

UNIVERZITET U BEOGRADU  
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Ana M. Obradović, dipl. inž.

**DIVERZITET KOMPLEKSA VRSTE  
*Fusarium graminearum* PATOGENA  
STRNIH ŽITA I KUKURUZA U SRBIJI**

Doktorska disertacija

Beograd, 2017

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF AGRICULTURE

Ana M. Obradović, BSc.

**DIVERSITY OF THE *Fusarium*  
*graminearum* SPECIES COMPLEX A  
PATHOGEN OF SMALL GRAINS AND  
MAIZE IN SERBIA**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2017

Poljoprivredni fakultet – Beograd

Mentor: dr Goran Delibašić, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet

Drugi mentor: dr Slavica Stanković, naučni savetnik  
Institut za kukuruz Zemun Polje, Beograd

Članovi komisije: dr Aleksandra Bulajić, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet

dr Ana Nikolić, naučni saradnik  
Institut za kukuruz Zemun Polje, Beograd

dr Dragana Ignjatović-Mićić, naučni savetnik  
Institut za kukuruz Zemun Polje, Beograd

Datum odbrane:

*Zahvaljujem se Institutu za kukuruz Zemun Polje na materijalnoj i tehničkoj podršci prilikom izrade ove doktorske disertacije, a koja je deo projekta“ Redukcija toksigenih gljiva roda Fusarium i njihovih mikotoksina u proizvodnji zdravstveno bezbedne hrane na bazi žita“ finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, a čiji je rukovodilac dr Slavica Stanković.*

*Posebnu zahvalnost dugujem dr Slavici Stanković na prenesenom znanju i brojnim savetima koje mi je pružila od samog početka naše saradnje. Njena neizmerna podrška, strpljenje za sva moja pitanja i razumevanje su mi puno pomogli, posebno u trenucima kada je kraj izgledao beskonačno daleko.*

*Želim da se zahvalim mentoru prof. dr Goranu Delibašiću i prof. dr Aleksandri Bulajić na korisnim savetima i sugestijama koje su doprinele poboljšanju kvaliteta izrade ove doktorske disertacije. Takođe, želela bih da se zahvalim i članovima komisije dr Ani Nikolić i dr Dragani Ignjatović-Micić na stručnoj pomoći i korisnim savetima.*

*Posebnu zahvalnost dugujem dr Jeleni Stepanović i dr Bojanu Duduk iz Instituta za pesticide i zaštitu životne sredine, čija je pomoć znatno doprinela kvalitetu ove doktorske disertacije. Zahvalnost dugujem i dr Mili Grahovac i dr Jovani Hrustić na nesebičnoj pomoći i uloženom trudu oko statističke obrade podataka. Zahvalila bih se i mast. hem., Jeleni Mesarović, dr Danijeli Ristić i dr Mariji Kostandinović, koje su pomogle u izradi ove doktorske disertacije.*

*Zahvaljujem svim kolegama iz Instituta na pomoći i razumevanju, posebno kolegama iz Laboratorije za fitopatologiju Instituta za kukuruz.*

*Hvala mojoj porodici i prijateljima na podršci, strpljenju i razumevanju.*

# DIVERZITET KOMPLEKSA VRSTE *Fusarium graminearum* PATOGENA STRNIH ŽITA I KUKURUZA U SRBIJI

## REZIME

Za proučavanje diverziteta vrste *F. graminearum* odabran je 101 izolat iz kolekcije Laboratorije za fitopatologiju Instituta za kukuruz "Zemun Polje" koji su prethodno identifikovani konvencionalnim metodama na osnovu makroskopskih i mikroskopskih svojstava. Izolati su prikupljeni u periodu od 1993. do 2015. godine, a poreklom iz uzoraka pšenice (42), kukuruza (37) i ječma (22) iz 41 lokaliteta na teritoriji Srbije. Sa ciljem da se dobije uvid o rasprostranjenosti, prisustvu i diverzitetu vrsta *Fusarium graminearum* kompleksa (*Fg*) kao i o trihotecenskim hemotipovima u Srbiji, obavljena su proučavanja morfoloških, patogenih, toksigenih i filogenetskih svojstava odabranih izolata. Na osnovu svih proučenih svojstava utvrđeno je prisustvo tri vrste u okviru *Fg* kompleksa: *Fusarium graminearum sensu stricto*, *Fusarium boothii* i *Fusarium vorosii*. Po prvi put u Srbiji, detektovano je prisustvo *F. boothii* i *F. vorosii* patogena strnih žita i kukuruza u našoj zemlji.

Na osnovu morfoloških, patogenih i toksigenih svojstava uočen je veliki diverzitet ispitivanih izolata. Rezultati analize morfoloških svojstava izolata *F. graminearum* ss, *F. boothii* i *F. vorosii*, ukazuju da ne postoje razlike među njima. Izolati vrste *F. boothii* i *F. vorosii* ispoljili su generalno slabiju patogenost u poređenju sa ostalim izolatima. Analiza potencijala produkcije mikotoksina deoksinivalenola i zearalenona ELISA i HPLC metodom ukazala je na varijabilnost između ispitivanih izolata. Određivanjem trihotecenskih hemotipova hemijskom analizom utvrđeno je da u Srbiji postoje dva hemotipa - 15ADON (dominantan) i 3ADON.

Za razliku od hemijskih, molekularnim analizama na osnovu *TRI3* i *TRII2* gena, utvrđeno je prisustvo samo 15ADON hemotipa. Dobijeni rezultati o biodiverzitetu hemotipova su prvi nalaz u agroekološkim uslovima Srbije. Analiza nukleotidnih sekvenci tri genomska regiona (*TEF-1 $\alpha$* ,  *$\beta$ -tubulin* i *histon H3*), pokazala je da postoje različiti potencijali za razdvajanje vrsta u okviru *Fg* kompleksa. Rezultati ove disertacije ukazali su na postojanje dve vrste u okviru *Fg* kompleksa (*F. boothii* i *F. vorosii*), koje do sada nisu identifikovane na teritoriji Srbije. Sekvenciranje ovih genomskih regiona odabranih izolata i njihovo poređenje sa referentnim izolatima kao i poređenje sa

izolatima *Fg* kompleksa u svetu doprinelo je boljem poznavanju biodiverziteta ovih vrsta u Srbiji.

**Ključne reči:** *Fg* kompleks, *F. boothii*, *F. vorosii*, *F. graminearum*, diverzitet, strna žita, kukuruz

**Naučna oblast:** Biotehničke nauke

**Uža naučna oblast:** Fitopatologija

**UDK:** 632.4 : 633.15 (497.11) (043.3)

## DIVERSITY OF THE *Fusarium graminearum* SPECIES COMPLEX A PATHOGEN OF SMALL GRAINS AND MAIZE IN SERBIA

### ABSTRACT

One hundred and one isolates of the *F. graminearum* species have been isolated from the collection of the Laboratory of Phytopathology of the Maize Research Institute, Zemun Polje to study the species diversity. These isolates had been previously identified using conventional methods based on macroscopic and microscopic properties. Isolates, originating from samples of wheat (42), maize (37) and barley (22), were collected from 41 locations in Serbia in the period from 1993 to 2015. In order to gain insight into the distribution, presence and diversity of the *Fusarium graminearum* species complex (*Fg*), as well as into trichothecene chemotypes in Serbia, studies of the morphological, pathogenic, toxigenic and phylogenetic properties of the selected isolates were carried out. According to all observed properties, the presence of the three following species was determined within the *Fg* complex: *Fusarium graminearum sensu stricto*, *Fusarium boothii* and *Fusarium vorosii*. *F. boothii* and *F. vorosii*, pathogens of small grains and maize in our country, were detected for the first time in Serbia.

Based on morphological, pathogenic and toxigenic properties, a great diversity of analysed isolates was observed. Results of analyses of morphological properties of the isolates of *F. graminearum* ss, *F. boothii* and *F. vorosii*, pointed out that there had been no differences among them. Isolates of *F. boothii* and *F. vorosii* species exhibited generally less pathogenicity than remaining isolates. The analysis of the potential for the production of mycotoxins deoxynivalenol and zearalenone by the ELISA and the HPLC method pointed out to the variability among analysed isolates. The determination of trichothecene chemotypes done by chemical analyses confirmed the presence of two chemotypes in Serbia- 15ADON (dominant) and 3ADON. In contrast to chemical analyses, the molecular analyses, based on the *TRI3* and *TRI2* genes, established the presence of only 15ADON chemotype. The obtained results on the biodiversity of chemotypes are the first finding under agroecological conditions of Serbia. The analysis of nucleotide sequences of the three genomic regions (*TEF-1 $\alpha$* ,  *$\beta$ -tubulin* and *histone H3*), showed the existence of different potentials for separation of species within the *Fg*

complex. The results presented in this PhD thesis point out to the existence of two species (*F. boothii* and *F. vorosii*) within the *Fg* complex, which have not yet been identified in the territory of Serbia. Sequencing these portions of the genome of the selected isolates and their comparison with the reference isolates, as well as, the comparison with the *Fg* complex isolates in the world contributed to a better knowledge of the biodiversity of these species in Serbia.

**Key words:** *Fg* complex, *F. boothii*, *F. vorosii*, *F. graminearum*, diversity, small grains, maize

**Scientific field:** Biotechnical sciences

**Narrow scientific field:** Phytopathology

**UDC:** 632.4 : 633.15 (497.11) (043.3)



---

**SADRŽAJ**

<b>1. UVOD</b>	1
<b>2. PREGLED LITERATURE</b>	4
2.1. Privredni značaj žita	4
2.1.1. Privredni značaj strnih žita	4
2.1.2. Privredni značaj kukuruza	5
2.2. Bolesti koje prouzrokuje <i>Fusarium graminearum</i>	6
2.2.1. Trulež korena, stabla i plesnivost klipa kukuruza	7
2.2.2. Fuzarioza klasa pšenice i strnih žita	9
2.3. Mikotoksini (Fuzariotoksini)	11
2.3.1. Istraživanja mikotoksina deoksinivalenola i zearalenona u Srbiji	13
2.3.2. Najvažnije grupe fuzariotoksina	15
2.3.3. Uticaj mikotoksina na živa bića	16
2.4. Varijabilnost gljive <i>Fusarium graminearum</i>	18
2.4.1. Varijabilnost morfoloških svojstava	19
2.4.2. Varijabilnost patogenih svojstava	22
2.4.3. Varijabilnost toksigenih svojstava	23
2.4.3.1. Rasprostranjenost hemotipova u svetu	24
2.5. Genetička i biogeografska varijabilnost vrsta <i>Fg</i> kompleksa	29
<b>3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b>	34
<b>4. MATERIJAL I METODE</b>	36
4.1. Dobijanje čistih kultura i njihovo čuvanje	36
4.2. Metode za proveru patogenih svojstava <i>Fusarium graminearum</i>	39
4.2.1. Test patogenosti na listu ječma	39
4.2.2. Test patogenosti na klipu kukuruza	40
4.2.3. Test patogenosti na klasu pšenice	41
4.3. Utvrđivanje varijabilnosti morfoloških svojstava <i>Fusarium graminearum</i>	42

---

4.3.1. Varijabilnost anamorfnog stadijuma	42
4.3.2. Varijabilnost teleomorfnog stadijuma	43
4.4. Utvrđivanje varijabilnosti toksigenih svojstava <i>Fusarium graminearum</i>	43
4.4.1. Određivanje potencijala produkcije mikotoksina ELISA testom	44
4.4.2. Kvalitativno i kvantitativno određivanje nivalenola i acetil-estar derivata deoksinivalenola metodom visoko efikasne tečne hromatografije sa UV detekcijom	46
4.5. Molekularne analize	48
4.5.1. Priprema izolata	48
4.5.2. Izolacija DNK	49
4.5.3. Određivanje koncentracije i proveravanje kvaliteta DNK	50
4.5.4. Molekularna detekcija gena za produkciju trihotecenskih hemotipova (3-ADON, 15-ADON i NIV)	50
4.5.5. Vizuelizacija PCR produkata	52
4.5.6. Molekularna identifikacija <i>Fusarium graminearum</i> primenom PCR reakcije	52
4.5.7. Prečišćavanje PCR produkata i sekvenciranje	54
4.5.8. Molekularna identifikacija i karakterizacija patogena	55
4.6. Statističke metode i analiza podataka	59
<b>5. REZULTATI</b>	<b>60</b>
5.1. Izolati odabrani za proučavanja	60
5.2. Varijabilnost morfoloških svojstava	61
5.2.1. Varijabilnost anamorfnog stadijuma	68
5.2.2. Varijabilnost teleomorfnog stadijuma	74
5.3. Varijabilnost patogenih svojstava	75
5.3.1. Patogenost izolata <i>Fusarium graminearum</i> na listu ječma	75
5.3.2. Patogenost izolata <i>Fusarium graminearum</i> na klipu kukuruza	80
5.3.3. Patogenost izolata <i>Fusarium graminearum</i> na klasu pšenice	87
5.4. Varijabilnost toksigenih svojstava	93
5.4.1. Potencijal produkcije izolata <i>Fusarium graminearum</i> pomoću ELISA metode	93

---

5.4.2. Određivanje hemotipova izolata <i>Fusarium graminearum</i> pomoću HPLC metode	97
5.4.3. Određivanje trihotecenskih hemotipova genetičkim analizama	104
5.5. Genetička varijabilnost izolata <i>Fusarium graminearum</i>	105
5.5.1. Molekularna identifikacija	106
5.5.2. Filogenetska analiza	114
5.6. Novootkrivene vrste u okviru <i>Fusarium graminearum</i> kompleksa	117
5.6.1. <i>Fusarium vorosii</i> (izolat 1339/2)	117
5.6.2. <i>Fusarium boothii</i> (izolati 2822 i 4135)	119
<b>6. DISKUSIJA</b>	123
6.1. Varijabilnost morfoloških svojstava izolata <i>Fusarium graminearum</i>	123
6.2. Varijabilnost patogenih svojstava izolata <i>Fusarium graminearum</i>	127
6.3. Varijabilnost toksigenih svojstava izolata <i>Fusarium graminearum</i>	129
6.3.1. Određivanje hemotipova kvalitativnom analizom	132
6.3.2. Određivanje hemotipova molekularnim analizama	133
6.4. Rasprostranjenost i značaj hemotipova	135
6.5. Molekularna identifikacija i karakterizacija vrsta <i>Fg</i> kompleksa	136
6.6. Rasprostranjenost vrsta <i>Fg</i> kompleksa	139
<b>7. ZAKLJUČAK</b>	143
<b>8. LITERATURA</b>	147
<b>BIOGRAFIJA</b>	
<b>IZJAVE</b>	

## 1. UVOD

Strna žita i kukuruz spadaju među najstarije gajene biljke. Pšenica je na prvom mestu po površinama na kojima se gaji u svetu i značaju u prehrambenoj industriji, a zatim sledi kukuruz, dok ječam zauzima peto mesto (FAO, 2014). Različiti načini upotrebe zrna i suve mase žita u ishrani ljudi i životinja, kao i u industrijskoj preradi, ukazuju na to da ona imaju veliku upotrebnu vrednost.

Strna žita i kukuruz apsolutno dominiraju u ukupnoj ratarskoj proizvodnji u Srbiji, kako po jedinici površine, tako i po ukupnom prinosu. Međutim, proizvodnju žita ugrožava veliki broj patogena među kojima se posebno ističu vrste roda *Fusarium*, koje su široko rasprostranjene u svim delovima sveta. Vrste roda *Fusarium* poznate su kao patogeni mnogih biljnih vrsta (Stanković et al., 2007). Smatra se da nema gajene ili samonikle biljke iz koje nije izolovana bar jedna ili više vrsta ovoga roda. Zbog navedenih razloga, rod *Fusarium* predstavlja najznačajniji rod u poljoprivredi čije patogene vrste inficiraju biljke i sintetišu mikotoksine. Usled velike varijabilnosti, vrste ovog roda su se odlično prilagodile različitim agroekološkim uslovima gajenja zbog čega su većinom kosmopoliti (Stanković et al., 2007c).

Vrste roda *Fusarium* poznate su kao uzročnici truleži korena, prizemnog dela stabla, truleži klipa kukuruza i šturost klasova pšenice, kao i uvenuća velikog broja biljaka. Promenom fizičko-hemijskih svojstava semena, ovi patogeni utiču na smanjenje energije klijanja semena. Iako podaci o fuzariozama biljaka postoje više od dva veka, značajnija pažnja im je posvećena tek tokom poslednjih decenija XX veka (Logrieco et al., 2002). Fuzarioze biljaka su prisutne svake godine u određenom procentu, a u godinama epidemija mogu umanjiti prinos 70-90%, naročito kada je zahvaćen klip (Stanković et al., 2012). Značaj predstavnika ovog roda ne ogleda se samo u smanjenju prinosa, već i u smanjenju kvaliteta zrna zbog njihove sposobnosti sinteze mikotoksina u inficiranim biljkama i negativnog uticaja na zdravlje ljudi i životinja.

Agroekološki uslovi u Srbiji pogodni su za razvoj patogenih i toksigenih vrsta roda *Fusarium* u širim razmerama, a najzastupljenije vrste ovoga roda na zrnu žita pripadaju sekciji *Discolor* (*Fusarium graminearum* Schwabe i *F. avenaceum* (Fr.) Sacc.) i *Liseola* (*F. verticillioides* Sheldon) (Stanković et al., 2007).

Smatra se da je *F. graminearum* jedan od najznačajnijih patogena zrna žita i industrijskih biljaka širom sveta. Jedna je od najdestruktivnih, najrasprostranjenih, ali i najranije identifikovanih vrsta ovoga roda. Štete koje pričinjava su dodatno povećane time što ova vrsta ima sposobnost sinteze više od 17 mikotoksina, od kojih su najrasprostranjeniji i najznačajniji deoksinivalenol i zearalenon (**Logrieco et al.**, 2002). Tokom protekle dve decenije, vrste u okviru *Fusarium graminearum* kompleksa (*Fg complex*) su se istakle kao jedan od najdestruktivnijih uzročnika oboljenja na žitaricama, jer mogu izazvati gubitke prinosa u vrednosti od nekoliko milijardi dolara (**Clear and Patrick**, 2000; **Windels**, 2000). U SAD-u je kao posledica ovog oboljenja zabeležen gubitak od tri milijarde dolara između 1998. i 2000. godine (**Nganje et al.**, 2001, 2002). Dobro poznavanje svih činilaca koji direktno ili indirektno utiču na razvoj oboljenja predstavlja neophodan preduslov za uspeh u sprečavanju šteta koje prouzrokuje ova patogena vrsta.

Iako je kompleksna vrsta *F. graminearum* kao patogen strnih žita i kukuruza dosta proučavana širom sveta, o njenoj distribuciji, varijabilnosti u pogledu morfoloških, fizioloških, toksikoloških, genetičkih i drugih svojstava nema dovoljno informacija u našoj zemlji. Primenom molekularnih metoda u okviru *Fg* kompleksa u svetu je do sada identifikovano 15 novih vrsta, zbog čega je ova zbirna vrsta dobila naziv *Fusarium graminearum sensu lato*. Tokom dosadašnjih istraživanja identifikovane su sledeće vrste: [1] *F. graminearum sensu stricto* [2] *F. austroamericanum*, [3] *F. meridionale*, [4] *F. boothii*, [5] *F. mesoamericanum*, [6] *F. acacie-mearnsii*, [7] *F. asiaticum*, [8] *F. cortaderie*, [9] *F. brasiliicum*, [10] *F. vorosii*, [11] *F. gerlachii*, [12] *F. aethiopicum*, [13] *F. ussurianum*, [14] *F. louisianense* i [15] *F. nepalense* (**O'Donnell et al.**, 2000, 2004, 2008; **Starkey et al.**, 2007; **Yli-Mattila et al.**, 2009; **Sarver et al.**, 2011). Vrste u okviru *Fg* kompleksa se međusobno razlikuju po biogeografskoj rasprostranjenosti (**Qu et al.**, 2008; **Sampietro et al.**, 2011; **Lee et al.**, 2009; **Desjardins et al.**, 2011), agresivnosti/ patogenosti, pripadnosti određenom hemotipu (**O'Donnell et al.**, 2008; **Ward et al.**, 2008; **Yli-Mattila et al.**, 2009; **Boutigny et al.**, 2011), potencijalu produkcije mikotoksina i filogeniji, dok su razlike u morfološkim svojstvima veoma male (**Starkey et al.**, 2007; **O'Donnell et al.**, 2008).

Poslednjih godina globalne klimatske promene izazivaju varijabilnost agroklimatskih uslova, što može doprineti sintezi viših koncentracija mikotoksina u

zrnu žita u toku vegetacije i prouzrokovati ekonomske gubitke u proizvodnji, kao i povećan rizik po zdravlje ljudi i životinja. Pomenuti razlozi, kao i činjenica da su u okruženju Srbije identifikovane nove vrste iz *Fg* kompleksa, ukazali su na potrebu kontinuiranog praćenja ovih toksigenih vrsta u proizvodnji žitarica.

## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. Privredni značaj žita

#### 2.1.1. Privredni značaj strnih žita

**Pšenica.** Osnovni značaj se ogleda u njenom korišćenju kao glavne hlebne biljke za najveći deo ljudske populacije. Pšenica se najvećim delom koristi u ljudskoj ishrani, oko 53% od ukupne proizvodnje u razvijenim i oko 85% u zemljama u razvoju (**Pena**, 2007). Takođe, upotrebljava se i za ishranu životinja, a veoma je značajna i kao industrijska sirovina u mlinsko-pekarskoj, pivskoj, farmaceutskoj, industriji skroba, peciva, keksa, kolača i slično. Pšenična slama, kao nus proizvod koji se dobija u značajnim količinama, najčešće se koristi kao prostirka za stoku, ali je prikladna i za njenu ishranu, kao i za kompostiranje, izradu hartije, celuloze, građevinskog materijala i raznih ukrasnih predmeta (slamnatih šešira i slično).

Privredno - ekonomski značaj pšenice i žitarica uopšte, ogleda se i u površinama koje zauzimaju u svetu, u ukupnoj proizvodnji zrna i učešću u svetskoj razmeni dobara (**Jaćimović**, 2012). Pšenica se gaji na više hektara nego bilo koji drugi usev i jedna je od najvažnijih izvora hranljivih materija za ljude u mnogim oblastima u svetu. Pšenica se u svetu gaji na više od 218 miliona hektara, pri čemu se postiže ukupna proizvodnja od oko 732 miliona tona, uz prosečan prinos od oko 4 t/ha (**FAO**, 2016). Najveći proizvođači pšenice u svetu su Kina, Indija, Rusija, SAD i Kanada, dok je u Evropi na prvom mestu Francuska a zatim Nemačka, Velika Britanija i Poljska.

U Srbiji se pšenica u periodu 2014-2016. godine gajila na površini od oko 596.596 hektara, sa prosečnim prinosom od 4,27 t/ha, i ukupnom godišnjom proizvodnjom od 2,3 do 2,8 miliona tona (*izvor: Republički zavod za statistiku*). Prema zvaničnim podacima, Vojvodina učestvuje sa oko 50% u površinama pod strnim žitima (**Novković i Mutavdžić**, 2010).

**Ječam.** Značaj ječma proizilazi iz njegove široke upotrebe, kako u ishrani životinja i ljudi, tako i u industriji. Za ishranu stoke koristi se kao koncentrovana ili kabasta stočna hrana (zelena biljka), u silaži i kao suvi ili vlažni pivarski trop. Ječam može da se koristi i u ishrani ljudi, dosta se troši u oljuštenom obliku sirov ili za

proizvodnju kaša i hleba. Najveći značaj ima u proizvodnji slada za pivo, viski, votku i drugo. Pored toga, sladni sirup se koristi u pekarstvu, poslastičarstvu, tekstilnoj i farmaceutskoj industriji, u proizvodnji sladnog mleka, alkohola, sirćetne kiseline i kvasca. Od oljuštenog zrna ječma, proizvodi se griz, ječmene pahuljice i surogat kafe (divka).

Od ukupne proizvodnje ječma u svetu 55% - 60% koristi se za proizvodnju stočne hrane, 30% - 40% za proizvodnju slada, 2% - 3% za ishranu ljudi i oko 5% odlazi na semenatstvo (Ullrich, 2011). U Srbiji, u poslednjih nekoliko godina oko 50% proizvodnje koristilo se za ishranu stoke, a 50% u pivarskoj industriji. Međutim, zbog niske profitabilnosti proizvodnje stočne hrane, a sve veće potražnje pivara, površine pod pivskim ječmom su u porastu (AgroChart, 2013). U periodu od 2010. do 2014. godine ječam je zauzimao peto mesto po prosečnoj površini na kojoj se gajio u svetu (50.183.974 ha), iza pšenice, kukuruza, pirinča i soje (FAO, 2014). Istu poziciju zauzimao je i po prosečnoj površini na kojoj se u periodu od 2014. do 2016. godine gajio u Srbiji (92.772 ha), sa prosečnim prinosom od 3,9 t/ha i ukupnom godišnjom proizvodnjom od oko 360.329 tona (izvor: Republički zavod za statistiku).

### 2.1.2. Privredni značaj kukuruza

Privredni značaj kukuruza proističe iz osobina same biljke, raznovrsnosti njegove upotrebe i obima proizvodnje. Kukuruz se koristi kako u ishrani domaćih životinja tako i u ishrani ljudi, kao i za industrijsku preradu. Za ishranu ljudi može se koristiti direktno zrno ili prerađeno (brašno, griz, pahuljice itd.). U ishrani životinja koriste se svi delovi biljke, a zrno predstavlja glavnu nutritivno bogatu hranu. Cela biljka koristi se za proizvodnju silaže kao veoma kvalitetna hrana u ishrani životinja. Kukuruz ima veliki privredni značaj i u industrijskoj preradi gde se može dobiti do 1500 raznih proizvoda (alkohol, skrob, ulje, pivo, celuloza, veštačke smole itd.). Veruje se da će se kukuruz usvajanjem novih tehnologija sve više koristiti u industriji (prehrambenoj, hemijskoj, farmaceutskoj, tekstilnoj itd.) (Marinković i sar., 2012).

Ipak, kukuruz ima najveći privredni značaj u ishrani domaćih životinja. U razvijenim zemljama širom sveta kukuruz se koristi u ishrani životinja 85%, a oko 15% u industrijskoj preradi i za ostale potrebe, dok se u nerazvijenim zemljama Afrike i Azije koristi čak 65-90% u ishrani ljudi. U našoj zemlji za ishranu životinja koristi se



oko 80%, a za ishranu ljudi i industrijsku preradu koristi oko 8% proizvedenog kukuruza, dok se ostatak koristi za izvoz i druge namene (**Milosavljević i sar.**, 2010).

Kukuruz u periodu 2010-2014. godine po površinama na kojima se gajio u svetu zauzima drugo mesto odmah posle pšenice i iznosi oko 180 miliona ha i ukupnom godišnjom proizvodnjom od preko milijardu tona (**FAO**, 2014). U pogledu poželjnih osobina biljke kukuruza, u prvom redu treba napomenuti njen visok genetički potencijal rodnosti koji je najveći među svim žitima. U SAD-u su zabeleženi prinosi zrna kukuruza od 25,0 t/ha, dok su iz naše proizvodne prakse poznati rekordni prinosi od 12,0 t/ha, na većim površinama, a 14,0 - 18,0 t/ha na manjim površinama i u sistemima za navodnjavanje. Kukuruz se pored visokog potencijala rodnosti odlikuje i velikim brojem genotipova koji su prilagođeni različitim agroekološkim uslovima (**Latković i sar.**, 2014).

U Srbiji se kukuruz u periodu 2014-2016. godine gajio na površini od oko 1.026.067 ha, sa prosečnim prinosom od oko 6,7 t/ha, i ukupnom godišnjom proizvodnjom od oko 6,9 miliona tona (*izvor: Republički zavod za statistiku*).

## **2.2. Bolesti koje prouzrokuje *Fusarium graminearum***

S obzirom na veliki značaj kukuruza i strnih žita u proizvodnji hrane, danas se dosta radi na stvaranju sorti i hibrida visokog genetičkog potencijala rodnosti, kao i na poboljšanju tehnologije gajenja u cilju bolje zaštite od bolesti. Međutim, poslednjih nekoliko decenija bolesti kukuruza i strnih žita nanele su velike štete smanjujući prinos i kvalitet zrna kako u merkantilnoj, tako i u semenskoj proizvodnji. Strna žita i kukuruz izloženi su napadu brojnih bolesti, a fuzarioze su jedna od najčešćih i najznačajnijih bolesti koje se javljaju na ovim biljnim vrstama. Štetno delovanje *Fusarium* vrsta pojačano je njihovom sposobnošću da stvaraju metabolite toksične za ljude i životinje. Varijabilnost populacije patogena ima bitnu ulogu u razvoju strategije oplemenjivanja biljaka. Svakako najsveobuhvatnija mera zaštite je oplemenjivanje biljaka, odnosno selekcija otpornih hibrida/sorti prema prouzrokovateljima bolesti.

### 2.2.1. Trulež korena, stabla i plesnivost klipa kukuruza

**Geografska distribucija i ekonomski značaj.** *F. graminearum* prouzrokuje najvažnije i ekonomski najznačajnije oboljenje kukuruza u svetu. Ova kosmopolitska vrsta dominantna je na žitima u oblastima sa toplijom klimom, naročito u kukuruznom pojasu SAD-a, istočne Australije, Kine i južne Evrope (Italija, Španija, Austrija, Francuska, područje bivše Jugoslavije) (Teich, 1989). Ova bolest otkrivena je na našim prostorima početkom pedesetih godina prošlog veka (Perišić, 1953). Nekoliko godina kasnije, vrsta *F. graminearum* postala je najštetniji patogen kukuruza svuda gde se ova biljka gaji.

*F. graminearum* ubraja se među najčešće izolovane vrste iz zaraženih biljaka kukuruza u Evropi (Logrieco et al., 2002). Pojava fuzarioze jačeg intenziteta zabeležena je u Austriji, kada je iz zrna kukuruza izolovano 12 vrsta roda *Fusarium*, od kojih je najčešće identifikovana vrsta *F. graminearum* (16 - 47%) (Lew et al., 2001). U Srbiji intenzitet pojave *F. graminearum* utvrđen je na zrnju kukuruza u opsegu 25-83,3% u 2006. godini, dok je u 2007. godini taj procenat bio znatno manji (do 39,3%) (Tančić, 2009). Takođe Stanković et al. (2007a), na osnovu proučavanja uzoraka zrna pšenice i kukuruza, prikupljenih neposredno pred žetvu u 2005. i 2006. godini u različitim agroekološkim uslovima u Srbiji, utvrdili su da je najveći broj uzoraka bio zaražen vrstama iz roda *Fusarium* (65,0%, odnosno 81,8%). Od ukupno 13 identifikovanih vrsta roda *Fusarium* najučestalija vrsta bila je *F. graminearum* (12,5 - 35,2%). U periodu 2008-2010. godine u Češkoj ova vrsta bila je dominantna na zrnju kukuruza (Nedelnik et al., 2012).

**Simptomi oboljenja.** *F. graminearum* može ostvariti egzogenu i endogenu infekciju semena kukuruza. Zaraženo seme ima smanjenu klijavost i energiju klijanja što utiče nepovoljno na nicanje semena. U usevima zasnovanim sa jače zaraženim semenom, seme propada pre nicanja ili dolazi do nekroze tkiva i njihovog propadanja u ranoj fazi. Sejanci kod kojih je zahvaćen veći deo tkiva dolazi do izumiranja i takvi usevi su sa smanjenim skolpom biljaka. Ukoliko biljke prežive ovu početnu fazu, one nastavljaju sa porastom, jer bolest prelazi u fazu mirovanja i biljke daju smanjeni prinos (Toit et al., 1997).

Osim na semenu kukuruza, simptomi oboljenja ispoljavaju se i na korenovom sistemu u vidu pojave ružičaste boje. Kod jačih infekcija korenov sistem zahvata

nekroza i tkivo je razoreno, zbog čega se biljke lako čupaju iz zemlje. U drugom delu vegetacije, nekoliko nedelja posle oprašivanja kukuruza, javljaju se simptomi na stablu. Na uzdužnom preseku vidi se dezorganizovana srž tamne ili crvenkaste boje, usled čega biljka gubi čvrstinu i poleže, zbog čega je mehanizovana berba kukuruza otežana ili potpuno onemogućena. Na površini stabla pojavljuju se tamne pege koje se šire od nodusa na internodije. Lišće takvih biljaka dobija sivkastu boju, a kasnije dolazi do sušenja listova (Ivanović, 2001). Na klipju i zrnu kukuruza simptomi se uočavaju u vidu pojave ružičaste micelije na vrhu ili pri osnovi klipa. Kod ranih i jačih zaraza trulež zahvata veći deo ili ceo klip, a komušina je prožeta micelijom i slepljena za klip. Sa spoljašnje strane, na komušini, patogen obrazuje ružičastu miceliju na njoj se formiraju makrokonidije, dok se u vlažnim uslovima na klipju obično formiraju peritecije. Kod kasnih i slabih zaraza može se javiti beličasta micelija između zrna na klipju, a zatim se širi na kočanku koja postaje lako lomljiva. U zavisnosti od vremena ostvarene infekcije, klipovi mogu biti potpuno ili delimično zahvaćeni. Dešava se da zrno bude kontaminirano u polju bez vidljivih simptoma zaraze. Trulež klipa dalje se razvija tokom čuvanja ukoliko su povoljni uslovi temperature i vlage, posebno ako je sadržaj vlage u zrnu veliki. Štetnost ovog oboljenja dodatno je pojačano jer patogen stvara mikotoksine koji prouzrokuju različita oboljenja kod životinja i ljudi.

Pojava bolesti jačeg intenziteta javlja se kada su biljke izložene stresu, u uslovima deficita zemljišne vlage. Takođe, utvrđeno je da se osetljivost biljaka prema truleži povećava pri korišćenju velikih količina azota, kao i u uslovima prevelike gustine biljaka (Balaž, 1982). Jačoj pojavi fuzariozne truleži stabla doprinose oštećenja od kukuruznog plamenca (*Ostrinia nubilalis*). Ranostasni hibridi kukuruza osetljiviji su na trulež klipa, dok su hibridi otporni na nedostatak vlage u isto vreme otporniji i prema truleži stabla (Ivanović, 2001).

**Ciklus razvoja patogena.** Najznačajniji način prenošenja patogena je semenom kukuruza. Pored semena, značajan izvor inokuluma predstavlja i zemljište sa zaraženim biljnim ostacima u kojima gljiva prezimljava u vidu peritecija, micelije ili hlamidospora. Do paleži klijanaca kukuruza dolazi pri temperaturi od 8°C. Značajan izvor primarnih zaraza kukuruza su peritecije u kojima se formiraju askusi sa askosporama. Peritecije sazrevaju za desetak dana pri optimalnim temperaturama od 29°C. Askospore se oslobađaju uglavnom noću kada je relativna vlažnost preko 95%, a

temperatura vazduha između 13°C i 22°C i raznose se vetrom (Caron, 2000). Kod odraslih biljaka infekcija se ostvaruje u fazi cvetanja, preko svile najčešće od vrha klipa ili kroz mehanička oštećenja od grada ili insekata. Razvoju patogena pogoduje vlažno i toplo vreme 2-3 nedelje nakon infekcije (Stanković et al., 2007a), jer je klip najosetljiviji početkom svilanja, dok se sa starenjem svile osetljivost smanjuje (Reid et al., 1996). Period infekcije klipa ograničen je na jedan infektivni ciklus zbog kratkog perioda osetljivosti koji traje tokom svilanja i iznosi 10-20 dana (Teich, 1989).

Makrokonidije se formiraju na miceliji koja se razvija na zaraženim biljnim ostacima pri povoljnim uslovima temperature i vlage i mogu biti značajne za širenje infekcije kukuruza. Za obrazovanje makrokonidija potrebne su nešto više temperature nego za obrazovanje peritecija i askospora. Optimalne temperature za njihovo formiranje su od 28°C do 32°C. Osim toga, za obrazovanje makrokonidija neophodni su i vlažni uslovi sredine. Makrokonidije se uglavnom raznose vetrom mada mogu i kišom koja ih spira (Caron, 2000).

### 2.2.2. Fuzarioza klasa pšenice i strnih žita

**Geografska distribucija i ekonomski značaj.** Pojavu fuzarioze klasa pšenice prvi put je opisao Smith 1884. godine u Engleskoj (Parry et al., 1995), a u SAD-u opisali su je Chester 1890. i Arthur 1891. godine (Adams, 1921). Veći broj vrsta roda *Fusarium* mogu prouzrokovati fuzariozu klasa, a među njima je najznačajnija vrsta *F. graminearum* (Sutton, 1982; Wiese, 1987; Parry, 1995), čija je pojava u direktnoj korelaciji sa temperaturnim uslovima. U toplijim krajevima uključujući delove SAD, Australije i centralne Evrope ova vrsta najznačajniji je prouzročivač fuzarioze klasa strnih žita. Bolest je rasprostranjena u svim delovima sveta gde se pšenica gaji, a posebno u humidnim i semihumidnim područjima gajenja. Poslednje decenije XX veka, zabeležena je intenzivna pojava fuzarioze klasa u Japanu (Ban, 1997), Rusiji (Ablova and Slusarenko, 1997), SAD-u (Windels, 2000), Belgiji (Kestemont et al., 2002), Finskoj (Yli-Mattila et al., 2002), Poljskoj (Góral et al., 2002), Češkoj (Ostrý and Ruprich, 2001) i Mađarskoj (Hornok and Toth, 2001). Epidemijske razmere fuzarioze klasa pšenice zabeležene su i u našoj zemlji 90-tih godina XX veka kada je prinos i kvalitet bio drastično smanjen, a na pojedinim parcelama žetva nije ni obavljena (Ivanović, 2001).

Ogromni ekonomski gubici zabeleženi su širom Evrope, kao i u celom svetu usled pojave jačeg intenziteta fuzarioze klasa pšenice. U SAD-u i Kanadi procenjena je šteta od tri milijarde dolara usled pojave fuzarioze klasa (*Fusarium head blight*- FHB) u periodu 1998.-2000. godine (**Windels, 2000**). Zbog učestalih pojava fuzarioze klasa pšenice proizvodnja se smanjila za čak 40% (**Wang, 1997**), što ukupno predstavlja oko 2,5 miliona tona manje proizvedene pšenice u Kini (**Dubin et al., 1997**). Zbog epidemija fuzarioze klasa pšenice u Rusiji prinos zrna je snižen 25-50%, dok je u Iranu prinos snižen čak i do 70% (**Levitin, 2000**).

**Simptomi oboljenja.** Karakteristični simptomi oboljenja koje prouzrokuje *F. graminearum* na strnim žitima uočavaju se na mladim biljkama, posle nicanja, gde dolazi do propadanja mladih biljaka i truleži korena. Ipak, najštetnija je pojava patogena na klasu. Ispoljavanje simptoma uočava se u vreme formiranja i dozrevanja zrna. Nakon infekcije na plevicama zaraženih klasova pojavljuju se mrke, vodenaste pege. Zaraženi klasovi prevremeno izumiru i dobijaju bleđu boju. Pri povoljnim vremenskim uslovima za razvoj oboljenja patogen se širi preko vretena a delovi klasa iznad zahvaćenog vretena izumiru. U zaraženim klasićima zrna se ne formiraju ili su smežurana i prožeta micelijom. Ukoliko do zaraze dođe u kasnijim fazama, zrno je manje zahvaćeno micelijom i lošijeg je kvaliteta, smanjuje se klijavost, dolazi do promena fizičko-hemijskih svojstava, kao i kontaminacije zrna mikotoksinima. Ukoliko se zaraženo seme koristi za setvu dolazi do propadanja klijanaca. U zaraženim zrnima manji je procenat proteina, a veći sadržaj pepela (**Berova and Mladenova, 1974**) što u znatnoj meri smanjuje kvalitet brašna. Posledice oboljenja se ogledaju u smanjenju prinosa i kvalitetu zrna, a osim direktnih šteta otežana je i žetva usled poleganja biljka.

**Ciklus razvoja patogena.** Kao i kod kukuruza, seme pšenice predstavlja najznačajniji način prenošenja gljive *F. graminearum*. Međutim, pored semena, ovaj patogen može prezimeti i u zemljištu na zaraženim biljnim ostacima u obliku peritecija kao i u vidu micelije sa makrokonidijama. Žetveni ostaci prethodnog useva su osnovni izvor inokuluma u zemljištu, što za posledicu može imati infekciju biljaka, palež klijanaca, trulež korena i prizemnog dela stabla (**Dill-Mackay and Jones, 2000**). Utvrđeno je da *F. graminearum* izaziva zarazu klijanaca pšenice na temperaturi od 24°C. Tokom vegetacije pšenice inokulum iz vazduha, u obliku makrokonidija ili askospora, može ostvariti infekciju klasova što za posledicu ima pojavu fuzarioze klasa.

Primarnu infekciju pšenice ostvaruju askospore iz zemljišta ili iz zaraženih biljnih ostataka, dok makrokonidije formirane na cvetovima i klasu mogu da prouzrokuju sekundarne infekcije. Smatra se da je vetar kod pšenice jedan od glavnih činilaca prenošenja askospora i inokuluma na veću udaljenost (**Parry et al., 1995; Gilbert and Tekauz, 2000**). Takođe, kiša je još jedan faktor koji igra važnu ulogu u prenošenju inokuluma, naročito makrokonidija (**Parry et al., 1995; Fernando et al., 2000; Hörberg, 2002**).

Ostvarenju infekcije i razvoju bolesti pogoduju visoke temperature, česte padavine i visoka vlažnost vazduha (**Lacey et al., 1999**). Padavine imaju najveći uticaj na rasejavanje i klijanje spora. Vlažan period od najmanje 24h i temperature iznad 15°C potrebne su za značajnu infekciju klasa pšenice (**Doohan et al., 2003**). U periodu cvetanja biljaka strna žita su najosetljivija na infekciju, a osetljivost se smanjuje sa razvojem zrna. Period infekcije klasa jako je ograničen i traje od pojave klasića do cvetanja. Kao i kod kukuruza, zbog kratkog perioda osetljivosti, *F. graminearum* ograničen je na samo jedan infektivni ciklus tokom vegetacije (**Bai and Shaner, 1994**).

Utvrđena je interakcija između biljke domaćina (pšenica i kukuruz) i patogena na različitim temperaturama. Do paleži klijanaca kukuruza dolazi na niskoj temperaturi (8°C) koja usporava početni razvoj biljaka (**Kabeere et al., 1997**), za razliku od paleži klijanaca pšenice, gde je optimalna temperatura za razvoj patogena znatno veća (24°C).

### **2.3. Mikotoksini (Fuzariotoksini)**

Mikotoksini su sekundarni metaboliti nekih vrsta gljiva koji se stvaraju u zaraženim ili kontaminiranim biljkama pod određenim uslovima spoljašnje sredine. Kontaminacija hrane plesnima i mikotoksinima predstavlja ogroman problem na svetskom nivou. Prema podacima FAO oko 25% proizvodnje žitarica u svetu je kontaminirano mikotoksinima (**Devegowda et al., 1998**). S obzirom da se mikotoksini u prirodi pojavljuju pojedinačno ili u kombinaciji dva ili više mikotoksina smatra se da je navedeni procenat kontaminacije žitarica mikotoksinima čak i veći. Evidentno je da plesni i mikotoksini predstavljaju ozbiljan problem (**SCOOP, 1996**), ne samo u smislu kvaliteta zrna, već i u odnosu na produktivnost i zdravlje životinja (**Mašić i sar., 2002**), kao i ispravnost namirnica animalnog porekla sa aspekta zdravlja ljudi (**Miller and**

**Trenholm**, 1994). Smatra se da su gubici izazvani kontaminacijom hrane mikotoksinima gotovo neprocenjivi (**Devegowda and Aravind**, 2002).

Pojava mikotoksina česta je u tropskim i suptropskim oblastima, zbog povoljnih uslova temperature i vlažnosti za razvoj toksigenih gljiva, kao i u nerazvijenim zemljama, zbog malih mogućnosti za sušenje i skladištenje proizvoda i niskog nivoa obrazovanja ljudi. Klimatski faktori zajedno sa brojnim fizičkim i agrotehničkim činiocima utiču na geografsko i sezonsko variranje pojave toksigenih vrsta, kao i na nivo sinteze mikotoksina.

Fuzariotoksini spadaju u grupu najčešće identifikovanih mikotoksina u hranivima. Vrste roda *Fusarium* imaju širok spektar produkcije mikotoksina, ali njihova koncentracija nije uvek proporcionala intenzitetu bolesti tipa fuzarioze (**Champeil et al.**, 2004; **Wegulo**, 2012; **Krnjaja et al.**, 2015a). Mikotoksini su po hemijskom sastavu veoma heterogene supstance koje nastaju različitim metaboličkim putevima. Identifikovano je preko 300 toksičnih metabolita gljiva, od čega 139 čine fuzariotoksini (**Logrieco et al.**, 2002; **Leslie and Summerell**, 2006). Među njima su najzastupljeniji trihoteceni [tipa A (T-2 toksin) i tipa B (deoksinivalenol-Don)], a zatim zearalenoni (ZEA), fumonizini (FB1) i drugi mikotoksini (moniliformin, bovericin, fuzaproliferin, fuzarin, itd.), koji se razlikuju po hemijskoj strukturi, mehanizmu delovanja i karakterističnim simptomima oboljenja koje prouzrokuju kod ljudi i životinja.

Različite vrste roda *Fusarium* produkuju različite mikotoksine, a isto tako jedna vrsta može proizvoditi više različitih mikotoksina koji deluju na zdravlje ljudi i životinja. Jedan od primera je vrsta *F. graminearum* koja sintetiše više od 17 vrsta mikotoksina: ZEA, DON, mono- acetildeoksinivalenol (3ADON i 15ADON), nivalenol (NIV), trihotecene tipa A, kulmorin, fuzarin C, fuzarohormanon i steroide (**Logrieco et al.**, 2002; **Leslie and Summerell**, 2006). S druge strane, toksin kao što je ZEA mogu sintetisati osim vrste *F. graminearum* i vrste *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. semitectum* i *F. sporotrichioides*.

Toksikološki profil kontaminiranog useva ne zavisi samo od dominantnih vrsta, već i od drugih vrsta koje čine taj kompleks (**Logrieco et al.**, 2003). Analizom deoksinivalenola i zearalenola u svetu uočeno je veliko variranje u koncentraciji ovih mikotoksina u znu žitarica. U Mađarskoj, **Varga et al.** (2002) ustanovili su da je u uzorcima zrna pšenice koncentracija ZEA varirala od 3,5 do 18 µg/g, dok su

koncentracije DON-a varirale od 93,7 do 903  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , sa prosečnom koncentracijom od 304,7  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . **Ittu et al.** (2004) utvrdili su da je u Rumuniji kod prirodne kontaminacije zrna pšenice 100% uzoraka sadržalo DON u opsegu od 0,097 do 5,6  $\mu\text{g}/\text{g}$  (prosečna koncentracija 1,5  $\mu\text{g}/\text{g}$ ). Uzorci zrna kukuruza bili su kontaminirani u nešto nižem procentu u odnosu na pšenicu (46,6%) sa koncentracijom DON-a od 0,05 do 160  $\mu\text{g}/\text{g}$ . Kontaminacija uzoraka zrna kukuruza sa ZEA bila je svega 13% sa maksimalnom koncentracijom od 2,5  $\mu\text{g}/\text{g}$ , dok je kontaminacija zrna pšenice bila 100% sa maksimalom koncentracijom od 0,17  $\mu\text{g}/\text{g}$ . U Poljskoj, **Tomczak et al.** (2002) uočili su visok procenat kontaminacije zrna pšenice deoksinivalenolom (do 95%), a koncentracija je varirala od 0,01 do 24,29  $\mu\text{g}/\text{g}$ . **Heier et al.** (2005) pokazali su da je koncentracija ZEA u 2001. godini u ispitivanom uzorku bila ispod limita detekcije, dok je u 2002. godini koncentracija ZEA bila do 28,7  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

### 2.3.1. Istraživanja mikotoksina deoksinivalenola i zearalenona u Srbiji

Utvrđeno je da neke toksigene vrste poreklom iz Srbije imaju visok potencijal za produkciju mikotoksina, kao i da su ovi fuzariotoksini prisutni u visokom procentu u zrnu žita u našoj zemlji (**Stanković et al.**, 2007b). Vlažnost tokom proleća i leta utiče na intenzivnu pojavu *F. graminearum* i sintezu mikotoksina DON i ZEA (**Stanković et al.**, 2007a). Prema literaturnim podacima u Srbiji, DON je proučavan najčešće na zrnu pšenice i kukuruza, dok na ječmu, soji i suncokretu postoji manje podataka.

