rezultati predstavljaju ujedno i prvo naučno saopštenje od vrstama roda *Alternaria* na spelti u Srbiji. Veštačkom inokulacijom tri različita genotipa spelte (Nirvana, Austria i Ostro) odabranim *Alternaria* izolatima u 2011. i 2012. god. uočena je značajna razlika u intenzitetu zaraze *Alternaria* spp. na zrnima sa plevičastim omotačima gde se intenzitet infekcije kretao od 87-100% dok je na oljuštenim zrnima iznosio od 16-72% u 2011. god., odnosno od 95-100% na plevičastim zrnima i 42-68% na oljuštenim zrnima u 2012. god. Efekat hemijske zaštite fungicidom se pokazao značajan za redukciju *Alternaria* spp. u obe istraživačke godine kako na plevičastim tako i na oljuštenim zrnima spelte. Kolorimetrijskim merenjima intenziteta zaraze plevičastih omotača i oljuštenih zrna inokulisanih biljaka u 2011. i 2012. god. potvrđena su standardna vizuelna fitopatološka ispitivanja, što ukazuje na to da se metoda instrumentale ocene zaraze može koristiti kao efikasna i brza metoda detekcije tamnokličnih zrna, gde uz dodatne verifikacije postoji mogućnost primene i u praksi. AOH i AME detektovani su u proseku četiri puta većoj koncentraciji u plevičastim omotačima nego u oljuštenim zrnima, što potvrđuje efikasnost plevičastih omotača u zaštiti zrna spelte, ne samo od prodiranja *Alternaria* spp. već i od njihovih toksičnih metabolita. Najmanja koncentracija *Alternaria* toksina zabeležena je na oljuštenim zrnima bijaka tretiranih fungicidom (AOH - 84 µg/kg i AME - 153 µg/kg). Ispitivanja prometnog i tehnološkog kvaliteta spelte zaražene *Alternaria* spp. su pokazala da tamnoklična zrna značajno narušavaju parametre prometnog i tehnološkog kvaliteta spelte, negativno utičući na nalivanje i sazrevanje zrna kao i sintezu skroba i proteina.

Prikazani rezultati ukazuju na to da plevičasti omotači predstavljaju efikasnu barijeru u zaštiti zrna od infekcije vrstama roda *Alternaria*, što ima izuzetan značaj za otpornost spelte naročito u uslovima gajenja u sistemu organske proizvodnje gde upotreba hemijske zaštite nije dozvoljena. Međutim, uprkos prirodnoj otpornosti i genetskoj predodređenosti spelte za organsku proizvodnju, rezultati efikasne primene fungicida u suzbijanju *Alternaria* spp. opravdavaju adekvatan hemijski tretman u dobroj poljoprivrednoj praksi i proizvodnji zdravstveno bezbedne hrane. Multidisciplinarni pristup ove doktorske disertacije, ukazuje na neophodnost komplementarnog sagledavanja agronomskih i tehnoloških aspekata u poljoprivrednoj i prehrambenoj industriji, kao jedinstvenog modela koji omogućava praćenje savremenih tendencija u proizvodnji zdravstveno bezbedne hrane visokog nutritivnog kvaliteta.

Datum prihvatanja teme od strane NN veća: DP	4.10.2013.
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: (ime i prezime/titula/zvanje/naziv organizacije/status) KO	<p>predsednik: dr Sanja Lazić, redovni profesor, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu</p> <hr/> <p>član-mentor: dr Ferenc Bagi, vanredni profesor, Poljoprivredni fakultet Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu</p> <hr/> <p>član: dr Marija Bodroža-Solarov, naučni savetnik, Naučni institut za prehrambene tehnologije, Univerzitet u Novom Sadu</p> <hr/>

**UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF AGRICULTURE
KEY WORD DOCUMENTATION**

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Documentation type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD Thesis
Author: AU	Jovana Đisalov
Mentor: MN	PhD Ferenc Bagi, associate professor
Title: TI	Identification of <i>Alternaria</i> spp. on spelt kernels and impact of infection on yield parameters, mycotoxins content and technological quality
Language of text: LT	Serbian (Latin letter)
Language of abstract: LA	Serbian/English
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	AP Vojvodina
Publication year: PY	2015
Publisher: PU	Authors's reprint
Publication place:	Faculty of Agriculture Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 8, Novi Sad, Serbia. Department of Environmental and Plant Protection
Physical description: PD	8 chapters /142 pages/ 26 figures/45 tables/ 3 graphs/342 references/ 4 appendixes
Scientific filed: SF	Biotechnical sciences
Scientific discipline: SD	Phytopatology
Subject, key words: SKW	<i>Alternaria</i> spp., spelt wheat, identification, mycotoxins, technological quality
UC	632(043.3)
Holding data: HD	Faculty of University of Novi Sad, Faculty of Agriculture
Note: N	-
Abstract: AB	<p>There is an increasing market demand for alternative crops such as spelt wheat (<i>Triticum aestivum</i> ssp. <i>spelta</i>), an ancient, hulled with high nutritional values which</p>

encourages agroecological production systems. According to literature overview, it is considered that hulls protect kernels against different pests and pathogens, which is of great importance in organic production where chemical treatment is forbidden. *Alternaria* is a ubiquitous fungal genus that includes saprobic, and pathogenic species associated with yield losses and reduction of technological quality of small grains. Moreover, some of *Alternaria* spp. has high toxigenic potential and can be harmful for human and animal health. In order to conduct efficient disease control and monitoring of toxigenic *Alternaria* species, precise and reliable identification is highly important issue.

This study include identification and molecular characterisation of *Alternaria* spp. isolated from spelt kernels in the Republic of Serbia, followed by assessing of level of infection of hulled and dehulled kernels, separately. Additionally, the content of the most important *Alternaria* toxins (alternariol-AOH and alternariol monomethyl-ether-AME) is analysed, as well as the overall impact of infection on yield parameters, food safety and technological quality of spelt wheat. Out of 25 *Alternaria* strains isolated from spelte kernels harvested in 2011. from different regions of Vojvodina and according to morphological, pathogenic and molecular characteristics, the most dominant species was *A. tenuissima* (22 isolates) followed by *A. infectoria* (3 isolates). This is the first report of *Alternaria* spp. detected on species level on spelt wheat in Serbia. After artificial inoculation of three different spelt genotypes (Nirvana, Austria i Ostro) with *Alternaria* isolates in 2011. and 2012., the significant difference in the level of infection on hulled and dehulled kernels is noted. On the hulled kernels infection was in the range of 87-100%, while on the dehulled kernels was from 16 to 72% in 2011., and from 95 to 100% on hulled kernels and from 42 to 68% on dehulled kernels in 2012., respectively. Chemical treatment showed positive effect in the reduction of *Alternaria* disease in both years, on hulled and dehulled kernels as well. Colorimetric measurements of the level of infection proved conventional phytopathological analyses, which indicates that such instrumental method can be efficiently used in rapid detection of black point kernels and with additional verifications might be use in practise. AOH and AME were detected in four time higher concentrations in hulls compared to dehulled kernels, which confirms that hulls act as barriers against fungal infection and their toxic metabolites. The minimum concentration was detected on dehulled kernels treated with fungicide (AOH - 84 µg/kg i AME - 153 µg/kg). In the technological quality analysis of infected kernels, it was found that black point disease reduced technological quality, due to negative impact of infection on maturation of grains and synthesis of proteins and starch.

Presented results indicate that hulls on spelt kernels act as efficient barriers in the protection of kernels against *Alternaria* spp. and their toxic metabolites, which is of great importance for the resistance of spelt wheat particularly in the organic farming where chemical treatment is forbidden. In spite of the fact that spelt is suitable for organic production, adequate fungicide application against *Alternaria* spp. is justified from the aspect of the good agriculture practise and food safety. Multidisciplinary approach of this doctoral dissertation points to necessity of complementary perception of agronomic and technological aspects in agriculture and food industry, as the unique model that supports contemporary trends in the production of food safety products with high nutritional value.

Accepted on Scientific Board on: AS	4.10.2013.
Defended: DE	
Theses Defend Board: DB	president: PhD Sanja Lazić, full professor, Faculty of Agriculture, University of Novi Sad

	<p>member, mentor: PhD Ferenc Bagi, associate professor, Faculty of Agriculture, University of Novi Sad</p>
	<p>member: PhD Marija Bodroža-Solarov, full research professor, Institute of Food Technology, University of Novi Sad</p>

SADRŽAJ

1. UVOD	11
2. PREGLED LITERATURE	13
2.1. Spelta	13
2.1.1. Agronomske karakteristike spelte	14
2.1.2. Prometni i tehnološki kvalitet spelte	16
2.2. Gljive roda <i>Alternaria</i>	19
2.2.1. Sistematika roda <i>Alternaria</i>	19
2.2.2. Značaj roda <i>Alternaria</i>	22
2.3. Pojava i rasprostranjenost <i>Alternaria</i> vrsta na strnim žitima	25
2.3.1. Simptomi bolesti	27
2.3.2. Osobine patogena, epidemiologija i ekologija	30
2.4. <i>Alternaria</i> toksini	34
2.4.1. Toksikološki značaj <i>Alternaria</i> toksina	39
2.5. Uticaj <i>Alternaria</i> spp. na prometni i tehnološki kvalitet pšenice	41
3. CILJ ISTRAŽIVANJA	43
4. MATERIJAL I METODE	44
4.1. Ocena zaraze uzorkovanih zrna spelte i izolacija gljiva roda <i>Alternaria</i>	44
4.2. Dobijanje čistih kultura i monosporijalnih izolata	45
4.3. Identifikacija vrsta roda <i>Alternaria</i>	46
4.3.1. Determinacija <i>Alternaria</i> spp. na osnovu morfoloških osobina	46
4.3.2. Molekularna identifikacija izolata <i>Alternaria</i> spp.	47
4.3.2.1. Ekstrakcija DNK	47
4.3.2.2. Lančana reakcija polimeraze	48
4.3.2.3. Vizuelizacija i analiza produkata PCR reakcija	49
4.3.2.4. Prečišćavanje PCR produkata i sekvencioniranje	51
4.3.2.5. Analiza sekvenci i identifikacija BLAST metodom	51
4.4. Provera patogenosti odabranih izolata <i>A.tenuissima</i> i <i>A.infectoria</i> veštačkom inokulacijom u poljskim uslovima	52
4.5. Ocena zaraze biljaka spelte inokulisanih <i>Alternaria</i> spp. uz poređenje intenziteta zaraze posebno oljuštenih zrna i zrna sa plevičastim omotačima	53

4.5.1. Određivanje stepena zaraze zrna spelte <i>Alternaria</i> spp.	53
4.5.2. Kolorimetrijska merenja intenziteta zaraze zrna spelte <i>Alternaria</i> spp.	54
4.6. Određivanje parametara prinosa inokulisanih biljaka.....	54
4.7. Određivanje sadržaja mikotoksina (AOH i AME) tečnom hromatografijom visoke performance (HPLC metodom) posebno u plevičastim omotačima i oljuštenim zrnima ...	55
4.7.1. Priprema uzoraka.....	55
4.7.2. Ekstrakcija i prečišćavanje <i>Alternaria</i> toksina.....	55
4.7.3. Detekcija mikotoksina HPLC metodom	56
4.8. Metode ocene prometnog i tehnološkog kvaliteta spelte inokulisane <i>Alternaria</i> spp. i tretirane fungicidom.....	57
4.8.1. Određivanje zapreminske mase.....	58
4.8.2. Određivanje mase 1000 zrna	58
4.8.3. Određivanje veličine zrna.....	58
4.8.4. Određivanje sadržaja proteina	58
4.8.5. Metoda laboratorijskog mlevenja pšenice	59
4.8.6. Određivanje broja padanja po Hagberg-u.....	59
4.8.7. Određivanje sadržaja vlažnog glutena	60
4.8.8. Ekstenzografska analiza.....	60
4.8.9. Miksolab analiza.....	60
4.9. Statistička obrada podataka.....	62
5. REZULTATI I DISKUSIJA.....	63
5.1. Kljavost i zdravstveno stanje uzorkovanih zrna spelte	63
5.2. Izolacija patogena i dobijanje monosporijalnih izolata	64
5.3. Identifikacija <i>Alternaria</i> spp. na zrnju spelte	64
5.3.1. Determinacija na osnovu morfoloških osobina izolata <i>Alternaria</i> spp.	64
5.3.2. Molekularna identifikacija ispitivanih izolata <i>Alternaria</i> spp.....	67
5.4. Patogenost odabranih izolata <i>A. tenuissima</i> i <i>A. infectoria</i> na klasovima i zrnju spelte	71
5.5. Ocena zaraze inokulisanih biljaka <i>Alternaria</i> spp. uz poređenje intenziteta zaraze posebno oljuštenih zrna i zrna sa plevičastim omotačima	74
5.5.1. Stepenn zaraze <i>Alternaria</i> spp.	74
5.5.2. Kolorimetrijska merenja.....	77
5.6. Masa klasova inokulisanih biljaka spelte.....	81
5.7. Sadržaj <i>Alternaria</i> toksina (AOH i AME) u plevičastim omotačima i oljuštenim zrnima spelte.....	83
5.8. Prometni i tehnološki kvalitet spelte inokulisane <i>Alternaria</i> spp.	93

5.8.1. Zapreminska masa	93
5.8.2. Masa 1000 zrna	95
5.8.3. Veličina zrna	96
5.8.4. Sadržaj proteina	97
5.8.5. Laboratorijsko mlevenje pšenice	99
5.8.6. Broj padanja po Hagberg-u	100
5.8.7. Gluten	102
5.8.8. Rezultati ekstenzografskih ispitivanja	104
5.8.9. Rezultati termo-mehaničkih osobina testa dobijenih primenom Miksolaba®.....	106
6. ZAKLJUČAK.....	108
7. LITERATURA.....	110
8. PRILOZI.....	139

1. UVOD

U novije vreme, pažnja javnosti je sve više okrenuta ka proizvodnji i potrošnji zdravstveno bezbedne hrane visokog kvaliteta. Promene u trendu ishrane uticale su na formiranje specifičnih zahteva tržišta koji su doveli do toga da se pored konvencionalnih u ishrani sve više koriste i alternativna žita visoke nutritivne vrednosti. Alternativne kulture podrazumevaju stare i pomalo zanemarene biljne vrste koja imaju značajna hranljiva svojstva, a u isto vreme doprinose održavanju agroekoloških sistema gajenja. To naročito ima značaja u organskoj proizvodnji hrane koja je poslednjih godina u ekspanziji (Bavec i Bavec, 2006).

Spelta (*Triticum aestivum* ssp. *spelta* L.) je stara podvrsta meke pšenice poznata od davnina, ali je vremenom, upotrebom modernih visokoprinosnih sorti žita skoro potpuno zanemarena. Zbog svojih bioloških i agronomskih karakteristika, kao i bogatih nutritivnih svojstava, spelta zauzima značajno mesto u grupi alternativnih žita (Ugrenović, 2013). Skromni zahtevi prema klimatskim i zemljišnim činiocima i agrotehnici i visoka tolerantnost prema bolestima štetočinama, predstavljaju niz preduslova za proizvodnju ove plevičaste vrste žita u ekološkim sistemima gajenja, od kojih organska proizvodnja ima naročit značaj (Bodroža-Solarov i sar., 2009; Lacko-Bartošova i sar., 2010; Grobelnik-Mlakar i sar., 2014). Takođe, visok sadržaj nutritivno vrednih komponenti, čini speltu pogodnom za proizvodnju širokog spektra organskih i tradicionalnih prehrambenih proizvoda sa dodatom vrednošću (Kohajdová i Karovičová, 2008).

Zvanična statistika o površinama i proizvodnji spelte ograničena je na zemlje srednje Evrope. Kako navodi Escarnot i sar. (2010), u Belgiji spelta se proizvodi na 10 000 ha, u Nemačkoj na 23 000 ha (Statistisches Bundesamt Deutschland, 2008), dok u Švajcarskoj čini 10 000 tona od ukupnih žitarica (Office fédéral de la statistique Suisse, 2008). U Australiji ukupna proizvodnja spelte iznosi 4 000 tona, dok se procenjuje sa su zahtevi tržišta na ovom kontinetu oko 10 000 tona (Neeson, 2008). Evidentno je da se površine na kojim se gaji spelta sve više povećavaju, a proizvodi na bazi ove žitarice postaju sve traženiji na tržištu (Vukoje i sar., 2013). U Republici Srbiji postoji nekoliko proizvođača spelte, kao i onih koji se bave preradom u cilju dobijanja finalnih proizvoda. Na tržištu u našoj zemlji može se naći široka paleta prehrambenih proizvoda na bazi spelte kao što su hleb, testenine, mekinje, keksovi i drugi proizvodi. Širenjem svesti o kvalitetu i zdravstvenoj bezbednosti hrane, potražnja za ovim proizvodima sve više raste.

Brojni naučni literaturni podaci ukazuju na sve češće prisustvo različitih patogenih gljiva na zrnu spelte, što je značajno sa stanovišta smanjenja prinosa i kvaliteta zrna (Lacko-Bartošova i sar., 2012; Kurowski i sar., 2012; Wachowska i sar., 2012). U tom pogledu najviše su izučavane vrste roda *Fusarium*. Međutim, novija istraživanja su pokazala da na zrnima spelte dominiraju gljive iz roda *Alternaria* (Kurowski i Wysocka, 2009). *Alternaria* spp. su široko rasprostranjene na žitaricama u svim krajevima sveta, a njihova učestala pojava uzrokuje velike ekonomske gubitke. Kao razlog za ovu pojavu, navode se klimatske promene i visoka prilagodljivost i otpornost kako saprobnih tako i fitopatogenih *Alternaria* vrsta (Corden i sar., 2003). Značaj *Alternaria* spp. ogleda se ne samo u narušavanju prinosa i kvaliteta zrna pšenice, već i u tome što mnoge vrste ovog roda produkuju toksične metabolite, koji su štetni po zdravlje ljudi i životinja. U prilog aktuelnosti ove naučne problematike govori i nedavno objavljena studija od strane Evropske uprave za bezbednost hrane (European Food Safety Authority) o rizicima i uticaju *Alternaria* toksina na zdravlje ljudi i životinja (EFSA, 2011).

Predmet višegodišnjih istraživanja ove doktorske disertacije su *Alternaria* spp. na zrnu spelte, sa akcentom na plevičaste omotače kao potencijalne barijere u zaštiti zrna prilikom gljivične infekcije i prodiranja njihovih toksičnih metabolita u zrno. U fokusu ovog naučno-istraživačkog rada je i biosinteza najznačajnijih *Alternaria* toksina koje produkuju izolovane gljive, kao i ispitivanje uticaja zaraze *Alternaria* spp. na produktivnost i tehnološki kvalitet spelte.

Istraživanja su obuhvatila preciznu identifikaciju dominantnih vrsta roda *Alternaria* izolovanih sa zrna spelte u Srbiji, zatim ocenu intenziteta zaraze plevičastih i oljuštenih zrna spelte uz analizu efikasnosti plevičastih omotača kao barijera u prodiranju ovih gljiva. Istovremeno je određen i sadržaj najzastupljenijih *Alternaria* toksina, kao i sveobuhvatni uticaj ovih gljiva na komponente prinosa i tehnološki kvalitet spelte. Multidisciplinarni pristup ove doktorske disertacije, ukazuje na neophodnost komplementarnog sagledavanja agronomskih i tehnoloških aspekata u poljoprivrednoj i prehrambenoj industriji, kao jedinstvenog modela koji omogućava praćenje savremenih tendencija u proizvodnji zdravstveno bezbedne hrane visokog nutritivnog kvaliteta.

2.PREGLED LITERATURE

2.1. Spelta

Spelta (*Triticum aestivum* ssp. *spelta* L. syn *Triticum spelta* L.) je heksaploidna plevičasta forma hlebne, meke pšenice (Cubadda i Marconi, 2002). U našem govornom području poznata je i kao krupnik ili pir. Postoje različiti literaturni podaci o poreklu i širenju spelte (Andrews, 1964; Nezbitt i Samuel, 1996; Stallknecht i sar., 1996; Salamini i sar., 2002). Prema najnovijim istraživanjima smatra se da je spelta nastala na Bliskom Istoku 7000 godina pre nove ere, na području Transkavkazja, severno od Crnog mora, spontanom ukrštanjem travnih vrsta, odakle se migracijama stanovništva spontano širila ka Evropi i drugim krajevima sveta (Blatter i sar., 2004). Ovu izuzetno hranjivu vrstu pšenice koristili su u ishrani i stari Rimljani koji su je gajili u severno alpskim predelima i delovima Panonske nizije. Tri veka nakon Rimskog carstva proizvodnju su preuzela nemačka plemena pokraj Rajne i Dunava (Dark i Gent, 2001; Blagojević, 2012). U XII veku uticajna namačka misionaraka, nutricionista i zagovornik holističke medicine, St. Hildegard von Bingen, promovisala je blagodetna svojstva spelte kroz istoriju i mnogi proizvodi i dan danas nose ime po njoj (Portman, 1991).

Do početka dvadesetog veka, spelta je bila glavna žitarica u proizvodnji hleba pretežno u zemljama srednje Evrope (alpska područja Nemačke, Austrije i Švajcarske). U tom periodu, kod nas najviše je gajena u brdsko-planinskom području Raške oblasti (Miržinska i Miladinović, 1956). Vremenom, razvojem intenzivne poljoprivredne proizvodnje i stvaranjem modernih visokorodnih genotipova pšenice, ova vrlo značajna žitarica je skoro potpuno iščezla. Do polovine XX-og veka gajena je samo sporadično, na većim nadmorskim visinama i marginalnim područjima na kojima druga žita nisu uspevala.

Poslednjih nekoliko decenija, buđenjem ekološke svesti i povećanim interesovanjem za organskim proizvodima, spelta postaje sve atraktivija kultura na svetskom tržištu, pre svega u srednjoj i istočnoj Evropi kao i u severnoj Americi i Australiji. Vodeće zemlje u proizvodnji spelte su Nemačka, Belgija, Švajcarska, Austrija, Poljska, Slovenija, deo Španije i Italija (Cubadda i Marconi, 2002). Sve veća potražnja za alternativnim proizvodima iz održivih sistema proizvodnje, koji pružaju zdravstveni benefit i imaju dodatnu vrednost, doveli su do toga da je spelta postala proizvod tržišne niše (Shober i sar., 2006). Zbog svojih agronomskih, prehrambenih i medicinskih karakteristika proizvodnja spelte ima

tendenciju konstantnog porasta (Troccoli i Cordianni, 2005). Spelta, kao i ostala prava žita, ima značaj i u stočarskoj industriji (Abdel-Aal i Wood, 1998). Može se gajiti u kombinaciji sa mahunarkama za proizvodnju sveže biomase ili sena. Slama se koristi kao prostirka u stočarskim objektima ili u industrijskoj preradi kao sirovina za dobijanje celuloze, metil alkohola i dr. Takođe, spelta i njeni nus proizvodi predstavljaju značajan resurs za proizvodnju biomase i imaju veliki potencijal za upotrebu u održivim sistemima obnovljive enegije (Brelk i sar., 2012).

2.1.1. Agronomske karakteristike spelte

Spelta (*Triticum aestivum* ssp. *spelta* L. syn *Triticum spelta* L.) je podvrsta hlebne, meke pšenice koja pripada heksaploidnoj grupi gajenih vrsta roda *Triticum*. Većina naučnih radnika (Percival, 1921; McFadden i Sears, 1946; Kuckuck, 1959; Helbaek, 1960, Endruz, 1964; Nezbitt i Sammuel, 1996; Gonachrov, 2011; Hammer i sar., 2011; Dvorak i sar., 2012) slažu se da je spelta predak obične, hlebne pšenice (*Triticum aestivum* L.). Morfološki, spelta se od hlebne pšenice razlikuje po tankom, viskom stablu, koje je sklono poleganju. Klasovi su dugački, rastresiti, bez osja i sa lomljivim klasnim vretenom (Onishi i sar., 2006). Prilikom zrenja, klasovi se raspadaju na klasiće u kojima se nalaze dva do tri zrna koje su čvrsto obavijena plevičastim omotačima (slika 1). Udeo plevičastih omotača u klasićima se kreće od 21–32% i prvenstveno je sortna karakteristika (Percival, 1921). Konvalina i sar. (2010) navode da je prosečan udeo plevičastih omotača u ukupnom prinosu zrna 15 različitih genotipova spelte bio 30.67%. Slične vrednosti za domaće populacije saopštili su i Medović (2003) - 25% do 35%, kao i Bodroža-Solarov i sar. (2010a)- 22,7%-28,3%. Ova osobina spelte smanjuje prinos zrna i uveliko otežava žetvu. Stoga, pre procesa prerade, neophodno je ljušćenje plevičastih omotača što dodatno poskupljuje troškove u proizvodnji (Campbell, 1997; von Büren i sar., 2001). Međutim, pojedini literaturni podaci ukazuju na to da upravo ova morfološka karakteristika utiče na povećanu rezistentnost spelte prema bolestima i štetočinama (Riesen i sar., 1986; Bodroža-Solarov i sar., 2010a). Veliki broj autora je ustanovio da su plevičaste forme žita generalno otpornije na gljivična oboljenja (Kema, 1992; Adler i sar., 2003; Khatibi 2012). Do sada je na spelti proučavana kontaminacija vrstama roda *Fusarium* (Moudry i sar., 2009; Suchowilska i sar., 2010; Wiwart i sar., 2009; Bodroža-Solarov i sar., 2010a, Konvalina i sar., 2010), *Penicillium* (Elmholt i Rasmussen, 2004) i *Puccinia* (Kema i Lange, 1992; Wang i sar., 2010; Konvalina i sar., 2010) prilikom čega su svi navedeni autori ustanovili veću rezistentnost spelte na ispitivane patogene. Takođe, Riesen i sar. (1986) su uočili veću otpornost spelte i prema zemljišnim patogenima.

Pojedini autori bavili su se ispitivanjima genetičkih markera koji utiču na otpornost spelte prema različitim patogenima (Dyck i Sykes, 1994; Keller i sar, 1999, Sun i sar., 2002). Međutim, postoji vrlo malo literaturnih podataka u kojoj meri plevičasti omotači utiču na otpornost spelte prema patogenim gljivama. U istraživanjima Bodraža-Solarov i sar. (2010b) i Almaši i sar. (2010) ispitivani su zaštitni uticaj plevičastih omotača na skladišne štetočine i zaključeno je da pirinčani žižak (*Sitophilus oryzae* Linneaeus) ne može da se hrani i razmnožava na plevičastim plodovima spelte. U prilog tvrdnjama da plevice predstavljaju zaštitne barijere koje poboljšavaju zadržavanje hranljivih materija u zrnu i produžavaju njegovu svežinu, govore i istraživanja Solarske i sar. (2012) koji navode da plevičasti omotači predstavljaju barijere i za kontaminante kao što su ostatak pesticida i teški metali.



Slika 1. Plevičasto i oljušteno zrno spelte (Ugrenović, 2013)

Sa agroekološkog stanovišta, spelta, za razliku od hlebne pšenice, ima izrazito skromne zahteve prema klimatskim i zemljišnim činiocima i agrotehnici (Gomez-Becerra i sar., 2010). Istraživanja koje su sprovodili Castagne i sar. (1996) i Koutroubas i sar. (2011) o mogućnostima gajenja spelte na području Mediterana ukazuju da se spelta može uspešno gajiti u marginalnim područjima i na višim nadmorskim visinama. To potvrđuju i istraživanja Glamočlija i sar. (2010), Ugrenović i sar., (2012) i Dolijanović i sar. (2012, 2013) u Srbiji. Zahvaljujući visokoj tolerantnosti i prilagodljivosti na različite uslove proizvodnje, kao i prirodnoj tolerantnosti na bolesti i štetočine, brojna istraživanja potvrđuju da spelta ima veliki potencijal za gajenje u održivim i *low-input* sistemima gajenja (Ruegger i Winzler, 1993; Stalenga i Jonczyk, 2004; Bavec i Bavec, 2006; Bodroža-Solarov i sar., 2009, Lacko-

Bartošová i sar., 2010; Ugrenović i sar., 2010). Takođe, stabilni prinosi u različitim agroekološkim uslovima čine ovu žitaricu izuzetno značajnom u svetlu tendencije klimatskih promena. Zbog svoje genetičke divergentnosti, spelta je značajna i sa stanovišta povećanja agrobiodiverziteta (Moudry i sar., 2011), što je još jedan od faktora koji ukazuje da je ova kultura posebno interesantna za ekološke sisteme gajenja. Sve gore navedene činjenice ukazuju na to da je spelta kultura koja ima niz preduslova i veliki potencijal za organsku proizvodnju.

2.1.2. Prometni i tehnološki kvalitet spelte

Hranjiva vrednost spelte ogleda se u visokom sadržaju nutritivnih komponenti koji stimulišu imunološki sistem organizma i imaju niz pozitivnih uticaja na zdravlje ljudi.

Veliki broj literaturnih navoda saopštio je da spelta ima veći sadržaj proteina (oko 10-25%) u odnosu na hlebnu pšenicu (Abdel-Aal i sar., 1995, 2002; Ranhotra i sar., 1995, 1996; Grela i sar., 1996; Piergiovanni i sar., 1996; Jorgensen i sar., 1997; Marconi i sar., 1999, 2002; Moudry i sar., 1999; Bonafaccia i sar., 2000; Matuz i sar., 2000; Abdel-Aal i sar., 2002; Kohajdova i Koravičova, 2007; Bonafaccia et al., 2009; Bodroža i dr., 2009; Pasqualone i sar., 2011; Escarnot i sar., 2012; Filipčev i sar., 2013). Pruska-Kedzior i sar. (2008) su pronašli signifikantno veći sadržaj proteina u brašnu spelte u odnosu na brašno hlebne pšenice, što su potvrdili Wilson i sar. (2008). U različitim naučnim publikacijama saopštene su veoma varijabilne vrednosti sadržaja proteina spelte, što je generalno bilo uslovljeno različitim sortimentom i uslovima gajenja (Dupont i sar., 2003, Bodroža-Solarov i sar., 2009; Filipčev i sar., 2013). Prema Ugrenoviću (2013) sadržaj proteina spelte u različitim rokovima setve kretao se od 17,5% do 18,1%.

Veći sadržaj proteina dovodi do sporije sedimentacije, odnosno uslovljava veće sedimentacione vrednosti kod spelte u odnosu na hlebnu pšenicu. Kako navode Filipčev i sar. (2013) gluten indeks kod spelte je znatno manji u poređenju sa hlebnu pšenicom, što je indikator siromašnog kvaliteta glutena kod spelte. To potvrđuju Schober i sar. (2006) kao i Pruska-Kedzior i sar. (2008) koji tvrde da uprkos većem sadržaju proteina i glutena, kvalitet glutena spelte je lošiji u odnosu na hlebnu pšenicu, tako da daje mekše, manje elastično, lepljivo i manje stabilno testo. Proteini žitarica se karakterišu malim sadržajem esencijalnih amino kiselina, naročito lizina i treonina, ali sa druge strane bogati glutaminskom kiselinom i prolinom, glavnim aminokiselinama u formiranju testa (Abdel-Aal i sar., 2002). Kako navode Ranhotra i sar. (1995), Grela i sar. (1996), Bonafaccia i sar. (2000), Abdel-Aal i sar.

(2002) aminokiselinski sastav spelte se neznatno razlikuje u odnosu na hlebnu pšenicu. Spelta ima više prolina (Jorgensen i sar., 1997), glutaminske kiseline (Jorgensen i sar., 1997; Abdel-Aal i sar., 2002), tirozina (Ranhotra i sar., 1995; Jorgensen i sar., 1997) i asparaginske kiseline (Ranhotra i sar., 1995).

Različite studije su pokazale da ne postoji velika razlika u sadržaju ukupnih ugljenih hidrata, skroba i prostih šećera između brašna od celog zrna hlebne pšenice i brašna od celog zrna spelte (Abdel-Aal i sar., 1995; Ranhotra i sar., 1995; Grela, 1996; Ranhotra i sar., 1996; Zorb i sar., 2007, Escarnot i sar., 2012).

Uprkos tome, brojna istraživanja potvrđuju da je spelta bogatija lipidima od hlebne pšenice (Abdel-Aal i sar., 1995; Ranhotra i sar., 1995; Grela, 1996; Ranhotra i sar., 1996; Ruibal-Mendieta i sar., 2002; Ruibal-Mendieta i sar., 2005). Ova zapažanja vode ka zaključku da je klica prisutna u većem udelu u spelti nego u hleboj pšenici (Marconi i sar., 1999). Dominantne masne kiseline kod hlebne pšenice i spelte su linoleinska, palmitinska, oleinska i linoleinska (Grela, 1996; Ruibal-Mendieta i sar., 2005). Pri komparativnoj analizi nutritivnog sastava spelte i hlebne pšenice Grela (1996) je saopštio da je sadržaj oleinske kiseline u masnim kiselinama veći kod spelte (20,40%) nego kod hlebne pšenice (11,30%), za razliku od linolne i linoleinske kiseline kojih ima manje kod spelte. Zasićene masne kiseline se nalaze više u hleboj pšenici nego u spelti i to u procentu od 19,8% u hleboj odnosno 18,9% u spelti. U ispitivanjima Marques i sar. (2007) udeo mononezasićenih masnih kiselina u speltinom brašnu bio je dva puta veći u odnosu na pšenično brašno. Ranhotra i sar. (1995) zaključuju da s obzirom da je speltino zrno bogatije mastima, skrobom i šećerima, ono sadrži oko 3% više energije nego hlebna pšenica. Veći sadržaj lipida i nezasićenih masnih kiselina u zrnu i brašnu spelte u poređenju sa hleboj pšenicom dokazali su i Bodroža-Solarov i sar. (2014) ekstrakcijom liposolubilnog dela GC-MS metodom, koja uz primenu multivariacione statistike ujedno predstavlja i novu metodu za dokazivanje autentičnosti speltinog brašna, što je naročito značajno imajući u vidu veću tržišnu cenu speltinog brašna u odnosu na pšenično.

Visok sadržaj mineralnih elemenata i bolja biološka raspoloživost usled niskog sadržaja fitinske kiseline predstavlja veliku prednost spelte nad hleboj pšenicom (Lopez i sar., 2002). Veliki broj autora utvrdio je komparativnom analizom da spleta ima u proseku 30-60% veću koncentraciju gvožđa, cinka, bakra, magnezijuma i fosfora (Ranhotra i sar., 1995; Grela, 1996; Piergiovanni i sar., 1997; Ruibal-Mendieta i sar., 2005; Zieliński i sar., 2008).

U pogledu sadržaja vitamina A, D i E grupe nisu zabeležene značajnije razlike između spelte i hlebne pšenice (Abdel-Aal i sar., 1995; Kohajdová i sar., 2008).

Analiza vlakana spelte u odnosu na hlebnu pešnicu pokazala je da spelta ima viši sadržaj rastvorljivih vlakana i lignina (Marconi i sar., 1999) dok je siromašnija hemicelulozom i celulozom (Escornot i sar., 2010).

Upravo zbog ovih nutritivnih svojstava, spelta se koristi kao poboljšivač kvaliteta i ukusa pšeničnog hleba i drugih hlebno-pekarskih proizvoda (Galova i Knodlochova, 2000). Bogata hranjiva svojstva zrna spelte, kao i niz preduslova za gajenje u sistemu organske proizvodnje, čini ovu žitaricu pogodnom za proizvodnju širokog spektra organskih i tradicionalnih prehrambenih proizvoda visoke nutritivne vrednosti (Gomez-Becerra i sar., 2010). Pored hleba i peciva, spelta se koristi za proizvodnju muslija, pasti, mekinja, krepera (Abdel-Aal, 1998, Marquew i sar., 2007). U istraživanjima uticaja različitih sistema poljoprivredne proizvodnje (konvencionalne, integralne, organske, i biodinamičke) na parametre tehnološkog kvaliteta splete, Grobelnik-Mlakar i sar. (2014) su zaključili da način proizvodnje ne utiče na kvalitet spelte, te da održivi i *low-input* sistemi proizvodnje kao što su organska i biodinamička proizvodnja omogućavaju proizvodnju zrna dobrog tehnološkog kvaliteta zrna i optimalnih pecivnih osobina.

Komparativni pregled najznačajnijih agronomskih i tehnoloških parametara spelta u odnosu na hlebnu pšenicu prikazan je u tabeli 1.

Tabela 1. Komparativni prikaz najznačajnijih agronomskih i tehnoloških pokazatelja spelte u odnosu na hlebnu pšenicu

	Spelta	Hlebna pšenica	Literaturni izvor
Botanički naziv	<i>Triticum aestivum</i> ssp. <i>spelta</i>	<i>Triticum aestivum</i>	Mac Key (2005)
Stablo	Tanko visoko sklono poleganju	Relativno čvrsto	Mielke i Rodemann (2007)
Cvet	Klas dugačak, rastresit, bez osja, sa lomljivim klasnim vretenom i naizmenično raspoređenim petocvetnim klasićima u kojima se nalaze 2-3 zrna	Klas rastresit, bez osja (ako ima ono je katko i lepezasto), sa 2-7 cvetova u jednom klasiću	Onishi i sar. (2006); Ugrenović (2013)
Plod	Zrno čvrsto obavijeno plevičastim omotačima (25-35%)	Zrno sa plevicama koje se lako odstranjuju	Mlinar i Ilić (2012); Ugrenović (2013)
Proteini	Veći sadržaj proteina (15.6-19.5%)	Manji sadržaj proteina (14,9%)	Abdel-Aal i sar. (2008), Pasqualone i sar. (2011)

Ugljeni hidrati	Nema razlike	Nema razlike	Zorb i sar. (2007); Escarnot i sar. (2012)
Lipidi	Više lipida i nezasićenih masnih kiselina	Manje lipida i nezasićenih masnih kiselina	Ruibal-Mendieta i sar. (2002, 2005); Bodroža-Solarov i sar. (2014)
Minerali	Veći sadržaj Fe, Zn, Cu, Mg i P	Manji sadržaj mikroelemenata u odnosu na spletu	Ranhotra i sar. (1995); Zieliński i sar. (2008)
Vlakna	Viši sadržaj rastvorljivih vlakana i lignina	Viši sadržaj hemiseluloze i celuloze	Marconi i sar., (1999); Escornot i sar. (2010)
Vitamini A, D, E grupe	Nema značajnijih razlika	Nema značajnijih razlika	Kohajdová i sar., 2008

2.2. Gljive roda *Alternaria*

2.2.1. Sistematika roda *Alternaria*

Rod *Alternaria* prvi put je opisan 1816. god. (Nees von Esenbeck, 1816-1817) sa *A. tenuis* kao tipičnim i jedinim članom. Dijagnostičke osobine ovog roda podrazumevale su obrazovanje lanaca tamno obojenih višćelijskih konidija sa longitudinalnim i transverzalnim septama (feodiktiospore) i kljunasto zašiljenim apikalnim ćelijama. Iz kompleksa vrsta gljiva sa feodiktiospornim konidijama, koje su svrstane u rod *Alternaria*, tokom istorijskog razvoja klasifikacije, prvo je izdvojen rod *Macrosporium* (Fries, 1832, loc. cit. Rotem, 1994). Međutim kasnije, su istraživači (Wiltshire, 1933, loc. cit. Rotem, 1994) zaključili da su ova dva roda ista i da ime *Alternaria* bolje odgovara. Nakon toga je potisnut naziv *Macrosporium*. Istorijske polemike oko taksonomije roda *Alternaria* najbolje potvrđuju činjenice da su mnoge "atipične" vrste ovog roda od svog otkrića bile svrstane u više rodova istovremeno. Od tog vremena pa do danas, klasifikacija pojedinih izolata gljiva sa osobinama koje odgovaraju najširem opisu za rod *Alternaria*, ostala je teška i komplikovana.

Postoji više različitih klasifikacija roda *Alternaria*, a najčešće se navodi sledeća (Bulajić, 2006; Battilani i sar., 2009; USDA ARS Fungal Database):

Carstvo: *Fungi*

Razdeo: *Ascomycota*

Klasa: *Euascmycetes*

Red: *Pleosporales*

Familija: *Pleosporaceae*

Rod: *Alternaria*

Obzirom da kod većine *Alternaria* vrsta nije identifikovan polni stadijum, ovaj rod je klasifikovan u zbirnu grupu *Deuteromycetes (Fungi Imperfecti-nesavršene gljive)* (Thomma, 2003; Balaž i sar., 2010 b). Cooke i sar. (1998) i Thomma (2003) smatraju da neke vrste roda *Alternaria* predstavljaju bespolni stadijum askomiceta *Pleospora*, dok se za druge spekuliše da su anamorfi *Clathrospora* i *Leptosphaeria* (Battilani i sar., 2009). Iako kod većine *Alternaria* vrsta nije utvrđen polni stadijum, poznati telemorfi *Alternaria* pripadaju rodu askomiceta *Lewia* Barr&Simmons (Ivanović i Ivanović, 2001; Simmons, 2007).

Rod *Alternaria* obuhvata veliki broj izrazito varijabilnih i široko rasprostranjenih vrsta. Procenjuje se da postoji nekoliko stotina vrsta ovog roda (Rotem, 1994). U prirodnoj populaciji vrsta *Alternaria* postoji puno prelaznih oblika, čije se pojedine osobine ponekad preklapaju sa osobinama druge vrste istog roda. Zbog varijabilnosti njihovih morfoloških osobina, taksonomija vrsta *Alternaria* je veoma složena. Rotem (1994) navodi da čak i katenulacija kod nekih izolata nekih vrsta može biti promenljiva u odnosu na uslove gajenja. Pored uslova spoljašnje sredine, na morfološku varijabilnost konidija utiču i unutrašnji faktori. U skladu sa tim, sistematika i klasifikacija ovih gljiva je veoma složena i u velikoj meri i danas nepotpuno rešena (Pryor i Michailides, 2002; Simmons, 2007).

Različite vrste roda *Alternaria* bile su čest predmet proučavanja istraživača iz celog sveta. Najpre je Elliot 1917. god. predložio da se vrste roda *Alternaria* grupišu u šest podgrupa na osnovu zajedničkih karakteristika konidija u pogledu dužine, širine i septiranosti. Neergard (1945) je zatim sugerirao da se formiraju tri grupacije na osnovu lanaca konidija različitih dužina i to na vrste sa dugačkim lancima (*Longicatenateae*), kratkim lancima (*Brevicatenateae*) i vrste sa jednostrukim kondijama (*Noncatenateae*). Simmons je 1992. god preuzeo oba koncepta i organizovao rod *Alternaria* u 14 podgrupa na bazi karakteristika konidija i izgleda formiranih lanaca (Simmons, 1992).

Kako navodi Bulajić (2006) važni morfološki kriterijumi koji odvajaju vrste unutar roda *Alternaria* uključuju veličinu konidija, odnos dužine/širine konidija, izgled površine konidije, ornamentaciju, prisustvo i dužinu kljuna, septiranost (stepen i vidljivost) konidija i način katenulacije (stepen i način trodimenzionalne sporulacije).

Klasifikacija vrsta u okviru roda *Alternaria* je veoma kompleksna. U literaturi se navode različite grupacije od kojih je najprihvatljivija sledeća podela (Andersen i sar., 2001, 2002 i 2009; Serdiani i sar., 2002; Polizzotto i sar., 2012):

- *A.alternata* grupa (pripadaju vrste: *A. alternata*, *A. tenuissima*, *A. arborescens*, *A. destruens*, *A. longipes*, *A.gaisen*, *A.citri*)

- *A. radicina* grupa (pripadaju vrste: *A. radicina*, *A. carotiincultae*, *A. petroselini*, *A. selini*, *A. smyrnii*)

- *A. porri* grupa (pripadaju vrste: *A. dauci*, *A. crassa*, *A. macrospora*, *A. porri*, *A. solani*, *A.tomatophila*)

- *A. infectoria* grupa (pripadaju vrste: *A.arbusti*, *A. ethzedi*, *A. infectoria*, *A. metachromatica*, *A.conjuncta*, *A.oregonensis*, *A. photistica*, *A. triticimaculans*, *A. triticina*, *A. viburni*, *A.intercepta* i *A.novae-zelandinae*)

Vrste koje pripadaju grupi *A. alternata* proizvode mikotoksine kao što su alternariol (AOH), alternariol metil etar (AME) i tenuazoičnu kiselinu i osim što narušavaju zdravlje biljaka, uzrokuju smanjenja kvaliteta gotovih proizvoda i dovode do značajnih ekonomskih gubitaka u proizvodnji i preradi. Vrste *Alternaria* iz grupe *A. porri* prouzrokuju oboljenja na mrkvi, crnom luku, krompiru i paradajzu i proizvođači su mikotoksina AOH, altertoksina i altersolanol. Grupi *A. radicina* pripadaju najznačajniji patogeni semena mrkve koji produkuju fitotoksične metabolite radicin i radicinol. Za razliku od prethodnih vrsta u grupi *A. infectoria* su saprofitni i endofitni paraziti strnih žita i skladištenih žitarica koji stvaraju metabolite infektopirone i novae-zelandin koji su specifični isključivo za ovu grupu i ne javljaju se kod drugih vrsta.

Na osnovu istraživanja osobina *Alternaria* spp. na različitim supstratima Andersen i sar. (2002) predlažu da se na osnovu sličnosti konidija mogu podeliti u tri grupe *A.infectoria*, *A. tenuissima* i *A. arborescens*. Takođe, analizom pomoću tečne hromatografije visoke performace (High Performance Liquid Chromatography-HPLC metoda) ovi autori utvrdili su da se *A .infectoria* grupa znatno razlikuju na osnovu hemijskih metabolita od druge dve

grupe (Andersen i sar., 2015). Na osnovu rezultata dobijenih sekvencioniranjem nukleotida (Woudenberg i sar., 2013) a s obzirom da nisu utvrđene varijabilnosti na molekularnom nivou (Andrew i sar., 2009), nedavna molekularna istraživanja su predložila grupisanje *A. arborescens* i *A. tenuissima* grupacija sa vrstama iz grupe *A. alternata* (Lawrence i sar., 2013), koju čini više od 50 vrsta.

Simmons (2007) smatra da je za taksonomiju i klasifikaciju gljiva iz bilo kog roda, pa tako i iz roda *Alternaria*, neophodno da se poveže ime neke vrste sa stalnim morfološkim osobinama, kao i sa biologijom te vrste, odnosno patogenošću, reprodukcijom, fiziologijom i drugim osobinama, te i da savremene metode identifikacije zahtevaju detaljnija proučavanja radi utvrđivanja morfoloških i fizioloških osobina kao i filogenetske pripadnosti.

2.2.2. Značaj roda *Alternaria*

Vrste roda *Alternaria* su izraziti kosmopoliti sa izuzetnom sposobnošću prilagođavanja različitim uslovima spoljašnje sredine. Mogu se naći kako u vlažnim tako i u semi-aridnim regionima gde napadaju brojne kulture. Veliki broj saprobnih vrsta izolovan je sa niza supstrata uključujući biljke, zemljište i različite materijale, a smatra se da imaju ulogu u procesu razgradnje organske materije (Thomma, 2003). Međutim, pojedine vrste imaju izrazito fitopatogeni potencijal i mogu prouzrokovati ekonomski značajna oboljenja biljaka. Kao biljni patogeni, *Alternaria* spp. su prouzrokovatori karakterističnog oboljenja poznatog kao crna pegavost i javljaju se na velikom broju biljnih vrsta napadajući listove, stabljike, cvetove i plodove. Glavni su kontaminanti pšenice, ječma, raži i ovsu (Culshaw i sar., 1988; Kwasna i Kosiak, 2003; Kosiak, 2004; Medina i sar., 2006, Zur i sar. 2002; Mercado Vergnes i sar, 2006; Bensassi i sar., 2009; Tóth i sar., 2011; Andersen i sar., 2015). Pored žitarica, vrste roda *Alternaria* su registrovane i na uljanim kulturama (suncokret, uljana repica) (Meena i sar., 2010; Udayashankar i sar., 2012; Wang, 2014) kao i na paradajzu (Somma i sar., 2009; Pose i sar., 2010, Noser i sar., 2011; Andersen i sar., 2015), paprici, krompiru (Edin, 2012; Zheng i sar., 2014), kupusnjačama (Guillemette i sar., 2004), mrkvi (Konstantinova i sar., 2002; Pryor i Gilbertson, 2002; Farrar i sar., 2004), jabukama (Johnson i sar., 2000; Reuveni i sar., 2002; Serdiani i sar., 2002; Ntasiou i sar., 2015), jagodičastom voću (Tournas i Katsoudas, 2005; Andersen i sar., 2015), vinovoj lozi (Swart i Holz, 1994) citrusima (Magnani, 2007), maslinama (Visconti i sar., 1986) i drugom voću i povrću (Mmbaga i sar., 2001, Lagauskas i sar., 2006). Javljaju se i kao važni prouzrokovatori

bolesti pri gajenju u zatvorenom prostoru (Agostini i sar., 2003). *Alternaria* spp. su značajni patogeni i uskladištenih proizvoda i mogu uticati na smanjenje kvaliteta gotovih proizvoda od 20-40% (de Miranda i sar., 2006; Pavón i sar., 2010).

Zabeleženo je preko 4000 kombinacija *Alternaria*/domaćin (USDA ARS Fungal Database) i kako navodi Pryor (2011) ovaj rod je na desetom mestu po ukupnom broju zabeleženih domaćina, od ukupno opisanih 2000 rodova gljiva. Nasuprot, fitopatogenim osobinama, nekoliko *Alternaria* spp. su pokazale pozitivne rezultate kao biološki agensi protiv određenih korova ili kao mikroparaziti drugih patogenih gljiva (Ghorbani i sar., 2000; Babu i sar., 2003; El Morsy i sar., 2006)

Alternaria spp. su značajni prouzrokovaci bolesti biljaka i u Srbiji, kako u polju, tako i u skladištu. Najčešće opisane vrste zabeležene kod nas su prouzrokovaci crne pegavosti lišća krompira, paradajza i drugih biljaka iz familije *Solanacea* (Ivanović i sar., 1999; Rajković i sar., 1999; Stojanović, 2004; Rekanović i sar., 2004), zatim na povrtarskim i začinskim biljakama familije *Apiaceae* (Ivanović i Mijatović, 2003; Bulajić i sar., 2006), na lubenici i dinji (Duduk i sar., 2002), kupusnjačama (Antonijević, 2000, 2007), uljanim kulturama (Maširević i Jasnić, 2006; Jasnić i sar., 2011), šećernoj repi (Stojšin i sar., 2006); jabukama (Bulajić i sar., 1996) i drugim biljnim vrstama. Na dominantnost ove mikopopulacije na strnim žitima ukazuju višegodišnja istraživanja autora Ivanović i sar. (2001), Balaž i sar. (2003, 2010 a), Bagi i sar. (2005).

Više autora bavilo se proučavanjem antifungalne aktivnosti etarskih ulja iz lekovitog bilja na *Alternaria* vrste (Simić i sar., 2001; Soković i i sar., 2007; Džamić i sar., 2008; Jošić i sar., 2011; Mašković i sar., 2011), kao i suzbijanjem i različitim aspektima kontrole fitopatogenih gljiva iz roda *Alternaria* (Šmit-Klokočar i sar., 2001).

Ekonomski gubici strnih žita kontaminiranih *Alternaria* spp. su uglavnom manji u poređenju sa drugim patogenima i ne ogledaju se u tolikoj meri u smanjenju prinosa, koliko u gubicima koji nastaju u postžetvenim delatnostima, tokom transporta i skladištenja (Ostry, 2008). Kosiak i sar. (2004) ističu da se negativan uticaj *Alternaria* spp. ogleda pre svega u smanjenju prometnog i tehnološkog kvaliteta žitarica usled opadanja nutritivne vrednosti, promene boje i ukusa. To potvrđuju i Šarić i sar. (2008) i Balaž i sar. (2011) koji navode da prisustvo ovih patogena značajno utiče na promenu biološkog kvaliteta zrna, odnosno da jaka infekcija ovim gljivama može da ima katastrofalne posledice na semenski kvalitet i mogućnost reprodukcije. Tokom višegodišnjih istraživanja u Argentini Perelló i Larran

(2013). su uočili ekonomski značaj uticaja *Alternaria* spp. na smanjenje energije semena pšenice a što se negativno odražava na klijanje i nicanje. Do sličnih zaključka su došli i Rajput i sar. (2005) u Pakistanu, gde su *Alternaria* spp. uzrokovale smanjenje klijanja zrna za čak 82% i takođe su negativno uticale na energiju semena.

Pored šteta kao primarni paraziti, značaj vrsta *Alternaria* se ogleda u tome što ovi mikroorganizmi spadaju među najproduktivnije proizvođače mikotoksina i domaćin-specifičnih fitotoksina (Magan i sar., 1984; Logrieco i sar., 2009; Amatulli i sar., 2013). *A. alternata* ima sposobnost sinteze specifičnih fitotoksina koji su detektovani na jabukama, kruškama, citrusima, duvanu i paradajzu (Otani i sar., 1995; Strange, 2007). Suprotno fitotoksinima, mikotoksini nisu specifični za određenu biljnu vrstu, njih sintetiše veliki broj *Alternaria* spp. na različitim kulturama, što može dovesti do akumulacije kako u sirovim tako i u prerađenim biljnim proizvodima. Stoga, pojava *Alternaria* toksina u prehrambenim proizvodima i hrani za životinje predstavlja vrlo značajan problem sa aspekta zdravstvene bezbednosti (Loiveke i sar., 2004). U prilog tome govori i nedavno objavljena studija Evropske uprave za bezbednost hrane (EFSA, 2011) koja ističe neophodnost monitoringa *Alternaria* toksina u prehrambenim proizvodima i hrani za životinje i procene rizika na zdravlje ljudi.

U humanoj medicinskoj mikologiji gljive roda *Alternaria* privlače pažnju kao noviji patogeni, naročito kod pacijenata sa imunodeficijencijom, a u pojedinim slučajevima zaraze mogu imati i fatalne posledice (Fernandez-Cruz i sar., 2011). Takođe, spore *Alternaria* spp. imaju alergeno dejstvo, uzrokovano glikoproteinom ALTa1 i kod osetljivih osoba mogu uticati na smetnje u respiratornom sistemu, kao i na razvoj astme kod dece (Corden i sar., 2003; Kilic i sar., 2010). Smatra se da su ovi patogeni čest uzrok pojave "pekarske astme" usled prisustva ovih patogena u pekarama (Klaustermeyer i sar., 2006). Kako navodi Linas i sar. (1998) ove spore mogu prouzrokovati infekcije, koje se manifestuju kao epidermalna oštećenja i najčešće se javljaju kod pacijenata sa slabo kontrolisanim dijabetesom ili koji primaju terapiju kortikosteroidima.

Iz svega navedenog, može se zaključiti da su *Alternaria* spp. od izuzetnog značaja sa agronomskog, tehnološkog, medicinskog i ekonomskog aspekta, što opravdava činjenica da je u poslednjih četrdeset godina objavljeno više od 3000 publikacija sa osvrtom na rod *Alternaria* (Simmons, 2007).

2.3. Pojava i rasprostranjenost *Alternaria* vrsta na strnim žitima

Rod *Alternaria* pričinjava velike štete širom sveta. Obzirom na varijabilnost fitopatogenih vrsta, značaj i štetnost zavise pre svega od vrste ovog patogena. *A.triticina* pojavila se još 1924.god. u Indiji, ali joj se nije pridavao veliki značaj, sve do 50-tih godina prošlog veka kada je postala široko rasprostranjena. Opisana je 60-tih godina XX veka kao folijarni patogen na brojnim vrstama iz familije trava (*Poaceae*), pričinjavajući štete pre svega u južnoj, istočnoj i centralnoj Aziji (Prasada i Prabhu, 1963.). Naročito su osetljive stare sorte durum pšenice. Danas je prisutna u Argentini, Indiji, Italiji, Meksiku i severnoj Africi gde ima visok fitosanitarni značaj. Novija istraživanja pokazuju da genotipovi pšenice iz Južne Azije i Meksika su otporne na *A.triticina*, sugerirajući da ovaj patogen ne prouzrokuje ekonomski značajne štete na savremenim sortama pšenice (Diekmann i Putter, 1995). Pored oštećenja na listovima, mnoge *Alternaria* vrste napadaju zrna gde prouzrokuju znatno veće gubitke.

U mnogim zemljama širom sveta na strnim žitima opisan je veći broj infektivnih vrsta roda *Alternaria* kao što su: *A.alternata*, *A.triticola*, *A.tenuissima*, *A.metachromatica*, *A.fruventi*, *A.oregonensis*, *A.triticimaculens*, *A.californica*, *A.longissima*, *A.triticina*, *A.arborescens*, *A.tenuissima*, *A.graminicola*, *A.infectoria* (Simmons 2007). Logrieco i sar. (1990, 2003) objavili su da u zemljama Mediterana na strnim žitima dominiraju vrste *A.triticina* i *A.alternata*. Isti autori zabeležili su *A.tenuissima* i *Alternaria* stadijum vrste *Pleospora infectoria*. Kosiak i sar. (2004) su na pšenici u Norveškoj uočili da dominantne *Alternaria* vrste pripadaju grupi *A.infectoria*, za kojom sledi *A.tenuissima*, mada se mogu naći i vrste iz grupe *A.arborescens* i *A.alternata*. Ovi autora su opisali i dve nove vrste, od kojih je na ovsu identifikovana *Lewia avenicola* sa *Alternaria* anamorfom *A.avenicola* (Kwasna i Kosiak, 2003), dok je na ječmu opisana vrsta nalik vrsti *Lewia infectoria*, od koje se razlikuje po *Alternaria* stadijumu i metaboličkom profilu (Kosiak i sar., 2002). Lõiveke i sar.(2004) saopštili su da se u Estoniji, najčešće javljaju *A.alternata* i *A.tenuissima*. Slična zapažanja objavili su i Bensassi i sar. (2009) koji su na pšenici u Tunisu identifikovali vrste *A.alternata*, *A.tenuissima* i *A.japonica*. U Argentini su zabeležene vrste *A.tenuissima*, *A.alternata*, *A.longipes*, *A.arborescens*, *A.gaisen* i *A.mali* (Gonzales i sar., 1998; Patriaca i sar., 2007) kao i *A.triticimaculans* (Perelló i Mónaco, 2007) i *A.infectoria* (Oviedo i sar., 2013, Andersen i sar., 2015). Toth i sar. (2011) su nedavno na pšenici u Mađarskoj izolovali novu

vrstu *A. hungarica*, koju su opisali kao patogena na lišću pšenice od slabijeg ekonomskog značaja.

U višegodišnjim ispitivanjima mikopopulacije semena strnih žita sa većeg broja lokaliteta u Srbiji, Balaž i sar. (2003, 2008) i Bagi i sar. (2005) su naveli da su najzastupljenije bile gljive roda *Alternaria* (60-70% mikopopulacija) pored rodova *Fusarium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium* i *Mucor*. U regionu Pančevačkog rita, registrovane su vrste *A. alternata* i *A. longipes* (Ivanović i sar., 2001).

Prema literaturnim podacima na zrnu spelte je registrovano prisustvo *Alternaria* spp. u Italiji (Castoria i sar., 2005) i Poljskoj (Kurowski i Wysocka, 2009) gde je najčešće prisutna vrsta identifikovana kao *A. alternata*.

Sumarni podaci o rasprostranjenosti *Alternaria* spp. na strnim žitima su prikazani u tabeli 2.

Tabela 2. Rasprostranjenost *Alternaria* spp. na strnim žitima u svetu

Zemlja	<i>Alternaria</i> spp.	Literaturni izvor
Argentina	<i>A.tenuissima</i>	Patriaca i sar. (2007)
	<i>A.arborescens</i>	
	<i>A.gaisen</i>	
	<i>A.mali</i>	
	<i>A.triticimaculans</i>	Perelló i Mónaco (2007)
	<i>A.infectoria</i>	Oviedo i sar. (2013); Andersen i sar.(2015)
Estonia	<i>A.alternata</i>	Kütt i sar. (2010)
	<i>A.tenuissima</i>	
Izrael	<i>A.alternata</i>	Zur i sar. (2012)
Južna Azija	<i>A.triticina</i>	Mercado Vergnes i sar. (2006)
	<i>A.alternata</i>	
	<i>A.arborescens</i>	
	<i>A.tenuissima</i>	
Mađarska	<i>A.hungarica</i>	Toth i sar. (2011)
Mediterranske zemlje	<i>A.triticina</i>	Logriecco i sar. (1990, 2003)
	<i>A.alternata</i>	
	<i>A.tenuissima</i>	
Norveška	<i>A.infectoria</i>	Kossiak i sar. (2004)
	<i>A.tenuissima</i>	
	<i>A.alternata</i>	
	<i>a.aborescens</i>	
Poljska	<i>A.alternata</i>	Grabarkiewicz-Szczesna i sar. (1989); Kurowski i Wysocka (2009)

Rusija	<i>A.tenuissima</i>	Gannibal i sar. (2007)
Slovačka	<i>A.alternata</i>	Maškova i sar. (2012)
	<i>A.arborescens</i>	
	<i>A.infectoria</i>	
	<i>A.tenuissima</i>	
Srbija	<i>A.alternata</i>	Ivanović i sar. (2011); Vučković i sar. (2012)
	<i>A.tenuissima</i>	
	<i>A.longipes</i>	
Tunis	<i>A.alternata</i>	Bensassi i sar. (2009)
	<i>A.tenuissima</i>	
	<i>A.japonica</i>	

2.3.1. Simptomi bolesti

Alternaria spp. napadaju sve nadzemne organe strnih žita prouzrokujući oboljenje poznato kao mrka pegavost. Simptomi su očigledni na biljkama nakon žetve, te je izuzeteno teško registrovati oboljenje na zaraženim usevima u polju (Cromey i Mulholland, 1988). Inficirani delovi biljaka nekrotiraju i dobijaju crnu boju, što dovodi do raspadanja biljnog tkiva i inhibiranja fotosinteze. Usled infekcija, na zaraženom tkivu, formiraju se mrki koncentrični krugovi u kojima se nalaze toksični metaboliti. Pored ovih simptoma, na oštećenom tkivu formira se fina, crna paperjasta prevlaka kao rezultat sporulacije patogena (Laemmlen, 2001; Thomma, 2003).

Izgled pega zavisi pre svega od organa na kojima se formira. Prilikom infekcije klasa simptomi se najpre javljaju u vidu crne pegavosti, nakon čega dolazi do gubljenja margina i formiranja pega nepravilnog oblika sive do sivo crne boje (slika 2). Mrka boja klasa je često povezana sa i sa bolestima korena i stabla, što zajedno dovodi do prevremenog sazrevanja biljaka. Kasna žetva u vlažnim vremenskim uslovima dovodi do jačeg crnila na klasovima što uzrokuje promenu boje i crnilo zrna. Crna plesan na površini zrelih klasova registrovana je kod pšenice, raži, ječma i ovsa (Murray i sar., 2008).



Slika 2. Simptomi *Alternaria* spp. na klasu pšenice (Cereal Disease Encyclopedia, www.hgca.com)

Karakteristični simptom koji se javlja na zrnju žitarica je crna obojenost najčešće lokalizovana oko klice i po ivici zrna, koja sa razvojem oboljenja postepeno zahvata celu površinu zrna zadržavajući se samo na perikarpu (slika 3). Smatra se da je to rezultat aktivnosti enzima peroksidaza lociranih u aleuronskom omotaču, koji utiču na formiranje obojenih fenolnih jedinjenja (Lehmensiek i sar., 2004). U kasnijoj fazi zaraze, crna pegavost se širi zahvatajući celu površinu zrna. Za razliku od drugih patogena koji prouzrokuju slične simptome, *Alternaria* spp. se zadržava samo na perikarpu, dok *Helminthosporium* spp. i *Fusarium* spp. prodiru u endosperm uzrokujući šturost zrna (Prescott i sar., 1986; Culshaw i sar., 1988). Kada je infekcija lokalizovana oko klice i ne prelazi preko omotača perikarpa, moguće ju je odstraniti tokom procesa mlevenja. Kako navodi Mitchell (1985) mnogo je veće štete nastaju kada se infekcija proširi u unutrašnjost zrna i tada se ne može tako lako ukloniti. Brašno dobijeno od zaraženog zrna je tamnije boje što narušava kvalitet žita prilikom mlevenja i drugih tehnoloških procesa u preradi. Oštećenja na zrnju žitarica su ekonomski najznačajnija, te u zavisnosti od intenziteta zaraze, tamno obojena zrna su za tržište neprihvatljiva (Fernandez i Conner, 2011). Simptomi na zrnju se javljaju na svim strnim žitima, mada su najčešće inficirane pšenica i ječam. Durum pšenica se smatra naročito osetljivom.



Slika 3. Simptomi *Alternaria* spp. na zrnju pšenice (Fernandez i Conner, 2011)

Pored zaraze na klasovima, pojedine vrste roda *Alternaria* mogu prouzrokovati oboljenja u vidu mrke pegavosti i na listovima strnih žita. Najčešći prouzročivač ovog oboljenja, koje se najčešće se javlja u toplim klimatskim područjima južne i istočne Azije na osetljivim genotipima hlebne i durum pšenice, je *Alternaria triticina* (Prasada i Prabhua, 1962). Uprkos brojnim navodima iz različitih krajeva sveta o prisutnosti ovog patogena kao i nedavnoj morfološkoj (Dugan i Peever, 2002) i molekularnoj karakterizaciji (Mercado Vergnes i sar., 2006), Simmons (2007) i Mercado Vergnes i sar. (2006) smatraju da pouzdano i precizno identifikovana *A.triticina* dolazi iz Indije i Irana te da su u ostalim zemljama neophodni testovi provere patogenosti.

Ova vrsta je jedina od *Alternaria* spp. izolovanih sa lišća koja ima patogene osobine, za razliku od ostalih koje su saprobi (Mercado Vergnes i sar., 2006; Simmons, 2007). Crna pegavost lišća je često povezana sa rodom *Helminthosporium*, obzirom da se u okviru mrkih pega, *Alternaria* vrste nalaze zajedno u kompleksu sa *Cochliobolus sativus* i *Pyrenophora tritici-repentis*, stoga ih je teško razlikovati od ostalih prouzročivača pegavosti na lišću. Kako navode Mercado Vergnes i sar. (2006), simptomi *A.triticina* se javljaju na lišću u vidu malih (<1 mm), ovalnih, žućkastih hlorotičnih pega nepravilnog oblika. Simptomi se najpre javljaju na donjem lišću. Razvojem oboljenja, hlorotične pege postaju tamno braon do sive boje sa žutim marginama (slika 4). U uslovima velike vlažnosti crna praškasta masa konidija se može uočiti na površini zaraženih delova. U kasnijim stadijumima oštećenja zahvataju veće površine lista prilikom čega jače zaraženi listovi nekrotiraju i suše se, ponekad uzrokujući uvenuće biljaka (Chalkley, 2015). Domaćini *A. triticina* su pre svega hlebna i durum pšenica (Prasada i Prabhua 1962,; Mercado Vergnes i sar., 2006), mada je detektovana i na ječmu (Mehiar i sar., 1976), ovsu i raži (Logrieco i sar., 1990), kao i na starim vrstama pšenice *T. dicoccum* (Kulshrestha i Rao, 1976) i *T. sphaerococcum* (Kumar i sar., 1974a), *T. triticale* (Chaudhuri i sar., 1976).



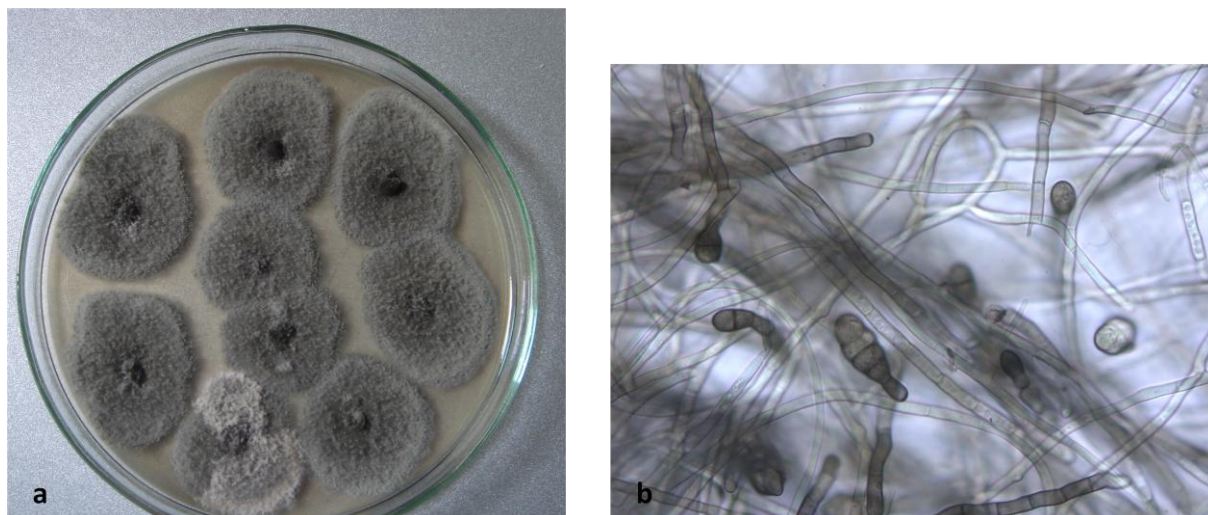
4. Simptomi *A.tritricina* na lišću pšenice (Perelló i Sisterna, 2008)

2.3.2. Osobine patogena, epidemiologija i ekologija

Ključna osobina roda *Alternaria* je formiranje velikih (7-10 x 23-34 μm), višćelijskih, tamno obojenih (melaniziranih) konidija sa poprečnim i uzdužnim septama (feodiktiospore). Konidije su šire u osnovi i postepeno se sužavaju ka izduženom kljunu, tako da imaju izgled kupe ili „buzdovana“. Juvenilne kondije su usko elipsoidnog oblika, a sa razvojem dobijaju tačkasto hrapavu teksturu i tamno maslinastu boju, sa 3-7 poprečnih i 1-5 uzdužnih septi. Dijagnostičke osobine roda *Alternaria* uključuju formiranje jednostrukih ili razgranatih nizova tamno obojenih višćelijskih konidija na kratkim, uspravnim konidioforama i kljunastim završecima na apikalnim ćelijama (slika 5 b). Pojedinačni lanci se sastoje od 5-15 konidija, dok kompleks razgranatih lanaca može sadržati 50-60 konidija. Konidiofore posamatrane na PCA supstratu (krompir-šargarepa agar) formiraju žbunaste forme koje se sastoje od 4-8 krupnih lanaca konidija. Sekundarne konidiofore su uglavnom kratke i jednoćelijske (Thomma, 2003; Battiliani i sar., 2009). Međutim, ove osobine nisu karakteristične za sve vrste u okviru roda, te je klasifikacija izolata ovog roda gljiva vrlo komplikovana.

Generalno, *Alternaria* spp. se brzo razvijaju i micelija dostiže prečnik veličine od 3 do 9 cm, pri inkubaciji na 25°C u toku sedam dana na PDA (krompir dekstroza agar). Micelija je ravna, paperjasta, prekrivena sivim, kartkim vazdušastim hifama. U početnoj fazi razvića površina je beličasto sivkaste boje, a kasnije postaje tamnija, zelenkasto crne do maslinasto braon boje sa svetlom ivicom (slika 5 a). Naličje je braon do crne boje usled prisustva melanina (St-Germain i Summerbell, 1996). Pored PDA, Simmons (2007) preporučuje V8

agar (hranjivu podloga na bazi soka od paradajza) kao i PCA za ispitivanje brzine porasta i sporulaciju *Alternaria* spp. Optimalna pH vrednost za razvoj micelije je između 4 i 6,6, iako su tolerantne vrednosti u granicama od 2,7 do 8. U anaerobnim uslovima nije zabeležen razvoj micelije.



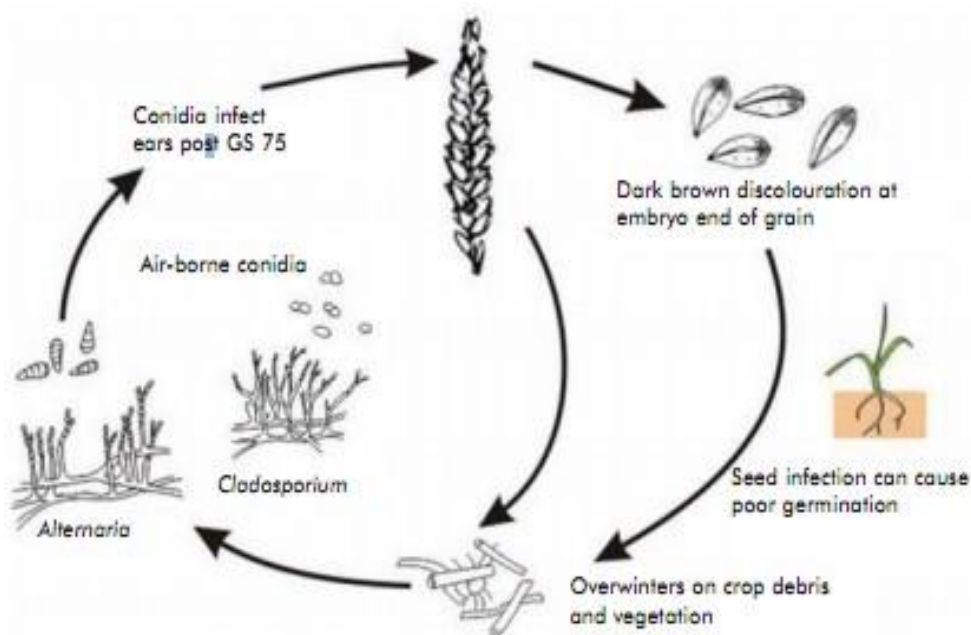
Slika 5. *Alternaria* spp. (a) izgled micelije na PDA; (b) konidije (original)

Alternaria spp. predstavljaju parazite slabosti, koji prvenstveno napadaju biljke oslabljene dejstvom raznih faktora. U klimatskim uslovima Srbije najčešće dolazi do gubitka otpornosti usled nedostatka vlage, temperaturnih ekstrema, zaraženosti biljaka nekim drugim patogenima ili starenja pojedinih biljnih organa. Infekcija od strane roda *Alternaria*. se ostvaruje putem konidija u fazi cvetanja i formiranja zrna. S obzirom da kod *Alternaria* spp. nije identifikovan polni stadijum, gljive ovog roda prezimljavaju na ostacima zaraženih biljaka ili na semenu u vidu micelije, konidija ili spora (Laemmlen, 2001). Parazit se tokom vegetacije u zemljištu širi micelijom, dok vazдушna strujanja prenose konidije i feudiktiospore patogena na nadzemne delove biljaka. Gljive mogu da se prenose i putem zaraženog semena, insekata, kiše, kao i posredstvom sistema za navodnjavanje (Battilani i sar., 2009). Značaj *Alternaria* vrsta. iz grupa *A. alternata* i *A. infectoria* kao patogena semena koji utiči na smanjenje energije zrna i samim tim na klijanje i nicanje istakli su Perello i Larran (2013).

Uprkos razlikama u taksonomiji i patogenosti *Alternaria* vrsta, proces infekcije je vrlo sličan (slika 6). Kod strnih žita infekcija se odvija u fazi cvetanja odnosno sazrevanja zrna. Pod povoljnim temperaturnim uslovima (15-24°C) i visokoj vlažnosti vazduha ($a_w \geq 84$) melanizovane spore klijavu formirajući kratke apresorije. U tkivo domaćina prodiru kroz stome, kutikulu ili oštećena mesta (Magan i sar., 1984; Lorenz, 1986). Kod manje virulentnih vrsta penetracija se odvija kroz oštećena tkiva i stome, dok virulentnije vrste

prodiru direktno u tkivo domaćina. Oslabljene i oštećene biljke kao i starija biljna tkiva su više osjetljiva na infekcije nego zdravi i snažni organizmi. Obzirom da u tom slučaju saprobne forme *Alternaria* spp. postaju paraziti, ne može se uvek sa preciznošću utvrditi razlika između saprobnih i parazitnih vrsta (Laemmlen, 2001; Logrieco i sar., 2003; Thomma, 2003).

Tokom infekcije odvijaju se enzimski procesi koji su u globalu slični kao i kod drugih fitopatogenih gljiva. Kako navodi Thomma (2003), u procesu infekcije prilikom prodiranja kroz kutikulu i ćelijski zid domaćina, ključnu ulogu imaju enzimi kutinaza, lipaze, kao endo- i egzo- glukonaze, koji se aktiviraju kod patogenih sojeva roda *Alternaria*. Tokom infekcije *Alternaria* vrste proizvode ekstraselularne enzime koji razaraju polimere ćelijskog zida biljnih ćelija. Većina vrsta proizvode fitotoksine koji reaguju na različite načine uzrokujući uvenuće biljnog tkiva. Tyagi i sar. (2000 i 2001) utvrdili su aktivnu ulogu enzima peroksidaze, polifenol oksidaze, β -1-3-glikanaze i kitinaze u mehanizmima odbrane pšenice od *A.triticina*.



Slika 6. Ciklus razvoja infekcije *Alternaria* spp. na strnim žitima (Cereal Disease Encyclopedia, www.hgca.com)

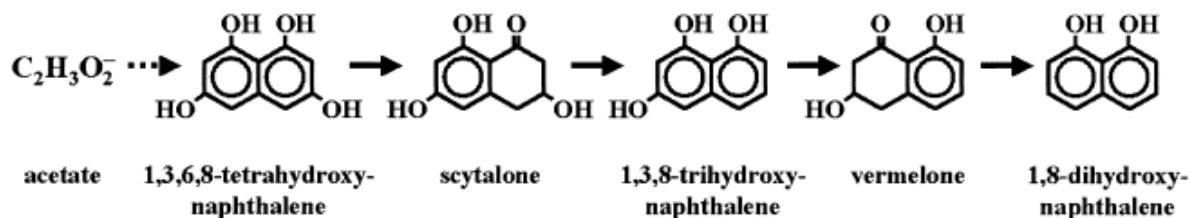
Uslovi spoljašnje sredine koji pogoduju infekciji *Alternaria* spp. zavise pre svega od vrste ovog roda kao i od domaćina, ali i od interakcije odgovarajuće temperature i vlažnosti. Obilne padavina, zadržavanje rose ili prekomerno navodnjavanje povoljni su uslovi za razvoj

ovog patogena. To potvrđuju istraživanja brojnih autora (Culshaw i sar., 1988; Prescott i sar., 1986; Diekmann i Putter, 1995) koji ukazuju na to da se *Alternaria* spp. masovno javljaju kada za vreme cvetanja i formiranja zrna preovlađuje vlažno i toplo vreme, sa čestim kišama i visokom relativnom vlažnošću vazduha (iznad 75%). Optimalna temperatura za razvoj micelije je 20-25 °C, dok su temperaturni minimum i maksimum 4°C odnosno 35°C. Relativna vlažnost vazduha i aktivnost vode (količina slobodne vode- a_w) su takođe značajni parametri u razvoju infekcije. U optimalnim temperaturnim uslovima, za razvoj micelije potrebno je zadržavanje vlage na biljnim delovima minimum 5-8 h (EFSA, 2011). Magan i sar. (1984) navode da povoljni klimatski uslovi i prekomerne padavine, naročito u periodu kasne vegetacije pogoduju ne samo razvoju crne pegavosti na strnim žitima, već i produkciji *Alternaria* toksina, kao što su altenuen (AE), alternariol (AOH), alternariol metil etar (AME) i tenuazonične kiseline (TZA).

Pored infekcija na otvorenom polju, *Alternaria* spp. mogu prouzrokovati štete i nakon žetve tokom skladištenja i transporta (Ostry, 2008). Žetva tokom kišnog perioda ili skladištenje u uslovima visoke vlažnosti pogoduju razvoju ovog patogena (Magan i sar., 2003). U skladištima *Alternaria* vrste mogu se preneti i sa zaraženih biljnih proizvoda na zdrave putem sekundarnih infekcija. Zbog sposobnosti razvijanja na niskim temperaturama vrste roda *Alternaria* se mogu naći i u hladnjačama, gde ostaju u latentnom stanju sve dok se ne uspostave povoljni uslovi za razvoj infekcije. *Alternaria* spp. imaju izuzetnu sposobnost da prežive duži vremenski period i sačuvaju vitalnost i do nekoliko godina (Rotem, 1994).

Karakterističan simptom *Alternaria* spp. su nekrotične pege u vidu mrkih koncentričnih krugova. Tamna boja inficiranih delova biljnog tkiva potiče od crnog pigmenta melanina koji se nalazi u ćelijskom zidu parazita. Melanin koji proizvode *Alternaria* spp. je derivat 1,8-dihidroksinaptalena (DHN) koji nastaje u toku sinteze pentaketida (slika 7). Pokazano je da je melanin pentaketida značajan virulentni faktor patogenih gljiva (Jacobson i sar., 1995; Thomma, 2003). DHN nastaje u citoplazmi odakle se eksportuje u ćelijski zid i ekstracelularni matriks, gde se uz enzim lakazu polimerizuje do melanina. Pored uloge u razvoju konidija, melanin je značajan i za zaštitu samog parazita. Naime, melanin ima funkciju "oklopa" pružajući zaštitu gljivama od nepovoljnih uslova spoljašne sredine, temperaturnih stresova, UV zračenja i jedinjenja koja luče njihovi antagonisti, utičući na vitalnost, opstanak i duži životni vek patogena (Linas i sar., 1998; Kawamura i sar., 1999). Pored ovoga, prilikom infekcije biljaka melanin vrlo brzo reaguje sa slobodnim radikalima

kiseonika fenolnih jedinjenja (koje su komponente sistema odbrane domaćina od prodiranja patogena) usled čega dolazi do povećane osetljivost domaćina (Jacobson i sar., 1995).



Slika 7. Sinteza pentaketida (Thoma, 2003)

2.4. *Alternaria* toksini

Mikotoksini (mykes – grč. gljiva, toxikon – grč. otrov) su sekundarni metaboliti nekih vrsta filamentoznih gljiva, koji su toksični ili imaju druge negativne biološke efekte po ljude i životinje (da Rocha i sar., 2014). Toksični efekti mikotoksina ispoljavaju se u vidu različitih sindroma kod ljudi i životinja, poznati kao mikotoksikoze. Pojava mikotoksina vezuje za sve procese proizvodnje (uzgoj žitarica, transport, procese prerade) gde usled prisustva njihovih rezidua u hrani biljnog ili animalnog porekla mogu ispoljiti negativan uticaj na zdravlje ljudi (Kocić-Tanackov i Dimić, 2013).

Vrste roda *Alternaria* spadaju među najproduktivnije proizvođače mikotoksina. Registrovano je preko 70 mikotoksina različite toksičnosti, ali samo nekoliko se spontano javljaju u prirodi i imaju toksikološki značaj (Marin i sar., 2013). *Alternaria* toksini se translociraju u okolne delove biljnog tkiva, tako da ova jedinjenja mogu biti prisutna čak i kada je micelija odstranjena. Takođe, toksini se mogu naći i u prerađenim biljnim proizvodima (Logrieco i sar., 2009). Kako navode Andersen i sar. (2015), od ukupno 87 izolata *Alternaria* spp. izolovanih sa različitih supstrata, više od 75% su imali sposobnost biosinteze mikotoksina. Istraživanja Liu (1992) ukazuju da su metaboliti koje proizvode ove vrste različite toksičnosti, a neki od njih imaju moćne mutagene i teratogene osobine i povezuju se sa određenim formama kancera.

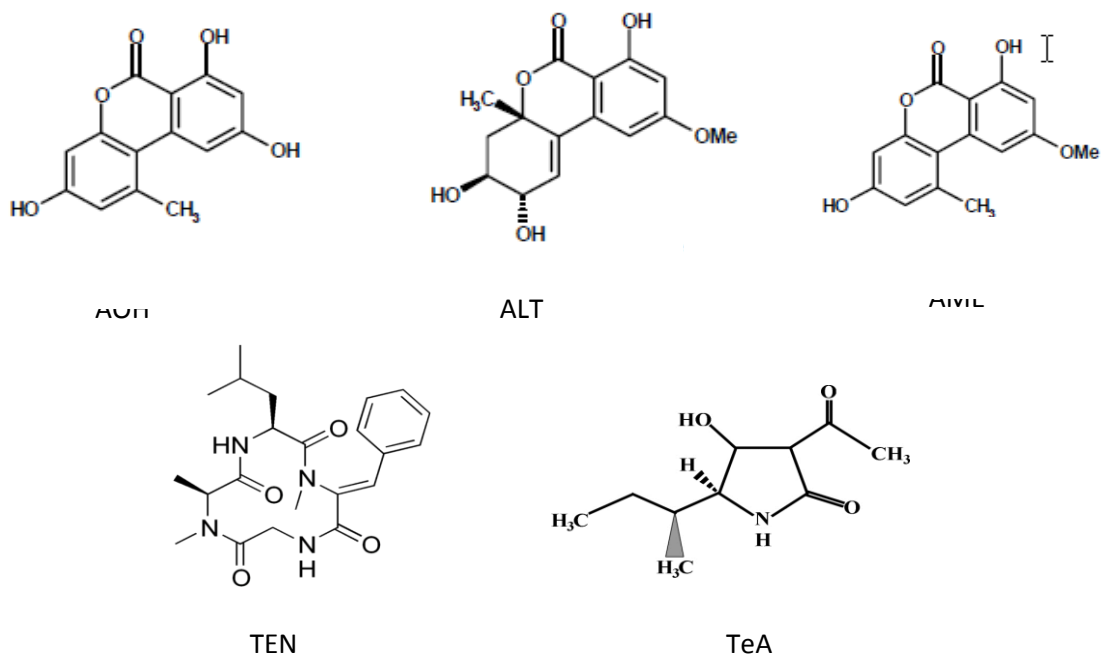
Kako navode Botallico i Logrieco (1998), Ostry (2008), Logrieco i i sar., (2009) i Battilani i sar., (2009) *Alternaria* toksini mogu se svrstati u tri strukturne grupe:

- derivati dibenzo- α -pirona: alternariol (AOH), alternariol monometil etar (AME) i altenuen (ALT) i altenuisol (AS)
- derivati tetraminske kiseline: tenuazonična kiselina (TeA) i izo-tenuazonična kiselina (iso-TeA)
- derivati perilena: alertoksin I, II i III (ATX-I, ATX-II i ATX -III) i stemfiltoksin III

U izveštaju EFSA (2011) izdavaju se jos dve grupe *Alternaria* toksina:

- AAL-toksini (odn. *A.alternata* f.sp. *lycopersici* toksini): AAL-TA i AAL-TB
- Toksini mešovite strukture kao što je tentoksin (TEN) (ciklični tetrapeptid)

Hemijske strukture najznačajnijih *Alternaria* toksina prikazane su na slici 8.



Slika 8. Strukturne formule najznačajnijih *Alternaria* toksina

Najčešće detektovni i najznačajniji *Alternaria* toksini na strnim žitima su alternariol (AOH), alternariol monometil etar (AME), tenuazonična kiselina (TeA) i altenuen (ALT) (Tabela 3).

Tabela 3. *Alternaria* toksini detektovani na strnim žitima*

Zemlja	Miko toks.	N	n>LO Q	LOD/LOQ (µg/kg)	Sred.vr. (µg/kg)	Maksimum	Metod	Literaturni izvor
Nemačka	AOH	13	1	1.05	-	4.01	HPLC-MS/MS	Asam i sar. (2010)
	AME	13	1	0.03	-	0.06		
	TEA	27	2	50	49	851		Siegel i sar. (2009)
Belgija	AOH	1	0	dic-23	n.d.	n.d.	LC-MS/MS	Monbaliu i sar. (2010)
	AME	1	0	18/39	n.d.	n.d.		
Republika Češka	AOH	8	0	dic-23	n.d.	n.d.	LC-MS/MS	Monbaliu i sar. (2010)
	AME	8	0	18/39	n.d.	n.d.		
Danska	AOH	14	0	dic-23	n.d.	n.d.	LC-MS/MS	Monbaliu i sar. (2010)
	AME	14	0	18/39	n.d.	n.d.		
Estonija	AOH	4	3	100	-	340	HPLC-DAD	Kütt i sar. (2010)
Mađarska	AOH	7	0	dic-23	n.d.	n.d.	LC-MS/MS	Monbaliu i sar. (2010)
	AME	7	0	18/39	n.d.	n.d.		
Švedska	AOH	18	16	35/45	-	335	HPLC-UV	Hägglom i sar. (2007)
	AME	18	7	35/45	-	184		
	TeA	18	18	100/135	-	4310		
Argentina	AOH	64	4	50	1054	1388	HPLC-UV	Azcarate i sar. (2008)
	AME	64	15	50	2118	7451		
	TeA	64	12	80	2313	8814		
Egipat	AOH	15	4	50	-	2320	HPLC-UV	El-Aal (1997)
	AME	15	2	300	-	1890		

	ALT	1 5	2	100	-	1480		
	ATX-I	1 5	2	200	-	1678		
	TeA	1 5	5	100	-	658		
Rusija	AOH	2 8	4	20	98	192	ELISA	Burkin i Kononenko (2011)
Kina	AOH	2 2	20	50	335	731	HPLC- FLD	Li i Yoshizawa (2000)
	AME	2 2	21	50	443	1426		
	ALT	2 2	0	100	n.d.	n.d.		
	ATX-I	2 2	0	200	n.d.	n.d.	HPLC-UV	
	TeA	2 2	22	100	2419	6432		
Australija	AOH	5	0	10	n.d.	n.d.	HPLC-UV	Webley i sar. (1997)
	AME	5	0	10	n.d.	n.d.		
	TeA	5	1	10	-	15		

* Izvor: European Food Safety Authority (2011). AOH:alternariol; AME: alternariol monometil etar; ALT:altenuen; TEA:tenuazoična kiselina; ATX:alvertoksin I; N: broj uzoraka; LOD: limit detekcije; LOQ: Limit kvantifikacije; n.d.:nije detektovan

Kako navodi Thomma (2003) u okviru roda *Alternaria* identifikovani su mikotoksini specifični za određenu biljnu vrstu kao i oni sa vrlo širokim spektrom delovanja. Nekoliko fitopatogenih tipova *Alternaria* vrsta je identifikovano na bazi toksina specifičnih za određenog domaćina (Andersen i sar., 2001, 2002, 2008). Ipak, obzirom na različite kriterijume koji su korišćeni prilikom utvrđivanja taksonomije i klasifikaciji roda *Alternaria*, teško je uspostaviti precizan odnos između određene *Alternaria* vrste i produkcije specifičnog mikotoksina. Pregled *Alternaria* toksina i vrsta koje ih produkuju prikazan je u tabeli 4. *A.alternata* se smatra najznačajnijom vrstom ovog roda u pogledu produkcije mikotoksina (Bhaat, 2010; Pose i sar., 2010).

Tabela 4. Mikotoksini i vrste roda *Alternaria* koje ih proizvode (Battilani i sar., 2009; Oviedo i sar., 2013)

Alternaria toksini	Akronim	Vrsta koje ga proizvodi
Alternariol	AOH	<i>A. alternata</i> , <i>A. infectoria</i>
Alternariol monometil etar	AME	<i>A. alternata</i> , <i>A. solani</i>
Tentoksin	TA	<i>A. alternata</i>
Tenuazoična kiselina	TeA	<i>A. alternata</i> , <i>A. tenuissima</i>
Altertoksini	ATX	<i>A. alternata</i>
<i>A. alternata</i> f. sp. <i>lycopersici</i> toksini	AAL-toksini	<i>A. alternata</i> f.sp. <i>lycopersici</i>
Stemphylltoksin III	Stemphylltoksin III	<i>A. alternata</i>
Alteuen	ALT	<i>A. alternata</i>

Mikotoksigeni potencijal roda *Alternaria* zavisi od vrste patogena, supstrata i uslova spoljašne sredine, odnosno temperature i vlažnosti (Fernández-Cruz i sar., 2010). Optimalni uslovi za biosintezu toksina su slični onima koje su potrebene za infekciju, razvoj micelije i sporulaciju gljiva. Pri ispitivanju uticaja temperature i vodene aktivnosti (a_w) na sintezu *Alternaria* toksina na agaroznoj podlozi od ekstakta pšenice i na zrnu pšenice Magan i sar. (1984) su zaključili i da je najveća produkcija toksina AE, AOH i AME ostvarena pri temperaturi od 25°C i $a_w=0.98$ na oba supstrata. Hasan (1996) navodi da su različite temperature uslovile sintezu različitih *Alternaria* toksina, te da optimalna temperatura za produkciju AOH iznosi 28°C, dok je za TeA 21°C. Oviedo i sar. (2011) su ispitivali porast i sintezu mikotoksina kod vrste *A.alternata* na sojinom agaru i zrnu soje i ustanovili da je najveća produkcija AOH, AME i TeA bila na temperaturama od 15-30°C i $a_w = 0,96-0,99$. Istržujući *Alternaria* toksine na paradajzu, Pose i sar. (2010) su utvrdili da su optimalni uslovi za sintezu AOH bili pri 0.954 a_w nakon 28 dana inkubacije na 21°C, dok je najveća koncentracija AME zabeležena pri $a_w = 0.954$ na 35°C. Optimalni uslovi za TeA su bili $a_w = 0.982$ i 21 °C. Nijedan od navedenih toksina nije registrovan na temperaturi od 6°C, te se smatra da skladištenje na temperaturi ispod 6°C ihibira produkciju toksina. Činjenica da se toksini mogu sintetisati i u uslovima povišene temperature i vlage izvan optimalnih granica je izuzetno značajana, jer se u neadekvatnim skladišnim uslovima povećava sadržaj mikotoksina, a što utiče na smanjenje kvaliteta žita (Oviedo i sar., 2009). Izloženost svetlosnim zracima različitog spektra takođe je jedan od faktora koji može uticati na sintezu mikotoksina. Istraživanja Söderhäll i sar. (1978), Häggblom i Unestam (1979) i Schmidt-Heydt i sar. (2001) pokazuju da je inkubacija pod svetlom iz belog, plavog i crvenog spektra imala inhibitorski efekat na produkciju AOH i AME, dok nije uticala na porast i morfološka svojstva vrste *A.alternata*.

Stabilnost *Alternaria* toksina tokom procesa prerade potvrđena je u nekoliko studija. Siegel i sar. (2010) ispitivali su stabilnost AOH, AME i ALT u brašnu u različitim uslovima pečenja (vlažno i suvo pečenje). Rezultati ovih istraživanja pokazali su da su *Alternaria* toksini u velikoj meri stabilni prilikom vlažnog pečenja, dok se pri pečenju sa odsustvom vode razgrađuju i to sledećim redosledom AME>AOH>ALT. Lawley (2010) je ukazalo na stabilnost AME i ATX I u voćnim sokovima i vinu tokom 20 dana, kao i na 80 °C u toku 20 min, dok su Terminiello i sar. (2006) zabeležili visok procenat toksina koji je ostao nepromenjen nakon pasterizacije paradajza prilikom proizvodnje paradajz paste.

2.4.1. Toksikološki značaj *Alternaria* toksina

Alternaria toksini, AOH, AME, TeA, TEN i ALT registrovani su u velikom broju namirnica koji se koriste u ljudskoj ishrani, od kojih su najznačajnije žitarice i proizvodi na bazi žitarica, paradajz i proizvodi od paradajza, semenke suncokreta i suncokretovo ulje, voće i razne preradevine na bazi voća uključujući sokove, vino i pivo (Scott, 2001; Ostry, 2008; Asam i sar., 2011; Fernandez-Cruz i sar., 2011, Siegel i sar., 2010, Andersen i sar., 2015). Do sada nije doneta zakonska regulativa koja se odnosi na *Alternaria* toksine u hrani i hrani za životinje u Evropi i drugim regionima sveta. Međutim njihovo prisustvo u sirovinama i proizvodima ukazuje na potencijalnu opasnost po zdravlje ljudi. Toksičnost, mutagenost i genotoksičnost *Alternaria* toksina potvrđena je *in vitro* i *in vivo* ispitivanjima (Schrader i sar., 2001; Zhou i sar., 2008; Kocić-Tanackov i Dimić, 2013).

Na ćelijskom nivou neki mikotoksini reaguju sa nukleinskim kiselinama i inhibiraju biosintezu makromolekula DNK i RNK ili proteina., dok drugi deluju na strukture i funkcije bioloških membrana ili na nivou energetskeg metabolizma. Step en os etljivosti organizma zavisi od pola, starosti, ishrane, stanja organizma, količine i vrste, kao i dužine perioda njihovog unošenja (Wyatt, 2005; Mayer i sar., 2008)

Toksičnost TeA je utvrđena kod biljaka, embriona pileta, nekoliko životinjskih vrsta, uključujući mišev e, zečeve, pse i majmune (Solfrizzo i sar., 2005). Kod pasa je ovaj metabolit prouzrokovao krvarenja na nekoliko organa i subakutnu toksičnost kod pilića. Takođe, pretpostavlja se da je TeA uključena u etiologiju hematoloških poremećaja kod ljudi u Africi (Scott, 2004).