Tokom 2004. godine na zrnu pšenice **Jajić et al.** (2008a) detektovali su prisustvo DON-a u opsegu od 630,0 do 1840,0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (prosek 1235,0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), dok su 2005. godine utvrdili više od 6 puta manje koncentracije DON-a (prosek 182,0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Međutim, proučavajući uzorke zrna pšenice prikupljene 2005. godine **Stanković et al.** (2012) uočili su daleko veće koncentracije DON-a od 52 do 3306  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (prosek 605,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). U istraživanjima **Krnjaja et al.** (2011) na zrnu pšenice prikupljene tokom 2009. godine detektovali su prosečne koncentracije DON-a od 490,0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , takođe na zrnu pšenice prikupljene 2014. godine, **Krnjaja et al.** (2015c) su uočili prosečne koncentracije DON-a 424,0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Ispitivajući uzorake zrna pšenice **Stepanić et al.** (2011) utvrdili su prisustvo DON-a u 73,2% sa prosečnom koncentracijom od 1988,1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , a **Jajić et al.** (2011) su takođe ustanovili visoko prisustvo DON-a (82,4%), čije su koncentracije bile u opsegu od 68 do 1572  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .



Analizom uzoraka zrna ječma **Stanković et al.** (2010) detektovali su prisustvo DON-a u 70% uzoraka čije su koncentracije bile u opsegu 50,0 do 3197,0 µg/kg. Međutim, **Jajić et al.** (2014) ustanovili su znatno manji opseg variranja koncentracija DON-a (118,0 µg/kg do 355,0 µg/kg).

U zrnu kukuruza u toku 2005. godine zabeležena je koncentracija DON-a od 40,0 do 2210,0 µg/kg (prosek 363,0 µg/kg), dok je u 2007. godini opseg variranja koncentracija bio značajno manji 27,0-172,0 µg/kg (prosek 58,0 µg/kg) (**Jajić et al.**, 2008a, **Jajić et al.**, 2008b). Tokom 2011. i 2014. godine u zrnu kukuruza **Krnjaja et al.** detektovali su prosečne koncentracije DON-a 128,2 µg/kg odnosno 117,83 µg/kg (**Krnjaja et al.**, 2013; **Krnjaja et al.**, 2015c). Međutim, **Jakšić et al.** (2012) su tokom 2010. godine u zrnu kukuruza uočili značajno veće koncentracije DON-a koje su varirale od 154,0 do 16528,0 µg/kg (prosek 1263,0 µg/kg). **Kos et al.** (2016) na zrnu kukuruza detektovali su prosečne koncentracije DON-a 921,1 µg/kg.

Analizom uzoraka zrna pšenice **Stanković et al.** (2007c) detektovali su prisustvo ZEA u 64,52% uzoraka čije su koncentracije bile u opsegu 37-331 µg/kg. Na zrnu pšenice prikupljene tokom 2005. godine utvrđene su prosečne koncentracije ZEA 19,7 µg/kg, dok su 2007. godine prosečne koncentracije pomenutog mikotokina bile 29,0 µg/kg (**Stanković et al.**, 2008). **Krnjaja et al.** (2011) su tokom 2009. godine na zrnu pšenice uočili prisustvo ZEA kod 10% uzoraka čije su prosečne koncentracije bile 70,0 µg/kg. U daljim istraživanjima, **Stepanić et al.** (2011) ustanovili su visok procenat (90,2%) kontaminacije mikotoksinom ZEA na pšenci koja je prikupljena tokom 2010. godine iz različitih agroekoloških uslova u Srbiji. U ovom istraživanju detektovana je prosečna koncentracija ZEA od 442,6 µg/kg, a koncentracije su varirale u rasponu 0 - 1000 µg/kg.

U zrnu kukuruza **Jakšić et al.** (2011) su tokom 2009. godine uočili kod 26,5 % uzoraka niske koncentracije ZEA prosek 2,7 µg/kg. Značajno veće prosečne koncentracije 71,8 µg/kg ZEA utvrdili su **Krnjaja et al.** (2013) u zrnu kukuruza. Takođe, **Ljubojević et al.** (2014) su kod 35,7% uzoraka detektovali prosečne koncentracije ZEA 73,3 µg/kg.

### 2.3.2. Najvažnije grupe fuzariotoksina

Trihoteceni su prirodni kontaminanti pšenice, kukuruza i drugih žita, kao i njihovih prerađevina i ujedno čine najveću grupu toksina koje sintetišu vrste roda *Fusarium*, sa više od 170 različitih hemijskih struktura (Jurić et al., 2007). Proučavanje ovih mikotoksina u Srbiji započeto je osamdesetih godina XX veka, pre svega u čistim kulturama gljiva i do sada je uočena značajna prirodna pojava trihotecena tipa A, koji je najtoksičniji u ovoj grupi. Za trihotecene tipa B, postoji malo podataka, iako su intenzivnija proučavanja DON-a započeta u drugoj polovini prve decenije XXI veka (Lević, 2008).

Zearalenon (ZEA) je mikotoksin koji je najčešći kontaminant uskladištenih proizvoda, kao što su kukuruz, pšenica, ječam, ovas, kao i drugih supstrata na kojima se razvijaju gljive iz roda *Fusarium*. Dosadašnja istraživanja u svetu pokazala su da mikotoksin ZEA može da sintetiše 18 vrsta roda *Fusarium*. Najpoznatije vrste koje sintetišu ZEA su *F. graminearum* i *F. culmorum*, mada i druge vrste roda *Fusarium* mogu sintetisati ovaj mikotoksin pod određenim uslovima (Marasas et al., 1984). U Srbiji ZEA je utvrđen u znu kukuruza, pšenice, ječma i ovsa. U agroekološkim uslovima Srbije vrste roda *Fusarium* imaju relativno visok potencijal za sintezu ZEA, posebno *F. graminearum* (Bočarov – Stančić i sar., 1996).

Poslednjih godina, zbog sve strožih zakonskih propisa u mnogim zemljama širom sveta, pažnja istraživača usmerena je na mikotoksikološke analize uzoraka žitarica i njihovih proizvoda. S obzirom na ekonomske štete koje prouzrokuje vrsta *F. graminearum* usled razvoja na žitaricama, neophodno je primeniti mere kojima bi se smanjila infekcija zrna, a samim tim i kontaminacija mikotoksinima. Međutim, zbog uslova spoljašnje sredine često je nemoguće u potpunosti sprečiti infekciju biljaka, kao i sintezu mikotoksina. Kada se jednom stvori mikotoksin, ne može se nikada u potpunosti odstraniti, zato je neophodno preduzeti preventivne mere koje će sprečiti infekciju biljaka ili je bar ublažiti i na taj način smanjiti rizik od mikotoksina na prihvatljiv nivo.

### 2.3.3. Uticaj mikotoksina na živa bića

Mikotoksini dovode do poremećaja zdravstvenog stanja kod ljudi i životinja, što prouzrokuje tzv. mikotoksikoze. Oni su podjednako toksični za ljude i životinje pa su i klinički znaci trovanja slični. Poseban uticaj na stepen štetnih i toksičnih efekata pojedinih mikotoksina ispoljava prisustvo drugih mikotoksina u hrani (Wyatt, 2005). Mikotoksini se u prirodi pojavljuju pojedinačno ili u kombinacijama dva, tri ili više sa aditivnim ili sinergičkim efektima. Promenom njihove strukture često nastaju derivati koji mogu biti znatno toksičniji od polaznog mikotoksina. Interesovanje za interakcije različitih mikotoksina poslednjih nekoliko godina je u porastu zbog boljeg razumevanja biodiverziteta mikotoksina.

**Uticaj trihotecena na životinje.** Uloga trihotecena u etiologiji mikotoksikoza životinja prvi put je dokazana u SAD-u 1971. godine kada je došlo do oboljenja i uginuća krava posle ishrane plesnivim kukuruzom (Hsu et al., 1972). Različiti klinički simptomi toksikoza prouzrokovani trihotecenima uključuju: upalu kože i rane u usnoj duplji, poremećaje varenja (povraćanje, dijareja, odbijanje hrane), krvarenje u parenhimatoznim organima, povećan broj leukocita, razaranje koštane srži i smanjen broj leukocita i drugo (Ueno, 1983; Marasas, 1984). Smatra se da trihoteceni uglavnom utiču na smanjenje prirasta životinja i imunološkog odgovora životinja i ljudi.

DON može da prouzrokuje:

- Emetički sindrom i odbijanje hrane - dovodi do promena u koštanoj srži i limfnim tkivima, kao i do odbijanja hrane, slabosti u mišićima i drhtanja, kome i na kraju smrti (Ožegović i Pepeljnjak, 1995). Kod svinja DON se brzo apsorbuje u bubrezima i jetri odakle se raspoređuje i u ostala tkiva, dok je kod preživara i živine apsorpcija ovog toksina daleko manja.
- „Akakabi byo“ ili „bolest crvenog zrna“- čija je pojava zabeležena u Japanu kao posledica 100% kontaminacije zrna pšenice i ječma vrstama *F. graminearum* i *F. sporotrichioides*, koje sintetišu DON, NIV, T-2 i ZEA (Marasas et al., 1984; Desjardinis and Hohn, 1997). Ovo oboljenje se manifestuje odbijanjem hrane, krvarenjem u želucu i crevima kod životinja.

Kada se razmatra potencijalni rizik od mikotoksina, potrebno je uzeti u obzir kontaminaciju poljoprivrednih proizvoda mikotoksinima poreklom od više vrsta roda

*Fusarium*, kao i toksigenih vrsta drugih rodova gljiva. Trihoteceni u kombinaciji sa drugim mikotoksinima imaju aditivni i sinergistički efekat.

**Uticao trihotecena na ljude.** Alimentarna toksična aleukija (ATA) kod ljudi, kao posledica ishrane fuzarioznim žitima, prvi put je zabeležena u Rusiji tokom XVIII veka. U literaturi se, kao drugi težak oblik mikotoksikoza ljudi, navodi „akakabi byo“ bolest koja je karakteristična za vlažne regione s hladnim sezonama kao što su Japan i Koreja. Klinički simptomi bolesti su povraćanje, dijareja, glavobolja i pospanost ljudi. Za ovu bolest je utvrđeno da je prouzrokovana mikotoksinima koje sintetise *F. graminearum* (Marasas et al., 1984).

**Uticao ZEA na životinje.** Kontaminirana zrna žita najčešći su izvori mikotoksikoza životinja, mada neki podaci pokazuju da i pašnjaci mogu biti kontaminirani zearalenonom (Hagler et al., 2001). Dijareja, povraćanje, odbijanje hrane, gubitak telesne mase i hemoragija su neki od efekata, osim estrogenog, koji se javljaju kao posledica konzumiranja hrane kontaminirane ZEA-om (Lončarević i sar., 1972; Mirocha et al., 1977). Sudeći prema povredama i funkcionalnim smetnjama na različitim organima miševa izgleda da ovaj fuzariotoksin ne deluje samo na seksualne organe već i na nervni sistem (Ito and Outsubo, 1997).

U mnogim slučajevima zearalenoni su združeni sa drugim toksinima vrsta roda *Fusarium* koji doprinose ispoljavanju različitih simptoma. Male koncentracije ZEA i DON-a u kombinaciji mogu prouzrokovati neplodnost, smanjeni prirast ili konverziju hrane, kao i gubitke koje je teško proceniti (Morriessey and Vesonder, 1985).

**Uticao zearalenona na ljude.** Zearalenon i njegovi derivati kao estrogeni agensi prouzrokuju prevremeni pubertet kod dece, a mogu da deluju i kao kontraceptivno sredstvo (Hagler et al., 2001). Prevremeni pubertet je zabeležen poslednje dve decenije XX veka u Italiji i Mađarskoj (Szuets et al., 1997; Sinovec i sar., 2006). Szuets et al. (1997) smatraju da je ova pojava rezultat hronične intoksikacije osetljivih osoba i zaključuju da je potrebna stroga kontrola dečije hrane na prisustvo ZEA.

## 2.4. Varijabilnost gljive *Fusarium graminearum* Schwabe

*Fusarium graminearum* Schwabe je anamorfni stadijum gljive *Giberella zeae* Schwein (Petch). Pripada carstvu *Fungi*, klasi *Chitridiomycetes*, redu *Hypocreales*, familiji *Hypocreaceae* i rodu *Giberella* (Ivanović, 2001). To je jedna od najrasprostranjenijih i najdestruktivnijih vrsta roda *Fusarium*. Prvi put je opisana početkom XIX veka za vreme epidemije fuzarioze klasa i truleži klipa kukuruza. Identifikovana je 1822. godine kao *Sphaeria zeae* (Fries), a 1838. godine reimenovana je u sadašnje ime *F. graminearum* (Schwabe). Nakon 100 godina (1936.) opisan je teleomorfni stadijum *Gibberella zeae* (Petch). Nazivi anamorfnog i teleomorfnog stadijuma gljive pretrpeli su nekoliko izmena. Teleomorfni stadijum je nazvan *G. saubnetii*, dok se anamorfni stadijum zvao *F. roseum*, a zatim *F. roseum* sp. *cerealis*, prema sistematici **Snydera i Hansena** (1945). Kasnije 1968. godine **Messiaen i Cassini** su iz pomenute vrste koja je objedinjavala *F. culmorum* i *F. avenaceum* izdvojili varijetet *F. roseum* var. *graminearum*. **Booth** je 1971. godine ovu vrstu nazvao *F. graminearum*, što je prihvaćeno u kasnijoj taksonomiji (**Nelson et al.**, 1983; **Burgess et al.**, 1988, 1994).

U okviru vrste *F. graminearum* 1966. godine utvrđene su dve grupe na osnovu simptoma koje prouzrokuju na biljkama (**McKnight et al.**, 1966), kao i na osnovu sposobnosti formiranja peritecija (**Francis and Burgess**, 1977). Grupa I prouzrokuje simptome truleži osnove stabla strnih žita, dok grupa II prouzrokuje ružičastu trulež stabla, korena i klipa kukuruza, kao i fuzariozu klasa pšenice i drugih žita. Drugi razlog zbog kojeg su se grupe razdvojile je formiranje peritecija u laboratorijskim uslovima. Obe vrste formiraju peritecije u polju, dok grupa II formira peritecije i u laboratorijskim uslovima. Na osnovu morfoloških karakteristika teško se mogu razlikovati jedna od druge, pa su **Aoki i O'Donnell** 1999. godine primenom molekularnih metoda grupu I izdvojili u posebnu vrstu pod nazivom *F. pseudograminearum* (teleomorfni stadijum: *G. coronicolla*), dok je grupa II dobila naziv *F. graminearum sensu lato* (teleomorfni stadijum: *G. zeae*).

Proučavanja na molekularnom nivou ukazala su da je vrsta *F. graminearum sensu lato* genetski veoma heterogena. Dugo se smatralo da je u pitanju jedna vrsta koja je rasprostranjena na svim kontinentima. Međutim, primenom filogenetske analize DNK sekvenci 6 nuklearnih gena i GCPSR metode (Genealogical Concordance Phylogenetic

Species Recognition) otkriveno je devet biogeografski različitih vrsta u okviru *F. graminearum* kompleksa (*Fg* kompleks) (O'Donnell et al., 2000). Kasnija istraživanja koja su se zasnivala na upotrebi multilokusne DNK sekvence 13 nuklearnih gena i GCPSR metode ukazala su na postojanje još šest vrsta (Starkey et al., 2007; O'Donnell et al., 2008; Yli-Mattila et al., 2009; Sarver et al., 2011).

Ranije poznata vrsta *F. gramineaeum sensu lato* ili grupa II danas je poznata kao kompleks vrsta koji sadrži najmanje 15 odvojenih filogenetskih vrsta. Ove nove vrste razlikuju se na osnovu geografske rasprostranjenosti, sposobnosti produkcije trihotecena, kao i na osnovu različite patogenosti, odnosno sposobnosti da prouzrokuju bolest na pojedinim usevima (O'Donnell et al., 2000; Cumagun et al., 2004; O'Donnell et al., 2004).

#### 2.4.1. Varijabilnost morfoloških svojstava

Usled velike varijabilnosti vrsta roda *Fusarium* u pogledu morfoloških, patogenih i fizioloških svojstava, bilo je dosta promena u taksonomiji. Još uvek nije definisan sistem koji bi potpuno zadovoljio identifikaciju i karakterizaciju ovog roda. Identifikacija vrsta u okviru roda *Fusarium* teško je ostvarljiva iz više razloga: brza promena u populacijama (Booth, 1971; McDonald, 1997), različita distribucija vrsta (Leslie et al., 2001; Zeller et al., 2003), dvostruki nezavisni načini razmnožavanja, kao i stalno menjani taksonomski sistemi (Samuels et al., 2001). Krajem XX veka molekularna biologija našla je primenu u identifikaciji vrsta roda *Fusarium*. Može se očekivati da će detaljnija filogenetska istraživanja utvrditi postojanje novih vrsta i promeniti dosadašnju taksonomiju. Prema najprihvaćenijoj klasifikaciji (Siefert and Levesque, 2004) anamorf, rod *Fusarium*, svrstan je u razdeo *Ascomycota*, klasu *Sordariomycetes*, red *Hypocerales* i familiju *Nectriaceae* (Siefert and Levesque, 2004).

Anamorf je stadijum u životnom ciklusu kojeg karakteriše razmnožavanje bespolnim sporama. Stadijum anamorfa razlikuje se u makroskopskim i mikroskopskim svojstvima. U makroskopska svojstva ubrajaju se porast i izgled kolonije, boja vazdušne micelije i formiranje pigmenta u podlozi. Varijabilnost makroskopskih svojstava najbolje se može uočiti gajenjem gljiva na krompir dekstroznoj podlozi (PDA) na 25°C (Nelson et al., 1983). Na PDA *F. graminearum* može dostići porast od 7,5 do 8 cm za

pet dana (Lević, 2008). Kolonija *F. graminearum* na PDA raste veoma brzo, vazдушna micelija je gusta i pamučasta, najčešće žute, ružičaste do mrke boje sa belom do karmin crvenom ivicom. Uglavnom luči karakterističan karmin crveni pigment sa smeđom nijansom (Burgess et al., 1994; Leslie and Sammerell, 2006).

U mikroskopska svojstva ubrajaju se izgled i veličina makrokonidija, kao i prisustvo ili odsustvo hlamidospora. Makrokonidije sa bazalnom ćelijom u obliku stopala su karakteristična odlika vrsta roda *Fusarium*. Ovaj rod je dobio ime po fuzoidnom obliku makrokonidija koji je opisao Link 1809. (loc. cit. Samueles et al., 2001), a potiče od reči *fusus* (lat. vreteno). Makrokonidije kod *Fusarium* vrsta mogu da variraju u obliku (Nelson et al., 1983; Burgess et al., 1994; Leslie and Sammerell, 2006), koji može biti izdužen, vretenast, skoro prav (*F. graminearum*), oblika igle, blago zakrivljen ili srpasto savijen, itd. Takođe, za identifikaciju su ključni oblik vršne i bazalne ćelije, kod vrste *F. graminearum* bazalna ćelija je izduženog oblika stopala. U zavisnosti od vrste postoji velika varijabilnost oblika vršnih ćelija (Burgess et al., 1994; Leslie and Sammerell, 2006), koja može biti kupasta (*F. graminearum*), prstasta, končasta i savijena, klinasta, u obliku papile, itd. Makrokonidije su prozirne, blago povijene i sužene prema krajevima, debelih zidova. Vršne ćelije su kupaste ili sužene, dok su bazalne ćelije karakterističnog oblika stopala (Leslie and Summerell, 2006).

Makrokonidije su višećelijske, tako da broj septi varira zavisno od vrste i uslova. Većina vrsta roda *Fusarium* imaju makrokonidije sa 3-5 septi, dok vrsta *F. graminearum* ima 5-6 septi, a nekada i više. Varijabilnost makrokonidija se ogleda i u njihovoj veličini, kako između vrsta tako i u okviru jedne vrste, u zavisnosti od broja formiranih septi. Postoje različiti literaturni podaci za dimenzije makrokonidija. Dužina makrokonidija kod vrste *F. graminearum* kreće se od 21 do 106  $\mu\text{m}$ , a širina od 3 do 8  $\mu\text{m}$ . Za pouzdanu identifikaciju je najbolje uzeti makrokonidije koje su formirane u sporodohijama jer su one najujednačenije. Vrsta *F. graminearum* može da formira pod određenim uslovima, hlamidospore ali je varirabilnost u okviru vrste veoma velika pa se smatra nepouzdanim svojstvom za identifikaciju. Hlamidospore su loptastog oblika, bezbojne do blede smeđe i mogu se obrazovati pojedinačno ili u nizovima (Leslie and Summerell, 2006).

Teleomorfni stadijum roda *Fusarium* karakteriše formiranje peritecija. U zavisnosti od načina formiranja peritecija vrste mogu biti homotalusne ili heterotalusne.

*F. graminearum* je homotalusna vrsta koja formira peritecije u prirodi na brojnim domaćinima, posebno iz familije *Poaceae*, a njen teleomorfni stadijum je *G. zea*. Takođe, ova vrsta može formirati peritecije i u laboratorijskim uslovima. Monosporijalni izolati formiraju peritecije na podlozi sa sterilnim listom karanfila nakon 30 dana. Peritecije *G. zea* formiraju se na površini supstrata samostalno ili u grupama, jajastog oblika sa čvornovitim zidom, vrlo malo variraju po obliku i boji, obično su tamno plave do crne boje. U peritecijama formiraju se askusi koji su izduženi (oblika palice) s kratkom osnovom i tankim neizdiferenciranim zidom, u početku su providni a kasnije prilikom oslobađanja askospora postaju smeđi. Askusi sadrže 4-6 askospora koje su koso poređane u jednom ili dva reda. Askospore koje se formiraju u vršnom delu askusa imaju jednu poprečnu pregradu, dok one koje se formiraju prema osnovi imaju tri pregrade. Askospore su bezbojne sa savijenim i zaobljenim krajevima (Lević, 2008).

Proučavanja na molekularnom nivou su ukazala da je vrsta *F. graminearum* genetski veoma heterogena. Iz populacije ove gljive izdvojeno je 15 novih vrsta uključujući *F. graminearum sensu stricto* (O'Donnell et al., 2000, 2004, 2008; Starkey et al., 2007; Sarver et al., 2011). Vrste u okviru *F. graminearum* kompleksa (*Fg* complex) teško se mogu razlikovati jedna od druge na osnovu morfoloških svojstava. U istraživanjima Starkey et al. (2007) i Sarver et al. (2011) poređeni su izolati na osnovu fenotipskih svojstava kako bi se utvrdilo da li je moguće razlikovati vrste na osnovu morfoloških karakteristika. Na osnovu širine makrokonidija izdvojene su tri grupe. U grupu čija je širina makrokonidija ispod 4,5 µm svrstane su vrste *F. austroamericanum*, *F. meridionale*, *F. boothii*, *F. mesoamericanum* i *F. louisianense* u grupu 4,5-5 µm širine makrokonidija ubrojane su vrste *F. acaciae-mearnsii*, *F. graminearum sensu stricto*, *F. asiaticum*, *F. cortaderie*, *F. brasilicum*, *F. gerlachii* i *F. nepalense* dok širinu konidija preko 5 µm imaju dve vrste *F. vorosii* i *F. ussurianum*. Utvrđeno je da dve nove vrste *F. gerlachii* i *F. vorosii* formiraju konidije koje su nešto šire od konidija koje formiraju druge vrste *Fg* kompleksa. Istraživanja Starkey et al. (2007) ukazuju na to da je teško samo na osnovu morfoloških karakteristika identifikovati vrste u okviru *Fg* kompleksa s obzirom na preklapanje srednjih vrednosti u dužini i širini makrokonidija kao što je slučaj kod vrste *F. graminearum ss* i *F. acaciae-mearnsii*. Pored morfoloških karakteristika, neophodno je proveriti patogenost



izolata, njihov toksikološki profil, kao i molekularnim analizama potvrditi identifikaciju vrsta.

#### 2.4.2. Varijabilnost patogenih svojstava

Vrste roda *Fusarium*, kako u morfološkim, tako i u patogenim svojstvima, ispoljavaju visok stepen interspecijske i intraspecijske varijabilnosti. Izolati mogu da variraju od nepatogenih do veoma patogenih za određenu biljnu vrstu ili za više biljnih vrsta. Isto tako jedna vrsta može biti patogena za jednu, a nepatogena za drugu biljnu vrstu. Mnogi autori ustanovili su postojanje varijabilnosti u stepenu patogenosti odnosno agresivnosti izolata *F. graminearum* (Carter et al., 2002; Brennan et al., 2003; Mesterházy et al., 2005; Krnjaja et al., 2007, 2008).

Patogenost izolata *F. graminearum* ispitivana je u mnogim zemljama širom Amerike i Evrope (Varga et al., 2002; Brennan et al. 2003; Fernandez and Chen 2005; Broders et al., 2007; Kuhnem et al., 2015). Proučavanjem patogenosti *Fusarium* vrsta u Kanadi, Fernandez and Chen (2005) uočili su da su najpatogenije vrste na pšenici *F. graminearum* i *F. culmorum*, dok su najmanje patogene vrste *F. equiseti* i *F. poae*. Agresivnost u *in vitro* uslovima 112 izolata *F. graminearum* sa 30 lokaliteta iz 13 zemalja pokazala je da su svi ispitivani izolati bili veoma patogeni na semenu kukuruza i umereno do visoko patogeni na semenu soje (Broders et al., 2007). Istraživanje koje su sproveli Kuhnem et al. (2015) u Njujorku, imalo je za cilj da utvrdi da li su izolati *F. graminearum* poreklom sa pšenice i kukuruza agresivniji na biljci domaćinu sa koje vode poreklo i da li je agresivnost dodatno uticala na produkciju trihotecena. Ovi rezultati pokazali su da je agresivnost izolata *F. graminearum* varirala u širokom opsegu i na pšenici i na kukuruzu, kao i to da nema statističke značajnosti u agresivnosti između izolata različitog porekla. U istraživanjima koja su sprovedena u Evropi, Brennan et al. (2003) su od pet proučavanih vrsta u okviru roda *Fusarium*, uočili da su izolati *F. graminearum* bili najpatogeniji na zrnju pšenice. Takođe, na teritoriji Mađarske i Poljske, ova vrsta identifikovana je kao najagresivnija vrsta roda *Fusarium* na pšenici (Varga et al., 2002; Tomczak et al., 2002).

Proučavajući varijabilnost patogenih svojstava *Fusarium* spp. poreklom sa zrna kukuruza i pšenice gajenih u Srbiji, Tančić i sar. (2009) uočili su da je intraspecijska varijabilnost u agresivnosti bila najizraženija kod izolata *F. graminearum*. Takođe, ovi autori navode da su izolati *F. graminearum* poreklom sa zrna pšenice ispoljili manju

patogenost u poređenju sa izolatima poreklom sa zrna kukuruza. **Stanković et al.** (2007a) utvrdili su da je najagresivnija vrsta na zrnu kukuruza i pšenice bila *F. graminearum* u različitim agroekološkim uslovima u Srbiji. Proučavajući uticaj agroekoloških faktora na osetljivost različitih sorti pšenice prema fuzariozi klasa, **Krnjaja et al.** (2015b) su tokom 2011. i 2012. godine nakon veštačke inokulacije klasa pšenice utvrdili varijabilnost u patogenosti izolata *F. graminearum*.

### 2.4.3. Varijabilnost toksigenih svojstava

Zbog toksigenih svojstava za ljude i životinje, pojedinim vrstama iz roda *Fusarium* pridaje se veći značaj kao potencijalno toksigenim nego kao patogenim vrstama. Diverzitet vrsta *Fg* kompleksa pokazuju i rezultati istraživanja o sintezi različitih mikotoksina. Ova vrsta sintetiše veći broj mikotoksina od kojih su najznačajniji trihoteceni tipa B deoksinivalenol (DON), njegovi acetil-estar derivati (3ADON i 15ADON), nivalenol (NIV) i zearalenon (ZEA). U pogledu sinteze trihotecena (hemijske strukture, uključujući poziciju acetil-estar derivata) opisana su dva hemotipa. Hemotip I koji sintetiše DON i njegove acetil-estar derivate, dok hemotip II sintetiše nivalenol i fuzarenon - X (**Mulé et al.**, 1998). Ukoliko sintetišu 3ADON pripadaju hemotipu Ia, a ukoliko sintetišu 15-ADON pripadaju hemotipu Ib (**Ward et al.**, 2002). Filogenetska proučavanja vrste *F. graminearum* ukazuju na razlike u potencijalu produkcije mikotoksina među izolatima različitog geografskog porekla.

Osim širokog spektra produkcije mikotoksina, varijabilnost se uočava i u količini sinteze jednog toksina od strane više izolata jedne vrste. U istraživanjima koja su sprovedena u Srbiji, koncentracije DON-a koje su sintetisali izolati *F. graminearum* varirale su od 0,7 do 45,3 µg/g, zavisno od potencijala produkcije izolata, dok su koncentracije ZEA bile u opsegu od 0,11 do 97,5 µg/g (**Tančić**, 2009). Znatno veći potencijal produkcije DON-a (do 465,9 µg/g) i ZEA (do 4,416 µg/g) kod izolata *F. graminearum* uočili su **Jajić et al.** (2007). Takođe, uočena je varijabilnost u koncentraciji produkovanog mikotoksina kod različitih vrsta. Istraživanja su pokazala da koncentracije zearalenona i deoksinivalenola koje produkuju različite vrste roda *Fusarium* dosta variraju (**Moretti et al.**, 2002; **Varga et al.**, 2002; **Tomczak et al.**, 2002; **Ittu et al.**, 2004). U Srbiji je takođe uočena varijabilnost u produkciji DON-a kod izolata poreklom sa zrna pšenice, koja je varirala od 0,25 do 45,26 µg/g (**Stanković et**

al., 2008) i ZEA od 0,03 do 12,8 µg/g (Bočarov-Stančić i sar., 2000; Stanković et al., 2007c). Analizom 39 izolata *Fusarium* spp. poreklom sa zrna pšenice i kukuruza sakupljenih iz 10 lokaliteta u Srbiji, Tančić et al. (2015) ustanovili su da su izolati *F. graminearum* produkovali najveće koncentracije DON i ZEA u poređenju sa drugim *Fusarium* vrstama. Uočeno je da nije bilo jasne razlike u produkciji mikotoksina ZEA između izolata *F. graminearum* poreklom sa pšenice i kukuruza, dok su veće prosečne koncentracije DON-a produkovali izolati poreklom sa pšenice. Prosečne koncentracije DON-a kod svih ispitivanih izolata *F. graminearum* bile su 10,1 µg/g, a prosečne koncentracije ZEA 30,61 µg/g. Proučavanjem izolata *F. graminearum* koji su prikupljeni tokom 2011. i 2012. godine poreklom sa pšenice i kukuruza u Americi, Kuhnem et al. (2015) uočili su potencijal produkcije DON-a na pšenici u rasponu od 10,65 do 97,05 µg/g, dok je na kukuruzu koncentracija DON-a bila u većem rasponu od 5,9 do 132,2 µg/g. Međutim, mikotoksin ZEA na pšenici u ovom istraživanju nije detektovan, dok je na kukuruzu koncentracija ZEA uočena u opsegu od 0,08 do 1,0 µg/g. Na osnovu dosadašnjih istraživanja količina produkovanog toksina varira u zavisnosti od izolata, spoljašnjih uslova, biljke domaćina i ekoloških faktora (Lević, 2008).

#### 2.4.3.1. Rasprostranjenost hemotipova u svetu

Od suštinskog značaja za poljoprivredu kao i prehrambenu industriju jedne zemlje je poznavanje toksikološkog profila vrste *F. graminearum*, jer trihotecenski hemotipovi (NIV, 3ADON i 15ADON) imaju značajnu ulogu u etiologiji bolesti. Uočeno je da različiti mikotoksini imaju različita toksikološka svojstva, nivalenol je toksičniji od deksinivalenola za ljude i životinje (Lee et al., 2015). Izolati koji produkuju 3ADON superiorniji su od izolata koji produkuju NIV u fenotipskim osobinama, kao i to da se agresivnost 3ADON producenata širi (Zhang et al., 2012; Ward et al., 2008). Poznavanje hemotipova važna je informacija za uspostavljanje strategije za procenu rizika u pogledu zaštite zdravlja ljudi i životinja.

U dosadašnjim istraživanjima utvrđeno je da postoji nekoliko novootkrivenih vrsta u okviru *Fg* kompleksa koje pripadaju samo jednom hemotipu: Ia (3ADON) *F. ussuriense* (Yli-Mattila et al., 2009), Ib (15ADON) *F. aethiopicum*, *F. boothii* i *F. vorosii* (Starkey et al., 2007; Yli-Mattila et al., 2009; O'Donnell et al., 2008; Ward et al., 2008) i hemotip II (NIV) *F. meridionale* i *F. gerlachii* (Starkey et al., 2007;

O'Donnell et al., 2008; Ward et al., 2008; Sampietro et al., 2011). Dve vrste, *F. graminearum sensu stricto* i *F. asiaticum*, pripadaju hemotipu I i II jer sintetišu 3ADON, 15ADON i NIV. Preostalih pet vrsta, *F. acaciae-mearnsi*, *F. mesoamericanum*, *F. austroamericanum*, *F. cortaderiae* i *F. brasilicum* mogu da sintetišu i 3ADON i NIV (Ward et al., 2008).

(i) **Distribucija hemotipova u Aziji.** Prema literaturnim podacima na azijskom kontinentu rasprostranjena su sva tri hemotipa (3ADON, 15ADON i NIV) u zavisnosti od vrste *Fg* kompleksa kao i od biljke domaćina sa koje su izolovane. Vrsta *F. graminearum ss* uglavnom produkuje 15ADON a ređe NIV, za razliku od vrste *F. asiaticum* koja produkuje 3ADON ili NIV. Geografsku rasprostranjenost hemotipova u Kini opisali su Gale et al. (2002), Zhang et al. (2007) i Qu et al. (2008), a Karugia et al. (2009) u Japanu. Rezultati ovih istraživanja pokazali su da populacije *F. graminearum ss* na pšenici i ječmu u Kini pretežno produkuju 15ADON, za razliku od populacije *F. asiaticum*, koje uglavnom produkuju 3ADON ili NIV. U istraživanjima koja su sprovedena u Japanu od ukupno 179 izolata *F. asiaticum*, 80 izolata je pripadalo NIV hemotipu, a preostalih 99 izolata pripadali su 3ADON hemotipu (Karugia et al., 2009). Uočeno je da dominantan hemotip među izolatima poreklom sa kukuruza varira u zavisnosti od geografskog područja (Lee et al., 2010). U okviru *Fg* kompleksa izolati sa NIV hemotipom izolovani su dvostruko češće nego izolati sa DON hemotipom iz uzorka semena kukuruza u Nepal (Desjardins et al., 2008, 2011). U Južnoj Koreji, *F. asiaticum* je uglavnom izolovan sa pirinča i većina izolata (95%) pripadaju NIV hemotipu. Nasuprot tome, dominantna vrsta na zrnu kukuruza je *F. graminearum ss*, a dominantni hemotip među izolatima poreklom sa kukuruza je varirao u zavisnosti od regiona. DON hemotip je identifikovan u većem procentu (66%) u odnosu na NIV hemotip u severoistočnom delu, dok je NIV hemotip (70%) bio dominantan u centralnom delu (Lee et al., 2010). Još jedan očigledan primer geografskog variranja zabeležen je u Iranu, gde je na zapadu zemlje identifikovano 125 od 129 izolata kao *F. graminearum ss*, među kojima je 121 izolat imao 15ADON hemotip. Nasuprot tome, na istoku Irana, od ukupno 12 analiziranih izolata *F. gramineaeum*, 11 izolata je pripadalo NIV hemotipu (Davari et al., 2013). Do sličnih rezultata došli su Haratian et al. (2008) koji su utvrdili da je većina izolata na severoistoku Irana pripadala NIV hemotipu.

(ii) **Distribucija hemotipova u Africi.** Rezultati istraživanja sprovedini u Africi ukazuju da je dominantan hemotip 15ADON na pšenici, ječmu i kukuruзу, a takođe i 3ADON i NIV hemotip su prisutni ali u nižem procentu. **Boutigny et al.** (2011) su proučavanjem 560 izolata *Fg* kompleksa, koji su prikupljeni sa pšenice, ječma i kukuruза u Južnoj Africi, potvrdili da je 535 izolata pripadalo 15ADON hemotipu, 22 izolata pripadalo NIV hemotipu, a samo 3 izolata su bila 3ADON hemotip. Vrsta koja je identifikovana samo u Etiopiji, *F. aethiopicum*, pripada 15ADON hemotipu (**O'Donnell et al.**, 2008; **Boutigny et al.**, 2011).

(iii) **Distribucija hemotipova u Americi.** Rezultati istraživanja u Americi pokazali su da je 15ADON hemotip dominantan (oko 95%), dok je 3ADON hemotip uočen u dosta manjem procentu, međutim poslednjih godina uočen je sve veći porast prisustva 3ADON hemotipa (**Abramson et al.**, 1993, 2001; **Gale et al.**, 2007). Poređenjem izolata prikupljenih u periodu 1980-2000. i 2008. godine uočeno je povećanje prisutnih 3ADON hemotipa sa 3% na 44%. Takođe, primećeno je da izolati koji pripadaju 3ADON hemotipu prouzrokuju intenzivnije bolest i produkuju veće količine DON-a nego izolati koji pripadaju 15ADON hemotipu (**Puri and Zhong**, 2010). Osim toga, pojava 3ADON hemotipa detektovana je na ječmu, gde je primećeno povećanje 11 puta u 2008. godini u odnosu na period 1997-2000. godine (**Burlakoti et al.**, 2011). U istočnom SAD-u od ukupno 998 izolata *G. zae* koji su prikupljeni sa ozime pšenice iz 39 oblasti, utvrđeno je da je 92% izolata pripadalo 15ADON hemotipu, 7% 3ADON hemotipu i 1% NIV hemotipu, sa rastućim trendom izolata koji su pripadali 3ADON hemotipu od juga ka severu (**Schmale et al.**, 2011). Iako se smatralo da je NIV hemotip kod izolata *F. graminearum* ss redak u SAD-u, novija istraživanja **Gale et al.** (2011) pokazala su da je u južnom delu SAD-a visok procenat izolata *F. graminearum* ss (79%) pripadao NIV hemotipu.

U Kanadi od zapada ka istoku takođe je došlo do značajnog povećanja učestalosti 3ADON hemotipa, **Ward et al.** (2008) su analizom 492 izolata *F. graminearum* utvrdili da je oko 25% izolata pripadalo 3ADON hemotipu, dok je 75% svrstano u 15ADON hemotip. Uočeno je da je 100% uzoraka poreklom sa istoka pripadalo 3ADON hemotipu, u poređenju sa manje od 10% izolata na zapadu koji pripadaju 3ADON hemotipu (**Ward et al.**, 2008; **Guo et al.**, 2008).

U okviru kompleksa *Fg*, u Argentini 15ADON hemotip bio je najčešći (Alvarez et al., 2009; Reynoso et al., 2011; Castanares et al., 2014; Malbran et al., 2014), a raznolikost trihotecenskih hemotipova među izolatima direktno je vezana za različite vrste (Sampietro et al., 2011). Značajan porast sa 29% na 49%, kod izolata koji su pripadali 3ADON hemotipu zabeležen je u Argentini u periodu 2001-2004. godine (Alvarez et al., 2009). Ispitivanja uzorka zrna pšenice u Južnom Brazilu pokazala su da je 15ADON hemotip bio dominantan sa više od 92% izolata, zatim sledi NIV i na kraju 3ADON hemotip (Scoz et al., 2009; Astolfi et al., 2011a). Istraživanja koja su sprovedena na uzorcima zrna ječma u Južnom Brazilu, otkrila su da je samo 4% izolata pripadalo 3ADON hemotipu, 66% 15ADON hemotipu, dok je NIV hemotipu pripadalo 29% (Astolfi et al., 2011b). U Urugvaju, zabeležene su značajne razlike u rasprostranjenosti hemotipova između zapadnih i istočnih oblasti. NIV hemotip dominira u područjima na istoku gde je proizvodnja pirinča uobičajena (Umpierrez et al., 2013). Zanimljivo je da je većina izolata koji produkuju NIV poreklom od izolata *F. asiaticum*. U Južnoj Americi na kukuruzu uočene su vrste koje pripadaju *Fg* kompleksu, izolati vrste *F. meridionale* pripadali su NIV hemotipu, dok su izolati vrste *F. boothii* pripadali 15ADON hemotipu (Sampietro et al., 2010). Uočeno je da izolati *F. graminearum* ss poreklom sa pšenice proizvode 15ADON, dok je na kukuruzu i pirinču uobičajen NIV hemotip, s tim da se na kukuruzu javlja vrsta *F. meridionale*, a na pirinču *F. asiaticum* (Del Ponte et al., 2013).

(iv) **Distribucija hemotipova u Austarliji i Novom Zelandu.** Malo informacija dostupno je o trihotecenskim hemotipovima koje produkuju vrste *Fg* kompleksa u Australiji i Novom Zelandu. Vrsta *F. cortaderiae* pronađena je na Novom Zelandu i svi izolati sintetisali su NIV (Monds et al., 2005). Međutim, na Novom Zelandu Monds et al. (2005) utvrdili su da su među izolatima *F. graminearum* ss podjednako bili zastupljeni NIV i DON hemotipovi. U zapadnom delu Australije identifikovana je vrsta *F. graminearum* ss na uzorcima pšenice koja je pripadala 3ADON hemotipu (Tan et al., 2012).

Filogenetska proučavanja vrste *F. graminearum* ukazuju na razlike u sintezi mikotoksina među izolatima različitog geografskog porekla, usled različitih klimatskih faktora. Dosadašnja istraživanja ukazala su da su izolati *F. graminearum* ss poreklom iz Evrope i Amerike većeg potencijala za sintezu 15ADON, u Aziji za sintezu 3ADON,

dok na Novom Zelandu preovladava NIV (Starkey et al., 2007; Ward et al., 2008; Gale et al., 2011, 2007). Međutim, novija istraživanja koja su sprovedena širom sveta, ukazuju na promene u sintezi mikotoksina usled promene klime.

(v) **Distribucija hemotipova u Evropi.** Istraživanja o FHB i mikotoksinima sprovedena su u mnogim zemljama u Evropi tokom poslednje decenije. Podaci o rasprostranjenosti hemotipova u Evropi pokazuju da je 15ADON hemotip prevalentan u većini zemalja, za razliku od 3ADON i NIV hemotipa koji su detektovani značajno ređe. Istraživanja su pokazala da je hemotip 15ADON dominantan u Velikoj Britaniji (prisutan sa više od 90%) (Jennings et al., 2004), Nemačkoj (Talas et al., 2011), Luksemburgu (Pasquali et al., 2010), Holandiji (Waalwijk et al., 2003), Italiji (Prodi et al., 2011; Somma et al., 2014), dok je 3ADON i NIV hemotip detektovan u Norveškoj (Aamot et al., 2015; Uhlig et al., 2013), Švedskoj i Finskoj (Fredlund et al., 2013; Lindblad et al., 2013) kao i na severozapadu Rusije (Yli-Mattila et al., 2009). U Francuskoj, Boutigny et al. (2014) utvrdili su da je dominantan hemotip na zrnju pšenice, ječma i kukuruza bio 15ADON, dok je NIV hemotip ređi i prisutan samo na pšenici i kukuruzu. Takođe, 15ADON hemotip je dominantan u Italiji pretežno u regionima sa hladnijom klimom (Prodi et al., 2009, 2011). Do sličnih rezultata došli su Somma et al. (2014) koji su analizom populacije *Fg* kompleksa utvrdili da je 88% pripadalo hemotipu 15ADON, 11% NIV hemotipu, dok je 3ADON hemotipu pripadao samo jedan izolat. U Engleskoj, Jennings et al. (2004) su proučavanjem 76 izolata *F. graminearum* ss poreklom sa pšenice ustanovili da 72 izolata pripada hemotipu 15ADON. Nasuprot tome, u Finskoj, kao i na severu Rusije, identifikovan je *F. graminearum* koji je sintetisao isključivo 3ADON (40/46), dok je na jugu 15ADON hemotip bio dominantan sa 93,5% (Yli-Mattila et al., 2009).

U agroekološkim uslovima Srbije do sada nema podataka o diverzitetu i distribuciji trihotecenskih hemotipova. U Rumuniji je proučavanjem 35 izolata *F. graminearum* uočeno da samo jedan izolat pripada NIV hemotipu, dok su svi ostali izolati pripadali 15ADON hemotipu (Bozac et al., 2016). Ovo je ujedno i jedini podatak o rasprostranjenosti i varijabilnosti hemotipova u zemljama u okruženju.

Istraživanja u svetu u pogledu sinteze trihotecena u okviru *Fg* kompleksa kod žitarica važna su da bi se uspostavile osnove za ove genotipove prema kojima će se

svako pomeranje populacija u budućnosti moći pratiti (Starkey et al., 2007; Ward et al., 2008; Gale et al., 2011, 2007; Guo et al., 2008; Schmale et al., 2011).

## 2.5. Genetička i biogeografska varijabilnost vrsta *Fg* kompleksa

Dugo se smatralo da je *F. graminearum* jedna vrsta koja se javlja na svim kontinentima, sve dok nisu primenjene molekularne tehnike za proučavanje rasprostranjenosti izolata poreklom iz različitih delova sveta (O'Donnell et al., 2000; Ward et al., 2002) čime je dokazano da se radi o genetički veoma heterogenoj vrsti.

Za molekularnu identifikaciju vrsta *Fg* kompleksa primenjuje se GCPSR pristup zasnovan na korišćenju informacija o genealogiji više gena u cilju dokazivanja vrsta (Taylor et al., 2000). O'Donnell et al. (1998) koristeći ovaj pristup identifikovali su vrste roda *Fusarium*. Ispitivali su veliki broj izolata, najpre sekvencirajući gen za beta tubulin, a zatim i druge gene. Na ovaj način identifikovali su 45 vrsta, od kojih su 23 nove vrste. Sve vrste koje su prethodno dokazane na osnovu biološkog koncepta, potvrđene su i primenom GCPSR pristupa. Ovaj pristup zasniva se na filogenetskoj saglasnosti više nevezanih gena u cilju ukazivanja na odsustvo genetičke razmene i evolutivnu nezavisnost ispitivanih genotipova. Na ovaj način omogućava se razdvajanje vrsta u slučajevima kada to nije moguće na osnovu morfoloških karakteristika, kao i kod vrsta gljiva koje su aseksualne (homotalusne), što je slučaj kod vrste *F. graminearum*. Prema podacima iz literature najviše korišćeni geni za uspešnu identifikaciju vrsta *Fg* kompleksa su elongacioni faktor (*TEF-1 $\alpha$* ), beta tubulin ( *$\beta$ -tubulin*), histon (*H3*), reduktaza gen (*RED*), *mating-type* geni (*MAT*), gen koji kodira 3-*O*-acetiltransferazu (*TRII01*) i drugi (O'Donnell et al., 1998; Cai et al., 2011; Starkey et al., 2009; Somma et al., 2014).

Primenom filogenetske analize multilokusne DNK sekvence 11 nuklearnih gena i GCPSR metode, u okviru kompleksne vrste *F. graminearum* Schwabe identifikovano je 9 različitih vrsta: [1] *F. austroamericanum*, [2] *F. meridionale*, [3] *F. boothii*, [4] *F. mesoamericanum*, [5] *F. acacie-mearnsii*, [6] *F. asiaticum*, [7] *F. graminearum sensu stricto*, [8] *F. cortaderie* i [9] *F. brasiliicum* (O'Donnell et al., 2004).

Starkey et al. su 2007. godine upotrebom multilokusne DNK sekvence 13 nuklearnih gena i GCPSR metode opisali dve nove vrste u okviru *Fg* kompleksa: *F. vorosii* i *F. gerlachii*, a kasnije su opisane još dve vrste *F. aethiopicum* poreklom iz Etiopije (O'Donnell et al., 2008) i *F. ussurianum* poreklom iz Rusije (Yli-Mattila et



al., 2009). Nedavno su otkrivene još dve nove vrste - *F. nepalense* poreklom iz Nepala i *F. louisianense* poreklom iz Luizijane u SAD-u (Sarver et al., 2011).

Poreklo vrsta *Fg* kompleksa je sa južne hemisfere, izuzev vrsta *F. gerlachii* i *F. graminearum* ss, koje su kosmopoliti (O'Donnell et al., 2004). Usled klimatskih promena došlo je do migracije ovih vrsta, tako da su se one sada proširile širom sveta. Biogeografsku rasprostranjenost kompleksne vrste *F. graminearum* u svetu dao je Kerry O'Donnell (2004) i ukazao na to da je *F. graminearum* ss najrasprostranjenija i najdominantnija vrsta u svetu, preovladava u Severnoj Americi i Evropi. Istraživanja su pokazala da su vrste *F. austroamericanum*, *F. meridionale*, *F. cortaderiae* i *F. brasiliicum* verovatno lokalizovane u Južnoj Americi (O'Donnell et al., 2004; Starkey et al., 2007; Sampietro et al., 2011), *F. acaciae-mearnsi* u Australiji i Južnoj Africi (O'Donnell et al., 2004; Boutigny et al., 2011), *F. vorosii* i *F. ussurianum* su endemske u Aziji (Starkey et al., 2007; Yli-Mattila et al., 2009), *F. asiaticum* u Aziji i Južnoj Americi (O'Donnell et al., 2004), *F. aethiopicum* je lokalizovana u Africi (O'Donnell et al., 2008), *F. boothii* i *F. mesoamericanum* u Centralnoj Americi (O'Donnell et al., 2004, 2008), *F. gerlachii* i *F. louisianense* u SAD-u (Starkey et al., 2007; Sarver et al., 2011) i *F. nepalense* u Nepal (Sarver et al., 2011).

(i) **Rasprostranjenost vrsta *Fg* kompleksa u Aziji.** Proučavanjem rasprostranjenosti *F. graminearum* ss i *F. asiaticum* u Kini uočeno je da je vrsta *F. graminearum* ss uglavnom prisutna u hladnijim regionima. Nasuprot tome, 95% izolata *F. asiaticum* prisutno je u toplijim regionima (Qu et al., 2008; Zhang et al., 2007). Ovi rezultati ukazuju na to da je ekološki faktor imao značajan uticaj na geografsku rasprostranjenost ovih vrsta (Qu et al., 2008; Sampietro et al., 2011; Ji, 2007; Lee et al., 2009; Desjardins and Proctor, 2011). Na osnovu istraživanja koja su sprovedena u južnoj Kini, vrsta *F. asiaticum* izolovana je u visokom procentu (preko 90% na zrnju ječma), dok su druge vrste identifikovane u značajno manjem procentu: *F. graminearum* ss 2,7%, *F. meridionale* 1,4%, i ostale vrste 3,5%. Takođe, vrsta *F. asiaticum* bila je glavni prouzrokovatelj FHB na pšenici u južnoj Kini (97%), za razliku od severne i severo-istočne Kine gde je od ukupno 169 izolata (76%), 129 izolata identifikovano kao *F. graminearum* ss (Zhang et al., 2012).

Značajna korelacija uočena je između učestalosti *F. graminearum* ss i *F. asiaticum* u zavisnosti od plodoreda. Na severu Kine u područjima gde se pšenica i

kukuruz gaje u plodoredu vrsta *F. graminearum* široko je rasprostranjena. Nasuprot tome, u područjima gde se pšenica gaji u plodoredu sa pirinčem uglavnom je prisutna vrsta *F. asiaticum* (Zhang et al., 2012). Takođe, Lee et al. (2010) utvrdili su da se *F. asiaticum* javlja češće na pirinču. U Japanu je takođe zabeležena različita distribucija vrsta *F. graminearum* ss i *F. asiaticum* u zavisnosti od plodoreda (Index Mundi, 2014). Rasprostranjenost vrsta *Fg* kompleksa na pšenici i ječmu širom Japana pokazuje jasnu geografsku razliku. Na severu je izolovana vrsta *F. graminearum* ss dok je na jugu dominantna vrsta *F. asiaticum* (Suga et al., 2008). Rasprostranjenost ove dve vrste značajno zavisi i od srednjih temperatura. *F. graminearum* javlja se na temperaturama ispod 15°C, dok se *F. asiaticum* pojavljuje na temperaturama preko 15°C (Suga et al., 2008). Preliminarni rezultati koji su objavljeni u Koreji pokazali su da su izolati poreklom sa kukuruza pripadali *F. graminearum* ss (74%), dok su tri vrste *F. meridionale*, *F. boothii* i *F. asiaticum*, takođe bile prisutne ali u niskom procentu (Jeon et al., 2003). Lee et al. (2010) su u Južnoj Koreji identifikovali vrstu *F. asiaticum* u visokom procentu (95%) na pirinču. Nasuprot tome, dominantna vrsta na kukuruzu je bila *F. graminearum* ss. Od 568 proučavanih izolata *Fg* kompleksa identifikovane su četiri vrste: *F. graminearum* (75%), *F. boothii* (12%), *F. asiaticum* (12%) i *F. meridionale* (1%) (Lee et al., 2012). U Iranu, u zapadnom delu zemlje, dominantna vrsta na pšenici je *F. graminearum* ss (96%) (Davari et al., 2013). U Nepal, Desjardins and Proctor (2011) utvrdili su da su glavni prouzrokovači truleži klipa kukuruza vrste *F. asiaticum*, *F. meridionale* i *F. boothii*, dok vrsta *F. graminearum* ss, koja dominira na kukuruzu širom sveta, nije detektovana.

(ii) **Rasprostranjenost vrsta *Fg* kompleksa u Africi.** Istraživanja o diverzitetu vrsta *Fg* kompleksa u Africi sprovedli su O'Donnell et al. (2008) i po prvi put su identifikovali vrstu *F. aethiopicum* na pšenici. Pretpostavlja se da je *F. aethiopicum* zajedno sa vrstom *F. acacia-mearnsii* endemska vrsta na južnoj hemisferi. Svi izolati *F. aethiopicum* izolovani su u Etiopiji, dok su izolati *F. acacia-mearnsii* poreklom iz Južne Afrike (O'Donnell et al., 2000). Opširnije istraživanje o diverzitetu vrsta *Fg* kompleksa je sprovedeno u Južnoj Africi gde su Boutigny et al. (2011) analizirali 560 izolata poreklom sa pšenice, ječma i kukuruza. Više od 85% izolata sa pšenice i ječma svrstani su u *F. graminearum* ss, nasuprot tome, na kukuruzu je izolovana vrsta *F. boothii*. U Keniji, Wagacha et al. (2010) identifikovali su 19 različitih vrsta na pšenici, oko 80%

su činile vrste *F. graminearum* i *F. boothii* zajedno sa drugim vrstama koje nisu pripadnici *Fg* kompleksa.

(iii) **Rasprostranjenost vrsta *Fg* kompleksa u Americi.** Istarživanja o FHB u Južnoj Americi uglavnom su sprovedena u umerenim regionima severne Argentine, Južnom Brazilu i Urugvaju, kao glavnim područjima gajenja žita. U okviru *Fg* kompleksa sa kukuruza izolovane su vrste *F. meridionale* i *F. boothii* koje su endemske u Južnoj Americi (Sampietro et al., 2011; Aoki et al., 2012). Nasuprot tome, prethodna istraživanja koja su sproveli Ramirez et al. (2007) u Argentini pokazala su da je svih 113 izolata koji su prikupljeni sa pšenice pripadalo vrsti *F. graminearum* ss. Uočeno je da se na pšenici javlja *F. graminearum* ss, na kukuruza *F. meridionale*, dok se na pirinču javlja *F. asiaticum* (Del Ponte et al., 2013).

(iv) **Rasprostranjenost vrsta *Fg* kompleksa u Australiji.** Malo informacija je dostupno kada je u pitanju rasprostranjenost vrsta *Fg* kompleksa u Australiji. Monds et al. (2005) su sa zrna pšenice poreklom sa Novog Zelanda izolavali dve vrste *F. graminearum* ss i *F. cortaderie*, dok su Hussein et al. (2002) uočili prisustvo *F. graminearum* ss na zrnu kukuruza.

(vi) **Rasprostranjenost vrsta *Fg* kompleksa u Evropi.** U Evropi postoji malo informacija o distribuciji vrsta *Fg* kompleksa. Utvrđeno je da je u Francuskoj (Waalwijk et al., 2008), Nemačkoj (Talas et al., 2011) i Italiji (Prodi et al., 2009, 2011) dominantna vrsta *F. graminearum* ss. U istraživanjima koja su sprovedena u Italiji na zrnu pšenice i kukuruza, Somma et al. (2014) su pored vrste *F. graminearum* ss koja je dominantna (88/90), identifikovali prvi put vrstu *F. cortaderiae* (2/90). Sa zrna pšenice sakupljene tokom 2002. godine na teritoriji Mađarske prvi put je izolovana vrsta *F. vorosii* (Toth et al., 2005; Starkey et al., 2007) i *F. boothii* (Backhouse, 2014). Boutigny et al. (2014) su identifikovali *F. graminearum* ss kao dominantnu vrstu *Fg* kompleksa na pšenici, ječmu i kukuruza u Francuskoj.

U Srbiji do sada nema informacija o rasprostranjenosti vrsta *Fg* kompleksa. U Mađarskoj, identifikovane su vrste *F. vorosii* i *F. boothii*, pa se, s obzirom na geografsku blizinu kao i slične klimatske i agroekološke uslove, može očekivati pojava pomenutih vrsta i u Srbiji.

Iako su osnovni faktori za geografsku rasprostranjenost vrsta, a samim tim i hemotipova u okviru *Fg* kompleksa nepoznati, pojava određenih vrsta se poklapa sa

ekološkim, odnosno temperaturnim zahtevima određenih vrsta u okviru *Fg* kompleksa. Utvrđeni su različiti genotipovi iste vrste kao i različitih vrsta *Fg* kompleksa u različitim lokalitetima (**Zhang et al.**, 2010). Ovo ukazuje na to da može doći do ukrštanja genotipova.

### 3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Rezultati dosadašnjih istraživanja u svetu ukazali su da se primenom filogenetske analize multilokusne DNK sekvence i GCPSR metode može razdvojiti 15 različitih vrsta u okviru *Fg* kompleksa. Međutim, u Srbiji ne postoje podaci o prisustvu i eventualnoj rasprostranjenosti ovih vrsta. Stoga je osnovni cilj ove disertacije bio da se analizom morfoloških, patogenih, toksigenih i molekularnih karakteristika izolata *F. graminearum* poreklom iz uzoraka pšenice, kukuruza i ječma iz različitih agroklimatskih uslova, utvrdi prisustvo, rasprostranjenost i diverzitet vrsta *Fg* kompleksa na teritoriji Srbije.

S obzirom na literaturne podatke o prisustvu novootkrivenih vrsta u susednim zemljama - *F. boothii* i *F. vorosii*, jedan od ciljeva bio je da se utvrdi njihovo eventualno prisustvo na zrnju strnih žita i kukuruza gajenih u Srbiji.

Brojni rezultati iz svetske literature ukazuju na veliki diverzitet vrsta u okviru *Fg* kompleksa, pa je jedan od ciljeva ove disertacije bio da se prouči varijabilnost ispitivanih izolata vrste *F. graminearum* u pogledu morfoloških svojstava na osnovu makroskopskih i mikroskopskih karakteristika monosporijalnih kultura ispitivanih izolata. Patogenost ispitivanih izolata vrste *F. graminearum* primenom veštačke inokulacije biljaka u poljskim i laboratorijskim uslovima, ispitivana je u cilju utvrđivanja ovog svojstva, kao i ispitivanja varijabilnosti patogenih svojstava izolata.

Sposobnost sinteze mikotoksina je, s obzirom na veliki značaj u proizvodnji zdravstveno bezbedne hrane, jedna od značajnijih karakteristika vrsta roda *Fusarium*, pa je cilj u okviru ovih istraživanja bio i da se odredi sposobnost ispitivanih izolata da sintetišu mikotoksine DON i ZEA, kao i da se kvantitativnom i kvalitativnom analizom ispita njihova varijabilnost u sintezi mikotoksina. Jedan od ciljeva ove disertacije bio je da se hemijskim i molekularnim analizama izolata *F. graminearum* različitog porekla utvrdi njihova pripadnost određenom hemotipu (3ADON, 15ADON i NIV).

U cilju molekularne karakterizacije izolata *F. graminearum* poreklom sa zrna žita u Srbiji, u ovoj disertaciji izvršiće se sekvenciranje više genomnih regiona odabranih izolata, kao i njihovo međusobno poređenje i određivanje filogenetskog

međudnosa sa izolatima *F. graminearum* deponovanih u NCBI bazi podataka, što će doprineti boljem poznavanju diverziteta vrsta *Fg* kompleksa u svetu.

## 4. MATERIJAL I METODE

Za proučavanje diverziteta vrste *F. graminearum* korišćeni su izolati iz kolekcije Laboratorije za fitopatologiju Instituta za kukuruz "Zemun Polje". Odabran je 101 izolat koji su prikupljeni u periodu od 1993. do 2015. godine, poreklom iz uzoraka pšenice (42), kukuruza (37) i ječma (22) iz 41 lokaliteta na teritoriji Srbije (Tabela 1). Izolati su prethodno identifikovani konvencionalnim metodama na osnovu makroskopskih i mikroskopskih karakteristika. Oni su za dalji rad čuvani u ampulama sa zakošenom PDA podlogom u frižideru na temperaturi od 4°C. Izolati su presejavani jednom godišnje.

### 4.1. Dobijanje čistih kultura i njihovo čuvanje

Kulture gljive *F. graminearum* prečišćene su postupkom monosporijalne izolacije u cilju dobijanja uniformnih i čistih kultura (Nelson et al., 1983; Burgess et al., 1994; Leslie and Summerell, 2006). Izolati *F. graminearum* gajeni su 10 dana na podlozi vodenog agara sa sterilnim fragmentima lista karanfila (carnation leaf agar, CLA) (Fisher et al., 1982), koja stimulatивно deluje na sporulaciju ove vrste i obilno formiraju sporodohije sa makrokonidijama ujednačenog oblika i veličine, pri kombinaciji fluorescentne i ultraljubičaste svetlosti na 20°C. Podloga je pripremana od 20 g agara (Agar, Merck KgaA, Germany), 1000 ml destilovane vode i sterilisanih fragmenata lista karanfila (gama zracima) veličine oko 6 mm. U Petri kutije pre razlivanja podloge stavljano je po 5 fragmenata lista karanfila na 10 ml podloge.

Sterilnom kopljastom iglom zahvaćena je jedna sporodohija gljive koja je prenetu u epruvetu sa 10 ml sterilne vode. Suspenzija spora je protresena na vorteksu u trajanju od 10 sekundi, a zatim je 1 ml suspenzije (1:10) nanesen kružnim pokretima po celoj površini krompir dekstrozne podloge (potato dextrose agar, PDA) (Burgess et al., 1994) u Petri kutije (Ø100 mm). Kutije su zatim držane u mraku pod uglom od 45°C u trajanju od 24 h na temperaturi od 25°C. PDA podloga je pripremana od 42 g krompir dekstroznog agara (potato dextrose agar, Biolife, Italia) u koji je doliveno 1000 ml destilovane vode a zatim je mešano na magnetnoj mešalici do rastvaranja agara. Nakon mešanja, podloga je sterilisana u autoklavu 20 min na 120°C pri pritisku od 1,2 bara.

Nakon inkubacije, pomoću stereomikroskopa pregledana je površina Petri kutije, a zatim je sterilnom iglom isečen komadić podloge sa prokljijalom pojedinačnom sporom koja je prenetna na PDA, a zatim su kulture inkubirane sedam dana u mraku na 25°C. Nakon inkubacije izolati su presejani u ampule sa zakošenom PDA podlogom. Ovako prečišćene monosporijalne kulture svakog izolata su nakon sedam dana inkubacije u termostatu na 25°C čuvane za dalji rad u frižideru na +4°C.

**Tabela 1.** Lista ispitivanih izolata *Fusarium graminearum*

Izolat	Lokalitet	Godina izolacije	Biljka domaćin
257	Z.Polje	2004	Kukuruz
581	Z.Polje	2005	Kukuruz
656	Z.Polje	2005	Kukuruz
699	Z.Polje	2005	Kukuruz
762	Titel	2005	Kukuruz
880	Bač	2006	Kukuruz
914	Z.Polje	1996	Kukuruz
943/2	Novi Sad	2006	Kukuruz
971	Novi Sad	2006	Kukuruz
1010	Novi Sad	2006	Kukuruz
1030	Indija	1999	Kukuruz
1133	Senta	2006	Kukuruz
1165	Z.Polje	2006	Kukuruz
1195	Krnješevci	2006	Kukuruz
1199	Krnješevci	2006	Kukuruz
1211	Kikinda	2006	Kukuruz
1249	Loznica	2006	Kukuruz
1255	Kovin	2006	Kukuruz
1268	Sombor	2006	Kukuruz
1282/2	B.Topola	2006	Kukuruz
1368	Šabac	2007	Kukuruz
1408	Kraljevo	2007	Kukuruz
1419	Kraljevo	2007	Kukuruz
1482/2	Apatin	2007	Kukuruz
1495	Z.Polje	2007	Kukuruz
1554/2	B.Petrovac	2007	Kukuruz
1649	Loznica	2007	Kukuruz
1673	Z.Polje	2008	Kukuruz
1696	Zrenjanin	2008	Kukuruz
1751	Požarevac	1994	Kukuruz
2533	Z.Polje	2010	Kukuruz
2624	Bajmok	2010	Kukuruz
2811	Požarevac	1993	Kukuruz
2812	V.Plana	1998	Kukuruz



<b>Izolati</b>	<b>Lokalitet</b>	<b>Godina izolacije</b>	<b>Biljka domaćin</b>
2813	S.Mitrovica	1999	Kukuruz
2815	Z.Polje	1999	Kukuruz
2822	Srbobran	1999	Kukuruz
203	S.Mitrovica	2003	Pšenica
618	Z.Polje	2005	Pšenica
670	Sombor	2005	Pšenica
677	Sombor	2005	Pšenica
681	Sombor	2005	Pšenica
687/2	Kikinda	2005	Pšenica
744	Niš	2005	Pšenica
749	Loznica	2005	Pšenica
763	Ruma	2005	Pšenica
764	Novi Sad	2005	Pšenica
766	Požarevac	2005	Pšenica
767	Čačak	2005	Pšenica
779/2	Zobnatica	2005	Pšenica
789	Krsmanovača	2005	Pšenica
795	B.Palanka	2005	Pšenica
800	N.Pazova	2005	Pšenica
825	Despotovo	2005	Pšenica
831	V.Radinci	2005	Pšenica
836	S.Banovci	2005	Pšenica
864	Taraš	2005	Pšenica
866	Vršac	2005	Pšenica
870	Knićanin	2006	Pšenica
892	V.Radinci	2006	Pšenica
1012	Kraljevo	2006	Pšenica
1337	Kovin	2006	Pšenica
1339/2	Kikinda	2006	Pšenica
1343	B.Petrovac	2006	Pšenica
1348	V.Radinci	2006	Pšenica
1351/2	Novi Sad	2007	Pšenica
1370	Kikinda	2007	Pšenica
1443	Kraljevo	2007	Pšenica
1485	Indija	2007	Pšenica
1486/2	Aleksinac	2007	Pšenica
1490/2	Sombor	2007	Pšenica
1746	Z.Polje	2010	Pšenica
2621	Bela Crkva	2010	Pšenica
2625	Pad.Skela	2010	Pšenica
2635	Z.Polje	2010	Pšenica
2818	Ruma	2002	Pšenica
2820	Pad.Skela	1997	Pšenica
2823	Erdevik	2002	Pšenica
4135	Z.Polje	2015	Pšenica

Izolati	Lokalitet	Godina izolacije	Biljka domaćin
654	Z.Polje	2005	Ječam
770/2	Bač	2005	Ječam
798	Zobnatica	2005	Ječam
805	N.Pazova	2005	Ječam
891/2	S.Mitrovica	2006	Ječam
1217/2	Kraljevo	2006	Ječam
1493	Loznica	2007	Ječam
1517	Novi Sad	2007	Ječam
1526	B.Petrovac	2007	Ječam
1528	Indija	2007	Ječam
1534	N.Pazova	2007	Ječam
1772	Sombor	2008	Ječam
1800	Sombor	2008	Ječam
1801	Sombor	2008	Ječam
1812	Sombor	2008	Ječam
1839	Sombor	2009	Ječam
2045	Z.Polje	2009	Ječam
2078	Z.Polje	2009	Ječam
2254	Z.Polje	2009	Ječam
2630	Šabac	2010	Ječam
2672	Z.Polje	2010	Ječam
2627	R.Šančevi	2010	Ječam

#### 4.2. Metode za proveru patogenih svojstava *Fusarium graminearum*

Varijabilnost patogenih svojstava ispitivanih izolata vrste *F. graminearum* proučavana je primenom veštačke inokulacije biljaka korišćenjem tri testa patogenosti: test patogenosti na listu ječma, na klipku kukuruza i klasu pšenice. Za ova proučavanja korišćeni su svi ispitivani izolati (101).

##### 4.2.1. Test patogenosti na listu ječma

U cilju provere patogenosti ispitivanih izolata korišćena je metoda koju su opisali **Imathiu et al.** (2009). Prema ovoj metodi izvršena je inokulacija prvog lista ječma pomoću suspenzije spora ispitivanih izolata *F. graminearum*.

U saksije veličine 15x30 cm, u supstratu za cveće Floragard (Germany), posejano je seme ječma ozime sorte Nektar. Biljke su gajene u fitotronu dve nedelje pri dnevnoj temperaturi 20°C i noćnoj 18°C sa dužinom fotoperioda od 12 h. Zalivanje biljaka je vršeno po potrebi u zavisnosti od vlažnosti supstrata. Nakon dve nedelje prvi

list klijanca sečen je na dužinu od 4 cm od vrha. Po osam isečaka lista je stavljano u Petri kutije Ø 150 mm prethodno obloženih sa filter papirom koji je navlažen sterilnom destilovanom vodom. Listovi su u središnjem delu inokulisani sa 5 µl suspenzije konidija gljive *F. graminearum*.

Inokulum je pripreman od kultura izolata starih 14 dana, odgajanih na SNA podlozi - sintetička hranljiva podloga (sintetic nutrition agar) (**Burgess et al.**, 1994) pri kombinaciji fluorescentne i ultraljubičaste svetlosti na 20°C. SNA podloga je pripremana od 23 g agara (Agar, Merck KGaA, Germany), 1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g KNO<sub>3</sub>, 0,5 g MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O, 0,5 g KCl, 0,2 g glukoze (D- Glucose, Fisher Scientific UK), 0,2 g saharoze (Saharose, Fisher Scientific UK), 0,6 ml 1M NaOH i 1 l destilovane vode. Komponente za ovu podlogu rastvorene su u 100 ml destilovane vode uz mešanje na magnetnoj mešalici. Agar je rastvoren u 900 ml destilovane vode i smeše su sjedinjene pre sterilizacije u autoklavu (na 120°C pri pritisku od 1,2 bara u trajanju od 20 min). Na površinu podloge, koja je prethodno prohlađena stavljen je sterilisan filter papir veličine 1x2 cm koji stimuliše sporulaciju gljiva.

U Petri kutije Ø 100 mm sa razvijenom kolonijom gljive nanese se po 10 ml sterilne vode, a zatim je sterilnim štapićem, blagim pokretima, skinuta micelija gljive u cilju oslobađanja formiranih konidija. Dobijena suspenzija spora proceđena je kroz sterilnu gazu, a koncentracija konidija je podešena pomoću hemocitometra na približno 1x10<sup>5</sup> konidija/ml. Tako pripremljenom suspenzijom inokulisano je 8 listova u četiri ponavljanja, ukupno 32 lista po izolatu. Kao negativna kontrola korišćeni su listovi inokulisani sterilnom destilovanom vodom. Inkubacija inokulisanih listova obavljena je u termostatu na temperaturi od 25°C. U cilju obezbeđivanja uslova povišene vlažnosti, filter papir je kvašen sa 2 ml sterilne destilovane vode svaki drugi dan. Pojava simptoma posmatrana je svakodnevno a nakon pet dana merena je dužina pega.

#### **4.2.2. Test patogenosti na klipu kukuruza**

Patogenost izolata *F. graminearum* na kukuruzu u poljskim uslovima izvršena je veštačkim inokulacijama klipa po metodi koju su opisali **Reid et al.** (1996).

Patogenost izolata proveravana je tokom 2011. i 2012. godine na hibridu kukuruza ZP434, na oglednoj parceli Instituta za kukuruz u Zemun Polju. Ogled je postavljen po slučajnom split-plot eksperimentalnom dizajnu. Setva kukuruza obavljena

je u 101 red pošto je svaki red inokulisan sa po jednim izolatom. U redu je bilo po 20 biljaka na međurednom rastojanju 70 cm, a biljke su sejane na 25 cm u redu.

Za ova ispitivanja korišćeni su svi ispitivani izolati *F. graminearum*. Veštačka inokulacija je izvršena treći dan nakon svilanja biljaka, injektiranjem 2 ml suspenzije konidija približno  $1 \times 10^5$  konidija/ml u kanal svile klipa kukuruza vodeći računa da prilikom unošenja patogena ne dođe do povređivanja klipa. Inokulum je pripremljen na isti način kao za test patogenosti u laboratorijskim uslovima. Patogen je direktno unošen u tkivo domaćina pomoću sterilnog šprica i igle. Inokulisano je po 5 biljaka u 4 ponavljanja, što je ukupno 20 biljaka po izolatu. Kod kontrolnih biljaka primenjen je isti postupak, a umesto inokuluma korišćena je sterilna voda.

Ocenjivanje stepena patogenosti izolata je izvršeno na osnovu prisustva simptoma ružičaste truleži koju prouzrokuje ispitivani patogen. U fazi tehnološke zrelosti kukuruza ocenjen je intenzitet fuzarioze klipa prema skali od 1 do 7 (**Reid et al., 1996**) gde je:

- 1- bez simptoma zaraze
- 2- 1-3% zaražene površine klipa
- 3- 4-10% zaražene površine klipa
- 4- 11-25% zaražene površine klipa
- 5- 26-50% zaražene površine klipa
- 6- 51-75% zaražene površine klipa
- 7- 76-100% zaražene površine klipa

#### **4.2.3. Test patogenosti na klasu pšenice**

Za proveru patogenosti izolata *F. graminearum* na pšenici u poljskim uslovima izvršena je veštačka inokulacija klasa po metodi koju su opisali **Mesterhazy et al. (1999)**. Patogenost izolata proveravana je tokom 2011. i 2012. godine na sorti pšenice Renesansa, na oglednoj parceli Instituta za kukuruz u Zemun Polju. Ogled je postavljen po slučajnom split-plot eksperimentalnom dizajnu.

Za proveru patogenosti korišćeni su svi ispitivani izolati *F. graminearum* (101). Veštačka inokulacija klasa izvršena je u vreme cvetanja pšenice suspenzijom spora vrste *F. graminearum*, čija je koncentracija bila približno  $1 \times 10^5$  konidija/ml. Inokulum je pripremljen na isti način kao za test patogenosti u laboratorijskim uslovima. Patogen je

pomoću ručne prskalice nanošen na klas pšenice. Inokulisano je po 30 biljaka po izolatu, u tri ponavljanja. Količina inokuluma koji je korišćen po ponavljanju je bio 30 ml, dok su biljke u kontroli tretirane istom količinom destilovane vode. Posle inokulacije klasovi su izolovani prethodno vodom navlaženim PVC kesama, koje su uklonjene nakon 48 h.

Dve nedelje nakon inokulacije izvršena je ocena stepena infekcije, na osnovu prisustva simptoma fuzarioze klasa po skali od 1-7 (**Blandino et al.**, 2012) gde je:

- 1- 0 do 5% zahvaćene površine klasića
- 2- 5 do 15% zahvaćene površine klasića
- 3- 15 do 30% zahvaćene površine klasića
- 4- 30 do 50% zahvaćene površine klasića
- 5- 50 do 75% zahvaćene površine klasića
- 6- 75 do 90% zahvaćene površine klasića
- 7- 90 do 100% zahvaćene površine klasića

#### **4.3. Utvrđivanje varijabilnosti morfoloških svojstava *Fusarium graminearum***

Varijabilnost vrste *F. graminearum* u pogledu morfoloških svojstava proučavana je na osnovu makroskopskih i mikroskopskih svojstava monosporijalnih kultura svih 101 izolata gajenih pri određenim uslovima.

##### **4.3.1. Varijabilnost anamornog stadijuma**

(i) **Makroskopske karakteristike.** Ove karakteristike proučavane su gajenjem izolata *F. graminearum* na PDA podlozi u tami na 25°C tokom sedam dana. Za proučavanje ovih svojstava kod svih izolata praćen je:

- a) izgled i boja kolonija, izgled i boja ivice kolonije
- b) pigmentacija podloge i
- c) brzina porasta micelije merenjem prečnika kolonije drugog i četvrtog dana nakon presejavanja
- d) prisustvo plodonosnih tvorevina (**Muntañola-Cvetković**, 1987)

(ii) **Mikroskopske karakteristike.** Od mikroskopskih karakteristika proučavani su oblik i dimenzije makrokonidija. Ova morfološka svojstva proučavana su gajenjem

izolata u trajanju 10-14 dana na SNA i CLA podlozi (Nirenberg and O'Donell, 1998) pri smenjivanju ultraljubičaste svetlosti i tame u intervalu od po 12 h. Ove kulture su pregledane *in situ* pomoću optičkog mikroskopa (Opton) pri uvećanju od 40x, a zatim su od svih izolata pravljeni nativni preparati za merenje dužine i širine makrokonidija. Za svaki izolat izmereno je po 50 makrokonidija koje su odabrane na slučajan način u vidnom polju nativnog preparata.

#### 4.3.2. Varijabilnost teleomornog stadijuma

Pored proučavanja anamornog stadijuma ispitivano je prisustvo teleomornih struktura-peritecija koje formira vrsta *F. graminearum*. Na podlozi od šargarepe (CA – carrot agar) (Kllitich and Leslie, 1994) zasejani su ispitivani izolati *F. graminearum* koji su gajeni na 20°C u mraku. Podloga je pripravljena od 400 g očišćene i isečene šargarepe na kolutove sa 400 ml destilovane vode i sterilisana 20 min u autoklavu. Nakon hlađenja, šargarepa je izmiksana do kašastog stanja, a zatim joj je dodato 500 ml destilovane vode i 20 g agara (Agar, Merck KgaA, Germany). Ovako pripravljena podloga je ponovo sterilisana na 120°C pri pritisku od 1,2 bara, u trajanju od 20 min. Sterilna podloga razlivena je u Petri kutije Ø 60 mm, po 15-17 ml podloge ili skoro do vrha kutije zbog dužeg vremenskog perioda gajenja gljive. Nakon pet nedelja, u intervalima od nedelju dana, pregledane su kulture pod binokularom. Peritecije su izdvojene pomoću sterilne kopljaste igle i prenete u kap tečnosti na mikroskopskoj pločici, a zatim smrvljene iglom radi ispitivanja prisutva reproduktivnih struktura i posmatranja izgleda i osobina askospora, pri uvećanju od 40x.

#### 4.4. Utvrđivanje varijabilnosti toksigenih svojstava *Fusarium graminearum*

Za kvalitativno i kvantitativno određivanje mikotoksina primenjuju se različite analitičke metode, ali su svakako najzastupljenije tečna hromatografija visokog učinka (HPLC) i enzimski imunosorpcioni test (ELISA). Analiza potencijala produkcije najznačajnijih mikotoksina DON i ZEA koje sintetiše vrsta *F. graminearum* urađena je pomoću ELISA metode, dok je HPLC metodom određena koncentracija i trihotecenski hemotip (3ADON, 15ADON i NIV).

Pripremanje uzorka za kvantitativne i kvalitativne mikotoksikološke analize izvršeno je na sterilnom zrnju kukuruza po metodi koju su opisali Logrieco et al. (1995).

Postupak se sastojao iz nekoliko koraka koji su obuhvatali pripremu supstrata za inokulaciju, inokulaciju supstrata, sušenje, mlevenje i čuvanje inokulisanog supstrata.

**Priprema supstrata.** U Erlenmajerove kolbe od 250 ml izmešano je po 50 g zrna kukuruza i 22,5 ml destilovane vode, a zatim su boce zatvorene aluminijumskom folijom i ostavljene 24 h na sobnoj temperaturi kako bi se postigla vlaga semena od 45%. Nakon 24 h Erlenmajerove kolbe sa zrnom kukuruza su sterilisane 30 minuta u autoklavu na temperaturi od 120°C i pritisku od 1,2 bara. Kada se supstrat u Erlenmajer kolbama ohladio izvršena je inokulacija zrna.

**Inokulacija supstrata.** Za inokulum korišćeni su izolati *F. graminearum* koji su gajeni na PDA sedam dana pri temperaturi od 25°C. Inokulacija sterilnog zrna kukuruza izvršena je sa tri isečka (veličine 0,5x0,5 cm) kolonije gljive razvijene na PDA podlozi. Nakon inokulacije, Erlenmajerove kolbe su zatvorene i obložene celom površinom aluminijumskom folijom, kako bi se sprečio prodor svetlosti i odložene su u termostat pri temperaturi od 25°C. Kolbe su svakodnevno protresane tokom dve nedelje radi ujednačenog razvoja gljive i sprečavanja slepljivanja (konglomeracije) uzorka.

**Sušenje, mlevenje i čuvanje inokulisanog supstrata.** Inokulisana zrna kukuruza nakon inkubacije prebačena su u aluminijumske posude i sušena u ventilacionoj sušnici na temperaturi od 50°C. Nakon tri dana, zrna su samlevena pomoću laboratorijskog mlina (A11 IKA, Germany) do praškastog stanja. Posle svakog samlevenog uzorka mlin je čišćen sa alkoholom i vatom kako bi se sprečila kontaminacija. Samleveni uzorci čuvani su do analize mikotoksina u frižideru na +4°C, najduže u trajanju od 15 dana.

#### **4.4.1. Određivanje potencijala produkcije mikotoksina ELISA testom**

ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) je brz imunoheмиjski test koji se koristi za detekciju supstanci koje imaju antigena svojstva. Ovi testovi visoko su osetljivi i specifični.

Princip ELISA metode zasnovan je na postojanju bunarčića sa anti-toksin antitelom. U toku inkubacije toksin prisutan u uzorku i enzimski toksin iz konjugata su u kompeticiji za vezujuća mesta na anti-toksin antitelima koja se nalaze u bunarčićima. U procesu ispiranja svi nevezani molekuli toksina i enzimskog konjugata se uklanjaju. Enzimska aktivnost određuje se dodavanjem određene količine hromogenog supstrata

koji boji enzim u plavo. Dodavanjem stop reagensa boji se postojeći plavi rastvor u žuto. Merenje apsorbance vrši se na 450 nm, a jačina obojenosti obrnuto je proporcionalna koncentraciji toksina u uzorku. Optička gustina uzorka poredi se sa optičkom gustinom standarda na osnovu kojih Elisa čitač preračunava koncentraciju toksina u uzorku.

ELISA metoda se sastoji iz dva koraka: ekstrakcije mikotoksina iz uzorka određenim rastvaračem i određivanje koncentracije mikotoksina pomoću ELISA čitača na talasnoj dužini od 450 nm.

**Ekstrakcija mikotoksina.** Ekstrakcija mikotoksina za kvalitativnu i kvantitativnu analizu potencijala produkcije mikotoksina obavljena je prema uputstvu proizvođača: za ZEA korišćen je Celer ZON Test Kit (Tecna S.r.l., Italy), a za DON korišćen je Celer DON Test Kit (Tecna S.r.l., Italy).

Ekstrakcija mikotoksina za detekciju prisustva oba mikotoksina obavljena je na sledeći način:

- odmereno je po 5 g mlevenog uzorka (pripremljen na prethodno opisan način) i 1 g NaCl a zatim pomešani sa 25 ml rastvarača (70% rastvor metanola i destilovane vode) i homogenizovani u mikseru (Osterizer blender) na 1300 obrtaja u trajanju od 3 min,
- homogenizovana smeša uzorka procedena je kroz Whatman filter papir No 1, a filtrat je sakupljen u staklene bočice.

Ukoliko je koncentracija mikotoksina u uzorcima bila preko 1000 µg/kg kod ZEA, odnosno preko 5 µg/g kod DON-a, tada su filtrati ovih uzoraka razblaženi prema uputstvu proizvođača. Sva razblaženja koja nisu predviđena metodom uračunata su prilikom preračunavanja koncentracije mikotoksina.

**ELISA postupak.** Analiza je obuhvatala nekoliko koraka:

- u bunarčice za razblaženje sipano je po 100 µl konjugata
- zatim je dodato po 50 µl standarda/uzorka, koji su promešani pomoću višekanalne mikropipete,
- nakon mešanja po 100 µl preneseno je u bunarčice prekrivene antitelima i inkubirani na sobnoj temperaturi 10 min,



- posle inkubacije bunarčići su isprani puferom za ispiranje a zatim prosušeni na papirnoj vati,
- u prosušene bunarčiće sipano je po 100  $\mu$ l razvijaača i inkubirano na sobnoj temperaturi 5 min,
- nakon inkubacije, u svaki bunarčić dodato je po 50  $\mu$ l reagensa za zaustavljanje procesa, koji boji plavi rastvor u žuto.

Celer ZON Test kit sadrži pet standarda koncentracija od 0; 10; 50; 200 i 1000  $\mu$ g/kg, dok Celer DON Test kit sadrži standarde koncentracija 0; 0,04; 0,25; 1,25 i 5  $\mu$ g/g. Koeficient iskoristljivosti (recovery coefficient) za DON bio je 109 ( $\pm$  16) %, a za ZEA 108 ( $\pm$  7) %. Određivanje koncentracije mikotoksina vršeno je na talasnoj dužini od 450 nm pomoću ELISA čitača (BioTek EL x 800<sup>TM</sup>) koji preračunava koncentraciju mikotoksina izraženu u jedinicama  $\mu$ g/kg za ZEA i  $\mu$ g/g za DON.

#### **4.4.2. Kvalitativno i kvantitativno određivanje nivalenola i acetil-estar derivata deoksinivalenola metodom visoko efikasne tečne hromatografije sa UV detekcijom**

Visoko efikasna tečna hromatografija (**H**igh **P**erformance **L**iquid **C**hromatography – HPLC) je analitička metoda koja se koristi za razdvajanje, identifikaciju i kvantifikaciju različitih komponentni u uzorku na osnovu različite raspodele između stacionarne (nepokretne) i mobilne (pokretne) faze. Uzorak se u sistem injektuje, pomoću autosemlera, i u struji mobilne faze unosi na kolonu, gde se analizirane komponente, u zavisnosti od svoje hemijske prirode, različito zadržavaju. Vreme koje je potrebno da se ispitivana komponenta eluira sa kolone naziva se retenciono vreme (retention time -  $t_R$ ). Poređenjem  $t_R$  analizirane komponente sa  $t_R$  standarda vrši se identifikacija. Svaki HPLC sistem povezan je sa detektorom (ili više) gde se registruje izdavanje odgovarajuće komponente sa kolone i šalje električni signal. Pomoću specijalnog softverskog programa električni signal se obrađuje i dobijaju se hromatogrami koji služe za identifikaciju i kvantifikaciju komponenti u uzorku.

U analitici NIV-a, DON-a, kao i njegovih acetil-estar derivata (3ADON i 15ADON), zbog apsorpcije u ultraljubičastoj (UV) oblasti, najveću primenu ima visoko efikasna tečna hromatografija sa fotodiodnim detektorom (**D**iode **A**rray **D**etector -

DAD). Shodno tome, pomenuta metoda primenjena je za analizu mikotoksina NIV, DON, 3ADON i 15ADON i na osnovu nje određena je pripadnost ispitivanih izolata gljive *F. graminearum* odgovarajućem hemotipu.

Priprema uzorka obuhvata ekstrakciju, prečišćavanje i filtriranje ekstrakta. Svrha ekstrakcije je da iz ispitivanog uzorka u rastvarač pređe što veća količina mikotoksina. Kako bi se osigurala maksimalna ekstrakcija, najvažniji je dobar izbor organskog rastvarača ili njegove mešavine. Rastvarač mora biti niske toksičnosti, isparljiv i stabilan. Mešavina rastvarača sa vodom je često efikasnija od čistog rastvarača, jer voda omogućava bubrenje u pucanje ćelija i pomaže oslobađanju mikotoksina (**Scudamore**, 2005). **Mateo et al.** (2001) u svojoj studiji pokazali su da je najbolji odnos acetonitrila (organskog rastvarača) i vode za ekstrakciju trihotecena iz uzorka 21:4, v/v stoga je taj odnos i korišćen. Takođe, prema uputstvu proizvođača MycoSep kolona (Romer Labs) za prečišćavanje uzoraka preporučen je isti odnos acetonitrila i vode. U odmeren uzorak (5 g) dodato je 25 ml smeše acetonitril:voda, (84:16, v/v), a zatim je smeša homogenizovana u blenderu na maksimalnoj brzini u trajanju od 60 sekundi. Nakon ceđenja kroz Whatman filter papir br. 41, filtrat je podeljen na dva dela. Prvi deo filtrata propušten je kroz MycoSep 113 Trich (Romer Labs, USA) kolonu u cilju dobijanja prečišćenog filtrata koji je očišćen od nečistoća i koji sadrži 3ADON i 15ADON. Drugi deo filtrata propušten je kroz MycoSep 230 Niv (Romer Labs, USA) koji sadrži samo NIV. Prečišćavanje je veoma bitan postupak u analizi mikotoksina, a naročito kada je koncentracija mikotoksina veoma niska, jer se povećava uspešnost analize. Različite nečistoće mogu ometati detekciju i određivanje mikotoksina i zato je neophodno izvršiti prečišćavanje ekstrakta. Korišćene MycoSep kolone su za jednokratnu upotrebu, a punjene su adsorbensima pomoću kojih se kroz kolonu propušta samo željeni mikotoksin. U toku rada sa kolonama važno je da se adsorbens u koloni ne osuši i da sadržaj protiče ujednačeno.

Nakon propuštanja kroz odgovarajuću MycoSep kolonu, ekstrakti su profiltrirani (17 mm, PTFE membrane 0,45 µm) i pomoću autosemplera (WPS-300SL) injektovani u Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific, Germany) tečni hromatografski sistem sa DAD-3000 detektorom (Thermo Scientific, Germany). Hromatografsko razdvajanje kako 3ADON i 15ADON tako i NIV izvršeno je na analitičkoj koloni Acclaim Polar Advantage II, C18 (150 × 4.6 mm, 3 µm) na 25°C. Injekciona zapremina za obe analize

bila je 10 µl. Za razdvajanje 3ADON i 15ADON kao mobilna faza korišćena je smeša voda:acetonitril (90:10; v/v) pri linearnom protoku od 1 ml/min, u toku 15 minuta. Hromatogrami su praćeni na 221 nm (Mateo et al., 2001). Kao mobilna faza za hromatografsko razdvajanje NIV korišćena je smeša voda:acetonitrile:metanol (90:5:5; v/v) pri linearnom protoku od 0,8 ml/min, u toku 15 minuta. Hromatogrami su praćeni na 218 nm (Yue et al., 2010). Početne koncentracije standardnih rastvora 3ADON i 15ADON (Romer Labs, USA) bile su 100,5 odnosno 101,2 µg/ml. Njihovim razblaživanjem na krajnje koncentracije: 0,01; 0,1; 0,5; 1; 5 i 10 µg/ml, dobijeni su radni rastvori, pomoću kojih je konstruisana i kalibraciona kriva, postavljanjem površine pika (odgovor detektora) prema datoj koncentraciji standarda. Granica detekcije za 3ADON i 15ADON iznosila je 27,63 odnosno 46,80 ng/ml, a granica kvantifikacije 92,11 odnosno 156,0 ng/ml. Početna koncentracija standardnog rastvora NIV (Romer Labs, USA) bila je 100,5 µg/ml. Daljim razblaživanjem na krajnje koncentracije: 0,01; 0,1; 0,5; 1; 2 i 5 µg/ml, dobijeni su radni rastvori, pomoću kojih je konstruisana kalibraciona kriva, postavljanjem površine pika (odgovor detektora) prema datoj koncentraciji standarda. Granica detekcije iznosila je 48,96 ng/ml, a granica kvantifikacije 163,21 ng/ml. Ispitivani mikotoksini identifikovani su poređenjem sa retencionim vremenom standarda. Za kvantitativna izračunavanja korišćena je kalibraciona kriva konstruisana nanošenjem vrednosti površine pika (odgovor detektora) na y osu, odnosno odgovarajuće koncentracije standarda na x osu. Za te svrhe korišćen je kompjuterski program Microsoft Excel 2010. Sadržaj mikotoksina je izražen kao µg/g suve mase a dobijen, kao srednja vrednost tri nezavisna injektovanja.

#### **4.5. Molekularne analize**

##### **4.5.1. Priprema izolata**

Za potrebe molekularne identifikacije *F. graminearum* kao i određivanja hemotipa, svi izolati su zasejavani na PDA podlogu i inkubirani u mraku na temperaturi od 25°C u trajanju od sedam dana. Nakon inkubacije sakupljena je vazдушna micelija sterilnim skalpelom iz razvijene kolonije gljive koja je dalje korišćena za ekstrakciju ukupne DNK. Sakupljanje micelije urađeno je pažljivo kako bi se izbeglo unošenje fragmenata podloge u početni materijal za ekstrakciju DNK.

#### **4.5.2. Izolacija DNK**

Izolacija ukupne količine dezoksiribonukleinske kiseline (DNK) urađena je korišćenjem komercijalnog kita DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) po uputstvu proizvođača.

Odmereno je 100 mg micelije koja je prebačena u tube zapremine 1,5 ml, a zatim je vršena homogenizacija pomoću tučka za jednokratnu upotrebu uz dodavanje tečnog azota. Nakon homogenizacije u tube dodato je po 400  $\mu$ l AP1 pufera i 4  $\mu$ l enzima RNase kako bi se eliminisale ribonukleinske kiseline (RNK). Tube sa suspenzijom su zatim lagano okretane kako bi se sadržaj promešao i stavljene u vodeno kupatilo na 65°C u trajanju od 15 minuta uz povremeno mešanje sadržaja tokom inkubacije, kako bi se ćelijski zid razgradio i oslobodio sadržaj a RNK razgradile u prisustvu enzima RNase. Posle završene inkubacije u tube je dodato po 130  $\mu$ l P3 pufera, a zatim su inkubirane na ledu 5 minuta. Nakon inkubacije sadržaj tuba je centrifugiran 5 minuta na 14000 rpm. Dodavanjem ovog pufera omogućeno je taloženje proteina i polisaharida. Kada je završeno centrifugiranje, oko 400  $\mu$ l lizata je polako preneto u Qiashredder mini spin kolone sa filterom, vodeći računa da se komadići taloga ne prenesu na filter. Tube od 2 ml na kojima se nalazi kolona sa filterom su centrifugirane 2 minuta na 14000 rpm. Sadržaj koji je propušten kroz filter (oko 400  $\mu$ l) prebačen je u nove tube od 2 ml. Dodato je 600  $\mu$ l AW1 pufera i suspenzija je promešana pomoću mikropipete. Nakon mešanja, oko 650  $\mu$ l suspenzije preneto je na DNeasy mini spin kolone sa filterom. Sadržaj tuba centrifugiran je 1 minut na 10 000 rpm, a tečna faza koja je propuštena kroz filter je odbačena. Preostala količina suspenzije preneti je na filter za koji se vezuju molekuli DNK i ponovljen je isti postupak. Posle centrifugiranja DNeasy mini spin kolone prebačene su u nove tube od 2 ml a zatim je usledilo ispiranje u dva navrata sa po 500  $\mu$ l AW2 pufera. Posle prvog dodavanja AW2 pufera DNeasy Mini spin kolone centrifugirane su 1 minut na 10 000 rpm, a posle drugog 2 minuta na 14 000 rpm. Na ovaj način uklonjene su sve nečistoće koje su se vezale za filter a ostala je samo DNK. Kolone su zatim prebačene u nove tube od 2 ml i dodato je po 100  $\mu$ l AE pufera. Uzorci su inkubirani 5 minuta na sobnoj temperaturi. Tokom inkubacije došlo je do oslobađanja DNK koje su bile vezane za filter. Posle završene inkubacije usledilo je centrifugiranje od 1 minuta na 10 000 rpm.

Propuštena tečna faza predstavljala je ukupnu izolovanu DNK koja je čuvana za dalje analize na -20°C.

#### 4.5.3. Određivanje koncentracije i proveravanje kvaliteta DNK

Nakon izolacije, koncentracija i kvalitet DNK provereni su pomoću spektrofotometra (Biochrom Libra S22, EU). Vršeno je merenje apsorbance 300x razblaženog uzorka u 0.1 x TE puferu na talasnim dužinama  $\lambda = 260$  i  $\lambda = 280$  nm. Koncentracija DNK je izračunata po formuli:

$$\text{conc.}(\mu\text{g}/\mu\text{L}) = \text{OD}_{260} \times R \times 50/1000$$

gde je:

OD<sub>260</sub> - apsorbanca na talasnoj dužini  $\lambda = 260$ ;

R - razblaženje uzorka;

50 - koncentracija 50  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  koja ima apsorbanču OD=1.

Čistoća uzorka procenjuje se preko odnosa OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>, ukoliko je dobijena vrednost u intervalu 1.8 - 2.0 onda je DNK dovoljno čista za dalju analizu. Po utvrđivanju koncentracije i kvaliteta, izolovana DNK je do upotrebe čuvana na -20 °C.