Rizik od toksičnosti AOH i AME potvrđen je istraživanjima Scott i Stoltz (1980), An i sar. (1989) i Prell e i sar. (2013) koja ukazuju na mutagene promene na sistemu mamalnih ćelija usled izloženosti ovim metabolitima. U Kini brojni autori smatraju da su ovi toksini

odgovorni za kancer jednjaka kod ljudi koji su konzumirali zrna žita kontaminirana *A. alternata* i ukazuju da ova vrsta ima značajnu ulogu u etiologiji ezofaganih karcinoma kod ljudi (Dong i sar., 1987; Liu i sar., 1992). Lehmann i sar. (2006) ukazali su na estrogene i klastogene potencijal AOH, inhibitorni efekat na proliferaciju ćelija i na genotoksične posledice u kulturama ćelija sisara. U nedavno objavljenoj studiji Bensassi i sar. (2012) potvrdili su da je AOH indukovao citotoksičnost u ćelijama ljudskog organizma. Najnovija istraživanja ukazuju na visok genotoksični potencijal toksina ATX I i ATX II u humanim ćelijama i prema brojnim autorima smatraju se potentnijim mutagenom od AOH i AME (Ostry, 2000; Schwartz i sar., 2012a,b).

U novije vreme, *Alternaria* toksini su u fokusu kako naučne javnosti tako i programa procene rizika. Međutim, dosadašnji publikovani podaci ne pružaju dovoljno informacija kako bi se definisali propisi o graničnim vrednostima za *Alternaria* toksine (EFSA, 2011; Amatulli i sar., 2013;). Takođe, različiti evropskih naučni komiteti smatraju da je neophodno više relevantnih podataka o toksičnosti ovih jedinjenja u cilju boljeg razumevanja realnih rizika za javno zdravlje. Tako je u 2003. God. Nemački Federalni institut za procenu rizika pokrenuo inicijativu o prikupljanju više informacija o štetnosti *Alternaria* toksina i potencijalnom riziku za zdravlje ljudi (BfR, 2003). Značaj istraživanja o genotoksičnosti i kancerogenosti *Alternaria* toksina istaknuo je i Naučni komitet za hranu Republike Češke (CSCF, 2008), dok se u Francuskoj smatra da ovi mikotoksini nemaju prioritet u pogledu narušavanja zdravstvenog stanja ljudi i životinja (AFSSA, 2009). Andersen i sar. (2015) ističu da je u programima monitoringa i zdravstvene bezbednosti hrane neophodna prioritizacija 12 *Alternaria* toksina od strane argentinske agencije za bezbednost hrane. Na zahtev Evropske komisije 2011. god. objavljeno je naučno mišljenje Evropske uprave za bezbednost hrane (EFSA) o rizicima i uticaju *Alternaria* toksina prisutnih u hrani za ljude i životinje na zdravlje sa sledećim zaključcima:

- Utvrđen je genotoksični efekat AOH i AME kod bakterije i u ćelijama sisara *in vitro*. ATX su mutageni kod bakterija i indukuju transformaciju ćelija dok TEN i TaE nemaju mutagena svojstva.
- Genotoksičnost i kancerogenost *Alternaria* toksina nije utvrđena *in vivo*. Indikacije egzofagalne promene su registrovane kod miševa.
- Panel on Contaminants (CONTAM Panel) je za neke od *Alternaria* toksina utvrdio prag toksikološkog značaja (TTC-treshold toxicological concern approach)

- Procenjena hronična izloženost AOH i AME prilikom ishrane premašuje relevantne TTC vrednosti što ukazuje na potrebu za dodatnim podacima o toksičnosti specifičnih metabolita
- Procenjena hronična izloženost TeA i TEN prilikom ishrane je ispod relevantnih TTC vrednosti i stoga se smatra da ovi metaboliti ne predstavljaju rizik za zdravlje ljudi i životinja.

U prilog aktuelnosti ove problematike govori i činjenica da je Evropski komitet za standardizaciju (CEN, 2013) nedavno objavio poziv za tender za razvoj standardizovanih metoda za analize *Alternaria* toksina u prehrambenim proizvodima (Berthiler i sar., 2014).

2.5. Uticaj *Alternaria* spp. na prometni i tehnološki kvalitet pšenice

Fitopatogene i saprobne vrste roda *Alternaria* mogu naneti štete u svim fazama proizvodnog ciklusa, od kojih su naročito značajni prometni i tehnološki kvalitet koji direktno utiču na ekonomske gubitke u prehrambenoj industriji. *Alternaria* spp. kao prouzrokovaci crne pegavosti (slika 9) su često prisutne u kompleksu sa drugim prouzrokovacima tamnokličnih zrna (*Helminthosporium* spp., *Bipolaris* spp.) i drugim plesnima (*Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Fusarium* spp.) te se u literaturi u tumačenju promena tehnološkog kvaliteta usled kontaminacije ovim patogenima često posmatra zajednički uticaj ovih kontaminanata (Culshaw i sar., 1988; Šarić i sar., 1997; Antes i sar., 2001; de Miranda i sar., 2006; Malaker i sar., 2009).

Negativan uticaj gljiva na prometni i tehnološki kvalitet žitarica ogleda se pre svega u narušavanju organoleptičkih svojstava (ukus, boja i miris), zatim i u smanjenju nutritivne vrednosti krajnjih proizvoda (Kosiak i sar., 2004).

Pri ispitivanju reoloških i pecivnih svojstva pšenice Antes i sar. (2001) su utvrdili da je kontaminacija plesnima značajno oštetila gluten, što se odrazilo na izrazito niže vrednosti zapremine hleba nakon probnog pečenja. Degradiranje glutenske mrežaste strukture kao posledice infekcije zrna pšenice saopštili su i Dexter i sar. (1996), Prange i sar., (2005), de Miranda i sar., (2006), Šarić i sar. (2008), Papouškova i sar. (2011). Uprkos smanjenom

sadržaju gluten, Lorenz i sar. (1986), Šarić i sar. (2008) i Malaker i sar. (2009) su ustanovili veći porast proteina kod tamnokličnih zrna, usled prisustva gljivične micelije.

Godišnji gubici u mlinskoj industriji u Velikoj Britaniji, procenjuju se na 3 miliona funti, obzirom da su uzorci sa preko 15% zaraženog zrna neprihvatljivi u procesnim tehnologijama (Culshaw i sar., 1988). U SAD, zaražena zrna vrstama roda *Alternaria* se deklariraju kao oštećena i samo 2% odn. 4% oštećenih zrna je dozvoljeno u prvoj odnosno drugoj klasi pšenice (Murray i sar., 2008). U Australiji je taj procenat iznosio 5% (Lehmensiek i sar., 2004). U našoj zemlji, na osnovu Pravilnika o kvalitetu žita, mlinskih i pekarskih proizvoda, testenina i brzo smrznutih testa, maksimalno dozvoljena količina primesa u žitu u vidu zrna izmenjene boje inficiranih gljivicama i koja se deklariraju kao pokvarena je 2% ("Sl. list SRJ", br. 52/95 i "Sl. list SCG", br. 56/2003 – dr. pravilnik, 4/2004 – dr. pravilnik i "Sl. glasnik RS", br. 43/2013 dr. pravilnik)

Proizvodne 2003/2004 godine nizak tehnološki kvalitet zrna pšenice u našoj zemlji je bio ograničavajući faktor za preradu i izvoz. Energija testa se znatno smanjila usled prisustva *Alternaria spp.* sa 60-70% zastupljenosti na zrnima pšenice. To je dovelo do velikih problema u mlinskoj industriji, obzirom da su mlinari bili primorani da mešaju takvu pšenicu sa visokokvalitetnom, kako bi dobili brašno pogodno za pečenje hleba drugih peciva (Balaž i sar., 2005).



Slika 9 . *Alternaria* spp. značajan problem u mlinskoj industriji (University of California Integrated Pest Management Program, 1990).

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

S obzirom na specifičnost spelte kao kulture koja je u ekspanziji na tržištu alternativnih žitarica iz organske proizvodnje i široku rasprostranjenost *Alternaria* spp. sa mikotoksičnim potencijalom štetnim po zdravlje ljudi i životinja postavljeni su sledeći ciljevi istraživanja:

- Precizna identifikacija i karakterizacija *Alternaria* spp. na zrnu spelte do nivoa vrste, ispitivanjem morfoloških i patogenih osobina, kao i primenom molekularnih metoda u cilju sagledavanja dominantnih vrsta koje su rasprostranjene na spelti u Republici Srbiji.
- Ocena intenziteta zaraze zrna spelte inokulisanih *Alternaria* spp. sa akcentom na plevičaste omotače kao potencijalne barijere prilikom infekcije zrna.
- Određivanje sadržaja *Alternaria* toksina posebno u plevičastim omotačima i oljuštenim zrnima. Razlike u oceni zaraze i sadržaju mikotoksina u plevičastim omotačima i oljuštenim zrnima, biće merilo efikasnosti plevičastih omotača kao zaštitnog sloja u prodiranju ovih gljiva i njihovih toksičnih metabolita.
- Uticaj infekcije *Alternaria* spp. na produktivnost klasa spelte.
- Krajnji cilj ovih istraživanja je evaluacija uticaja *Alternaria* spp. na tehnološki kvalitet spelte, koja osim teoretskog doprinosa ima i praktični značaj u smislu proizvodnje zdravstveno bezbednih proizvoda.

Hipoteza od koje se polazi je da plevičasti omotači na zrnu spelte predstavljaju barijere koje imaju zaštitnu funkciju od prodiranja patogenih gljiva i njihovih toksičnih metabolita.

4. MATERIJAL I METODE

Tokom 2011. god. prikupljena su zrna pet različitih genotipova spelte, komercijalnih uzoraka dostupnih na tržištu u Srbiji i lokalnih populacija. Uzorci su upakovani u papirne kese, obeleženi i čuvani za istraživanja u okviru ove doktorske disertacije.

Eksperimenatni deo istraživanja urađen je u Departmanu za fitopatologiju, Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu, zatim na oglednim parcelama Instituta za ratarstvo i povrtarstvo Novi Sad i na Naučnom institutu za prehrambene tehnologije u Novom Sadu.

4.1. Ocena zaraze uzorkovanih zrna spelte i izolacija gljiva roda *Alternaria*

U cilju pregleda zdravstvenog stanja zrna spelte korišćen je metod za određivanje procenta zaraze i klijavosti zrna na vlažnom filter papiru prema Pitt i Hocking (1985). Od svakog uzorka spelte izdvojeno je po 100 zrna sa plevičastim omotačima i 100 oljuštenih zrna, koja su površinski dezinfikovana sa po 100 ml 0,4% natrijum-hipohlorita (NaOCl) neprekidnim mešanjem u toku 2 min i zatim su u istom trajanju ispirana tekućom vodom. Po 25 zrna postavljano je u 4 ponavljanja u petri kutije (prečnika 150 mm) na sterilian filter papir prethodno nakvašen sa po 9 ml sterilne destilovane vode. Nakon 6 dana inkubacije u termostatu, izvršena je ocena klijavosti zrna i zaraze gljivama roda *Alternaria*. Na osnovu pregleda materijala izračunat je procenat klijavosti i procenat zaraze u svakom ponavljanju (I-IV), i ukupno za svaki uzorak, posebno posmatrajući plevičasta u odnosu na oljuštena zrna splete.

Sa plevičastih omotača zaraženih klijanaca kao i iz zrna koja nisu kljijala, izolovane su gljive roda *Alternaria* na podlogu krompir-dekstrozni agar (PDA) i inkubirane na 25 °C u mraku. Sa svakog genotipa izolovano je po 5 izolata *Alternaria* spp. i formirana je kolekcija od ukupno 25 izolata izolata roda *Alternaria*.

4.2. Dobijanje čistih kultura i monosporijalnih izolata

U ovom radu, za sva proučavanja *Alternaria* spp. uključujući morfološke i molekularne metode identifikacije, kao i proveru patogenosti, korišćene su čiste kulture izolata dobijene primenom postupka monosporne izolacije (Burgess i sar., 1994; Leslie i Summerell, 2006). Za izolaciju monosporne kulture korišćene su 7 dana stare kulture gajene na PDA podlozi. Fragmenti kolonija gde je došlo do sporulacije su preneti sterilnom laboratorijskom iglom (eza) u epruvetu sa 10 ml sterilne destilovane vode. Sadržaj epruvete je dobro izmešan na vorteksu kako bi se oslobodile spore gljive nakon čega je 1 ml ove suspenzije (razređenje 1:10) stavljen na površinu 2% podloge WA (vodeni agar) u Petrijevoj kutiji. Zatim je iz epruvete sa gornjim razređenjem odmereno 1 ml suspenzije i sadržaj je prenet u epruvetu sa 9 ml sterilne destilovane vode, kako bi se dobilo razređenje 1:100. Nakon mešanja na vorteksu, 1ml suspenzije razređenja 1:100 je nanesen na površinu 2% WA podloge u drugoj Petrijevoj kutiji. Sadržaj u kutijama je kružnim pokretima razliven po celoj površini podloge, a zatim su kutije poređane pod uglom od 30° i inkubirane 24 sata na 25 °C u mraku. Nakon 24 sata pregledana je površina petrijevih kutija stereomikroskopom i komadić podloge sa jednom iskljalom sporom je isečen sterilnom stklenom iglom ručno napravljenom po postupku opisanom u radu Goh (1999). Podloga sa kljalom sporom je posatvljena u centar Petrijeve kutije sa PDA podlogom. Kutije su zatvorene parafilmom i inkubirane na 25 °C u mraku.

Dobijeni monosporijalni izolati su presejani u epruvete sa zakošenom podlogom PDA i inkubirani na 25 °C u mraku. Nakon razvoja micelije, epruvete zatvorene parafilmom u stalcima upakovanim u plastične kese su čuvane u frižideru na +4 °C. Ponovno presejavanje (subkultivacija) formirane kolekcije izolata je vršeno svakih 6 meseci radi revitalizacije kultura (slika 10).



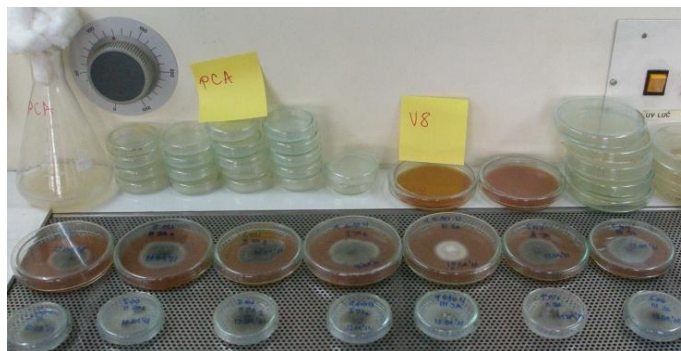
Slika 10. Formiranje kolekcije na kosoj PDA podlozi (original)

4.3. Identifikacija vrsta roda *Alternaria*

Identifikacija vrsta roda *Alternaria* je izvršena najpre na osnovu morfoloških osobina reproduktivnih organa prema determinatoru Simmons (2007). Obzirom da su dosadašnja istraživanja (Niessen 2007; Pryor i Michailides, 2002; Pavon i sar., 2012;) pokazala da morfološke i odgajivačke karakteristike nisu dovoljno informativne za pravilnu determinaciju vrsta *Alternaria*, identifikacija odabranih izolata potvrđena i molekularnom metodom lančane reakcije polimeraze (*Polymerase Chain Reaction*-PCR).

4.3.1. Determinacija *Alternaria* spp. na osnovu morfoloških osobina

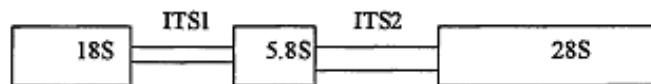
Subkultivacija *Alternaria* spp. izvršena je presejavanjem izolata sa PDA na specifične podloge za *Alternaria* vrste, krompir šargarepa agar (PCA) i podlogu sa dodatkom soka paradajza (V8) (slika 11). Izolati su presejani u Petrijeve kutije (prečnika 90mm) i inkubirani 5 dana u termostatu u mraku na temperaturi od 24 °C, a zatim izloženi fluorescentnom osvetljenju tokom 2 dana. Nakon 7 dana posmatrana su makroskopska i mikroskopska svojstva izolata. Makroskopske osobine proučavane su na podlozi V8, prilikom čega je praćen intenzitet rasta, izgled i boja kolonije, kao struktura vazdušne i supstratne micelije. Mikroskopske odlike izolata *Alternaria* spp. posmatrane su na podlozi PCA, gde su opisane morfološke karakteristike reproduktivnih organa, katenulacija, odnosno sporulacija i prostorni raspored sporonosnih tvorevina, dužina i širina konidija i septiranost. Merene su dimenzije slučajno odabranih, potpuno zrelih konidija; prosek je obračunat za najmanje 100 ponovljenih merenja. Mikroskopski preparat je pripreman u kapi sterilne vode u koju je kopljastom iglom nanet fragment kolonije ispitivanih izolata *Alternaria* spp. Tako pripremljen materijal je potom prekriven pokrovnim staklom i posmatran uz pomoć optičkog mikroskopa Olympus CX41 pod direktnim uvećanjima od 40x do 400x.



Slika 11. Priprema izolata *Alternaria* spp. za morfološku identifikaciju

4.3.2. Molekularna identifikacija izolata *Alternaria* spp.

Metoda lančane reakcije polimeraze (PCR) primenjena je u cilju molekularne detekcije i identifikacije izolovanih *Alternaria* spp. sa zrna spelte, kao potvrda identifikacije na osnovu koncencionalnih metoda. Najčešći region koji se koristi u dijagnostičkim postupcima determinacije gljiva je nuklearna ribozomalna DNK (nr DNK). U okviru ovog regiona nalaze se konzervativni geni koji kodiraju 18S, 5.8S i 28S rRNK molekule (slika 12). Selektivno umnožavanje genskih segmenata iz ITS regiona (*Internal Transcribed Spacer*) nr DNK (ITS1, 5.8rRNA, ITS2) vršeno je primenom odgovarajućeg para univerzalnih prajmera koji omogućavaju umnožavanje i kasnije sekvencioniranje ITS regiona ribozomalne DNK Eukariota (White, 1990).



Slika 12. ITS region eukariotske nrDNK

4.3.2.1. Ekstrakcija DNK.

DNK je ekstrahovana po uputstvu proizvođača korišćenjem komercijalnog kita *DNA Isolation kit (Agilent Technologies)*. Početni materijal 25 ispitivanih izolata je prethodno odgajan na PDA u toku sedam dana, pri 24 °C u mraku i micelija je direktno nanošena sterilnim skalpelom u ependorf tubice. Sakupljanje vazdušne micelije vršeno je vrlo pažljivo kako bi se izbeglo unošenje fragmenta podloge u početni materijal za ekstrakciju. Odmerena količina micelije (60 mg) od svakog uzorka preneti je u mikrotubicu zapremine 1,5ml, gde je uz dodavanje je 500 µL *Nucleic Acid Binding pufera* vršena homogenizacija na vorteksu. Suspenzija je prebačena u *DNA Binding Spin Cup* kolonu sa filterom, koja se nalazi u kolektorskoj tubici zapremine 2ml. Filter u *DNA Binding Spin Cup* kolonama u procesu ekstrakcije ima ulogu da veže molekule DNK i na taj način omogućava njihovo izdvajanje. Nakon centrifugiranja u trajanju od 1 minut na 14 000 rpm, odstranjena je tečna faza koja je propuštena kroz filter, dodato je 500 µL *High Salt Wash* pufera i ponovljen isti postupak centrifugiranja i odbacivanja tečne faze. Nakon ovog procesa, sledio je postupak ispiranja etanolom kako bi se uklonile nečistoće koje su se pored DNK vezale za filter. Postupak dodavanja 500 µL 80% etanola, centrifugiranje 1 minut na 14 000 rpm i odlivanje tečne faze ponovljen je tri puta, s tim što je nakon trećeg ispiranja sadržaj centrifugiran 14 000

rpm u toku 2 minuta da bi se potpuno otklonili ostaci tečnosti. Nakon centrifugiranja, *DNA Binding Spin Cup* kolona sa filterom prebačena u novu ependorf tubicu sa poklopcem zapremine 1,5ml i na filter je sipano 100 μ L *Elution pufera*. Uzorci su zatim inkubirani na sobnoj temperaturi 1 minut da bi se omogućilo oslobađanje i ratvaranje DNK sa filtera, a potom su tubice centrifugirane 1 minut na 14 000 rpm. Tečna faza koja je prošla kroz filter predstavljala je ukupnu ekstrahovanu DNK i tako dobijeni uzorci su čuvani na -20 °C do dalje upotrebe.

4.3.2.2. Lančana reakcija polimeraze (PCR)

Kod svih izolata ITS region je amplifikovan parom univerzalnih prajmera ITS1 (5_-TTCGTAGGTGAACCTGCGG-3_) i ITS4 (5_-TCCTCCGTCTATTGATATGC-3_) (Tabela 5). PCR reakcija obavljena je u radnoj zapremini od 50 μ L korišćenjem 25 μ L *Paq5000 Hotstart PCR Master Mix*a pripremljenog po uputstvu proizvođača (Agilent Technologies, USA) , 22 μ L destilovane vode, po 1 μ L svakog prajmera (100 pmol/ μ L, Metabion International, Deutschland) i 1 μ L ekstrahovane ukupne DNK. U svim reakcijama, negativnu kontrolu za detekciju kontaminacije predstavljao je uzorak sa svim reagensima potrebnim za umnožavanje DNK u koji je umesto DNK uzorka dodana molekularna *RNase-free* voda (Molecular Biology Grade Water, Eppendorf). Lančane reakcije polimeraze izvedene su na uređaju PCR Thermo Cycler (Sure Cycles 8800; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) pri sledećim uslovima: 1 ciklus inicijalne denaturacije nuklinskih kiselina (2min na 95 °C) ; 30 ciklusa koji se sastoje od denaturacije (20 sek na 95 °C) hibridizacije (20 sek na 54 °C) i elongacije prajmera (30 sek na 72 °C). Posle poslednjeg ciklusa nastupa finalna elongacija u trajanju od 5 min na 72°C kako bi došlo do kompletiranja parcijalni elongiranih produkata (Agilent technologies, USA).

Tabela 5. Prajmeri primenjeni za identifikaciju *Alternaria* spp.

Ciljna sekvenca	Naziv prajmera	Sekvenca	Veličina fragmenta	Literaturni izvor
ITS Eukariota	ITS 1	TTCGTAGGTGAACCTGCGG	500-600 bp*	Bensassi i sar. (2009)
	ITS4	TCCTCCGTCTATTGATATGC		

*bp: bazni parovi

4.3.2.3. Vizuelizacija i analiza produkata PCR reakcija

Učinak amplifikacije proveren je vizuelizacijom umnoženih PCR produkata pomoću kapilarne *lab-on-chip* elektroforeze na uređaju Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Koncentracija DNK određena je korišćenjem kita Agilent DNA 1000 koji čine sledeći reagensi:

DNA 1000 *Ladder* (žuta 🌟)

DNA 1000 *Markers* 15/1500bp (zelena 🌿)

DNA *Dye Concentrate* (plava 🌊) – koncentrat boje

DNA *Gel Matrix* (crvena 🌸)-gel matriks

Priprema uzoraka i njihovo nanošenje na čipove izvedeno je u skladu sa uputstvom proizvođača (Agilent Technologies, Santa Clara, CA).

Priprema smeše gela i boje (Gel-Dye Mix)

Pre početka analize koncentrat boje, zaštićen od svetla aluminijumskom folijom i gel matriks su ekvilibrisani na sobnoj temperaturi 30 minuta. Nakon ekvibracije, koncentrat boje je vorteksovao 10 sek i 25 µl je dodato u DNK gel matriks (slika 13). Smeša gela i boje je stavljena na vorteks 10 sek i ceo sadržaj je prebačen u tubu sa filterom (*Receptable Spin Filter*) nakon čega je centrifugiran 15 min na 6 000 rpm. Zatim je filter izvađen i odbačen a *gel-dye mix* čuvan na 4 °C do daljeg korišćenja.



Slika 13. Priprema *Gel-Dye Mix*

Nanošenje Gel-Dye Mix

Pripremljen reagens *Gel-Dye Mix* je ekvilibrisan na sobnoj temperaturi 30 min pre upotrebe. Svaki DNK čip ima 16 otvora kružnog oblika, od kojih je 12 namenjeno za ispitivane uzorke. Otvori čipa koji služe za analize uzoraka su napunjeni mešavinom gela i boje tako da se formiraju paralelni šuplji kanalići gela sa fluorescentnom bojom za detekciju (sa izgledom sita na poprečnom preseku). Naneto je i ubrizgano pod pritiskom uz pomoć injektora u toku od 60 sekundi u predviđeni otvor (obeležen G) 9 µl smeše gela i boje (slika

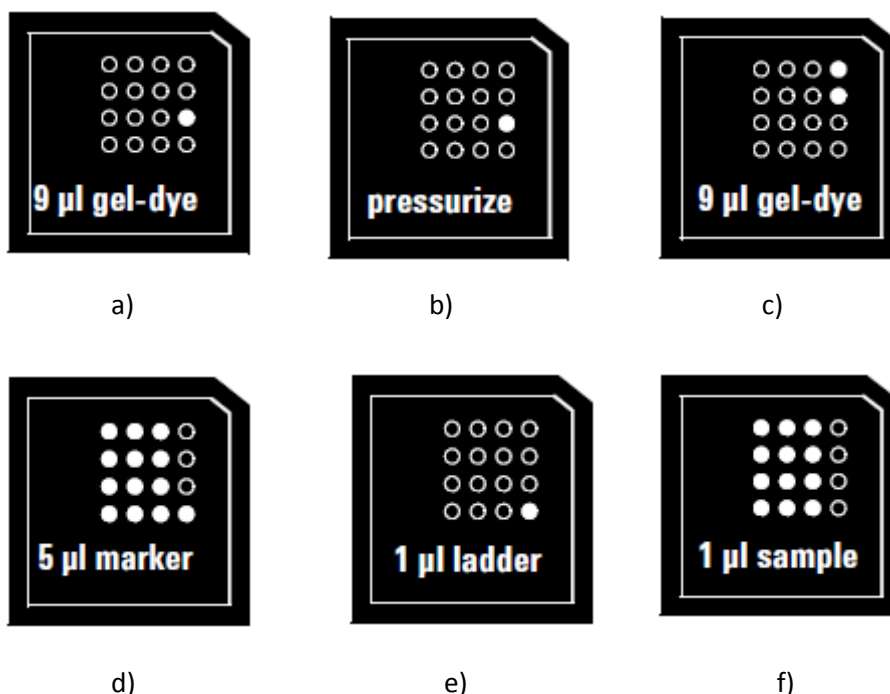
14 a, b). Pripremljena smeša gela i boje je dodata u istoj količini i u druga dva otvora čipa (obeleženi g, g) (slika 14c)

Nanošenje markera

Zatim je naneto 5 μl markera u otvor obeležen # kao i u ostalih 12 otvora namenjenih za uzorke (slika 14 d).

Nanošenje ladder-a i uzoraka

U otvor obeležen # naneto je 1 μl *ladder-a* (slika 14e). Po 1 μl uzoraka je nanešeno u mesta predviđena na čipu za uzorke (slika 14 f). Pripremljen čip je vortkesovan 1 minut na 2000 rpm i postavljen u ležište uređaja za čip elektroforezu *Agilent 2100 Bioanalyzer*. Rezultati su analizirani pomoću ekspertskog softvera 2100 i predstavljeni su grafički (elektroforegram) i tabelarno za svaki uzorak posebno. Prisustvo DNK fragmenata očekivane dužine od 500-600 bp smatrano je kao pozitivna reakcija.



Slika 14. Redosled nanošenja ragenasa i uzoraka na čip kapilarne elektroforeze

4.3.2.4. Prečišćavanje PCR produkata i sekvencioniranje

Nakon uspešne amplifikacije, PCR produkti prečišćeni su pomoću *QIAquick PCR Purification Kit-a* (Qiagen, Hilden, Germany), prema uputstvu proizvođača. Jedna zapremina reakcione smeše i PCR produkta pomešana je sa pet zapremina *PB* pufera, zatim je prebačena u *QIAquick* kolonu smeštenu u kolekcionu tubicu zapremine 2 ml i centrifugirana 1 min na maksimalnom broju obrtaja (13 000 rpm) u cilju vezivanja DNK za filter. Nakon odlivanja tečne faze, u *QIAquick* kolonu je dodato 750 µl *PE* pufera u cilju ispiranja nečistoća, nakon čega je tubica sa uzorkom centrifugirana ponovo 1 min na 13000 rpm. Tečna faza je zatim ponovo odbačena, a *QIAquick* kolona vraćena u istu kolekcionu tubicu i centrifugirana 1 min na 13 000 rpm kako bi se rezidualni pufera potpuno uklonili. U cilju rastvaranja DNK, *QIAquick* kolona je smeštenu u novu tubicu od 1,5 ml, dodato je 30µl *EB* pufera i nakon stajanja 1 min na sobnoj temperaturi, centrifugirana je 1 min na 13 000 rpm. Dobijena DNK čuvana je na 4 °C do kvantifikacije i pripreme za slanje na uslužno sekvencioniranje.

Prečišćeni uzorci su razdvojeni *lab-on-chip* elektroforezom kako bi se proverila čistoća amplikona, procenila molekularna težina i odredila količina sintetisane DNK. Količina umnoženih fragmenata u svakom uzorku određena je poređenjem dobijenih produkata sa fragmentima komercijalnog markera 100 bp *DNA Ladder* (Serva GmbH, UK) sa poznatim količinama svih frakcija u markeru. Umnoženi fragmenti su nakon prečišćavanja poslani na uslužno sekvencioniranje u u oba smera na ABI 3730XL Automatic Sequencer-u Macrogen Europe Inc.(Amsterdam, Holandija).

4.3.2.5. Analiza sekvenci i identifikacija BLAST metodom

Dobijene sekvence ITS regiona su primenom BLAST algoritma upoređene sa dostupnim sekvencama u NCBI bazi podataka (www.ncbi.nlm.nih.gov) i na osnovu toga je urađena identifikacija izolata. Nakon identifikacije, sekvence su poravnate pomoću *ClustalW* algoritma (Larkin i sar., 2007). Terminalni regioni sekvenci kojima su nedostajali podaci su uklonjeni, tako da su sve sekvence svedene na jednak broj molekularnih karaktera. Korišćenjem programa Mega 5 (Tamure i sar., 2011) izvršeno je poređenje sekvenci između vrsta, ali i između izolata iste vrste kako bi se ustanovio nivo varijabilnih sekvenci. Sve sekvence su podnete u NCBI bazu podataka gde im je dodeljen pristupni broj (*GenBank Accession Number*).

4.4. Provera patogenosti odabranih izolata *A.tenuissima* i *A.infectoria* veštačkom inokulacijom u poljskim uslovima

Ispitivanje patogenosti izolata *A.tenuissima* i *A.infectoria* na klasovima spelte vršeno je tokom 2011. i 2012. godine veštačkom inokulacijom klasova 3 različita genotipa spelte (Nirvana, Austria i Ostro) na ogledinim parcelama Instituta za ratarstvo i povrtarstvo u Rimskim Šančevima. U ispitivanja su uključena 2 izolata *A.tenuissima* (u daljem radu *A.tenuissima* 1 što odgovara uzorku Bsp5 i *A.tenuissima* 2 što odgovara uzorku Esp5) i jedan izolat *A.infectoria* (što odgovara uzorku Esp1). Pored gljivičnog inokuluma, u tretmane su bili uključeni, kao kontrole kombinacije, fungicid na bazi prochloraza (267 g/l) i tebukanzola (133 g/l) i destilovana voda. Veličina elementarne parcele je iznosila 5 m², sa deset redova dužine 5m i međurednim rastojanjem od 10 cm. Ogledi su postavljeni po metodi potpuno slučajnog blok sistema u četiri ponavljanja.

Radi umnožavanja inokuluma, fragmenti micelija izolata *A.tenuissima* (1) i (2) i *A.infectoria* presejani su u po pet velikih Petrijevih kutija (prečnika 150 mm) na podlogu PDA i inkubirani u termostatu na temperaturi od 25 °C. Tokom 10 dana micelija je potpuno prekrila površinu Petrijeve kutije. Nakon razvoja gljiva, sadržaj je prenet u blender i uz dodatak 600 ml destilovane miksovanjem pripremljena je suspenzija za inokulaciju. Koncentracija infektivnih čestica (fragmenata micelije) određena je pomoću hemocitometra i u proseku kretala se oko 10⁶ infektivnih čestica/ml.

Inokulacija klasova sve tri sorte spelte vršena je u fazi cvetanja (2.06.2011. i 29.05.2012.), pomoću ručne prskalice, u tri ponavljanja, tako što je u svakom tretmanu nanošeno po 200ml suspenzije inokuluma, odnosno po 200 ml fungicida i vode (slika 15). Ovako inokulisani klasovi su po metodi Balaž i sar. (1992), pokriveni prvo polietilenskim džakovima (radi obezbeđivanja dovoljne vlažnosti za ostvarenje infekcije), a nakon toga i papirnim džakovima (radi zaštite od pregrevavanja). Džakovi su skinuti posle 24 časa. Inokulacija je ponovljena nakon 14 dana. U fazi pune zrelosti, zaraženi klasovi, kako i oni tretirani fungicidom i vodom, skidani su ručno i čuvani u papirnatim vrećama u frižideru na +4 °C za dalja ispitivanja.



Slika 15. Veštačka inokulacija spelte u fazi cvetanja (original)

Pojava simptoma posmatrana je dve nedelje od inokulacije. Sa zrna na kojima su se razvili simptomi, izvršena je reizolacija i dobijene su monosporijalne kulture reizolata korišćenjem istih metoda kao pri izolaciji. Kolonije dobijenih reizolata (izgled, boja, zoniranost) upoređene su sa kolonijama izolata. Stepem zaraze je izražen procentualno (%) na oljuštenim zrnima za svaku godinu pojedinačno.

4.5. Ocena zaraze biljaka spelte inokulisanih *Alternaria* spp. uz poređenje intenziteta zaraze posebno oljuštenih zrna i zrna sa plevičastim omotačima

4.5.1. Određivanje stepena zaraze zrna spelte *Alternaria* spp.

Intezitet zaraze zrna ocenjen je nakon veštačke inokulacije klasova spelte (Nirvana, Austria i Ostro) tokom 2011. i 2012.god. izolatima *A.tenuissima* (1) i (2) i *A. infectoria*, kao i na zrnima iz kontrolnih tertmana (ungicid i voda). Ocena zaraze vršena je posebno za oljuštena i plevičasta zrna. Za određivanje intenziteta zaraze zrna spelte korišćen je prethodno opisan metod za ispitivanje zdravstvenog stanja zrna na vlažnom filter papiru (Pitt i Hocking, 1985). Pregledom uzoraka izračunat je procenat zaraze u svakom ponavljanju (I-IV) za svaki tretman.

4.5.2. Kolorimetrijska merenja intenziteta zaraze zrna spelte *Alternaria* spp.

Boja zaraženih zrna spelte od strane *Alternaria* spp. i zrna tretiranih fungicidom određena je hromametrom (MINOLTA, *Chroma Meter* CR-400, *Minolta Co., Ltd., Osaka, Japan*) sa D-65 osvetljenjem, 2° standardnim uglom posmatranja i 8 mm otvorom u glavi merenja. Merenja su vršena posebno na plevičastim i oljuštenim zrnima. Kalibracija je izvršena na beloj kalibracionoj pločici, a merenja su rađena u pet ponavljanja. Rezultati su očitani sa instrumenta prema CIE L*a*b* sistemu boja (Robertson, 1977) gde je:

- L* pokazatelj svetloće i kreće se u rangi od 0 (crno) do 100 (belo)
- a* pokazatelj odnosa intenziteta crvene (a*+) /zelene boje (a-)
- b* pokazatelj odnosa intenziteta žuto (b*+)/plave boje (b*).

Merenja su vršena na plevičastim omotačima i oljuštenim zrnima posebno.

Imajući u vidu cilj naših istraživanja, koji se odnosi na utvrđivanje mere zaštite plevičastih omotača na prodiranje *Alternaria* spp. i intenzitet zaraze zrna splete, u daljoj statističkoj obradi podataka analizirana je varijabilnost parametra L*, kao pokazatelja svetloće odnosno tamne obojenosti zrna.

4.6. Određivanje parametara prinosa inokulisanih biljaka

Za analizu produktivnosti klasa određena je masa inokulisanih klasova genotipova Nirvana, Austria i Ostro nakon tretmana tj. inokulacije izolatima *A.tenuissima* (1), *A.tenuissima* (2) i *A.infectoria* i kontrole fungicidom i vodom tokom 2011. i 2012.god. U punoj zrelosti useva od svakog genotipa, iz svakog tretmana i iz svih ponavljanja uzeto je metodom slučajnog uzorka po 100 klasova spelte za analizu produktivnosti klasova. Masa klasova merena je na tehničkoj vagi i izražena je u gramima (g).

4.7. Određivanje sadržaja mikotoksina (AOH i AME) tečnom hromatografijom visoke performance (HPLC metodom) posebno u plevičastim omotačima i oljuštenim zrnima

4.7.1. Priprema uzoraka

U cilju pripreme uzoraka za analizu alternaria toksina, klasovi tri različita genotipa spelte (Nirvana, Austria i Ostro), veštački inokulisani odabranim *Alternaria* spp. i tretiranih fungicidom i vodom tokom 2011. god, oljušteni su laboratorijskom ljuštilicom (model MDF1, RePietro, Gaggiano, Italija) u Institutu Tamiš u Pančevu. Oljuštena zrna čuvana su odvojeno od plevičastih omotača na tamnom i suvom mestu.

4.7.2. Ekstrakcija i prečišćavanje *Alternaria* toksina

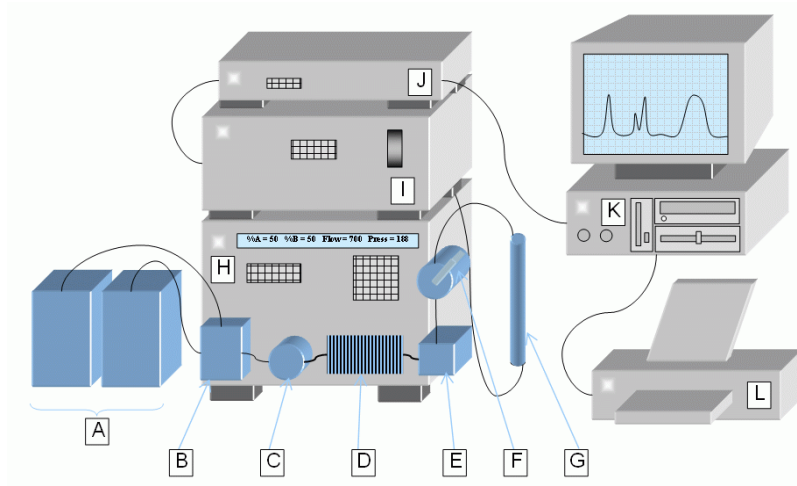
Ekstrakcija mikotoksina iz spraćenog uzorka izvršena je po postupku Li i Yoshizawa (2000). Odmereno je po $15 \pm 0,001$ g oljuštenog zrna spelte i posebno plevičastih omotača uzeto od svih genotipova i iz svih tretmana. Svi uzorci su samlevni do frakcije praha u laboratorijskom mlinu (Bag Mixer 400P; Interscience, St. Nom, France). Uzorci su rastvoreni u 75 ml smeše acetonitrila i 4% KCl ($\text{CH}_3\text{CN}/4\%\text{KCl}=9/9$) tokom 30 minuta mućkanja u rotacionom šejkeru na sobnoj temperaturi ($22-24^\circ\text{C}$) uz dodavanje 15 ml 1M HCl. Nakon filtriranja, 45ml filtrata (što je odgovaralo 7,5 g uzorka spelte) je prečišćeno sa 90 ml 0,05M $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ i uzorak je ponovo filtriran. Dobijeni filtrat (75 ml) ekstrahovan je tri puta sa 20 mL dihlormetana. Organske faze su kombinovane uparene do suva i rastvorene u 1mL metanola za dalju analizu alternariol (AOH) i alternariol monoetil etra (AME) HPLC metodom.

Hemikalije i reagensi

U analizama korišćeni su standardi AOH (čistoće 97.8%) i AME (čistoće 99.2%) Romer Labs Diagnostic GmbH (Tulln, Austria). Radni rastvori standarda su dobijeni dodavanjem $1,000 \text{ ml} \pm 0,014 \text{ ml}$ metanola. Koncentracije standarda upotrebljene za kalibracionu krivu kretale su se u rasponu od 0,625 do $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. Koncentracija AOH osnovnog rastvora iznosila je $98,8 \mu\text{g/ml} \pm 3,2 \mu\text{g/ml}$, dok je za AME bila $98,6 \mu\text{g/ml} \pm 2,0 \mu\text{g/ml}$. Za pripremu mobilne faze korišćen je metanol HPLC čistoće.

4.7.3. Detekcija mikotoksina HPLC metodom

Analize su izvedene na uređaju HPLC Agilent 1200 Series (Agilent Technologies Inc., USA) opremljenim degazerom, binarnom pumpom, delom za automatsko ubacivanje uzoraka (eng. „autosampler”), termostatisiranog dela za hromatografsku kolonu i detektorom od niza dioda (DAD) (slika 16). Za razdvajanje *Alternaria* toksina korišćena je Agilent Eclipse XDB-C18 kolona (50 mm × 4,6 mm; 1,8 μm) (Agilent Technologies Inc., USA) pri konstantnoj temperaturi od 40 °C. Zapemina injektovanja iznosila je 5 μl. U radu je korišćen gradijentni model rada gde je mobilna faza bila metanol-voda (rastvarač A - voda sa 385 mg/l amonijum acetata; rastvarač B - metanol) (1:9 v/v) pri protoku od 0,5 ml/min. Početna koncentracija mobilne faze je održavana 0,5 min da bi nakon toga koncentracija metanola porasla do 100% u trajanju od 9,5 min. Nakon održavanja ovih uslova 3,5 min, metanol je vraćen na početnu koncentraciju. Snimanje hromatograma je trajalo 20 minuta na talasnoj dužini od 275 nm za oba mikotoksina AOH i AME. Granica kvantifikacije je bila 83 ppb za obe komponente. Pikovi su detektovani u UV spektru na osnovu vremena retencije. Podaci su analizirani korišćenjem programa Software Agilent Chem Station for LC 3D Systems Rev. B.02.01 SR1 (260).



Slika 16. Osnovana šema HPLC-a (ConHelius, 2003)- A - posude za rastvarače, mobilne faze; B - mešanje mobilnih faza C - gradijent ventil; D - visoko-pritiska pumpa; E - komora za mešanje; F - ručni injektor; G - kolona; H - HPLC-jedinica; I - detektor; J, K - računar; L - štampač

4.8. Metode ocene prometnog i tehnološkog kvaliteta spelte inokulisane *Alternaria* spp. i tretirane fungicidom

Ocene prometnog i tehnološkog kvaliteta spelte u ovim istraživanjima sprovedene su po standardnim metodama ispitivanja kvaliteta žita i brašna (Kaluderski i Filipović, 1998). U cilju određivanja u kojoj meri zaraza *Alternaria* spp. utiče na prometni u tehnološki kvalitet zrna i brašna spelte, prilikom ocenjivanja su korišćena zrna tri različita genotipa spelte (Nirvana, Austria i Ostro) veštački inokulisani *Alternaria* spp. i tretirani fungicidom u poljskim uslovima na oglednim parcelama na Rimskim Šančevima tokom 2013. godine. Nakon ručnog skidanja klasova izvršena je vršidba laboratorijskom vršilicom *Wintersteiger LD180*. Za analize prometnog i tehnološkog kvaliteta spelte ispitivane su fizičko-hemjske osobine oljuštenog zrna kao i tehnološka svojstva brašna i testa.

Analizirani su sledeći pokazatelja prometnog i tehnološkog kvaliteta zrna i brašna:

- Zapreminska masa
- Masa 1000 zrna
- Veličina zrna
- Sadržaj proteina
- Broj padanja po Hagberg-u
- Mlevenje
- Sadržaj vlažnog glutena
- Gluten-indeks
- Kvalitet brašna na ekstenzografu
- Miksolab

4.8.1. Određivanje zapreminske mase

Za određivanje zapreminske (hektolitarske) mase ispitivanja su vršena prema standardnoj metodi prema Pravilniku o metodama fizičkih i hemijskih analiza za kontrolu kvaliteta žita, mlinskih i pekarskih proizvoda, testenina i brzosmrznutih testa ("Službeni list SFRJ" br. 74/1988). Zpreminska masa određena je merenjem pomoću Šoperove (*Schopper*) vage uz korišćenje tablica za očitavanje zapreminske mase i izražena je u kg/hl.

4.8.2. Određivanje mase 1000 zrna

Masa 1000 zrna svakog uzorka spelte određena je merenjem dva puta po 500 celih zrna bez primesa, sa tačnošću 0,1g, nakon čega su dobijene vrednosti sabrane. Masa 1000 zrna izražena je u gramima (g).

Dobijena masa preračunata je pomoću formule:

$$\text{Masa 1000 zrna} = \frac{m \times (100 - v)}{100}$$

m - izmerena masa 1000 celih zrna; v - sadržaj vlage u pšenici izražen u %.

4.8.3. Određivanje veličine zrna

Za merenje veličine zrna odmereno je po 100 g uzorka bez primesa koji su propušteni kroz laboratorijski uređaj za rešetanje na mehanički pogon sa otvorima prilagođenim osobinama pšenice. Otvori rešeta su pravougaonog oblika dužine 20mm i širine 2,2; 2,5; i 2,8mm. Udeo zrna različitih veličina prikazan je procentualno (%).

4.8.4. Određivanje sadržaja proteina

Određivanje sadržaja proteina u ispitivanim uzorcima spelte izvršeno je metodom bliske infracrvene spektroskopije (*Near Infrared Reflectance, NIR*) na uređaju *Infratec 1241 Grain Analyzer (Foss Analytical AB, Hillerød, Denmark)* uz primenu kalibracija validovanih u sklopu akreditovane Laboratorije za tehnologiju, kvalitet i bezbednost hrane FINSLab (FINSLab-5.4-3M-001,2007). Sadržaj proteina izražen je u procentima i automatski

preračunat na suhu materiju. Podaci o sadržaju vlage su iskorišćeni u cilju izračunavanja sadržaja vode za kondicioniranje pšenice pre mlevenja, kao i da bi se dobili podaci o masi uzorka koja je potrebna za određivanje broja padanja po Hagbergu.

4.8.5. Metoda laboratorijskog mlevenja pšenice

Cilj mlevenja očišćene i nakvašene pšenice u laboratorijskom mlinu je simulacija mlevenja u industrijskim uslovima pri čemu se dobija brašno koje je po svojim osobinama slično brašnu iz industrijskog mlina. Očišćeni uzorci zrna spelte iz svih tretmana (3 kg) nakvašeni su do 13,5% vlage, a zatim ostavljeni da odleže 24 h. Pola sata pre mlevenja uzorci su dodatno nakvašeni do sadržaja vlage od 15% a potom samleveni na mlevnom automatu MLU – 202 (*Bühler, Uzwil, Switzerland*) koji daje tri brašna sa prolazišta krupljenja (I, II i III) i tri brašna sa prolazišta mlevenja (1, 2 i 3) (Kaluderski i Filipović, 1998).

Dalja ispitivanja izvedena su na 60%-nom laboratorijskom brašnu, koje predstavlja maseni procenat izdvojenog belog brašna iz pšenice mlevene na laboratorijskom mlinu. Ovakvo brašno dobijeno je spajanjem brašna 1 i 2 prolazišta krupljenja i 1 i 2 prolazišta mlevenja, nakon čega je izmerena masa ove mešavine. Mešavini brašna zatim je dodato tačno toliko mase brašna 3 prolazišta mlevenja, koliko je nedostajalo da bi se dobilo 60 % izbrašnjavanje. Uzorak 60%-nog brašna je homogenizovan.

4.8.6. Određivanje broja padanja po Hagberg-u

Brojenjem padanja meri se aktivnost enzima alfa-amilaze. Metoda se zasniva na brzom želatinizaciji skroba u suspenziji brašna i vode, merenju viskoziteta skrobnog gela, odnosno merenju likvefakcije skroba (prevođenja čvrste faze u tečnu) izazvane dejstvom alfa-amilaze. Broj padanja predstavlja ukupno vreme, izraženo u sekundama, od momenta unošenja kive sa suspenzijom u vodeno kupatilo pa do kraja penetracije mešalice viskozimetra kroz zagrejani skrobni gel. Za analizu se koristi aparat *po Hagberg-u* sa pripadajućim priborima, kao i mlin *Falling Number*.