#### 4.5.4. Molekularna detekcija gena za produkciju trihotecenskih hemotipova (3ADON, 15ADON i NIV)

Toksikološki profil ispitivanih izolata *F. graminearum* je pored potencijala produkcije koji je urađen ELISA i HPLC metodom, potvrđen i multipleks PCR reakcijom. Hemotipovi su detektovani pomoću dva seta specifičnih prajmera (Ward et al., 2002) dizajniranih na osnovu sekvenci gena uključenih u produkciju trihotecena (*TRI3* – gen za 15-O-acetiltransferazu i *TRI2* – gen za efluks pumpu) i prikazani su u Tabeli 2.

**Tabela 2.** Pregled prajmera korišćenih za detekciju hemotipova

Gen	Prajmer	Sekvenca 5'-3'	Veličina fragmenta	Literaturni izvor
	3CON	TGGCAAAGACTGGTTCAC		
	3NA	GTGCACAGAATATACGAGC	840 bp	
<i>TR13</i>	3D15A	ACTGACCCAAGCTGCCATC	610 bp	
	3D3A	CGCATTGGCTAACACATG	243 bp	
	12CON	CATGAGCATGGTGATGTC		<b>Ward et al., (2002)</b>
<i>TR12</i>	12NF	TCTCCTCGTTGTATCTGG	840 bp	
	12-15F	TACAGCGGTCGCAACTTC	670 bp	
	12-3F	CTTTGGCAAGCCCGTGCA	410 bp	

Prvi set specifičnih prajmera uključuje prajmer zajednički za sve hemotipove (3CON), i tri specifična prajmera (3NA, 3D15A i 3D3A) za hemotipove NIV, 15ADON i 3ADON. Očekivana veličina amplifikovanih produkata za prvi set prajmera je 840bp (NIV), 610bp (15ADON) i 243bp (3ADON). Drugi set specifičnih prajmera uključuje prajmer zajednički za sve hemotipove (12CON), i tri hemotip specifična prajmera (12NF, 12-15F, 12-3F). Ovaj set specifičnih prajmera za detekciju hemotipova omogućava umnožavanje fragmenata veličine 840 bp (NIV), 670 bp (15ADON) i 410 bp (3ADON).

Obe multipleks PCR reakcije izvedene su u reakcionoj smeši finalne zapremine 10 µl, koja je pripremljena od: 1x komercijalni puffer (Thermo Fisher Scientific, USA), 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM dNTP, po 0,2 µM svakog prajmera, 0,5U *Taq* polimeraze, 50 ng/µl DNK i RNase-free voda (Molecular Biology Grade Water, Eppendorf) do zapremine od 10µl. Kao negativna kontrola korišćena je reakciona smeša u koju je umesto DNK uzorka dodata RNase-free voda. Reakcija umnožavanja željenih fragmenata izvedena je u PCR mašini (Thermocycler T1, Biometra, Germany) pri sledećim uslovima: inicijalna denaturacija na 94°C utrajanju od 2 minuta, denaturacija na 94°C u trajanju od 30 sekundi, vezivanje prajmera za ciljne sekvence na 52°C u trajanju od 30 sekundi i elongacije na 72°C u trajanju od 1 minut. Denaturacija, vezivanje prajmera za ciljne sekvence i elongacija ponavljaju se u 25 ciklusa.

#### 4.5.5. Vizuelizacija PCR produkata

Nakon završene PCR reakcije produkti su elektroforetski razdvojeni na 1% agaroznom gelu u 1xTBE puferu, a vizuelizacija je obavljena bojenjem etidijum bromidom i posmatranjem pod UV svetlom transluminatora. Gelovi su fotografisani pomoću sistema za dokumentaciju (*gel documentation system*, Bio Doc Analyze, Biometra, Germany). Gel za elektroforezu je pripremljen na sledeći način: u 35 ml 1xTBE pufera (90 mM Tris, 90 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1mM EDTA, Thermo Fisher Scientific, USA) dodato je 0,35 g agaroze i nakon rastvaranja usledilo je zagrevanje do temperature ključanja u mikrotalasnoj pećnici. Kada je gel ohlađen na približno 60°C, razliven je u prethodno pripremljen kalup sa postavljenim češljevima, a zatim je ostavljen da se polimerizuje oko 20 minuta. U kadicu za horizontalnu elektroforezu sipan je 1xTBE pufer do određene visine, i u njega je uronjen kalup sa polimerizovanim gelom. Prethodno je izvučen češalj, koji je postavljen da bi se formirali bunarčići u gelu u koje se nanose uzorci. U prvi bunarčić nanesen je marker 100 bp DNK (Thermo Fisher Scientific, USA) radi određivanja veličine produkta. Mešanjem 5 µl PCR produkta i 1 µl boje 6x Loading dye (Thermo Fisher Scientific, USA), uzorci su naneseni u bunarčiće po određenom redosledu. Elektroforeza je izvedena pri naponu od 100 V u trajanju od 40 minuta u aparatu za horizontalnu elektroforezu (BluePower 500, Serva, UK). Posle završene elektroforeze, gel je obojen u rastvoru etidijum bromida (0,5 µg/ml) u trajanju od 20 minuta, a zatim su gelovi posmatrani pod UV svetlom transluminatora i fotografisani. Veličina produkata ocenjena je na osnovu poređenja sa markerom.

#### 4.5.6. Molekularna identifikacija *Fusarium graminearum* primenom PCR reakcije

Izolati *F. graminearum* su pored morfoloških, patogenih i toksigenih karakteristika identifikovani i potvrđeni primenom PCR reakcije, umnožavanjem tri genomska segmenta gljive (elongacioni faktor *TEF-1α*, histon *H3* i *β-tubulin*) korišćenjem odgovarajućih parova prajmera (Tabela 3). Reakciona smeša, finalne zapremine 25 µl, pripremljena je od: 1x komercijalni pufer (Thermo Fisher Scientific, USA), 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 0,8mM dNTP, po 0,5µM prajmera (*forward* i *reverse*), 1U *Taq* polimeraze, 50 ng/µl DNK i RNase-free voda do 25 µl. Kao negativna kontrola

korišćena je reakciona smeša u koju je umesto DNK uzorka dodata RNase-free voda. Umnožavanje željenih sekvenci izvedeno je u PCR mašini (Thermocycler T1, Biometra, Germany).

Nakon umnožavanja specifičnih fragmenata, usledilo je njihovo sekvenciranje i poređenje sa sekvencama iz GenBank baze podataka (<http://blast.GenBank.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Na osnovu dobijenih podataka, rekonstruisano je flogenetsko stablo primenom odgovarajućih softvera.

**Tabela 3.** Prikaz prajmera korišćenih za identifikaciju *F. graminearum*

Gen	Prajmer	Prajmer Sekvenca (5'-.....-3')	Veličina fragmenta	Literaturni izvor
<i>TEF-1<math>\alpha</math></i>	ef1	ATGGGTAAG GAGGACAAG	~700 bp	<b>Geiser et al.</b> (2004)
	ef2	GGAAGTACCAGTGATCATG		
<i>Histon H3</i>	H3-1a	ACTAAGCAGACCGCCCGCAGG	~600bp	<b>O'Donnell et al.</b> (2004)
	H3-1b	GCGGGCGAGCTGGATGTCCTT		
<i><math>\beta</math>-tubulin</i>	T1	AACATGCGTGAGATTGTAAGT	~1300 bp	<b>O'Donnell and Cigelnik</b> (1997)
	T22	TCTGGATGTTGTTGGGAATCC		

**PCR reakcija sa parom prajmera ef1/ef2 (TEF- 1 $\alpha$ ).** Ovaj par prajmera omogućava umnožavanje proteinskog gena (elongacioni faktor, *TEF- 1 $\alpha$* ), koji je odgovoran za translaciju proteina prilikom rasta hifa gljiva. Utvrđeno je da ovaj gen pokazuje visok polimorfizam između sekvenci kod blisko srodnih vrsta (**Summerell et al.**, 2003; **Geiser et al.**, 2004; **Kristensen et al.**, 2005). PCR reakcija je izvedena pri sledećim uslovima: inicijalna denaturacija na 94°C u trajanju od 2 minuta, denaturacija na 94°C u trajanju od 1 minut, vezivanja prajmera za ciljne sekvence na 53°C u trajanju od 1 minuta i elongacije na 72°C u trajanju od 2 minuta. Završni korak elongacije traje 10 minuta. Denaturacija, vezivanje prajmera za ciljne sekvence i elongacija ponavljaju se u 35 ciklusa. Očekivana veličina traka za ovaj par prajmera je ~ 700 bp.

**PCR reakcija sa parom prajmera H3-1a/H3-1b.** Omogućava amplifikaciju gena za histon *H3* koji pokazuje visok polimorfizam sekvenci između blisko srodnih



vrsta, tj. sekvenca ovog dela genoma smatra se visoko informativnom na nivou vrste *F. graminearum* (O'Donnell et al., 2004). PCR umnožavanje izvedeno je pri sledećim uslovima: inicijalna denaturacija nukleinskih kiselina 10 minuta pri 94°C; 30 ciklusa koji se sastoje od denaturacije 30 sekundi pri 94°C, hibridizacije 30 sekundi pri 58°C, elongacije 30 sekundi pri 72°C i finalne elongacije pri 72°C u trajanju od 10 minuta (Somma et al., 2014). Prajmeri H3-1a/H3-1b umnožavaju segment DNK finalne dužine ~600 bp.

**PCR sa parom prajmera T1/T22.** Omogućava amplifikaciju gena za protein  $\beta$ -tubulin, PCR reakcija je izvedena pri sledećim uslovima: inicijalna denaturacija nukleinskih kiselina 10 minuta pri 94°C; 35 ciklusa koji se sastoje od denaturacije 30 sekundi pri 94°C, hibridizacije 30 sekundi pri 52°C, elongacije 90 sekundi pri 72°C i finalna elongacija pri 72°C u trajanju od 10 minuta (O'Donnell et al., 1998). Pozitivnom reakcijom smatrana je pojava traka produkta očekivane veličine oko ~1 300 bp.

Nakon završene PCR reakcije produkti su elektroforetski razdvojeni na 1% agaroznom gelu u 1xTBE puferu, a vizuelizacija je obavljena bojenjem etidijum bromidom i posmatranjem pod UV svetlom transluminatora, kao što je prethodno opisano kod određivanja hemotipova molekularnim metodama.

#### 4.5.7. Prečišćavanje PCR produkata i sekvenciranje

Posle uspešno obavljene amplifikacije, usledilo je prečišćavanje PCR produkata pomoću QIAquick PCR Purification Kit-a (Qiagen, Hilden, Germany), po uputstvu proizvođača. U tubice sa PCR produktima dodat je PBI puffer i to u zapremini pet puta većoj od količine PCR smeše i sve je dobro promešano. Zatim je smeša prebačena u QIAquick kolonu smeštenu u kolekcionu tubicu i centrifugirana 1 min na maksimalnom broju obrtaja (12 800 rpm) na sobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja tečna faza je odbačena, a u QIAquick kolonu dodato je 750  $\mu$ l PE pufera i centrifugirano 1 min pri brzini od 12 800 rpm na sobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja, tečna faza je odbačena, a u QIAquick kolone dodato je još 250  $\mu$ l istog pufera, centrifugirano pri istim uslovima i na kraju filtrat je odbačen. QIAquick kolona prebačena je u novu tubicu od 1,5 ml dodato je 50  $\mu$ l EB pufera i centrifugirano 1 min na 12 800 rpm. Propuštena

tečna faza predstavljala je prečišćenu DNK koja je čuvana na 4°C do kvantifikacije i pripreme za slanje na uslužno sekvenciranje.

Ovako prečišćeni uzorci elektroforetski su razdvojeni na 1% agaroznom gelu kako bi se proverila čistoća, koncentracija i kvalitet prečišćenih amplicona. Veličina umnoženih fragmenata je određena vizuelnim putem poređenjem dobijenih produkata sa fragmentima korišćenog markera 100 bp DNK (Thermo Fisher Scientific, USA). Prečišćeni ampliconi poslani su na uslužno sekvenciranje u oba smera na ABI 3730XL Automatic Sequencer u Macrogen Inc. (<http://dna.macrogen.com>, Korea). Dobijene sekvence obrađene su u programu FinchTV Version 1.4.0., nakon čega su dobijene konsenzus nukleotidne sekvence podnete u GenBank bazu podataka (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) i dodeljen im je pristupni broj (GenBank Accession Number).

#### 4.5.8. Molekularna identifikacija i karakterizacija patogena

Nakon sekvenciranja *TEF-1 $\alpha$* ,  *$\beta$ -tubulin* i *H3* genomnog regiona, urađena je molekularna identifikacija izolata *F. graminearum*, koji su poreklom iz različitih lokaliteta na teritoriji Srbije. Molekularna identifikacija ispitivanih izolata obavljena je višestrukim uparivanjem sekvenci izolata sa drugim sekvencama dostupnim u GenBank bazi podataka korišćenjem BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) alata i proračunom genetičke sličnosti pomoću softverskog paketa MEGA 6.0 (Tamura et al., 2011). Korišćenjem CLUSTAL W programa (Thompson et al., 1994), obavljena je potvrda identifikacije dobijenih sekvenci, na osnovu višestrukih poređenja dobijenih sekvenci odgovarajućih genomnih regiona gljiva sa sekvencama dostupnim u GenBank bazi podataka (<http://blast.GenBank.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Molekularna karakterizacija ispitivanih izolata obavljena je rekonstrukcijom filogenetskog stabla na osnovu *TEF-1 $\alpha$* ,  *$\beta$ -tubulin* i *H3* gena čime je pružen uvid u taksonomiju vrste *F. graminearum* u okviru *Fg* kompleksa, i ukazala na srodnost sa vrstama u okviru ovog kompleksa. Molekularna identifikacija svih ispitivanih izolata (101) *F. graminearum* obavljena je amplifikacijom *TEF-1 $\alpha$*  gena pomoću *ef1/ef2* para prajmera i sekvenciranjem dobijenog fragmenta. Nakon obrade dobijenih sekvenci, vršeno je njihovo međusobno poređenje korišćenjem softverskog paketa MEGA 6.0. Uočeno je da su neke sekvence bile identične među sobom i izdvojile su se u 12 različitih grupa (u okviru jedne grupe bile su identične sekvence) tako da je iz svake

grupe izabran po jedan predstavnik (687/2, 914, 1339/2, 1343, 1348, 1486/2, 1495, 1517, 1772, 2812, 2822, 4135). Ovih 12 izolata korišćeni su za dalje filogenetske analize (sekvenciranje  $\beta$ -*tubulina* i histon *H3* gena). Upoređivanje je vršeno sa 25 sekvenci različitih filogenetskih vrsta unutar *Fg* kompleksa poreklom iz različitih delova sveta koje su dostupne u GenBank bazi podataka (Tabela 4). Korišćenjem Maximum Parsimony metode, koja je integrisana unutar programa MEGA 6.0 i *bootstrap* analize u 1000 ponavljanja, rekonstruisano je filogenetsko stablo. Filogenetsko stablo je ukorenjeno sa spoljašnjom grupom vrste *F. pseudograminearum* (NRRL 28062), ranije poznata kao *F. graminearum* grupa I (Aoki and O'Donnell, 1999), koja je genetski bliska vrstama u okviru *Fg* kompleksa.

**Tabela 4.** Lista izolata korišćenih za filogenetske analize (referentni izolati preuzeti iz GenBank baze podataka)

Vrsta	Gen	Gen Bank pristupni broj	Broj izolata u u Gen Bank kolekciji	Literaturni navod
<i>F. graminearum</i>	<i>TEF- 1<math>\alpha</math></i>	AF212460	NRRL 28439	<b>O'Donnell et al., 2000</b>
		AF212461	NRRL 29169	
		AF212459	NRRL 28336	
	<i>histon H3</i>	AY452839	NRRL 28439	<b>O'Donnell et al., 2000</b>
		AY452836	NRRL 29169	
		AY452818	NRRL 28336	
	<i><math>\beta</math>-tubulin</i>	AF212777	NRRL 28439	<b>O'Donnell et al., 2000</b>
		AF212778	NRRL 29169	
		AF212776	NRRL 28336	
<i>F. boothii</i>	<i>TEF- 1<math>\alpha</math></i>	GQ915503	NRRL 26916	<b>O'Donnell et al., 2000</b>
		AF212443	NRRL 29020	
	<i>histon H3</i>	GQ915470	NRRL 26916	<b>O'Donnell et al., 2000</b>
		AY452829	NRRL 29020	
	<i><math>\beta</math>-tubulin</i>	GQ915437	NRRL 26916	<b>O'Donnell et al., 2000</b>
		AF212760	NRRL 29020	
<i>F. vorosii</i>	<i>TEF- 1<math>\alpha</math></i>	DQ459745	NRRL 37605	<b>Starkey et al., 2007</b>
		DQ459747	NRRL 38207	
	<i>histon H3</i>	DQ459728	NRRL 37605	<b>Starkey et al., 2007</b>
		DQ459730	NRRL 38207	
	<i><math>\beta</math>-tubulin</i>	DQ459660	NRRL 37605	<b>Starkey et al., 2007</b>
		DQ459662	NRRL 38207	
<i>F. austroamericanum</i>	<i>TEF- 1<math>\alpha</math></i>	AF212439	NRRL 28585	<b>O'Donnell et al., 2000</b>
		AF212438	NRRL 2903	
	<i>histon H3</i>	AY452825	NRRL 28585	<b>O'Donnell et al., 2000</b>
		AY452822	NRRL 2903	
	<i><math>\beta</math>-tubulin</i>	AF212756	NRRL 28585	<b>O'Donnell et al., 2000</b>
		AF212755	NRRL 2903	
<i>F. meridionale</i>	<i>TEF- 1<math>\alpha</math></i>	AF212436	NRRL 28723	<b>O'Donnell et al., 2000</b>
		AF212437	NRRL 29010	
	<i>histon H3</i>	AY452846	NRRL 28723	<b>O'Donnell et al., 2000</b>
		AY452845	NRRL 29010	
	<i><math>\beta</math>-tubulin</i>	AF212753	NRRL 28723	<b>O'Donnell et al., 2000</b>
		AF212754	NRRL 29010	
<i>F. mesoamericanum</i>	<i>TEF- 1<math>\alpha</math></i>	AF212441	NRRL 25797	<b>O'Donnell et al., 2000</b>
		AF212442	NRRL 29148	
	<i>histon H3</i>	AY452826	NRRL 25797	<b>O'Donnell et al., 2000</b>
		AY452847	NRRL 29148	
	<i><math>\beta</math>-tubulin</i>	AF212758	NRRL 25797	<b>O'Donnell et al., 2000</b>
		AF212759	NRRL 29148	

Vrsta	Gen	Gen Bank pristupni broj	Broj kolekcije izolata u Gen Bank	Literaturni navod
<i>F. acaciae-mearnsii</i>	<i>TEF- 1<math>\alpha</math></i>	AF212448	NRRL 26754	<b>O'Donnell et al., 2000</b>
		AF212449	NRRL 26755	
	<i>histon H3</i>	AY452841	NRRL 26754	<b>O'Donnell et al., 2000</b>
		AY452842	NRRL 26755	
	<i><math>\beta</math>-tubulin</i>	AF212765	NRRL 26754	<b>O'Donnell et al., 2000</b>
		AF212766	NRRL 26755	
<i>F. asiaticum</i>	<i>TEF- 1<math>\alpha</math></i>	AF212452	NRRL 26156	<b>O'Donnell et al., 2000</b>
		AF212450	NRRL 6101	
	<i>histon H3</i>	AY452843	NRRL 26156	<b>O'Donnell et al., 2000</b>
		AY452820	NRRL 6101	
	<i><math>\beta</math>-tubulin</i>	AF212769	NRRL 26156	<b>O'Donnell et al., 2000</b>
		AF212767	NRRL 6101	
<i>F. cortaderiae</i>	<i>TEF- 1<math>\alpha</math></i>	AY225885	NRRL 29297	<b>Ward et al., 2002</b>
		AY225886	NRRL 29306	
	<i>histon H3</i>	AY452856	NRRL 29297	<b>Ward et al., 2002</b>
		AY452855	NRRL 29306	
	<i><math>\beta</math>-tubulin</i>	AH012625	NRRL 29297	<b>Ward et al., 2002</b>
		AH012626	NRRL 29306	
<i>F. gerlachii</i>	<i>TEF- 1<math>\alpha</math></i>	DQ459742	NRRL 36905	<b>Starkey et al., 2007</b>
		DQ459743	NRRL 38380	
	<i>histon H3</i>	DQ459725	NRRL 36905	<b>Starkey et al., 2007</b>
		DQ459726	NRRL 38380	
	<i><math>\beta</math>-tubulin</i>	DQ459657	NRRL 36905	<b>Starkey et al., 2007</b>
		DQ459658	NRRL 38380	
<i>F. aethiopicum</i>	<i>TEF- 1<math>\alpha</math></i>	FJ240297	NRRL 46722	<b>O'Donnell et al., 2008</b>
		FJ240295	NRRL 46710	
	<i>histon H3</i>	FJ240243	NRRL 46722	<b>O'Donnell et al., 2008</b>
		FJ240241	NRRL 46710	
	<i><math>\beta</math>-tubulin</i>	FJ240287	NRRL 46722	<b>O'Donnell et al., 2008</b>
		FJ240285	NRRL 46710	
<i>F. ussurianum</i>	<i>TEF- 1<math>\alpha</math></i>	FJ240300	NRRL 45665	<b>Yli-Mattila et al., 2008</b>
		FJ240301	NRRL 45681	
	<i>histon H3</i>	FJ240246	NRRL 45665	<b>Yli-Mattila et al., 2008</b>
		FJ240247	NRRL 45681	
	<i><math>\beta</math>-tubulin</i>	FJ240290	NRRL 45665	<b>Yli-Mattila et al., 2008</b>
		FJ240291	NRRL 45681	
<b>Autgrupa</b>	<i>TEF- 1<math>\alpha</math></i>	AF212468	NRRL 28062	<b>O'Donnell et al., 2004</b>
<i>F. pseudograminearum</i>	<i>histon H3</i>	AY452848	NRRL 28062	<b>O'Donnell et al., 2004</b>
	<i><math>\beta</math>-tubulin</i>	AF107867	NRRL 28062	<b>O'Donnell et al., 2004</b>

Skraćenice kolekcije kultura: NRRL–National Center for Agricultural Utilization Research, Peoria, Illinois, USA

#### **4.6. Statističke metode i analiza podataka**

Dobijeni rezultati u okviru brzine porasta (prečnika) kolonija obrađeni su jednofaktorijalnom analizom varijanse (ANOVA), a značajnost razlika srednjih vrednosti određena je Dankanovim post-hok testom ( $p < 0,05$ ). Rezultati testova patogenosti u poljskim i laboratorijskim uslovima obrađeni su dvofaktorijalnom analizom varijanse, značajnost razlika srednjih vrednosti određena je Dankanovim post-hok testom ( $p < 0,05$ ). Obrada podataka urađena je u softverskom paketu *Statistika 12.0*, a dobijeni rezultati prikazani su u tabelama u obliku srednjih vrednosti i standardne devijacije.

Koeficijent korelacije korišćen je za utvrđivanje međuzavisnosti stepena patogenosti izolata na listu ječma, klasu pšenice i klipu kukuruza, kao i potencijala produkcije izolata u sintezi mikotoksina DON i ZEA pomoću Elisa metode.

## 5. REZULTATI

### 5.1. Izolati odabrani za proučavanja

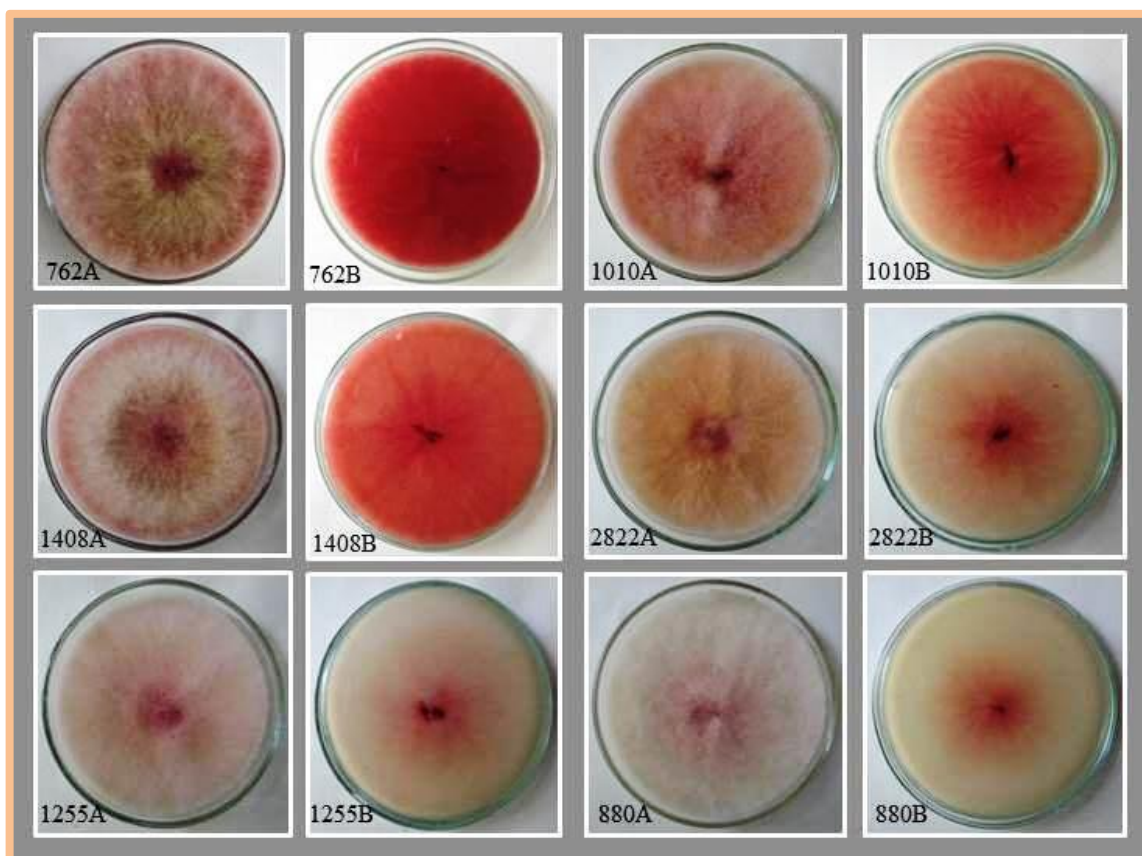
Izolati gljive *F. graminearum* za proučavanje u ovom radu uzeti su iz kolekcije gljiva koja se nalazi u Laboratoriji za fitopatologiju Instituta za kukuruz Zemun Polje. Izolati su odabrani na osnovu različitog biogeografskog porekla, koje je obuhvatalo različite biljke domačine, različite biljne organe sa kojih je izolovan patogen (stablo, zrno, vreteno, klas, plevice), kao i različite lokalitete na teritoriji Srbije u periodu od 1993. do 2015. godine. Odabran je 101 izolat koji su poreklom iz uzoraka pšenice (42), kukuruza (37) i ječma (22) iz 41 lokaliteta na teritoriji Srbije (Slika 1).



Slika 1. Geografska distribucija odabranih izolata *Fusarium graminearum*

## 5. 2. Varijabilnost morfoloških svojstava

**Varijabilnost makroskopskih svojstava.** Izolati *F. graminearum* pokazali su veliku divergentnost u makroskopskim svojstvima (boja, izgled i porast kolonije). Na PDA podlozi ispitivani izolati formirali su obilnu vazdušnu miceliju koja je bila gusta, vunastog ili pamučastog izgleda. Boja vazdušne micelije varirala je od bele, bledoružičaste, ružičaste do žutosmeđe boje (Slike 2, 3 i 4). Izolat 2822 poreklom sa kukuruza (Slika 2) i 4135 poreklom sa pšenice (Slika 3), koji su na molekularnom nivou identifikovani kao *F. boothii*, imali su gustu vunastu vazdušnu miceliju žute boje. Izolat 1339/2 poreklom sa pšenice (Slika 3) na molekularnom nivou identifikovan kao *F. vorosii* imao je gustu belu do bledožutu vazdušnu miceliju. S obzirom na veliku varijabilnost u izgledu micelije kod ispitivanih izolata nije se moglo na osnovu izgleda kolonije uočiti razlika između pomenutih vrsta.

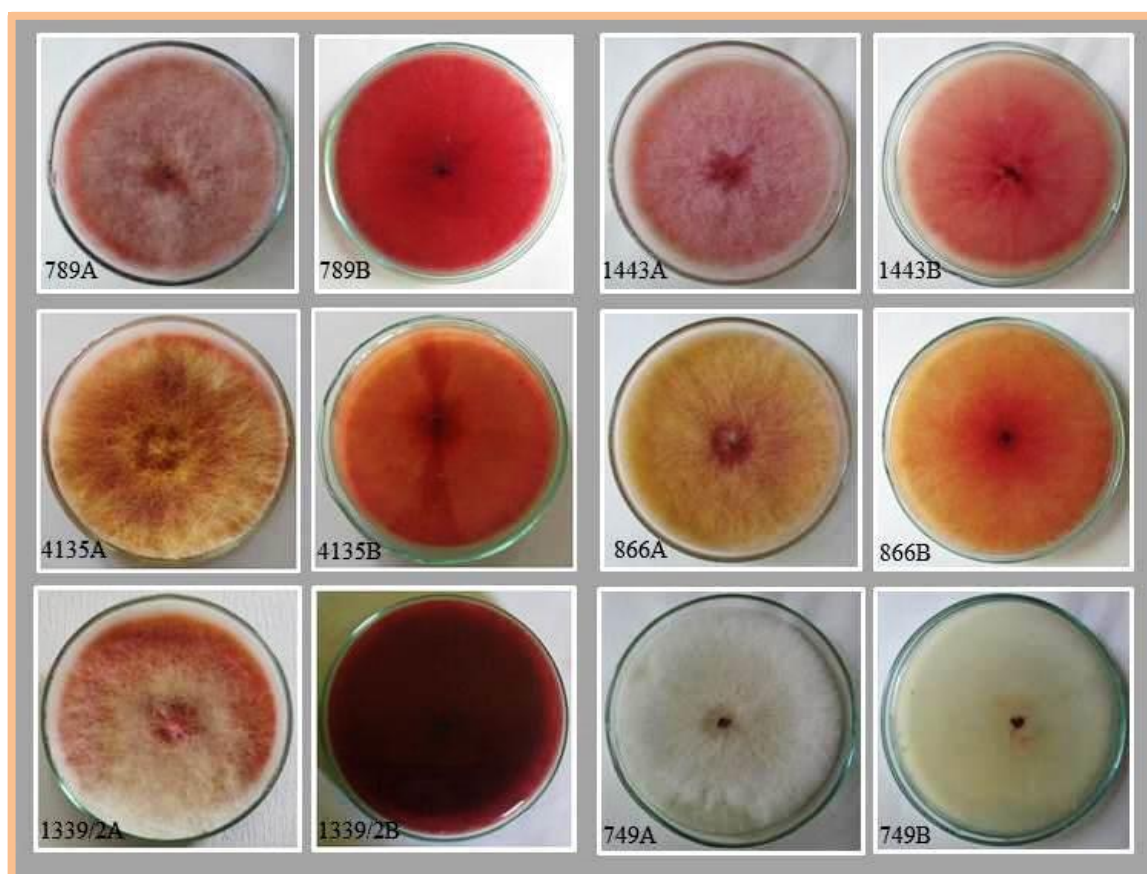


**Slika 2.** Varijabilnost u izgledu micelije izolata *Fusarium graminearum* ss (762, 1010, 1408, 1255, 880) i *Fusarium boothii* (2822) poreklom sa kukuruza na PDA, lice (A) i naličje (B)

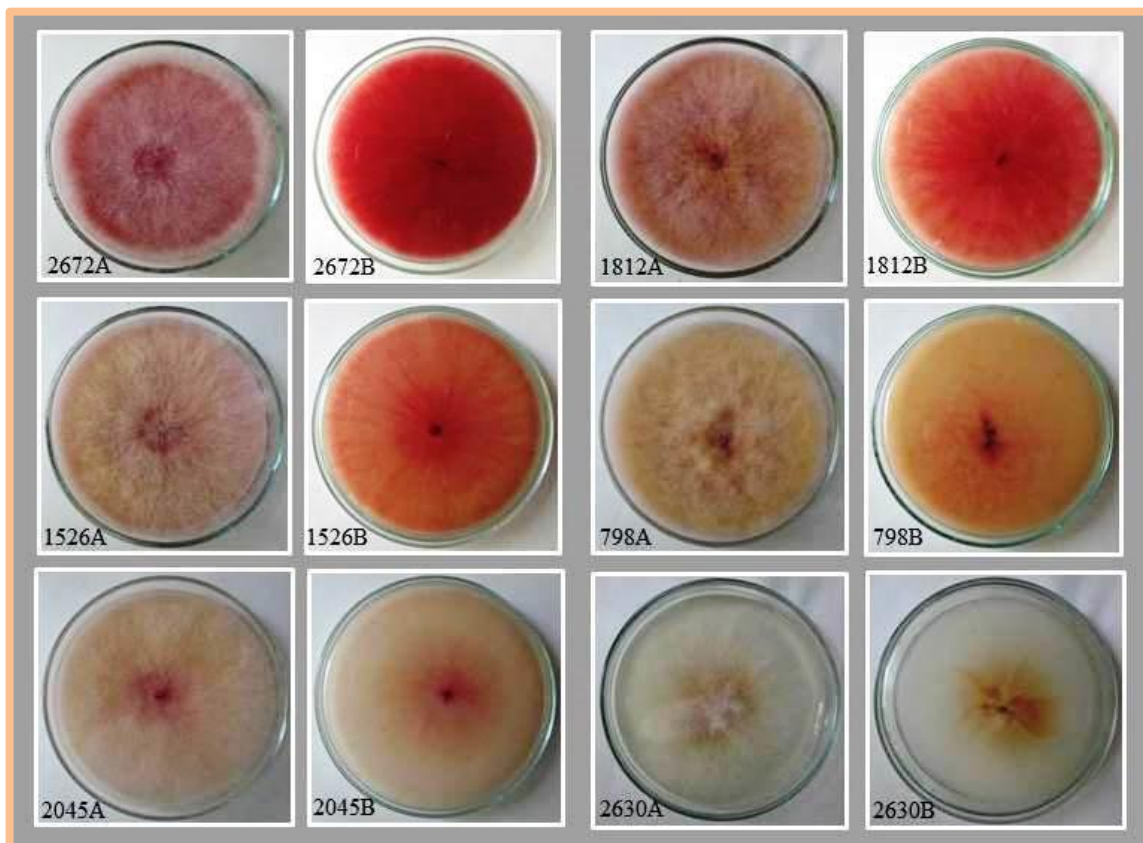


Ispitivani izolati značajno su varirali po boji pigmenta stvorenog u podlozi, koji je bio od bele, bledoružičaste, ružičaste, tamnonarandžaste do izrazito crvene (karmin crvene ili burgund) boje (Slika 2, 3 i 4). Izolati vrste *F. boothii* (Slika 2 i 3) stvorili su bledoružičasti do ružičastosmeđi pigment u podlozi, a izolat vrste *F. vorosii* imao je izrazito crveni (burgund) pigment u podlozi (Slika 3).

Poreklo izolata nije uticalo na ispoljavanje makroskopskih svojstava, odnosno izolati su izrazito varirali u izgledu vazdušne micelije, kao i u boji stvorenog pigmenta u PDA podlozi, bez obzira na to sa koje biljke domaćina su izolovani. Na osnovu ovog svojstva nisu se mogle izdvojiti i identifikovati vrste u okviru *Fg* kompleksa (*F. graminearum* ss, *F. boothii* i *F. vorosii*).



**Slika 3.** Varijabilnost u izgledu micelije izolata *Fusarium graminearum* ss (789, 1443, 866, 749), *Fusarium boothii* (4135) i *Fusarium vorosii* (1339/2) poreklom sa pšenice na PDA, lice (A) i naličje (B)



**Slika 4.** Varijabilnost u izgledu micelije izolata *Fusarium graminearum* ss (2672, 1812, 1526, 798, 2045, 2630) poreklom sa ječma na PDA, lice (A) i naličje (B)

Tokom ispitivanja makroskopskih svojstava ispitivanih izolata *F. graminearum* poreklom sa kukuruza, pšenice i ječma, praćen je dnevni porast micelije na PDA podlozi na 25°C u mraku koja je izražena vrednostima prečnika kolonije. Takođe, pored dnevnog porasta praćen je i porast micelije drugog i četvrtog dana nakon presejavanja.

Prosečna brzina dnevnog porasta kolonija nije se značajno razlikovala između izolata u odnosu na njihovo poreklo. Kod izolata poreklom sa kukuruza uočen je najveći prosečan dnevni porast micelije 27,36 mm, kod izolata sa pšenice iznosio je 26,88 mm, dok je kod izolata poreklom sa ječma uočen najmanji prosečan dnevni porast (26,34 mm) (Tabela 5). Varijabilnost u dnevnom porastu micelije najviše je bila izražena kod izolata poreklom sa kukuruza, opseg variranja bio je od 13,16 mm kod izolata 2813 do 32,00 mm kod izolata 2815. Dnevni porast micelije kod izolata poreklom sa ječma bio je od 14,83 mm (izolat 1801) do 30,16 mm (izolat 798). Najmanja varijabilnost u dnevnom porastu micelije uočena je kod izolata poreklom sa pšenice i bila je od 19,5 mm (izolat 767) do 32,16 mm kod izolata 4135 koji je na molekularnom nivou identifikovan kao *F. boothii* (Tabela 5).

**Tabela 5.** Dnevni porast kolonije (mm) kod izolata *Fusarium graminearum* poreklom sa kukuruza, pšenice i ječma na PDA podlozi

Izolati sa pšenice	Dnevni porast kolonije (mm)	Izolati sa kukuruza	Dnevni porast kolonije (mm)	Izolati sa ječma	Dnevni porast kolonije (mm)
767	19,50 a	2813	13,16 a	1801	14,83 a
1443	19,66 a	1419	15,50 ab	805	18,16 ab
681	20,00 ab	1408	20,16 bc	1812	22,83 bc
1339/2	22,33 abc	1282/2	22,00 cd	2630	24,83 cd
1485	22,33 abc	1554/2	23,00 cde	2254	26,16 cd
2625	24,83 abcd	1165	24,33 cdef	1772	26,33 cd
764	25,33 abcde	1482/2	24,66 cdefg	2045	26,33 cd
749	26,00 bcde	971	25,50 cdefgh	1526	26,50 cd
763	26,33 cde	1495	25,66 cdefgh	1839	26,50 cd
1348	26,83 cde	1133	26,00 cdefgh	2672	26,66 cd
892	26,83 cde	1673	26,50 cdefgh	1528	27,00 cd
870	26,83 cde	1199	26,50 cdefgh	2078	27,33 cd
677	27,00 cde	1010	26,66 defgh	654	27,66 cd
1337	27,00 cde	581	26,83 defgh	1517/2	28,00 cd
800	27,00 cde	2533	27,00 defgh	1217	28,16 cd
2621	27,16 cde	1368	27,16 defgh	1493	28,16 cd
1746	27,16 cde	1696	27,16 defgh	891/2	28,66 cd
789	27,33 cde	2811	27,33 defgh	1534	28,66 cd
1012	27,50 cde	1211	27,50 defgh	770/2	28,66 cd
866	27,66 cde	1751	27,50 defgh	2627	29,00 cd
1343	27,83 cde	914	27,66 defgh	1800	29,00 cd
1370	27,83 cde	1195	27,66 defgh	798	30,16 d
1490	28,00 cde	880	28,00 defgh		
1486	28,16 cde	1649	28,50 defgh		
670	28,16 cde	1030	29,00 efgh		
836	28,16 cde	762	29,33 efgh		
203	28,33 cde	257	29,33 efgh		
1351/2	28,50 cde	2624	29,50 efgh		
825	28,83 cde	2822	29,66 efgh		
2823	29,00 cde	699	29,66 efgh		
2818	29,16 de	2812	30,16 fgh		
744	29,16 de	943/2	30,33 fgh		
795	29,33 de	1255	30,50 fgh		
618	29,83 de	656	30,83 fgh		
831	30,00 de	1268	31,00 fgh		
864	30,00 de	1249	31,33 gh		
766	30,16 de	2815	32,00 h		
779/2	30,33 de				
687/2	30,33 de				
2635	30,50 de				
2820	30,83 de				
4135	32,16 e				
<b>Prosek</b>	<b>27,36</b>		<b>26,88</b>		<b>26,34</b>

\*Vrednosti obeležene istim slovom su na istom nivou značajnosti u intervalu poverenja 95%

Homogene grupe izolata i značajnost razlika utvrđeni su Dankanovim testom za interval poverenja 95% (Tabela 5). Na osnovu jednofaktorijalne analize varijanse za brzinu dnevnog porasta izolata na PDA podlozi utvrđeno je da postoje statistički značajne razlike u brzini rasta kolonije između izolata poreklom sa istog domaćina (Tabela 6). Izolat 1339/2 identifikovan kao *F. vorosii* i izolati 4135 i 2822 koji je na molekularnom nivou identifikovan kao *F. boothii* nisu se statistički značajno razlikovali od većine ispitivanih izolata. Međutim, izolat 1339/2 (*F. vorosii*) se statistički značajno razlikovao od izolata 4135 i 2822 (*F. boothii*) (Tabela 5).

**Tabela 6.** Jednofaktorijalna analiza varijanse za brzinu dnevnog porasta kod izolata poreklom sa kukuruza, pšenice i ječma

<b>Kukuruz</b>					
<b>Izvor variranja</b>	<b>Suma kvadrata</b>	<b>Stepeni slobode</b>	<b>Sredina kvadrata</b>	<b>Količnik</b>	<b>Nivo značajnosti</b>
	SS	Df	MS	F	P
Izolat	1736,34	36	48,23	4,331	0,00**
Greška	824,00	74	11,14		
<b>Pšenica</b>					
<b>Izvor variranja</b>	<b>Suma kvadrata</b>	<b>Stepeni slobode</b>	<b>Sredina kvadrata</b>	<b>Količnik</b>	<b>Nivo značajnosti</b>
	SS	Df	MS	F	P
Izolat	1049,65	41	25,60	2,308	0,00**
Greška	931,67	84	11,09		
<b>Ječam</b>					
<b>Izvor variranja</b>	<b>Suma kvadrata</b>	<b>Stepeni slobode</b>	<b>Sredina kvadrata</b>	<b>Količnik</b>	<b>Nivo značajnosti</b>
	SS	Df	MS	F	P
Izolat	814,82	21	38,80	3,114	0,00**
Greška	548,17	44	12,46		

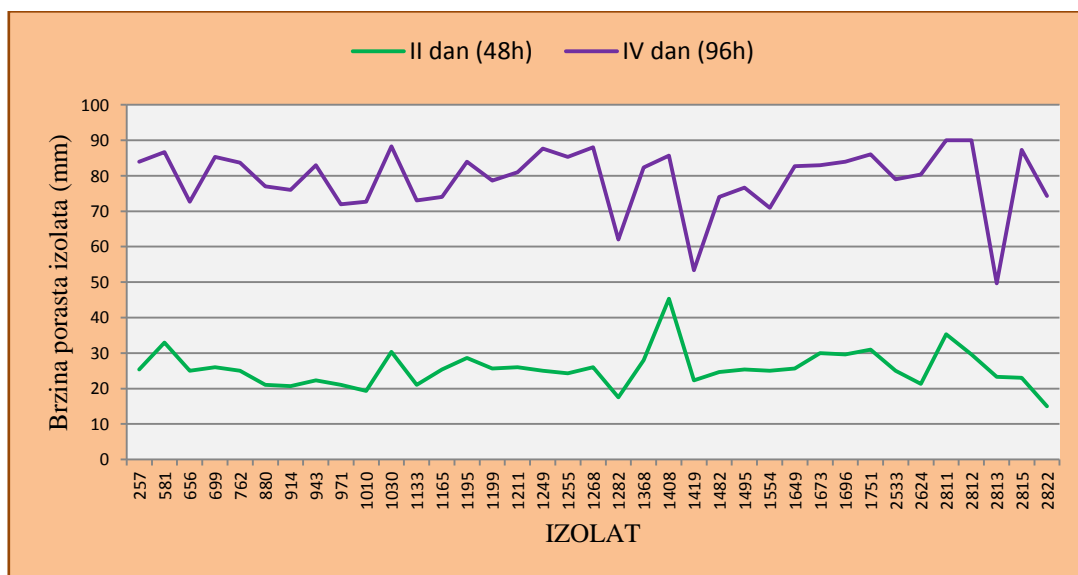
\*Statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) ; \*\*Statistički visoko značajna razlika ( $p < 0,01$ )

Prilikom ispitivanja porasta micelije na PDA podlozi uočeno je da su se svi ispitivani izolati *F. graminearum* veoma brzo razvijali. Drugi dan posle presejavanja (48 h) uočeno je da su izolati poreklom sa kukuruza imali najveću varijabilnost u porastu micelije (Grafikon 1), a zatim izolati poreklom sa pšenice (Grafikon 2), dok je najmanja varijabilnost u porastu micelije uočen kod izolata poreklom sa ječma

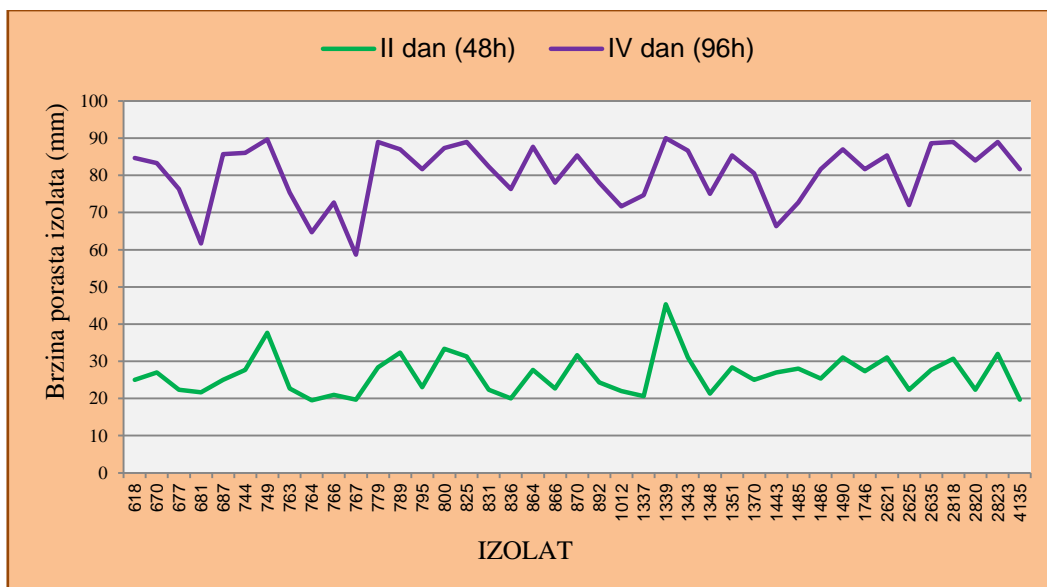
(Grafikon 3). Kod izolata poreklom sa kukuruza, izolat 1408 ispoljio je najintenzivniji porast micelije, dok je najslabiji porast uočen kod izolata 2822 (*F. boothii*) (Grafikon 1). Kod izolata poreklom sa pšenice izolat 1339/2 (*F. vorosii*) ispoljio je najveći porast micelije, dok je najmanji porast uočen kod izolata 4135 (*F. boothii*) (Grafikon 2). Izolat 2672 ispoljio je najintezivniji porast a izolat 2254 najslabiji porast micelije kod izolata poreklom sa ječma (Grafikon 3).

Četvrti dan posle presejavanja (96 h) maksimalni porast uočen je kod izolata 2811 i 2812 poreklom sa kukuruza (Grafikon 1), 1339/2 poreklom sa pšenice (Grafikon 2), i izolat 2672 poreklom sa ječma (Grafikon 3). Najmanji porast micelije uočen je kod izolata 2813 sa kukuruza (Grafikon 1), a zatim kod izolata poreklom sa ječma 1801 (Grafikon 3), dok je kod izolata poreklom sa pšenice najmanji porast uočen kod izolata 767 (Grafikon 2).