4.8.7. Određivanje sadržaja vlažnog glutena

Princip određivanja sadržaja glutena zasniva se na osobini glijadina i glutenina, osnovnih sastojaka glutena, koji su nerastvorljivi u rastvoru kuhinjske soli. Odvagom 10 g ($\pm 0,01$ g) brašna dodaje se 5-5,5 ml 2% rastvora za ispiranje i formira se homogeno testo. Ispiranjem testa i mehaničkim pritiskom testo se oslobađa rastvorljivih sastojaka i skroba, prilikom čega zaostaje gumasta masa glutena. Određivanje sadržaja vlažnog glutena rađeno je prema modifikovanoj metodi *ICC standard method 137/1* uz mašinsko ispiranje glutena na aparatu *Theby* (ICC Standards, 1996). Nakon prestanka izdvajanje skroba, vlažan gluten je centrifugiran (*Perten Instruments, Huddinge, Sweden*) i nakon sušenja pod presom izmeren na tehničkoj vagi.

Sadržaj vlažnog glutena izražen je u procentima (%) i izračunat po sledećoj formuli:

$$\text{Sadržaj vlažnog glutena (\%)} = \frac{a}{m} \times 100$$

gde je:

a - masa vlažnog glutena dobijena nakon ispiranja u (g)

m - masa uzorka uzetog za analizu u (g).

4.8.8. Ekstenzografska analiza

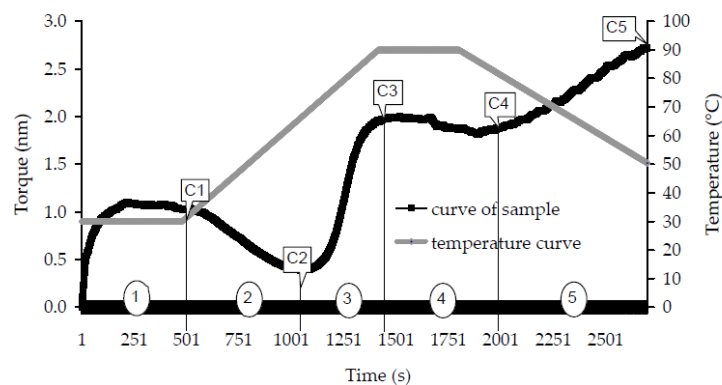
Kvalitet brašna na ekstenzografu rađen je prema proceduri Pravilnika o metodama fizičkih i hemijskih analiza za kontrolu kvaliteta žita, mlinskih i pekarskih proizvoda, testenina i brzo smrznutih testa ("*Službeni list SFRJ*" br. 74/1988). Fizičke osobine testa tokom uzastopnog odmaranja i uniaksijalnog rastezanja mereni su na uređaju ekstenzograf (*C.W. Brabender, Duisburg, Germany*). Izmereni su otpor, rastegljivost, energija i odnos otpora prema rastegljivosti (O/R) a rezultati su predstavljeni u vidu krive-ekstenzograma.

4.8.9. Miksolab analiza

Miksolab je instrument najnovije generacije koji daje brojne podatke o interakciji efekata mehaničkog naprežanja (zamesa, premesa i oblikovanja) i temperaturnih promena karakterišući procese hidratacije, želatinizacije, struktuiranja glutenske mreže, enzimskih procesa i dr. (Kahraman i sar., 2008). Postupak merenja obuhvata mešanje testa pod

kontrolisanim temperaturnim uslovima i pri porastu temperature do 90°C, nakon čega sledi hlađenje do 50°C. Pri tom, miksolab meri u realnom vremenu moment torzije (Nm) koji se javlja u testu između dve lopatice. Nakon formiranja testa, uređaj meri njegovo ponašanja u funkciji vremena, razvoja testa tokom mešanja i temperature. Uz pomoć miksolaba moguće je pratiti ponašanje testa u toku mešenja i zagrevanja, tj. omogućeno je određivanje doprinosa obe frakcije (proteina i skroba) na reološke osobine testa. Stoga, miksolab metod simulira proces pečenja hleba, od trenutka zamesa do kraja pečenja.

Reološko ponašanje testa tokom mešanja i zagrevanja praćeno je pomoću miksolaba (*Chopin Technologies, Francuska*) primenom "Chopin+" protokola prema ICC 173 (ICC Standards, 1996). Test počiva na pripremi mase testa sa konstantnom vlagom kako bi se dobila željena konzistencija testa tokom prve faze ogleda. Po "Chopin+" protokolu, masa testa iznosi 75 g, a njegova ciljana konzistencija je 1,1 Nm ($\pm 0,07$). Miksolab profil je podeljen u pet stadijuma koje karakterišu pet tačaka (C1-C5) kao i drugi parametri koji su rezultat nastalih razlika između pojedinačnih tačaka (slika 17).



Slika 17. Standardna miksolab kriva (Papouškova i sar., 2011)

Nakon merenja dobijeni su sledeći parametri krive:

- MUV - moć upijanja vode (%) odn. količina vode koju brašno može da apsorbuje da bi se dobila željena konzistencija u fazi konstantne temperature
- Vreme razvoja (min) - trajanje formiranja testa (što je brašno jače, to ono duže traje)
- Stabilnost testa (min) - otpor testa prilikom mešanja (što ono duže traje, to je testo „jače“)
- Amplituda (Nm) - elastičnost testa (što je vrednost veća, to je elastičnost brašna veća)

- C1 - maksimum torzije nakon mešanja na 30°C (inicijalna maksimalna konzistencija koja služi za određivanje moći upijanja vode)
- C2 - minimalna vrednost torzije na početku zagrevanja -Nm (merenje slabljenja proteinske mreže na osnovu mehaničkog rada i temperature)
- C3 - maksimalna vrednost (pik) torzije u fazi zagrevanja-Nm (merenje klajsterizacije skroba)
- C4 - minimalna vrednost torzije nakon perioda zagrevanja-Nm (merenje stabilnosti gela nastalog na toplo)
- C5 - maksimalna vrednost torzije nakon period hlađenja na 50°C- Nm (merenje retrogradacije skroba u period hlađenja)

4.9. Statistička obrada podataka

Dobijeni ekperimentalni rezultati obrađeni su primenom statističkog programa Statistica 12.0 (StatSoft,Inc., 2012). Dvofaktorijalnom analizom varijanse (ANOVA) ispitana je značajnost uticaja genotipa i tretmana, kao i međusobna interakcija genotip x tretman na intenzitet zaraze, produktivnost klasova, sadržaj mikotoksina i tehnološke parametre kvaliteta spelte. Za analizu značajnosti razlika među srednjim vrednostima analiziranih parametara korišćen je Tukey-ev test sa pragom značajnosti 0,05. Dobijene prosečne vrednosti koje se statistički značajno razlikuju obeležene su različitim slovima. Kod analize rezultata koji se odnose na *Alternaria* toksine urađena je klaster analiza korišćenjem City-block (Manhattan) algoritma, kao i analiza glavnih komponenti (*Principal component analyses, PCA*). Svi dobijeni rezultati prikazani su tabelarno i grafikonima, dokumentovani fotografijama.

5. REZULTATI I DISKUSIJA

5.1. Klijavost i zdravstveno stanje uzorkovanih zrna spelte

Pregledom zdravstvenog stanja zrna 5 različitih genotipova spelte, kao i klijavosti uzorkovanih zrna, uočeni su simptomi intenzivne crne pegavosti. Gljive roda *Alternaria* bile su dominantne u poređenju sa ostalim registrovanim fitopatogenim gljivama (*Fusarium*, *Penicillium*, *Helmithosporium*, *Aspergillus* i dr.). Srednje vrednosti rezultata su procentualno predstavljene u tabeli 6.

Tabela 6. Srednje vrednosti klijavosti i zaraze zrna spelte ispitivanih genotipova (%)

		Klijala zrna	Neklijala zrna	Zdravstveno ispravna	<i>Alternaria</i> spp.	Ostali patogeni
Genotip 1	Oljuštena	92±3,27	8±3,27	64±13,49	10±7,66	26±7,70
	Plevičasta	15±15,45	85±15,45	44±23,64	30±14,05	26±15,10
Genotip 2	Oljuštena	95±3,83	5±3,83	48±4,62	30±2,31	22±5,16
	Plevičasta	37±13,22	63±13,22	21±3,83	64±6,53	15±8,87
Genotip 3	Oljuštena	93±6,83	7±6,83	64±11,60	27±8,87	9±3,65
	Plevičasta	76±26,93	24±26,93	30±6,93	46±8,33	24±14,97
Genotip 4	Oljuštena	78±17,44	22±17,44	38±6,83	33±6,83	29±5,16
	Plevičasta	7±6,83	93±6,83	29±11,97	60±13,95	11±6,78
Genotip 5	Oljuštena	96±1,63	4±1,63	23±9,38	45±15,45	32±8,41
	Plevičasta	76±8,33	24±8,33	28±5,60	62±1,63	10±5,72

Uporednom ocenom zaraze oljuštenih i zrna sa plevičastim omotačima, dobijeni rezultati preliminarnih istraživanja ukazali su na potencijalnu ulogu plevičastih omotača u zaštiti zrna spelte od prodiranja *Alternaria* spp., što je bila polazna tačka za dalja ispitivanja u okviru ove doktorske disertacije.

5.2. Izolacija patogena i dobijanje monosporijalnih izolata

Gljive roda *Alternaria* izolovane su sa zaraženih zrna spelte koja su pokazivala simptome crne pegavosti (Sa svakog genotipa spelte nasumično je odabrano po 5 izolata *Alternaria* spp. i formirana je kolekcija od ukupno 25 monosporijalnih izolata (slika 18).



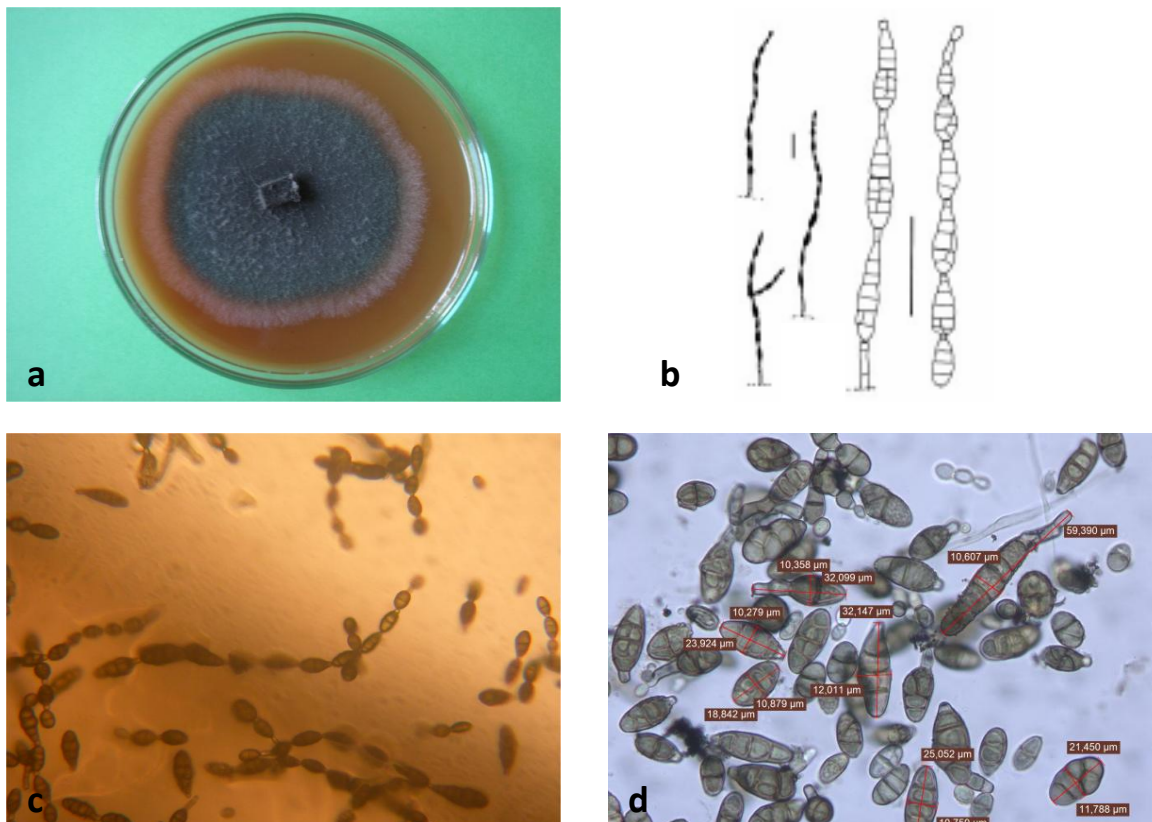
Slika 18. *Alternaria* spp. na plevičastom i oljuštenom zrnu spelte (original)

5.3. Identifikacija *Alternaria* spp. na zrnu spelte

5.3.1. Determinacija na osnovu morfoloških osobina izolata *Alternaria* spp.

Prilikom proučavanja morfoloških svojstava kolonija 25 izolata posmatrane su njihove makroskopske i mikroskopske karakteristike. Za opis makroskopskih svojstava odn. vazdušne i supstratne micelije korišćena je podloga V8, dok je podloga PCA korišćena za posmatranje mikroskopskih svojstava tj. oblika i dimenzija konidija, septiranosti, katenulacije, odnosno načina sporulacije i prostornog rasporeda formiranih sporonosnih tvorevina, pod mikroskopskim uvećanjem od 40x do 400x. Tokom ispitivanja morfoloških makroskopskih svojstava *Alternaria* spp. pokazalo se da se izolati po važnijim osobinama mogu svrstati u dve grupe. U **prvoj grupi** su bila 23 izolata koji su formirali gustu i kompaktnu miceliju zoniranu sa 2-3 koncentrična kruga. Boja micelije varirala je od zelenkasto crne u centru do sive sa maslinasto zelenim marginama. Supstratna micelija je bila slabo razvijena, sa slabije izraženim zonama, koje su bile tamnosive u centru i svetlo sive po obodu. Tekstura kolonija je bila pamučasta. Prosečan prečnik kolonija nakon 7 dana

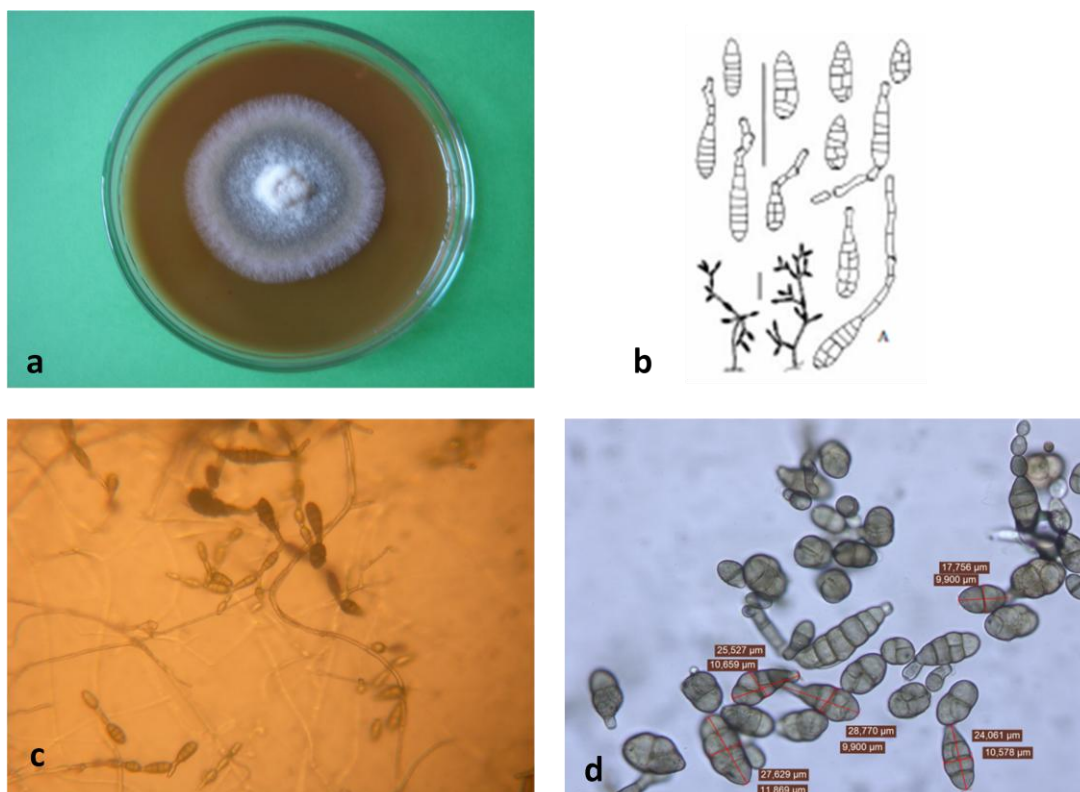
inkubacije pri 25°C na podlozi V8 je iznosio 65mm (slika 19 a). Na PCA, izolati prve grupe formirali su konidije u lancima koji su često bili razgranati a retko simpodijalno razgranati (slika 19 b i c). U glavnim lancima je uočeno 6-14 konidija. Vršne konidije u lancima su bile ovalne, manje, bez izraženog kljuna i nisu imale pregrade. Središnje konidije su bile veće, izdužene do eliptične, sa uzdužnim i poprečnim pregradama. Konidije bliže konidiofori su bile izdužene, eliptične sa izduženim vratom, odnosno kljunom. U proseku, konidije su imale 3-7 transferzalne i 1-3 longitudinalne septe. Kod nekih od njih uočena je tačkasta ornamentacija. Prosečne dimenzije konidija su se kretale od 20.5-45 × 9-16.5 μm (slika 19 d). Prema literaturnim podacima morfološke karakteristike ovih izolata su odgovarale vrsti *Alternaria tenuissima* (Simmons, 2007).



Slika 19. *A.tenuissima*: a) izgled kolonije na V8; b) formiranje lanaca; c) konidije u nizu na PCA; d) pojedinačne konidije (original)

Izolati **druge grupe** formirali su vunaste beličaste kolonije, sa tamnim koncentričnim zonama, čiji je prosečni porast iznosio 60 mm nakon 7 dana inkubacije pri 25°C na podlozi V8. Koncentrični krugovi su varirali od sivkasto do maslinasto zelene boje sa svetlo narandžastom pigmentacijom (slika 20 a). Na PCA, ovi izolati formirali su lance dužine od 3-

8 konidija sa brojnim sekundarnim, tercijalnim i kvarterarnim bočnim grananjem. Veoma dugačke sekundarne konidiofore često su se završavale kompleksom pojedinačnih konidija ili izuzetno gustih kratkih lanaca (slika 20 b i c). Sitne jednoćelijske ili dvoćelijske konidije imale su elipsoidni oblik sa piramidalnim apikalnim izduženjima. Dimenzije konidija za ovu grupu izolata iznosile su $15-25 \times 4,5-7 \mu\text{m}$ (slika 20 d). Na osnovu determinatora Simmons (2007), opisani izolati su odgovarali vrsti *A. infectoria*.



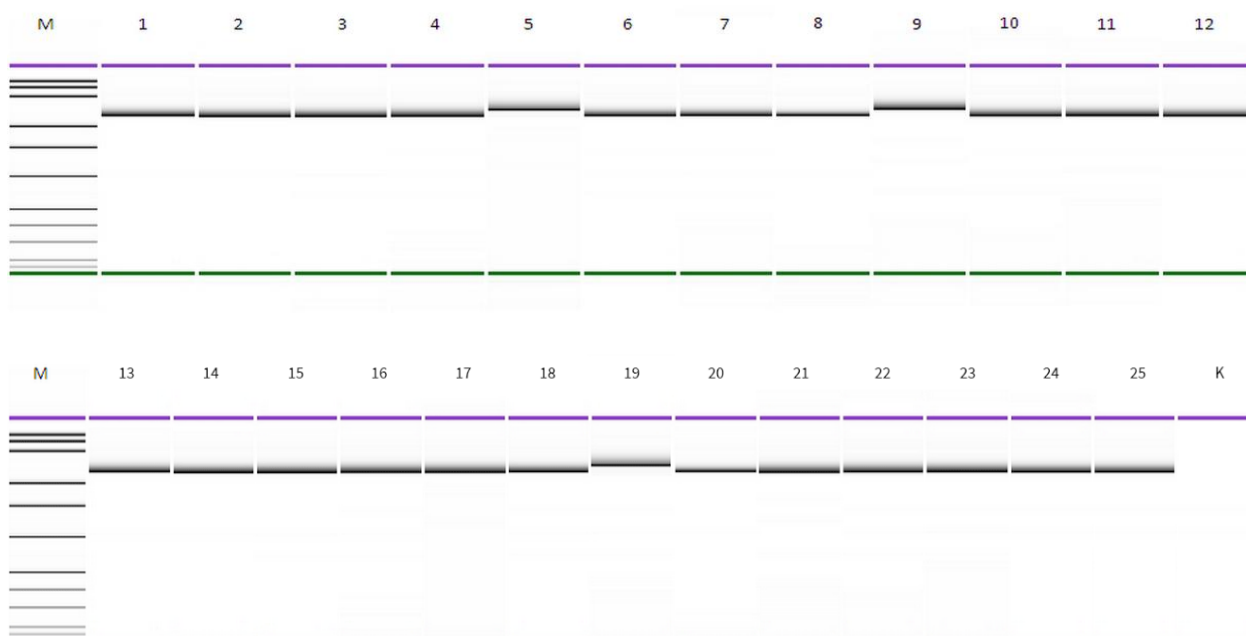
Slika 20. *A.infectoria*: a) izgled kolonije na V8; b)formiranje lanaca; c) konidije u nizu na PCA; d) pojedinačne konidije (original)

Primenom konvencionalnih metoda identifikacije i proučavanjem morfoloških i odgajivačkih osobina izvršena je identifikacija izolata roda *Alternaria* sa zrna spelte do nivoa vrste. Međutim, pri klasičnim metodama determinacije, ponekad se formira isuviše bujna vazдушna micelija koja sprečava razvoj karakterističnih trodimenzionalnih sporulacijskih struktura. Takođe, usled mikroskopskog pregleda izolata često dolazi do narušavanja lanaca konidija što otežava preciznu identifikaciju do nivoa vrste. Tokom osamdesetih i devedesetih godina, mnogi autori su pri identifikaciji bili vođeni isključivo dimenzijama konidija, međutim baziranje isključivo na ovim parametrima može dovesti do nepotpune i nepravilne identifikacije *Alternaria* vrsta (Andersen i sar., 2001). Imajući u vidu da klasične metode identifikacije nisu u potpunosti precizne prilikom razlikovanja vrsta i podvrsta roda

Alternaria, u novije vreme su postali sve primenjeniji molekularni pristupi. U skladu sa ovim naučnim trendovima, a u cilju precizne determinacije i molekularane karakterizacije ispitivanih izolata roda *Alternaria*, nakon morfološke identifikacije, pristupilo se molekularnoj determinaciji *Alternaria* spp.

5.3.2. Molekularna identifikacija ispitivanih izolata *Alternaria* spp.

Molekularna metoda lančane reakcije polimeraze (PCR) i sekvencioniranje umnoženih fragmentata uspešno je primenjeno za detekciju ispitivanih izolata *Alternaria* spp. Nakon ekstrakcije ukupne DNK ispitivanih izolata, izvršena je PCR reakcija sa parom univerzalnih prajmera ITS1/ITS4. Rezultati amplifikacije ciljanog fragmenta rDNK koji obuhvata ITS genomni region (deo 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2 i deo 28S rRNA) posmatrani su na gelu *lab-on-chip* elektroforeze. Kod 22 uzoraka utvrđeno je prisustvo trake veličine oko 570 bp, sa jasnim razdvajanjem 3 uzorka čija je dužina iznosila oko 620 bp (slika 21). Kod negativne kontrole nije zabeležena amplifikacija (PCR smeša sa *RNase free* vodom). Ovi rezultati ukazali su na potencijalno postojanje različitih vrsta *Alternaria* u okviru ispitivanih izolata.



Slika 21. Elektroforetska analiza amplifikovanih PCR produkata dobijenih korišćenjem par prajmera ITS1/ITS4. Kolone: M- DNK marker (15/1500bp); 1-4, 6-8, 10-18, 20-25 - *A.tenuissima*; 5, 9 i 19 -*A.infectoria*, K-kontrola

Analiza sekvenci i identifikacija BLAST metodom

Nakon sekvencioniranja PCR produkata i njihove obrade, konsenzus nukleotidne sekvence deponovane su u NCBI podataka nakon čega su im dodeljeni pristupni brojevi KM516074-KM516085 (tabela 7). Identifikacija izolata izvršena je višestrukim uparivanjem dobijenih sekvenci međusobno, kao i sa sekvencama drugih izolata dostupnih u GenBank bazi podataka. Blast analiza 22 sekvence pokazala je 100% nukleotidnu identičnost sa vrstom *A.tenuissima* kao dominantnom vrstom izolavanom sa zrna spelte, dok su 3 sekvence imale 100% identičnost sa vrstom *A. infectoria*. Visok stepen sličnosti, potvrđen je i nakon poređenja sa referentnim izolatima *Alternaria tenuissima* CBS 918.96 (EF031053) odnosno *Alternaria infectoria* CBS 210.86 (FM958526). Dvadeset i dve sekvence identifikovane kao *A. tenuissima* (KM516074-KM516083) su bile potpuno identične. Takođe, ni 3 sekvence identifikovane kao *A. infectoria* nisu pokazivale nukleotidnu varijabilnost. Genotip spelte sa koga su izolovane ove dve vrste *Alternaria* nije bio signifikantan za identifikaciju vrsta. Razdvajanje amplifikovanih PCR produkata različitih vrsta na gelu potvrđeno je sekvencioniranjem, što ukazuje na mogućnost da se metod lančane reakcije polimeraze u kombinaciji sa *lab-on-chip* elektroforezom može uspešno koristiti za brzu detekciju patogena.

Tabela 7. Rezultati identifikacije *Alternaria* spp. na različitim genotipovima spelte

Gljivica	Izolat	Genotip spelte	GenBank pristupni broj
<i>Alternaria tenuissima</i>	Asp1	Genotip 1	KM516079
	Asp2		KM516080
	Asp3		KM516081
	Asp4		KM516082
	Asp5		KM516083
	Bsp1	Genotip 2	KM516062
	Bsp2		KM516063
	Bsp3		KM516074
	Bsp4		KM516075
	Bsp5		KM516076
	Esp2	Genotip 3	KM516068
	Esp3		KM516069
	Esp4		KM516070
	Esp5		KM516077
	Nsp1	Genotip 4	KM516071
	Nsp2		KM516072
	Nsp3		KM516073

	Nsp5		KM516078
	Osp1	Genotip 5	KM516064
	Osp3		KM516065
	Osp4		KM516066
	Osp5		KM516067
<i>Alternaria infectoria</i>	Esp1		Genotip 3
	Nsp4	Genotip 4	KM516086
	Osp2	Genotip 5	KM516084

Rod *Alternaria* obuhvata veliki broj izrazito varijabilnih i široko rasprostranjenih vrsta i do sada opisano oko 300 različitih patogenih sojeva (Simmons, 2007). Zbog varijabilnosti njihovih morfoloških osobina, identifikacija do nivoa vrsta i sistematizacija je izuzetno kompleksna. Savremena istraživanja u identifikaciji *Alternaria* spp. primenjuju molekularne metode analize DNK sekvenci koje pružaju veću pouzdanost rezultata i imaju niz prednosti. PCR tehnologija zahteva minimalnu količinu materijala i omogućuje amplifikaciju željenog segmenta DNK nekoliko miliona puta, pri čemu strukturna građa DNK ostaje neizmenjena u različitim fiziološkim stadijumima. Takođe, pojedini delovi DNK lanca imaju visok stepen varijabilnosti kod različitih vrsta što omogućuje identifikaciju širih taksonomskih grupa (Pavon i sar., 2010). ITS region genomne DNK je visoko varijabilan između morfološki različitih vrsta gljiva i sa druge strane konzervativan na nivou vrste i kod mnogih rodova fitopatogenih gljiva te se koristi i za filogenetske analize. Obzirom da je ITS1/ITS4 univerzalni par prajmera koji može da amplifikuje ITS region svih eukariota, koristi se i za proveru uspešnosti ekstrakcije DNK.

Molekularna detekcija PCR reakcijama uz korišćenje odgovarajućih prajmera i sekvencioniranje ITS regiona omogućila je dokazivanje prisustva nukleinskih kiselina odgovarajućih *Alternaria* spp. i na taj način potvrdila razlikovanje morfoloških grupa unutar roda *Alternaria*. Potvrđeno je da izolati koji su na osnovu morfoloških karakteristika svrstani u prvu grupu pripadaju vrsti *A.tenuissima*, dok izolati druge grupe vrsti *A.infectoria*. Naši rezultati prikazuju divergentnost vrsta *A.tenuissima* i *A.infectoria* na morfološkom i moleklarnom nivou. Istraživanja Andersen i sar. (2002) ukazuju na to da se ove dve vrste razlikuju i po profilu njihovih metabolita. U literaturi se navode različite grupacije *Alternaria* vrsta (Chou i Wu 2002; Hong i sar., 2005) na osnovu filogenetske analize u okviru kojih *A. tenuissima* pripada *A. alternata* grupi koja produkuje mikotoksine kao što su AOH, AME i TeA (Andersen i sar., 2002). S druge strane, *A. infectoria* pripada *A. infectoria* grupi koji su tipični patogeni strnih žita i skladištenih žitarica koji stvaraju

metabolite infektopenone i novae-zelandin koji su specifični samo za ovu grupu i ne javljaju se kod drugih vrsta (Larsen i sar., 2003).

Rezultati naših istraživanja se u velikoj meri podudaraju sa prethodno identifikovanim *Alternaria* vrstama na pšenici u Evropi i šire koje su identifikovali drugi autori. Na osnovu morfoloških osobina na strnim žitima u zemljama Mediterana Logrieco i sar. (1990, 2003) detektovali su vrste *A. alternata* i *A. triticina*, *A. tenuissima*. Slične rezultate saopštili su i Kossiak i sar. (2004) u Norveškoj, Maškova i sar. (2012) u Slovačkoj i Löiveke i sar. (2004) u Estoniji gde su dominantne vrste na pšenici bile *A. tenuissima* i *A. infectoria* i *A. alternata*. U Argentini zabeležen je veći broj različitih vrsta: *A. tenuissima*, *A. alternata*, *A. longipes*, *A. arborescens*, *A. gaisen* i *A. mali* (Gonzales i sar., 1998; Patriaca i sar., 2007) kao i *A. triticimaculans* (Perelló i Mónaco, 2007) i *A. infectoria* (Oviedo i sar., 2013, Andersen i sar., 2015). Nedavno su Perello i Sisterna (2008) ustanovili prisustvo vrste *Lewia infectoria* (polni stadijum *Alternaria infectoria*) prouzrokovavača crne pegavosti pšenice u Argentini. U Srbiji, na pšenici su identifikovane *A. alternata* i *A. longipes* (Ivanovic i sar., 2001) kao i *A. tenuissima* (Stanojev i sar., 2010).

Primenom molekularnih metoda identifikacije, korišćenjem PCR metode i sekvencioniranjem, na zrnu pšenice u Tunisu su detektovane su *A. alternata*, *A. tenuissima* i *A. japonica* (Bensassi i sar., 2009), a u Izraelu *A. alternata* (Zur i sar., 2002).

O prisutnosti roda *Alternaria* na spelti svedoče pojedini literaturni podaci (Castoria i sar., 2005; Kurowski i Wysocka 2009; Solarska i sar., 2012) sa *A. alternata*. kao jedinom detektovanom vrstom U istraživanjima u okviru ove doktorske disertacije na molekularnom nivou su prvi put identifikovane vrste *A. tenuissima* i *A. infectoria* na zrnu spelte.

5.4. Patogenost odabranih izolata *A. tenuissima* i *A. infectoria* na klasovima i zrnu spelte

Za dalje istraživanja odabrana su 2 izolata *A.tenuissima* (u daljem radu *A .tenuissima* 1 što odgovara uzorku Bsp5 i *A.tenuissima* 2 što odgovara uzorku Esp5) i jedan izolat *A. infectoria* (što odgovara uzorku Esp1) čija infektivnost je ispitana na osnovu veštačke inokulacije klasova tri različita genotipa spelte Nirvana, Austria i Ostro u fazi cvetanja u poljskim uslovima tokom 2011. i 2012. god.

Ispitivani izolati ispoljili su sposobnost da ostvare zarazu na klasovima spelte čime je potvrđena njihova patogenost. Provera patogenosti odabranih izolata potvrđena je tako što su u uslovima poljskog eksperimenta reprodukovani simptomi prirodne infekcije. Na inficiranim klasovima došlo je pojave simptoma crne pegavosti već nakon dve nedelje, a jasno vidljive promene uočene su i na zrnima inokuliranih klasova. Na biljkama koje su kao kontrola tretirane fungicidom, došlo je do znatno slabije pojave simptoma, dok je u tretmanima sa destilovanom vodom intenzitet infekcije varirao u zavisnosti od godine i meteoroloških uslova u periodu nakon inokulacije. Reizolacija patogena sa svih veštački inokuliranih biljaka na kojima su reprodukovani simptomi, obavljena je istim metodama kao i izolacija, čime su zadovoljeni osnovni Kohovi postulati. Po izgledu micelije i morfologiji reproduktivnih organa dobijeni reizolati su u potpunosti odgovarali izvornim izolatima.

Stepen patogenosti određen je na osnovu broja zaraženih zrna i predstavljen je procentualno za svaku godinu posebno. Analizom varijanse ispitan je uticaj različitih tretmana, genotipova i njihova međusobna interakcija na intezitet zaraze odnosno patogenost ispitivanih izolata. Koristeći Tukey-ev HSD test (engl. "*honestly significant differences*"), upoređene su srednje vrednosti tretmana inokulacije *Alternaria* spp. i kontrolnih tretmana (fungicid i voda) posebno za svaku sortu i utvrđena je statistički značajna razlika na nivou $p<0,05$, sa granicom poverenja od 95% .

ANOVA test ukazao je na statistički značajan uticaj (na nivou $p<0,01$), tretmana i međusobne interakcije genotip \times tretman na patogenost inokuliranih izolata u 2011. God. (tabela 8). Najveću zarazu ostvario je izolat *A.tenuissima* 2 na genotipu Austria (72%), a takođe visok stepen infekcije ovog izolata zabeležen je i kod genotipova Nirvana (68%) i Ostro (66%). Kod sva tri genotipa patogenost ovog izolata se statistički značajno razlikovala od ostalih tretmana inokulacije (tabela 9). Patogenost izolata *A.infectoria* je statistički značajno bila različita od tretmana *A.tenuissima* 1 i 2 i intenzitet zaraze se kretao od 44% kod genotipa Nirvana i Austria do 54% kod genotipa Ostro. Tretman fungicidom se pokazao

statistički značajno različit od svih ostalih tretmana sa najmanjim stepenom zaraze kod sva tri genotipa (16-22%), što ukazuje na efikasnost kontrolnog tretmana. U tretmanima vodom patogenost odabranih izolata je bila nešto viša od tretmana fungicidom (24-25%) što je objašnjivo uspostavljanjem povoljnih uslova vlažnosti koji utiču za razvoj *Alternaria* spp. u prirodnom uslovima.

Tabela 8. Analiza varijanse intenziteta zaraze oljuštenih zrna različitih genotipova spelte inokulisanim ispitivanim izolatima *Alternaria* spp. u 2011.god.

Izvor varijacije	Suma kvadrata	Broj stepeni slobode	Varijansa	F vrednost	p vrednost
Genotip	174,4	2	87,2	2,074	0,137531
Tretman	18858,7 ⁺	4	4714,7	112,135	0,000000
Genotip x tretman	926,9 [*]	8	115,9	2,756	0,014446
Greška modela	1892,0	45	42,0		

*Statistički značajna razlika na nivou $p < 0,05$; ⁺Statistički značajna razlika na nivou $p < 0,01$

Tabela 9. Tukey-ev HSD test- srednje vrednosti intenziteta zaraze (%) oljuštenih zrna različitih genotipova spelte inokulisanim ispitivanim izolatima *Alternaria* spp. u 2011.godini

Tretman/Sorta	Nirvana	Austria	Ostro	CV
<i>A.tenuissima</i> 1	40±5,29 ^{cd}	40±14,05 ^{cd}	56±10,74 ^{abc}	5,22
<i>A.tenuissima</i> 2	68±4,13 ^{ab}	72±4,08 ^a	66±1,63 ^{ab}	9,19
<i>A.infectoria</i>	44±3,37 ^c	44±6,93 ^c	54±6,73 ^{bc}	5,63
Fungicid	22±7,12 ^f	20±3,65 ^f	16±3,65 ^f	9,76
Voda	24±3,64 ^{de}	24±5,94 ^{de}	25±4,76 ^{de}	8,53

*Vrednosti obeležene različitim slovom u koloni tabele su statistički značajno različite na nivou $p < 0,05$ u intervalu poverenja 95%; CV-koeficijent varijacije

U 2012. god., analizom varijanse utvrđen je statistički vrlo značajan uticaj sva tri izvora varijacije na patogenost odabranih izolata, koja se menjala u zavisnosti od različitih genotipova, tretmana kao i međusobne interakcija genotip x tretman (tabela 10). Srednje vrednosti intenziteta zaraze prikazane su u tabeli 11. Najveću patogenost ispoljili su izolati *A.tenuissima* 1 i 2 na genotipu Ostro (68%), s tim što se u ovoj istraživačkoj godini intenzitet zaraze ostalih tretmana inokulacije nisu statistički značajno razlikovali. Tretmani fungicidom kod sva tri genotipa (8-16%) su bili statistički značajno različiti od ostalih tretmana, te je i ove godine ispoljen pozitivan efekat hemijske zaštite u kontroli *Alternaria* spp.

Tabela 10. Analiza varijanse intenziteta zaraze oljuštenih zrna različitih genotipova spelte inokulisanim ispitivanim izolatima *Alternaria* spp. u 2012.god.

Izvor varijacije	Suma kvadrata	Broj stepeni slobode	Varijansa	F vrednost	p vrednost
Genotip	787,7 ⁺	2	393,9	12,041	0,000065
Tretman	18260,3 ⁺	4	4565,1	139,557	0,000000
Sorta x tretman	2158,9 ⁺	8	269,9	8,250	0,000001
Greška modela	1472,0	45	32,7		

⁺Statistički značajna razlika na nivou $p < 0,01$

Tabela 11. Tukey-ev HSD test - srednje vrednosti intenziteta zaraze (%) oljuštenih zrna različitih genotipova spelte inokulisanim ispitivanim izolatima *Alternaria* spp. u 2012.god.

Tretman/Sorta	Nirvana	Austria	Ostro	CV
<i>A.tenuissima</i> 1	52±1,63 ^{bcde}	44±1,63 ^{defg}	68±1,48 ^a	3,71
<i>A.tenuissima</i> 2	54±2,83 ^{abcd}	64±1,93 ^{abc}	68±4,9 ^a	7,2
<i>A.infectoria</i>	42±2,47 ^{defg}	65±5,35 ^{ab}	50±0,89 ^{cdef}	8,24
Fungicid	8±0,17 ^h	16±1,32 ^h	16±0,65 ^h	8,25
Voda	38±1,33 ^{efg}	32±1,89 ^g	36±2,65 ^{fg}	7,36

*Vrednosti obeležene različitim slovom u koloni tabele su statistički značajno različite na nivou $p < 0,05$ u intervalu poverenja 95%; CV-koeficijent varijacije

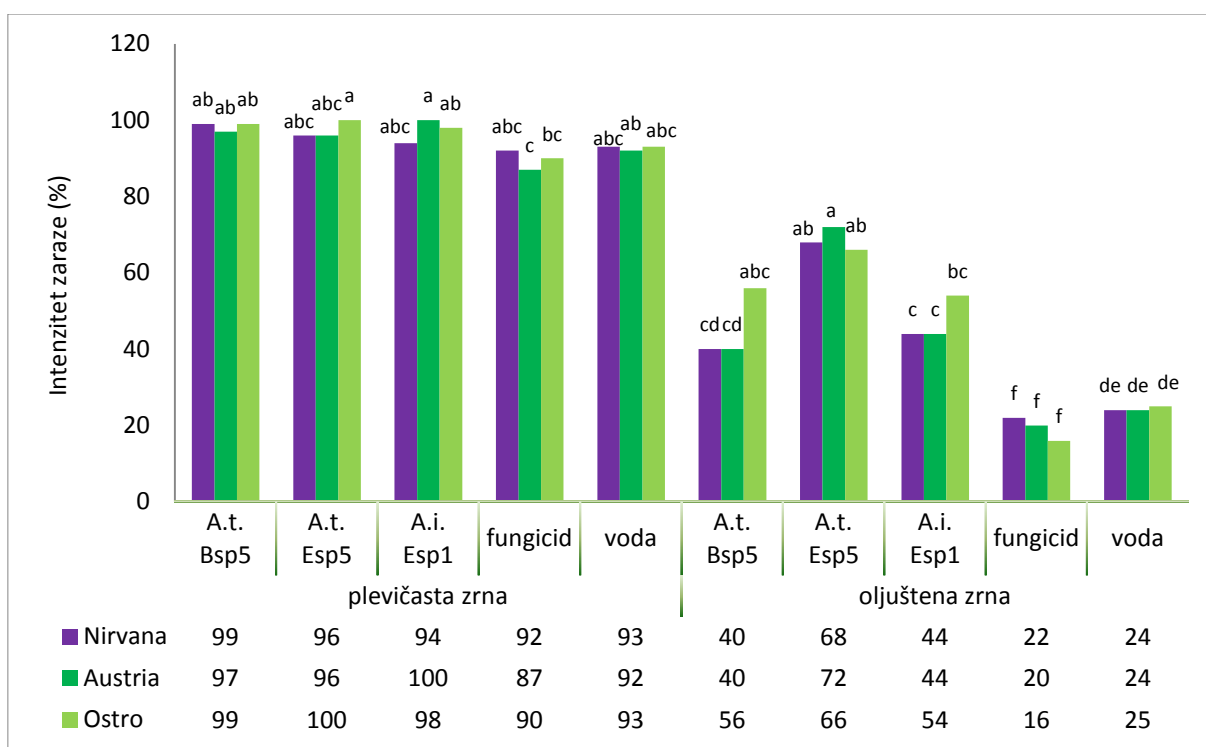
Poređenjem patogenosti inokuluma tokom 2011 i 2012. God., veći stepen infekcije je zabeležen u 2011. God. kako u tretmanima inokulacije *Alternaria* spp. tako i pri tretmanima fungicidom, što se može objasniti obilnim padavinama i visokim temperaturama u julu mesecu 2011. God. koje su pogodovale razvoju *Alternaria* spp. U 2012. god. toplo i uglavnom suvo vreme sa znatno manje padavina (32% od višegodišnjeg proseka) tokom juna i jula meseca nije pogodavalo razvoju *Alternaria* spp. te je pozitivan efekat kontrole fungicidom ispoljen znatno jače. U našim istraživanjima koeficijent varijacije, kao pokazatelj reprezentativnosti uzorka, kretao se od 5,73-8,25% u 2011. god. odnosno od 3,71-8,25% u 2012. god. što ukazuje na pouzdanost metodološkog pristupa.

5.5. Ocena zaraze inokuliranih biljaka *Alternaria* spp. uz poređenje intenziteta zaraze posebno oljuštenih zrna i zrna sa plevičastim omotačima

5.5.1. Stepen zaraze *Alternaria* spp.

Intenzitet zaraze odabranih izolata *A. tenuissima* 1 i 2 i *A. infectoria* nakon veštačke inokulacije klasova tri različita genotipa spelte (Nirvana, Austria i Ostro) u 2011. i 2012. god. izražen je procentualno posebno za plevičasta i oljuštena zrna, uz poređenje intenziteta zaraze iz tretmana fungicidom i vodom.

Na osnovu dvofaktorijale analize varijanse (ANOVA) uticaj tretmana je bio statistički vrlo značajan (na nivou $p < 0,01$) na intenzitet zaraze plevičastih zrna u 2011. godini, dok se uticaj genotipova i međusobnog dejstva genotip \times tretman nije pokazao kao signifikantan. Pregledom zrna inokuliranih odabranim *Alternaria* izolatima, kao i onih tretiranih fungicidom i vodom, uočena je značajna razlika u intenzitetu zaraze *Alternaria* spp. na zrnima sa plevičastim omotačima gde se intenzitet infekcije kretao od 87-100% dok je na oljuštenim zrnima iznosio od 16-72% (grafikon 1).

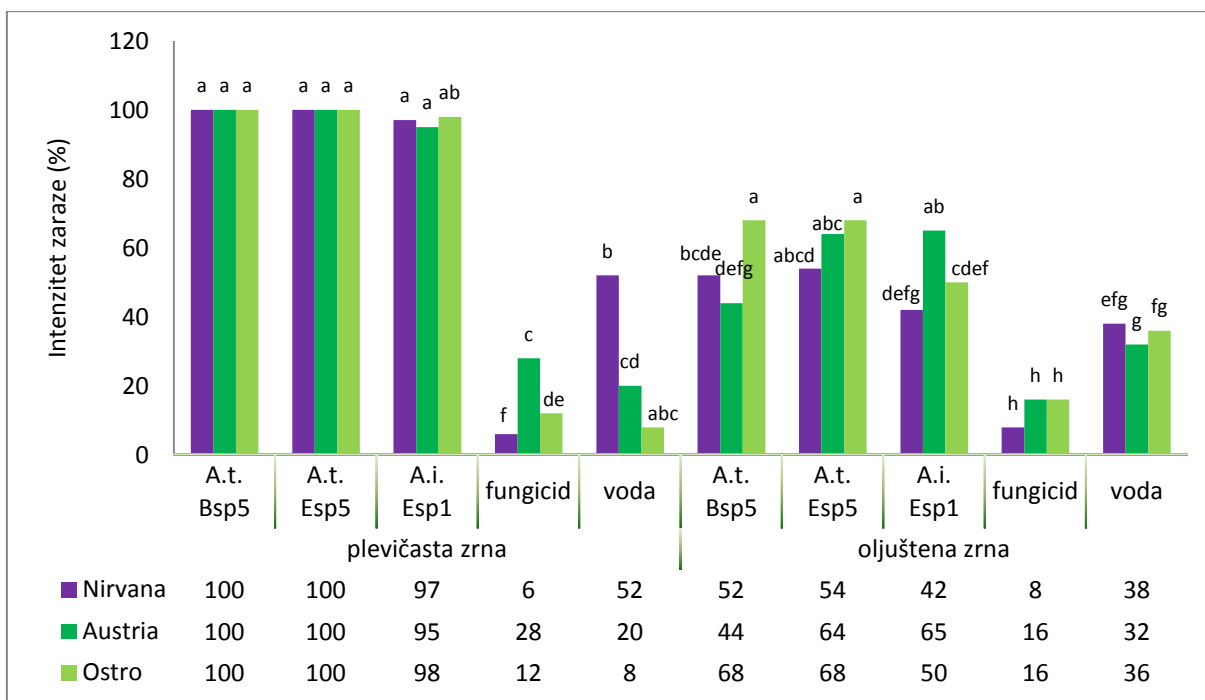


Grafikon 1. Intenzitet zaraze plevičastih i oljuštenih zrna spelte nakon inokulacije u 2011. godini (A.t Bsp5-*A.tenuissima* 1; A.t. Esp-*A.tenuissima* 2; A.i.-*A.infectoria*)

*Vrednosti obeležene različitim slovom u koloni tabele su statistički značajno različite na nivou $p < 0,05$ u intervalu poverenja 95%

Maksimalni nivo infekcije (100%) na plevičastim zrnima ostvaren je kod tretmana *A.tenuissima* (2) na genotipu Ostro i *A.infectoria* na genotipu Austria i signifikantno se razlikovao od ostalih inokulisanih tretmana. Najniži nivo zaraze zabeležen je kod tretmana fungicidom na genotipu Austria (87%) i statistički se značajno razlikovao od ostalih kontrolnih tretmana. Kod druga dva genotipa tretman fungicidom je uticao na manji stepen zaraze ali se nije statistički razlikovao od ostalih tretmana. Takođe, infekcija nije bila značajno manjeg intenziteta ni u tretmanima vodom kod sva tri genotipa, što se može pripisati obilnim padavinama u periodu nakon inokulacije u 2011. god. i povoljnom uticaju agrometeoroloških uslova na razvoj *Alternaria* spp.