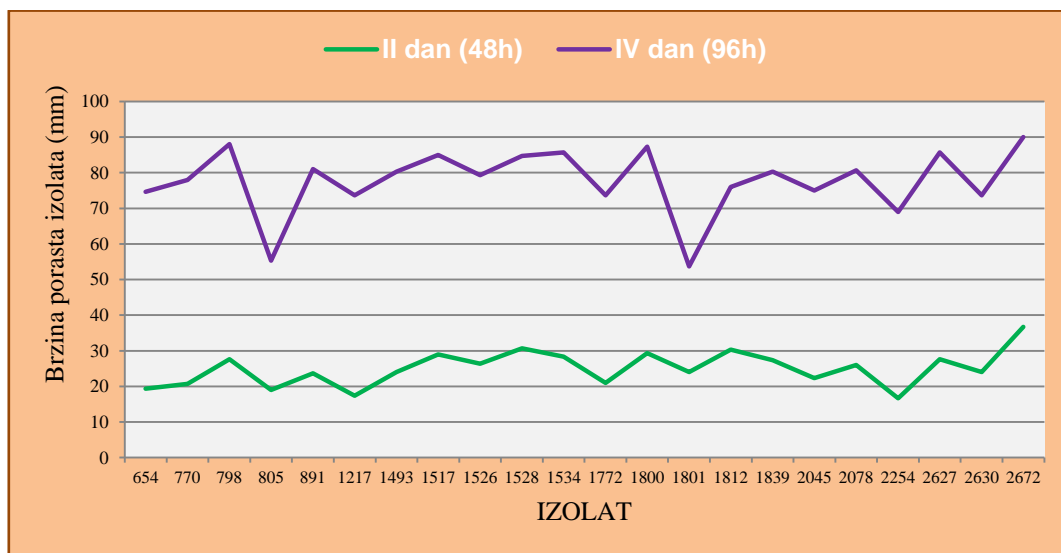
Svi ispitivani izolati poreklom sa istog domaćina pokazali su veću divergentnost u brzini razvoja micelije posle četvrtog dana merenja u odnosu na drugi dan (Grafikoni 1, 2 i 3).



**Grafikon 1.** Brzina porasta micelije izolata *Fusarium graminearum* poreklom sa kukuruza

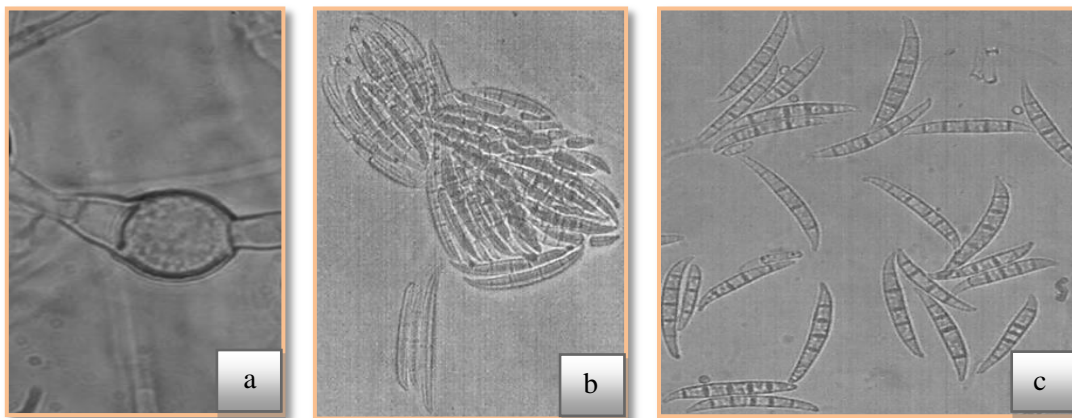


**Grafikon 2.** Brzina porasta micelije izolata *Fusarium graminearum* poreklom sa pšenice



**Grafikon 3.** Brzina porasta micelije izolata *Fusarium graminearum* poreklom sa ječma

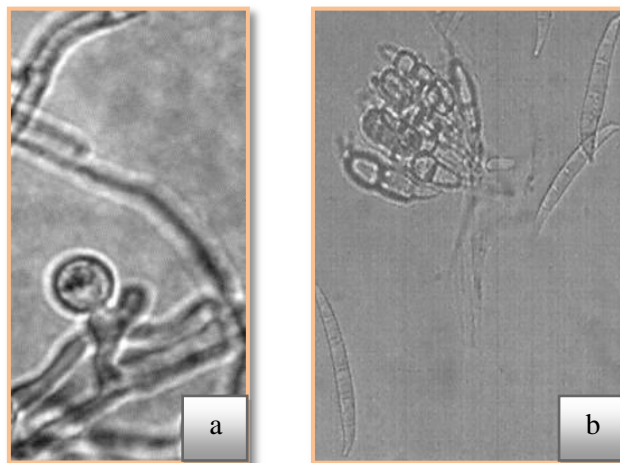
**Varijabilnost mikroskopskih svojstva.** Proučavani izolati *F. graminearum* razlikovali su se u pogledu veličine makrokonidija (dužina i širina), kao i u formiranju hlamidospora (Slika 5). Međutim, nije uočena razlika u izgledu peritecija, kao ni askusa i askospora.



**Slika 5.** *Fusarium graminearum*: izgled hlamidospora (a), makrokonidija u sporodohiji (b) i makrokonidija (c) izolata na CLA podlozi *in situ*

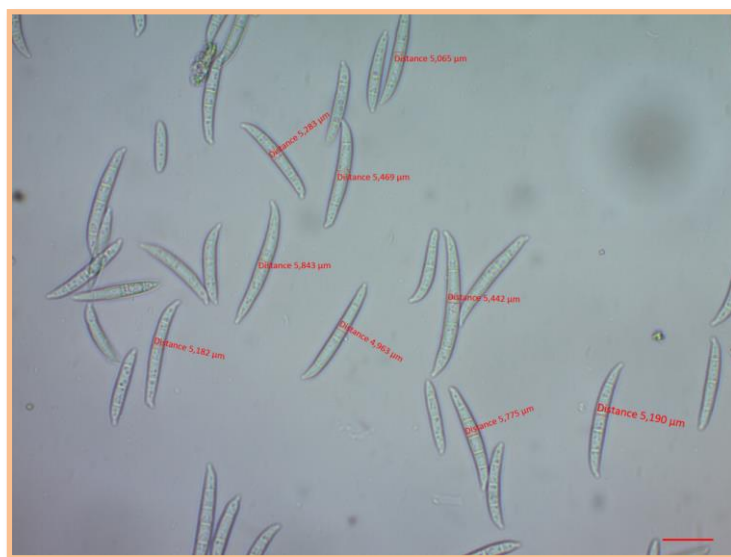
### 5.2.1. Varijabilnost anamornog stadijuma

**(i) Hlamidospore.** Proučavanje mikroskopskih svojstava, odnosno utvrđivanje prisustva i izgleda hlamidospora praćeno je na CLA podlozi tokom 10-14 dana na UV svetlu na 25°C, pri cikličnom smenjivanju svetlosti i tame u intervalima od po 12 sati. Kod nekih izolata *F. graminearum* utvrđeno je prisustvo mehurastih ćelija - hlamidospora. Hlamidospore su se većinom obrazovale u makrokonidijama, dok se kod nekih izolata hlamidospore formirale u hifi (Slika 6), dok neki izolati nisu formirali hlamidospore u uslovima postavljenog eksperimenta. One su bile loptaste, glatkih zidova, bezbojne, pojedinačne ili u grupama. Hlamidospore u najvećem procentu formirali su izolati poreklom sa kukuruza 35,13% (13/37), a zatim izolati poreklom sa ječma 27,27% (6/22), dok su izolati poreklom sa pšenice procentualno formirali najmanje hlamidospora 26,19% (11/42).



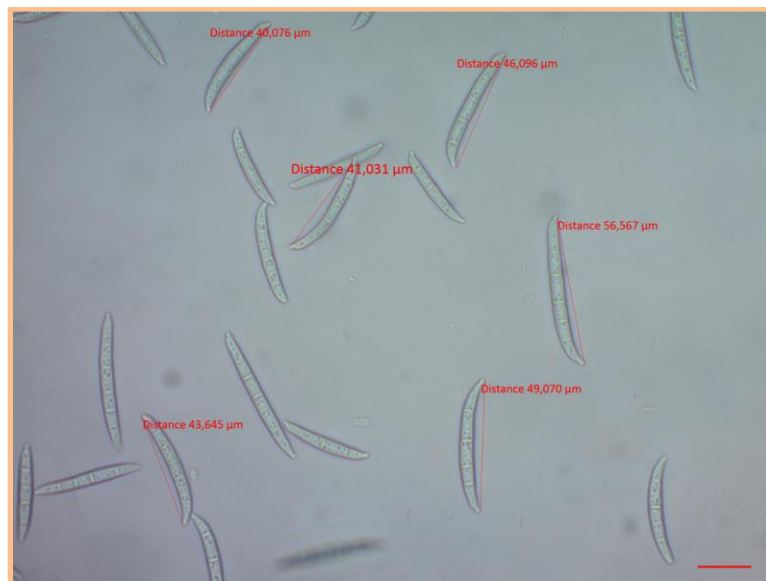
**Slika 6.** *Fusarium graminearum*: izgled hlamidospore formirane u hifi (a) i formiranih u konidiji (b)

(ii) **Makrokonidije.** Svi proučavani izolati formirali su makrokonidije sa karakterističnom bazalnom ćelijom u obliku stopala (engl. foot cell) koje su tipične za rod *Fusarium*. Vršna ćelija makrokonidija je konusnog oblika, a bazalna ćelija je u obliku stopala. Dorzalna strana je lučno savijena za razliku od ventralne koja je skoro prava. Makrokonidije se javljaju u sporodohijama u kulturama starim više od mesec dana. Ispitivani izolati *F. graminearum* formirali su makrokonidije sa 4-6 septi. Proučavanja mikroskopskih svojstva obuhvatila su merenje dužine i širine makrokonidija pri uvećanju od 40x (Slike 7 i 8).



**Slika 7.** *Fusarium graminearum*: širina makrokonidija merena u softverskom programu ZEN

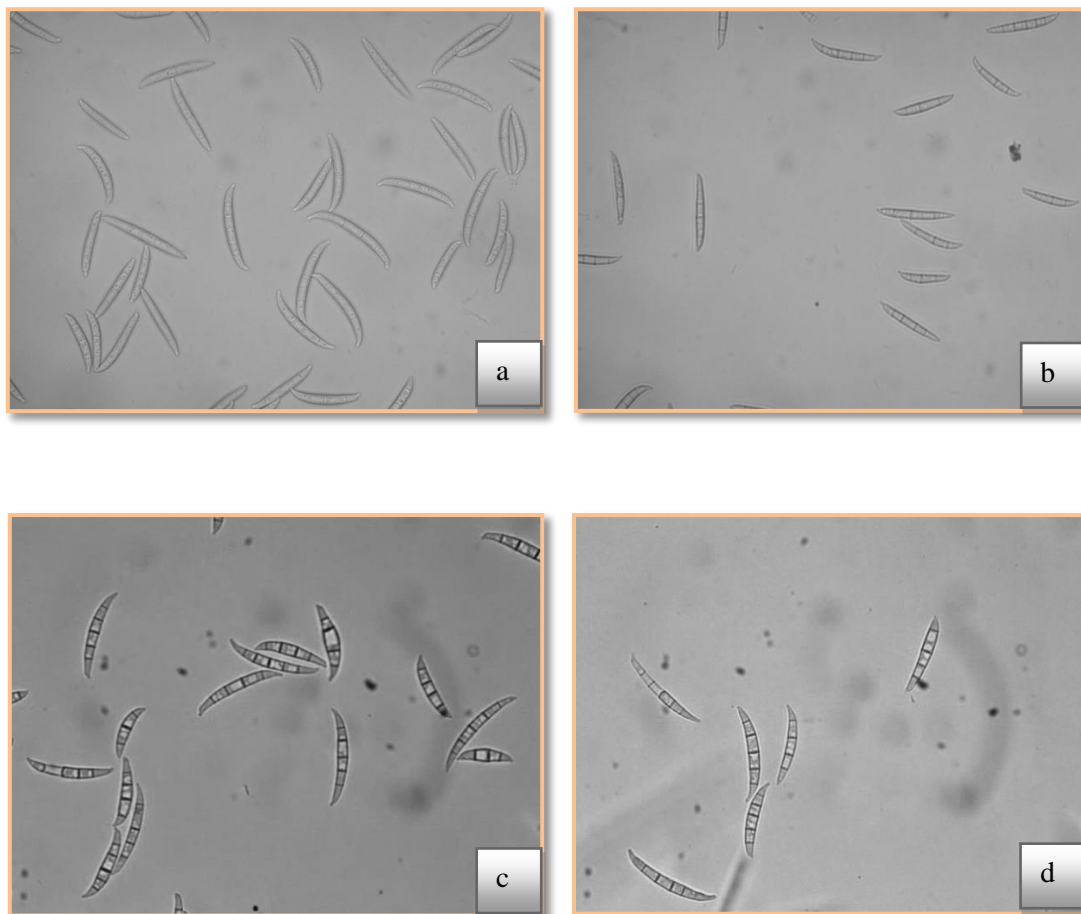




**Slika 8.** *Fusarium graminearum*: dužina makrokonidija merena u softverskom programu ZEN

Ispitivani izolati *F. graminearum* obrazovali su makrokonidije koje su između izolata bile izuzetno varijabilne, njihova dužina je bila u opsegu od 25,30 µm (izolat 1199) do 74,70 µm (izolat 892), dok je širina makrokonidija bila od 4,12 µm (izolat 4135) do 6,12 µm (izolat 1339/2). Izolati *F. graminearum* poreklom sa kukuruza obrazovali su konidije čije su dimenzije u opsegu 25,30-71,30 µm x 4,13-6,03 µm (Tabela 7), izolati poreklom sa pšenice 25,70-74,70 µm x 4,12-6,12 µm (Tabela 8), dok su izolati poreklom sa ječma obrazovali konidije u opsegu 25,40-73,70 µm x 4,41-5,88 µm (Tabela 9). Na osnovu prosečnih dimenzija, najveća varijabilnost dužine i širine makrokonidija uočena je kod izolata poreklom sa pšenice. Ovi izolati su u proseku formirali makrokonidije koje su najduže i najuže (prosek 45,30 µm x 4,88 µm), dok su najkraće i najšire makrokonidije formirali izolati poreklom sa kukuruza (prosek 40,71 µm x 4,99 µm). Uporedni pregled prosečnih dimenzija makrokonidija ispitivanih izolata *F. graminearum* prikazan je u Tabelama 7, 8 i 9. Na osnovu prosečnih dimenzija širine makrokonidija uočeno je da su izolati vrste *F. boothii* (2822 i 4135) obrazovali makrokonidije čija je širina bila uža od većine ispitivanih izolata, dok su kod izolata 1339/2 (*F. vorosii*) uočene prosečno najšire makrokonidije. Izgled izolata sa najdužim (izolat 836) i najkraćim (izolat 770/2) makrokonidijama, kao i najužim (izolat 2822) i najširim (izolat 1339/2) makrokonidijama prikazani su na slici 9. Na osnovu

mikroskopskih svojstava izgleda makrokonidija ne mogu se razlikovati vrste *F. graminearum* ss, *F. boothii* i *F. vorosii* u okviru *Fg* kompleksa.



**Slika 9.** Izgled najdužih (a) i najkraćih makrokonidija (b) izolata *Fusarium graminearum*; izgled makrokonidija izolata *Fusarium boothii* (c) i *Fusarium vorosii* (d)

**Tabela 7.** Prikaz prosečnih dimenzija dužine i širine makrokonidija izolata *F. graminearum* poreklom sa kukuruza

Izolat	Dužina makrokonidija (µm)			Širina makrokonidija (µm)			Hlamido spore
	Min	Max	Prosek	Min	Max	Prosek	
257	31,50	64,70	43,23	4,38	5,70	5,00	-
581	28,10	65,40	40,24	4,59	5,70	4,93	-
656	31,40	58,10	39,94	4,47	5,79	5,00	+
699	27,20	55,20	37,62	4,21	5,40	4,84	+
762	32,90	54,10	43,05	4,17	5,66	4,83	-
880	30,80	50,50	39,16	5,15	5,60	5,33	-
914	34,40	55,10	43,80	4,83	5,68	5,28	-
943/2	27,70	70,00	44,79	4,51	<b>6,03</b>	5,70	+
971	27,50	50,40	35,81	4,58	5,21	4,80	-
1010	28,60	51,30	39,59	4,59	5,01	4,76	-
1030	26,50	65,50	34,83	4,72	5,45	5,12	-
1133	31,60	51,80	39,14	4,59	4,89	4,73	-
1165	38,20	52,60	45,35	4,52	5,05	4,78	+
1195	26,80	44,60	<b>32,51</b>	4,51	5,01	4,89	-
1199	<b>25,30</b>	58,00	35,65	5,51	6,12	<b>5,72</b>	+
1211	33,20	60,90	46,96	4,81	5,11	4,99	-
1249	30,50	52,80	43,15	4,55	5,15	4,72	-
1255	30,00	55,20	42,32	5,00	5,54	5,34	-
1268	26,40	55,70	38,08	4,31	4,88	4,65	-
1282/2	28,50	53,40	42,24	4,89	5,49	5,00	+
1368	35,00	56,40	45,13	4,53	5,13	4,96	-
1408	31,50	<b>71,30</b>	46,22	4,32	5,01	4,57	+
1419	29,60	65,40	46,45	4,42	4,90	4,68	+
1482/2	27,00	64,60	<b>47,37</b>	4,67	5,07	4,90	-
1495	33,40	61,00	42,73	4,58	4,83	4,63	-
1554/2	29,40	45,40	34,78	4,55	5,51	4,97	+
1649	29,50	46,70	37,75	4,45	5,34	5,00	-
1673	26,00	50,60	38,57	4,89	5,69	5,20	-
1696	33,60	58,50	44,33	4,43	5,20	4,98	-
1751	34,40	64,90	42,79	4,68	5,21	4,94	+
2533	26,60	48,80	36,17	4,93	5,61	5,34	+
2624	27,90	47,50	36,87	4,36	4,89	4,65	+
2811	28,40	50,20	38,07	4,71	5,49	5,27	-
2812	26,70	61,80	38,48	4,80	5,65	5,35	-
2813	25,40	58,80	39,15	4,32	4,91	4,74	-
2815	29,10	49,40	37,58	4,77	5,95	5,69	-
2822	32,70	69,80	46,53	<b>4,13</b>	4,47	<b>4,35</b>	+
<b>Prosek</b>	<b>29,82</b>	<b>56,65</b>	<b>40,71</b>	<b>4,61</b>	<b>5,33</b>	<b>4,99</b>	

**Tabela 8.** Prikaz prosečnih dimenzija dužine i širine makrokonidija izolata *F. graminearum* poreklom sa pšenice

Izolat	Dužina makrokonidija (µm)			Širina makrokonidija (µm)			Hlamido spore
	Min	Max	Prosek	Min	Max	Prosek	
203	32,60	67,20	48,38	4,30	4,90	4,55	-
618	28,10	62,90	41,57	4,37	4,73	4,58	-
670	35,40	67,00	44,68	4,32	5,07	4,71	-
677	35,60	63,10	49,83	4,34	4,89	4,58	+
681	31,20	57,80	42,09	4,70	5,10	4,90	+
687/2	35,30	78,10	47,94	4,44	5,02	4,72	-
744	39,50	56,60	47,47	4,34	5,90	5,00	-
749	29,60	60,70	43,26	4,30	5,50	4,82	-
763	30,40	48,70	39,63	4,35	5,52	4,94	-
764	30,40	45,80	39,15	4,55	5,28	4,82	-
766	32,30	53,50	44,75	4,65	5,55	4,97	+
767	31,60	69,90	47,58	4,59	5,30	4,96	-
779/2	38,70	69,80	51,13	4,55	5,31	4,96	-
789	28,10	74,50	48,52	4,68	5,79	5,00	+
795	32,90	64,30	47,06	4,35	5,08	4,65	-
800	26,50	58,50	41,56	4,75	5,56	5,00	-
825	30,00	48,90	40,24	4,42	5,04	4,87	-
831	32,70	55,40	44,62	4,95	5,87	5,54	-
836	37,90	73,80	53,98	4,61	5,02	4,95	-
864	25,70	64,90	42,07	4,95	5,38	5,11	-
866	25,90	57,00	39,09	4,42	5,00	4,86	-
870	28,20	63,40	43,97	4,65	5,18	4,87	+
892	26,60	74,70	47,80	4,68	5,09	4,97	+
1012	36,20	54,40	44,36	4,42	4,90	4,64	-
1337	30,10	61,20	42,58	4,75	5,11	4,94	-
1339/2	31,40	52,20	44,84	5,04	6,12	5,77	+
1343	39,10	71,10	53,09	4,48	5,52	5,22	-
1348	26,50	61,40	41,06	4,23	5,03	4,73	-
1351/2	27,60	59,60	46,75	4,52	4,87	4,64	-
1370	29,00	57,10	43,40	4,54	4,96	4,77	+
1443	29,20	58,10	45,69	4,45	5,14	4,82	-
1485	30,10	62,50	41,01	4,88	5,23	5,00	-
1486/2	37,30	62,50	49,88	4,48	4,99	4,77	+
1490/2	34,20	61,60	42,23	4,78	5,23	4,90	-
1746	29,10	57,30	41,28	4,49	4,89	4,76	-
2621	33,00	60,70	43,91	4,66	5,09	4,88	-
2625	34,70	64,80	45,61	4,62	5,19	4,91	-
2635	35,30	64,00	49,41	4,52	4,88	4,75	-
2818	27,70	65,20	40,59	4,37	4,87	4,43	-
2820	26,30	72,40	49,78	4,87	5,59	4,94	+
2823	38,50	73,70	53,90	4,87	5,98	5,29	-
4135	31,25	73,52	46,73	4,12	4,88	4,45	+
Prosek	31,71	62,61	45,30	4,55	5,23	4,88	

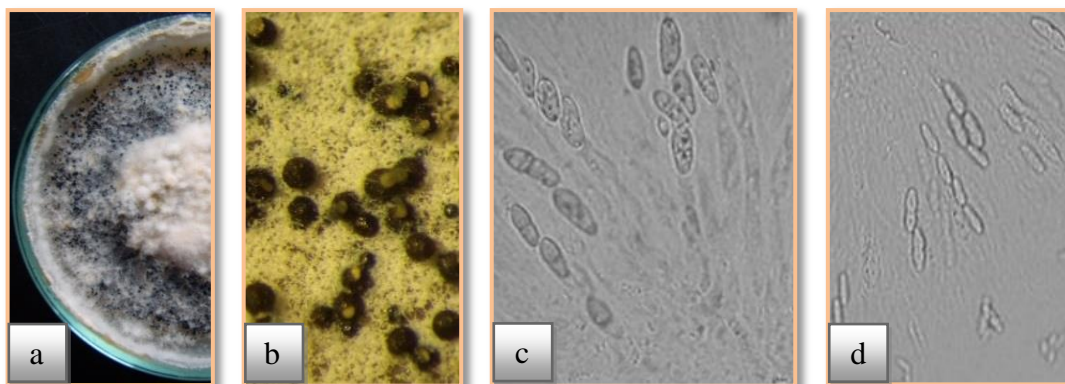
**Tabela 9.** Prikaz prosečnih dimenzija dužine i širine makrokonidija izolata *F. graminearum* poreklom sa ječma

Izolot	Dužina makrokonidija (µm)			Širina makrokonidija (µm)			Hlamido spore
	Min	Max	Prosek	Min	Max	Prosek	
654	25,40	56,20	39,83	4,63	4,94	4,77	+
770/2	25,70	48,50	31,00	4,86	5,65	5,13	-
798	36,10	57,30	46,55	4,52	5,09	4,78	+
805	27,20	58,60	42,46	4,82	5,34	5,00	-
891/2	31,30	54,80	41,96	4,85	5,65	5,20	-
1217	26,30	55,90	41,52	4,66	5,03	4,90	-
1493	33,00	60,20	45,89	4,41	4,97	4,67	-
1517/2	37,20	67,40	44,49	4,83	5,57	5,00	-
1526	33,40	73,70	45,87	4,57	5,21	4,95	-
1528	34,90	56,00	43,41	4,50	4,93	4,74	+
1534	36,90	65,70	52,72	4,54	5,22	4,95	-
1772	30,50	63,40	42,66	4,51	5,41	4,98	-
1800	29,80	64,10	42,56	4,49	5,22	4,91	-
1801	37,90	64,10	48,60	4,81	5,29	5,00	+
1812	34,30	63,20	46,21	4,66	5,19	4,79	-
1839	35,50	59,40	46,11	4,71	5,54	4,96	+
2045	36,90	66,70	47,02	4,79	5,73	5,49	-
2078	38,20	71,80	52,77	4,84	5,48	5,00	-
2254	34,80	54,60	45,72	4,74	5,06	4,89	-
2627	33,00	72,00	42,65	4,78	5,09	4,95	-
2630	38,30	70,50	50,02	4,66	5,88	5,16	-
2672	30,20	71,20	46,80	4,73	5,35	4,97	+
<b>Prosek</b>	<b>33,04</b>	<b>62,51</b>	<b>44,85</b>	<b>4,67</b>	<b>5,31</b>	<b>4,96</b>	

### 5.2.2. Varijabilnost teleomorfog stadijuma

Tokom ispitivanja morfoloških svojstava, izolati *F. graminearum* gajeni su na CA podlozi tokom pet nedelja na 25°C u mraku, kako bi se utvrdilo prisustvo teleomorfne struktura - peritecija. Pregledom kolonija ispitivanih izolata *in situ*, uočeno je da su svi ispitivani izolati formirali peritecije prečnika od 141,2 do 250,2 µm, koje su bile crne, jajaste sa čvornovitim zidom. Askusi su imali oblik palice sa kratkom osnovom i tankim zidom. U njima je uočeno 4-6 askospora, koje su bile bezbojne sa

zaobljenim krajevima. Kod ispitivanih izolata *F. graminearum* ss, *F. boothii* i *F. vorosii* nije uočena razlika u izgledu peritecija, kao ni askusa i askospora (Slika 10).



**Slika 10.** *Fusarium graminearum*: izgled peritecija (a i b), askusa sa askosporama (c) i askospora (d)

### 5.3. Varijabilnost patogenih svojstava

#### 5.3.1. Patogenost izolata *Fusarium graminearum* na listu ječma

Patogenost odabranih izolata *F. graminearum* u laboratorijskim uslovima proverena je i ocenjena nakon inokulacije listova ječma, kao test biljke. Ispitivanje patogenosti monosporijalnih izolata *F. graminearum* (101) pokazalo je da su svi izolati petog dana nakon inokulacije izazvali pojavu nekrotičnih pega sa žutim oreolom (Slika 20). Nekrotične površine u kasnijoj fazi razvoja prekrivene su beličastom prevlakom micelije parazita. Kod većine ispitivanih izolata sedam dana nakon inokulacije dolazi do potpune nekroze i propadanja listova. Ova pojava je dosta slabije izražena kod izolata 1339/2, 1408, 2254, 763, 2822, 1839, 581 i 4135. Reizolacija patogena obavljena je sa inokulisanih listova i dobijeni reizolati su upoređeni sa izolatima korišćenim za inokulaciju. Po izgledu kolonija i morfološkim karakteristikama dobijeni reizolati su u potpunosti odgovarali izvornim izolatima čime je potvrđena patogenost izolata i Kohovi postulati. Na osnovu dobijenih rezultata ispitivani izolati pokazali su različitu patogenost koja je merena dužinom pega (mm) (Tabela 10). Na listovima koji su kao negativna kontrola inokulisani sterilnom destilovanom vodom nije došlo do pojave simptoma bolesti (Slika 11).

Od svih ispitanih izolata *F. graminearum*, prema intenzitetu ispoljavanja simptoma, izdvajaju se izolati 1493 (dužina pege: 37,19 mm za 5 dana) i 1534 (dužina pege: 34,88 mm za 5 dana) poreklom sa ječma (Tabela 10). Na istom nivou značajnosti su i izolati 1485 poreklom sa pšenice (dužina pege: 34,88 mm za 5 dana) i 971 poreklom sa kukuruza (dužina pege: 33,88 mm za 5 dana) (Tabela 10). Kod preostalih izolata prosečna dužina pege kreće se u opsegu 2,00-33,31 mm, što ukazuje da je njihova patogenost na statistički značajno nižem nivou u odnosu na pomenute izolate. Budući da izolat 1493 predstavlja jedan od izolata sa statistički značajno najjačom sposobnošću da prouzrokuje simptome na listu ječma, može se smatrati izolatom koji generalno ispoljava najjaču agresivnost u laboratorijskim uslovima (Slika 11). Izolati koji su ispoljili najslabiju patogenost u laboratorijskim uslovima su 1339/2 poreklom sa pšenice (dužina pege: 2,00 mm za 5 dana) (Slika 11), a zatim izolat 1408 poreklom sa kukuruza i 2254 poreklom sa ječma (dužina pege: 2,06 mm za 5 dana) (Tabela 10). Uočeno je da su izolati identifikovani kao *F. boothii* (2822 i 4135) i *F. vorosii* (1339/2) ispoljili slabiju patogenost u poređenju sa ostalim izolatima (Tabela 10, Slika 11). Izgled simptoma na listu ječma izolata *F. graminearum* ss koji su ispoljili najslabiju (izolat 1408) i najjaču patogenost (izolat 1493) prikazani su na slici 11.



**Slika 11.** Simptoma na listu ječma nakon veštačke inokulacije: (a) kontrola, (b) *Fusarium vorosii* (izolat 1339/2), (c) *Fusarium boothii* (izolat 4135), (d) *Fusarium boothii* (izolat 2822), (e) *Fusarium graminearum* (izolat 1408) i (f) *Fusarium graminearum* (izolat 1493)



**Tabela 10.** Patogenost izolata *F. graminearum* poreklom sa pšenice, kukuruza i ječma na listu ječma

Izolati sa pšenice	Dužina pege (mm)	Izolati sa kukuruza	Dužina pege (mm)	Izolati sa ječma	Dužina pege (mm)
1339/2	2,00 a	1408	2,06 a	2254	2,06 a
763	4,30 ab	2822	3,44 a	1839	3,56 ab
4135	4,44 ab	581	3,44 a	1801	7,00 abc
795	4,44 ab	2815	4,63 a	798	7,94 bc
203	5,31 ab	1199	4,88 a	1517	9,63 cd
831	6,31 abc	1010	4,94 a	2672	10,00 cd
1351/2	9,00 bcd	1696	5,88 ab	770/2	12,50 cde
870	11,56 cde	1368	7,56 abc	2045	14,19 def
836	11,88 cde	1133	11,56 bcd	891/2	14,25 def
866	12,45 def	1282/2	12,06 cd	1526	16,25 ef
749	12,75 def	2533	12,44 cd	2630	16,44 ef
2635	13,00 def	1249	12,94 cd	1772	17,31 efg
2820	13,13 def	2811	13,19 cd	654	18,44 efg
677	13,38 def	1673	14,50 d	2627	19,31 fgh
1490/2	13,75 defg	943/2	15,75 de	1812	22,56 ghi
767	14,56 defg	1211	15,81 de	1528	22,81 ghi
1370	14,88 defg	762	16,00 de	805	24,69 hi
764	15,75 efgh	1419	16,44 de	1217/2	25,38 ij
670	16,25 efgh	1554/2	17,75 def	2078	26,94 ij
2625	17,13 efghi	1165	17,94 def	1800	27,10 ij
779/2	17,56 efghi	656	19,19 def	1534	34,88 j
687/2	17,81 efghij	2812	21,00 efg	1493	37,19 j
2818	18,19 efghijk	1195	21,56 efg		
1343	18,25 efghijk	2813	21,63 efg		
618	18,31 efghijk	914	21,75 efg		
1486/2	20,25 ghijklm	257	22,25 efg		
800	20,31 ghijklm	1495	23,75 fgh		
789	21,69 hijklmn	2624	24,31 fgh		
892	22,00 hijklmn	1030	25,13 gh		
766	22,10 hijklmn	1255	25,38 gh		
1443	23,07 ijklmno	1751	26,13 gh		
825	23,19 ijklmno	1268	27,25 gh		
1337	24,50 klmno	699	29,30 hi		
1012	25,31 lmnop	1649	29,56 hi		
681	26,56 mnopq	880	31,44 hi		
1746	27,44 nopqr	1482/2	33,31 i		
744	27,75 nopqr	971	33,88 i		
864	29,38 opqrs				
1348	30,94 pqrs				
2823	31,44 pqrs				
2621	32,69 qrs				
1485	34,88 s				
<b>Prosek</b>	<b>18,85</b>		<b>17,57</b>		<b>17,75</b>

\*Vrednosti obeležene istim slovom su na istom nivou značajnosti u intervalu poverenja 95%

Rezultati jednofaktorijalne analize varijanse dobijenih vrednosti za ispitivane parametre prikazani su u tabeli 11. Homogene grupe izolata i značajnost razlika utvrđeni su Dankanovim testom za interval poverenja 95% (Tabela 10). Na osnovu jednofaktorijalne analize varijanse za stepen infekcije lista ječma u kontrolisanim uslovima, utvrđene su statistički visoko značajne razlike ( $p < 0,01$ ) u patogenosti između izolata kod sva tri domaćina (kukuruz, pšenica, ječam) (Tabela 11).

**Tabela 11.** Jednofaktorijalna analiza varijanse za uticaj izolata poreklom sa kukuruza, pšenice i ječma na ispoljenu patogenost na listu ječma

<b>Kukuruz</b>					
<b>Izvor variranja</b>	<b>Suma kvadrata</b>	<b>Stepeni slobode</b>	<b>Sredina kvadrata</b>	<b>Količnik</b>	<b>Nivo značajnosti</b>
	SS	Df	MS	F	P
Izolat	11150,35	36	309,73	19,795	0,00**
Greška	1470,82	94	15,65		
<b>Pšenica</b>					
<b>Izvor variranja</b>	<b>Suma kvadrata</b>	<b>Stepeni slobode</b>	<b>Sredina kvadrata</b>	<b>Količnik</b>	<b>Nivo značajnosti</b>
	SS	Df	MS	F	P
Izolat	12077,92	41	294,58	19,154	0,00**
Greška	2260,83	147	15,38		
<b>Ječam</b>					
<b>Izvor variranja</b>	<b>Suma kvadrata</b>	<b>Stepeni slobode</b>	<b>Sredina kvadrata</b>	<b>Količnik</b>	<b>Nivo značajnosti</b>
	SS	Df	MS	F	P
Izolat	7365,15	21	350,24	24,815	0,00**
Greška	889,17	63	14,11		

\*Statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) ; \*\*Statistički visoko značajna razlika ( $p < 0,01$ )

### 5.3.2. Patogenost izolata *Fusarium graminearum* na klipu kukuruza

Patogenost izolata *F. graminearum* u dvogodišnjim poljskim ogledima potvrđena je nakon veštačke inokulacije klipa kukuruza u toku 2011. i 2012. godine na lokalitetu Zemun Polje. Dobijeni rezultati ukazali su da su svi ispitivani izolati bili patogeni, jer se na svim inokulisanim klipovima pojavio karakterističan simptom u vidu crveno-ružičaste truleži. U zavisnosti od agresivnosti izolata, klipovi su bili potpuno ili delimično zahvaćeni micelijom gljive (Slika 12). Simptomi izazvani sa većinom ispitivanih izolata javljali su se od vrha klipa u vidu micelije ružičaste boje, dok se između zrna razvijala beličasta micelija. U pojedinim slučajevima micelija je zahvatala pojedinačna zrna ili grupe od nekoliko zrna duž celog klipa ili pri njegovoj osnovi (Slika 12). Kod izolata *F. graminearum* koji su ispoljili jaču patogenost došlo je do slepljivanja komušine za klip. Na klipovima koji su kao negativna kontrola inokulisani sterilnom destilovanom vodom nije došlo do pojave simptoma bolesti.



**Slika 12.** Simptomi *Fusarium graminearum* posle veštačke inokulacije klipa kukuruza u vreme berbe

Reizolacija patogena obavljena je sa inokulisanih klipova kukuruza i dobijeni reizolati su po izgledu kolonija i morfološkim karakteristikama u potpunosti odgovarali izvornim izolatima, čime je potvrđena patogenost izolata i zadovoljeni Kohovi postulati. Dobijeni rezultati ukazuju na različitu patogenost/agresivnost koja je ocenjena na osnovu stepena infekcije prema skali 1-7 u vreme berbe kukuruza (Slika 13).



**Slika 13.** Skala za ocenu intenziteta patogenosti izolata posle veštačke inokulacije: 1- klip bez simptoma; 2- (1-3%); 3- (4-10%); 4- (11-25%); 5- (26-50%); 6- (51-75%); 7- (76-100%) zaražene površine klipa

Prosečna ocena intenziteta zaraze u 2011. godini varirala je u širokom rasponu u zavisnosti od izolata. Kod izolata poreklom sa pšenice ocena se kretala od 1,50 (izolat 1339/2) do 5,12 (izolat 1485) (Tabela 13), dok je kod izolata poreklom sa ječma bila u intervalu od 1,75 (izolat 1839) do 5,10 (izolat 1493) (Tabela 14). Patogenost izolata poreklom sa kukuruza bila je u opsegu od 1,55 (izolat 1408) do 5,37 (izolat 971) (Tabela 12). U proseku, najmanju patogenost ispoljili su izolati poreklom sa pšenice (2,88), dok su najveću prosečnu patogenost ispoljili izolati poreklom sa ječma (3,11). Izolat koji je identifikovan kao *F. vorosii* (Tabela 13, Slika 14) ispoljio je najmanju patogenost, dok su izolati *F. boothii* (2822 i 4135) ispoljili generalno slabiju patogenost u poređenju sa ostalim izolatima (Tabele 12 i 13, Slika 15).



**Slika 14.** *Fusarium vorosii*: ružičasta trulež inokulisanog klipa kukuruza (izolat 1339/2)



**Slika 15.** *Fusarium boothii*: ružičasta trulež inokulisanog klipa kukuruza  
(a) izolat 4135 i (b) izolat 2822

U toku druge godine ispitivanja (2012. godina) u uslovima veštačke inokulacije uočeno je da su ispitivani izolati ispoljili patogenost u opsegu od 1,95 (izolat 1408) do 5,27 (izolat 1649) kod izolata poreklom sa kukuruza (Tabela 12). Patogenost izolata poreklom sa pšenice bila je u opsegu od 1,68 (izolat 1339/2) do 4,87 (izolat 1485) (Tabela 13), dok su izolati poreklom sa ječma imali opseg variranja od 2,10 (izolat 1839) do 5,42 (izolat 1493) (Tabela 14). Takođe, i u 2012. godini uočava se da su izolati *F. vorosii* i *F. boothii* ispoljili slabiju patogenost u polju. Kada se uporede

prosečne ocene stepena infekcije u toku 2011. i 2012. godine kod izolata poreklom sa iste biljke domaćina uočava se da su izolati ispoljili vrlo ujednačenu patogenost (Tabele 12, 13 i 14).

**Tabela 12.** Patogenost izolata *Fusarium graminearum* poreklom sa kukuruza na klipu kukuruza

Izolat	2011. godina Ocena (1-7)	2012. godina Ocena (1-7)
Kontrola	1,00 a	1,00 a
1408	1,55 b	1,95 cde
581	1,77 bc	2,35 fghij
2815	1,80 bc	3,35 tuv
2822	1,80 bc	2,05 cdefg
1199	1,85 bcd	2,00 cdef
1010	1,85 bcd	2,30 efghij
1282/2	2,05 cdefg	2,57 ijklm
1368	2,05 cdefg	2,27 efghij
1696	2,22 efghi	2,47 hijk
2533	2,30 efghij	2,22 efghi
2811	2,40 ghij	3,45 uv
1495	2,45 hijk	2,40 ghij
1554/2	2,52 hijkl	2,20 defgh
1249	2,57 ijklm	2,60 jklmn
1211	2,60 jklmn	3,32 stuv
2624	2,85 lmnop	2,00 cdef
257	2,87 lmnopq	3,20 pqrstu
656	2,90 mnopq	2,45 hijk
2812	2,90 mnopq	3,00 opqrst
914	2,95 mnopqr	3,25 qrstuv
762	3,00 opqrst	3,00 opqrst
2813	3,00 opqrst	2,80 klmno
1255	3,05 opqrst	2,90 lmnopq
1165	3,05 opqrst	2,30 efghij
1030	3,20 pqrstu	3,10 opqrstu
1195	3,25 pqrstuv	2,52 hijkl
1419	3,32 stuv	2,60 jklmn
943/2	3,35 tuv	3,42 uv
1133	3,60 uv	3,30 rstuv
1673	3,97 w	2,97 nopqrs
1751	4,32 xy	4,55 xyz
699	4,62 yzć	4,32 xy
1268	4,82 zćč	4,32 xy
1482/2	4,90 ćč	4,27 wx
880	4,95 ćč	4,95 ćč
1649	4,95 ćč	5,27 čš
971	5,37 š	4,27 wx
<b>Prosek</b>	<b>3,05</b>	<b>3,03</b>

\*Vrednosti obeležene istim slovom su na istom nivou značajnosti u intervalu poverenja 95%

**Tabela 13.** Patogenost izolata *Fusarium graminearum* poreklom sa pšenice na klipku kukuruza

Izolat	2011. godina Ocena	2012. godina Ocena (1-7)
Kontrola	1,00 a	1,10 a
1339/2	1,50 b	1,68 bc
795	1,77 bcd	2,45 defghijklmno
831	1,90 bcd	2,12 cdefg
4135	1,97 bcd	2,20 cdefgh
767	2,10 cdefg	2,40 defghijkl
763	2,17 cdefgh	2,42 defghijkl
687/2	2,20 cdefgh	2,57 efghijklmnopqrs
618	2,20 cdefgh	2,22 defghi
1351/2	2,27 defghij	3,37 wxy
866	2,30 defghijk	2,65 ghijklmnopqrst
203	2,30 defghijk	2,82 jklmnopqrstuvw
1370	2,42 defghijkl	2,45 defghijklmno
749	2,42 defghijkl	2,50 defghijklmnop
1012	2,45 defghijklmno	2,30 defghijk
1486/2	2,47 defghijklmnop	2,45 defghijklmno
744	2,50 defghijklmnop	2,07 cdef
766	2,52 defghijklmnopq	3,52 xyz
870	2,65 ghijklmnopqrst	3,00 mopqrstuvw
1490/2	2,65 ghijklmnopqrst	2,52 defghijklmnopq
836	2,70 hijklmnopqrstu	2,65 ghijklmnopqrst
2818	2,72 hijklmnopqrstu	3,57 yzč
1337	2,77 ijklmnopqrstuv	2,62 fghijklmnopqrst
1746	2,80 ijklmnopqrstuv	3,02 pqrstuvwz
670	2,82 jklmnopqrstuv	3,00 opqrstuvwz
864	2,87 lmnopqrstuvw	2,85 klmnopqrstuvw
764	2,92 lmnopqrstuvw	2,77 ijklmnopqrstuv
677	3,00 mnoopqrstuvw	2,30 defghijk
2635	3,05 qrstuvwxy	4,02 ččš
892	3,07 rstuvwxy	2,50 defghijklmnopq
1343	3,07 rstuvwxy	2,72 hijklmnopqrstu
779/2	3,10 stuvwxy	2,30 defghijk
789	3,10 xstuvwxy	2,45 defghijklm
2820	3,15 tuvwxxy	2,65 ghijklmnopqrst
1443	3,20 uvwxxy	2,55 efghijklmnopqr
2625	3,22 uvwxxy	2,02 bcde
825	3,30 vwxy	2,07 bcde
681	3,95 zčč	2,37 defghijkl
1348	4,05 čš	4,40 čšžd
800	4,30 čšž	2,90 lmnopqrstuvw
2621	4,40 čšžd	4,57 žđ
2823	4,57 žđ	4,57 žđ
1485	5,12 ü	4,87 đü
<b>Prosek</b>	<b>2,86</b>	<b>2,81</b>

\*Vrednosti obeležene istim slovom su na istom nivou značajnosti u intervalu poverenja 95%

**Tabela 14.** Patogenost izolata *Fusarium graminearum* poreklom sa ječma na klipku kukuruza

<b>Izolat</b>	<b>2011. godina Ocena (1-7)</b>	<b>2012. godina Ocena (1-7)</b>
Kontrola	1,10 a	1,10 a
1839	1,75 b	2,10 bc
2254	2,20 bcd	2,72 defghij
1517	2,42 cdef	2,47 cdefg
1526	2,50 cdefgh	2,70 defghi
770/2	2,62 cdefghi	3,45 mn
1801	2,65 defghi	2,92 fghijklm
891/2	2,75 efghij	2,82 fghijk
2045	2,82 fghijk	2,50 cdefg
1812	2,90 fghijklm	2,52 cdefgh
2078	2,92 fghijklm	2,40 cdef
798	3,00 ghijklm	2,25 cde
2672	3,00 ghijklm	2,85 fghijkl
654	3,07 hijklm	2,20 bcd
2627	3,10 hijklm	3,45 mn
1528	3,25 ijklmn	3,30 klmn
1217/2	3,35 lmn	2,45 cdefg
1772	3,37 lmn	2,62 cdefghi
2630	3,70 no	3,75 no
1800	3,85 op	2,82 fghijk
805	4,32 qr	4,35 pq
1534	5,00 rs	5,25 s
1493	5,10 s	5,42 s
<b>Prosek</b>	<b>3,11</b>	<b>3,06</b>

\*Vrednosti obeležene istim slovom su na istom nivou značajnosti u intervalu poverenja 95%

Od svih ispitanih izolata *F. graminearum*, prema ispoljenim simptomima, na osnovu Dankanovog testa izdvajaju se izolati 971 (prosečna ocena: 5,37) poreklom sa kukuruza (Tabela 12) i 1485 (prosečna ocena: 5,12) poreklom sa pšenice (Tabela 13). Kod izolata poreklom sa ječma izdvaja se izolat 1493 (prosečna ocena: 5,10) zajedno sa izolatom 1534 (prosečna ocena: 5,00) koji su na istom nivou značajnosti (Tabela 14). Prosečna ocena patogenosti kod preostalih izolata je na statistički značajno nižem nivou u odnosu na pomenute izolate. Izolati koji su ispoljili najslabiju patogenost (1408, 1339/2, 1839) imali su ocenu patogenosti koja nije bila na statistički značajnom nivou (Tabele 12, 13 i 14).

Kod izolata poreklom sa pšenice dvofaktorijalna analiza varijanse pokazala je da je godina kada je vršena veštačka inokulacija statistički značajno ( $p < 0,05$ ) uticala na ispoljenu patogenost, dok kod izolata sa kukuruza godina nije imala statistički značajan



uticaj na ovu osobinu. Izolati poreklom sa kukuruza i pšenice su statistički visoko značajno ( $p < 0,01$ ) uticali na ispoljavanje ovog svojstva na klipku kukuruza (Tabela 15).

**Tabela 15.** Dvofaktorijalna analiza varijanse za uticaj godine inokulacije i izolata poreklom sa kukuruza, pšenice i ječma na ispoljenu patogenost na klipku kukuruza

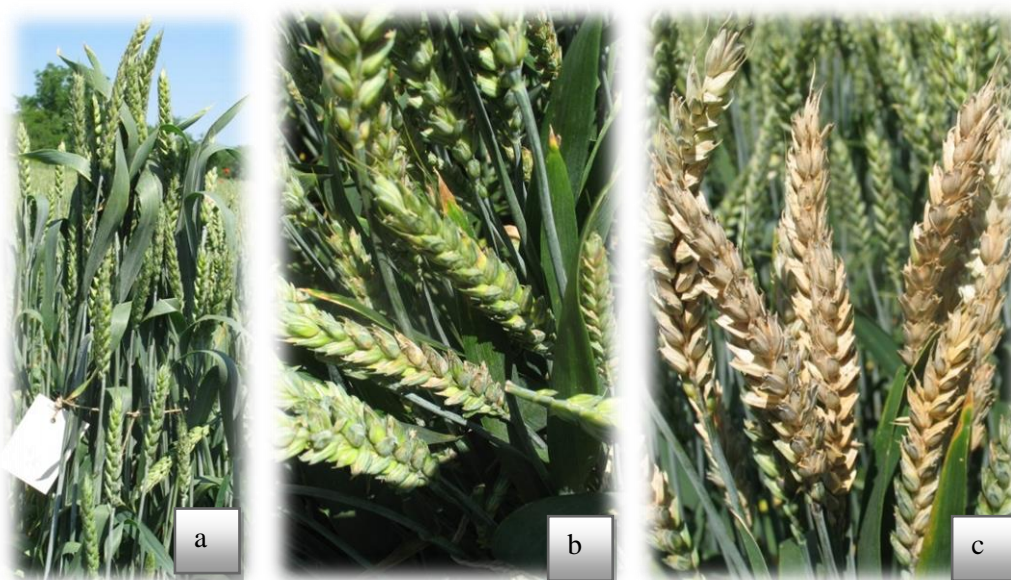
<b>Kukuruz</b>					
<b>Izvor variranja</b>	<b>Suma kvadrata</b>	<b>Stepeni slobode</b>	<b>Sredina kvadrata</b>	<b>Količnik</b>	<b>Nivo značajnosti</b>
	SS	Df	MS	F	P
Godina	0,065	1	0,065	1,46	0,23
Izolat	253,119	36	7,031	157,27	0,00**
Godina x Izolat	26,367	36	0,732	16,38	0,00**
Greška	9,925	222	0,045		
<b>Pšenica</b>					
<b>Izvor variranja</b>	<b>Suma kvadrata</b>	<b>Stepeni slobode</b>	<b>Sredina kvadrata</b>	<b>Količnik</b>	<b>Nivo značajnosti</b>
	SS	Df	MS	F	P
Godina	0,458	1	0,458	4,75	0,03*
Izolat	149,477	41	3,737	38,78	0,00**
Godina x Izolat	30,725	41	0,768	7,97	0,00**
Greška	23,707	246	0,096		
<b>Ječam</b>					
<b>Izvor variranja</b>	<b>Suma kvadrata</b>	<b>Stepeni slobode</b>	<b>Sredina kvadrata</b>	<b>Količnik</b>	<b>Nivo značajnosti</b>
	SS	Df	MS	F	P
Godina	0,874	1	0,874	8,47	0,00**
Izolat	121,229	21	5,773	55,95	0,00**
Godina x Izolat	11,379	21	0,542	5,25	0,00**
Greška	13,620	132	0,103		

\*Statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) ; \*\*Statistički visoko značajna razlika ( $p < 0,01$ )

Dvofaktorijalna analiza varijanse pokazala je da je godina kada je vršena veštačka inokulacija, kao i izolat sa kojim je vršena inokulacija visoko statistički značajno ( $p < 0,01$ ) uticali na ispoljenu patogenost na klipku kukuruza kod izolata poreklom sa ječma (Tabela 15). Takođe, interakcija ova dva faktora je visoko statistički značajno uticala na zavisno promenljivu ( $p < 0,01$ ).