Na oljuštenim zrnima, analiza varijabilnosti uticaja tretmana i međusobne interakcije genotip × tretman pokazala se vrlo značajno na intenzitet zaraze (na nivou $p < 0,01$). Najveći stepen zaraze zabeležen je kod tretmana *A.tenuissima* 2 na genotipu Austria (72%) i značajno je bio različit od ostalih tretmana *Alternaria* spp., dok je najniži nivo zaraze registrovan u tretmanu fungicidom na genotipu Ostro gde je iznosio 16%. Kod oljuštenih zrna tretman fungicidom kod svih genotipova pokazao se statistički značajno različitim od ostalih tretmana.



Grafikon 2. Intenzitet zaraze plevičastih i oljuštenih zrna spelte nakon inokulacije u 2012. godini (A.t Bsp5-*A.tenuissima* 1; A.t. Esp-*A.tenuissima* 2; A.i.-*A.infectoria*)

*Vrednosti obeležene različitim slovom u koloni tabele su statistički značajno različite na nivou $p < 0,05$, u intervalu poverenja 95%

U 2012. god. uticaj genotipa, tretmana kao i međusobna interakcije genotipa × tretman su se pokazali statistički visoko značajnim (na nivou $p < 0,01$) na intenzitet zaraze kako kod plevičastih tako i kod oljuštenih zrna. Na grafikonu 2 prikazani su rezultati intenziteta zaraze različitih genotipova spelte nakon inokulacije odabranim *Alternaria* spp. gde je jasno izražen znatno veći stepen infekcije na plevičastim zrnima u poređenju sa oljuštenim zrnima spelte. Najveći stepen zaraze plevičastih zrna kod sva tri genotipa (100%) detektovan je u tretmanima *A. tenuissima* 1 i 2. Izuzetno visok i statistički vrlo sličan stepen zaraze registrovan je i kod tretmana *A. infectoria* (95-98%). Intenzitet zaraze pri kontrolnim tretmanima fungicidom i vodom se značajno razlikovao od zaraze klasova inokulisanih *Alternaria* spp., pri čemu je najniži stepen infekcije registrovan kod tretmana fungicidom na genotipu Nirvana (6%) bio je statistički značajno različit od ostalih kontrolnih tretmana.

Kod oljuštenih zrna najveći intenzitet zaraze ostvaren je takođe u tretmanima *A. tenuissima* 1 i *A. tenuissima* 2 (68%) i kod genotipa Ostro statistički se značajno razlikovao od ostalih tretmana *Alternaria* spp. kod druge dva genotipa. Nivo zaraze pri tretmanu fungicidom je bio najniži kod genotipa Nirvana (8%) dok je kod genotipa Austria i Ostro iznosio 16% i kod sva tri genotipa je bio statistički značajno različit od ostalih tretmana.

Prikazani rezultati ukazuju na to da plevičasti omotači predstavljaju potencijalne barijere u prodiranju patogenih gljiva roda *Alternaria*, što je od izuzetnog značaja za otpornost spelte naročito u uslovima gajenja u sistemu organske proizvodnje gde upotreba hemijske zaštite nije dozvoljena. O uticaj plevičastih omotača spelte u zaštiti zrna od fitopatogenih gljiva (*Septoria nodorum*, *Fusarium nivale* i *Alternaria* spp., *Pythium aristosporum*) u uslovima prirodne infekcije saopštili su Riesen i dr. (1986) gde je nivo zaraze na plevičastim zrnima iznosio 26%, dok je na oljuštenim zrnima bio 17%. Rezultati naših istraživanja su u skladu sa navodima Bodroža-Solarov i sar. (2010b) gde se procenat zaraženih zrna *Alternaria* spp. kretao od 98-100% na plevičastim zrnima sorti Nirvana, Ostro i Eko 10, dok je na oljuštenim iznosio 13-16%. Generalno govoreći broj literaturnih podataka o tome u kojoj meri plevičasti omotači utiču na zaštitu zrna spelte od gljiva je izuzetno oskudan i fokusiran je uglavnom na metabolite koje proizvode gljive, što ograničava dalji komparativni pregled naših rezultata.

Uprkos prirodnoj otpornosti i genetskoj predodređenosti spelte za organsku proizvodnju, rezultati efikasne primene fungicida u suzbijanju *Alternaria* spp. su dokazani i u 2011. i 2012. god., što ukazuje na opravdanost upotrebe fungicida u dobroj poljoprivrednoj praksi u cilju proizvodnje zdravstveno bezbedne hrane. Usled pojave *Alternaria* spp. na usevima pšenice, folijarna upotreba fungicida nije uvek neophodna mera,

jer dalji razvoj patogena u mnogome zavisi i od uslova spoljašnje sredine. Imajući u vidu da se infekcija *Alternaria* spp. odvija u fazi cvetanja i odmah nakon cvetanja u periodu do mlečne zrelosti, pravovremena upotreba fungicida je od odlučujućeg značaja za uspešnu zaštitu spelte u poljskim uslovima (Li i sar., 2004). Istraživanja Balaž i sar. (2008) pokazuju da tretiranjem pšenice u fazi cvetanja postoje značajne razlike u stepenu zaraženosti semena između netretiranih varijanata i tretiranim gljivama iz roda *Alternaria* kao i drugim vrstama. Isti autori navode da je tretman fungicidima u ovoj fazi razvoja spelte doveo do povećanja prinosa za 20%, a imao je pozitivan učinak i na druge parametre tehnološkog kvaliteta zrna (Balaž i sar., 2011). Prethodna istraživanja potvrđuju Culshaw i sar. (1988) gde hemijska zaštita pšenice u kasnijoj fazi tj. tokom sazrevanja, nije imala nikakvog efekta na pojavu crne pegavosti na žitima.

5.5.2. Kolorimetrijska merenja

Kolorimetrijskim merenjima intenziteta zaraze pleličastih i oljuštenih zrna inokulisanih biljaka u 2011. i 2012. god. ispitana je mogućnost ocene nivoa infekcije metodom instrumentalne analize čime su potvrđena standardna vizuelna fitopatološka ispitivanja. Uticaj različitih tretmana i genotipova, kao i međusobno dejstvo genotip × tretman, na boju posebno pleličastih i oljuštenih zrna, ispitan je analizom varijanse. Ocena zaraze predstavljena je pomoću parametra L*, koji je pokazatelj intenziteta svetloće, a srednje vrednosti dobijenih rezultata upoređene su pomoću Tukey-evog HSD testa značajnosti razlika na nivou $p < 0,05$, sa granicom poverenja od 95%.

U obe istraživačke godine, dobijena p vrednost ($p < 0,01$) ukazuje na statistički vrlo značajan uticaj tretmana na boju zaraze, za razliku od uticaja sorte i intetrakcije genotip x tretman koji nisu bili stat. značajni ni kod pleličastih ni kod oljuštenih zrna (tabele 12- 15).

Tabela 12. Analiza varijanse boje pleličastih zrna različitih genotipova spelte inokulisanih ispitivanim izolatima *Alternaria* spp. u 2011. god.

Izvor varijacije	Suma kvadrata razlika	Broj stepeni slobode	Varijansa	F vrednost	p vrednost
Uticaj sorte	0,6	2	0,3	0,03	0,966947
Uticaj tretmana	579,8 ⁺	4	145,0	15,34	0,000000
Sorta x tretman	93,2	8	11,6	1,23	0,296219
Greška modela	566,9	60	9,4		

⁺Statistički značajna razlika na nivou $p < 0,01$

Tabela 13. Analiza varijanse boje oljuštenih zrna različitih genotipova spelte inokulisanih ispitivanim izolatima *Alternaria* spp. u 2011.god.

Izvor varijacije	Suma kvadrata razlika	Broj stepeni slobode	Varijansa	F vrednost	p vrednost
Genotip	2,3	2	1,2	0,29	0,745737
Tretman	166,9 ⁺	4	41,7	10,59	0,000001
Sorta x tretman	18,9	8	2,4	0,60	0,773102
Greška modela	236,3	60	3,9		

⁺Statistički značajna razlika na nivou $p < 0,01$

Tabela 14. Analiza varijanse boje plevičastih zrna različitih genotipova spelte inokulisanih ispitivanim izolatima *Alternaria* spp. u 2012. god.

Izvor varijacije	Suma kvadrata razlika	Broj stepeni slobode	Varijansa	F vrednost	p vrednost
Uticao sorte	22,9	2	11,5	2,14	0,126927
Uticao tretmana	398,7 ⁺	4	99,7	18,58	0,000000
Sorta x tretman	44,5	8	5,6	1,04	0,418762
Greška modela	321,9	60	5,4		

⁺Statistički značajna razlika na nivou $p < 0,01$

Tabela 15. Analiza varijanse boje oljuštenih zrna različitih genotipova spelte inokulisanih ispitivanim izolatima *Alternaria* spp. u 2012. god.

Izvor varijacije	Suma kvadrata razlika	Broj stepeni slobode	Varijansa	F vrednost	p vrednost
Uticao sorte	59,4	2	29,7	1,97	0,148427
Uticao tretmana	1711,6 ⁺	4	427,9	28,36	0,000000
Sorta x tretman	103,3	8	12,9	0,86	0,558655
Greška modela	905,4	60	15,1		

⁺Statistički značajna razlika na nivou $p < 0,01$

Rezultati srednjih vrednosti kolorimetrijskih merenja na plevičastim zrnima u 2011. god. prikazani su u tabeli 16. Najveća vrednost parametra L* (najsvetlija zrna) zabeležena je u tretmanu fungicidom kod genotipa Ostro (66,64) i Austria (66,38) i ona se statistički značajno razlikovala od ostalih tretmana. Najmanja vrednost L* (najtamnije obojena zrna) registrovana je kod istih genotipova pri tretmanima *A.infectoria* (57,39) i *A.tenussima* 2 (57,16) i statistički značajno se razlikovala od ostalih tretmana inokulacije. U tretmanima

vodom vrednosti L* su bile veće u poređenju sa tretmanima *Alternaria* spp., dok su nešto manje bile u odnosu na tremane fungicidom kod sva tri genotipa i nisu se značajno razlikovale od ostalih termna inokulacije. To se može objasniti nepovoljnim agrometeorološkim uslovima u 2011. god. tj. obilnim padavinama u prvoj dekadi jula, neposredno nakon inokulacije, koje su pogodovale razvoju *Alternaria* spp.

Tabela 16. Tukey-ev HSD test: srednje vrednosti boje (L*) plevičastih zrna različitih genotipova spelte inokulisanih ispitivanim izolatima *Alternaria* spp. u 2011.god.

Tretman/Sorta	Nirvana	Austria	Ostro	CV
<i>A.tenuissima</i> 1	60,64±4,93 ^{abc}	60,34±3,92 ^{abc}	62,58±2,75 ^{abc}	8,13
<i>A.tenuissima</i> 2	60,16±3,92 ^{abc}	61,59±4,31 ^{abc}	57,16±2,34 ^c	6,99
<i>A.infectoria</i>	59,88±2,37 ^{abc}	57,39±2,13 ^c	58,38±2,27 ^{bc}	3,95
Fungicid	64,85±2,43 ^{ab}	66,38±2,22 ^a	66,64±2,46 ^a	5,88
Voda	63,60±2,45 ^{abc}	64,47±3,79 ^{ab}	64,56±1,62 ^{ab}	3,74

*Vrednosti obeležene različitim slovom u koloni tabele su statistički značajno različite na nivou $p < 0,05$, u intervalu poverenja 95%; CV-koeficijent varijacije

Kod oljuštenih zrna u 2011. god., najveću L* vrednost pokazali su tretmani fungicidom kod sva tri genotipa (54,16-54,87), dok je slična vrednost registrovana i kod tretmana vodom kod genotipa Ostro (tabela 17). Svetlija boja kod kontrolnih tretmana se statistički značajno razlikovala od tretmana inokulacije, što potvrđuje efektivno suzbijanje *Alternaria* spp. fungicidom kao što je i pokazano kod prethodne vizuelne ocene.

Tabela 17. Tukey-ev HSD test: srednje vrednosti boje (L*) oljuštenih zrna različitih genotipova spelte inokulisanih ispitivanim izolatima *Alternaria* spp. u 2011.god.

Tretman/Sorta	Nirvana	Austria	Ostro	CV
<i>A.tenuissima</i> 1	52,45±1,06 ^{ab}	52,10±1,04 ^{ab}	51,51±1,58 ^{ab}	3,07
<i>A.tenuissima</i> 2	50,88±1,72 ^{ab}	48,79±1,49 ^b	51,79±1,98 ^{ab}	3,82
<i>A.infectoria</i>	52,50±0,49 ^{ab}	52,99±1,80 ^{ab}	52,67±1,31 ^{ab}	3,39
Fungicid	54,8±2,31 ^a	54,60±2,90 ^a	54,16±3,04 ^a	5,62
Voda	53,71±2,32 ^b	53,80±1,28 ^b	54,09±2,88 ^a	5,23

*Vrednosti obeležene različitim slovom u koloni tabele su statistički značajno različite na nivou $p < 0,05$, u intervalu poverenja 95%; CV-koeficijent varijacije

Rezultati obojenosti plevičastih zrna različitih geotipova spelte u 2012. god. prikazani su u tabeli 18. Najveća i statistički najznačajnija vrednost parametra L* registrovana je na genotipu Nirvana kod tretmana fungicidom (59,04) kao i kod genotipa Austria u tretmanu vodom (58,97). Najtamniju obojenost i najmanju L* vrednost (50,6) imale su plevice biljaka inokulisanih *A. tenuissima* (1) na genotipu Nirvana.

Tabela 18. Tukey-ev HSD test: srednje vrednosti boje (L*) plevičastih zrna različitih genotipova spelte inokulisanih ispitivanim izolatima *Alternaria* spp. u 2012. god.

Tretman/Sorta	Nirvana	Austria	Ostro	CV
<i>A.tenuissima</i> 1	50,60±1,20 ^d	53,47±1,71 ^{bcd}	53,12±2,03 ^{bcd}	3,82
<i>A.tenuissima</i> 2	50,25±2,87 ^{cd}	52,01±1,54 ^{cd}	54,7±3,33 ^{abcd}	6,09
<i>A.infectoria</i>	54,53±2,80 ^{abcd}	54,56±2,65 ^{abcd}	54,7±3,33 ^{abcd}	6,09
Fungicid	59,04±2,14 ^a	57,24±2,63 ^{abc}	58,4±1,78 ^{ab}	4,59
Voda	56,49±1,47 ^{abc}	57,25±2,54 ^{abc}	58,97±0,77 ^a	4,43

*Vrednosti obeležene različitim slovom u koloni tabele su statistički značajno različite na nivou $p < 0,05$, u intervalu poverenja 95%; CV-koeficijent varijacije

Kod oljuštenih zrna, najveću vrednost L* su imala zrna iz tretmana fungicidom; intenzitet svetloće se statistički značajno razlikovao od ostalih tretmana kao što je prikazano u tabeli 19. Najtamnija zrna, što ukazuje na najveći nivo zaraze, su registrovana na genotipu Ostro kod inokulacije *A.tenuissima* (1 i 2).

Tabela 19. Tukey-ev HSD test: srednje vrednosti boje (L*) oljuštenih zrna različitih genotipova spelte inokulisanih ispitivanim izolatima *Alternaria* spp. u 2011.god.

Tretman/Sorta	Nirvana	Austria	Ostro	CV
<i>A.tenuissima</i> 1	55,76±2,27 ^{bcd}	54,37±3,24 ^{bcd}	49,41±3,67 ^d	7,43
<i>A.tenuissima</i> 2	53,44±2,70 ^{bcd}	52,99±3,50 ^{bcd}	49,95±1,46 ^{cd}	6,60
<i>A.infectoria</i>	52,42±1,54 ^{bcd}	54,54±2,26 ^{bcd}	52,67±1,31 ^{bcd}	4,14
Fungicid	64,86±3,48 ^a	64,56±1,86 ^a	65,19±1,25 ^a	5,37
Voda	58,71±3,26 ^{ab}	58,05±4,61 ^{abcd}	58,19±1,58 ^{abc}	7,94

*Vrednosti obeležene različitim slovom u koloni tabele su statistički značajno različite na nivou $p < 0,05$, u intervalu poverenja 95%; CV-koeficijent varijacije

U obe istraživačke godine, koeficijenti varijacije u svim tretmanima su bili ispod 10%, što ukazuje na visoku tačnost primenjene instrumentalne metode, obzirom da opseg variranja eksperimentalnih podataka mora biti pod stalnom kontrolom kao ključno pitanje pouzadane ocene eksperimentalnih uslova (Mičić i Bosančić, 2012).

Simptomi infekcije *Alternaria* spp. na zrnju žitarica ogledaju se u promeni boje zrna, koje postaje tamno mrko ili crno, usled produkcije pigmenta melanina (Thomma, 2003), te su dobijeni rezultati u skladu sa očekivanjima da se intenzitet svetloće menja u zavisnosti od stepena infekcije. Rezultati instrumentalnih merenja se u velikoj meri podudaraju sa rezultatima vizuelne ocene, tako da su u tretmanima gde je ostvaren najjači intenzitet zaraze *Alternaria* spp., zrna imala najtamniju obojenost, za razliku od tretmana fungicidom gde su zrna bila znatno svetlija. Međutim, međusobnim poređenjem vizuelne i instrumentalne ocene intenziteta zaraze u odnosu na tretmane inokulacije različitih *Alternaria* izolata nije

bilo značajnih razlika. Takođe, ni uticaj genotipa se nije pokazao kao značajan izvor varijacije boje prilikom inokulacije, što je bilo suprotno našim očekivanjima obzirom da je boja zrna pšenice vrlo često sortna karakteristika (Groos i sar., 2002; Bordes i sar., 2008). Promena boje u zavisnosti od tretmana i stepena zaraze evidentna je kako na pleličastim omotačima, tako i na oljuštenim zrnima. Dobijeni rezultati su u korelaciji sa istraživanjima Janić-Hajnal i sar. (2014) koji su utvrdili značajne razlike u boji zrna pšenice inokulisanog *Alternaria* spp. nego tretiranog fungicidom i vodom, gde je intenzitet svetloće na inokulisanim zrnima iznosio 52,20 dok je na zrnima tretiranim fungicidom vrednost L* bila 53,34. Po ovim autorima, nije bilo statistički značajne razlike u tretmanima fungicidom i vodom, kao što je prikazano i u našim istraživanjima. Što se tiče spelte, do sada su vršena kolorimetrijska merenja proizvoda na bazi ove žitarice, kao što su speltino brašno (Angioloni i Collar, 2011), mekinje (Mastromatteo i sar., 2008), hleb (Filipčev i sar., 2013) i testenine (Marconi i sar., 2002; Filipović i sar., 2012) ukazujući na reološki i pecivni kvalitet speltinih proizvoda. U iscrpnom pregledu literature ne postoje podaci o promeni obojenosti speltinog zrna usled infekcije gljivama, te rezultati ovih istraživanja predstavljaju novi doprinos u tom domenu. Takođe, ova istraživanja ukazuju da se metoda instrumentale ocene zaraze može koristiti kao efikasna i brza metoda detekcije tamnokličnih zrna gde uz dodatne verifikacije postoji mogućnost primene i u praksi.

5.6. Masa klasova inokulisanih biljaka spelte

Analizom uticaja različitih genotipova, tretmana kao i međusobne interakcije genotip × tretman (tabela 20 i 21) uticaj tretmana se, za razliku od ostalih izvora varijacije, pokazao statistički veoma značajan za masu klasa spelte u obe istraživačke godine (na nivou $p < 0.01$).

Tabela 20. Analiza varijanse mase klasova različitih genotipova spelte inokulisanih ispitivanim izolatima *Alternaria* spp. u 2011. god.

Izvor varijacije	Suma kvadrata	Broj stepeni slobode	Varijansa	F vrednost	p vrednost
Uticaj sorte	0,2681	2	0,1341	1,143	0,3321798
Uticaj tretmana	7,1609 ⁺	4	1,7902	15,268	0,000000
Genotip x tretman	0,8679	8	0,1085	0,925	0,497875
Greška modela	15,8290	135	0,1173		

⁺Statistički značajna razlika na nivou $p < 0,01$

Tabela 21. Analiza varijanse mase klasova različitih genotipova spelte inokulisanih ispitivanim izolatima *Alternaria* spp. u 2012. god.

Izvor varijacije	Suma kvadrata	Broj stepeni slobode	Varijansa	F vrednost	P vrednost
Uticaoj sorte	0,2725	2	0,1363	1,218	0,295993
Uticaoj tretmana	10,6353 ⁺	4	2,6588	23,769	0,000000
Genotip x tretman	1,1798	8	0,1474	0,318	0,239652
Greška modela	15,1010	135	0,1119		

⁺Statistički značajna razlika na nivou $p < 0,01$, u intervalu poverenja 95%

Analizom srednje vednosti mase klasova Tukey-evim HSD testom i upoređivanjem dobijene vrednosti u tretmanima inokulacije *Alternaria* spp. i kontrolnih tretmana (fungicid i voda) posebno za svaki genotip, utvrđena je statistički značajna razlika na nivou $p < 0,05$, sa granicom poverenja od 95% .

U 2011. god., najveća masa je izmerena u tretmanu fungicidom kod genotipa Austria (1,75 g) i ona se statistički značajno razlikovala od ostalih vrednosti izmerenih kod drugih tretmana (tabela 22). Najmanju masu imali su klasovi genotipa Austria inokulisani sa *A.tenuissima* 1 (1,03g) i genotipa Ostro nakon inokulacije *A.tenuissima* 1 (1,03g) i *A.infectoria* (1,13), koja se statistički značajno razlikovala od ostalih tretmana inokulacije. Masa klasova tretranih vodom nije bila značajno različita od ostalih tretmana inokulacije.

Tabela 22. Tukey-ev HSD test: srednje vrednosti mase klasova (g) različitih genotipova spelte inokulisanih ispitivanim izolatima *Alternaria* spp. u 2011. god.

Tretman/Genotip	Nirvana	Austria	Ostro	CV
<i>A.tenuissima</i> 1	1,19±0,09 ^{bc}	1,03±0,09 ^c	1,03±0,09 ^c	8,74
<i>A.tenuissima</i> 2	1,25±0,06 ^{abc}	1,45±0,05 ^{abc}	1,23±0,11 ^{bc}	8,94
<i>A.infectoria</i>	1,19±0,10 ^{bc}	1,43±0,14 ^{abc}	1,13±0,08 ^c	9,72
Fungicid	1,65±0,12 ^{ab}	1,75±0,16 ^a	1,66±0,14 ^{ab}	8,7
Voda	1,52±0,08 ^{abc}	1,53±0,13 ^{abc}	1,65±0,12 ^{ab}	8,44

*Vrednosti obeležene različitim slovom u koloni tabele su statistički značajno različite na nivou $p < 0,05$, u intervalu poverenja 95%; CV- koeficijent varijacije

U 2012. god. takođe najveću statistički značajno različitu masu u odnosu na druge tretmane imali su klasovi genotipa Austria tretirani fungicidom (2,2 g), dok je najmanja statistički značajno različita masa izmerena pri inokulaciji *A.tenuissima* 1 genotipa Austria (1,076 g) odnosno *A.tenuissima* 1 (1.64 g)) i *A.infectoria* (1,7 g) na genotipu Ostro. Rezultati Tukeyev-og HSD testa prikazani su u tabeli 23.

Tabela 23. Tukey-ev HSD test: srednje vrednosti mase klasova (g) različitih genotipova spelte inokulisanih ispitivanim izolatima *Alternaria* spp. u 2012.god.

Tretman/Genotip	Nirvana	Austria	Ostro	CV
<i>A.tenuissima</i> 1	1,69±0,12 ^{bc}	1,76±0,14 ^c	1,64±0,09 ^c	7,95
<i>A.tenuissima</i> 2	1,60±0,15 ^{abc}	1,56±0,11 ^{abc}	1,74±0,12 ^{bc}	9,38
<i>A.infectoria</i>	1,77±0,16 ^{bc}	1,63±0,13 ^{abc}	1,7±0,16 ^c	9,41
Fungicid	2,60±0,13 ^{ab}	2,2±0,16 ^a	1,82±0,12 ^{ab}	7,27
Voda	1,74±0,15 ^{abc}	1,84±0,13 ^{abc}	2,32±0,12 ^{ab}	8,62

*Vrednosti obeležene različitim slovom u koloni tabele su statistički značajno različite na nivou $p < 0,05$, u intervalu poverenja 95%; CV- koeficijent varijacije

U obe istraživačke godine tretmani fungicidom imali su značajan uticaj na povećanje mase klasa, dok su zaražena zrna u svim tretmanima inokulacije *Alternaria* spp. imali znatno manju masu klasova, što ukazuje na efikasnost preparata za zaštitu bilja u dobroj poljoprivrednoj praksi u proizvodnji zdravstveno bezbedne hrane visokih prinosa. Takođe, koeficijenti varijacije su se kretali u intervalu od 8,7-9,72% u 2011.god., odnosno od 7,27-9,38% u 2012. god. što potvrđuje tačnost izvršenih merenja.

5.7. Sadržaj *Alternaria* toksina (AOH i AME) u plevičastim omotačima i oljuštenim zrnima spelte

Primenom hromatografskih uslova dobijene su koncentracije ispitivanih *Alternaria* toksina, alternariol (AOH) i aletrnariol-monometil etar (AME) u oljuštenim zrnima spelte i plevičastim omotačima posebno. Imajući u vidu da je cilj ovih istraživanja bio da se utvrdi u kojoj meri plevičasti omotači štite zrno od kontaminacije *Alternaria* toksinima, u proračunu koncentracije mikotoksina različiti genotipovi spelte uzeti su obzir kao broj ponavljanja.

Izvori varijacije bili su uticaji oljuštenih odnosno plevičastih zrna, različiti tretmani inokulacije koji su obuhvatili izolate *A. tenuissima* 1, *A. tenuissima* 2 i *A.infectoria* i tretmane fungicidom i vodom, kao i međusobna interakcija oljušteno zrno/pleva × tretman. Na osnovu rezultata analize varijanse uočava se statistički vrlo značajan uticaj ($p < 0,01$) sva tri izvora varijacije na promenu koncentracije ispitivanih *Alternaria* toksina (tabela 24 i 25). Greška modela nije bila statistički značajna, što ukazuje na dobro poklapanje merenih vrednosti AOH i AME i vrednosti predviđenih matematičkim modelom.

Tabela 24. Analiza varijanse alternariola (AOH) na oljuštenim i plevičastim zrnima spelte

Izvor varijacije	Suma kvadrata	Broj stepeni slobode	Varijansa	F vrednost	p vrednost
Zrno/pleva	2869607 ⁺	1	2869607	59,6900	0,000000
Tretman	3339152 ⁺	4	834788	17,3642	0,000003
Zrno/pleva x tretman	1807401 ⁺	4	451850	9,3988	0,000192
Greška modela	961504	20	48075		

⁺Statistički značajna razlika na nivou $p < 0,01$

Tabela 25. Analiza varijanse alternariol-monometil etra (AME) na oljuštenim i plevičastim zrnima spelte

Izvor varijacije	Suma kvadrata	Broj stepeni slobode	Varijansa	F vrednost	p vrednost
Zrno/pleva	6820147 ⁺	1	6820147	56,5806	0,000000
Tretman	4646042 ⁺	4	1161510	9,6360	0,000164
Zrno/pleva x tretman	30371241 ⁺	4	759281	6,2991	0,001893
Greška modela	2410771	20	120539		

⁺Statistički značajna razlika na nivou $p < 0,01$, u intervalu poverenja 95%

Srednje vrednosti koncentracije AOH u oljuštenima i plevičastim zrnima upoređene su Tukey-evim HSD testom značajnosti na nivou $p < 0,05$, a dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 26. Najveći sadržaj AOH registrovan je u plevičastim omotačima uzoraka inokulisanih izolatima *A. tenuissima* 1 (1647 $\mu\text{g}/\text{kg}$) i *A. tenuissima* 2 (1433 $\mu\text{g}/\text{kg}$) i on se statistički značajno razlikovao od ostalih tretmana. Najmanja koncentracija AOH zabeležena je na oljuštenim zrnima tretiranim fungicidom (84 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

Tabela 26. Tukey-ev HSD test: srednje vrednosti koncentracija aletnrariola (AOH) ($\mu\text{g}/\text{kg}$) u oljuštenim i plevičastim zrnima spelte

Tretman	Oljuštena zrna	Plevičasta zrna	CV
<i>A. tenuissima</i> 1	322 \pm 16,8 ^b	1647 \pm 66,63 ^a	5,22
<i>A. tenuissima</i> 2	331 \pm 30,34 ^b	1433 \pm 64,21 ^a	9,19
<i>A. infectoria</i>	227 \pm 12,79 ^b	433 \pm 14,56 ^b	5,63
Fungicid	84 \pm 8,23 ^b	338 \pm 24,54 ^b	9,76
Voda	136 \pm 11,58 ^b	342 \pm 24,39 ^b	8,53

*Vrednosti obeležene različitim slovom u koloni tabele su statistički značajno različite na nivou $p < 0,05$, u intervalu poverenja 95%; CV-koeficijent varijacije

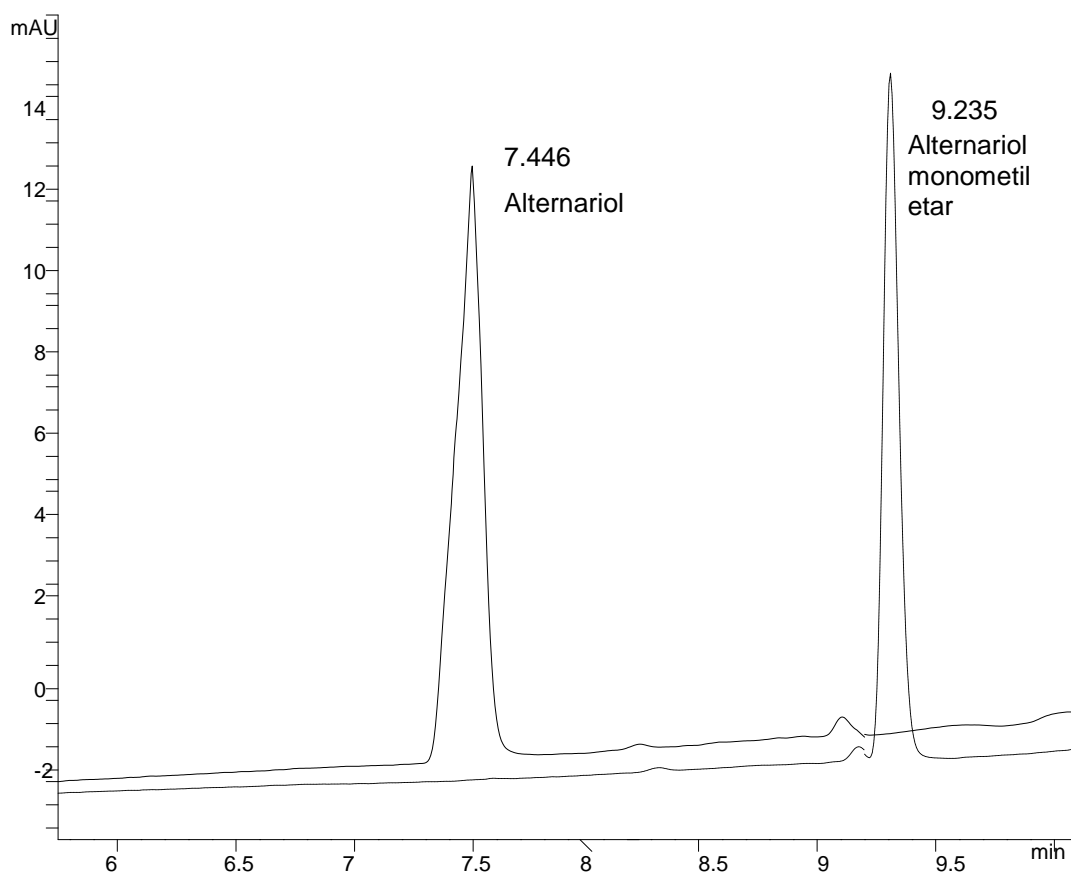
U svim tretmanima i kod oljuštenih i plevičastih zrna, AME je dektovan u većoj koncentraciji u poređenju sa AOH (tabela 27). Najveća koncentracija AME bila je prisutna u plevičastim zrnima inokulisanim izolatima *A. tenuissima* 2 (2183 µg/kg) i *A. infectoria* (1844 µg/kg) i statistički se značajno razlikovala od kontrolnih tretmana na nivou $p < 0,05$. Najmanji statistički značajno različit sadržaj AME detektovan je na oljuštenim zrnima tretiranim fungicidom (153 µg/kg) odnosno vodom (219 µg/kg), a izuzetno nizak sadržaj AME bio je prisutan i kod inokulacije sa *A. infectoria* (277 µg/kg).

Tabela 27. Tukey-ev HSD test: srednje vrednosti koncentracija alternariol-monometil etra (AME) (µg/kg) u oljuštenim i plevičastim zrnima spelte

Tretman	Oljuštena zrna	Plevičasta zrna	CV
<i>A. tenuissima</i> 1	428±30,8 ^{bc}	1315±32,53 ^{ab}	7,19
<i>A. tenuissima</i> 2	398±28,55 ^{bc}	2183±186,33 ^a	8,54
<i>A. infectoria</i>	277±17,97 ^c	1844±129,35 ^a	7,01
Fungicid	153±13,41 ^c	446±15,8 ^{bc}	8,74
Voda	219±17,88 ^c	454±31,01 ^{bc}	8,18

*Vrednosti obeležene različitim slovom u koloni tabele su statistički značajno različite na nivou $p < 0,05$, u intervalu poverenja 95%; Prosek±SD: prosečna koncentracija (µg /kg) ±standardno odstupanje (µg /kg); CV-koeficijent varijacije

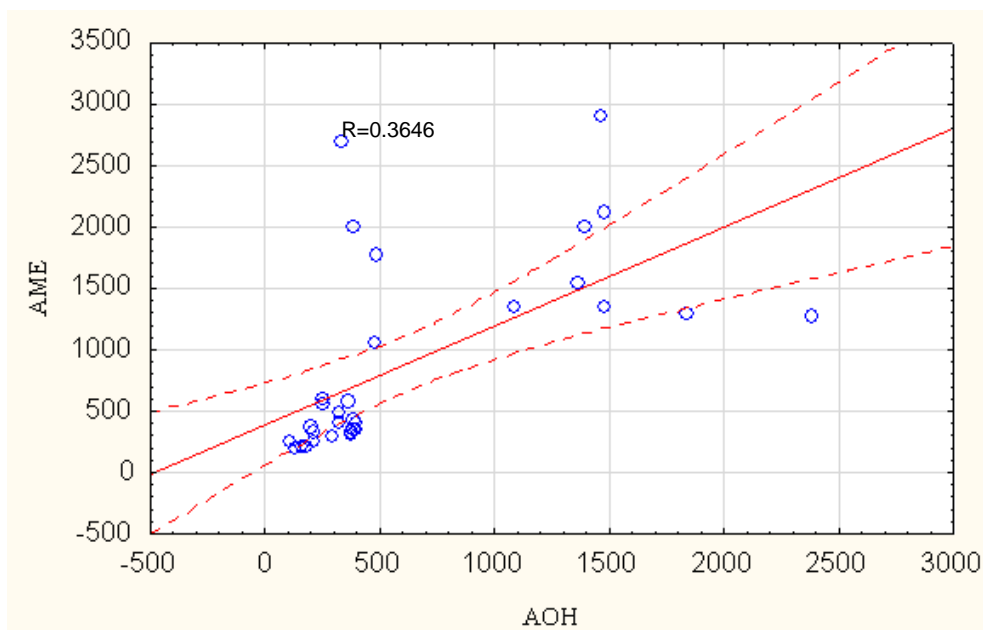
Prisusutvo AOH i AME standardnih rastvora na vremenu retencije oko 7,4 odnosno 9,2, je potvrđeno DAD detekcijom kao što je prikazano na hromatogramu na slici 22.



Slika 22. Hromatogram standarda alternariola i alternariol monometil etra

Takođe, svi dobijeni hromatogrami ispitivanih toksina potvrđuju višu koncentraciju oba mikotoksina u plevičastim omotačima u poređenju sa oljuštenim zrnima.

Posmatrana je i pozitivna korelacija između mikotoksina iz grupe alternariola (AOH i AME). Statistički značajna korelacija koncentracija AOH i AME u uzorcima spelte je prikazana na grafikonu 3. Na osnovu dobijenog koeficijenta korelacije ($r=0,603$, $p<0.01$) uočava se pozitivna visoko signifikantna linearana korelacija između sinteze AME i sinteze AOH. Sličan rezultat su saopštili Li i Yoshizawa (2000) ukazujući na koprodukciju odnosno istovremenu pojavu ovih toksina na pšenici u Kini ($r=0,850$, $p <0.01$).



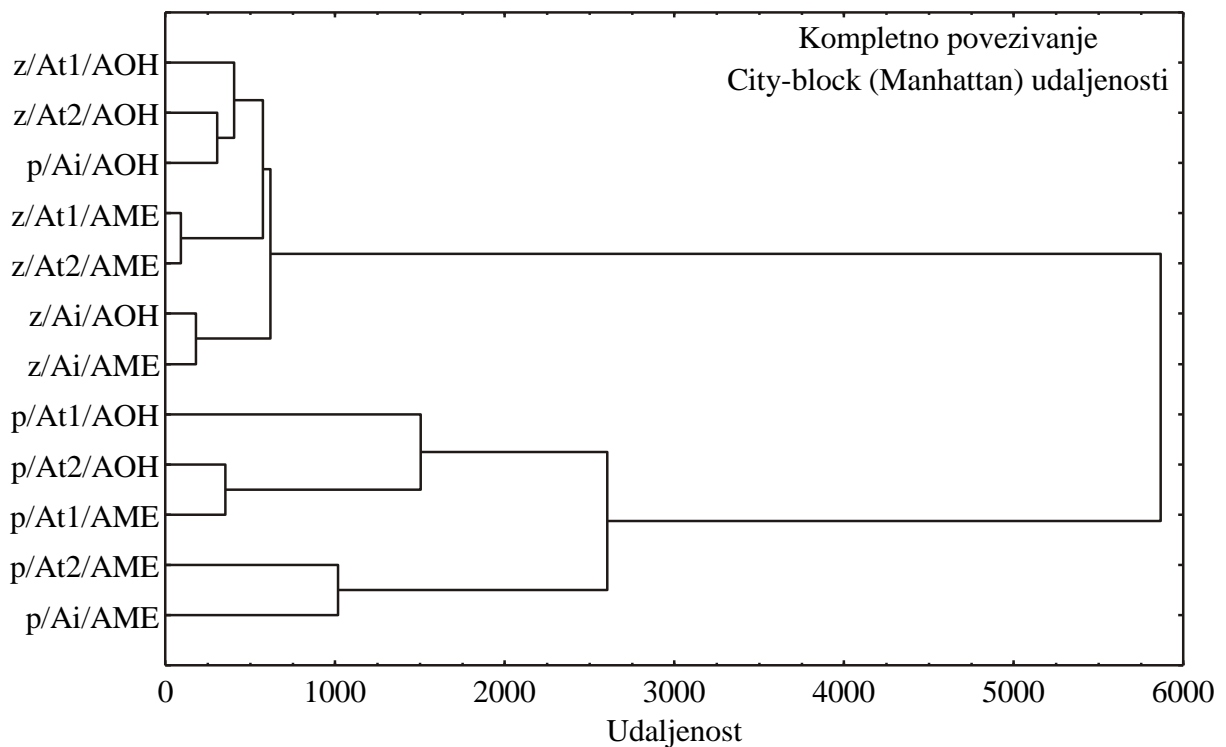
Grafikon 3. Korelacija između ukupne koncentracije alternariola (AOH) i alternariolmonometil etra (AME). Scatterplot: AOH vs. AME. $AME=394,1+0,80374 \times AOH$, korelacija: $r=0,6038$

AOH i AME detektovani su u proseku četiri puta većoj koncentraciji u plevičastim omotačima u poređenju sa oljuštenim zrnima, što potvrđuje efikasnost plevičastih omotača u zaštiti zrna spelte ne samo u prodiranju *Alternaria* spp. nego i njihovih toksičnih metabolita. Koeficijent varijacije kod oba ispitivana toksina u svim tretmanima je bio ispod 10% što ukazuje na uspešnost primenjene eksperimentalne metode. Obzirom da je za produkciju *Alternaria* toksina potrebna veća relativna vlažnost (Magan i sar., 1984) a što je u prirodnim uslovima uslovljeno obilnim padavinama naročito u periodu pre žetve, time se objašnjava povećan sadržaj AOH i AME u tretmanima vodom, u odnosu na tretmane fungicidom. Imajući u vidu tretmane inokulacije, naši rezultati su u skladu sa istraživanjima Suchowilska i sar. (2010), gde je koncentracija AOH bila dva puta veća kod inokulisanih uzorka pšenice u odnosu na kontrolni tretman vodom i iznosila je 101 $\mu\text{g}/\text{kg}$ odnosno 58 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Kako navode ovi autori, dominantan *Alternaria* toksin na spelti je bio AOH, za razliku od naših rezultata gde je dominirao AME. Iako su ovi autori detektovali 2-2,5 puta niže koncentracije AOH u odnosu na naše analize, Li i Yoshizawa (2000) su saopštili približno slične vrednosti koncentracija ispitivanih *Alternaria* toksina na prirodno kontaminiranoj pšenici u Kini. AOH i AME su detektovani u 90,9% ispitivanih uzorka u koncentracijama čija je prosečna vrednost iznosila 335 $\mu\text{g}/\text{kg}$, odnosno u 95% slučajeva 443 $\mu\text{g}/\text{kg}$, što odgovara rezultatima naših ispitivanja koja se odnose na plevičasta zrna iz tretmana destilovanom vodom. U desetogodišnjem monitoringu *Alternaria* toksina na pšenici u Nemačkoj, Müller i

Korn (2013) su saopštili da je najčešće prisutna bila tenuazoična kiselina (TeA-30.3%), zatim AOH-8,1%, AME-3,1% i ALT-2,6%. Visok procentan kontaminacije *Alternaria* toksinima ustanovljen je i u nedavno sprovedenim istraživanjima u našoj zemlji, gde je od 92 analizirana uzorka pšenice iz Vojvodine, 72 (78,3%) bilo kontaminirano *Alternaria* toksinima kao što su AOH, AME i tenuazonska kiselina (TeA) u prosečnim koncentracijama od 18,6 µg/kg, 39,0 µg/kg odnosno 92,4 µg/kg (Janić-Hajnal, 2015).

Pored navedenih razmatranja, u cilju grupisanja uzorka na bazi sadržaja *Alternaria* toksina (AOH i AME) u plevičastim omotačima i oljuštenim zrnima u različitim tretmanima urađena je klaster analiza. Računate su ukupne povezanosti tačaka (engl. *complete linkage*), a rastojanja između tačaka u 12-dimenzionalnom koordinatnom prostoru su merena korišćenjem *City-block (Manhattan)* algoritma. *City-block distance*, koje su prikazane na apscisnoj osi grafika su merene kao srednje razlike između dimenzija različitih uzoraka. Merenje udaljenosti *City-block* algoritmom daje rezultate slične Euklidskom merenju, ali je ovo merenje pogodnije zato što je smanjen uticaj pojedinačnih velikih udaljenosti (tzv. autlajeri, engl. outlier), pošto se ne računaju kvadrati vrednosti pojedinačnih koordinata.

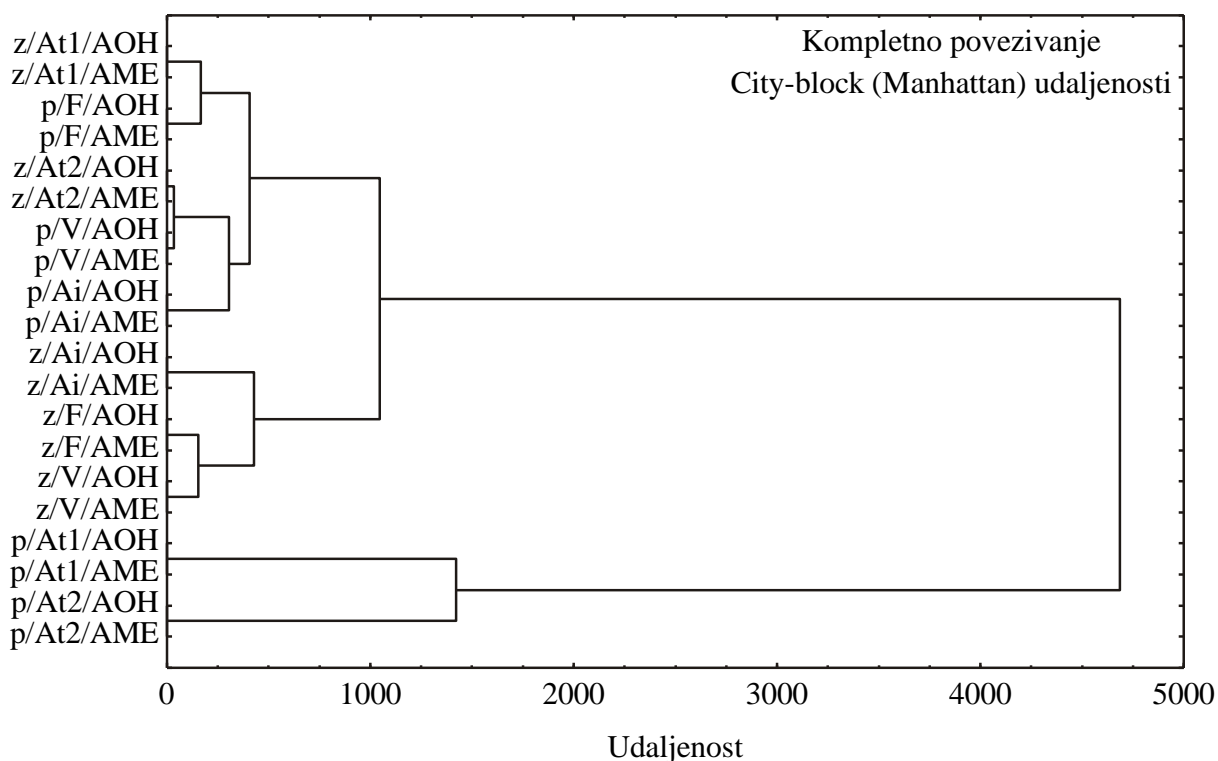
Na dobijenom dendogramu jasno se uočavaju dva klastera (slika 23). Prvi klaster čine isključivo promenjive sa plevičastim omotačima (sa prvim slovom "p" u imenu promenljive), dok drugi klaster čine oljuštena zrna sa uzetkom plevice/*A.infectoria*/AOH (p/Ai/AOH). Dobijeni rezultati klaster analize ukazuju na veliku sličnost sa rezultatima analize varijanse, potvrđujući činjenicu da plevičasti omotači imaju zaštitnu funkciju pri prodiranju toksičnih metabolita.



Slika 23. Dendrogram za klaster analizu sadržaja AOH i AME u plevičastim omotačima i oljuštenim zrnima inokulisanim različitim *Alternaria* spp. (Prefiksi naziva uzoraka: P-plevičasta zrna; Z-oljuštena zrna; At1-*A. tenuissima* 1; At2-*A. tenuissima* 2; Ai- *A. infectoria*; AOH-alternariol; AME-alternariol-monometil etar)

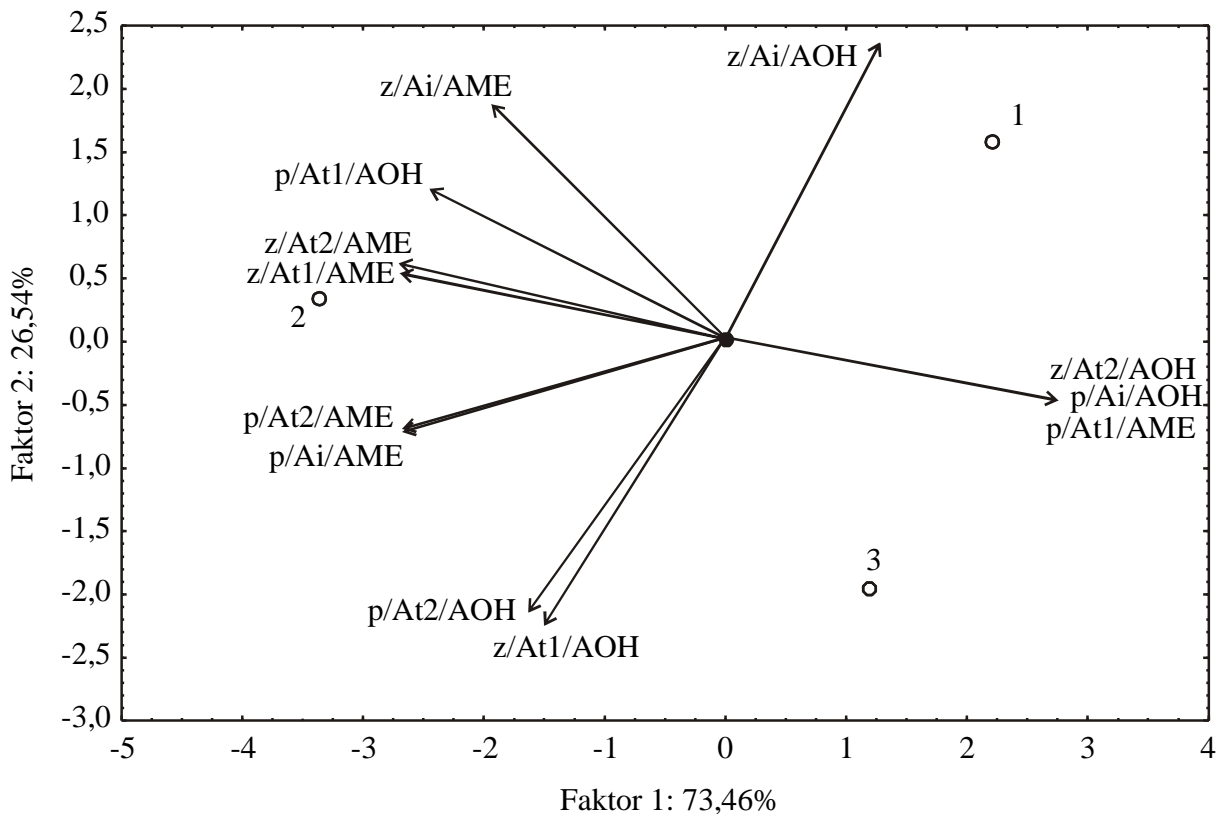
Međutim kada se u klaster analizu uključe i kontrolni tretmani fungicidom i vodom, razdvajanje na osnovu prisustva ili odsustva plevičastih omotača nije toliko očigledno (slika 24). I u ovom slučaju su računane ukupne povezanosti tačaka, a rastojanja između tačaka u 20-dimenzionalnom koordinatnom prostoru su takođe merena korišćenjem *City-block (Manhattan)* algoritma. Uticaj hemijske zaštite na oljuštenim zrnima se jasno uočava kao poseban klaster, značajno udaljen od ostalih, što ukazuje na efikasnost dobre proizvođačke prakse i primene fungicida u zaštiti useva od gljiva i potencijalnih mikotoksina.

Rezultati klaster analize u oba slučaja upućuju na zaključak da plevičasti omotači spelte mogu biti visoko kontaminirani gljivama i njihovim mikotoksinima, što ima naročitog značaja u zavisnosti za koje svrhe je predviđena dalja upotrebe spelte. U skladu sa tim, ukoliko se plevice koriste za proizvodnju peleta odnosno kao bio-masa u održivim sistemima obnovljive enegije (Brlek i sar., 2012), tretman hemijske zaštite nije neophodan. Međutim, s obzirom na nutritivnu vrednost spelte, njeni nus proizvodi uključujući i plevice često se upotrebljavaju kao hrana za životinje, te je u tom slučaju, sa stanovišta zdravstvene bezbednosti, hemijski tretman obavezan.



Slika 24. Dendrogram za klaster analizu sadržaja AOH i AME u plevičastim omotačima i oljuštenim zrnima pri različitim tretmanima inokulacije (Prefiksi naziva uzoraka: P-plevičasta zrna; Z-oljuštena zrna; At1-*A. tenuissima* 1; At2-*A. tenuissima* 2; Ai- *A. infectoria*; V-voda, F-fungicid, AOH-alternariol; AME-alternariol-monometil etar)

Analiza glavnih komponenti (*Principal component analyses, PCA*) omogućava da se značajno smanji broj promenljivih koje učestvuju u analizi, a omogućava i detektovanje i analizu inherentne, skrivene, strukture između mernih veličina i promenljivih koje se posmatraju. U cilju boljeg uvida i komparacije između uzorka primenjena je i PCA, kako bi se razdvojile grupe uzorka u faktorskoj ravni. Celokupna matrica merenih podataka koja se sastoji od 12 različitih merenih podataka je podvrgnuta PCA analizi. Grafički prikaz trendova i efikasnost odvajanja grupa parametara na osnovu korišćenih deskriptivnih faktora prikazana je na slici 25. Promenljive z/At2/AOH (koja prikazuje 11,0% ukupne varijanse), p/Ai/AOH (11,0%), z/At1/AME (10,8%), z/At2/AME (10,7%), p/At1/AME (11,0%), p/At2/AME(10,6%) i p/Ai/AME(10,6%) su bile najznačajnije za reprezentaciju prve glavne komponente, dok su doprinosi z/At1/AOH (koja prikazuje 22,1% ukupne varijanse), z/Ai/AOH (25,0%), p/At2/AOH (20,4%) i z/Ai/AME(15,8%) bili najznačajniji za izračunavanje druge faktorske koordinate.

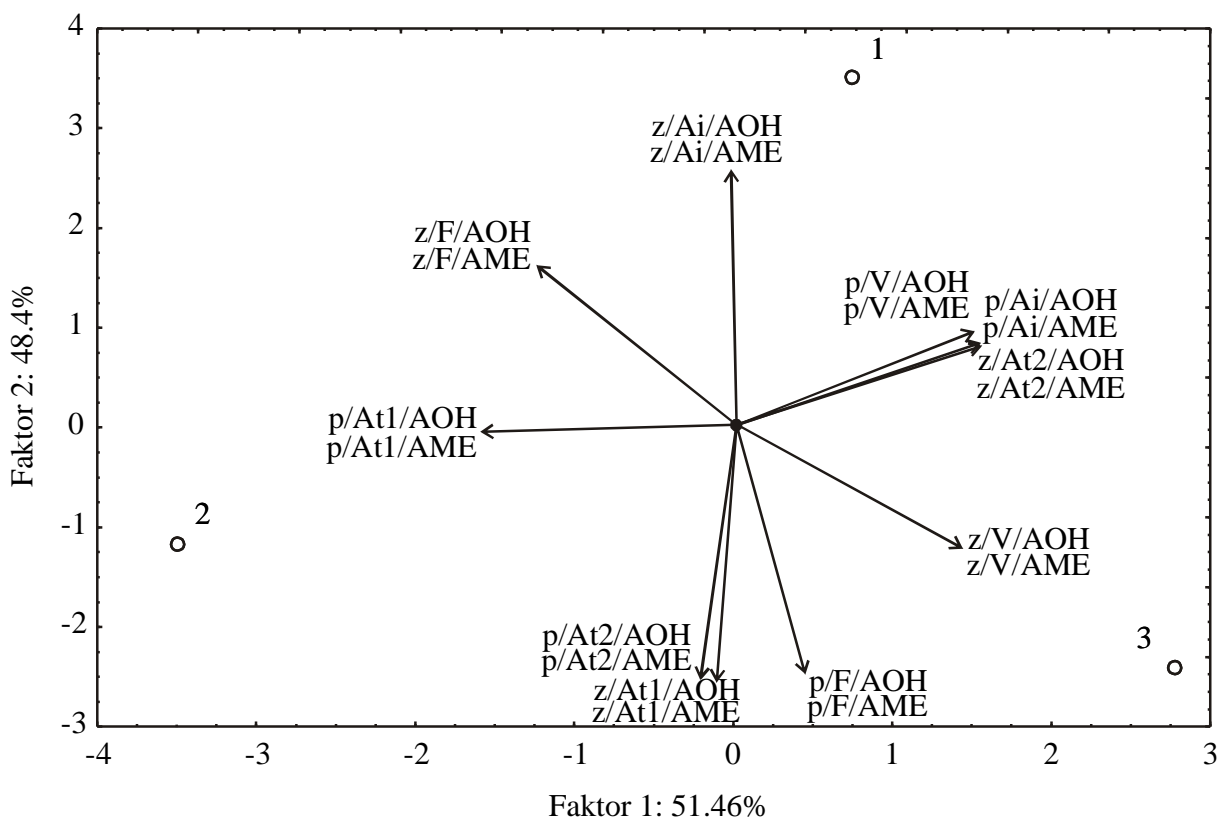


Slika 25. PCA analiza sadržaja AOH i AME u plevičastim omotačima i oljuštenim zrnima inokulisanim različitim *Alternaria* spp. (Prefiksi naziva uzoraka: P-plevičasta zrna; Z-oljuštena zrna; At1-*A. tenuissima* 1; At2-*A. tenuissima* 2; Ai- *A. infectoria*; V-voda, F-fungicid, AOH-alternariol; AME-alternariol-monometil etar)

Grafički prikaz trendova i efikasnost odvajanja grupa paramenatra kada se u klaster analizu uključi i tretman fungicidom i vodom, na osnovu korišćenih deskriptivnih faktora prikazana je na slici 26, gde se uočava uspešno odvajanje grupa podataka koje ukazuju da sadržaj AOH prati koncentracija AME, što je od značaja prilikom analiza ovih mikotoksina u praksi.

Promenljive z/At2/AOH (koja prikazuje 8,7% ukupne varijanse), z/F/AOH (5,9%), z/V/AOH (7,6%), z/At2/AOH (koja pokazuje 8,7% ukupne varijanse za prvu faktorsku koordinatu), z/F/AOH (5,9%), z/V/AOH (7,6%), p/At1/AOH (9,7%), p/Ai/AOH (8,8%), p/V/AOH (8,4%), z/At2/AME(8,7%), z/F/AME (5,9%), z/V/AME (7,6%), p/At1/AME (9,7%), p/Ai/AME (8,8%) i p/V/AME (8,4%) su bile najznačajnije za reprezentaciju prve glavne komponente, dok su doprinosi z/At1/AOH (koja prikazuje 10,2% ukupne varijanse), z/Ai/AOH (10,3%), p/At2/AOH (10,1%), p/F/AOH (9,6%), z/At1/AME(10,2%),

z/Ai/AME(10,3 %), p/At2/AME (10,1%) i p/F/AME (9,6%) bili najznačajniji za izračunavanje druge faktorske koordinate.



Slika 26. PCA analiza sadržaja AOH i AME u plevičastim omotačima i oljuštenim zrnima pri različitim tretmanima inokulacije (Prefiksi naziva uzoraka: P-plevičasta zrna; Z-oljuštena zrna; At1-*A. tenuissima* 1; At2-*A. tenuissima* 2; Ai- *A. infectoria*; V-voda, F-fungicid, AOH-alternariol; AME-alternariol-monometil etar)

Rezultati naših istraživanja doprinose naučnim saznanjima koja se odnose na zaštitni efekat plevičastih omotača u prodiranju toksičnih metabolita koje proizvode gljive. Dosadašnji literaturni podaci se odnose na ispitivanje uticaja plevičastih omotača na kontaminaciju zrna spelte toksinima koje proizvode vrste roda *Fusarium* (Wiwart i sar., 2009; Castoria i sar., 2005; Mouldry i sar., 2011; Mankevičienė i sar., 2014). Tako su Wiwart i sar. (2009) saopštili 2-4 puta više koncentracije deoksinivalenola (DON) u plevicama u odnosu na oljuštena zrna spelte u zavisnosti od proizvodne godine. Takođe poređenjem sadržaja mikotoksina u zrnima hlebne pšenice i spelte, grupa ovih autora ustanovila je 73 puta niže koncentracije mikotoksina DON u zrnima spelte (Wiwart i sar., 2011). Slične rezultate saopštili su i Mankevičienė i sar. (2014) koji su ustanovili znatno veće

koncentracije DON-a, zearalenona (ZEA) i T-2/HT-2 toksina u plevičastim omotačima spelte u odnosu na oljuštena zrna. Navedene činjenice ukazuju na opravdanost ljuštenja zrna splete nakon žetve u cilju smanjenja kontaminacije zrna toksičnim metabolitima. Müller i sar. (2013) naročito ističu sinergističan toksičan efekat usled istovremenog prisustva *Fusarium* spp. i *Aternaria* spp. na žitima usled pojave različitih mikotoksina.

Imajući u vidu morfološko genetsku predispoziciju spelte, koja se zbog svoje prirodne otpornosti smatra idealnom žitaricom za gajenje u sistemu organske proizvodnje, gde se metode zaštite baziraju na biološkim merama kontrole bez upotrebe hemijskih sredstava, ne može se sa sigurnošću tvrditi koliki je uticaj ovakvog načina proizvodnje na produkciju i sadržaj mikotoksina (Kralova i sar., 2006; Magkos i sar., 2006). Poređenje koncentracije mikotoksina u konvencionalom i organskom sistemu proizvodnje otvara prostor za nova naučna saznanja u domenu proizvodnje zdravstveno bezbedne hrane visokog kvaliteta.

5.8. Prometni i tehnološki kvalitet spelte inokulisane *Alternaria* spp. i tretirane fungicidom

Kvalitet spelte, kao i kod pšenice zavisi od genetičkog potencijala sorte, primenjenih agrotehničkih mera i agroekoloških uslova gajenja. Delovanje ovih faktora je veoma kompleksno, a kvalitet je rezultat njihove interakcije. Tamnoklična zrna, odnosno zrna zaražena *Alternaria* spp. takođe imaju značajan uticaj na tehnološki kvalitet zrna, jer visoka kontaminacija dovodi do gubitka kvaliteta i pecivnih osobina što utiče i na smanjenje prometnog kvaliteta o čemu svedoče brojni autori (Martin i Law, 1984; Rees i sar., 1984; Cromey i Mulholland, 1988; Lorenz i sar., 1986; Dexter i sar., 1996; Šarić i sar., 1997 i 2008; Prange i sar., 2005; de Miranda i sar., 2006; Malaker i sar., 2009; Balaž i sar., 2011; Papouškova i sar., 2011; Bodroža-Solarov i sar., 2012).

5.8.1. Zapreminska masa

Zapreminska ili hektolitarska masa je sveobuhvatan pokazatelj fizičkih karakteristika zrna i kao indirektni pokazatelj meljivosti uključen je u sve svetske standarde, na bazi kojih se vrednuje pšenica na međunarodnom tržištu. Ova osobina je u pozitivnoj korelaciji sa kvalitetom i poželjno je da njene vrednosti budu što veće. Hektolitarska masa varira u

rasponu od 60 do 84 kg/hl. Prema SRPS-E. B1. 200 (bivši JUS E. B1. 200), o opštim uslovima kvaliteta pšenice, kao sirovine za mlinsku industriju, standardnim kvalitetom se smatra pšenica čija je zapreminska masa 76kg/hl. Generalno, spelta ima niže vrednosti zapreminske mase zrna nego što je to kod hlebne pšenice. Dugo i uzano zrno spelte utiče na smanjenje vrednosti ovog pokazatelja. U istraživanjima Bodroža- Solarov i sar. (2009) ona se kretala od 71,85-74,75 kg/hl za razliku od hlebne pšenice gde je iznosila 77,5kg/hl.

Naši rezultati ispitivanja analize varijanse uticaja različitih genotipova i tretmana na zapreminsku masu zrna spelte pokazuju visoko značajan uticaj ovih izvora varijacije kao i njihove međusobne interakcije (na nivou $p < 0,01$) kao što je prikazano u tabeli 28.

Tabela 28. Analiza varijanse uticaja različitih genotipova spelte inokulisanih *Alternaria* spp. i tretiranih fungicidom na zapreminsku masu (kg/hl)

Izvor varijacije	Suma kvadrata	Broj stepeni slobode	Varijansa	F vrednost	p vrednost
Genotip	1,1 ⁺	2	0,6	27	0,000004
Tretman	4,6 ⁺	1	4,6	225	0,000000
Genotip x tretman	1,4 ⁺	2	0,7	34	0,000000
Greška modela	0,4	18	0,0		

*Statistički značajna razlika na nivou $p < 0,01$

Srednje vrednosti rezultata merenja upoređene su Tukey-evim HSD testom prilikom čega je između tretmana uočena statistički značajna razlika na nivou $p < 0,05$ (tabela 29).

Tabela 29. Tukey-ev HSD test: srednje vrednosti zapreminske mase (kg/hl) zrna različitih genotipova spelte inokulisanih *Alternaria* spp. i tretiranih fungicidom

Tretman/Sorta	Nirvana	Austria	Ostro	CV
<i>Alternaria</i> spp.	74,2±0,19 ^d	73,95±0,12 ^d	74,52±0,10 ^c	0,26
Fungicid	75,65±0,16 ^a	74,85±0,16 ^b	74,8±0,10 ^{bc}	0,22

*Vrednosti obeležene različitim slovom u koloni tabele su statistički značajno različite na nivou $p < 0,05$ u intervalu poverenja 95%; CV-koeficijent varijacije

Zrna inokulisana *Alternaria* spp. imala su manju i statistički značajno različitu zapreminsku masu od zrna tretiranih fungicidom, što se može objasniti uticajem tamnokličnih zrna na šturost zrna koja direktno utiču na smanjenje hektolitarske mase. Do sličnih rezultata došli su Martin i Law (1984), Dexter i sar. (2006), kao i Šarić i sar. (2008) koji navode da je infekcija *Alternaria* spp. uticala na smanjenje zapreminske mase ispitivanih zrna pšenice. Balaž i sar. (2011) su potvrdili gore navedene činjenice ističući da je prilikom tretiranja pšenice fungicidom zapreminska masa bila statistički značajno veća u odnosu na

zaražena zrna *Alternaria* spp. i *Fusarium* spp. De Miranda i sar. (2006) su ispitivali tehnološki kvalitet zaražene pšenice tokom skladištenja komentarišući uticaj gljivične infekcije na zapreminsku masu, kao jednog od pokazatelja tehnološkog kvaliteta zrna. Kako navode ovi autori, kod zrna zaraženih *Alternaria* spp. zapreminska masa se kretala od 77,25-83,10 kg/hl u zavisnosti od ispitivane sorte. Međutim, u istraživanjima 12 uzoraka pšenica koji su sadržali od 10 do 50% tamnoklična zrna, Rees i sar. (1984) su saopštili da je zapreminska masa zaraženih zrna bila tek nešto niža u odnosu na zdrava zrna te je uticaj infekcije *Alternaria* spp. na ovaj parametar tehnološkog kvaliteta bio minimalan.

5.8.2. Masa 1000 zrna

Masa 1000 zrna, kao parametar prometnog kvaliteta zrna, ukazuje na nalivenost zrna i mogućnost većeg iskorišćanja brašna. Ova osobina je posebno izražena kod pšenice, i što su vrednosti mase 1000 zrna veće to je zrno boljeg kvaliteta. Prema SRPS-E. B1. 200 (bivši JUS E. B1. 200), o opštim uslovima kvaliteta pšenice kao sirovine za mlinsku industriju masa 1000 zrna treba da iznosi najmanje 35g. Kako navode Bodroža-Solarov i sar. (2009) masa 1000 zrna kod različitih genotipova spelte (Eko 10, Nirvana i Ostro) se kretala od 39,7-40,9 g i bila je niža u odnosu na hlebnu pšenicu (43,8g).

ANOVA test uticaja genotipa i različitih tretmana na masu 1000 zrna ispitivanih uzoraka spelte pokazao je da za razliku od zapreminske mase, uticaj genotipa, nije imao značajan uticaj na masu 1000 zrna, dok su uticaj različitih tretmana kao i međusobna interakcija genotip×tretman bili statistički značajni na nivou $p<0,01$ odn. $p<0,05$ (tabela 30).

Tabela 30. Analiza varijanse uticaja različitih genotipova spelte inokulisanih *Alternaria* spp. i tretiranih fungicidom na masu 1000 zrna (g)

Izvor varijacije	Suma kvadrata	Broj stepeni slobode	Varijansa	F vrednost	<i>p</i> vrednost
Genotip	7,32	2	3,66	2,80	0,089273
Tretman	36,02 ⁺	1	36,02	27,55	0,000054
Genotip x tretman	12,61 [*]	2	6,31	4,82	0,021023
Greška modela	23,53	18	1,31		

*Statistički značajna razlika na nivou $p<0,05$;

⁺Statistički značajna razlika na nivou $p<0,01$, u intervalu poverenja 95%

Kao što je prikazano u tabeli 31 masa 1000 zrna biljaka inokulisanih *Alternaria* spp. bila je manja od zrna tretiranih fungicidom i statistički se značajno razlikovala od tretmana fungicidom, osim kod sorte Austria gde nije bilo signifikantne razlike. Naši rezultati su u skladu sa istraživanjima autora Suchowilska i Wiwart (2006) koji su nakon veštačke inokulacije spelte *Fusarium* spp. ustanovili značajnu razliku u masi 1000 zrna, koja se kod zaraženih zrna kretala od 20,84-29,91g, dok je u kontrolnim tretmanima iznosila 39,86-46,63g, što je čak 20,45-53,89% više. Slične rezultate saopštili su Šarić i sar. (2008) gde se masa 1000 zrna smanjivala sa porastom intenziteta infekcije pšenice. Takođe, Balaž i sar. (2011) su zaključili da je hemijski zaštićena pšenica imala značajno više vrednosti mase 1000 zrna. Suprotno ovim zapažanjima, Martin i Law (1984) i Cromey i Mulholland (1988) su registrovali veću masu zrna kod tamnokličnih zrna.

Tabela 31. Tukey-ev HSD test: srednje vrednosti mase 1000 zrna (g) zrna različitih genotipova spelte inokulisanih *Alternaria* spp. i tretiranih fungicidom

Tretman/Sorta	Nirvana	Austria	Ostro	CV
<i>Alternaria spp.</i>	40,45±0,53 ^{ab}	42,45±1,00 ^{bc}	39,6±1,70 ^{bc}	4,31
Fungicid	42,9±1,00 ^{bc}	43,85±0,82 ^{bc}	44,10±1,40 ^b	3,20

*Vrednosti obeležene različitim slovom u koloni tabele su statistički značajno različite na nivou $p < 0,05$, u intervalu poverenja 95%; CV-koeficijent varijacije

5.8.3. Veličina zrna

Veličina i oblik zrna su sortne osobine koji ukazuju na kvalitet i ponašanje zrna tokom mlevenja. Veća zrna imaju povoljniji odnos endosperma i omotača, što znači i veću iskorišćenost u brašnu. Međutim za meljivost pšenice, pored veličine zrna značajni su i ujednačenost veličine kao i oblik zrna. Što zrna više odstupaju od loptastog oblika udeo omotača u njima se povećava, a iskorišćenje u brašnu je manje (Kaluderski i Filipović, 1998).

Analizom varijanse različitih izvora varijacije na veličinu zrna utvrđeno je da je uticaj tretmana bio visoko značajan na krupnoću zrna na nivou $p < 0,01$ (tabela 32).

Tabela 32. Analiza varijanse uticaja različitih genotipova spelte inokulisanih *Alternaria* spp. i tretiranih fungicidom na veličinu zrna (mm)

Izvor varijacije	Suma kvadrata	Broj stepeni slobode	Varijansa	F vrednost	p vrednost
Genotip	9,34	2	4,67	2,61	0,101351
Tretman	88,7⁺	1	88,7	49,19	0,000002
Genotip x tretman	3,76	2	1,88	1,05	0,370445
Greška modela	32,26	18	1,79		

⁺Statistički značajna razlika na nivou $p < 0,01$, u intervalu poverenja 95%

Srednje vrednosti udela najkrupnijih zrna odn. zrna veličine preko 2,8 mm, upoređene su Tukey-evim testom značajnosti na nivou $p < 0,05$, a rezultati su procentualno prikazani u tabeli 33. Statistički značajno veći udeo najkrupnijih zrna uočava se kod tretmana fungicidom kod sva tri genotipa (36,98-37,73%), što ukazuje da gljivična infekcija oštećuje zrno i negativno utiče na nalivanje i sazrevanje zrna.

Tabela 33. Tukey-ev HSD test: srednje vrednosti procentualnog udela najkrupnijih zrna (2,8 mm) različitih genotipova spelte inokulisanih *Alternaria* spp. i tretiranih fungicidom

Tretman/Sorta	Nirvana	Austria	Ostro	CV
<i>Alternaria</i> spp.	33,78±3,65 ^c	36,63±2,25 ^{bc}	32,05±1,32 ^c	4,20
Fungicid	36,98±0,96 ^{ab}	37,73±1,58 ^a	37,00±1,10 ^{ab}	4,61

*Vrednosti obeležene različitim slovom u koloni tabele su statistički značajno različite na nivou $p < 0,05$, u intervalu poverenja 95%; CV-koeficijent varijacije

5.8.4. Sadržaj proteina

Sadržaj proteina spada među najznačajnije parametre, od njega zavisi variranje tehnološkog kvaliteta kako pšenice, tako i spelte. Kvantitativne razlike u sastavu proteinskih komponenti uslovljavaju razlike u pecivnim osobinama sirovine. Proteini, kao što su albumini, globulini, glutenini i glijadini, se nalaze u običnoj pšenici i spelti kao izvor energije i esencijalnih aminokiselina. Biološki aktivni proteini su većinom albumini i globulini koji su skoncentrisani u ćelijama aleuronskog omotača, perikarpa, klice i u malom procentu u endospermu. Glutenini i glijadini su skladišni proteini poznatiji kao prolamini. Oni se nalaze u endospermu i aleuronskom sloju, ali ih nema u perikarpu i klici (Hoseney, 1994).

Veliki broj naučnih publikacija ukazuje na veći sadržaj proteina u zrnu spelte u odnosu na hlebnu pšenicu (Abdel-Aal i sar., 1995, 2002; Ranhotra i sar., 1995 i 1996; Grela,

1996; Piergiovanni i sar., 1996; Jorgensen i sar., 1997; Marconi i sar., 1999; Moudry i sar., 1999; Matuz i sar., 2000; Škarabanja i sar., 2001; Bojnanaska i Frančakova 2002; Marconi i sar., 2002; Kohajdova i Koravičova., 2007; Bonafaccia i sar., 2009; Bodroža-Solarov i sar., 2009; Pasqualone i sar., 2011; Escarnot i sar., 2012; Filipčev i sar., 2013). Prema Ugrenoviću (2013) sadržaj proteina spelte u različitim rokovima setve kretao se od 17,5% do 18,1% . Takođe, sadržaj proteina zavisi i od različitog sortimenta spelte (Bodroža-Solarov i sar., 2009; Pasqualone i sar., 2011; Filipčev i sar., 2013). Veći sadržaj proteina dovodi do sporije sedimentacije, odnosno uslovljava veće sedimentacione vrednosti kod spelte u odnosu na hlebnu pšenicu (Filipčev i sar., 2013)

Analizom varijanse uticaja različitih genotipova spelte iz različitih tretmana uočen je statistički visoko značajan uticaj sva tri izvora varijacije na sadržaj proteina na nivou $p < 0,01$ (tabela 34). Kako navodi Dupont (2003) različit sadržaj proteina kod spelte varira u zavisnosti od sortimenta, te se ova varijabilnost može objasniti i različitim uslovima gajenja i genetskim osobina sorte koji utiču na sadržaj proteina.

Tabela 34. Analiza varijanse uticaja različitih genotipova spelte inokulisanih *Alternaria* spp. i tretiranih fungicidom na sadržaj proteina (%)

Izvor varijacije	Suma kvadrata	Broj stepeni slobode	Varijansa	F vrednost	p vrednost
Genotip	0,219 ⁺	2	0,109	8,2	0,003018
Tretman	13,336 ⁺	1	13,336	993,2	0,000000
Genotip x tretman	4,271 ⁺	2	2,136	159,1	0,000000
Greška modela	0,242	18	0,013		

+Statistički značajna razlika na nivou $p < 0,01$

Srednje vrednosti dobijenih rezultata ukazuju na veći sadržaj proteina u inficiranim zrnima u poređenju sa zrnima tretiranim fungicidom, uz visoko statistički značajne razlike između tretmana i sva tri genotipa. Na osnovu rezultata prikazanih u tabeli 35, najveći sadržaj proteina je izmeren kod genotipa Ostro inokulisanog *Alternaria* spp. (18,56%). Kod istog genotipa registrovan je i najmanji sadržaj proteina u tretmanu fungicidom (16%).

Tabela 35. Tukey-ev HSD test: srednje vrednosti sadržaja proteina (%)u zrnu različitih genotipova spelte inokulisanih *Alternaria* spp. i tretiranih fungicidom

Tretman/Sorta	Nirvana	Austria	Ostro	CV
<i>Alternaria spp.</i>	18,21±0,10 ^b	17,70±0,18 ^c	18,56±0,05 ^a	1,03
Fungicid	16,79±1,00 ^e	17,20±0,10 ^d	16,00±0,13 ^f	0,82

*Vrednosti obeležene različitim slovom u koloni tabele su statistički značajno različite na nivou $p < 0,05$, u intervalu poverenja 95%; CV-koeficijent varijacije

Slične rezultate saopštili su Lorenz i sar. (1986) proučavajući uticaj tamnokličnih zrna na pecivni kvalitet hlebne pšenice. Ovi autori navode da se sadržaj proteina povećavao usled veće zaraze zrna i kretao se od 9,8-11,2% odnosno 11-13% u zavisnosti od ispitivane sorte. Šarić i sar. (2008) i Malaker i sar. (2009) takođe su uočili da je veći stepen zaraze pšenice uticao na porast sadržaja proteina (12,51-16,77%). Za razliku od njih, Dexter i sar. (1996) i Gärtner i sar. (2008) su zaključili da se kod fuzarioznih zrna sadržaj proteina nije značajno menjao. Da hemijska zaštita može pozitivno da utiče na sadržaj proteina potvrđuju istraživanja Balaz i sar. (2011) koji smatraju da se time stvaraju povoljni uslovi za sintezu proteina za razliku od kontrole gde nije bilo hemijske zaštite i infekcija patogenim glivama je stoga bila znatno veća.

5.8.5. Laboratorijsko mlevenje pšenice

Podaci o količini izdvojenog brašna jednokratnim mlevenjem pšenice (I_1) kao i podaci o ukupnoj količini brašna (I_u) su merilo tehnološkog kvaliteta pšenice kao mlinske sirovine, tj. mogućnosti da se od nje dobije što više brašna a da pri tom ono sadrži što manje usitnjelih čestica omotača i klice. Količina brašna koja se dobija od određene količine pšenice naziva se *izbrašnjavanje* (Žeželj, 1995). Meljivost je sortna karakteristika, te sorte pšenice boljeg kvaliteta daju veću količinu brašna I_1 i I_u .

Rezultati izbrašnjavanja prikazani su u tabeli 36 gde se kod sva tri genotipa u tretmanima fungicidom jasno se uočava veći procenat brašna izdvojen jednokratnim mlevenjem (I_1) kao i ukupna količina brašna (I_u) što ukazuje na bolji kvalitet i veću nalivenost zrna. Teorijski vrednost izbrašnjavanja je u pozitivnoj korelaciji sa zapreminskom masom, kao i masom 1000 zrna međutim u praksi se pokazalo da je izbrašnjavanje direktno vezano za sortu (Žeželj, 1995).

Tabela 36 . Rezultati laboratorijskog mlevenja spelte

	Nirvana		Austria		Ostro	
	<i>Alternaria</i> spp.	Fungicid	<i>Alternaria</i> spp.	Fungicid	<i>Alternaria</i> spp.	Fungicid
I₁	66	66,80	67,9	69,1	68,8	69,2
I_u	76,8	76,90	78,6	79,7	79,1	79,8
Vlažnost zrna (%)	12,47	12,41	12,25	12,3	12,27	12,29
Vlažnost brašna (%)	12,8	13,30	13,5	13,5	13,3	13,4
masa(g)	2650,00	2200,00	1400,00	1600,00	1400,00	1900,00

I₁-količina brašna izdvojena jednokratnim mlevenjem (%); I_u-ukupna količina brašna (%)

Vrednost parametra I₁ kod uzoraka inokulisanih *Alternaria* spp. kretao se od 66-68,8%, dok je kod tretmana fungicidom iznosio od 66,8-69,2%. U našem eksperimentu procenat izbrašnjavanja (I₁) zrna inokulisanih *Alternaria* spp. i tretiranih fungicidom, bio je na nivou procenta izbrašnjavanja hlebne pšenice (62-69%) koji su saopštili Đurić i Mladenov (2007).

5.8.6. Broj padanja po Hagberg-u

Broj padanja po Hagbergu, kao pokazatelj alfa-amilazne aktivnosti jedna je od pokazatelja kvaliteta obzirom da se na taj način posredno dokazuje prisustvo prokljalih zrna žita. Ako je broj padanja između 200 i 300 sekundi (sek) pšenica je bez prokljalih zrna, a aktivnost alfa-amilaze je normalna. Za potrebe pekarstva optimalni raspon broja padanja je od 250 do 300 sek i u mnogim zemljama se podešava dodavanjem sladnog brašna pšeničnom brašnu.

ANOVA test uticaja različitih izvora varijacije ukazuje da na broj padanja nema statistički značajnog uticaja ni genotip spelte, ni različiti primenjeni tretmani (tabela 37).

Tabela 37. Analiza varijanse uticaja različitih genotipova spelte inokulisanih *Alternaria* spp. i tretiranih fungicidom na broj padanja (s)

Izvor varijacije	Suma kvadrata	Broj stepeni slobode	Varijansa	F vrednost	p vrednost
Genotip	8980	2	4490	0,9861	0,392314
Tretman	4483	1	4483	0,9845	0,334247
Genotip x tretman	12758	2	6379	1,4010	0,271970
Greška modela	81960	18	4553		

Takođe, poređenjem srednjih vrednosti dobijenih rezultata Tukey-evim HSD testom, uočava se da ne postoje statistički značajne razlike između termna kao ni između različitih genotipova spelte. Broj padanja se u svim varijantama kretao iznad 350 sek, osim u slučaju genotipa Austria inokulisanim *Alternaria* spp. gde je broj padanja bio nešto niži (281,25sek). Iako ne postoje statistički značajne razlike, na osnovu prikazanih rezultata u tabeli 38 uočava se da je infekcija *Alternaria* spp. uticala na povećanje aktivnosti alfa-amilaze, te je broj padanja opadao.

Tabela 38. Tukey-ev HSD test: srednje vrednosti broja padanja (s)u zrnu različitih genotipova spelte inokulisanim *Alternaria* spp. i tretiranih fungicidom

Tretman/Sorta	Nirvana	Austria	Ostro	CV
<i>Alternaria</i> spp.	373,75±12,69 ^a	361,25±6,10 ^a	353,25±14,10 ^a	3,99
fungicid	374±9,93 ^a	373,50±8,74 ^a	363,75±5,85 ^a	3,39

*Vrednosti obeležene različitim slovom u koloni tabele su statistički značajno različite na nivou $p < 0,05$, u intervalu poverenja 95%; CV-koeficijent varijacije

Za ovu pojavu objašnjenja su dali Lorenz (1986) i Hareld i sar. (2003), koji su zaključili da gljivična infekcija utiče na razgradnju skroba i doprinosi povećanoj aktivnosti alfa amilaze čije merilo je broj padanja. Naši rezultati su u skladu sa podacima koje su saopštili Martin i Law (1984). U uslovima različitog intenziteta zaraze *Alternaria* spp. kod 12 uzorka pšenice registrovali su smanjenje broja padanja usled povećanja infekcije. Slično, Gärtner i sar. (2008) i Papouškova i sar. (2011) su u ispitivanjima fuzarioznih zrna različitih nivoa infekcije zabeležili najniži broj padanja u najjače zaraženim zrnima.

5.8.7. Gluten

Gluten predstavlja u vodi nerastvorljive proteine pšenice, odnosno brašna, koji u dodiru sa vodom bubre, obrazujući pri tom elastičnu, koherentnu masu koja tokom mešanja testa stvara finu mrežastu strukturu i čini osnovni skelet testa. Sadržaj glutena uslovljavala razlike u pecivosti, a naročito je u veoma jakoj korelaciji sa zapreminom hleba. Sadržaj vlažnog glutena od 25 % predstavlja minimum za prehrambenu industriju (Bojnanska i Frančakova, 2002). Makromolekul glutena čine dve frakcije glijadin i glutenin, te razlike u kvalitetu glutena potiču od različite raspodele molekulskih masa ovih komponenti (Đaković, 1980). Gluten-indeks je pokazatelj kvaliteta glutena i predstavlja odnos glutenina i glijadina. Polimeri glutenina se smatraju odgovornim za pecivne osobine, jer testu daju „jačinu“, nasuprot glijadinu koji se posmatra sa stanovišta elastičnosti i povećanja viskoziteta testa (Li i sar., 2003). Vrednosti gluten-indeksa kreću se u granicama od 0 do 100% i predstavljaju udeo glutenina u vlažnom glutenu. Ukoliko je ova vrednost veća gluten je kvalitetniji.

Veći sadržaj proteina i glutena u zrnu spelte u odnosu na njihov sadržaj u hleboj pšenici ne daje spelti prednost kada je u pitanju prerađivački kvalitet brašna i testa, koje je naprotiv manje elastično, lepljivo i slabije energije (Schober i sar., 2002 i 2006; Kohajdová i Karovičová, 2007; Pruska-Kedzior i sar, 2008). Tokom višegodišnjih istraživanja različiti autori su zabeležili različit sadržaj vlažnog glutena kod spelte. On se kretao od 31,01-39,50% (Lacko-Bartošová i Rédlová, 2007), 36,60-51,80 % (Bojňanská i Frančáková, 2002), 49.9-52.6% (Pasqualonne i sar., 2006) i 34-46% (Bodroža-Solarov i sar., 2009) u zavisnosti od sortimenta i agroekoloških uslova. Zielinski i sar. (2008) saopštili su da je sadržaj vlažnog glutena bio 1,3 puta veći u speltinom brašnu u odnosu na brašno hlebne pšenice i kretao se od 30,1-37,2%. Uprkos visokog uticaja uslova spoljne sredine na sadržaj vlažnog glutena spelte, kako navode Pasqualone i sar. (2006) rafinisano speltino brašno je imalo elastičan gluten sa dobrim pecivnim svojstvima. Filipčev i sar. (2013) su saopštili da je gluten indeks je kod spelte bio značajno manji u poređenju sa hlebnom pšenicom, što je indikator siromašnog kvaliteta glutena kod spelte.

Analizom varijanse uticaja različitih genotipova i tretmana na sadržaj vlažnog glutena uočava se visok statistički značajan uticaj svih izvora varijacije na nivou $p < 0,01$ (tabela 39).

Tabela 39. Analiza varijanse uticaja različitih genotipova spelte inokulisanih *Alternaria* spp. i tretiranih fungicidom na sadržaj vlažnog glutena

Izvor varijacije	Suma kvadrata	Broj stepeni slobode	Varijansa	F vrednost	p vrednost
Genotip	331,24 ⁺	2	165,62	801,4	0,000000
Tretman	26,46 ⁺	1	26,46	128,0	0,000000
Genotip x tretman	10,36 ⁺	2	5,18	25,1	0,000006
Greška modela	3,72	18	0,21		

*Statistički značajna razlika na nivou $p < 0,01$

Vrednosti vlažnog glutena varirale su u zavisnosti od tretmana sa statistički značajnim razlikama u odnosu na sortiment. Najviše vlažnog glutena registrovano je kod genotipa Ostro, i on je kod inokulisanih biljaka iznosio 49%, dok je u tretmanu fungicidom bio 50,6%. Kao što se vidi iz rezultata prikazanih u tabeli 40, inokulacija *Alternaria* spp. uticala je na smanjenje sadržaja vlažnog glutena, koji se osim kod genotipa Austria statistički značajno razlikovao u odnosu na tretmane fungicidom.

Tabela 40. Sadržaj vlažnog glutena (%) različitih genotipova spelte inokulisanih *Alternaria* spp. i tretiranih fungicidom

	Nirvana		Austria		Ostro	
	<i>Alternaria</i> spp.	Fungicid	<i>Alternaria</i> spp.	Fungicid	<i>Alternaria</i> spp.	Fungicid
Sadržaj vlažnog glutena (%)	38,8±0,43 ^d	42,7±0,16 ^c	45,7±0,8 ^e	46,5±0,36 ^e	49±0,45 ^b	50,6±0,22 ^a

*Vrednosti obeležene različitim slovom u redu tabele su statistički značajno različite na nivou $p < 0,05$, u intervalu poverenja 95%

Pozitivan efekat hemijske zaštite na sadržaj glutena navode i Balaž i sar. (2011) u ispitivanjima uticaja različitih fungicida na intenzitet zaraze *Fusarium* spp. i *Alternaria* spp. u korelaciji sa tehnološkim kvalitetom. Smanjenje sadržaja glutena i degradiranje glutenske mrežaste strukture usled kontaminacije pšenice različitim gljivama potvrdili su Boyacioglu i Hettiarachchy (1995), Dexter i sar. (1996), Antes i sar. (2001), Prange i sar. (2005), de Miranda i sar. (2006), Šarić i sar. (2008), Papouškova i sar. (2011). Antes i sar. (2001) su zaključili da je kontaminacija žita *Fusarium* spp. neznatno uticala na smanjenje sadržaja glutena, za razliku od infekcije vrstama rodova *Aspergillus* i *Penicillium*. Prilikom toga su ispitivani uzorci imali značajno manji sadržaj glutena, što se dalje ogledalo u slabljenu testa i maloj zapreminskoj masi hleba. Ova pojava se može objasniti direktnim uticajem gljivične

infekcije na degradaciju glutena kao i time što infekcija dovodi do prevremenog odumiranja klasova te i do nedovoljnog razvijanja zrna i njegove proteinske strukture (Dexter i sar., 1996).

5.8.8. Rezultati ekstenzografskih ispitivanja

Ekstenzografom se ispituju fizičke osobine testa, odnosno njegova energija, rastegljivost i otpor pri rastezanju što ukazuje na ponašanje testa u procesima zamesa i fermentacije (Đaković, 1980). U pekarstvu, za proizvodnju hleba poželjno je da testo ima veliku energiju i da je pri tom odnos otpora rastezanja prema rastegljivosti od 1,5 do 2,5 (Kaluderski i Filipović, 1998).

Generalno, u pogledu prosečnih vrednosti ekstenzografski utvrđenih svojstava testa pri rastezanju, zrno spelte ima malu energija (znak slabog kvaliteta brašna) i malu zapreminu gotovog proizvoda (Ugrenović, 2013). Filipčev i sar. (2013) navode da spelta ima niže vrednosti otpora testa i veću rastegljivost u poređenju sa hlebnom pšenicom.

Rezultati analize varijanse uticaja različitih genotipova i tretmana prikazani su u tabelama 41-43 za svaki parametar posebno, dok su rezultati Tukey-evog HSD testa značajnosti razlike srednjih vrednosti sumirani u tabeli 44. Dobijeni ekstenzogrami najznačajnijih rezultata dati su u prilogu.

Tabela 41. Analiza varijanse uticaja različitih genotipova spelte inokulisanih *Alternaria* spp. i tretiranih fungicidom na energiju testa (cm²)

Izvor varijacije	Suma kvadrata	Broj stepeni slobode	Varijansa	F vrednost	p vrednost
Genotip	19861,33 ⁺	2	9930,67	3310,22	0,000000
Tretman	6,00 ⁺	1	6,00	2,00	0,000017
Genotip x tretman	192,00 ⁺	2	96,00	32,00	0,000001
Greška modela	54,00	18	3,00		

⁺Statistički značajna razlika na nivou $p < 0,01$

Tabela 42. Analiza varijanse uticaja različitih genotipova spelte inokulisanih *Alternaria* spp. i tretiranih fungicidom na otpor testa (Ej)

Izvor varijacije	Suma kvadrata	Broj stepeni slobode	Varijansa	F vrednost	p vrednost
Genotip	123239,1 ⁺	2	61619,5	21855,2	0,000000
Tretman	782,0 ⁺	1	782,0	277,4	0,000000
Genotip x tretman	979,1 ⁺	2	489,5	173,6	0,000000
Greška modela	50,7	18	2,8		

⁺Statistički značajna razlika na nivou $p < 0,01$

Tabela 43. Analiza varijanse uticaja različitih genotipova spelte inokulisanih *Alternaria* spp. i tretiranih fungicidom na rastegljivost testa (mm)

Izvor varijacije	Suma kvadrata	Broj stepeni slobode	Varijansa	F vrednost	p vrednost
Genotip	3525,3 ⁺	2	1762,7	323,8	0,000000
Tretman	66,7 ⁺	1	66,7	12,2	0,002561
Genotip x tretman	485,3 ⁺	2	242,7	44,6	0,000000
Greška modela	98,00	18	5,4		

⁺Statistički značajna razlika na nivou $p < 0,01$

ANOVA test jasno ukazuje na visoko statistički značajan uticaj sva tri izvora varijacije na sve posmatrane parametre na nivou $p < 0,01$, što ukazuje da su ekstenzografska svojstva testa pre svega sortna karakteristika, ali je i pokazatelj kvaliteta testa.

Tabela 44. Ekstenzografski pokazatelji brašna različitih genotipova spelte inokulisanih *Alternaria* spp. i tretiranih fungicidom

	Nirvana		Austria		Ostro	
	<i>Alternaria</i> spp.	Fungicid	<i>Alternaria</i> spp.	Fungicid	<i>Alternaria</i> spp.	Fungicid
Energija (cm²)	85±0,82 ^b	92±2,16 ^a	26±2,16 ^{de}	31±0,82 ^c	24±1,63 ^e	29±1,16 ^{cd}
Otpor rastezanja testa na 5 cm(Ej)	240±0,96 ^b	270±1,16 ^a	110±1,63 ^e	110±2,16 ^e	100±1,41 ^c	950±0,98 ^d
Rastegljivost (mm)	183±2,16 ^{de}	179±1,52 ^e	194±0,82 ^c	186±3,56 ^d	203±2,83 ^b	217±1,41 ^a
Odnosni broj**	1,31	1,51	0,57	0,59	0,49	0,44

*Vrednosti obeležene različitim slovom u redu tabele su statistički značajno različite na nivou $p < 0,05$, u intervalu poverenja 95%; **Odnos otpora rastezanja prema rastegljivosti

Veća energija testa registrovana je u uzorcima koji su tretirani fungicidom kod sva tri genotipa, što ukazuje na to da je infekcija *Alternaria* spp. uticala na smanjenje energije testa odnosno na smanjenje pecivnog kvaliteta. Najveća i statistički značajno različita energija testa zabeležena je kod genotipa Nirvana i u tretmanu fungicidom je iznosila 92 cm² (prilog 1), dok je pri inokulaciji bila 85 cm² (prilog 2). Najmanju energiju imao je genotip Ostro 29 cm² u tretiranim odnosno 24 cm² u inokulisanim uzorcima. Otpor kao i rastegljivost testa su takođe bili značajno niži u inokulisanim uzorcima. Slične rezultate saopštili su i drugi autori. U reološkim ispitivanjima pšenice inokulisane *Fusarium* spp. Antes i sar. (2001) su došli do zaključka da je infekcija gljivama uzorkovala blago smanjenje otpora testa što se nije značajno odrazilo na smanjenje zapremine hleba. Isti autori navode da je u uslovima skladišta infekcija žita *Aspergillus* i *Penicillium* vrstama uzrokovala značajno smanjenje otpora testa i rastegljivosti, što je zatim uticalo na izuzetno malu zapreminu hleba. Prange i sar. (2005) su došli do zanimljivog stanovišta da uprkos tome što infekcija *Fusarium* spp. dovodi do degradacije strukture zrna i glutena, gljivična kontaminacija ne utiče značajno na smanjenje pecivnih osobina, odnosno da se na osnovu analiza pecivnih osobina ne može ustanoviti nivo zaraze *Fusarium* spp. kao ni mikotoksina koje oni proizvode. To je naročito značajno sa stanovišta zdravstvene bezbednosti hrane, s obzirom da ocenjeni rezultati reoloških analiza (npr. zapemina hleba) ne ukazuju na mikrobiološku kontaminaciju. To povećava i rizik od prisustva mikotoksina u gotovim proizvodima, naročito ukoliko se ima u vidu da se sadržaj mikotoksina teško smanjuje termičkom obradom (Scott, 1991).

5.8.9. Rezultati termo-mehaničkih osobina testa dobijenih primenom Miksolaba®

Miksolab® je uređaj koji se koristi za karakterizaciju reološkog ponašanja testa, koje se istovremeno podvrgava i mešanju i temperaturnim promenama. Promene koje se javljaju pri prolasku testa između rotirajućih z-mesilica registruju se kao promene obrtnog momenta izraženog u Nm. Prednost miksolaba je što istovremeno meri kako karakteristike proteina brašna tako i osobine skroba. Dobijeni rezultati pružaju informacije o reološkim osobinama testa (moć upijanja vode, vreme potrebno za razvoj testa, jačina i elastičnosti testa), jačini proteinskog kompleksa, želatinizaciji i retrogradaciji skroba, kao i enzimskoj aktivnosti.