### 5.3.3. Patogenost izolata *Fusarium graminearum* na klasu pšenice

Patogenost izolata *F. graminearum* u poljskim uslovima proveravana je i na klasu pšenice nakon veštačke inokulacije, tokom 2011. i 2012. godine na lokalitetu Zemun Polje. Kako bi se potvrdila patogenost izolata u vreme cvetanja pšenice izvršena je inokulacija klasa, a ocena patogenosti izvršena je nakon tri nedelje na osnovu stepena infekcije prema skali 1-7. Simptomi na klasu ispoljili su se u vreme formiranja i dozrevanja zrna. Jedan ili više klasića na nedozrelom klasu postaju svetli i počinju da bele. Klas može biti potpuno zahvaćen ili samo njegov deo, koji izumire iznad mesta zaraze, a zrna postaju štura. Zaraza u vreme cvetanja se širi na klasiće zbog čega dolazi do prevremenog dozrevanja. U uslovima povišene vlage, na zaraženim klasovima obično se javlja crvenoružičasta micelija. Ukoliko je zahvaćen ceo klas postaje tanak i zakržljava, a klasići su slepljeni uz vreteno. Sa inokulisanog klasa pšenice izvršena je reizolacija patogena. Dobijeni reizolati u potpunosti su odgovarali izvornim izolatima po izgledu kolonija i morfološkim karakteristikama, čime je potvrđena patogenost izolata i zadovoljeni Kohovi postulati. Izolati *F. graminearum* pokazali su veliku varijabilnost u ispoljavanju patogenosti na klasu pšenice u polju. Na klasovima koji su kao negativna kontrola inokulisani sterilnom destilovanom vodom nije došlo do pojave simptoma bolesti (Slika 16).



**Slika 16.** Inokulisani klasovi pšenice: a- kontrola, b- umereno i c- jako izraženi

Ispitivani izolati *F. graminearum* ispoljili su varijabilnost u patogenosti koja je ispitivana na klasu pšenice tokom 2011. i 2012. godine. U 2011. godini patogenost izolata je varirala u širokom opsegu u zavisnosti od izolata. Opseg variranja prosečne ocene stepena infekcije bio je od 1,75 (izolat 1339/2) do 5,25 (izolat 1485) kod izolata poreklom sa pšenice (Tabela 17), kod izolata poreklom sa ječma je bila u opsegu od 1,90 (izolat 1839) do 4,40 (izolat 1772) (Tabela 18), dok je kod izolata poreklom sa kukuruza bila u intervalu od 1,62 (izolat 1408) do 5,10 (izolat 1673) (Tabela 16). Kada se uporede prosečne vrednosti ocene stepena infekcije tokom 2011. godine između izolata poreklom sa različitih domaćina uočava se da nije bilo značajne razlike između izolata poreklom sa kukuruza (3,05), pšenice (3,06) i ječma (3,16) (Tabele 16, 17 i 18).

Tokom 2012. godine, u uslovima veštačke inokulacije uočeno je da su ispitivani izolati u proseku ispoljili veću patogenost kod izolata poreklom sa sva tri domaćina sa kojih su izolovani u odnosu na 2011. godinu kada je razvoj simptoma fuzarioze klasa pšenice bio slabije izražen. Prosečno najslabiju patogenost ispoljili su izolati poreklom sa pšenice (3,15), dok su najveću prosečnu patogenost ispoljili izolati poreklom sa ječma (3,46) (Tabele 17 i 18). Opseg variranja prosečne ocene u 2012. godini je bio od 1,90 (izolat 1368) do 5,75 (izolat 1673) kod izolata poreklom sa kukuruza, od 2,10 (izolat 1337) do 5,57 (izolat 2823) kod izolata poreklom sa pšenice i od 2,10 (izolat 1839) do 4,82 (izolat 1772) kod izolata poreklom sa ječma (Tabele 16, 17 i 18). Kada se uporede svi ispitivani izolati, takođe i u ovom testu patogenosti, pored veštačke inokulacije klipa kukuruza i lista ječma, *F. vorosii* i *F. boothii* spadaju u grupu manje patogenih izolata.

Rezultati ispitivanja patogenosti izolata u laboratorijskim i poljskim uslovima pokazali su da su svi ispitivani izolati bili patogeni. Agresivnost između pojedinih izolata je varirala kako u kontrolisanim uslovima, tako i u polju, ali isto tako i između izolata poreklom sa različitih biljaka domaćina (kukuruz, pšenica i ječam). Nije uočena povezanost između porekla izolata i patogenosti na biljci domaćinu sa koje vode poreklo.

**Tabela 16.** Patogenost izolata *Fusarium graminearum* poreklom sa kukuruza na klasu pšenice

<b>Izolat</b>	<b>2011. godina Ocena (1-7)</b>	<b>2012. godina Ocena (1-7)</b>
Kontrola	1,00 a	1,15 a
1408	1,62 b	2,10 cdefg
2811	1,90 bc	2,35 fghi
2822	1,95 cd	2,45 hi
1696	2,00 cde	3,65 tuv
2815	2,00 cde	2,40 ghi
1282/2	2,02 cdef	2,77 jk
1255	2,05 cdef	1,95 cd
1199	2,05 cdef	2,32 efghi
1165	2,15 cdefgh	3,30 nopqrs
1249	2,15 cdefgh	3,20 mnopqr
1482/2	2,17 cdefgh	3,17 lmnopq
1368	2,20 cdefgh	1,90 bc
2813	2,55 ij	1,97 cd
1030	2,57 ij	3,22 mnopqrs
656	2,77 jk	3,07 klmno
257	2,85 jkl	3,07 klmno
914	2,90 klm	2,35 fghi
2624	2,90 klm	3,00 klmn
1554/2	2,90 klm	2,25 defghi
2812	3,10 klmnop	3,90 vwx
581	3,17 lmnopq	3,20 mnopqr
1195	3,20 mnopqq	2,55 ij
1419	3,30 nopqrs	3,52 rst
1010	3,30 nopqrs	3,37 opqrst
1751	3,37 opqrst	4,30 yzč
1133	3,42 pqrst	3,90 vwx
943/2	3,47 qrst	3,90 vwx
1211	3,52 rst	3,85 uvw
762	3,55 stu	3,30 nopqrs
1495	3,70 tuv	4,17 xyz
699	4,10 wxy	4,32 yzč
2533	4,20 xyzč	5,17 č
1649	4,45 zč	4,90 č
1268	4,50 č	5,20 č
971	4,92 č	5,22 č
880	4,95 č	5,10 č
1673	5,10 č	5,75 č
<b>Prosek</b>	<b>3,05</b>	<b>3,41</b>

\*Vrednosti obeležene istim slovom su na istom nivou značajnosti u intervalu poverenja 95%

**Tabela 17.** Patogenost izolata *Fusarium graminearum* poreklom sa pšenice na klasu pšenice

Izolati	2011. godina Ocena (1-7)	2012. godina Ocena (1-7)
Kontrola	1,10 a	1,20 a
1339/2	1,75 b	2,22 cdefg
831	1,85 b	2,30 efghi
870	1,87 bc	2,65 ijklmnop
866	1,90 bcd	2,75 klmnopqr
795	1,92 bcd	2,40 fghijk
4135	2,00 bcde	2,35 efghij
767	2,05 bcdef	2,62 ijklmno
203	2,05 bcdef	2,50 ghijkl
763	2,10 bcdef	2,25 defgh
687/2	2,10 bcdef	2,60 hijklmn
1370	2,30 efghi	3,00 opqrst
2621	2,35 efghij	3,15 st
744	2,52 ghijklm	2,10 bcdef
789	2,65 ijklmno	3,10 rst
1490/2	2,72 jklmnopqr	2,60 hijklmn
1337	2,90 mnopqrst	2,10 bcdef
1012	2,90 mnopqrst	3,75 uv
1343	2,90 mnopqrst	3,22 st
2818	2,92 nopqrst	3,95 uvwx
864	2,92 nopqrst	3,02 pqrst
677	3,00 opqrst	2,30 efghi
618	3,10 qrst	3,75 uv
670	3,12 qrst	2,10 bcdef
1746	3,12 qrst	3,65 u
1443	3,22 st	2,65 ijklmnop
836	3,22 st	3,10 rst
2625	3,25 u	2,85 lmnopqrs
892	3,25 u	2,25 defgh
764	3,25 u	2,70 jklmnop
825	3,25 u	2,65 ijklmnop
2820	3,25 u	2,57 ghijklmn
1351/2	3,25 u	2,65 ijklmnop
779/2	3,75 uv	4,35 y
749	3,90 uvwx	4,25 xy
1486/2	4,05 vwxy	3,65 u
2635	4,10 vwxy	4,25 wxy
681	4,10 vwxy	3,77 uv
800	4,25 wxy	3,90 uwx
766	4,37 y	4,90 zc
1348	4,82 z	5,30 cš
2823	5,17 cč	5,57 š
1485	5,25 c	4,75 z
<b>Prosek</b>	<b>3,06</b>	<b>3,15</b>

\*Vrednosti obeležene istim slovom su na istom nivou značajnosti u intervalu poverenja 95%

**Tabela 18.** Patogenost izolata *Fusarium graminearum* poreklom sa ječma na klasu pšenice

Izolat	2011. godina Ocena (1-7)	2012. godina Ocena (1-7)
Kontrola	1,00 a	1,10 a
1839	1,90 bc	2,10 bc
1812	2,12 c	2,90 fg
891/2	2,25 cd	2,95 fg
770/2	2,50 de	3,10 fgh
1801	2,75 ef	3,00 fgh
1517	2,80 ef	3,10 fgh
2254	2,87 fgh	3,00 fgh
1526	3,05 fgh	3,37 jkl
1800	3,05 fgh	3,25 ijk
2627	3,10 fgh	3,97 nopq
1528	3,10 fgh	3,05 fgh
2045	3,17 ghijk	3,22 hijk
654	3,25 ijk	3,00 fgh
1534	3,25 ijk	3,62 lm
2672	3,25 ijk	2,85 fg
2078	3,50 kl	4,10 pqr
1493	3,65 lmn	4,25 qr
798	3,67 lmno	4,10 pqr
2630	3,87 mnop	4,25 qr
1217/2	3,95 mnopq	4,05 pq
805	4,12 pqr	4,00 opq
1772	4,40 r	4,82 s
<b>Prosek</b>	<b>3,16</b>	<b>3,46</b>

\*Vrednosti obeležene istim slovom su na istom nivou značajnosti u intervalu poverenja 95%

Dvofaktorijalna analiza varijanse pokazala je da su na ispoljenu patogenost u polju statistički značajno ( $p < 0,01$ ) uticali izolat sa kojim je vršena inokulacija na klasu pšenice, kao i godina istraživanja. Interakcija ova dva faktora je takođe visoko statistički značajno uticala na zavisno promenljivu ( $p < 0,01$ ) kod izolata poreklom sa sva tri domaćina (Tabela 19).

**Tabela 19.** Dvofaktorijalna analiza varijanse za uticaj godine inokulacije i izolata poreklom sa kukuruza, pšenice i ječma na ispoljenu patogenost na klasu pšenice

<b>Kukuruz</b>					
<b>Izvor variranja</b>	<b>Suma kvadrata</b>	<b>Stepeni slobode</b>	<b>Sredina kvadrata</b>	<b>Količnik</b>	<b>Nivo značajnosti</b>
	SS	Df	MS	F	P
Godina	9,276	1	9,276	225,06	0,00**
Izolat	272,133	36	7,559	183,40	0,00**
Godina x Izolat	19,436	36	0,540	13,10	0,00**
Greška	9,150	222	0,041		
<b>Pšenica</b>					
<b>Izvor variranja</b>	<b>Suma kvadrata</b>	<b>Stepeni slobode</b>	<b>Sredina kvadrata</b>	<b>Količnik</b>	<b>Nivo značajnosti</b>
	SS	Df	MS	F	P
Godina	0,598	1	0,598	12,09	0,00**
Izolat	239,633	41	5,991	121,25	0,00**
Godina x Izolat	27,250	41	0,681	13,79	0,00**
Greška	12,155	246	0,049		
<b>Ječam</b>					
<b>Izvor variranja</b>	<b>Suma kvadrata</b>	<b>Stepeni slobode</b>	<b>Sredina kvadrata</b>	<b>Količnik</b>	<b>Nivo značajnosti</b>
	SS	Df	MS	F	P
Godina	3,811	1	3,811	85,53	0,00**
Izolat	65,076	21	3,099	69,54	0,00**
Godina x Izolat	4,560	21	0,217	4,87	0,00**
Greška	5,883	132	0,045		

\*Statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) ; \*\*Statistički visoko značajna razlika ( $p < 0,01$ )

Utvrđena je statistički visoko značajna pozitivna korelacija ( $p < 0,01$ ) između patogenosti ispitivanih izolata na listu ječma i klipu kukuruza, odnosno klasu pšenice, bez obzira na poreklo biljke domaćina sa koje su izolovani (Tabela 20). Isto tako, utvrđena je statistički visoko značajna pozitivna korelacija ( $p < 0,01$ ) između patogenosti ispoljene na klasu pšenice i klipu kukuruza (Tabela 21).

**Tabela 20.** Korelacija između patogenosti izolata različitog porekla na ječmu, pšenici i kukuruza

Pat.na listu ječma ↓	Patogenost u polju					
	klas pšenice			klip kukuruza		
Poreklo	kukuruz	pšenica	ječam	kukuruz	pšenica	ječam
kukuruz	0,92**			0,90**		
pšenica		0,89**			0,83**	
ječam			0,93**			0,87**

\*Statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ); \*\*Statistički visoko značajna razlika ( $p < 0,01$ )

**Tabela 21.** Korelacija između patogenosti na klasu pšenice i klipu kukuruza

Pat. na klasu pšenice ↓	Patogenost na klipu kukuruza		
	kukuruz	pšenica	ječam
Poreklo			
kukuruz	0,93**		
pšenica		0,82**	
ječam			0,81**

\*Statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ); \*\*Statistički visoko značajna razlika ( $p < 0,01$ )

#### 5.4. Varijabilnost toksigenih svojstava

##### 5.4.1. Potencijal produkcije izolata *Fusarium graminearum* pomoću ELISA metode

ELISA metodom utvrđen je potencijal produkcije zearalenona i deoksinivalenola ispitivanih izolata *F. graminearum*, kao najznačajnije toksigeno svojstvo.

**Zearalenon (ZEA).** Koncentracija ZEA varirala je kako između izolata poreklom sa istog domaćina tako i između izolata poreklom sa različitih domaćina. Najveća ukupna prosečna koncentracija sintetisanog toksina (44,28  $\mu\text{g/kg}$ ) uočena je kod izolata poreklom sa pšenice, dok je najmanja ukupna prosečna koncentracija (35,73  $\mu\text{g/kg}$ ) bila kod izolata poreklom sa ječma (Tabela 24). Najširi opseg variranja u produkciji ZEA uočen je kod izolata poreklom sa pšenice od 2,11 do 162,8  $\mu\text{g/kg}$ , a najmanji opseg kod izolata poreklom sa ječma (2,26-114,3  $\mu\text{g/kg}$ ) (Tabela 22). Najveće koncentracije ZEA detektovane su kod izolata 1339/2 (162,8  $\mu\text{g/kg}$ ) poreklom sa pšenice, kod izolata 971 (123,17  $\mu\text{g/kg}$ ) poreklom sa kukuruza i kod izolata 805 (114,35



µg/kg) poreklom sa ječma (Tabela 24). Najmanje koncentracije ovog mikotoksina detektovane su kod izolata 880 (0,25µg/kg) poreklom sa zrna kukuruza, 766 (2,11 µg/kg) poreklom sa pšenice i kod 1217/2 (2,26 µg/kg) poreklom sa ječma (Tabela 24). Uočeno je da je najveći procenat ispitivanih izolata sintetisao ZEA u koncentracijama između 10 i 50 µg/kg kod izolata poreklom sa sva tri domaćina (Tabela 22). U najmanjem procentu detektovane su koncentracije ZEA veće od 100 µg/kg, kod izolata poreklom sa ječma (4,54,%), a kod izolata poreklom sa kukuruza u nešto većem procentu (5,40%), dok je kod izolata poreklom sa pšenice taj procenat bio najveći (11,90%) (Tabela 22). Izolat koji je na molekularnom nivou identifikovan kao *F. vorosii* sintetisao je najveće koncentracije ZEA od svih ispitivanih izolata (162,8 µg/kg), dok su izolati identifikovani kao *F. boothii* sintetisali četiri puta manje ZEA 37,52 µg/kg (izolat 4135) i 26,88 µg/kg (izolat 2822) (Tabela 24).

**Tabela 22.** Potencijal produkcije deoksinivalenola i zearalenona kod ispitivanih izolata *Fusarium graminearum*

Koncentracija mikotoksina	DON (µg/g)			ZEA (µg/kg)		
	kukuruz	pšenica	ječam	kukuruz	pšenica	ječam
	% izolata					
< 10	13,51	0	13,63	24,32	19,05	18,18
10 – 50	32,43	38,09	27,27	51,35	57,15	63,64
50 – 100	35,13	45,24	50,00	18,92	11,90	13,64
> 100	18,92	16,66	9,09	5,40	11,90	4,54
Opseg	0,5-334,4	13,3-441,3	2,3-202,7	0,25-123,2	2,11-162,8	2,26-114,3

**Deokinivalenol (DON).** Rezultati kvantitativne analize DON-a ispitivanih izolata *F. graminearum* pokazali su da je izolat 2621 poreklom sa pšenice sintetisao najviše koncentracije DON-a (441,3 µg/g), dok je najmanje koncentracije (0,5 µg/g) produkovao izolat 581 sa kukuruza (Tabela 24). Poređenjem ukupnih prosečnih koncentracija DON-a poreklom sa različitih domaćina uočeno je da su izolati *F. graminearum* poreklom sa ječma sintetisali najmanje koncentracije DON-a (62,82 µg/g), a izolati poreklom sa pšenice najveće koncentracije (88,47µg/g) DON-a (Tabela 24). Uočen je najveći opseg variranja koncentracija ovog mikotoksina kod izolata poreklom sa pšenice od 13,3 µg/g (izolat 4135) do 441,3 µg/g (izolat 2621), a najmanji opseg variranja od 2,3 µg/g (izolat 1801) do 202,7 µg/g (izolat 1812) uočen je kod

izolata poreklom sa ječma (Tabela 24). Najveći procenat ispitivanih izolata poreklom sa sva tri domaćina imao je koncentracije DON-a između 50 i 100 µg/g (Tabela 22). Svi ispitivani izolati poreklom sa pšenice sintetisali su koncentracije DON-a veće od 10 µg/g. Kod izolata poreklom sa ječma uočava se da je najmanji procenat izolata (9,09%) imao koncentracije preko 100 µg/g (Tabela 22). Ispitivani izolati *F. graminearum* u proseku su sintetisali veće koncentracije DON-a nego ZEA kod sva tri domaćina (Tabela 24). Izolat *F. vorosii* sintetisao je manje DON-a u poređenju sa većinom ispitivanih izolata *F. graminearum* (29,4 µg/g). Takođe, izolati *F. boothii* su sintetisali niske koncentracije DON-a 0,6 µg/g (izolat 2822) odnosno 13,3 µg/g (izolat 4135) (Tabela 24).

Rezultati Elisa testa pokazali su da postoji statistički visoko značajna korelacija između potencijala produkcije DON i ZEA kod izolata *F. graminearum* poreklom sa kukuruza, dok kod izolata poreklom sa pšenice i ječma nije uočena statistički značajna korelacija između ispitivanih mikotoksina (Tabela 23).

**Tabela 23.** Korelacija između sinteze deoksinivalenola i zearalenona kod izolata *Fusarium graminearum*

Mikotoksin		Koeficijent korelacije (r)		
		DON		
		Kukuruz	Pšenica	Ječam
ZEA	Kukuruz	0,55**		
	Pšenica		0,28	
	Ječam			0,36

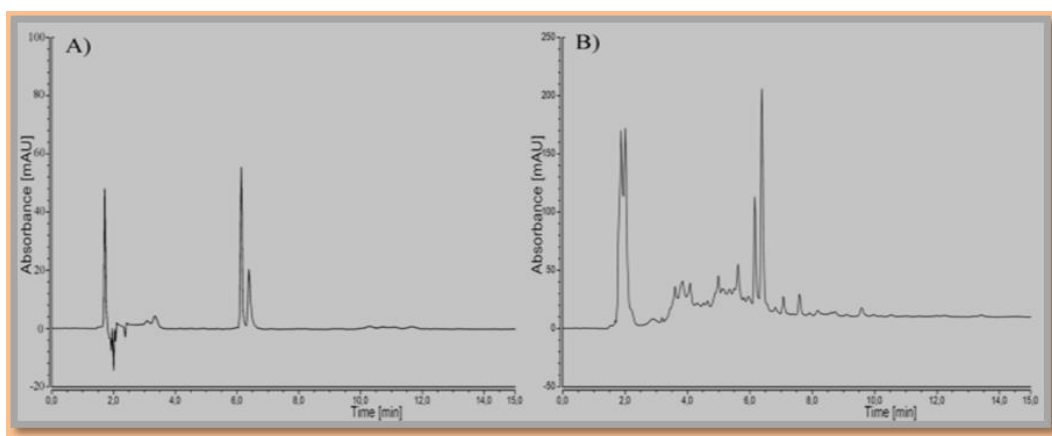
\*Statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) ; \*\*Statistički visoko značajna razlika ( $p < 0,01$ )

**Tabela 24.** Potencijal produkcije deoksinivalenola i zearalenona izolata *Fusarium graminearum*

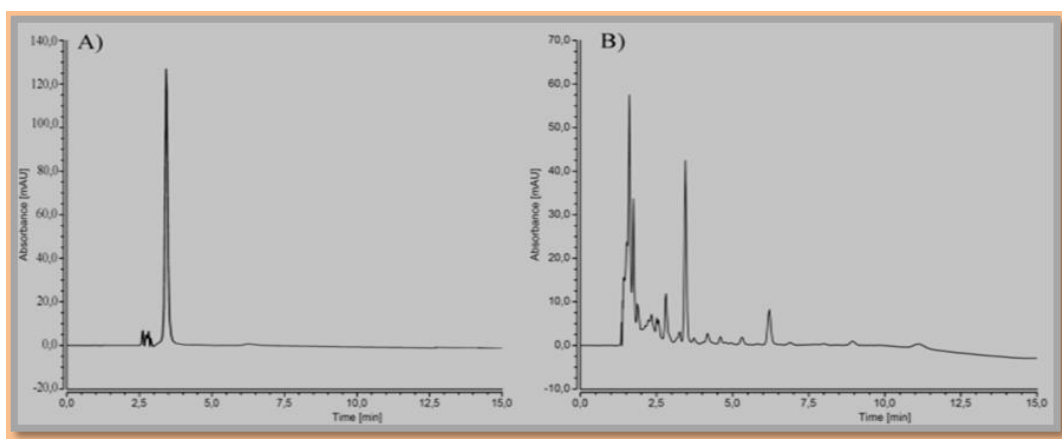
Izolat	Pšenica		Kukuruz			Ječam		
	DON (µg/g)	ZEA (µg/kg)	Izolat	DON (µg/g)	ZEA (µg/kg)	Izolat	DON (µg/g)	ZEA (µg/kg)
203	40.2	12.93	257	149.8	102.33	654	68.1	29.29
618	91.5	46.73	581	0.5	39.48	770/2	70.2	7.03
670	42.4	13.81	656	240.8	35.92	798	50.7	13.21
677	21.7	38.36	699	334.4	88.93	805	93.9	114.35
681	170.1	45.21	762	65.7	31.55	891/2	21.2	44.39
687/2	89.8	15.99	880	33.3	0.25	1217/2	62.3	2.26
744	95.0	64.94	914	64.8	9.55	1493	76.6	37.94
749	58.2	32.33	943/2	20	96.47	1517	3.0	2.55
763	23.8	9.27	971	168.3	123.17	1526	28.8	18.89
764	82.1	12.87	1010	3.7	7.28	1528	89.3	65.12
766	66.7	2.11	1030	88.9	32.06	1534	174.9	36.35
767	16.6	4.26	1133	97.7	90.12	1772	53.2	39.27
779/2	75.8	30.26	1165	35.5	20.64	1800	67.56	59.16
789	51.6	9.67	1195	38.6	14.84	1801	2.3	15.19
795	65.7	48.74	1199	47.4	9.21	1812	202.7	46.46
800	42.5	25.65	1211	23.3	22.49	1839	16.4	31.06
825	80.0	122.79	1249	17.5	24.02	2045	48	27.52
831	41.2	18.67	1255	99.4	39.77	2078	98.4	22.15
836	13.4	7.47	1268	41.2	6.58	2254	2.8	7.43
864	353.1	39.57	1282/2	2.9	8.06	2627	23.5	47.26
866	14.2	21.87	1368	79.1	35.08	2630	45.2	32.23
870	53.8	25.32	1408	25	14.87	2672	83	87.06
892	15.9	12.22	1419	19.8	4.77	<b>Prosek</b>	<b>62,82</b>	<b>35,73</b>
1012	48.8	7.48	1482/2	155.2	59.77			
1337	79.8	7.84	1495	64.5	37.98			
1339/2	29.4	162.8	1554/2	97.5	38.49			
1343	98.2	18.99	1649	373.8	92.14			
1348	187.8	39.46	1673	41.9	24.69			
1351/2	53.7	98.09	1696	47.3	21.03			
1370	23.8	32.85	1751	96	51.26			
1443	108.3	2.73	2533	51.5	20.26			
1485	184.6	117.98	2624	84.5	46.53			
1486/2	45.7	93.24	2811	99.6	67.51			
1490/2	66.6	118.43	2812	72.6	1.12			
1746	85.8	96.09	2813	193.7	0.54			
2621	441.3	136.81	2815	2.6	28.34			
2625	95.4	42.68	2822	0.6	26.88			
2635	71.3	36.015	<b>Prosek</b>	<b>83,21</b>	<b>37,13</b>			
2818	93.8	94.26						
2820	44.2	29.52						
2823	338.7	26.07						
4135	13.3	37.52						
<b>Prosek</b>	<b>88,47</b>	<b>44,28</b>						

#### 5.4.2. Određivanje hemotipova izolata *Fusarium graminearum* pomoću HPLC metode

Određivanje hemotipova izolata *F. graminearum* urađen je hemijskim analizama, primenom visoko efikasne tečne hromatografije sa UV detekcijom (HPLC/UV). Pomoću ove metode urađen je toksikološki profil izolata *F. graminearum*, odnosno sposobnost sinteze nivalenola (NIV) i deoksinivalenola kao i njegovih acetil ester derivata (3ADON i 15ADON) (Slike 18 i 19).



**Slika 17.** Hromatogram 15ADON i 3 ADON u standardu (A) i inokulisanom uzorku kukuruza izolatom 618 (B)



**Slika 18.** Hromatogram nivalenola u standardu (A) i inokulisanom uzorku kukuruza izolatom 618 (B)

Rezultati kvalitativne i kvantitativne analize pokazali su da postoji velika varijabilnost izolata u ovom svojstvu (Tabele 25, 26 i 27). Upoređivanjem ukupnih prosečnih koncentracija 15ADON, uočava se da su izolati poreklom sa kukuruza sintetisali najveće koncentracije (31,96 µg/g) (Tabela 25), dok su najmanje produkovali izolati poreklom sa ječma (24,79 µg/g) (Tabela 27). Ukupne prosečne koncentracije 3ADON su bile iste kod izolata poreklom sa pšenice i ječma, dok su izolati poreklom sa kukuruza imali dvostruko veće prosečne koncentracije (Tabele 25, 26 i 27). Izolati vrste *F. boothii* (izolat 2822 i izolat 4135) i *F. vorosii* (izolat 1339/2) produkovali su samo 15ADON, dok 3ADON i NIV nije detektovan (Tabele 25 i 26, Grafikoni 4 i 5).

Na osnovu dobijenih rezultata uočava se veliki diverzitet u produkciji DON derivata. Većina ispitivanih izolata *F. graminearum* ss bez obzira na poreklo (kukuruz, pšenica ili ječam) pripadali su 15ADON hemotipu. Detektovan je i 3ADON hemotip ali u značajno manjem broju (13/101) u odnosu na 15ADON hemotip (88/101), dok nijedan ispitivan izolat iz Srbije nije pripadao NIV hemotipu (Tabele 25, 26 i 27).

**Tabela 25.** Toksikološki profil izolata *Fusarium graminearum* poreklom sa kukuruza

Izolat	DON ( $\mu\text{g/g}$ )	15ADON ( $\mu\text{g/g}$ )	3ADON ( $\mu\text{g/g}$ )	NIV ( $\mu\text{g/g}$ )	Hemotip
581	64,97	20,92	41,11	ND	3ADON
656	29,68	10,78	14,78	0,51	3ADON
914	35,68	12,37	14,57	0,71	3ADON
943/2	3,18	0,63	1,03	0,42	3ADON
1010	6,38	0,71	3,01	ND	3ADON
1165	16,18	1,77	10,65	ND	3ADON
1195	97,41	24,72	59,60	0,28	3ADON
1249	159,25	72,47	72,85	1,65	3ADON
1368	10,55	ND	3,42	2,31	3ADON
257	31,88	18,57	5,85	0,75	15ADON
699	54,75	41,32	6,68	0,62	15ADON
762	27,32	14,66	4,39	0,36	15ADON
880	64,96	36,73	22,64	1,21	15ADON
971	27,49	22,66	1,73	ND	15ADON
1030	24,63	18,67	1,58	0,55	15ADON
1133	154,97	125,97	6,33	0,73	15ADON
1199	94,67	57,59	25,51	0,32	15ADON
1211	56,97	46,71	1,46	1,45	15ADON
1255	43,19	30,57	5,69	ND	15ADON
1268	107,31	54,67	42,20	1,63	15ADON
1282/2	42,18	25,12	5,18	1,25	15ADON
1408	39,63	26,62	5,32	0,40	15ADON
1419	40,38	20,79	13,97	0,59	15ADON
1482/2	42,67	32,14	2,52	0,68	15ADON
1495	17,69	12,12	1,67	ND	15ADON
1554/2	94,66	65,02	21,04	0,31	15ADON
1649	19,95	13,41	2,21	0,62	15ADON
1673	14,57	9,75	ND	ND	15ADON
1696	31,62	25,36	0,19	1,08	15ADON
1751	22,23	15,36	1,96	0,55	15ADON
2533	19,22	11,40	0,59	0,96	15ADON
2624	78,47	55,61	20,10	0,53	15ADON
2811	135,67	114,68	7,74	0,47	15ADON
2812	8,97	5,47	0,89	0,49	15ADON
2813	45,58	33,58	6,40	0,37	15ADON
2815	100,97	93,07	0,82	0,87	15ADON
2822	12,58	11,61	ND	ND	15ADON
<b>Prosek</b>	<b>50,79</b>	<b>31,99</b>	<b>11,77</b>	<b>0,61</b>	

ND - nije detektovan

**Tabela 26.** Toksikološki profil izolata *Fusarium graminearum* poreklom sa pšenice

Izolot	DON ( $\mu\text{g/g}$ )	15ADON ( $\mu\text{g/g}$ )	3ADON ( $\mu\text{g/g}$ )	NIV ( $\mu\text{g/g}$ )	Hemotip
800	12,31	2,73	3,73	1,43	3ADON
1370	64,36	18,99	36,51	1,48	3ADON
203	38,15	29,11	2,50	1,03	15ADON
618	57,68	46,81	6,66	0,24	15ADON
670	32,19	26,94	ND	1,19	15ADON
677	103,59	69,97	26,82	1,97	15ADON
681	71,26	58,76	3,90	1,54	15ADON
687/2	39,63	31,88	2,36	ND	15ADON
744	26,96	16,75	2,85	1,47	15ADON
749	95,95	78,14	9,77	ND	15ADON
763	9,18	5,68	ND	0,27	15ADON
764	40,36	23,31	9,52	1,34	15ADON
766	6,09	3,18	0,93	ND	15ADON
767	19,85	12,38	1,65	0,83	15ADON
779/2	72,22	46,58	17,81	1,25	15ADON
789	43,47	27,19	12,37	0,33	15ADON
795	18,56	11,69	1,61	ND	15ADON
825	21,59	16,07	1,76	0,60	15ADON
831	9,13	6,67	0,43	0,70	15ADON
836	24,56	15,40	2,39	0,73	15ADON
864	28,95	22,07	2,04	ND	15ADON
866	5,27	1,69	1,08	ND	15ADON
870	37,86	24,77	5,29	ND	15ADON
892	11,20	6,91	0,59	0,72	15ADON
1012	16,28	10,05	1,84	0,61	15ADON
1337	39,63	26,46	7,09	0,40	15ADON
1339/2	30,97	28,71	ND	ND	15ADON
1343	46,38	24,69	16,41	0,64	15ADON
1348	75,69	46,84	22,79	0,88	15ADON
1351/2	101,97	90,97	5,91	0,67	15ADON
1443	52,97	35,66	9,06	0,75	15ADON
1485	59,25	50,05	1,49	0,57	15ADON
1486/2	14,69	9,58	0,38	1,05	15ADON
1490/2	46,74	40,66	1,89	0,31	15ADON
1746	41,78	32,15	4,25	1,25	15ADON
2621	46,32	37,75	1,79	0,67	15ADON
2625	19,82	14,37	0,85	ND	15ADON
2635	45,69	34,60	1,96	0,41	15ADON
2818	37,39	25,13	2,18	1,25	15ADON
2820	57,36	48,85	0,99	0,85	15ADON
2823	94,98	75,12	12,35	1,27	15ADON
4135	10,23	7,92	ND	ND	15ADON
<b>Prosek</b>	<b>41,15</b>	<b>29,60</b>	<b>5,80</b>	<b>0,68</b>	

ND - nije detektovan

**Tabela 27.** Toksikološki profil izolata *Fusarium graminearum* poreklom sa ječma

Izolot	DON ( $\mu\text{g/g}$ )	15ADON ( $\mu\text{g/g}$ )	3ADON ( $\mu\text{g/g}$ )	NIV ( $\mu\text{g/g}$ )	Hemotip
1528	4,12	1,07	1,19	0,29	3ADON
2254	11,09	2,33	3,28	1,53	3ADON
654	61,23	26,71	26,63	0,61	15ADON
770/2	14,21	6,21	1,35	1,15	15ADON
798	12,83	7,20	0,22	0,68	15ADON
805	46,41	32,81	4,85	ND	15ADON
891/2	50,12	31,23	10,17	0,86	15ADON
1217/2	75,18	62,26	3,61	1,83	15ADON
1493	21,14	14,19	0,10	ND	15ADON
1517	15,36	10,34	2,49	0,19	15ADON
1526	41,87	25,89	8,87	0,35	15ADON
1534	8,74	6,23	0,68	ND	15ADON
1772	58,36	49,84	5,33	0,41	15ADON
1800	8,32	4,49	0,92	0,72	15ADON
1801	104,98	95,07	3,10	ND	15ADON
1812	31,69	23,68	3,25	1,31	15ADON
1839	17,38	10,59	0,11	0,92	15ADON
2045	19,61	9,86	3,71	1,73	15ADON
2078	29,97	21,10	4,61	1,36	15ADON
2627	42,55	19,98	15,08	1,36	15ADON
2630	22,43	13,44	0,67	0,24	15ADON
2672	102,32	71,05	26,76	1,32	15ADON
<b>Prosek</b>	<b>36,36</b>	<b>24,79</b>	<b>5,77</b>	<b>0,76</b>	

ND - nije detektovan

Ispitivanjem izolata *F. graminearum* (101), poreklom iz različitih agroekoloških uslova Srbije, pomoću HPLC metode uočena su dva hemotipa 3ADON i 15ADON. Većina ispitivanih izolata pripadala je 15ADON hemotipu sa procentualnom zastupljenošću 87,13%, dok je 3ADON hemotipu pripadalo 12,87% izolata. Izolati poreklom sa pšenice imali su najveći procenat izolata koji su pripadali 15ADON hemotipu (95,24%), a zatim izolati poreklom sa ječma (90,91%), dok je kod izolata poreklom sa kukuruza uočen najmanji procenat (75,67%) onih koji su pripadali 15ADON hemotipu. Kod izolata poreklom sa kukuruza 3ADON hemotip detektovan je u 24,33%, ječma 9,09% i pšenice 4,76% (Tabela 28).

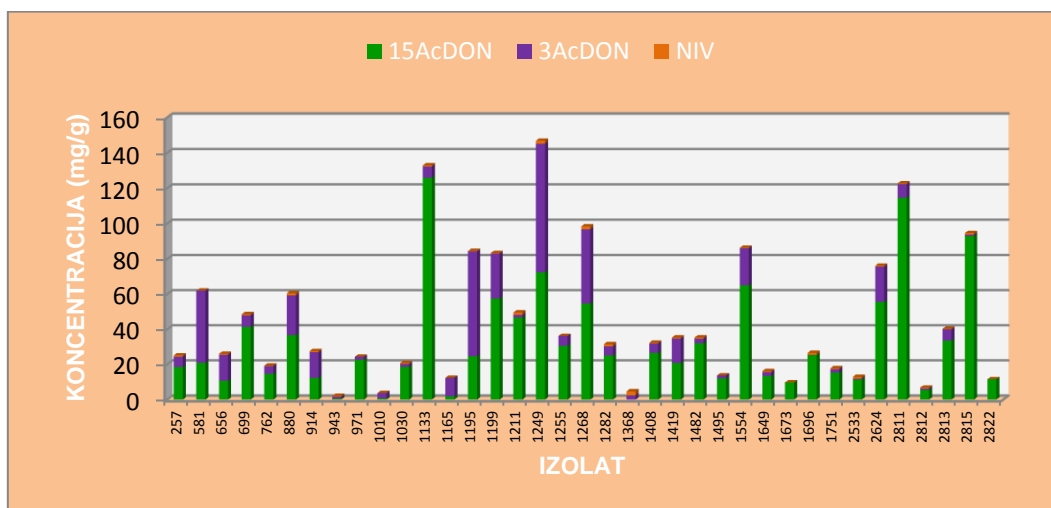
Najveći opseg variranja koncentracija 15ADON uočen je kod izolata poreklom sa kukuruza (0 - 125,97  $\mu\text{g/g}$ ), dok je najmanji opseg koncentracija uočen kod izolata poreklom sa ječma (1,07 - 71,05  $\mu\text{g/g}$ ) (Tabela 28). Takođe, izolati poreklom sa kukuruza imali su i najveći opseg variranja koncentracija 3ADON (0 do 72,85  $\mu\text{g/g}$ ), a najmanji opseg variranja ovog mikotoksina uočen je takođe kod izolata poreklom sa



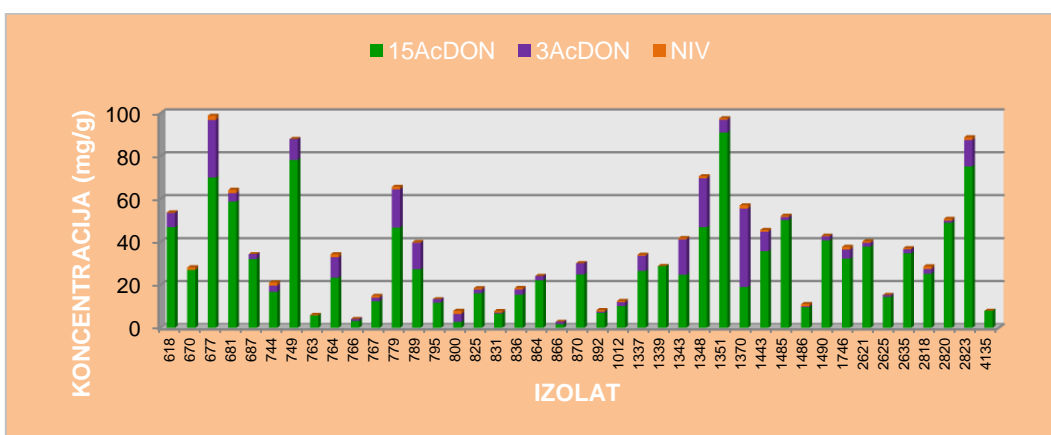
ječma (0,10 - 26,76 µg/g). Kod svih ispitivanih izolata *F. graminearum* poreklom sa sva tri domaćina uočene su koncentracije NIV u niskom opsegu (do 2,31 µg/g) (Tabela 28).

**Tabela 28.** Stepen učestalosti i opseg koncentracija 15ADON, 3ADON i NIV

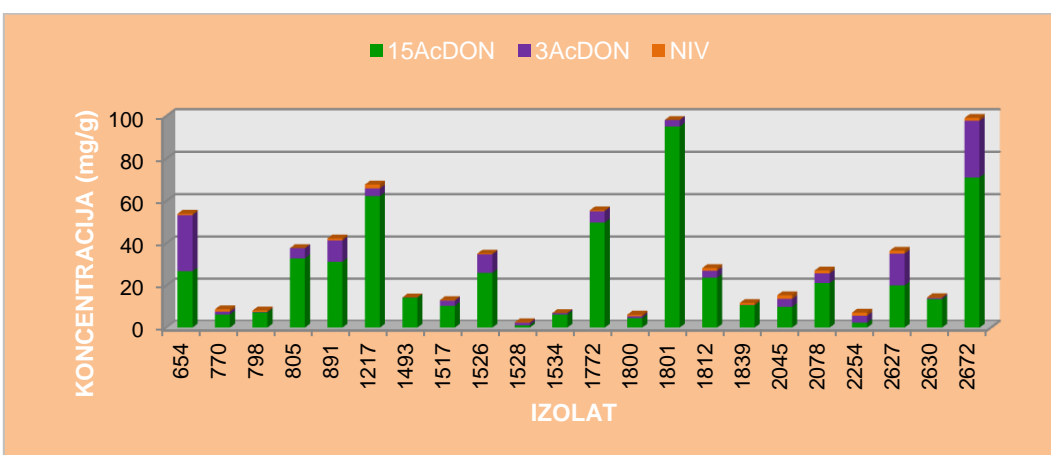
	<b>Kukuruz</b>		
	<b>15ADON</b>	<b>3ADON</b>	<b>NIV</b>
Učestalost pozitivnih uzoraka (%)	75,67	24,33	0
Opseg (µg/g)	0 – 125,97	0 – 72,85	0 – 2,31
	<b>Pšenica</b>		
	<b>15ADON</b>	<b>3ADON</b>	<b>NIV</b>
Učestalost pozitivnih uzoraka (%)	95,24	4,76	0
Opseg (µg/g)	1,69 – 90,97	0 – 36,51	0 – 1,97
	<b>Ječam</b>		
	<b>15ADON</b>	<b>3ADON</b>	<b>NIV</b>
Učestalost pozitivnih uzoraka (%)	90,91	9,09	0
Opseg (µg/g)	1,07 – 71,05	0,10 – 26,76	0 – 1,83



**Grafikon 4.** Koncentracije mikotoksina izolata *Fusarium graminearum* poreklom sa kukuruza



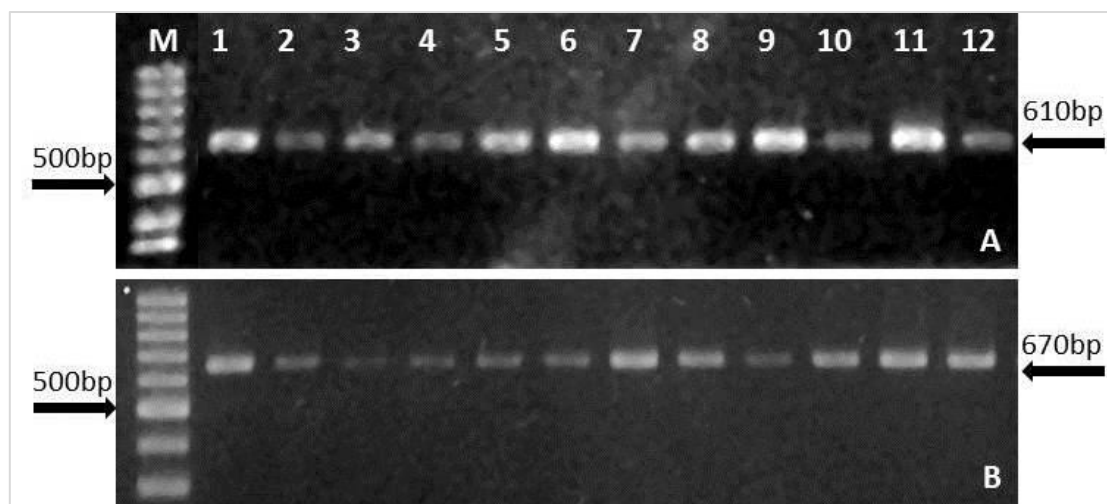
**Grafikon 5.** Koncentracije mikotoksina izolata *Fusarium graminearum* poreklom sa pšenice



**Grafikon 6.** Koncentracije mikotoksina izolata *Fusarium graminearum* poreklom sa ječma

### 5.4.3. Određivanje trihotecenskih hemotipova genetičkim analizama

Sa ciljem određivanja trihotecenskih hemotipova urađena je multipleks PCR reakcija korišćenjem dva seta specifičnih prajmera dizajniranih na osnovu sekvenci gena uključenih u produkciju trihotecena. Hemotipovi su detektovani pomoću seta prajmera TRI3 i TRI12. Kao rezultat PCR reakcije, korišćenjem ovih prajmera, utvrđeno je prisustvo amplifikovanih fragmenata DNK veličine 610 bp za TRI3 i 670 bp za TRI12 (Slika 19). Ovo ukazuje da su svi ispitivani izolati *F. graminearum* (101) iz različitih agroekoloških uslova u Srbiji, poreklom sa kukuruza, pšenice i ječma pripadali 15ADON hemotipu, bez obzira na poreklo izolata, odnosno sa koje biljke domaćina su izolovani (Slika 19).



**Slika 19.** Elektroforetska analiza PCR produkata dobijenog korišćenjem specifičnih prajmera: (A) TRI3 (amplifikovani produkti 610 bp) i (B) TRI12 (amplifikovani produkti 670 bp), M: 100 bp DNK marker (Thermo Fisher Scientific, USA), 1-12: izolati *F. graminearum* (1- izolat 687/2, 2- izolat 914, 3- izolat 1339/2, 4- izolat 1343, 5- izolat 1348, 6- izolat 1486/2, 7- izolat 1485, 8- izolat 1517, 9- izolat 1772, 10- izolat 2812, 11- izolat 2822 i 12- izolat 4135).

### 5.5. Genetička varijabilnost izolata *Fusarium graminearum*

Molekularna identifikacija 101 ispitivanih izolata *F. graminearum* obavljena je amplifikacijom *TEF-1 $\alpha$*  gena pomoću *ef1/ef2* para prajmera i sekvenciranjem dobijenog fragmenta. Nakon obrade dobijenih sekvenci, korišćenjem softverskog paketa MEGA 6.0 i poređenjem sekvenci, uočeno je da su se izolati grupisali u 12 različitih grupa (Tabela 29). U okviru jedne grupe izolati su bili identični tako da je iz svake grupe izabran po jedan izolat kao predstavnik grupe, koji su dalje korišćeni za filogenetske analize (sekvenciranje  $\beta$ -*tubulin* i histon *H3* gena).