Komparativni prikaz rezultata dobijenih primenom miksolaba za tri različita roka setve brašna spelte ukazuje na relativno ujednačen, slab kvalitet brašna male moći

apsorpcije, slabe glutenske mreže i slabe viskoznosti, što će imati za posledicu manje povoljne pekarske osobine finalnog proizvoda, koji će biti i male zapremine (Ugrenović, 2013).

U pogledu sortnih razlika, a na osnovu miksolab parametara, Bodroža- Solarov i sar. (2009) su zaključili da su uprkos većem sadržaju proteina, sorte Ekö 10 i Ostro imale slabiji tehnološki kvalitet, nego genotip Nirvana.

Vrednosti parametra C2 miksolab profila sva tri genotipa spelte sa tretmanima inokulacije *Alternaria* spp. i fungicidom prikazani sumirani su u tabeli 45.

Tabela 45. Miksolab parametar C2 (Nm) testa od spelte

Genotip	Tretman	C2 (Nm)
Nirvana	<i>Alternaria</i> spp.	0,32 ^b
	Fungicid	0,36 ^a
Austria	<i>Alternaria</i> spp.	0,29 ^c
	Fungicid	0,32 ^b
Ostro	<i>Alternaria</i> spp.	0,28 ^c
	Fungicid	0,28 ^c

*C2 - minimalna vrednost torzije na početku zagrevanja

Posmatrajući vrednosti parametra C2, kao pokazatelja slabljenja proteinske mreže, uočava se signifikantan efekat hemijskog tretmana na jačinu glutenske mreže kod genotipa Nirvana i Austria. Vrednost C2 je bila veća prilikom tretmana fungicidom kod genotipa Nirvana (0,36 nm) i Austria (0,32 nm) dok se kod genotipa Ostro nije razlikovala od tretmana inokulacije *Alternaria* spp. Imajući u vidu da fitopatogene gljive deluju inhibitorno na odvijanje fizioloških procesa tokom rasta i sazrevanja biljaka, a koji podrazumevaju i biosintezu proteina i skroba, može se zaključiti da zrna zaražena *Alternaria* spp. imaju slabiju glutensku mrežu u odnosu na zdrava zrna. Naši rezultati su u skladu sa istraživanjima Papouškova i sar. (2011) koji su ispitivali uticaj *Fusarium* spp. na tehnološki kvalitet pšenice, gde je vrednost parametra C2 bila najveća kod tretmana fungicidom (0,46 nm), dok je najmanja vrednost zabeležena prilikom veštačke inokulacije na početku i kraju cvetanja (0,35nm). Ovi autori takođe ukazuju na visoku senzitivnost miksolab sistema u monitoringu uticaja zaraze gljiva na tehnološki kvalitet pšenice.

6. ZAKLJUČAK

Na osnovu sprovedenih istraživanja i analize dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Poređenjem molekularnih, morfoloških i patogenih karakteristika 25 odabranih izolata utvrđeno je da su na zrnju spelte roda 2011. god. bile prisutne dve vrste: *A. tenuissima* (22 izolata) i *A. infectoria* (3 izolata). Dobijeni rezultati predstavljaju ujedno i prvo naučno saopštenje od vrstama roda *Alternaria* na spelti u Srbiji.
- Metoda lančane reakcije polimeraze u kombinaciji sa *lab-on-chip* elektroforezom predstavlja brz i pouzdan metod za detekciju gljivičnih patogena.
- Veštačkom inokulacijom tri različita genotipa spelte (Nirvana, Austria i Ostro) odabranim *Alternaria* spp. izolatima u 2011. i 2012. god. ispoljen je visoko značajan uticaj tretmana (na nivou $p < 0,01$) na intenzitet zaraze kako kod plevičastih tako i kod oljuštenih zrna u obe istraživačke godine.
- Uočena je značajna razlika u intenzitetu zaraze *Alternaria* spp. na zrnima sa plevičastim omotačima gde se intenzitet infekcije kretao od 87-100% dok je na oljuštenim zrnima iznosio od 16-72% u 2011. god., odnosno od 95-100% na plevičastim zrnima i 42-68% na oljuštenim zrnima u 2012. god.
- Efekat hemijske zaštite fungicidom se pokazao značajan za redukciju *Alternaria* spp. u obe istraživačke godine kako na plevičastim tako i na oljuštenim zrnima spelte. Nivo zaraze kod tretiranih biljaka se na plevičastim zrnima kretao od 87-92% a na oljuštenim od 16-22% u 2011. god., dok je u 2012. god. iznosio 6-28% na plevičastim i 8-16% na oljuštenim zrnima.
- Kolorimetrijskim merenjima intenziteta zaraze plevičastih omotača i oljuštenih zrna inokulisanih biljaka u 2011. i 2012. god. potvrđena su standardna vizuelna fitopatološka ispitivanja. Vrednost parametra L^* (pokazatelj intenziteta svetloće) su bile najveće kod oljuštenih zrna tretiranih fungicidom i kretale su se u intervalu od 54,16-54,87 u 2011. god., odn. 64,56-65,19 u 2012. god., dok su najmanje vrednosti

L* koje odgovaraju i najtamnije obojenim zrnima registrovane na biljkama inokulisanim *Alternaria* spp. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da metoda instrumentale ocene zaraze može koristiti kao efikasna i brza metoda detekcije tamnokličnih zrna, gde uz dodatne verifikacije postoji mogućnost primene i u praksi.

- Ispitivani *Alternaria* toksini, AOH i AME detektovani su u proseku četiri puta većoj koncentraciji u plevičastim omotačima nego u oljuštenim zrnima, što potvrđuje efikasnost plevičastih omotača u zaštiti zrna spelte, ne samo od prodiranja *Alternaria* spp. već i od njihovih toksičnih metabolita. Najmanja koncentracija *Alternaria* toksina zabeležena je na oljuštenim zrnima bijaka tretiranih fungicidom (AOH - 84 µg/kg i AME - 153 µg/kg). Klaster analiza potvrdila je rezultate analize varijanse gde se jasno uočava grupisanje plevičastih odnosno oljuštenih zrna inokulisanih *Alternaria* spp. na osnovu sadržaja ispitivanih *Alternaria* toksina.
- Tamnoklična zrna, odnosno zrna zaražena *Alternaria* spp. narušavaju prometni i tehnološki kvalitet spelte, negativno utičući na nalivanje i sazrevanje zrna kao i sintezu skroba i proteina. Generalno siromašniji kvalitet glutena kod spelte u poređenju sa hlebnom pšenicom, dodatno je narušen gljivičnom infekcijom.
- Rezultati ovih istraživanja ukazuju na to da plevičasti omotači predstavljaju efikasnu barijeru u zaštiti zrna prilikom infekcije vrstama roda *Alternaria*, što opravdava postavljenu hipotezu i ima izuzetan značaj za otpornost spelte naročito u uslovima gajenja u sistemu organske proizvodnje gde upotreba hemijske zaštite nije dozvoljena. Međutim, uprkos prirodnoj otpornosti i genetskoj predodređenosti spelte za organsku proizvodnju, rezultati efikasne primene fungicida u suzbijanju *Alternaria* spp. opravdavaju adekvatan hemijski tretman u dobroj poljoprivrednoj praksi i proizvodnji zdravstveno bezbedne hrane.

7. LITERATURA

1. Abdel-Aal, E. S. (2008). Effects of baking on protein digestibility of organic spelt products determined by two in vitro digestion methods. *LWT-Food Science and Technology*, 41 (7), 1282-1288.
2. Abdel-Aal, E. S., Hucl, P. (2002). Amino acid composition and in vitro protein digestibility of selected ancient wheats and their end products. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15(6), 737-747.
3. Abdel-Aal, E. S., Hucl, P., Sosulski, F. W. (1995). Compositional and nutritional characteristics of spring einkorn and spelt wheats. *Cereal Chemistry*, 72, 621-624.
4. Abdel-Aal, E. S., Hucl, P., Sosulski, F. W. (1998). Food uses for ancient wheats. *Cereal Foods World*, 43, 763-767.
5. Adler, A., Lew, H., Moudry, J., Sterba, Z., Vratilova, K., Edinger, W., ... & Kiendler, E. (2003). Microbiological and mycotoxicological quality parameters of naked and covered oats with regard to the production of bran and flakes. *Bodenkultur-Wien and Munchen*, 54 (1), 41-48.
6. AFSSA (Agence française de sécurité sanitaire des aliments). (2009). Evaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale. *Rapport final, mars*, 308.
7. Agostini, J. P., Bushong, P. M., Timmer, L. W. (2003). Greenhouse evaluation of products that induce host resistance for control of scab, melanose, and *Alternaria* brown spot of citrus. *Plant disease*, 87(1), 69-74.
8. Almaši, R., Bodroža-Solarov, M., Posloncec, D. (2010). Development of rice weevils (*Sitophilus oryzae* L.) and lesser grain borers (*Rhizopertha dominica* F.) on kernels and spikes of spelt wheat. *Savremena poljoprivreda*, 59 (1-2), 92-98.
9. Amatulli, M. T., Fanelli, F., Moretti, A., Mule, G., Logrieco, A. F. (2013). *Alternaria* species and mycotoxins associated to black point of cereals. *Mycotoxins*, 63 (1), 39-46.
10. An, Y., Zhao, T., Miao, J., Liu, G., Zheng, Y., Xu, Y., Van Etten, R. L. (1989). Isolation, identification, and mutagenicity of alternariol monomethyl ether. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37(5), 1341-1343.
11. Andersen, B., Dongo, A., Pryor, B. M. (2008). Secondary metabolite profiling of *Alternaria dauci*, *A. porri*, *A. solani*, and *A. tomatophila*. *Mycological Research*, 112, 241-250.

12. Andersen, B., Kreéger, E., Roberts, R. (2002). Chemical and morphological segregation of *Alternaria arborescens*, *A. infectoria* and *A. tenuissima* species-groups, *Mycological Research*, 106 (2), 171-182.
13. Andersen, B., Sořensen, J. L., Nielsen, K. F., Gerrits van den Ende, B., S deHoog, G. (2009). A polyphasic approach to the taxonomy of the *Alternaria infectoria* species-group, *Fungal Genetics and Biology*, 46, 42-656.
14. Andersen, B., Kroger, E., Roberts, R. G. (2001). Chemical and morphological segregation of *Alternaria alternata*, *A. gaisen* and *A. longipes*. *Mycological Research*, 105 (3), 291-299.
15. Andersen, B., Nielsen, K. F., Pinto, V. F., Patriarca, A. (2015). Characterization of *Alternaria* strains from Argentinean blueberry, tomato, walnut and wheat. *International journal of food microbiology*, 196, 1-10.
16. Andrew, M., Peever, T. L., Pryor, B. M. (2009). An expanded multilocus phylogeny does not resolve morphological species within the small-spored *Alternaria* species complex. *Mycologia*, 101 (1), 95-109.
17. Andrews, A.C. (1964). The genetic origin of spelt and related wheats. *Zuchter*, 34, 17-22.
18. Angioloni, A., Collar, C. (2011). Nutritional and functional added value of oat, Kamut®, spelt, rye and buckwheat versus common wheat in breadmaking, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91, 1283-129.
19. Antes, S., Birzele, B., Prange, A., Krämer, J., Meier, A., Dehne, H. W., Köhler, P. (2001). Rheological and breadmaking properties of wheat samples infected with *Fusarium* spp. *Mycotoxin research*, 17(1), 76-80.
20. Antonijević, D. (2000). Gljivične bolesti uljane repice u Srbiji. XI Simpozijum o zaštiti bilja i savetovanje o primeni pesticida, Zlatibor, 04.-09. decembar 2000. god., 47.
21. Antonijević, D., Mitrović, P. (2007). Bolesti lista uljane repice, *Biljni lekar*, 35 (4), 443-449.
22. Asam, S., Konitzer, K., Rychlik, M. (2011). Precise determination of the *Alternaria* mycotoxins alternariol and alternariol monomethyl ether in cereal, fruit and vegetable products using stable isotope dilution assays. *Mycotoxin research*, 27(1), 23-28.
23. Azcarate, M. P., Patriarca, A., Terminiello, L., Pinto, V. F. (2008). *Alternaria* toxins in wheat during the 2004 to 2005 Argentinean harvest. *Journal of Food Protection*, 71, 1262-1265.

24. Babu, R. M., Sajeena, A., Seetharaman, K. (2003). Bioassay of the potentiality of *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler as a bioherbicide to control waterhyacinth and other aquatic weeds. *Crop Protection*, 22 (8), 1005-1013.
25. Bagi, F., Stojšin, V., Balaž, F. (2005). Cereal seed mycopopulations in Serbia. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*, 108, 189-195.
26. Balaž, F. (2010) a. *Alternaria* spp. značajan patogen semena pšenice i mogućnosti hemijske zaštite, Zbornik rezimea radova, X Savetovanje o zaštiti bilja, Zlatibor, 29.11.-03.12.2010.god., 88-89.
27. Balaž, F., Bagi, F., Škrinjar, M., Stojšin, V. (2003). Mikopopulacija semena strnih žita u 2002.godini, *Žito-hleb*, 30 (4-5), 149-155.
28. Balaž, F., Balaž, J., Tošić, M., Stojšin, V., Bagi, F. (2010) b. Fitopatologija, Bolesti ratarskih i povrtarskih biljaka, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu
29. Balaž, F., Bodroža-Solarov, M., Zečević, T. (2008). Uticaj hemijske zaštite na elemente prinosa, tehnološki kvalitet i štetnu mikofloru semena i nekih sorti pšenice, Zbornik rezimea radova. IX Savetovanje o zaštiti bilja, Zlatibor, 24 - 30. novembar 2008. god., 53-54.
30. Balaž, F., Stojšin, V., Bagi, F., Suknjaja, N., Mastilović, J., Torbica, A. (2005). Uloga zaraženosti semena patogenim i saprofitnim gljivama u pogoršanju tehnološkog kvaliteta pšenice i mogućnosti zaštite. II simpozijum o zaštiti bilja u Bosni i Hercegovini, Zbornik izvoda, Teslić, 14.-16.12.2005.god., 7-8.
31. Balaž, F., Bodroža-Solarov, M., Vučković, J., Bagi, F. (2011). Effects of chemical treatments on infestation of *Alternaria* spp. and *Fusarium* spp. in correlation with technological wheat quality. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*, 121, 79-84.
32. Balaž, F., Jevtić, R., Denčić, S., Jerković, Z., Momčilović, V. (1992). Effect of various factors on the intensity of infection of wheat spike inoculated by *Fusarium graminearum*. *Schw. Ihar radz.*, Sept. 22-24., 105-113.
33. Battilani, P., Costa, L. G., Dossena, A., Gullino, M. L., Marchelli, R., Galaverna, G., Pietri, A., Dall'Asta, C., Giorni, P., Spadaro, D., Gualla, A. (2009). Scientific information on mycotoxins and natural plant toxicants, CFP/EFSA/CONTAM/2008/01, Scientific technical report submitted to EFSA, <http://www.efsa.europa.eu/de/scdocs/doc/24e.pdf>
34. Bavec, F. i Bavec, M. (2006). Spelt. In *Organic Production and Use of Alternative Crops*, Boca Raton: CRC Press/Taylor and Francis, 37-45.
35. Bensassi, F., Gallerne, C., El Dein, O. S., Hajlaoui, M. R., Bacha, H., Lemaire, C. (2012). Cell death induced by the *Alternaria* mycotoxin alternariol. *Toxicology in Vitro*, 26(6), 915-923.

36. Bensassi, F., Zid, M., Rhouma, A., Bacha, H., Hajlaoui, M. R. (2009). First report of *Alternaria* species associated with black point of wheat in Tunisia. *Annals of microbiology*, 59 (3), 465-467.
37. Berthiller, F., Burdaspal, P. A., Crews, C., Iha, M. H., Krska, R., Lattanzio, V. M. T., MacDonald, S., Malone, R. J., Maragos, C., Solfrizzo, M., Stroka, J., Whitaker, T. B. (2014). Developments in mycotoxin analysis: an update for 2012-2013. *World Mycotoxin Journal*, 7 (1), 3-33.
38. BfR (Bundesinstitut für Risikobewertung). (2003). *Alternaria-Toxine in Lebensmitteln*, 2.
39. Bhaat, R. V., Rai, R. V., Karim, A. A. (2010). Mycotoxins in Food and Feed: Present Status and Future Concerns. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9, 57-81.
40. Blagojević, I. (2012). Predeona vizuelizacija Rimskog lokaliteta Margum. *Forestry*, 105, 7-16.
41. Blatter, R. H. E., Jacomet, S., Schlumbaum, A. (2004). About the origin of European spelt (*Triticum spelta* L.): allelic differentiation of the HMW Glutenin B1-1 and A1-2 subunit genes. *Theoretical and Applied Genetics*, 108(2), 360-367.
42. a-Solarov, M., Almaši, R., Poslončec, D., Filipčev, B., Šimurina, O., & Lević, J. (2010 a). Protective effect of hulls *Triticum aestivum* ssp. *spelta* against insect infestation during storage. In 2nd Workshop Feed-to-Food FP7 REGPOT-3. XIV International Symposium feed technology, Proceedings. Novi Sad, Serbia, 19-21 October, 2010, Institute for Food Technology, 183-188.
43. Bodroža-Solarov, M., Brkljača, J., Vučković, J., Balaž, F. (2012). Changes in technological quality of winter wheat with different intensity of *Fusarium* spp. and *Alternaria* spp. contamination. In Proceedings of 15th International Feed Technology Symposium „FEED-TO-FOOD/COST FEED FOR HEALTH joint Workshop, 366-370.
44. Bodroža-Solarov, M., Balaž, F., Bagi, F., Filipčev, B., Šimurina, O., Mastilović, J. (2010b). Effect of hulls on grain mould infestation in *Triticum aestivum* ssp. *spelta* from organic trial. 45th Croatian & 5th International Symposium on Agriculture, Agroecology and Ecological Agriculture, Croatia, 51-54.
45. Bodroža-Solarov, M., Mastilović, J., Filipčev, B., & Šimurina, O. (2009). *Triticum aestivum* ssp. *spelta*- The potential for the organic wheat production, *PTEP* 13, 128-131
46. Bodroža-Solarov, M., Vujić, Đ., Ačanski, M., Pezo, L., Filipčev, B., Mladenov, N. (2014). Characterization of the liposoluble fraction of common wheat (*Triticum aestivum*) and spelt

(*T. aestivum* ssp. *spelta*) flours using multivariate analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(13), 2613-2617.

47. Bojnanska, T., Francakova, H. (2002). The use of spelt wheat (*Triticum spelta* L.) for baking applications. *Rostlinna Vyroba*, 48(4), 141-147.

48. Bonafaccia, G., Galli, V., Francisci, R., Mair, V., Skrabanja, V., Kreft, I. (2000). Characteristics of spelt wheat products and nutritional value of spelt wheat-based bread. *Food Chemistry*, 68(4), 437-441.

49. Bordes, J., Branlard, G., Oury, F. X., Charmet, G., Balfourier, F. (2008). Agronomic characteristics, grain quality and flour rheology of 372 bread wheats in a worldwide core collection. *Journal of cereal science*, 48(3), 569-579.

50. Bottalico, A., & Logrieco, A. (1998). Toxigenic *Alternaria* species of economic importance. *Mycotoxins in agriculture and food safety*, 65, 108.

51. Boyacioglu, D., Hettiarachchy, N. S. (1995). Changes in some biochemical components of wheat grain that was infected with *Fusarium graminearum*. *Journal of Cereal Science*, 21(1), 57-62.

52. Brlek, T., Bodroza-Solarov, M., Vukmirovic, D., Colovic, R., Vuckovic, J., Levic, J. (2012). Utilization of spelt wheat hull as a renewable energy source by pelleting. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 18(5), 752-758.

53. Bulajić, A. (2006). Identifikacija i taksonomski međuodnos vrsta roda *Alternaria* Ness patogenih za povrtarske i začinske biljke familije *Apiaceae* u Srbiji, Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu

54. Bulajić, A., Filajdić, N., Babović, M., Sutton T. B. (1996). First report of *Alternaria mali* on apples in Yugoslavia. *Plant Disease*, 80 (6), 709.

55. Burgess, L. W, Summerell, B. A., Bullock, S., Gott, K. P, Backhouse, D. (1994). Laboratory Manual For *Fusarium* Research. 3rd Ed. *Fusarium* Research Laboratory, Department Of Crop Sciences, The University of Sydney and The Royal Botanic Gardens, Sydney.

56. Burkin, A. A., Kononenko, G. P. (2011). Enzyme immunassay of alternariol for the assessment of risk of agricultural products contamination. *Applied biochemistry and microbiology*, 47(1), 72-76.

57. Campbell, K. G. (1997). Spelt: agronomy, genetics, and breeding. *Plant Breeding Reviews*, 15, 187-214.

58. Castagna, R., Minoia, C., Porfiri, O., Rocchetti, G. (1996). Nitrogen level and seeding rate effects on the performance of hulled wheats (*Triticum monococcum* L., *T. dicoccum*

Schubler and *T. spelta* L.) evaluated in contrasting agronomic environments. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 176(3), 173-181.

59. Castoria, R., Lima, G., Ferracane, R., Ritieni, A. (2005). Occurrence of mycotoxin in farro samples from southern Italy. *Journal of Food Protection*, 68(2), 416-420.

60. Chalkley, D. (2015). Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. . Invasive Fungi. *Alternaria* leaf blight of wheat -*Alternaria triticina* . Retrieved April 7, 2015, from /sbmlweb/fungi/index.cfm

61. Chaudhuri, S., Maiti, S. S., Saha, P. (1976). Leaf blight of triticale caused by *Alternaria triticina*. *Plant Disease Reporter*, 60 (2), 133-134.

62. Chou, H., Wu, W. (2002). Phylogenetic analysis of internal transcribed spacer regions of the genus *Alternaria* and the significance of filament-beaked conidia. *Mycological Research*, 106 (2), 164-169.

63. ConHelius, S. (2003). Self-published work by ConHelius. Licensed under CC BY-SA 2.5 via Wikimedia Commons, <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:HPLC.gif#mediaviewer/File:HPLC.gif>.

64. Cooke, D., Forster, J., Jenkins, P., Jones, G., Lewis, M. (1998). Analysis of intraspecific and interspecific variation in the genus *Alternaria* by the use of RAPD-PCR, *Annals of Applied Biology*, 132, 197-209.

65. Corden, J., Millington, W., Mullins, J. (2003). Long-term trends and regional variation in the aeroallergen *Alternaria* in Cardiff and Derby UK – are differences in climate and cereal production having an effect?. *Aerobiologia*, 19. 191–195.

66. Cromey, M. G., Mulholland, R. I. (1988). Blackpoint of wheat: fungal associations, cultivar susceptibility, and effects on grain weight and germination. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 31(1), 51-56.

67. Cubadda, R., Marconi, E. (2002). Spelt wheat. In *Pseudocereals and Less Common Cereals*, Springer Berlin Heidelberg, 153-175.

68. Culshaw, F., Cook, R. J., Magan, N., Evans, E. J. (1988). Blackpoint of wheat. *Research Review*, Home Grown Cereals Authority, 7, 1-42.

69. Czech SCF (Scientific Committee on Food of the Czech Republic) (2008). http://www.chpr.szu.cz/vedvybor/dokumenty/informace/info_2007_24_deklas_AL_T.pdf.

70. da Rocha, M. E. B., Freire, F. D. C. O., Maia, F. E. F., Guedes, M. I. F., Rondina, D. (2014). Mycotoxins and their effects on human and animal health. *Food Control*, 36(1), 159-165.

71. Dark, P., Gent, H. (2001). Pests and Diseases of Prehistoric Crops: A Yield 'Honeymoon' for Early Grain Crops in Europe?. *Oxford Journal of Archaeology*, 20(1), 59-78.
72. de Miranda, M. Z., Lima, M. I. P. M., Bertolin, T. E., Mallmann, C. A., de Lima, M., Vilasbôas, F. S., ... & Beckel, H. (2006). Sanitary and technological quality analysis of five Brazilian wheat cultivars, in the 2005 cropping season. In Proceedings of the 9th International Working Conference on Stored-Product Protection, ABRAPOS, Passo Fundo, RS, Brazil, 15-18 October 2006. (). Brazilian Post-Harvest Association (ABRAPOS), 172-181.
73. Dexter, J. E., Clear, R. M., Preston, K. R. (1996). *Fusarium* head blight: effect on the milling and baking of some Canadian wheats. *Cereal Chemistry*, 73(6), 695-701.
74. Diaz, D. (2005). The Mycotoxin Blue Book, Nottingham University Press, Nottingham.
75. Diekmann, M., Putter, C. A. J. (1995). FAO/IPGRI Technical Guidelines for the Safe Movement of Germplasm. No. 14: Small Grain Temperate Cereals. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) and International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI). 22-23.
76. Dolijanovic, Z., Oljaca, S., Kovacevic, D., Đorđević, S., Brdar, J. (2013). The effects of different fertilizers on spelt grain yield (*Triticum aestivum* spp. *spelta*). In Fourth International Scientific Symposium "Agrosym 2013", Jahorina, Bosnia and Herzegovina, 3-6 October, 2013. Book of Proceedings, Faculty of Agriculture, University of East Sarajevo, 506-510.
77. Dolijanović, Ž., Oljača, S., Kovačević, D., Jug, I., Stipešević, B., & Poštić, D. (2012, February). Utjecaj agrotehničkih mjera na prinos zrna pira (*Triticum aestivum* spp. *spelta*) u organskom sustavu uzgoja. In Proceedings. 47th Croatian and 7th International Symposium on Agriculture. Opatija. Croatia, 55.
78. Dong, Z., Liu, G., Dong, Z., Qian, Y., An, Y., Miao, J., Zhen, Y. (1987). Induction of mutagenesis and transformation by the extract of *Alternaria alternata* isolated from grains in Linxian, China. *Carcinogenesis*, 8, 989-991.
79. Duduk, B., Ivanović, M., Vico, I., Krstić, B., Dukić, N. (2002). Pojava crne pegavosti lubenica i dinja u Srbiji. XII Simpozijum o zaštiti bilja i savetovanje o primeni pesticida, Zlatibor, 25-29. novembar 2002. god., 22.
80. Dugan, F. M., Peever, T. L. (2002). Morphological and cultural differentiation of described species of *Alternaria* from *Poaceae*. *Mycotaxon*, 83, 229-264.
81. Dupont F. M., Alltenbach S. B. (2003). Molecular and biochemical impacts of environmental factors on wheat grain development and protein synthesis. *Journal of Cereal Science*, 38, 133-146.

82. Dvorak, J., Deal, K. R., Luo, M. C., You, F. M., von Borstel, K., Dehghani, H. (2012). The origin of spelt and free-threshing hexaploid wheat. *Journal of Heredity*, 152.
83. Dyck, P. L., Sykes, E. E. (1994). Genetics of leaf-rust resistance in three spelt wheats. *Canadian journal of plant science*, 74(2), 231-233.
84. Džamić, A., Soković, M., Ristić, M., Grujić-Jovanović, S., Vukojević, J., Marin, P. D. (2008). Hemijski sastav i antifungalna aktivnost etarskog ulja *Salvia sclarea* (*Lamiaceae*). *Archives of Biological Sciences*, 60 (2), 233-237.
85. Đaković, L. (1980). Pšenično bašno. Zavod za tehnologiju žita i brašna. Tehnološki fakultet Novi Sad, Novi Sad, Srbija.
86. Đurić, V., Mladenov, N. (2007). Uticaj spoljnih faktora na fizičko hemijske osobine zrna pšenice gajenih u Vojvodini. *Zbornik radova Instituta za ratarstvo i povrtarstvo*, 43(1), 39-45.
87. Edin, E. (2012). Species specific primers for identification of *Alternaria solani*, in combination with analysis of the F129L substitution associates with loss of sensitivity toward strobilurins. *Crop Protection*, 38, 72-73.
88. EFSA. (2011). EFSA on contaminants in the food chain (CONTAM): scientific opinion on the risks for animal and public health related to the presence of *Alternaria* toxins in food and feed. *EFSA Journal*, 9, (2407), 97.
89. El-Aal, S. S. A. (1997). Effects of gamma radiation, temperature and water activity on the production of *Alternaria* mycotoxins. *Egyptian Journal of Microbiology*, 32, 379-396.
90. Elliott, J. A. (1917). Taxonomic characters of the genera *Alternaria* and *Macrosporium*. *American Journal of Botany*, 439-476.
91. Elmholt, S., Rasmussen, P. H. (2004). Spelt is susceptible to Ochratoxin A producing fungi. *Newsletter from Danish Research Centre for Organic Farming*, 2, 1-5.
92. El-Morsy, E. M., Dohlob, S. M., Hyde, K. D. (2006). Diversity of *Alternaria alternata* a common destructive pathogen of *Eichhornia crassipes* in Egypt and its potential use in biological control. *Fungal Diversity*, 23, 139-158.
93. Escarnot, E., Agneessens, R., Wathelet, B., Paquot, M. (2010). Quantitative and qualitative study of spelt and wheat fibres in varying milling fractions. *Food chemistry*, 122 (3), 857-863.
94. Escarnot, E., Aguedo, M., Paquot, M. (2011). Characterization of hemicellulosic fractions from spelt hull extracted by different methods. *Carbohydrate Polymers*, 85 (2), 419-428.

95. Escarnot, E., Jacquemin, J. M., Agneessens, R., Paquot, M. (2012). Comparative study of the content and profiles of macronutrients in spelt and wheat, a review. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 16 (2), 243-256.
96. European Committee for Standardization (CEN). (2013). Call for tenders for project leaders for the development of standardized methods for the analysis of mycotoxins in food. CEN, Brussels, Belgium. Available at: ftp://ftp.cen.eu/CEN/Sectors/List/Food/Call_520.pdf.
97. Farrar, J. J., Pryor, B. M., Davis, R. M. (2004). *Alternaria* diseases of carrot. *Plant disease*, 88 (8), 776-784.
98. Fernandez, M. R., Conner, R. L. (2011). Black point and smudge in wheat. *Prairie Soils and Crops*, 4, 158-164.
99. Fernández-Cruz M.L., Mansilla, M.L., Tadeo, J.L. (2010). Mycotoxins in fruits and their processed products: Analysis, occurrence and health implications. *Journal of Advanced Research*, 1, 113-122.
100. Filipčev, B., Šimurina, O., Bodroža-Solarov, M., Brkljača, J. (2013). Dough rheological properties in relation to cracker-making performance of organically grown spelt cultivars. *International Journal of Food Science & Technology*, 48 (11), 2356-2362.
101. Filipčev, B., Šimurina, O., Bodroža-Solarov, M., Obreht, D. (2013). Comparison of the bread-making performance of spelt varieties grown under organic conditions in the environment of northern Serbia and their responses to dough strengthening improvers. *Hemijska industrija*, 67 (3), 443-453.
102. Filipović, J., Pezo, L., Filipović, N., Filipović, V., Bodroža-Solarov, M., & Plančak, M. (2013). Mathematical approach to assessing spelt cultivars (*Triticum aestivum* subsp. *spelt*) for pasta making. *International Journal of Food Science & Technology*, 48 (1), 195-203.
103. FINS. (2007). Određivanje sadržaja vlage i proteina primenom Infratec-a 1241 FINSLab-5.4-3M-001 interna metoda. Novi Sad, Srbija: Institut za prehrambene tehnologije u Novom Sadu.
104. Fredj, S. M. B., Chebil, S., Lebrihi, A., Lasram, S., Ghorbel, A., Mliki, A. (2007). Occurrence of pathogenic fungal species in Tunisian vineyards. *International journal of food microbiology*, 113 (3), 245-250.
105. Galova, Z., Knodlochova H. (2000). Nutritivna svojstva sorti spelta pšenice. *Žito-hleb*, 27, 135-142.
106. Gannibal, P. B., Klemsdal, S. S., Levitin, M. M. (2007). AFLP analysis of Russian *Alternaria tenuissima* populations from wheat kernels and other hosts. *European journal of plant pathology*, 119 (2), 175-182.

107. Gärtner, B. H., Munich, M., Kleijer, G., Mascher, F. (2008). Characterisation of kernel resistance against *Fusarium* infection in spring wheat by baking quality and mycotoxin assessments. *European journal of plant pathology*, 120 (1), 61-68.
108. Ghorbani, R., Seel, W., Litterick, A., Leifert, C. (2000). Evaluation of *Alternaria alternata* for biological control of *Amaranthus retroflexus*. *Weed Science*, 48 (4), 474-480.
109. Glamočlija, Đ. M., Staletić, J., Ikanović, M., Spasić, V., Đekić V., Davidović, M. (2010): Possibilities alternative grain production in the highlands area of Central Serbia. International scientific meeting: Multifunctional agriculture and rural development (V) regional specificities. Economics of agriculture, Special issue-2., Vol. LVII, SI-2, 71-77.
110. Goh, T. K. (1999). Single-spore isolation using a hand-made glass needle. *Fungal Diversity*, 2, 47-63.
111. Gomez-Becerra, H. F., Erdem, H., Yazici, A., Tutus, Y., Torun, B., Ozturk, L., Cakmak, I. (2010). Grain concentrations of protein and mineral nutrients in a large collection of spelt wheat grown under different environments. *Journal of Cereal Science*, 52 (3), 342-349.
112. Goncharov, N. P. (2011). Genus *Triticum* L. taxonomy: the present and the future. *Plant Systematics and Evolution*, 295(1-4), 1-11.
113. González, H. H. L. (1998). Relationship between *Fusarium graminearum* and *Alternaria alternata* contamination and deoxynivalenol occurrence on Argentinian durum wheat. *Mycopathologia*, 144(2), 97-102.
114. Grabarkiewicz-Szczęśna, J., Chelkowski, J., Zajkowski, P. (1989). Natural occurrence of *Alternaria* mycotoxins in the grain and chaff of cereals. *Mycotoxin research*, 5(2), 77-80.
115. Grela, E. R. (1996). Nutrient Composition and Content of Antinutritional Factors in Spelt (*Triticum spelta* L.) Cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 71(3), 399-404.
116. Grobelnik-Mlakar, S., Bavec F., Bavec, M., Jakop, J., Robačar, M., Brkljača, J., Bodroža-Solarov, M. (2014). Technological properties of spelt according to different production systems, Proceeding of II International Congress Food Technology, Quality and Safety, Novi Sad, Serbia, 28.-30.October 2014., 610-615.
117. Groos, C., Gay, G., Perretant, M. R., Gervais, L., Bernard, M., Dedryver, F., Charmet, G. (2002). Study of the relationship between pre-harvest sprouting and grain color by quantitative trait loci analysis in a white× red grain bread-wheat cross. *Theoretical and Applied Genetics*, 104 (1), 39-47;

118. Guillemette, T., Iacomi-Vasilescu, B., Simoneau, P. (2004). Conventional and real-time PCR-based assay for detecting pathogenic *Alternaria brassicae* in cruciferous seed. *Plant disease*, 88 (5), 490-496.
119. Häggblom, P., Unestam, T. (1979). Blue light inhibits mycotoxin production and increases total lipids and pigmentation in *Alternaria alternata*. *Applied and environmental microbiology*, 38 (6), 1074-1077.
120. Häggblom, P., Stepinska, A., Solyakov, A. (2007). *Alternaria* mycotoxins in Swedish feed grain. In Proceedings of the 29th Mycotoxin-Workshop, Fellbach, Germany, 35.
121. Hammer, K., Filatenko, A. A., Pistrick, K. (2011). Taxonomic remarks on *Triticum* L. and *Triticosecale* Wittm. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 58 (1), 3-10.
122. Hassan, H. A. H. (1996). *Alternaria* mycotoxins in Black rot lesion of tomato fruits: Conditions and regulations of their productions. *Acta Immunologica Hungarica*, 43 (2-3), 125-133.
123. Helbaek, H. (1960). The paleoethnobotany of the Near East and Europe. in R. J. Braidwood, and B. Howe eds. Prehistoric investigations in Iraqi Kurdistan, The University of Chicago Press, Chicago, 99-118
124. Hong, S. G., Cramer, R. A., Lawrence, C. B., Pryor, B. M. (2005). Alt a 1 allergen homologs from *Alternaria* and related taxa: analysis of phylogenetic content and secondary structure, *Fungal Genetics and Biology*, 42, 119-129
125. Hoseney, R. C. (1994). Principles of cereal science and technology (No. Ed. 2). American Association of Cereal Chemists (AACC).
126. ICC Standards. (1996). Standard Methods of the International Association for Cereal Science and Technology, International Association for Cereal Science and Technology, Vienna, Austria, methods ICC 137/1, ICC 173.
127. Ivanović, M., Ivanović, D. (2001). Mikoze i pseudomikoze biljaka. Poljoprivredni fakultet, Beograd, 1-547.
128. Ivanović, M., Mijatović, M. (2003). Patogene gljive semena povrća. *Biljni lekar*, 6, 595-603.
129. Ivanović, M., Martić, M., Đurić, N., Dragović, G. (2001). The most common wheat diseases in the conditions of Pančevački rit. Zbornik naučnih radova Instituta PKB Agroekonomik, 7(1), 27-31.
130. Ivanović, M., Mijatović, M., Antonijević, D. (1999). Effect of sodium bicarbonate on *Alternaria solani* in tomato. *Acta Horticulturae*, 579, 536-539.

131. Jacobson, E., Hove, E., Emery, H. (1995). Antioxidant Function of Melanin in Black Fungi, *Infection and Immunity*, 63 (12), 4944–4945.
132. Janić Hajnal, E., Belović, M., Plavšić, D., Mastilović, J., Bagi, F., Budakov, D., Kos, J. (2014). Possibilities of visual and instrumental identification of wheat infection with field fungi, II International Congress "Food Technology Quality and Safety", Novi sad, 28-30. October, 337-342.
133. Janić Hajnal, E., Orčić, D., Torbica, A., Kos, J., Mastilović, J., Škrinjar, M. (2015). *Alternaria* toxins in wheat from Autonomous Province of Vojvodina, Serbia: a preliminary survey. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 32 (3), DOI:10.1080/19440049.2015.1007533
134. Jasnić, S., Marjanović, Ž., Vidić, M., Bagi, F., Budakov, D., Pavlović, S., Stojšin, V. (2011). Patogene morfološke i molekularne osobine *Alternaria tenuissima* sa soje, *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*, 120, 183-196.
135. Johnson, R. D., Johnson, L., Kohmoto, K., Otani, H., Lane, C. R., Kodama, M. (2000). A polymerase chain reaction-based method to specifically detect *Alternaria alternata* apple pathotype (A. mali), the causal agent of *Alternaria* blotch of apple. *Phytopathology*, 90 (9), 973-976.
136. Jørgensen, J. R., Olsen, C. C. (1997). Yield and quality assessment of spelt (*Triticum spelta* L.) compared with winter wheat (*Triticum aestivum* L.) in Denmark. In Working group meeting Crop development for the Cool and Wet Regions of Europe. Spelt and Quinoa, 33-40.
137. Joshi, A. K., Miedaner, T. (2003). Occurrence and host preference of foliar blight pathogens in different growth stages of rye and wheat in Southwest Germany. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 110(4), 350-358.
138. Jošić, D., Pivić, R., Pavlović, S., Stojanović, S., Aleksić, G., Starović, M. (2011). Antifungalna aktivnost autohtonog izolata *Bacillus* sp. Q3 na mikopopulaciju belog sleza, *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*, 120, 111-120.
139. Kahraman, K., Sakıyan, O., Ozturk, S., Koksel, H., Sumnu, G., Dubat, A. (2008). Utilization of Mixolab® to predict the suitability of flours in terms of cake quality. *European Food Research and Technology*, 227 (2), 565-570.
140. Kaluđerski, G., Filipović, N. (1998). Metode ispitivanja kvaliteta žita, brašna i gotovih proizvoda, Tehnološki fakultet, Novi Sad, SRJ Jugoslavija, Zavod za tehnologiju žita i brašna. 1-320.

141. Kawamura, C., Tsujimoto, T., Tsuge, T. (1999). Targeted disruption of a melanin biosynthesis gene affect conidial development and UV tolerance in the Japanese pear pathotype of *Alternaria alternata*, *MPMI*, 12 (1), 59-63.
142. Keller, M., Keller, B., Schachermayr, G., Winzeler, M., Schmid, J. E., Stamp, P., Messmer, M. M. (1999). Quantitative trait loci for resistance against powdery mildew in a segregating wheat× spelt population. *Theoretical and Applied Genetics*, 98 (6-7), 903-912.
143. Kema, G. H. J., Lange, W. (1992). Resistance in spelt wheat to yellow rust. II: Monosomic analysis of the Iranian accession 415. *Euphytica*, 63 (3), 219-224.
144. Khatibi, P. A., Berger, G., Liu, S., Brooks, W. S., Griffey, C. A., Schmale III, D. G. (2012). Resistance to *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation in Virginia barley. *Plant Disease*, 96 (2), 279-284.
145. Kilic, M., Altintas, U., Yilmaz, M., Kendirli, G., Karakoc, B., Taskin, E., Ceter, T., Pinar, N. M. (2010). The effects of meteorological factors and *Alternaria* spore concentrations on children sensitised to *Alternaria*, *Allergologia et Immunopathologia*, 38 (3), 122-128.
146. Klaustermeyer, W. B., Bardanam E. J., Halem F. C. (2006). Pulmonary hypersensitivity to *Alternaria* and *Aspergillus* in baker's asthma. *Clinical & Experimental Allergy*, 7 (3), 227-223.
147. Kocić-Tanackov, S. D., Dimić, G. R. (2013). Gljive i mikotoksini-kontaminanti hrane. *Hemijska Industrija*, 67, 639-653.
148. Kohajdová, Z., Karovičová, J. (2008). Nutritional value and baking applications of spelt wheat. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment*, 7(3), 5-14.
149. Konstantinova, P., Bonants, P. J., Van Gent-Pelzer, M. P., Van Der Zouwen, P., Van Den Bulk, R. (2002). Development of specific primers for detection and identification of *Alternaria* spp. in carrot material by PCR and comparison with blotter and plating assays. *Mycological Research*, 106(01), 23-33.
150. Konvalina, P., Capouchová, I., Stehno, Z., Moudrý, J. (2010). Agronomic characteristics of the spring forms of the wheat landraces (einkorn, emmer, spelt, intermediate bread wheat) grown in organic farming. *Journal of Agrobiolgy*, 27(1), 9-17.
151. Kosiak, B., Kwasna, H., Bruun Bremnes, N. (2002). Morphological description and secondary metabolite profiles of single-spore propagations of *Lewia infectoria* and *Lewia triticola* (Kosia and Kwasna ined.), 10th International congress of Mycology, Paris, 27th July to 1st August 2002, Book of abstracts, 26.

152. Kosiak, B., Torp, M., Skjerve, E., Andersen, B. (2004). *Alternaria* and *Fusarium* in Norwegian grains of reduced quality—a matched pair sample study *International Journal of Food Microbiology*, 93, 51– 62.
153. Koutroubas, S. D., Fotiadis, S., Damalas, C. A. (2012). Biomass and nitrogen accumulation and translocation in spelt (*Triticum spelta*) grown in a Mediterranean area. *Field Crops Research*, 127, 1-8.
154. Kralova, J. A. N. A., Hajslova, J., Poustka, J., Hochman, M., Bjelkova, M., Odstrcilova, L. (2006). Occurrence of *Alternaria* toxins in fibre flax, linseed, and peas grown in organic and conventional farms: Monitoring pilot study. *Czech journal of food sciences*, 24(6), 288.
155. Kuckuck H. (1959). On the findings of *Triticum spelta* L. in Iran and on the arising of *Triticum aestivum*-types through crossings of different Spelta-types. *Wheat Information Service*. 9–10,1–2.
156. Kulshrestha, V. P., Rao, M. V. (1976). Genetics of resistance to an isolate of *Alternaria triticina* causing leaf blight of wheat. *Euphytica*, 25(1), 769-775.
157. Kumar, V. R., Kumar, A., Arya, H. C. (1974). Nature of disease resistance and susceptibility in leaf blight of wheat caused by *Alternaria triticina* in vivo and in vitro. *Indian Phytopathology*, 27(4), 455-458.
158. Kurowski, T. P., Wysocka, U. (2009). Fungi colonizing grain of winter spelt grown under two production systems. *Phytopathology*, 54, 45-52.
159. Kurowski, T. P., Damszel, M., Wysocka, U. (2012). Fungi colonizing the grain of spring wheat grown in the conventional and organic systems. *Phytopathologia*, 63, 39-50.
160. Kütt, M. L., Lõiveke, H., & Tanner, R. (2010). Detection of alternariol in Estonian grain samples. In *Agronomy Research*, Estonian Research Institute of Agriculture, 8, (II), 317-322.
161. Kwasna, H., Kosiak, B. (2003). *Lewia avenicola* sp. nov. and its *Alternaria* anamorph from oat grain, with a key to the species of *Lewia*. *Mycological Research*, 107, 371-376.
162. Terminiello, L., Patriarca, A., Pose, G., Fernández Pinto, vV (2006). Occurrence of alternariol, alternariol monomethyl ether and tenuazonic acid in Argentinean tomato puree. *Mycotoxin Research*, 22, 236–240.
163. Lacko-Bartošová, M. (2012). Occurrence of *Fusarium* species and DON concentration in kernels of *Triticum spelta*. *Research Journal of Agricultural Science*, 44, 2.
164. Lacko-Bartošová, M., Rádlová, M. (2007). The significance of spelt wheat cultivated in ecological farming in the Slovak Republic. In *Proceeding of the Conference on Organic Farming*, 79-81.

165. Lacko-Bartošová, M., Korczyk-Szabó, J., & Ražný, R. (2010). *Triticum spelta*—a speciality grain for ecological farming systems. *Research Journal of Agricultural Science*, 42 (1), 143-147.
166. Laemmlen, F. (2001). *Alternaria* diseases, Publication 8040; University of California.
167. Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23 (21), 2947-2948.
168. Larsen, T. O., Perry, N. B., Andersen, B. (2003). Infectopyrone, a potential mycotoxin from *Alternaria infectoria*. *Tetrahedron letters*, 44(24), 4511-4513.
169. Lawrence, D. P., Gannibal, P. B., Peever, T. L., Pryor, B. M. (2013). The sections of *Alternaria*: formalizing species-group concepts. *Mycologia*, 105(3), 530-546.
170. Lehmann, L., Wagner, J., Metzler, M. (2006). Estrogenic and clastogenic potential of the mycotoxin alternariol in cultured mammalian cells. *Food and Chemical Toxicology*, 44(3), 398-408.
171. Lehmensiek, A., Campbell, A. W., Sutherland, M. W., Williamson, P. M., Michalowitz, M., & Daggard, G. E. (2004). QTLs for black-point resistance in wheat and the identification of potential markers for use in breeding programmes. *Plant Breeding*, 123(5), 410-416.
172. Leslie, J. F., Summerell, B. A. (2001). *The Fusarium laboratory manual*, Blackwell Publishing, 38.
173. Li, F. Q., Yoshizawa, T. (2000). *Alternaria* mycotoxins in weathered wheat from China. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48 (7), 2920-2924.
174. Li, H., Xing, X., Yuan, H., Sun, B., Wang, Z. (2004). Study on the chemical control of wheat black point. *Journal of Triticeae Crops*, 25(5), 100-103.
175. Li, W., Dobraszczyk, B. J., Schofield, J. D. (2003). Stress relaxation behavior of wheat dough, gluten, and gluten protein fractions. *Cereal Chemistry*, 80(3), 333-338.
176. Linas, M. D., Morassin, B., Recco, P. (1998). Actualités sur *Alternaria*: écologie, *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique. Journées Nationales de la Société Française D'allergologie et D'immunologie Clinique*, 38 (4), 349-355.
177. Liu, G., Qian, Y., Zhang, P., Dong, W., Qi, Y., Guo, H. (1992). Etiological role of *Alternaria alternata* in human oesophageal cancer. *Chinese Medical Journal*, 105, 394-400.
178. Logrieco, A., Bottalico, A., Mul'e, G., Moretti, A., Perrone, G. (2003). Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. *European Journal of Plant Pathology*, 109, 645-667.