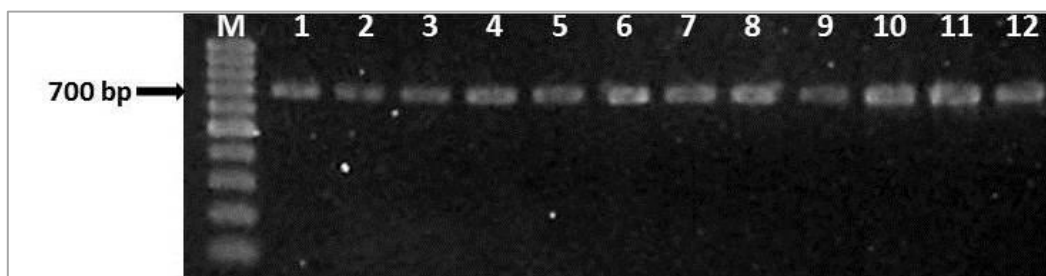
**Tabela 29.** Nukleotidna sličnost izolata *Fusarium graminearum* na osnovu *TEF-1 $\alpha$*  gena

Grupa	Izolati u grupi	Nukleotidna sličnost u okviru grupe
1	677, 764, 831, 870, 1030, 1165, 1255, 2813, 1351/2, 1408, 1419, 1746, 1800, 2078, 2533, 2621, 2624, 2672, 2815, <b>2822</b>	100%
2	618, 744, 779/2, 795, 825, 1211, 1268, <b>1486/2</b> , 2818	100%
3	<b>687/2</b> , 866, 1010, 1370, 1839, 2254, 2627	100%
4	800, 805, 1217/2, 1801, 1493, <b>2812</b>	100%
5	654, 749, 763, 766, 767, 892, 1482/2, 1485, 1649, 1673, 1696, <b>1772</b> , 2630,	100%
6	257, 681, 943/2, 971, 1443, <b>1495</b> , 2811	100%
7	203, 699, 789, 2635, <b>4135</b>	100%
8	656, 762, 1012, 1133, 1199, 1249, 1282/2, <b>1517</b> , 1526, 1534, 1751	100%
9	<b>1339/2</b>	100%
10	670, <b>914</b> , 1368, 1554/2,	100%
11	836, 864, <b>1343</b> , 1490/2, 2045	100%
12	581, 770/2, 798, 880, 891/2, 1195, 1337, <b>1348</b> , 1528, 1812, 2625, 2820, 2823	100%

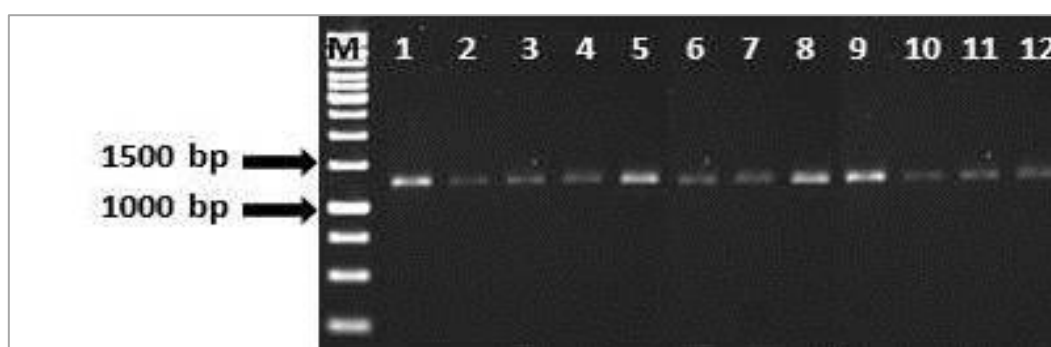
\*Oznake izolata koje su napisane crvenom bojom su predstavnici grupe

### 5.5.1. Molekularna identifikacija

Primenom PCR metode i sekvenciranjem umnoženih fragmenata DNK, obavljena je identifikacija ispitivanih izolata *F. graminearum*. PCR reakcija obavljena je korišćenjem parova prajmera za umnožavanje specifičnih regiona tri različita gena: elongacioni faktor *TEF-1 $\alpha$*  (ef1/ef2),  $\beta$ -*tubulin* (T1/T22) i histon *H3* (H3-1a /H3-1b). Amplifikovani su fragmenti očekivanih veličina: korišćenjem prajmera ef1/ef2 došlo je do amplifikacije fragmenta veličine oko 700 bp (Slika 20), T1/ T22 fragmenta veličine oko 1300 bp (Slika 21) i H3-1a /H3-1b fragmenta veličine oko 600 bp (Slika 22), kod svih ispitivanih izolata.



**Slika 20.** Elektroforetska analiza PCR proizvoda dobijenih korišćenjem para prajmera ef1/ef2, M: 100 bp DNK marker (Thermo Fisher Scientific, USA), 1-12: izolati *F. graminearum* (1- izolat 687/2, 2- izolat 914, 3- izolat 1339/2, 4-izolat 1343, 5- izolat 1348, 6- izolat 1486/2, 7- izolat 1485, 8- izolat 1517, 9- izolat 1772, 10- izolat 2812, 11- izolat 2822 i 12- izolat 4135).



**Slika 21.** Elektroforetska analiza PCR proizvoda dobijenih korišćenjem prajmer para T1/T22, M: 100 bp DNK marker (Thermo Fisher Scientific, USA), 1-12: izolati *F. graminearum* (1- izolat 687/2, 2- izolat 914, 3- izolat 1339/2, 4-izolat 1343, 5- izolat 1348, 6- izolat 1486/2, 7- izolat 1485, 8- izolat 1517, 9- izolat 1772, 10- izolat 2812, 11- izolat 2822 i 12- izolat 4135).



**Slika 22.** Elektroforetska analiza PCR proizvoda dobijenih korišćenjem prajmer para H3-1a /H3-1b, M: 100 bp DNK marker (Thermo Fisher Scientific, USA), 1-12: izolati *F. graminearum* (1- izolat 687/2, 2- izolat 914, 3- izolat 1339/2, 4-izolat 1343, 5- izolat 1348, 6- izolat 1486/2, 7- izolat 1485, 8- izolat 1517, 9- izolat 1772, 10- izolat 2812, 11- izolat 2822 i 12- izolat 4135).

Nakon sekvenciranja tri različita dela genoma *TEF-1 $\alpha$* , histon *H3* i  $\beta$ -*tubulina* 12 odabranih izolata (687/2, 914, 1339/2, 1343, 1348, 1486/2, 1495, 1517, 1772, 2812, 2822, 4135) dobijene konsenzus nukleotidne sekvence deponovane su u GenBank bazu podataka i dodeljeni su im pristupni brojevi (Tabela 30). Identifikacija odabranih izolata izvršena je međusobnim višestrukim uparivanjem i proračunom genetičke sličnosti dobijenih sekvenci, kao i poređenjem sa drugim sekvencama izolata koje su dostupne u GenBank bazi podataka.

**Tabela 30.** Izolati *Fg* kompleksa identifikovani tokom istraživanja sa dodeljenim Gen Bank pristupnim brojevima

Vrsta	Izolat	Biljka domaćin	Gen Bank pristupni broj		
			<i>TEF-1<math>\alpha</math></i>	$\beta$ - <i>tubulin</i>	histon <i>H3</i>
<i>F. graminearum</i>	687/2	Pšenica	MF974399	MG063783	MF999139
	914	Kukuruz	MF974400	MG063784	MF999140
	1343	Pšenica	MF974402	MG063786	MF999142
	1348	Pšenica	MF974403	MG063787	MF999143
	1486/2	Pšenica	MF974404	MG063788	MF999144
	1495	Kukuruz	MF974405	MG063789	MF999145
	1517	Ječam	MF974406	MG063790	MF999146
	1772	Ječam	MF974407	MG063791	MF999147
	2812	Kukuruz	MF974408	MG063792	MF999148
<i>F. vorosii</i>	1339/2	Pšenica	MF974401	MG063785	MF999141
<i>F. boothii</i>	2822	Kukuruz	MF974409	MG063793	MF999149
	4135	Pšenica	MF974410	MG063794	MF999150

Nakon sekvenciranja PCR produkata korišćenjem para prajmera *ef1/ef2* koji omogućavaju amplifikaciju proteinskog gena *TEF-1 $\alpha$*  i obrade sekvenci u softverskom paketu MEGA verzija 6.0., međusobnim poređenjem 12 odabranih sekvenci dobijenih u ovim istraživanjima (687/2, 914, 1339/2, 1343, 1348, 1486/2, 1485, 1517, 1772, 2812, 2822, 4135) utvrđena je sličnost od 98,9% do 99,8%. Sekvenca označena kao 1339/2 najviše se razlikovala od svih ostalih sekvenci (Tabela 31). Najniži stepen nukleotidne sličnosti sa razlikom u 10 nukleotida uočen je između izolata 1339/2 i 1343 (sličnost 98,9%), a najveća identičnost (99,2%) sa razlikom u 9 nukleotida ispoljena je za pomenuti izolat sa izolatima 1348, 1485, 2812 i 4135. Ova nukleotidna razlika podržava razdvajanje izolata 1339/2 u posebnu vrstu *F. vorosii* u okviru *Fg* kompleksa. Kada se izuzme izolat 1339/2 i uporede sekvence svih ostalih izolata uočava se visok stepen nukleotidne identičnosti od 99,3% do 99,8%. Izolat 1348 najviše se razlikovao od izolata 1495 (četiri nukleotida), dok je među ostalim izolatima razlika bila od jednog do tri nukleotida (identičnost 99,5 do 99,8 %). Poređenjem 12 sekvenci ispitivanih izolata na osnovu *TEF-1 $\alpha$*  proteinskog gena uočava se da se izolat 1339/2 izdvojio u posebnu grupu, dok su svi ostali izolati međusobno imali visok stepen nukleotidne identičnosti (Tabela 31).

**Tabela 31.** Sličnost ispitivanih izolata na osnovu *TEF-1 $\alpha$*  proteinskog gena

	687/2	914	1339/2	1343	1348	1486/2	1495	1517	1772	2812	2822	4135
687/2												
914	99,7											
1339/2	99,1	99,1										
1343	99,5	99,8	98,9									
1348	99,8	99,8	99,2	99,7								
1486/2	99,7	99,7	99,1	99,5	99,8							
1495	99,8	99,8	99,2	99,7	99,3	99,8						
1517	99,7	99,7	99,1	99,5	99,8	99,7	99,8					
1772	99,5	99,5	99,0	99,5	99,7	99,5	99,7	99,5				
2812	99,8	99,8	99,2	99,7	99,8	99,8	99,8	99,8	99,7			
2822	99,7	99,7	99,1	99,5	99,8	99,8	99,8	99,7	99,5	99,8		
4135	99,8	99,8	99,2	99,7	99,8	99,8	99,8	99,8	99,7	99,8	99,8	

Pomoću BLAST analize, dobijene konsenzus nukleotidne sekvence *TEF-1 $\alpha$*  gena poređene su sa sekvencama dostupnim u GenBank bazi podataka. BLAST analiza pokazala je da je nukleotidna identičnost sa sekvencama izolata *G. zeae* (anamorf *F. graminearum*) deponovanih u GenBank bazi podataka u opsegu od 98% do 100%.

Analiza sekvenci 12 izolata *F. graminearum* ispitivanih u ovom istraživanju pokazala je da je 10 sekvenci imalo 100% nukleotidne identičnosti, dok je jedna sekvenca pokazala 99% sa sekvencama izolata vrste *F. graminearum* poreklom iz različitih delova sveta (Poljske, Italije, Irana, Afrike itd.). Analiza jedne sekvence izolata 1339/2 pokazala je 99% nukleotidne identičnosti sa izolatima *F. asiaticum*, *F. graminearum* i *F. boothii*, dok je 100% nukleotidne identičnosti pokazala sa sekvencom referentnog izolata *F. vorosii* NRRL 37605 (DQ459745). Najniži stepen nukleotidne identičnosti sa razlikom u 7 nukleotida, ispitivani izolat 1339/2 ispoljio je sa sekvencama *F. asiaticum* (KM062023) poreklom sa Tajvana, *F. graminearum* (KP267345) poreklom iz Kine i *F. boothii* (HQ889141) poreklom iz Afrike. Izolat 1339/2 ispoljio je najviši stepen nukleotidne sličnosti od 100% sa sekvencom izolata *F. vorosii* poreklom sa pšenice iz Mađarske (DQ459745). Rezultati BLAST analize 12 sekvenci ispitivanih izolata u ovom radu sa najbližijim sekvencama dostupnim u NCBI na osnovu *TEF-1 $\alpha$*  gena prikazani su u tabeli 32. Na osnovu proračuna genetičke sličnosti odabranih sekvenci za gen *TEF-1 $\alpha$* , 11 izolata identifikovani su kao *F. graminearum* ss, dok je jedan izolat 1339/2 identifikovan kao *F. vorosii*.

**Tabela 32.** Rezultati BLAST analize sa najbližijim sekvencama dostupnim u NCBI na osnovu *TEF-1 $\alpha$*  gena

Elongacioni faktor ( <i>TEF-1<math>\alpha</math></i> )				
Izolat	Pristupni broj u NCBI	Sličnost BLAST analize	Broj nt razlika	Broj poređenih nt
687/2	JX118875	100%	0	666/666
914	KX092467	99%	1	665/666
1339/2	DQ459745	100%	0	641/641
1343	JF270176	100%	0	666/666
1348	KP267337	100%	0	665/665
1486/2	KP674201	100%	0	666/666
1485	KX092467	100%	0	666/666
1517	JF270216	100%	0	665/665
1772	KX269081	100%	0	608/608
2812	KX092467	100%	0	666/666
2822	KP674201	100%	0	666/666
4135	KX092467	100%	0	665/665

\*nt- nukleotidna identičnost



Pored *TEF-1 $\alpha$*  gena za sekvenciranje korišćeni su i amplifikovani PCR produkti dobijeni pomoću para prajmera H3-1a/H3-1b koji omogućavaju amplifikaciju histonskog *H3* gena. Dobijene sekvence 12 odabranih izolata (Tabela 33) međusobno su poredene i utvrđena je sličnost između izolata od 98,5% do 100%. Uočeno je da su izolati 687/2, 914, 1343, 1348, 1486/2, 1485, 1517, 1772 i 2812 imali međusobom 100% identičnosti i izdvojeni su u posebnu grupu (grupa I). Izolati 2822 i 4135 bili su međusobno identični (sličnost 100%) i svrstani su u grupu II, dok se izolat 1339/2 najviše razlikovao od svih ostalih izolata i svrstan je u grupu III. Izolati grupe I su se razlikovali od izolata grupe II u 9 nukleotida, odnosno sličnost između njih bila je 98,7%. Poređenjem sekvenci izolata grupe I sa sekvencom izolata grupe III uočena je razlika u 7 nukleotida, odnosno sličnost od 98,5%, dok je razlika između grupe II i grupe III u 9 nukleotida (sličnost 98,1%) (Tabela 33), što podržava razdvajanje ovih grupa izolata u različite vrste. Izolati grupe I (687/2, 914, 1343, 1348, 1486/2, 1485, 1517, 1772, 2812) identifikovani su kao *F. graminearum* ss, izolati grupe II (2822 i 4135) kao *F. boothii* i izolat grupe III (1339/2) kao *F. vorosii*.

**Tabela 33.** Sličnost ispitivanih izolata na osnovu *histon H3* gena

	687/2	914	1339/2	1343	1348	1486/2	1485	1517	1772	2812	2822	4135
687/2												
914	100											
1339/2	98,5	98,5										
1343	100	100	98,5									
1348	100	100	98,5	100								
1486/2	100	100	98,5	100	100							
1485	100	100	98,5	100	100	100						
1517	100	100	98,3	100	100	100	100					
1772	100	100	98,5	100	100	100	100	100				
2812	100	100	98,5	100	100	100	100	100	100			
2822	98,7	98,7	98,1	98,7	98,7	98,7	98,7	98,6	98,7	98,7		
4135	98,7	98,7	98,1	98,7	98,7	98,7	98,7	98,6	98,7	98,7	100	

Dobijene sekvence na osnovu *histon H3* gena međusobno su uparene sa sekvencama drugih izolata dostupnih u GenBank bazi podataka i izvršeno je njihovo poređenje BLAST analizom. Molekularna identifikacija 9 ispitivanih sekvenci, pomoću

BLAST analize pokazala je 99% do 100% identičnosti sa sekvencama izolata *F. graminearum* dostupnih u GenBank bazi podataka poreklom iz različitih delova sveta.

Analiza sekvenci 12 izolata pokazala je da 9 sekvenci ima 100% nukleotidne identičnosti sa izolatima *F. graminearum* ss, poreklom iz različitih delova sveta. Dva ispitivana izolata 2822 i 4135 pokazala su najviši stepen nukleotidne identičnosti od 100% sa sekvencom referentnog izolata *F. boothii* NRRL 26916 (GQ915470). Izolati 2822 i 4135 razlikovali su se od izolata *F. graminearum* (LT549886) u 6 nukleotida, a od *F. cortaderiae* (LT549870) u 7 nukleotida i pokazali nukleotidnu sličnost od 99%. Sekvenca izolata 1339/2 pokazala je 100% nukleotidne identičnosti sa referentnim izolatom *F. vorosii* (DQ459728), dok je sa izolatima *F. graminearum* (LT549886) i *F. cortaderiae* (LT549870) pokazala identičnost od 99%. Ispitivani izolat 1339/2 razlikuje se od izolata *F. cortaderiae* (LT549870) u 6 nukleotida, dok se 7 nukleotida razlikuje od izolata *F. graminearum* (LT549886). BLAST analiza pokazala je da izolat 1339/2 ima najmanju nukleotidnu sličnost od 98% sa sekvencom izolata *F. boothii* (GQ915470) sa razlikom u 9 nukleotida. Na osnovu navedenih proračuna genetičke sličnosti 12 odabranih sekvenci, 9 izolata (687/2, 914, 1343, 1348, 1486/2, 1485, 1517, 1772, 2812) identifikovani su kao *F. graminearum* ss, dva izolata kao *F. boothii* (2822 i 4135) i jedan izolat (1339/2) kao *F. vorosii*. Rezultati BLAST analize 12 sekvenci ispitivanih izolata u ovom radu sa najbližijim sekvencama dostupnim u NCBI na osnovu *histon H3* gena prikazani su u tabeli 34.

**Tabela 34.** Rezultati BLAST analize sa najbližijim sekvencama dostupnim u NCBI na osnovu *histon H3* gena

Histon ( <i>histon H3</i> )				
Izolat	Pristupni broj u NCBI	Sličnost BLAST analize	Broj nt razlika	Broj poređenih nt
687/2	LT549886	100%	0	471/471
914	LT549886	100%	0	471/471
1339/2	DQ459728	100%	0	449/449
1343	LT549886	100%	0	471/471
1348	LT549886	100%	0	471/471
1486/2	LT549886	100%	0	471/471
1485	LT549886	100%	0	471/471
1517	LT549886	100%	0	417/417
1772	LT549886	100%	0	471/471
2812	LT549886	100%	0	471/471
2822	GQ915470	100%	0	471/471
4135	GQ915470	100%	0	471/471

\*nt- nukleotidna identičnost

Nakon sekvenciranja fragmenata koji su umnoženi korišćenjem prajmera T1/T22, dobijene su delimične sekvence proteinskog gena  $\beta$ -*tubulina*. Međusobnim poređenjem 12 odabranih sekvenci (Tabela 35) dobijenih u ovim istraživanjima (687/2, 914, 1339/2, 1343, 1348, 1486/2, 1485, 1517, 1772, 2812, 2822, 4135) utvrđena je sličnost od 99,6% do 100% (Tabela 35). Izolat 1339/2 najviše se razlikovao od svih ostalih ispitivanih izolata a sličnost među njima bila je od 99,6% do 99,7%, što podržava razdvajanje ovog izolata u posebnu vrstu *F. vorosii*. Uočeno je da se pomenuti izolat razlikovao u pet nukleotida od izolata (1343, 1485, 1517, 1772 i 2822) i u četiri nukleotida od izolata (687/2, 914, 1348, 1486/2, 2812 i 4135). Izolati koji su na osnovu *histon H3* gena identifikovani kao *F. boothii* (2822 i 4135) razlikovali su se međusobom u jednom nukleotidu (sličnost 99,9%), dok su sa izolatom 1339/2 bili identični 99,6%, odnosno 99,7%. Izolati prethodno identifikovani kao *F. graminearum* ss imali su stepen nukleotidne identičnosti od 99,7% do 100%. Takođe, između izolata 687/2, 914, 1343, 1348, 1486/2, 1495, 1517, 1772, 2812 (*F. graminearum* ss) i izolata 2822 i 4135 (*F. boothii*) uočen je visok stepen nukleotidne identičnosti. Poređenjem sekvenci izolata na osnovu proteinskog gena  $\beta$ -*tubulin*, izolat 1339/2 izdvojio se od svih ostalih ispitivanih izolata, dok se izolati 2822 i 4135 nisu mogli odvojiti od izolata 687/2, 914, 1343, 1348, 1486/2, 1495, 1517, 1772, 2812 u posebnu grupu jer su ispoljili visok procenat sličnosti (Tabela 35).

**Tabela 35.** Sličnost ispitivanih izolata na osnovu gena  $\beta$ -*tubulin*

	687/2	914	1339/2	1343	1348	1486/2	1485	1517	1772	2812	2822	4135
687/2												
914	100											
1339/2	99,7	99,7										
1343	99,9	99,9	99,6									
1348	100	100	99,7	99,9								
1486/2	100	100	99,7	99,9	100							
1485	99,9	99,9	99,6	99,8	99,9	99,9						
1517	99,9	99,9	99,6	99,8	99,9	99,9	100					
1772	99,9	99,9	99,6	99,8	99,9	99,9	99,8	99,8				
2812	100	100	99,7	99,9	100	100	99,9	99,9	99,9			
2822	99,9	99,9	99,6	100	99,8	99,8	99,7	99,8	99,7	99,9		
4135	100	100	99,7	99,9	100	100	99,9	99,9	99,9	100	99,9	

Dobijene konsenzus nukleotidne sekvence gena  $\beta$ -tubulin poređene su sa sekvencama dostupnim u GenBank bazi podataka. Molekularna identifikacija 12 sekvenci ispitivanih izolata obavljena je BLAST analizom i pokazala je da 8 izolata ima 100% identičnost, dok su tri izolata imala 99% identičnosti sa sekvencama izolata *F. graminearum* deponovanih u GenBank bazi podataka. Izolat 1339/2 pokazao je najviši stepen nukleotidne identičnosti od 100% sa sekvencom referentnog izolata *F. vorosii* NRRL37605 (DQ459643) poreklom iz Mađarske. Izolat 2822 koji je prethodno identifikovan kao *F. boothii* pokazao je 99% identičnosti sa *F. boothii* (GQ915437), *F. graminearum* ss (KX087134) i *F. asiaticum* (KM062027) poreklom iz različitih delova sveta (Amerika i Kina). Izolat 4135 koji je takođe identifikovan kao *F. boothii* pokazao je 99% sličnosti sa referentnim izolatom *F. boothii* (GQ915437) sa razlikom u tri nukleotida, dok je sa izolatom *F. graminearum* ss (KX087134) pokazao 100% identičnosti. Rezultati BLAST analize 12 sekvenci ispitivanih izolata u ovom radu sa najbližijim sekvencama dostupnim u NCBI na osnovu gena  $\beta$ -tubulin prikazani su u tabeli 36. Na osnovu navedenih proračuna genetičke sličnosti odabranih sekvenci za gen  $\beta$ -tubulin, izolat 1339/2 identifikovan je kao *F. vorosii*. Izolati 2822 i 4135 nisu se jasno izdvojili od izolata *F. graminearum* ss kao posebne vrste u okviru *Fg* kompleksa.

**Tabela 36.** Rezultati BLAST analize sa najbližijim sekvencama dostupnim u NCBI na osnovu proteinskog gena  $\beta$ -tubulina

Beta tubulin ( $\beta$ -tubulin)				
Izolat	Pristupni broj u NCBI	Sličnost BLAST analize	Broj nt razlika	Broj poređenih nt
687/2	KX087134	100%	0	1171/1171
914	KX087134	100%	0	1201/1201
1339/2	DQ459643	100%	0	908/908
1343	KX087133	99%	1	1178/1179
1348	KX087134	100%	0	1216/1216
1486/2	KX087134	100%	0	1225/1225
1495	HG970335	100%	0	1168/1168
1517	HG970335	100%	0	1207/1207
1772	KX087133	99%	1	1195/1196
2812	KX087134	100%	0	1205/1205
2822	KX087134	99%	1	1211/1212
4135	KX087133	100%	0	1181/1181

\*nt- nukleotidna identičnost

U ovoj doktorskoj disertaciji korišćen je GCPSR pristup zasnovan na filogenetskoj saglasnosti tri nezavisna gena. Na ovaj način omogućeno je razdvajanje vrsta koje nije bilo moguće na osnovu morfoloških karakteristika. Koristeći *TEF-1 $\alpha$*  gen uočeno je da on nije bio dovoljno informativan da razdvoji sve prisutne vrste u okviru *Fg* kompleksa, iako su na osnovu pomenutog gena detektovane razlike, čak i u nekoliko nukleotida između izolata iste vrste. Na osnovu *TEF-1 $\alpha$*  gena izolat 1339/2 identifikovan je kao *F. vorosii*, dok su svi ostali izolati identifikovani kao *F. graminearum* ss. U dalje analize uključeni su dodatni geni,  $\beta$ -*tubulin* i *histon H3*. Geni *TEF-1 $\alpha$*  i  $\beta$ -*tubulin* omogućili su detektovanje vrsta *F. graminearum* ss i *F. vorosii*, dok *F. boothii* nije razdvojen od *F. graminearum* ss. Na osnovu *histon H3* gena identifikovane su sve tri vrste (*F. graminearum* ss- 9 izolata, *F. vorosii*- 1 izolat i *F. boothii*- 2 izolata). S obzirom na razlike koje su dobijene koristeći tri različita genomska regiona u ovoj disertaciji, za dalje filogenetske analize i pravljenje stabla korišćene su multilokusne DNK sekvence tri gena (*TEF-1 $\alpha$* ,  $\beta$ -*tubulin* i *histon H3*).

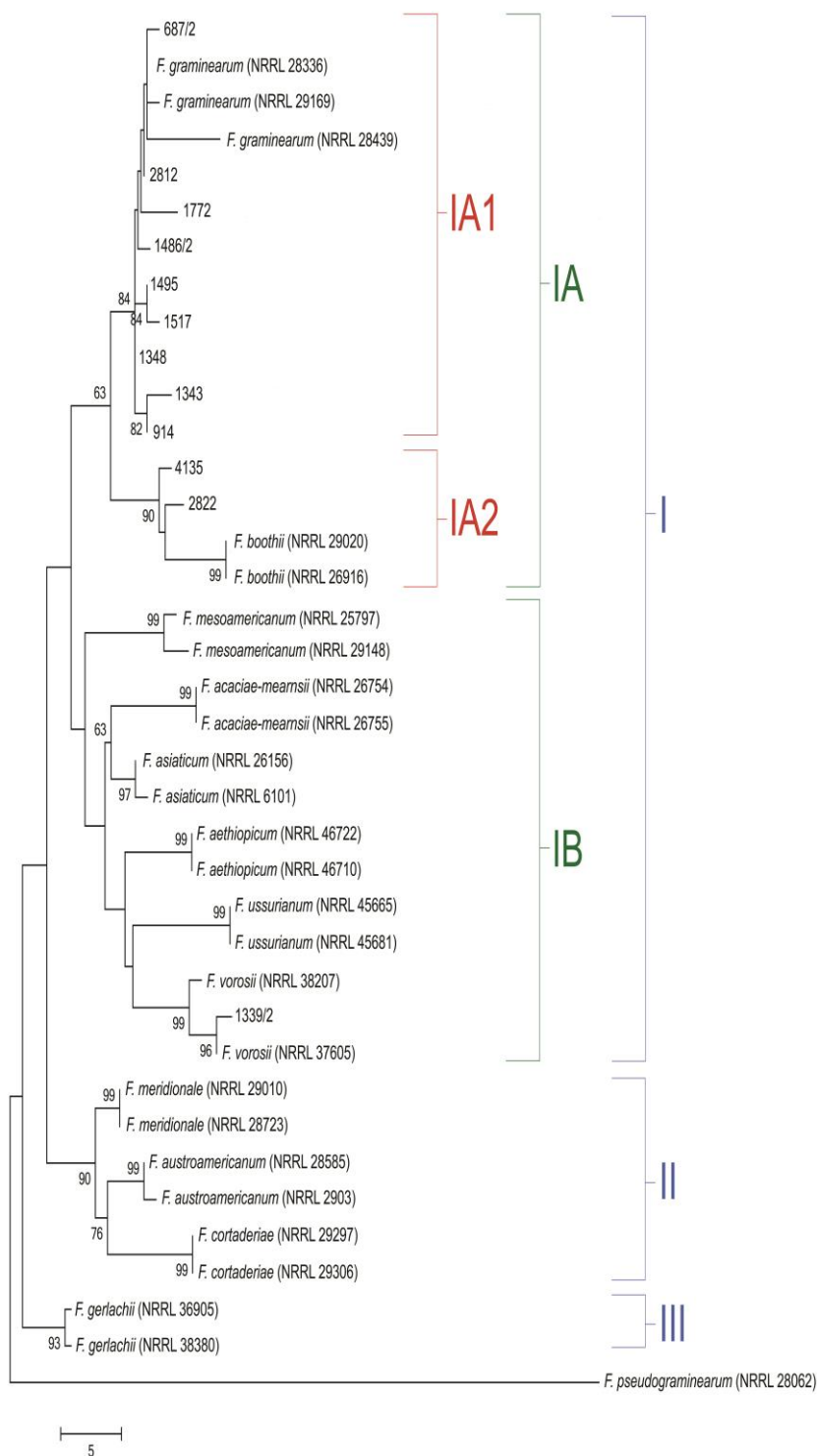
### 5.5.2. Filogenetska analiza

Za filogenetsku analizu korišćene su cele nukleotidne sekvence (nije vršeno skraćivanje/trimovanje), dobijene amplifikacijom tri različita regiona genoma: *TEF-1 $\alpha$* ,  $\beta$ -*tubulin* i *H3*. Za ova ispitivanja korišćene su sekvence 12 izdvojenih izolata *F. graminearum*. Dobijene sekvence su uparene sa 25 odabranih sekvenci vrsta u okviru kompleksa *F. graminearum* koje su dostupne u GenBank bazi podataka. Filogenetsko stablo je rekonstruisano primenom Maximum Parsimony metode i bootstrap vrednosti od 1000 ponavljanja, koje je ukorenjeno sa spoljašnjom grupom vrste *F. pseudograminearum* (NRRL 28062) (Slika 23).

Filogenetsko stablo pokazalo je izdvajanje izolata *F. graminearum* u tri klastera I, II i III. U okviru klastera I izdvajaju se dva subklastera IA i IB. Subklaster IA sastoji se od dve grupe IA1 i IA2. U grupu IA1 svrstalo se devet ispitivanih izolata *F. graminearum* ss zajedno sa referentnim izolatima *F. graminearum* ss (NRRL 28336, NRRL 29169 i NRRL 28439). Uočeno je da su izolati 4135 i 2822 u okviru grupe IA2 grupisani zajedno sa referentnim izolatima *F. boothii* (NRRL 29020 i NRRL 26916) koji su poreklom iz Amerike. U okviru subklastera IB, sekvenca ispitivanog izolata 1339/2 grupisana je zajedno sa referentnim izolatom *F. vorosii* (NRRL 37605) koji je

poreklom iz Mađarske (Slika 23). U klasteru II (NRRL29010, NRRL28723, NRRL28585, NRRL2903, NRRL29297, NRRL29306) i III (NRRL36905 i NRRL38380) nalaze se samo referenti izolati iz NCBI kolekcije (National Center for Biotechnology Information) (Slika 23).

Analiza filogenetskog stabla pružila je uvid u taksonomiju vrsta u okviru *Fg* kompleksa i ukazala na njihovu srodnost. Filogenetska analiza unutar *Fg* kompleksa obavljena je na osnovu proučavanja DNK sekvenci *TEF-1 $\alpha$* ,  *$\beta$ -tubulina* i *H3* gena. Analiza je obuhvatila 25 odabranih referentnih izolata iz NCBI kolekcije, koji su poreklom iz različitih delova sveta, zajedno sa 12 ispitivanih izolata u ovom radu koji su poreklom sa pšenice, ječma i kukuruza sa teritorije Srbije. Analizom filogenetskog stabla, pokazalo se da je devet izolata bilo *F. graminearum* ss, dva izolata *F. boothii* i jedan izolat *F. vorosii* (Slika 23).



**Slika 23.** Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu nukleotidnih sekvenci proteinskog gena *TEF-1 $\alpha$* , *H3* i  $\beta$ -*tubulina* 37 izolata vrsta kompleksa *F. graminearum* (*Fg* kompleks) korišćenjem MEGA 6.0. softvera upotrebom Maximum Parsimony metode sa bootstrap analizom u 1000 ponavljanja

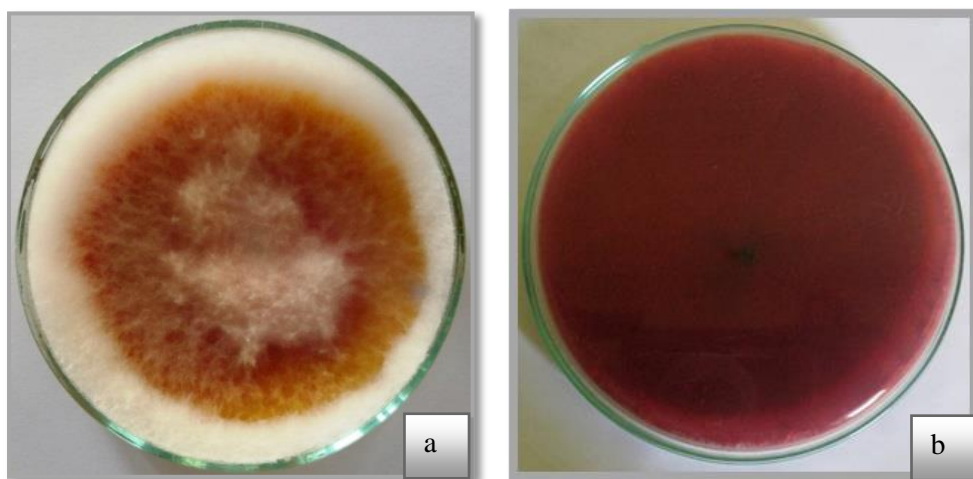
## 5.6. Novootkrivene vrste *Fg* kompleksa u Srbiji

Polifaznim pristupom, odnosno analizom morfoloških, patogenih i toksikoloških svojstava kao i filogenetskom analizom kompleksne vrste *F. graminearum*, identifikovane su dve nove vrste u Srbiji na zrnju kukuruza i pšenice - *F. boothii* (izolat 2822 i 4135) i na zrnju pšenice *F. vorosii* (izolat 1339/2).

### 5.6.1. *Fusarium vorosii* (izolat 1339/2)

Izolat 1339/2 koji je identifikovan kao *F. vorosii* izolovan je sa zrna pšenice prikupljene tokom žetve u 2006. godini na lokalitetu Kikinda.

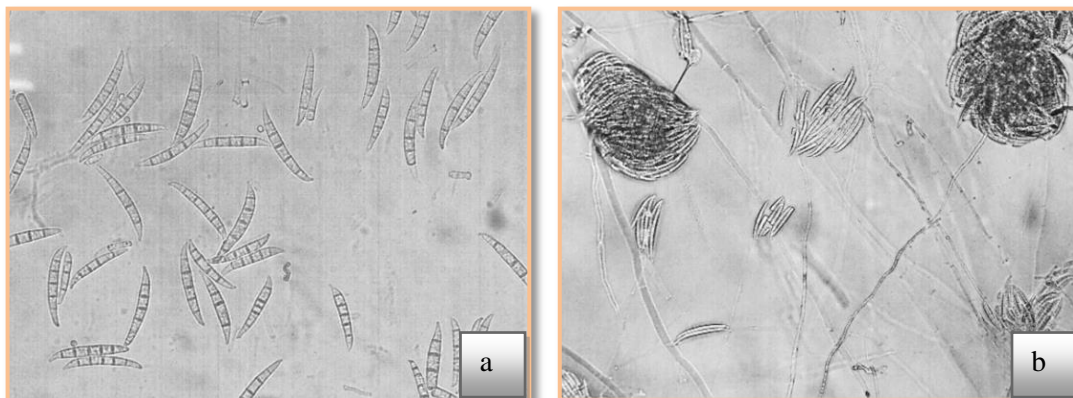
**Micelija i pigmentacija na PDA podlozi:** micelija raste veoma brzo, dnevni porast iznosio je 22,33 mm. Utvrđeno je obrazovanje kolonije prečnika 45 mm nakon dva dana i 90 mm nakon četiri dana pri 25°C u tami. Vazдушna micelija je pamučasta bela sa žutom nijansom. Pigment u podlozi je burgund crveni (Slika 24).



**Slika 24.** *Fusarium vorosii* (izolat 1339/2): izgled kolonije nakon sedam dana gajenja na PDA a) lice i b) naličje

**Makrokonidije:** su prave do umereno srpaste, dorzalna strana je lučno savijena dok je ventralna skoro prava sa 5-6 poprečnih pregrada. Vršna ćelija makrokonidija je konusnog oblika, a bazalna ćelija je u obliku stopala (Slika 25). Prosečne dimenzije makrokonidija su 45,33 x 5,77µm.





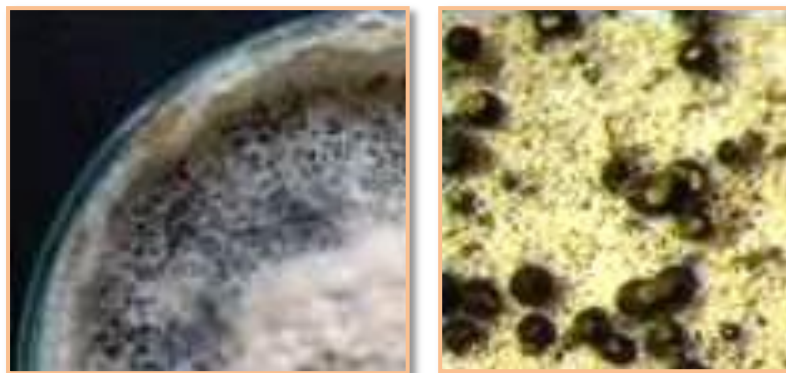
**Slika 25.** *Fusarium vorosii* (izolat 1339/2): makrokonidije (a) i makrokonidije u sporodohiji (b) pri uvećanju 40x

**Hlamidospore:** loptaste, glatkih zidova, bezbojne i pojedinačne u konidijama (Slika 26).



**Slika 26.** *Fusarium vorosii* (izolat 1339/2): hlamidospore formirane u konidiji (40x)

**Peritecije:** crnoplave, jajaste sa čvornovitim zidom (Slika 27).



**Slika 27.** *Fusarium vorosii* (izolat 1339/2): peritecije na CA podlozi (40x)

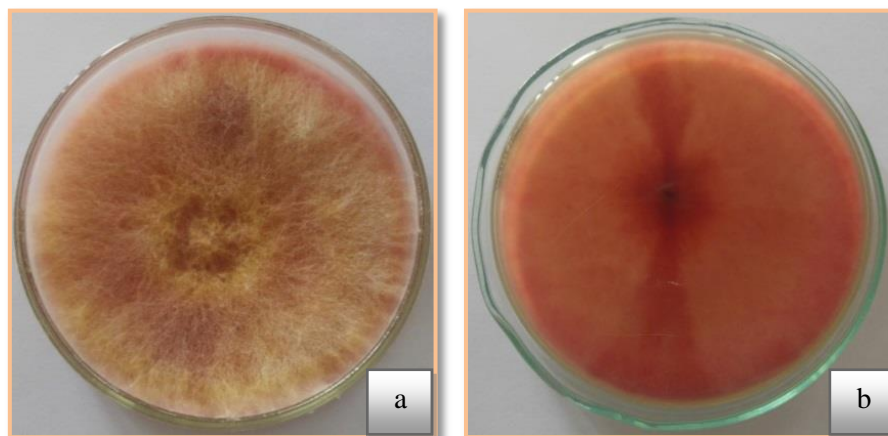
**Mikotoksini:** vrsta *F. vorosii* sintetise ZEA, DON i 15ADON. Utvrđeni potencijal produkcije izolata *F. vorosii* pomoću ELISA metode bio je 29,4 µg/g za DON i 162,8 µg/kg za ZEA. Pomoću HPLC metode utvrđen je 15ADON hemotip, čiji je potencijal produkcije bio 28,71 µg/g. Primenom multipleks PCR reakcije korišćenjem gena *TRI3* i *TRI2* potvrđeno je da izolat *F. vorosii* pripada 15ADON hemotipu.

**Molekularna identifikacija:** izolat 1339/2 je pomoću filogenetskih analiza na osnovu proučavanja DNK sekvenci *TEF-1α*, *β-tubulina* i *histon H3* gena kao i proračunom genetičke sličnosti pomoću BLAST analize identifikovan kao *F. vorosii*. Sekvenca izolata 1339/2 najviše se razlikovala od svih ostalih ispitivanih izolata kod sva tri gena (*TEF-1α*, *β-tubulina* i *histon H3*). BLAST analiza pokazala je 100% identičnosti sa referentnim izolatom *F. vorosii* NRRL37605 (DQ459643) poreklom sa zrna pšenice iz Mađarske.

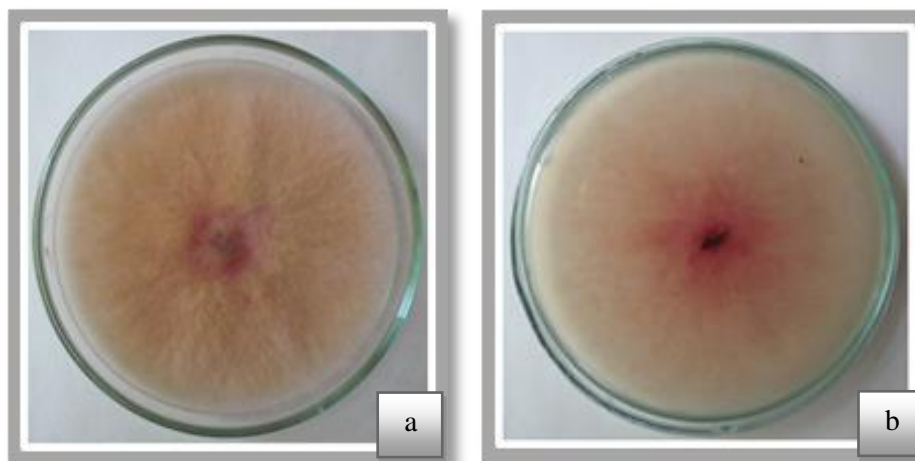
#### **5.6.2. *Fusarium boothii* (izolati 2822 i 4135)**

Izolati koji su identifikovani kao *F. boothii* izolovani su sa zrna kukuruza koje je prikupljeno tokom berbe 1999. godine na lokalitetu Srbobran (izolat 2822) i sa zrna pšenice prikupljene tokom 2015. godine sa lokaliteta Zemun Polje (izolat 4135).

**Micelija i pigmentacija na PDA podlozi:** micelija raste brzo, dnevni porast iznosio je 29,66 mm (izolat 2822) i 32,00 mm (izolat 4135). Utvrđeno je da izolati *F. boothii* u proseku obrazuju kolonije prečnika 17,33 mm nakon dva dana i 77,99 mm nakon četiri dana pri 25°C u tami. Vazдушna micelija je gusta pamučasta žuta sa smeđom nijansom. Pigment u podlozi varira od bele sa roze nijansom do ružičaste sa smeđom nijansom (Slike 28 i 29).

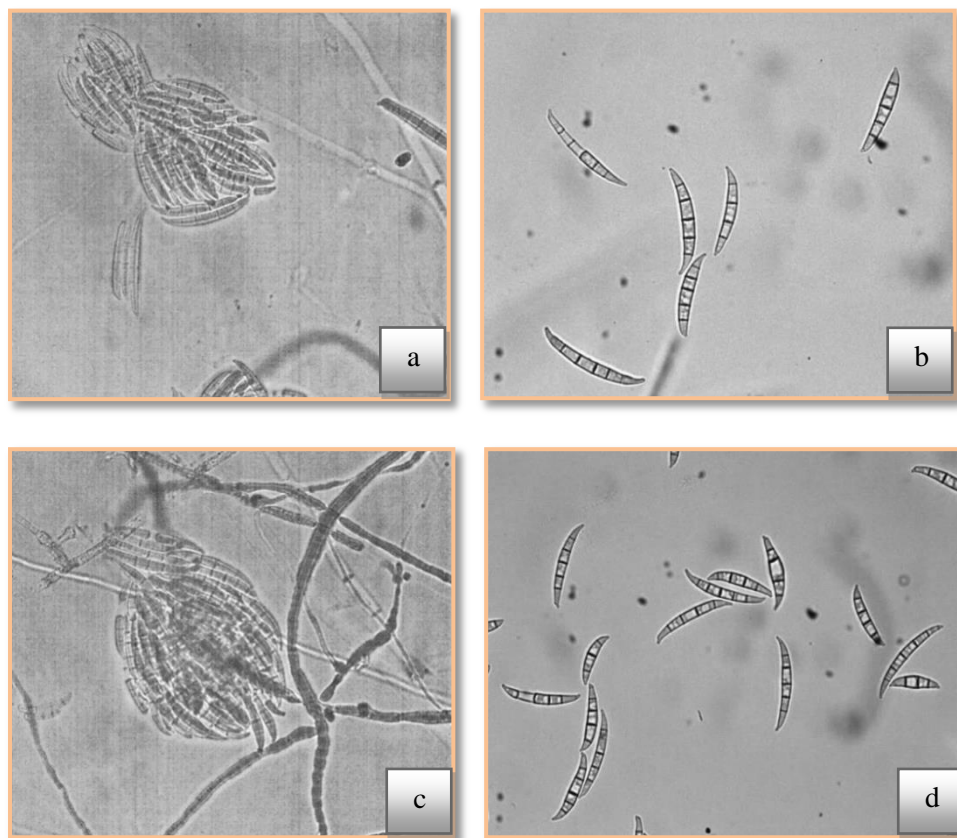


**Slika 28.** *Fusarium boothii* (izolat 4135): izgled kolonije nakon sedam dana na PDA podlozi a) lice i b) naličje



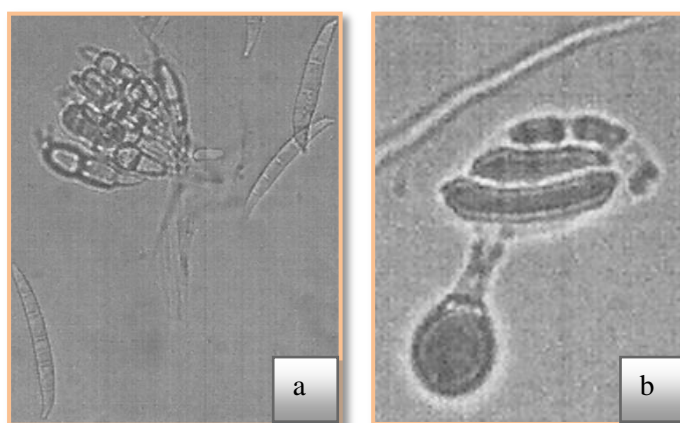
**Slika 29.** *Fusarium boothii* (izolat 4135): izgled kolonije nakon sedam dana na PDA podlozi a) lice i b) naličje

**Makrokonidije:** su prave do umereno srpaste, dorzalna strana je lučno savijena dok je ventralna skoro prava sa 5-6 septi. Vršna ćelija makrokonidija je konusnog oblika, a bazalna ćelija je u obliku stopala (Slika 30). Prosečna veličina makrokonidija je 46,64 x 4,40  $\mu\text{m}$ .



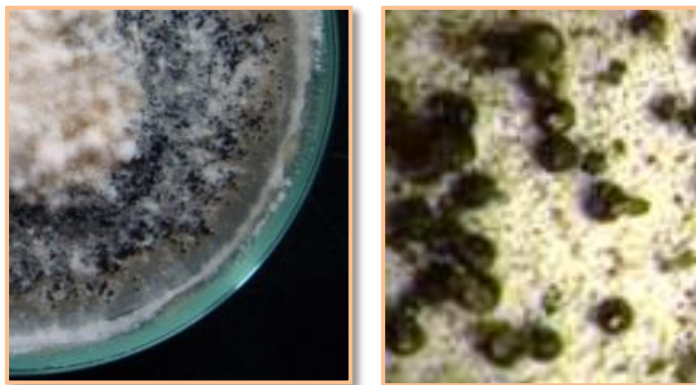
**Slika 30.** *Fusarium boothii*: makrokonidije u sporodohiji (a, c) makrokonidije (b, d) pri uvećanju 40x

**Hlamidospore:** loptaste, glatkih zidova, bezbojne do bledosmeđe, pojedinačne, češće u konidijama nego u hifi (Slika 31).