179. Logrieco, A., Bottalico, A., Solfrizzo, M., Mule, G. (1990). Incidence of *Alternaria* Species in Grains from Mediterranean Countries and Their Ability to Produce Mycotoxins. *Mycologia*, 82 (4), 501-505.
180. Logrieco, A., Moretti, A., Solfrizzo, M. (2009). *Alternaria* toxins and plant diseases: an overview of origin, occurrence and risk. *World Mycotoxin Journal*, 2, 129-140.
181. Lõiveke, H., Ilumäe, E., Laitamm, H. (2004). Microfungi in grain and grain feeds and their potential toxicity. *Agronomy Research*, 2(2), 195-205.
182. Lopez, H. W., Leenhardt, F., Coudray, C., Remesy, C. (2002). Minerals and phytic acid interactions: is it a real problem for human nutrition?. *International journal of food science & technology*, 37(7), 727-739.
183. Lorenz, K. (1986). Effects of blackpoint on grain composition and baking quality of New Zealand wheat. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 29(4), 711-718.
184. Lugauskas, A., Repečkienė, J., Levinskaitė, L., Mačkinitė, R., Kačergius, A., Raudonienė, V. (2006). Micromycetes as toxin producers detected on raw material of plant origin grown under various conditions in Lithuania. *Ekologija*, 3, 1-13.
185. Solfrizzo, M., De Girolamo, A., Vitti, C., Tylkowska, K., Grabarkiewicz-Szczesna, J., Szopinska, D., Dorna, H. (2005). Toxigenic profile of *Alternaria alternata* and *Alternaria radicina* occurring on umbelliferous plants. *Food Addit. Contam*, 22 (4), 302-308.
186. Mac Key, J. (2005). Wheat: its concept. evolution and taxonomy. In: Royo C et al. (eds) Durum wheat breeding. Current approaches and future strategies, vol. 1. CRC Press, Boca Raton, 3-61.
187. Magan, N., Cayley, G., Lacey, J. (1984). Effect of Water Activity and Temperature on Mycotoxin Production by *Alternaria alternata* in Culture and on Wheat Grain. *Applied and Environmental Microbiology*, 47 (5), 1113-1117.
188. Magan, N., Hope, R., Cairns, V., Aldred, D. (2003). Post-harvest fungal ecology: impact of fungal growth and mycotoxin accumulation in stored grain. *European Journal of Plant Pathology*, 109(7), 723-730.
189. Magkos, F., Arvaniti, F., Zampelas, A. (2006). Organic food: buying more safety or just peace of mind? A critical review of the literature. *Critical reviews in food science and nutrition*, 46(1), 23-56.
190. Magnani, R. F., De Souza, G. D., & Rodrigues-Filho, E. (2007). Analysis of alternariol and alternariol monomethyl ether on flavedo and albedo tissues of tangerines (*Citrus reticulata*) with symptoms of *Alternaria* brown spot. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(13), 4980-4986.

191. Malaker, P. K., Mian, I. H., Bhuiyan, K. A., Reza, M. M. A., Mannan, M. A. (2009). Effect of black point disease on quality of wheat grain. *Bangladesh Journal of Agricultural Research*, 34(2), 181-187.
192. Mankevičienė, A., Jablonskytė-Raščė, D., Maikštėnienė, S. (2014). Occurrence of mycotoxins in spelt and common wheat grain and their products. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 31(1), 132-138.
193. Marconi, E., Carcea, M., Graziano, M., Cubadda, R. (1999). Kernel properties and pasta-making quality of five European spelt wheat (*Triticum spelta* L.) cultivars. *Cereal chemistry*, 76(1), 25-29.
194. Marconi, E., Carcea, M., Schiavone, M., Cubadda, R. (2002). Spelt (*Triticum spelta* L.) pasta quality: Combined effect of flour properties and drying conditions. *Cereal chemistry*, 79(5), 634-639.
195. Marconi, E., Carcea, M., Schiavone, M., Cubadda, R. (2002). Spelt (*Triticum spelta* L.) Pasta Quality: Combined Effect of Flour Properties and Drying Conditions. *Cereal Chemistry*, 79, 634-639.
196. Marin, S., Ramos, A. J., Cano-Sancho, G., Sanchis, V. (2013). Mycotoxins: occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology*, 60, 218-237.
197. Marques, C., D'auria, L., Cani, P. D., Baccelli, C., Rozenberg, R., Ruibal-Mendieta, N. L., Delzenne, N. M. (2007). Comparison of glycemic index of spelt and wheat bread in human volunteers. *Food chemistry*, 100(3), 1265-1271.
198. Martin, D. J., Law, D.P. (1984). Black point in bread wheat: effects on quality and germination, and fungal associations. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry*, 24 (127), 601-605.
199. Mastromatteo, M., Chillo, S., Buonocore, G.G., Massaro, A., Conte A, Del Nobile, M.A. (2008). Effects of spelt and wheat bran on the performances of wheat gluten films. *J. F. Eng*, 88, 202-212.
200. Maširević, S., Jasnić, S. (2006). Pegavost lista i stabla suncokreta. *Biljni lekar*, 34, (4-5), 326-333.
201. Mašková, Z., Tančinová, D., Barboráková, Z., Felšöciová, S., Císarová, M. (2012). Comparison of occurrence and toxinogenicity of *Alternaria* spp. isolated from samples of conventional and new crossbred wheat of Slovak origin. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 1 (4), 552-562.
202. Mašković, P., Mladenović, J., Cvijović, M., Aćamović-Đoković, G., Solujić, S., Radojković, M. (2011). Sadržaj fenolnih jedinjenja, antioksidativna i antifungalna aktivnost acetonskog,

etanolskog i petrol-etarskog ekstrakta biljke *Hypericum perforatum* L. *Hemijska industrija*, 65 (2), 159-164.

203. Matuz, J., Bartok, T., Morocz-Salamon, K., Bona, L. (2000). Structure and potential allergenic character of cereal proteins. I. Protein content and amino acid composition. *Cereal Research Communications*, 28 (3), 263-270.

204. Mayer, S., Engelhart, S., Kolk, A., & Blome, H. (2008). The significance of mycotoxins in the framework of assessing workplace related risks. *Mycotoxin research*, 24 (3), 151-164.

205. McFadden, E.S., Sears, E.R. (1946). The origin of *Triticum spelta* and its free-threshing hexaploid relatives. *Journal of Heredity*, 37 (81-89), 107-116

206. Medina, Á., Valle-Algarra, F. M., Mateo, R., Gimeno-Adelantado, J. V., Mateo, F., & Jiménez, M. (2006). Survey of the mycobiota of Spanish malting barley and evaluation of the mycotoxin producing potential of species of *Alternaria*, *Aspergillus* and *Fusarium*. *International journal of food microbiology*, 108 (2), 196-203.

207. Medović, A. (2003). Čuruški krupnik iz 4. veka – u čvrstom zagrljaju njivskog poponca i njivskog vijušca. *Rar muzeja Vojvodine*, 51, 147-157.

208. Meena, P. D., Awasthi, R. P., Chattopadhyay, C., Kolte, S. J., & Kumar, A. (2010). *Alternaria blight*: a chronic disease in rapeseed-mustard. *Journal of Oilseed Brassica*, 1 (1), 1-11.

209. Mehier, F. F., Wasfy, E. E. D. H., & El-Samra, I. A. (1976). New leaf diseases of barley in Egypt. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Zweite Naturwissenschaftliche Abteilung: Allgemeine, Landwirtschaftliche und Technische Mikrobiologie*, 131 (8), 757-759.

210. Mercado Vergnes, D., Renard, M. E., Duveiller, E., & Maraite, H. (2006). Identification of *Alternaria* spp. on wheat by pathogenicity assays and sequencing. *Plant pathology*, 55 (4), 485-493.

211. Mičić, N., & Bosančić, B. (2012). Varijabilitet i koeficijenti varijacije u biološkim i poljoprivrednim istraživanjima. *Agroznanje*, 13(3), 331-342.

212. Mielke, H., Rodemann, B. (2007). Der Dinkel, eine besondere Weizenart – Anbau, Pflanzenschutz, Ernte und Verarbeitung. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes*, 59, 40-45.

213. Miržinska, J. & Miladinović, N. (1956). Sorte pšenice u Srbiji. *Zadružna knjiga*, Beograd.

214. Mitchell, T. A. (1985). Blackpoint. *Cereal news*, 10, 7 - 8.

215. Mmbaga, M. T., Shi, A., & Kim, M. S. (2011). Identification of *Alternaria alternata* as a causal agent for leaf blight in *Syringa* species. *The Plant Pathology Journal*, 27(2), 120-127.
216. Monbaliu, S., Van Poucke, C., Detavernier, C., Dumoulin, F., Van De Velde, M., Schoeters, E., Van Dyck, S., Averkieva, O., Van Peteghem, C., De Saeger, S., (2010). Occurrence of mycotoxins in feed as analyzed by a multi-mycotoxin LC-MS/MS Method. *J. Agric. Food Chem.*, 58, 66-71.
217. Moudry, J., & Dvoracek, V. (1999). Chemical composition of grain of different spelt (*Triticum spelta*) varieties. *Rostlinna Vyroba*, 45, 12.
218. Moudry, J., Konvalina, P., Stehno, Z., & Capouchová, I. (2011). Ancient wheat species can extend biodiversity of cultivated crops. *Scientific Research and Essay*, 6 (20), 4273-4280.
219. Müller, M. E., & Korn, U. (2013). *Alternaria* mycotoxins in wheat—A 10 years survey in the Northeast of Germany. *Food Control*, 34 (1), 191-197.
220. Murray, T.D., Parry, D.W. & Cattlin, N.D. (2009). Diseases of Small Grain Cereal Crops: A colour Handbook. London, UK: Manson Publishing.
221. National center for biotechnological information (NCBI). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pristupano> tokom 2011/12 godine)
222. Neergaard, P. (1945). Danish species of *Alternaria* and *Stemphylium*. Species of *Alternaria* and *Stemphylium*. Munksgaard, Copenhagen
223. Nees von Esenbeck, C.G.D. (1816). Das System der Pilze und Schwämme. Stahelschen Buchhandlung, Würzburg, Germany, 329.
224. Neeson, R., Evans, J., Burnett, V., & Luckett, D. (2008). Optimising the quality and yield of spelt under organic production in SE Australia. In *Proc. 14th Australian Society of Agronomy Conference*. Adelaide, SA, Australia.
225. Nesbitt, M., Samuel, D. (1996). From staple crop to extinction? The archaeology and history of hulled wheats. In: Padulosi S, Hammer K, Heller J, editors. Hulled wheats. *Proceedings of the 1st International Workshop on Hulled Wheats*. Rome, Italy: International Plant Genetic Resources Institute. 41–100.
226. Niessen, L. (2007). PCR-based diagnosis and quantification of mycotoxin producing fungi. *International Journal of Food Microbiology*, 119, 38–46.
227. Noser, J., Schneider, P., Rother, M., & Schmutz, H. (2011). Determination of six *Alternaria* toxins with UPLC-MS/MS and their occurrence in tomatoes and tomato products from the Swiss market. *Mycotoxin research*, 27(4), 265-271.
228. Ntasiou, P., Myresiotis, C., Konstantinou, S., Papadopoulou-Mourkidou, E., & Karaoglanidis, G. S. (2015). Identification, characterization and mycotoxigenic ability of

Alternaria spp. causing core rot of apple fruit in Greece. *International journal of food microbiology*, 197, 22-29.

229. Office fédéral de la statistique Suisse. (2008). <http://www.bfs.admin.ch/bfs/portal/fr/index.html>>

230. Onishi, I., Hongo, A., Sasakuma, T., Kawahara, T., Kato, K., & Miura, H. (2006). Variation and segregation for rachis fragility in spelt wheat, *Triticum spelta* L. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53(5), 985-992.

231. Ostry, V. (2008). *Alternaria* mycotoxins: an overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs. *World Mycotoxin Journal*, 1(2), 175-188.

1. Otani, H., & Kohmoto, K. (1992). Host-specific toxins of *Alternaria* species. In J. Chełkowski, & A. Visconti (Eds.), *Alternaria e Biology, plant diseases and metabolites* (pp. 123-156). Amsterdam, London, New York, Tokyo: Elsevier.

232. Otani, H., Kohmoto, K., & Kodama, M. (1995). *Alternaria* toxins and their effects on host plants. *Canadian Journal of Botany*, 73(S1), 453-458.

233. Oviedo, M. S., Sturm, M. E., Reynoso, M. M., Chulze, S. N., & Ramirez, M. L. (2013). Toxigenic profile and AFLP variability of *Alternaria alternata* and *Alternaria infectoria* occurring on wheat. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(2), 447-455.

234. Scott, P.M., Stoltz, D.R. (1980). Mutagens produced by *Alternaria alternata*, *Mutat. Res*, 78, 33-40.

235. Scott, P.M. (2004). Other Mycotoxins. In: *Mycotoxins in Food - Detection and Control* (N. Magan, M. Olsen, eds.), Cambridge, England: Woodhead, Publishing Ltd., 406-440.

236. Papoušková, L., Capouchová, I., Kostelanská, M., Škeříková, A., Prokinová, E., Hajšlová J., Salava, J., Faměra, O. (2011). Changes in Baking Quality of Winter Wheat with Different Intensity of *Fusarium* spp. Contamination Detected by Means of New Rheological System Mixolab, *Czech J. Food Sci.*, 29, 420-429.

237. Pasqualone, A., Piergiovanni, A.R., Laghetti, G., Volpe, N., Simeone, R. (2006). Valutazione di pane ottenuto da grano Kamut e da spelta, *Panificazione, Tecnica Molitoria-Ottobre 2006*, 1075-1080.

238. Pasqualone, A., Piergiovanni, A. R., Caponio, F., Paradiso, V. M., Summo, C., & Simeone, R. (2011). Evaluation of the technological characteristics and bread-making quality of alternative wheat cereals in comparison with common and durum wheat. *Food Science and Technology International*, 1082013210381547.

239. Patriarca, A., Azcarate, M. P., Terminiello, L., & Pinto, V. F. (2007). Mycotoxin production by *Alternaria* strains isolated from Argentinean wheat. *International journal of food microbiology*, 119(3), 219-222.
240. Pavón, M. Á., González, I., Martín, R., & Lacarra, T. G. (2012). ITS-based detection and quantification of *Alternaria* spp. in raw and processed vegetables by real-time quantitative PCR. *Food microbiology*, 32(1), 165-171.
241. Percival, J. (1921). The wheat plant, A monograph, Duckworth and Co., London
242. Perelló, A. & Mónaco, C. (2007). Status and Progress of Biological Control of Wheat (*Triticum aestivum* L.) Foliar Diseases in Argentina, *Fitosanidan*, 11 (2), 85-105.
243. Perelló, A. E., & Larran, S. (2013). Nature and effect of *Alternaria* spp. complex from wheat grain on germination and disease transmission. *Pakistan Journal of Botany*, 45(5), 1817-1824.
244. Perelló, A., & Sisterna, M. (2008). Formation of *Lewia infectoria*, the teleomorph of *Alternaria infectoria*, on wheat in Argentina. *Australasian Plant Pathology*, 37(6), 589-591.
245. Perelló, A., Cordo, C., & Simon, M. R. (1996). A new disease of wheat caused by *Alternaria triticimaculans* in Argentina. *Agronomie*, 16(2), 107-112.
246. Piergiovanni, A. R., Rizzi, R., Pannacciulli, E., & Gatta, C. D. (1997). Mineral composition in hulled wheat grains: a comparison between emmer (*Triticum dicoccon* Schrank) and spelt (*T. spelta* L.) accessions. *International journal of food sciences and nutrition*, 48(6), 381-386.
247. Pitt, J. I. & Hocking, A.D. (1985). Fungi and Food Spoilage. CSIRO Division of Food Research, Sydney, Academic press, 1- 414.
248. Polizzotto, R., Andersen, B., Martini, M., Grisan, S., Assante, G., & Musetti, R. (2012). A polyphasic approach for the characterization of endophytic *Alternaria* strains isolated from grapevines. *Journal of microbiological methods*, 88(1), 162-171.
249. Portman, M.L (1991). Hildegard von Bingen, Heilkraft der Natur 'Physica'. Dinkel Pattloch Verlag, p. 45. Augsburg, Germany
250. Pose, G., Patriarca, A., Kyanko, V., Pardo, A., Fernández Pinto, V. (2010). Water activity and temperature effects on mycotoxin production by *Alternaria alternata* on a synthetic tomato medium. *International Journal of Food Microbiology*, 142, 348-353.
251. Prange, A., Birzele, B., Krämer, J., Meier, A., Modrow, H., & Köhler, P. (2005). Fusarium-inoculated wheat: deoxynivalenol contents and baking quality in relation to infection time. *Food Control*, 16(8), 739-745

252. Prange, A., Birzele, B., Krämer, J., Meier, A., Modrow, H., & Köhler, P. (2005). *Fusarium* inoculated wheat: deoxynivalenol contents and baking quality in relation to infection time. *Food Control*, 16(8), 739-745.
253. Prasada, R. & Prabhu, A. S. (1962). Leaf blight of wheat caused by new species of *Alternaria tritricina*. *Indian Phytopat.*, 15, 292-293.
254. Pravilnik o metodama fizičkih i hemijskih analiza za kontrolu kvaliteta žita, mlinskih i pekarskih proizvoda, testenina i brzo smrznutih testa (1988). Službeni list SFRJ" br.74/1988
255. Prella, A., Spadaro, D., Garibaldi, A., & Gullino, M. L. (2013). A new method for detection of five *Alternaria* toxins in food matrices based on LC-APCI-MS. *Food chemistry*, 140(1), 161-167.
256. Prescott, J.M., P.A. Burnett, E. Saari, J. Ransom, J. Bowman, W. de. Milliano, R.P. Singh and G. Bekele. (1986). Wheat diseases and pests: A Guide for field identification. Mexico, D.F: CIMMYT. 135.
257. Pruska-Kedzior, A., Kedzior, Z., & Klockiewicz-Kaminska, E. (2008). Comparison of viscoelastic properties of gluten from spelt and common wheat. *European Food Research and Technology*, 227(1), 199-207.
258. Pryor, B. M. & Michailides, T. J. (2002). Morphological, pathogenic, and molecular characterization of *Alternaria* isolates associated with *Alternaria* late blight of pistachio. *Phytopathology*, 92 (4), 406-416.
259. Pryor, B. (2011). *Alternaria* online, University of Arizona. <http://ag.arizona.edu/PLP/alternaria/online/>
260. Pryor, B. M., & Gilbertson, R. L. (2002). Relationships and taxonomic status of *Alternaria radicina*, *A. carotiincultae*, and *A. petroselini* based upon morphological, biochemical, and molecular characteristics. *Mycologia*, 94(1), 49-61.
261. Lawley, R. (2010). *Alternaria*, Factsheet, European Mycotoxin Awareness Network (EMAN) <http://www.mycotoxins.org>.
262. Rajković, S., Miletić, N., Veljković, I., Šuljagić, V. i Milošević, D. (1999). Neke od mogućnosti zaštite krompira i paradajza od plamenjače i crne pegavosti. *IV jugoslovensko savetovanje o zaštiti bilja*, Zlatibor, 06-10. decembar 1999. godine, 82a.
263. Rajput, M. A., Pathan, M. A., Lodhi, A. M., Shah, G. S., & Khanzada, K. A. (2005). Studies on seed-borne fungi of wheat in Sindh Province and their effect on seed germination. *Pakistan Journal of Botany*, 37, 181-185.

264. Ranhotra, G. S., Gelroth, J. A., Glaser, B. K., & Lorenz, K. J. (1995). Baking and nutritional qualities of a spelt wheat sample. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1), 118-122.
265. Ranhotra, G. S., Gelroth, J. A., Glaser, B. K., & Lorenz, K. J. (1996). Nutrient composition of spelt wheat. *Journal of Food Composition and Analysis*, 9(1), 81-84.
266. Rees, R. G., Martin, D. J., & Law, D. P. (1984). Black point in bread wheat: effects on quality and germination, and fungal associations. *Animal Production Science*, 24(127), 601-605.
267. Rekanović, E., Todorović, B., Tanović, B., Milijašević, S., Stević, M. (2004). Efikasnost nove kombinacije fungicida u suzbijanju *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary i *Alternaria solani* Sorauer u usevu krompira i paradajza. *Pesticidi i fitomedicina*, 19 (4), 241-249.
268. Reuveni, M., Sheglov, D., Sheglov, N., Ben-Arie, R., & Prusky, D. (2002). Sensitivity of Red Delicious apple fruit at various phenologic stages to infection by *Alternaria alternata* and moldy-core control. *European journal of plant pathology*, 108 (5), 421-427.
269. Riesen, T. H., Winzeler, H., Rüeegger, A., & Fried, P. M. (1986). The effect of glumes on fungal infection of germinating seed of spelt (*Triticum spelta* L.) in comparison to wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Phytopathology*, 115 (4), 318-324.
270. Robertson, A. R. (1977). The CIE 1976 Color-Difference Formulae. *Color Research & Application*, 2 (1), 7-11.
271. Rotem, J. (1994): The genus *Alternaria*, Biology, Epidemiology and Pathogenicity. APS Press, St Paul, Minnesota, 1-325.
272. Rüeegger, A., & Winzeler, H. (1993). Performance of spelt (*Triticum spelta* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) at two different seeding rates and nitrogen levels under contrasting environmental conditions. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 170(5), 289-295.
273. Ruibal-Mendieta, N. L., Delacroix, D. L., & Meurens, M. (2002). A comparative analysis of free, bound and total lipid content on spelt and winter wheat wholemeal. *Journal of cereal science*, 35(3), 337-342.
274. Ruibal-Mendieta, N. L., Delacroix, D. L., Mignolet, E., Pycke, J. M., Marques, C., Rozenberg, R., ... & Larondelle, Y. (2005). Spelt (*Triticum aestivum* ssp. *spelta*) as a source of breadmaking flours and bran naturally enriched in oleic acid and minerals but not phytic acid. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53 (7), 2751-2759.
275. Salamini, F., Ozkan, H., Brandolini, A., Schafer-Pregl, R., Martin, W. (2002). Genetics and geography of wild cereal domestication in the Near East. *Nature Rev Genet*, 3, 429-441.

276. Schmidt-Heydt, M., Rüfer, C., Raupp, F., Bruchmann, A., Perrone, G., & Geisen, R. (2011). Influence of light on food relevant fungi with emphasis on ochratoxin producing species. *International journal of food microbiology*, 145 (1), 229-237.
277. Schober, T. J., Bean, S. R., & Kuhn, M. (2006). Gluten proteins from spelt (*Triticum aestivum* ssp. *spelta*) cultivars: A rheological and size-exclusion high-performance liquid chromatography study. *Journal of Cereal Science*, 44(2), 161-173.
278. Schober, T. J., Clarke, C. I., & Kuhn, M. (2002). Characterization of Functional Properties of Gluten Proteins in Spelt Cultivars Using Rheological and Quality Factor Measurements 1. *Cereal Chemistry*, 79 (3), 408-417.
279. Schrader, T. J., Cherry, W., Soper, K., Langlois, I., & Vijay, H. M. (2001). Examination of *Alternaria alternata* mutagenicity and effects of nitrosylation using the Ames Salmonella test. *Teratogenesis, carcinogenesis, and mutagenesis*, 21 (4), 261-274.
280. Schwarz, C., Kreutzer, M., & Marko, D. (2012). Minor contribution of alternariol, alternariol monomethyl ether and tenuazonic acid to the genotoxic properties of extracts from *Alternaria alternata* infested rice. *Toxicology letters*, 214 (1), 46-52.
281. Schwarz, C., Tiessen, C., Kreutzer, M., Stark, T., Hofmann, T., & Marko, D. (2012). Characterization of a genotoxic impact compound in *Alternaria alternata* infested rice as Altertoxin II. *Archives of toxicology*, 86 (12), 1911-1925.
282. Scott, P. (2001). Analysis of Agricultural Commodities and Foods for *Alternaria* Mycotoxins, *Journal of AOAC International*, 84 (6), 1809-1817.
283. Scott, P. M., & Chełkowski, J. (1991). Possibilities of reduction or elimination of mycotoxins present in cereal grains. *Cereal grain: mycotoxins, fungi and quality in drying and storage*, 529-572.
284. Serdani, M., Kang, J. C., Andersen, B., & Crous, P. W. (2002). Characterisation of *Alternaria* species-groups associated with core rot of apples in South Africa. *Mycological research*, 106 (05), 561-569.
285. Siegel, D., Feist, M., Proske, M., Koch, M., Nehls, I. (2010). Degradation of the *Alternaria* mycotoxins alternariol, alternariol monomethyl ether, and altenuene upon bread baking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 9622-9630.
286. Siegel, D., Rasenko, T., Koch, M., & Nehls, I. (2009). Determination of the *Alternaria* mycotoxin tenuazonic acid in cereals by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization ion-trap multistage mass spectrometry after derivatization with 2, 4-dinitrophenylhydrazine. *Journal of Chromatography A*, 1216 (21), 4582-4588.

287. Simić, A., Ristić, M., Soković, M., Marin, P., Vukojević, J. (2001). Antifungalna aktivnost etarskog ulja *Valeriana officinalis* L. *Lekovite sirovine*, 21, 121-124.
288. Simmons, E. (2007). *Alternaria*. An Identification Manual. Utrecht, the Netherlands: CBS Biodiversity Series 6, 1-775.
289. Simmons, E. G. (1992). *Alternaria* Taxonomy: Current Status, Viewpoint, Challenge. In *Alternaria* Biology, Plant Diseases and Metabolites, Topics in Secondary Metabolism – Volume 3, ed. by Chelkowski, J. and Visconti, A., Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, 1-35.
290. Söderhäll, K., Svensson, E. B. B. E., & Unestam, T. (1978). Light inhibits the production of alternariol and alternariol monomethyl ether in *Alternaria alternata*. *Applied and environmental microbiology*, 36(5), 655-657.
291. Soković, M., Marin, P., Vukojević, J., Ristić, M., Glamočlija, J., Ćirić, A. (2007). Hemijski sastav etarskog ulja *Hyssopus officinalis* L. i antifungalna aktivnost. *Lekovite sirovine*, 26-27, 41-50
292. Solarska, E., Kuzdralski, A., & Marzec, M. (2012). Toxigenic fungi and mycotoxins in organic spelt and its products. *J Agric Sci Technol A*, 2, 168-177.
293. Somma, S., Pose, G., Pardo, A., Mulè, G., Pinto, V. F., Moretti, A., & Logrieco, A. F. (2011). AFLP variability, toxin production, and pathogenicity of *Alternaria* species from Argentinean tomato fruits and puree. *International journal of food microbiology*, 145 (2), 414-419.
294. Stalenga, J., & Jończyk, K. (2005). Usefulness of some winter wheat varieties for cultivation in organic farming. In ISO FAR Proceedings of the Conference „Researching Sustainable Systems“, 15th IFOAM Organic World Congress, 21-23.09., Adelaide, Australia, 571-575.
295. Stallknecht, G. F., Gilbertson, K. M., & Ranney, J. E. (1996). Alternative wheat cereals as food grains: Einkorn, emmer, spelt, kamut, and triticale. *Progress in new crops*, 156-70.
296. Stanojev, Z. N., Bagi, F. F., Bodroža-Solarov, M. I., Stojšin, V. B., Vučković, J. N., Budakov, D. B., & Bodoči, K. S. (2013). Mycobiota of Serbian wheat grain in 2010. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*, (124), 145-152.
297. Statistisches Bundesamt Deutschland (2008). <http://www.destatis.de>
298. StatSoft, Inc. (2012). STATISTICA (data analysis software system), version 12. www.statsoft.com.
299. St-Germain, G., Summerbell, R. (1996). Identifying filamentous fungi: a clinical laboratory handbook (English edition). Belmont, CA: Star Publishing

300. Stojanović, S. (2004). Poljoprivredna fitopatologija, Srpsko biološko društvo "Stevan Jakovljević", Kragujevac
301. Stojšin, V., Marić, A., Jasnić, S., Bagi, F., Marinković, B. (2006). Root of sugarbeet in the Vojvodina Province, *Zbornik matice srpske za prirodne nauke*, 110, 65-74.
302. Strange, R. N. (2007). Phytotoxins produced by microbial plant pathogens. *Natural product reports*, 24 (1), 127-144.
303. Suchowilska, E., & Wiwart, M. (2006). Multivariate analysis of image descriptors of common wheat (*Triticum aestivum*) and spelt (*T. spelta*) grain infected by *Fusarium culmorum*. *International agrophysics*, 20 (4), 345.
304. Suchowilska, E., Kandler, W., Sulyok, M., Wiwart, M., & Krska, R. (2010). Mycotoxin profiles in the grain of *Triticum monococcum*, *Triticum dicoccum* and *Triticum spelta* after head infection with *Fusarium culmorum*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90 (4), 556-565.
305. Sun, Q., Wei, Y., Ni, Z., Xie, C., & Yang, T. (2002). Microsatellite marker for yellow rust resistance gene Yr5 in wheat introgressed from spelt wheat. *Plant Breeding*, 121(6), 539-541.
306. Swart, A. E., & Holz, G. (1994). Colonization of table grape bunches by *Alternaria alternata* and rot of cold-stored grapes. *South African Journal for Enology and Viticulture*, 15, 19-19.
307. Šarić, M. D., Stojanović, T. V., Škrinjar, M. M., & Menkovska, M. M. (2008). Effects of moulds on the safety and processing quality of *Triticum aestivum*. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*, (114), 105-114.
308. Šarić, M., Škrinjar, M., Dimić, G., Filipović N., Rašić J. (1997). Changes in hygienic and technological wheat quality caused by mould infection, *Acta Alimentaria*, 26, 255-269.
309. Škrabanja, V., Kovac, B., Golob, T., Liljeberg Elmståhl, H. G., Björck, I. M., & Kreft, I. (2001). Effect of spelt wheat flour and kernel on bread composition and nutritional characteristics. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(1), 497-500.
310. Šmit-Klokočar, Z., Indić, D., Belić, S., Mitar, M., Petrov, M. (2001). Biološki efekat pesticida u zavisnosti od kvaliteta vode u suspenzijama za zaštitu povrća, *Savremena poljoprivreda*, 50, 193-198.
311. Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution*, 28 (10), 2731-2739.

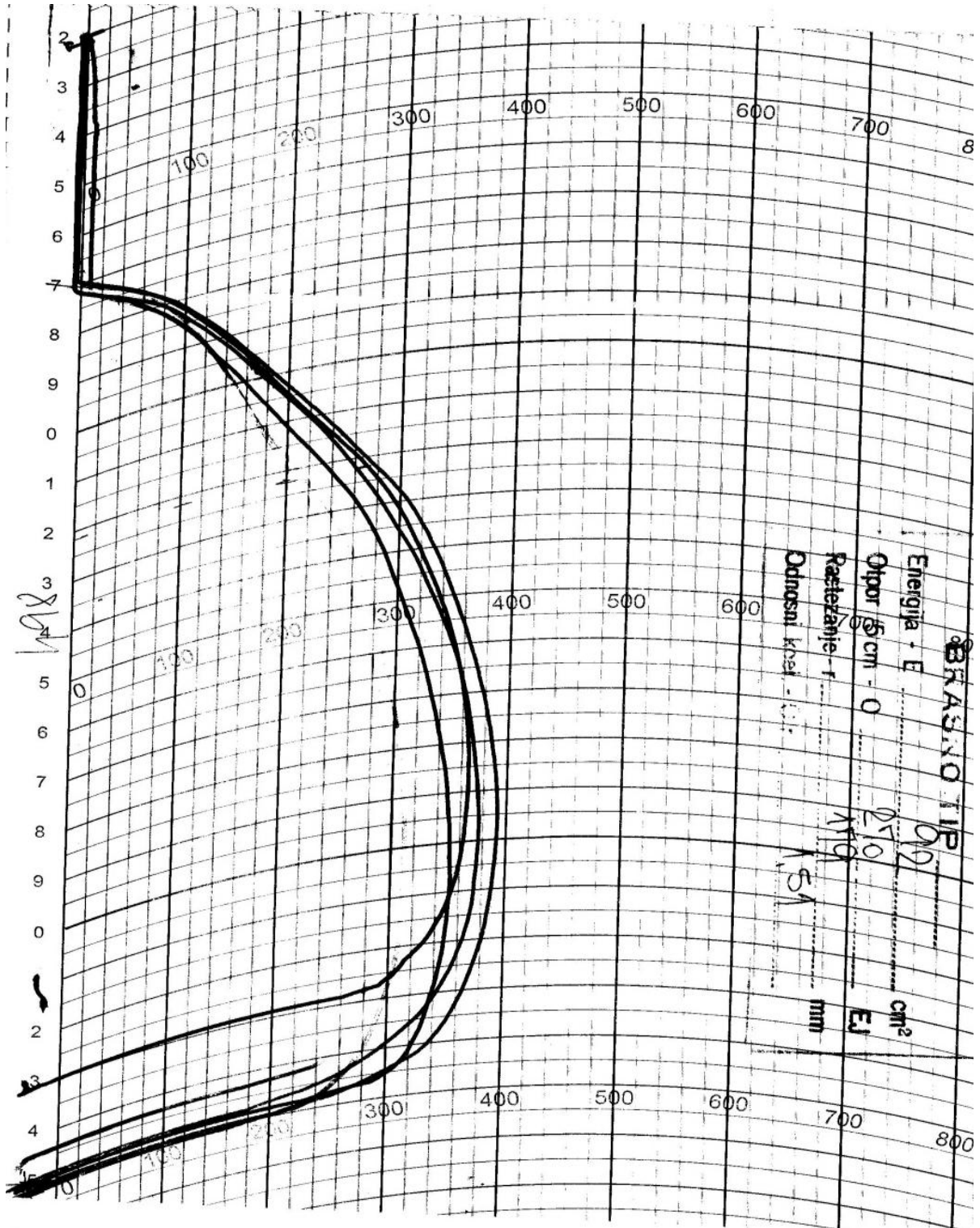
312. Thomma B (2003): *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite, *Molecular Plant Pathology*, 4 (4), 226-236.
313. Tóth, B., Csósz, M., Szabó-Hevér, Á., Simmons, E. G., Samson, R. A., & Varga, J. (2011). *Alternaria hungarica* sp. nov., a minor foliar pathogen of wheat in Hungary. *Mycologia*, 103 (1), 94-100.
314. Tournas, V. H., & Katsoudas, E. (2005). Mould and yeast flora in fresh berries, grapes and citrus fruits. *International journal of food microbiology*, 105 (1), 11-17.
315. Troccoli, A., & Codianni, P. (2005). Appropriate seeding rate for einkorn, emmer, and spelt grown under rainfed condition in southern Italy. *European journal of agronomy*, 22(3), 293-300.
316. Tyagi M, Kayastha A, Sinha B (2000): The Role of Peroxidase and Polyphenol Oxidase Isozymes in Wheat Resistance to *Alternaria triticina*. *Biologia Plantarum*, 43 (4), 559-562.
317. Tyagi M, Kayastha A, Sinha B (2001): Induction of chitinase and B-1,3-glucanase in resistant and susceptible wheat lines following infection with *Alternaria triticina*. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 10 (1), 71-74.
318. Udayashankar, A. C., Nayaka, S. C., Archana, B., Anjana, G., Niranjana, S. R., Mortensen, C. N., ... & Prakash, H. S. (2012). Specific PCR-based detection of *Alternaria helianthi*: the cause of blight and leaf spot in sunflower. *Archives of microbiology*, 194 (11), 923-932.
319. Ugrešević, V., Filipović, V., Glamočlija, Đ., Jovanović, B. (2010). Organsko seme - proizvodnja i sertifikacija na oglednom polju Instituta "Tamiš" Pančevo. *Selekcija i semenarstvo*, 16 (1), 55-62.
320. Ugrešević, V. (2013): Uticaj vremena setve i gustine useva na ontogenezu, prinos i kvalitet zrna krupnika (*Triticum spelta* L.). Beograd: Poljoprivredni fakultet, doktorska disertacija.
321. Ugrešević, V., Glamočlija, Đ., Filipović, V., & Vučković, J. (2012). Similarities and differences between hulled and dehulled kernels of spelt wheat (*Triticum spelta* L.). *Selekcija i semenarstvo*, 18 (2), 51-59.
322. USDA ARS Fungal Database. <http://nt.arsgrin.gov/fungaldatabases/>
323. Visconti, A., Logrieco, A., & Bottalico, A. (1986). Natural occurrence of *Alternaria* mycotoxins in olives—their production and possible transfer into the oil. *Food Additives & Contaminants*, 3 (4), 323-330.
324. von Büren, M., Stadler, M., & Lüthy, J. (2001). Detection of wheat adulteration of spelt flour and products by PCR. *European Food Research and Technology*, 212 (2), 234-239.

325. Vučković, J., Bagi, F., Bodroža-Solarov, M., Stojšin, V., Budakov, D., Ugrenović, V., & Aćimović, M. (2012). *Alternaria* spp. on spelt kernels (*Triticum aestivum* ssp. *spelta*). *Plant Doctor*, 1, 50-55.
326. Vukoje, V., Psodorov, Đ., & Živković, J. (2013). Profitability Of Production Of Pasta From Spelt Flour. *Economics of Agriculture*, 60 (2), 265-275.
327. Wachowska, U. (2012). Health of Spelt Wheat (*Triticum spelta*) Cultivated in Ecological and Conventional Systems. *Acta fytotechnica et zootechnica (online)*, roč. 15, 2012, č. *Mimoriadne-Special*, 72-75.
328. Wang, T., Zhao, J., Sun, P., & Wu, X. (2014). Characterization of *Alternaria* species associated with leaf blight of sunflower in China. *European Journal of Plant Pathology*, 140 (2), 301-315.
329. Wang, Y., Peng, H., Liu, G., Xie, C., Ni, Z., Yang, T., ... & Sun, Q. (2010). Identification and molecular mapping of a leaf rust resistance gene in spelt wheat landrace Altgold. *Euphytica*, 174 (3), 371-375.
330. Webley, D.J., Jackson, K.L., Mullins, J.D., Hocking, A.D., Pit, J.I. (1997). *Alternaria* toxins in weather damaged wheat and sorghum in the 1995-1996 Australian harvest, *Australian Journal of Agricultural Research*, 48, 1249-1255.
331. White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, In: Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J., Eds, PCR Protocols. Academic Press, San Diego, California, 315-322.
332. Wilson, J. D., Bechtel, D. B., Wilson, G. W. T., & Seib, P. A. (2008). Bread Quality of Spelt Wheat and Its Starch 1. *Cereal chemistry*, 85 (5), 629-638.
333. Wiwart, M., Kandler, W., Perkowski, J., Berthiller, F., Preinerstorfer, B., Suchowilska, E., ... & Krska, R. (2009). Concentrations of some metabolites produced by fungi of the genus *Fusarium* and selected elements in spring spelt grain. *Cereal chemistry*, 86 (1), 52-60.
334. Wiwart, M., Perkowski, J., Budzyński, W., Suchowilska, E., Buśko, M., & Matysiak, A. (2011). Concentrations of ergosterol and trichothecenes in the grains of three *Triticum* species. *Czech J Food Sci*, 29 (4), 430-440.
335. Woudenberg, J. H. C., Groenewald, J. Z., Binder, M., & Crous, P. W. (2013). *Alternaria* redefined. *Studies in mycology*, 75, 171-212.
336. Wyatt, D.R. (2005). (Ed), *The Mycotoxin Blue Book: Mycotoxin Interactions*, Nottingham University Press, Nottingham, 269-278.
337. Zheng, H. H., Zhao, J., Wang, T. Y., & Wu, X. H. (2014). Characterization of *Alternaria* species associated with potato foliar diseases in China. *Plant Pathology*, 64 (2), 425-433.

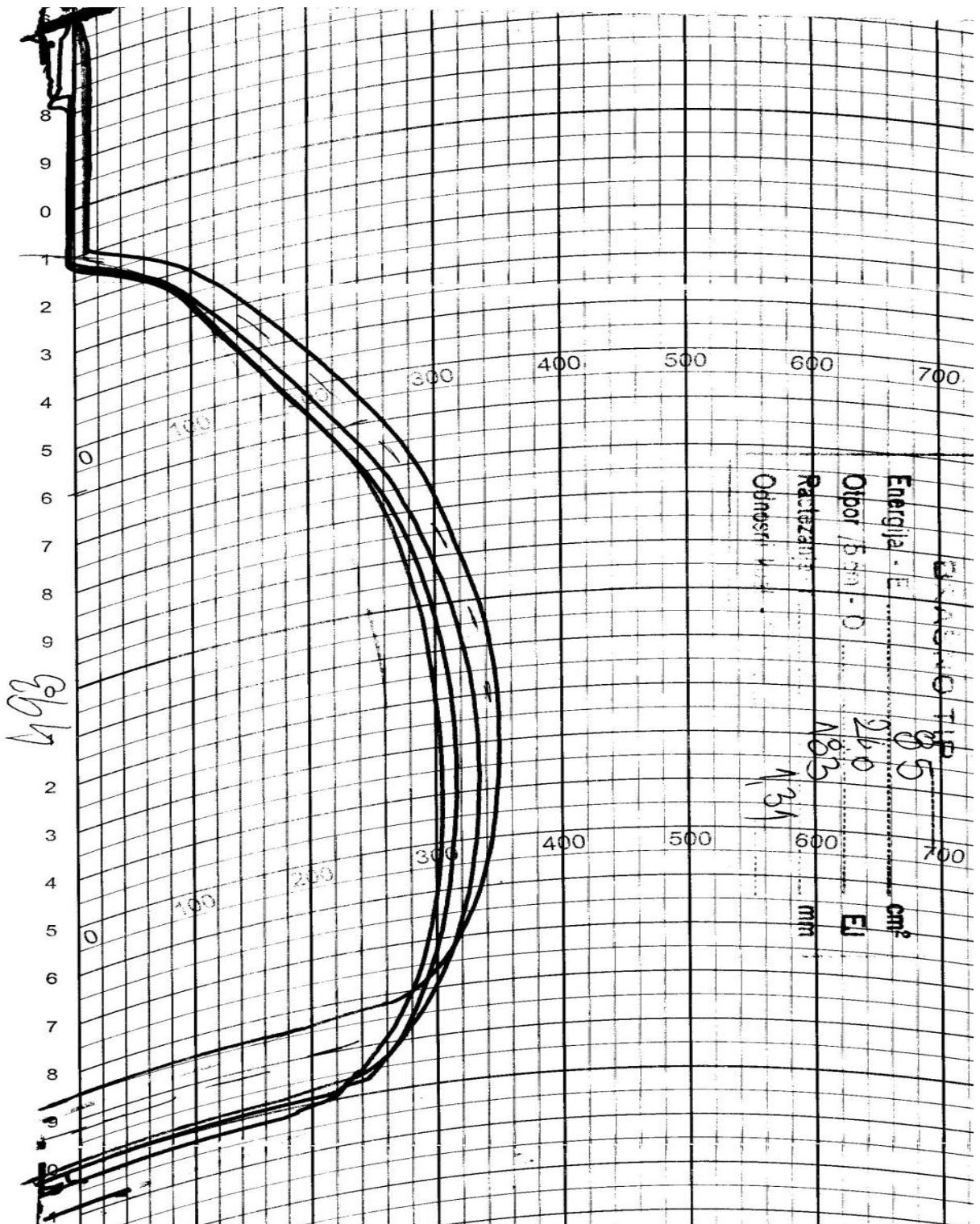
338. Zhou, B., & Qiang, S. (2008). Environmental, genetic and cellular toxicity of tenuazonic acid isolated from *Alternaria alternata*. *African Journal of Biotechnology*, 7(8).
339. Zieliński, H., Ceglińska, A., & Michalska, A. (2008). Bioactive compounds in spelt bread. *European Food Research and Technology*, 226(3), 537-544.
340. Zörb, C., Betsche, T., Langenkämper, G., Zapp, J., & Seifert, M. (2012). Free sugars in spelt wholemeal and flour. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 81 (2), 172-174.
341. Zur, G., Shimoni, E., Hallerman, E., & Kashi, Y. (2002). Detection of *Alternaria* fungal contamination in cereal grains by a polymerase chain reaction-based assay. *Journal of Food Protection®*, 65 (9), 1433-1440.
342. Žeželj, M. (1995). Tehnologija žita i brašna, Knjiga I, Poznavanje čuvanje i prerada žita. Novi Sad, SRJ: Tehnološki fakultet u Novom Sadu, Zavod za tehnologiju žita i brašna,1-3.

8. PRILOZI

Prilog 1. Ekstenzogram za genotip Nirvana-tretman fungicidom



Prilog 2. Ekstenzogram za genotip Nirvana-inokulisan *Alternaria* spp.



Prilog 3. Miksolab grafikon za genotip Nirvana-tretman fungicidom

Date : 12/18/2013 Hour : 12:56

Sample :

Water absorption : 51.1 % base 14% (b14)

moisture content : 12.5 %

Index: 1-41-388

Protocol : Chopin+

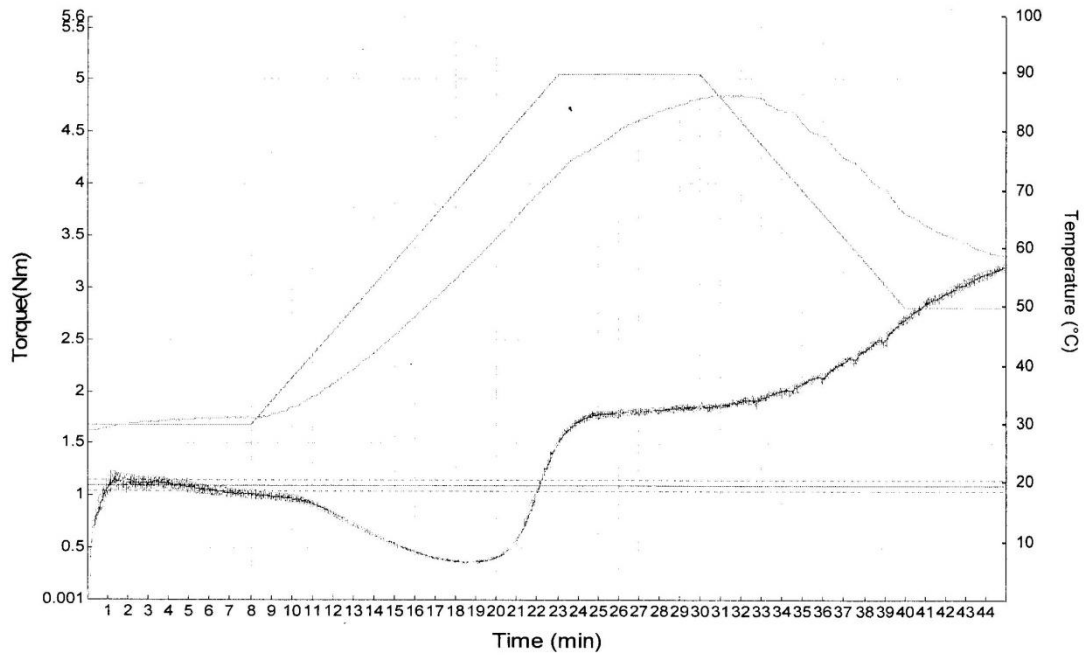
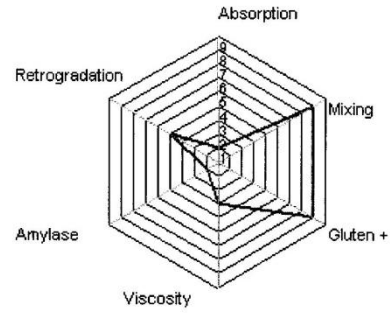
Dough weight : 75.0 g

Tank temperature : 30.0 °C

Mixing speed : 80 rpm

α :	-0.098	Nm/min
β :	0.238	Nm/min
γ :	0.028	Nm/min

	Time (min)	Torque (Nm)	temp. Dough(°C)	Amplitude (Nm)	Stability (min)
C1	1.75	1.14	30.0	0.15	8.70
C2	18.67	0.36	57.3		
C3	23.00	1.49	73.1		
C4	30.00	1.86	85.9		
C5	45.03	3.19	58.6		



Prilog 4. Miksolab grafikon za genotip Nirvana-inokulisan *Alternaria* spp.

Date : 12/18/2013 Hour : 14:02

Sample :

Water absorption : 52.0 % base 14% (b14)

moisture content : 12.4 %

Index: 1-21-278

Protocol : Chopin+

Dough weight : 75.0 g

Tank temperature : 30.0 °C

Mixing speed : 80 rpm

α :	-0.092	Nm/min
β :	0.294	Nm/min
γ :	0.008	Nm/min

	Time (min)	Torque (Nm)	temp. Dough(°C)	Amplitude (Nm)	Stability (min)
C1	2.70	1.10	30.6	0.12	5.63
C2	17.97	0.32	57.0		
C3	23.00	1.46	75.6		
C4	30.00	1.70	86.8		
C5	45.05	3.01	56.8		