**Slika 31.** *Fusarium boothii*: hlamidospore izolata a) 4135 i b) 2822

**Peritecije:** su crnoplave, jajaste sa čvornovitim zidom (Slika 32).



**Slika 32.** *Fusarium boothii*: peritecije na CA podlozi (40x)

**Mikotoksini:** vrsta *F. boothii* sintetishe ZEA, DON i 15ADON. Utvrđeni potencijal produkcije izolata *F. boothii* pomoću ELISA metode bio je 0,6 µg/g (izolat 2822) i 13,3 µg/g (izolat 4135) za DON, dok je za ZEA 26,88 µg/kg (izolat 2822) i 37,52 µg/kg (izolat 4135). Pomoću HPLC metode utvrđen je 15ADON hemotip, čiji je potencijal produkcije bio 11,61 µg/g (izolat 2822) i 7,92 µg/g (izolat 4135). Primenom multipleks PCR reakcije korišćenjem gena *TRI3* i *TRII2* utvrđeno je da izolati *F. boothii* pripadaju 15ADON hemotipu.

**Molekularna identifikacija:** pomoću filogenetskih analiza na osnovu proučavanja DNK sekvenci *TEF-1α*, *β-tubulina* i *H3* gena izolati 2822 i 4135 identifikovan su kao *F. boothii*. Međutim, ovi geni nisu bili podjednako informativni. U ovom radu pokazalo se da je histon gen bio visoko informativan za razdvajanje vrste *F. boothii* od vrste *F. graminearum ss* u okviru *Fg* kompleksa. Takođe i pomoću BLAST analize utvrđena je 100% identičnost sa referentnim izolatom *F. boothii* NRRL 26916 (GQ915470) poreklom iz Amerike. Na osnovu gena *TEF-1α* i *β-tubulina* izolati 2822 i 4135 imali su visok stepen nukleotidne identičnosti sa izolatima *F. graminearum ss* i ova dva gena nisu bila dovoljno informativna za razdvajanje vrste *F. boothii* od drugih vrsta *Fg* kompleksa.

Na osnovu dosadašnjih istraživanja u Srbiji u okviru *Fg* kompleksa ima najmanje tri vrste i to: *Fusarium graminearum sensu stricto*, *Fusarium vorosii* i *Fusarium boothii*.

## 6. DISKUSIJA

### 6.1. Varijabilnost morfoloških svojstava izolata *Fusarium graminearum*

Identifikacija vrsta *Fg* kompleksa veoma je teška samo na osnovu morfoloških svojstava, jer su razlike između njih veoma male, naročito u izgledu makrokonidija, koje se najčešće koriste u identifikaciji ovih vrsta. Kod ispitivanih izolata *F. graminearum* (101) u ovom radu, uočena je velika varijabilnost u makroskopskim karakteristikama kolonija na PDA podlozi. Ispitivane izolate *F. graminearum* nije bilo moguće grupisati u morfološke grupe, jer je i u okviru jednog izolata bilo varijabilnosti u pogledu makroskopskih svojstava (boja i izgled kolonije).

U ovom radu utvrđena je velika varijabilnost u makroskopskim karakteristikama između ispitivanih izolata *F. graminearum*, što su pokazali rezultati prethodnih istraživanja (Nelson et al., 1983; Aoki and O'Donnell., 1999; Leslie and Summerell 2006; O'Donnell et al., 2004; Starkey et al., 2007). Na PDA podlozi ispitivani izolati formirali su obilnu bogatu vazдушnu miceliju koja je bila gusta i vunasta. Boja vazdušne micelije varirala je od bele, bledoružičaste, ružičaste do žutosmeđe boje. Takođe, ispitivani izolati su značajno varirali po boji pigmenta stvorenog u podlozi, koji je bio od bele, bledoružičaste, ružičaste, tamnonarandžaste do izrazito crvene boje. Ova makroskopska svojstva izolata *F. graminearum* u kulturi na PDA podlozi odgovara opisima mnogih autora u literaturi (Nelson et al., 1983; Aoki and O'Donnell., 1999; Leslie and Summerell 2006). Izgled kolonije izolata 1339/2 na PDA podlozi, kasnije identifikovanog kao *F. vorosii*, nije se razlikovao od izgleda kolonije ostalih izolata. Do istog zaključka došli su i Lee et al. (2016), koji su identifikovali ovu vrstu na zrnu žita u Koreji i utvrdili da nema razlike u izgledu kolonija vrsta iz *Fg* kompleksa gajenih na PDA podlozi. Rezultati u disertaciji pokazali su da poreklo izolata nije uticalo na ispoljavanje ovog makroskopskog svojstva, odnosno izolati su izrazito varirali u izgledu vazdušne micelije, kao i u boji stvorenog pigmenta u PDA podlozi, bez obzira na to sa kojeg domaćina su izolovani.

Ispitivani izolati *F. graminearum* ispoljili su morfološka svojstva karakteristična za ovu vrstu, uključujući izgled micelije, formiranje hlamidospora i prisustvo tvorevina

za razmnožavanje. Peritecije formirane na CA podlozi, kao i askusi sa askosporama po izgledu i veličini slažu se sa navodima **Seifert** (1995) i **Aoki and O'Donnell** (1999).

Utvrđeno je da izolati *F. graminearum* imaju izrazito brz porast micelije jer nakon pet dana gajenja na PDA podlozi na 25°C dostiže prečnik micelije 75-80 mm (**Lević**, 2008), što je približno rezultatima istraživanja ove disertacije- izolati su u proseku za četiri dana dostizali 79,39 mm. **Tančić** (2009) je ispitujući varijabilnost izolata toksigenih vrsta roda *Fusarium* iz sekcije *Liseola* i *Discolor* poreklom sa zrna žita utvrdila da su najveći porast micelije imali izolati *F. graminearum* nakon pet dana gajenja (83,1 mm) na PDA podlozi. U istraživanjima **O'Donnell et al.** (2004) uočili su da nema značajne razlike u makroskopskim karakteristikama kolonije različitih vrsta *Fg* kompleksa na PDA podlozi gajenih u mraku na temperaturi od 25°C.

Posebna pažnja u dosadašnjim istraživanjima posvećena je utvrđivanju razlika u brzini porasta kolonija različitih hemotipova u okviru *Fg* kompleksa. Ispitivajući diverzitet vrsta *Fg* kompleksa u Norveškoj, **Aamot et al.** (2015) uočili su značajnu pozitivnu korelaciju (od 0,82 do 0,92) između porasta kolonije izolata *F. graminearum* i povećanja temperatura gajenja. U istom istraživanju, uočeno je da pripadnost različitim hemotipovima uslovljava brzinu porasta na temperaturama od 20 i 25°C. Naime, tri od četiri 15ADON izolata imali su značajno smanjen prosečan porast micelije u odnosu na 3ADON izolate pri pomenutim temperaturama. Slične rezultate dobili su **Ward et al.** (2008) koji su ispitivajući širenje populacije *Fg* u Severnoj Americi uočili da 3ADON hemotipovi vrste *F. graminearum* imaju značajno veći porast kolonije na PDA podlozi u odnosu na 15ADON izolate.

Međutim, suprotno rezultatima prethodno pomenutih istraživanja, pojedini autori utvrdili su da pripadnost hemotipu ne utiče uvek na brzinu razvoja kolonije izolata. **Puri and Zhong** (2010) su, proučavajući izolate *F. graminearum* prikupljene u periodu 1980-2000. i 2008. godine u Severnoj Americi, uočili da nema značajne razlike u porastu kolonije između izolata 3ADON i 15ADON hemotipa, što je potvrđeno i u istraživanjima u okviru ove disertacije. Uočena je velika varijabilnost u porastu micelije između ispitivanih izolata *F. graminearum* ali nije uočena zavisnost između pripadnosti trihotecenskim hemotipovima.

U mikroskopske karakteristike ubrajaju se oblik, broj poprečnih pregrada i veličina makrokonidija (dužina i širina). Ova svojstva su manje pouzdani pokazatelji u

identifikaciji *Fusarium* vrsta, jer mogu da variraju i često zavise od niza faktora spoljne sredine (Lević, 2008). Međutim, utvrđivanje mesta proširenja makrokonidija može biti jednostavan i pouzdan kriterijum za razlikovanje morfološki sličnih vrsta. Tako su, na primer, ova svojstva značajna za razlikovanje *F. pseudograminearum* (grupa I) i *F. graminearum* (grupa II). Kod vrste *F. pseudograminearum* makrokonidije su najšire pri srednjoj poprečnoj pregradi (u srednjem regionu njihove dužine), dok su kod vrste *F. graminearum* one najšire u gornjem delu prema vršnoj ćeliji (Aoki and O'Donnell, 1999). Podatak o veličini makrokonidija vrsta roda *Fusarium* je više informativan i ne smatra se osnovnim pokazateljem pri identifikaciji (Leslie and Sumerell, 2006).

Ispitivani izolati u okviru ove disertacije obrazovali su makrokonidije čija je dužina i širina bila u opsegu 25,30-74,70 x 4,12-6,12  $\mu\text{m}$  (prosek 43,62 x 4,94  $\mu\text{m}$ ). Ove dimenzije makrokonidija su slične prosečnim dimenzijama makrokonidija ispitivanih izolata *F. graminearum* u istraživanjima Tančić (2009) (44,3 x 5,6  $\mu\text{m}$ ) i Lević (2008) (28-72 x 3,2-6,0  $\mu\text{m}$ ).

O'Donnell et al. (2004) su na osnovu prosečne širine makrokonidija različitih vrsta *Fg* kompleksa izdvojili dve grupe (A i B). Grupa A obuhvata *F. austroamericanum*, *F. meridionale*, *F. boothii* i *F. mesoamericanum* (4 - 4.5  $\mu\text{m}$ ), dok grupa B obuhvata *F. acaciae-mearnsii*, *F. asiaticum*, *F. graminearum* ss, *F. cortaderiae* i *F. brasilicum* (4.5 - 5  $\mu\text{m}$ ). Preklapanje prosečnih vrednosti u širini i male razlike u dužini makrokonidija, kao i pozicija najšireg dela za pojedine vrste u okviru svake grupe, ukazuje da se ova karakteristika ne može koristiti za morfološko razdvajanje vrsta. Ovi autori navode da je veličina makrokonidija *F. graminearum* najpribližnija veličini makrokonidija grupe B (prosek 51 x 4.9  $\mu\text{m}$ ) koje su opisali Wollenweber (1931) i Wollenweber and Reinking (1935), dok je morfologija makrokonidija *F. asiaticum* i *F. graminearum* najpribližnija vrstama opisanim u grupi B.

Aoki et al. (2012) utvrdili su da se na osnovu morfoloških i fenotipskih karakteristika ne mogu razlikovati 2/3 vrsta u *Fg* kompleksu, pa se morfološka svojstva izolata ne mogu koristiti za precizno identifikovanje većine vrsta u okviru ovog kompleksa.

Starkey et al. (2007) su ispitivajući morfološka, toksigena i patogena svojstva, kao i na osnovu filogenetske analize izdvojili dve nove vrste u okviru *Fg* kompleksa: *F. vorosii* i *F. gerlachii*. Autori su utvrdili da ove vrste formiraju makrokonidije koje su



šire od makrokonidija drugih vrsta *Fg* kompleksa i da se ovo svojstvo može koristiti u njihovoj identifikaciji, ali da ono nije dovoljno.

Prema literaturnim podacima vrste *Fg* kompleksa formiraju makrokonidije koje se na osnovu širine konidija sa 5 septi, mogu podeliti u četiri grupe: prva grupa prosečna širina  $<4,5 \mu\text{m}$  (*F. austroamericanum*, *F. meridionale* i *F. boothii*), druga grupa prosečna širina  $4 - 4,5 \mu\text{m}$  (*F. mesoamericanum* i *F. louisianense*), treća grupa prosečna širina  $4,5 - 5 \mu\text{m}$  (*F. acaciae-mearnsii*, *F. asiaticum*, *F. graminearum ss*, *F. cortaderiae*, *F. brasiliicum*, *F. nepalense* i *F. gerlachii*) i četvrta grupa prosečna širina  $>5 \mu\text{m}$  (*F. vorosii* i *F. ussurianum*) (Starkey et al., 2007; Aoki et al., 2012; Sarver et al., 2011). Od svih ispitivanih izolata u okviru ove disertacije, kod većine (82) utvrđena je širina makrokonidija sa 5 septi u opsegu  $4,5 - 5 \mu\text{m}$ , pa se mogu, prema prethodnoj podeli svrstati u treću grupu, u kojoj se nalazi i *F. graminearum ss*, što je i potvrđeno molekularom metodom. Međutim, 16 izolata je isto tako na molekularnom nivou identifikovano kao *F. graminearum ss*, ali su širine njihovih konidija bile izvan opsega za ovu grupu. Ovakvi rezultati potvrđuju stanovište prethodnih istraživanja da se ovo svojstvo ne može koristiti za pouzdanu identifikaciju (Starkey et al., 2007; Aoki et al., 2012).

Međutim, kod nekih izolata je širina konidija potvrdila molekularnu identifikaciju, pa su tako izolati 2822 i 4135 molekularnim analizama identifikovani kao *F. boothii*, imali prosečnu širinu makrokonidija ( $4,35 \mu\text{m}$  odnosno  $4,45 \mu\text{m}$ ), što je prema O'Donnell et al. (2004) prosečna širina makrokonidija za ovu vrstu ( $<4,5 \mu\text{m}$ ). Isto tako, izolat 1339/2 je molekularnim metodama identifikovan kao *F. vorosii*, a imao je prosečnu širinu konidija ( $5,77 \mu\text{m}$ ), koju Starkey et al. (2007) navodi kao karakterističnu za ovu vrstu. Do sličnih rezultata došli su Lee et al. (2016) koji su uočili prosečnu širinu makrokonidija  $5,3 \mu\text{m}$  kod izolata *F. vorosii* poreklom sa ječma i pirinča u Koreji.

Ove činjenice ukazuju da je za pouzdanu identifikaciju, pored morfoloških karakteristika neophodno uključiti dalja proučavanja u pogledu patogenosti, odgajivačkih i ekoloških karakteristika, a zatim potvrditi molekularnim metodama (O'Donnell et al., 2004; Starkey et al., 2007; Aoki et al., 2012).

Literaturni podaci ukazuju da postoji razlika u morfološkim svojstvima kod nekih vrsta *Fg* kompleksa u zavisnosti od pripadnosti trihotecenskom hemotipu. Zhang

**et al.** (2012) uočili su značajne razlike u dužini makrokonidija kod izolata *F. graminearum* ss i *F. asiaticum* u zavisnosti od hemotipa kojem su pripadali. Najveći broj konidija i najveću dužinu konidija (50,13 µm) obrazovali su izolati 15ADON, dok kod izolata sa 3ADON (43,12 µm) i NIV (42,26 µm) hemotipom nije bilo značajnih razlika u njihovoj dužini. Nasuprot pomenutim istraživanjima, **Ward et al.** (2008) su proučavanjem razlika u fenotipskim karakteristikama kod izolata *F. graminearum* iz Kanade sa 3ADON i 15ADON hemotipom uočili da izolati koji pripadaju 3ADON hemotipu formiraju konidije koje su značajno veće nego konidije izolata sa 15ADON hemotipom nakon pet dana gajenja na PDA podlozi. U istraživanjima u okviru ove disertacije nije utvrđena povezanost između veličine makrokonidija izolata i njihove pripadnosti određenom hemotipu.

## 6.2. Varijabilnost patogenih svojstava izolata *Fusarium graminearum*

Testovi patogenosti ispitivanih izolata u laboratorijskim i poljskim uslovima pokazali su da postoji statistički značajna razlika u agresivnosti između izolata. Izolati *F. graminearum* ispoljili su značajnu varijabilnost kako u laboratorijskim, tako i u poljskim uslovima. Izolati koji su identifikovani kao *F. boothii* i *F. vorosii* ispoljili su slabiju patogenost u polju i laboratoriji u sva tri primenjena testa patogenosti u odnosu na ostale ispitivane izolate. Na inokulisanim klipovima kukuruza svi monosporijalni izolati prouzrokovali su karakteristični simptom ružičaste truleži klipa kukuruza. Nakon izolacije sa inokulisanih klipova dobijeni su reizolati koji su po izgledu kolonije i morfološkim svojstvima u potpunosti odgovarali izvornim izolatima, čime je potvrđena patogenost izolata i ispunjeni Kohovi postulati za sve dobijene izolate u okviru ovih istraživanja. U testovima patogenosti u okviru ove disertacije sve ispitivane vrste *Fg* kompleksa bile su sposobne da ostvare infekciju kako u laboratorijskim tako i u poljskim uslovima.

Rezultati testova patogenosti, kako u poljskim tako i u laboratorijskim uslovima, ukazali su na visoku varijabilnost u ispoljavanju agresivnosti ispitivanih izolata. Ovi rezultati se slažu sa mnogobrojnim podacima o varijacijama u patogenosti među izolatima *F. graminearum* koje su opisali **Mesterhazy** (1989), **Maier and Oettler** (1996), **Gagkaeva and Levitin** (1997), **Šrobarova et al.** (1997), **Bagi** (1999) i drugi.

Rezultati istraživanja **Lee et al.** (2016) ukazali su na veliku varijabilnost u patogenosti izolata *F. vorosii* poreklom sa ječma, kukuruza i pirinča.

Prilikom ispitivanja varijabilnosti patogenih svojstava *Fusarium* spp. poreklom sa zrna kukuruza i pšenice, **Tančić i sar.** (2009) uočili su da je intraspecijska varijabilnost u agresivnosti bila najizraženija kod izolata *F. graminearum*. Takođe, ovi autori utvrdili su da su izolati *F. graminearum* poreklom sa zrna kukuruza bili patogeniji u poređenju sa izolatima poreklom sa zrna pšenice, kada se patogenost ispitivala na kukuruзу. Međutim, povezanost između ispoljavanja patogenosti izolata i njihovog porekla nije utvrđen u rezultatima ove disertacije. Naime, izolati poreklom sa ječma su na klipu kukuruza imali najveću prosečnu patogenost (3,08), a zatim izolati sa kukuruza (3,04) i pšenice (2,83). Kada se uporedi prosečna patogenost izolata na ječmu, uočava se da su izolati poreklom sa pšenice bili najpatogeniji (18,85), dok kod izolata poreklom sa kukuruza (17,57) i ječma (17,75) nije bilo većih razlika. U testu patogenosti na klasu pšenice, izolati poreklom sa ove biljke ispoljili su najslabiju agresivnost (3,11), a na kukuruзу i ječmu ocena je bila slična (3,23, odnosno 3,29). Do istog zaključka dovela su i istraživanja **Lee et al.** (2016), koji su ispitivajući patogenost izolata *F. vorosii* i *F. graminearum* na zrnu kukuruza, ječma i pirinča utvrdili da patogenost ne zavisi od porekla izolata. Naime, izolati poreklom sa kukuruza bili su manje agresivni na kukuruзу u odnosu na izolate izolovane sa ječma i pirinča. **Kuhnem et al.** (2015), su isto tako proučavanjem patogenosti izolata *F. graminearum* poreklom sa pšenice i kukuruza, utvrdili da ne postoji povezanost između patogenosti izolata i njegovog porekla. Generalno, izolati koji su identifikovani kao *F. vorosii* i *F. boothii* su ispoljili slabiju agresivnost u svim testovima patogenosti u odnosu na ostale izolate.

U literaturi postoji veliki broj različitih podataka o povezanosti između patogenosti izolata i pripadnosti trihotecenskom hemotipu (**Carter et al.**, 2002; **Ward et al.**, 2008; **Puri and Zhong**, 2010; **Von der Ohe et al.**, 2010; **Li et al.**, 2010; **Zhang et al.**, 2012; **Aamot et al.**, 2015; **Kuhnem et al.**, 2015). Proučavanjem patogenosti i hemotipova izolata *F. graminearum*, **Carter et al.** (2002) su dokazali da su različiti hemotipovi podjednako patogeni za pšenicu, dok je NIV hemotip bio znatno patogeniji za kukuruz, što ukazuje na mogućnost da tip produkovanog toksina može uticati na stepen patogenosti izolata. **Zhang et al.** (2012) proučavanjem izolata *F. asiaticum* i *F. graminearum* poreklom sa pšenice uočili su da je patogenost 3ADON i 15ADON

hemotipova bila značajno veća u odnosu na NIV hemotipove na pšenici. **Li et al.** (2010) uočili su da su 3ADON hemotipovi virulentniji od NIV populacije u Kini. **Gale et al.** (2011) su isto tako utvrdili da izolati koji sintetišu DON prouzrokuju simptome bolesti koji se znatno brže šire na klasu pšenice od onih koji sintetišu NIV. **Goswami and Kistler** (2005) analizirajući 31 izolat *Fg* kompleksa sa različitih domaćina, uočili veliku varijabilnost u patogenosti, koja nije zavisila od vrste produkovanog mikotoksina. Statistički značajna korelacija primećena je između koncentracije trihotecena kojeg proizvodi svaka vrsta i njenog nivoa agresivnosti na pšenici.

Proučavajući diverzitet vrsta *Fg* kompleksa u Norveškoj, **Aamot et al.** (2015) uočili su razlike u agresivnosti između pojedinačnih izolata *F. graminearum* na jaroj pšenici od 0,9 do 7 inficiranih klasića po klasu između najmanje i najviše agresivnih izolata. Uočeno je da je agresivnost izolata značajno povezana sa pripadnošću trihotecenskim hemotipovima. Značajno veća prosečna agresivnost uočena je za 15ADON u poređenju sa 3ADON izolatima. Nasuprot ovim rezultatima, **Puri and Zhong** (2010) uočili su da su 3ADON izolati agresivniji i prouzrokuju značajno viši nivo oboljenja od 15ADON izolata na pšenici. Međutim, **Ward et al.** (2008) i **Von der Ohe et al.** (2010) utvrdili su da ne postoji značajna razlika u patogenosti između 3ADON i 15ADON hemotipa. **Kuhnem et al.** (2015) ispitivajući izolate *F. graminearum* poreklom sa pšenice i kukuruza, takođe su utvrdili da nema razlika u prosečnoj patogenosti između 3ADON i 15ADON hemotipa. Na isti zaključak navode i rezultati ove disertacije, jer su ukazali da nema razlike u agresivnosti između 15ADON i 3ADON hemotipa, bez obzira na njihovo poreklo u sva tri testa patogenosti.

### 6.3. Varijabilnost toksigenih svojstava izolata *Fusarium graminearum*

Ispitivani izolati *F. graminearum*, pokazali su veliku varijabilnost u toksigenim svojstvima, odnosno u kvalitativnoj i kvantitativnoj sintezi mikotoksina. Sposobnost sinteze mikotoksina ZEA i DON i njihova kvantifikacija utvrđeni su pomoću Elisa metode.

Analize potencijala produkcije mikotoksina koje sintetišu različite vrste roda *Fusarium* u svetu dale su veoma divergentne rezultate. Smatra se da je razlog tome različito poreklo izolata i klimatski uslovi sredine, kao i neusaglašene metode i standardi za analizu mikotoksina (**Lević, 2008**).

Prosečne koncentracije ZEA koje su sintetisali izolati proučavani u ovom radu (39,05 µg/kg) su daleko manje od prosečne produkcije izolata *F. graminearum* (30.600 µg/kg) koje je analizirala **Tančić** (2009), poreklom sa pšenice i kukuruza u Srbiji. Ispitivanjem varijabilnosti vrsta roda *Fusarium* i fuzariotoksina u Srbiji, uočeno je da je najveća varijabilnost u potencijalu produkcije ZEA imala vrsta *F. graminearum*. Varijabilnost u produkciji ZEA kod ispitivanih izolata u ovoj disertaciji bila je u opsegu od 0,25 do 162,8 µg/kg. Sličan potencijal produkcije ZEA (do 220 µg/kg) kod izolata *F. graminearum* ustanovili su **Jajić et al.** (2007).

Ispitivanjem potencijala produkcije DON-a u ovoj disertaciji detektovana je prosečna koncentracija 88,47 µg/g kod izolata poreklom sa pšenice, 83,21 µg/g kod izolata poreklom sa kukuruza, dok su izolati poreklom sa ječma u proseku sintetisali najmanje koncentracije ovog mikotoksina 62,82 µg/g. **Stanković et al.** (2008) su ispitivajući potencijal produkcije izolata *F. graminearum* poreklom sa zrna pšenice iz različitih agroklimatskih uslova u Srbiji utvrdili da je svih 14 izolata imalo sposobnost sinteze DON-a, do 45,26 µg/g. Nasuprot rezultatima ovih istraživanja, **Tančić et al.** (2015) su zabeležili značajno manje prosečne koncentracije DON-a (10,1 µg/g) koje su sintetisali izolati *F. graminearum*. Opseg koncentracija sintetisanog mikotoksina u ovim istraživanjima je bio od 0,5 do 441,3 µg/g. **Jajić et al.** (2007) utvrdili su slične vrednosti koncentracije DON-a u zrnu žita (od praga detekcije do 465,9 µg/g). Prilikom istraživanja potencijala produkcije DON-a kod izolata *F. graminearum* na kukuruza, **Harris et al.** (1999) detektovali su znatno veći opseg variranja koncentracija od 160 do 1302 µg/g.

Poreklo izolata značajno je uticalo na sintezu mikotoksina. Tako su izolati poreklom sa pšenice sintetisali veću koncentraciju i ZEA i DON-a u odnosu na izolate poreklom sa ostala dva domaćina.

Izolati poreklom sa pšenice produkuju veće prosečne koncentracije ZEA (44,28 µg/kg) u odnosu na izolate poreklom sa ječma (35,73 µg/kg) i kukuruza (37,13 µg/kg). Međutim, **Tančić et al.** (2015) ispitivanjem varijabilnosti u produkciji ZEA kod različitih vrsta roda *Fusarium* uočili su da nije bilo značajne razlike između prosečne koncentracije i opsega koncentracija kod izolata *F. graminearum* poreklom sa različitih domaćina.

**Kuhnem et al.** (2015) proučavanjem izolata *F. graminearum* poreklom sa pšenice i kukuruza utvrdili su da 65% izolata (9/15) produkuje ZEA u zrnu kukuruza, dok u zrnu pšenice ovaj mikotoksin nije detektovan. Proučavanjem potencijala produkcije ZEA sintetisane od strane ovih izolata uočen je veliki opseg variranja u koncentracijama ovog mikotoksina (100 do 97.520 µg/kg). Ispitivanjem toksigenog potencijala vrste *F. graminearum* poreklom sa kukuruza, **Cvetnić et al.** (2005) ustanovili su visoke koncentracije ZEA koje su bile u opsegu od 60.000 do 180.000 µg/kg, dok su **Logrieco et al.** (2003) uočili znatno veće koncentracije ZEA (1.500.000 µg/kg).

U ovom radu je prosečna koncentracija DON-a kod izolata *F. graminearum* poreklom sa zrna pšenice bila izrazito veća (88,47 µg/g) od izolata poreklom sa zrna ječma (62,82 µg/kg). Utvrđeno je da kod izolata poreklom sa kukuruza i pšenice nije bilo jasnog uticaja biljke domaćina u produkciji DON-a, s obzirom da nije bilo značajne razlike u prosečno produkovanim koncentracijama između izolata poreklom sa zrna kukuruza (83,21 µg/kg) i pšenice (88,47 µg/g). Prethodna istraživanja su pokazala da su izolati *F. graminearum* poreklom sa zrna pšenice sintetisali veće prosečne koncentracije DON-a od izolata poreklom sa zrna kukuruza, dok je raspon minimalne i maksimalne produkcije toksina bio identičan za izolate poreklom sa pšenice i kukuruza (**Tančić et al.**, 2015).

**Kuhnem et al.** (2015) uočili su značajnu razliku u produkciji DON-a između izolata različitog porekla. Izolati poreklom sa pšenice produkovali su 73.96 µg/g, što je u proseku 30 µg/g DON-a više od izolata poreklom sa kukuruza (44.57 µg/g). Do sličnih rezultata došli su **Tančić et al.** (2015) koji su uočili da izolati *F. graminearum* poreklom sa pšenice produkuju veće prosečne koncentracije DON-a sa širokim variranjem u odnosu na izolate poreklom sa kukuruza.

U istraživanjima **Tančić et al.** (2015) utvrđena je značajna negativna korelacija između produkcije DON i ZEA kod izolata *F. graminearum* poreklom sa pšenice i kukuruza. Nasuprot prethodnim rezultatima, u ovom radu uočena je statistički visoko značajna pozitivna korelacija između sinteze DON i ZEA i to samo kod izolata poreklom sa kukuruza, dok kod izolata poreklom sa pšenice i ječma nije uočena statistički značajna korelacija. Slične vrednosti korelacije između ova dva mikotoksina u zrnu pšenice utvrdili su **Stanković et al.** (2012).

### 6.3.1. Određivanje hemotipova kvalitativnom analizom

U okviru disertacije urađena je i kalitativna i kvantitativna analiza nivalenola i deoksinivalenola kao i njegovih acetil estar derivata kod izolata *F. graminearum* pomoću HPLC metode. Pomoću ove metode određena je pripadnost ispitivanih izolata hemotipu na osnovu dobijenih koncentracija 3ADON, 15ADON i NIV. U ovom istraživanju, uočeno je da je dominantan hemotip izolata *F. graminearum* u Srbiji bio 15ADON, dok NIV hemotip nije detektovan. Hemotip 3ADON uočen je u dosta manjem procentu u odnosu na 15ADON hemotip (12,87%, odnosno 87,13%). Kod izolata porekom sa kukuruza 3ADON hemotip je uočen u najvećem procentu (24,32%), a zatim kod ječma (9,09%) i pšenice (4,76%). Izolati *F. graminearum* koji pripadaju 15ADON hemotipu isto tako produkuju i 3ADON i NIV ali u dosta manjim koncentracijama koje se javljaju u tragovima. Kod izolata koji su molekularnim metodama identifikovani kao *F. vorosii* i *F. boothii* u ovom radu, detektovan je samo 15ADON, što je potvrdilo rezultate **Lee et al.** (2016).

U Kanadi, **Ward et al.** (2008) uočili su da izolati *F. graminearum* sa 3ADON hemotipom imaju statistički značajno ( $p < 0,05$ ) veću produkciju trihotecena u odnosu na izolate sa 15ADON hemotipom. U Severnoj Americi **Puri and Zhong** (2010) utvrdili su da je ukupna koncentracija DON-a sintetisana pojedinačno dosta varirala od praga detekcije do 398,5  $\mu\text{g/g}$ . Izolati sa 3ADON hemotipom sintetisali su veliku količinu 3ADON (61,6-258,2  $\mu\text{g/g}$ ) dok je koncentracija 15ADON sintetisana od strane izolata sa 15ADON hemotipom bila relativno niska (do 19  $\mu\text{g/g}$ ). Ispitivanja su pokazala da su izolati koji su pripadali 3ADON hemotipu sintetisali 1,5 puta više ukupnog DON-a i čak 86 puta više 3ADON u odnosu na izolate sa 15ADON hemotipom. Isto tako izolati sa 3ADON hemotipom su imali šest puta manje 15ADON nego što je uočeno kod izolata sa 15ADON hemotipom.

U ovim istraživanjima uočene su značajno veće koncentracije (do 125,97  $\mu\text{g/g}$ ) kod izolata sa 15ADON hemotipom, dok su izolati koji su pripadali 3ADON hemotipu imali znatno manje koncentracije (do 73,85  $\mu\text{g/g}$ ). Rezultati disertacije ukazuju da nije bilo značajnih razlika u prosečnoj produkciji ukupnog DON-a između izolata koji su pripadali 3ADON i 15ADON hemotipu. **Kuhnem et al.** (2015) uočili su da se ukupna produkcija trihotecena na pšenici ne razlikuje između izolata sa 3ADON (53.1  $\mu\text{g/g}$ ) i 15ADON (47.6  $\mu\text{g/g}$ ) hemotipom. U ovom radu *F. vorosii* je sintetisao koncentraciju od

28,71 µg/g 15ADON, dok je *F. boothii* sintetisao od 7,92 µg/g (4135) do 11,61 µg/g (2822). Međutim, **Lee et al.** (2016) su samo kod jednog izolata *F. vorosii* detektovali 15ADON u koncentraciji 3,5 µg/kg, dok je kod ostalih izolata detektovan NIV u koncentraciji od 2 do 6 µg/kg.

**Dong et al.** (2016) utvrdili su da se toksikološki profil trihotecenskih hemotipova u Kini razlikovao između izolata *F. graminearum* ss i *F. asiaticum* na zrnu pšenice. Kod izolata *F. asiaticum* detektovana su sva tri hemotipa, dok su svi ispitivani izolati *F. graminearum* ss pripadali 15ADON hemotipu. Prosečne koncentracije DON-a bile su u opsegu od 0,63 do 1,63 µg/g. **Zhang et al.** (2012) uočili su razlike u potencijalu produkcije trihotecena između izolata *F. asiaticum* i *F. graminearum*, dok između NIV hemotipa koje proizvodi *F. graminearum* (79,8 µg/g) i NIV hemotipa koje proizvodi *F. asiaticum* (66,7 µg/g) nisu uočene značajne razlike. Izolati *F. asiaticum* koji pripadaju 3ADON hemotipu proizvode znatno više mikotoksina (683,2 µg/g) od izolata *F. graminearum* sa 15ADON hemotipom (443,3 µg/g). Takođe, ovi autori nisu pronašli razlike u produkciji DON-a između *F. asiaticum* koji pripadaju 3ADON hemotipom (350,9 µg/g) i 15ADON hemotipom (406,1 µg/g).

**Gale et al.** (2011) utvrdili su da su DON hemotipovi četiri puta više sintetisali toksina u odnosu na NIV hemotipove. U istraživanjima koja su sprovedena u Severnoj Americi, **Goswami and Kistler** (2005) utvrdili su da NIV producenti sintetisaju nizak nivo ukupnog DON-a. U odnosu na količinu mikotoksina sintetisanu od strane različitih hemotipova, opseg koncentracija za NIV hemotip bio je niži (3-216 µg/g), u odnosu na DON hemotip (39 - 461 µg/g). Međutim, uočeno je da su NIV hemotipovi bili agresivniji od DON hemotipova.

### 6.3.2. Određivanje hemotipova molekularnim analizama

Određivanje hemotipova pored hemijskih analiza (HPLC) vršeno je i molekularnim metodama primenom multipleks PCR reakcije. Lančana reakcija polimeraze izvedena je korišćenjem dva seta prajmera *TRI3* i *TRI12* za dokazivanje trihotecenskih hemotipova vrste *F. graminearum*. Prema literaturnim podacima, za određivanje trihotecenskih hemotipova pomoću PCR metode, najčešće se navode dva seta specifičnih prajmera dizajniranih na osnovu sekvenci gena uključenih u produkciju trihotecena, *TRI3* – gen za 15-O-acetiltransferazu i *TRI12* – gen za efluks pumpu (**Ward**



**et al.**, 2002, 2008; **Starkey et al.**, 2007). Svi ispitivani izolati *F. graminearum* u ovom radu pripadali su 15ADON hemotipu, bez obzira na poreklo izolata, odnosno sa koje biljke domaćina su izolovani. Izolati identifikovani kao *F. vorosii* i *F. boothii* takođe su pripadali 15ADON hemotipu, što je potvrđeno u ranijim istraživanjima (**Starkey et al.**, 2007; **Yli-Mattila et al.**, 2009; **O'Donnell et al.**, 2008; **Ward et al.**, 2008). Međutim, **Lee et al.** (2016) uočili su samo kod jednog izolata *F. vorosii* 15ADON hemotip, dok je kod ostalih izolata detektovan NIV hemotip. Ovi autori navode da je verovatno razlog pojave NIV hemotipa kod izolata *F. vorosii* u tome što se ječam i pirinač gaje u plodoredu, a vrsta *F. asiaticum* koja pripada NIV hemotipu je dominantna na ovim usevima, pa je moglo doći do eventualnih „udruživanja“ populacija. Rezultati HPLC metode za dokazivanje trihotecenskih hemotipova u ovom radu pokazali su da je 15ADON hemotip dominantan, dok je 3ADON hemotip detektovan ali u manjem procentu. Međutim, rezultati molekularnih analiza za dokazivanje hemotipova pokazali su da su svi ispitivani izolati *F. graminearum* pripadali 15ADON hemotipu. Prethodna istraživanja o trihotecenskim hemotipovima ukazala su da rezultati hemijskih analiza ne daju uvek iste rezultate kao molekularne analize za utvrđivanje pripadnosti određenom hemotipu. Tako su **Somma et al.** (2014) proučavajući 90 izolata *Fg* kompleksa u Italiji, detektovali sva tri hemotipa. Međutim, hemijske analize potvrdile su razlike DON hemotipova (3ADON i 15ADON) u odnosu na molekularne analize. Od 47 analiziranih izolata koji su na molekularnom nivou identifikovani kao 15ADON hemotip, pomoću hemijskih analiza samo 11 izolata pripadali su 15ADON hemotipu, dok su ostali izolati pripadali 3ADON hemotipu. Kod tri izolata detektovan je NIV hemotip pomoću hemijskih i molekularnih analiza. U istraživanjima, **Desjardins et al.** (2008) navodi da hemijske analize često izostaju u radovima i može biti razlog za pogrešne podatke koji ne odražavaju uvek pravu situaciju profila trihotecenskih hemotipova. Kao primer, u istočnoj Kini na osnovu hemijskih analiza žitarica uočeno je da je DON bio glavni hemotip, međutim NIV hemotip bio je prisutan 10 puta više u odnosu na DON hemotip (**Desjardins et al.**, 2008). Na osnovu literaturnih podataka uočeno je da hemijske analize ostaju važan instrument za prikazivanje stvarne učestalosti različitih hemotipova koje će ujedno dati detaljnu validaciju trihotecenskih genotipova u okviru neke populacije (**Desjardins et al.**, 2008; **Somma et al.**, 2014).

#### 6.4. Rasprostranjenost i značaj hemotipova

S obzirom na veliki značaj trihotecena u poljoprivredi kao i u prehrambenoj industriji od suštinskog značaja za jednu zemlju je poznavanje toksikološkog profila trihotecena jer imaju značajnu ulogu u etiologiji bolesti. Trihotecenski hemotipovi (NIV, 3ADON i 15ADON) imaju različita toksikološka svojstva. Utvrđeno je da je nivalenol toksičniji od deksinivalenola za ljude i životinje (Lee et al., 2015), a isto tako ustanovljeno je, i da je 3ADON toksičniji od 15ADON (Puri and Zhong, 2010). U pogledu zaštite zdravlja ljudi i životinja poznavanje hemotipova je važna informacija za uspostavljanje strategije za procenu rizika. U dosadašnjim istraživanjima utvrđeno je da različite vrste *Fg* kompleksa mogu imati samo jedan hemotip ili čak mogu da sintetišu sva tri miktoksina 3ADON, 15ADON i NIV, kao što je slučaj kod vrste *F. graminearum* ss i *F. asiaticum*. Utvrđeno je da vrste *F. boothii* i *F. vorosii* sintetišu samo 15ADON (Starkey et al., 2007; O'Donnell et al., 2008; Ward et al., 2008).

Rezultati o geografskoj rasprostranjenosti hemotipa u ovoj disertaciji su po prvi put ukazali kakva je distribucija hemotipova u Srbiji, kao i na postojanje 3ADON hemotipa u sedam lokaliteta: Zemun Polje (5), Nova Pazova (1), Krnješevci (1), Indija (1), Novi Sad (2), Kikinda (1) i Loznica (1). Ovo je ujedno i prva detekcija 3ADON hemotipa u Južnoj Evropi.

Velike razlike u geografskoj rasprostranjenosti hemotipova širom sveta opisali su Gale et al. (2002), Zhang et al. (2007) i Qu et al. (2008) u Kini, Karugia et al. (2009) u Japanu, Boutigny et al. (2011) u Južnoj Africi, Gale et al. (2007) i Ward et al. (2008) u Americi, a u Australiji Monds et al. (2005). Literaturni podaci pokazuju geografsku podelu trihotecenskih hemotipova širom Evrope, gde je uočeno da u severnoj Evropi 3ADON hemotip dominira u Norveškoj (Aamot et al., 2015; Uhlig et al., 2013; Langseth et al., 2001) u Švedskoj (Fredlund et al., 2013; Lindblad et al., 2013), u Finskoj i na severozapadu Rusije (Yli-Mattila et al., 2009). Dok se 15ADON pojavljuje pretežno u zapadnoj i južnoj Evropi, uključujući Veliku Britaniju (Jennings et al., 2004), Belgiju (Audenaert et al., 2009), Italiju (Prodi et al., 2009; Somma et al., 2014), Luksemburg (Pasquali et al., 2010), Poljsku (Stepien et al., 2008), Mađarsku (Toth et al., 2005), Nemačku (Talas et al., 2011) i Francusku (Boutigny et al., 2014). Izolati sa NIV hemotipom nisu zabeleženi u severnoj Evropi, ali čine najmanje 10% izolata *Fg* kompleksa u nekim drugim delovima Evrope (Jennings et al., 2004;

Waalwijk et al., 2003; Boutigny et al., 2014; Stepien et al., 2008; Somma et al., 2014).

Na severu Evrope dominantan je 3ADON hemotip, pa su tako Aamot et al. (2015) uočili da je većina izolata *F. graminearum* na žitaricama u Norveškoj imala 3ADON hemotip. Takođe, u Norveškoj 3ADON je detektovan na pšenici, ovsu, i ječamu u toku 2011. godine, dok 15ADON nije detektovan (Uhlig et al., 2013). Još ranije je uočeno da 3ADON hemotip dominira među izolatima *Fg* kompleksa sa Norveških žitarica (Langseth et al., 1999, 2001), 3ADON hemotip je pronađen na ovsu i pšenici koji su sakupljeni između 2009-2011. godine u Švedskoj, dok 15ADON hemotip nije primećen (Fredlund et al., 2013; Lindblad et al., 2013). Prethodne genetičke analize pokazale su da su izolati *F. graminearum* iz Finske i severozapadne Rusije bili isključivo 3ADON (Yli-Mattila et al., 2009), a takođe 3ADON hemotip je bio dominantan na ječmu, tritikaleu, raži, ovsu i u Danskoj, iako je 15ADON hemotip bio dominantan na pšenici prikupljenoj između 2003. i 2007. godine u Danskoj (Nielsen et al., 2012). Za razliku od severa Evrope, u njenim drugim delovima dominantni su drugi hemotipovi. U Francuskoj dominantan hemotip na pšenici, ječmu i kukuruzu bio je 15ADON, dok je NIV hemotip dosta manje prisutan i to samo na pšenici i kukuruzu (Boutigny et al., 2014). U Italiji, Prodi et al. (2009, 2011) uočili su da je 15ADON hemotip dominantan u Italiji i to pretežno u regionima sa hladnijom klimom. Takođe, Somma et al. (2014) su analizom populacije *Fg* kompleksa utvrdili da je 88% pripadalo 15ADON hemotipu, 11% NIV hemotipu, dok je 3ADON hemotip detektovan samo kod jednog izolata. Proučavajući 76 izolata *F.graminearum* ss poreklom sa pšenice u Engleskoj, 72 izolata pripadali su 15ADON hemotipu (Jennings et al., 2004).

### 6.5. Molekularna identifikacija i karakterizacija vrsta *Fg* kompleksa

Primenom PCR reakcije korišćenjem prajmera *ef1/ef2* (omogućavaju amplifikaciju proteinskog gena *TEF-1 $\alpha$* ), T1/T22 (amplifikuju proteinski gen  *$\beta$ -tubulin*) i H3-1a/H3-1b (omogućava amplifikaciju histonskog *H3* gena) amplifikovani su fragmenti odgovarajuće veličine, koji su sekvencirani radi identifikacije proučavanih izolata.

Pomoću BLAST analize, dobijene konsenzus nukleotidne sekvence poređene su sa sekvencama dostupnim u GenBank bazi podataka. BLAST analiza na osnovu

*TEF-1 $\alpha$*  gena pokazala je da je 10 sekvenci imalo 100% nukleotidne identičnosti, dok je jedna sekvenca pokazala 99% sa sekvencama izolata vrste *F. graminearum* poreklom iz različitih delova sveta. Sekvenca izolata 1339/2 pokazala je 100% nukleotidne identičnosti sa sekvencom referentnog izolata *F. vorosii* (NRRL 37605), dok je 99% nukleotidne identičnosti pokazala sa izolatima *F. asiaticum*, *F. graminearum ss* i *F. boothii* deponovanih u GenBank bazi podataka.

Međutim, nakon poređenja dobijenih sekvenci na osnovu amplifikacije histon *H3* gena sa sekvencama drugih izolata dostupnih u GenBank bazi podataka rezultati BLAST analize 12 sekvenci ispitivanih izolata u ovom radu pokazali su da je 9 izolata imalo najviši nivo nukleotidne sličnosti sa izolatima *F. graminearum ss*, dva izolata sa *F. boothii* i jedan izolat sa *F. vorosii*.

Molekularna identifikacija 12 odabranih izolata na osnovu amplifikacije  $\beta$ -*tubulina* obavljena je BLAST analizom i pokazala je da je 8 izolata imalo 100% identičnosti, dok su tri izolata imala 99% identičnosti sa sekvencama izolata *F. graminearum ss* deponovanih u GenBank bazi podataka. Izolat 1339/2 pokazao je najviši stepen nukleotidne identičnosti sa sekvencom izolata *F. vorosii* NRRL 37605 poreklom iz Mađarske. Na osnovu proračuna genetičke sličnosti odabranih sekvenci za gen  $\beta$ -*tubulin*, izolat 1339/2 identifikovan je kao *F. vorosii*, dok se izolati *F. boothii* (2822 i 4135) nisu jasno izdvojili od izolata *F. graminearum ss*.

Molekularna identifikacija na osnovu multilokusne sekvence tri gena (*TEF-1 $\alpha$* ,  $\beta$ -*tubulin* i histon *H3*) u ovom radu identifikovane su vrste *F. graminearum ss*, *F. boothii* i *F. vorosii*.

Literaturni podaci ukazuju da je filogenetska srodnost vrsta u okviru *Fg* kompleksa jako bliska. Veliki broj autora u literaturi navodi da identifikacija vrsta *Fg* kompleksa zahteva analiziranje više gena uključujući *TEF-1 $\alpha$* ,  $\alpha$ -*tubulin*,  $\beta$ -*tubulin*, histon *H3*, *RED*, *TRI101* i druge (O'Donnell et al., 2004; Geiser et al., 2004; Starkey et al., 2007). Elongacioni faktor (*TEF-1 $\alpha$* ) je visoko informativan na nivou vrste za rod *Fusarium* i pokazuje visok polimorfizam sekvenci između blisko srodnih vrsta, čak i u poređenju sa intronom kodirajućih gena, kao što su  $\beta$ -*tubulin* i histon *H3* gen (Geiser et al., 2004), što su rezultati dobijeni u ovom radu i potvrdili. O'Donnell et al. (2004) su na osnovu *MAT1-1* i *MAT1-2* kao i histon *H3* gena izvršili molekularnu karakterizaciju vrsta *Fg* kompleksa. U istraživanjima Starkey et al. (2007) su na

osnovu DNK sekvenci više gena (*TEF-1 $\alpha$* ,  *$\beta$ -tubulin*, histon *H3*, *RED*, *TRI101*) identifikovali vrste u okviru *Fg* kompleksa.

Za filogenetsku analizu u disertaciji korišćeno je 12 sekvenci tri različita genomska regiona (*TEF-1 $\alpha$* ,  *$\beta$ -tubulin* i *H3*) koje su uparene sa 25 odabranih sekvenci vrsta *Fg* kompleksa koje su dostupne u GenBank bazi podataka. Filogenetska analiza je ukazala na postojanje dve novootkrivene vrste *Fg* kompleksa u Srbiji. Filogenetsko stablo pokazalo je izdvajanje izolata *F. graminearum* u tri klastera I, II i III. Uočeno je da su izolati 4135 i 2822 u okviru grupe IA2 grupisani zajedno sa referentnim izolatima *F. boothii* (NRRL 29020 i NRRL 26916) koji su poreklom iz Amerike. U okviru subklastera IB, sekvenca ispitivanog izolata 1339/2 grupisana je zajedno sa referentnim izolatom *F. vorosii* (NRRL 37605) koji je poreklom iz Mađarske. U grupu IA1 svrstalo se preostalih devet odabranih izolata *F. graminearum* zajedno sa referentnim izolatima *F. graminearum* (NRRL 28336, NRRL 29169 i NRRL 28439), što se i očekivalo s obzirom na rezultate prethodnih istraživanja o biogeografiji ove vrste, za koju je utvrđeno da preovladava na svim kontinentima (O'Donnell et al., 2004).

Rezultati dosadašnjih istraživanja u svetu ukazali su da se izolati *F. graminearum sensu lato* međusobno razlikuju po biogeografiji, pripadnosti određenom hemotipu, potencijalu produkcije mikotoksina i filogeniji, dok su morfološka svojstva slabo uočljiva. Upotrebom multilokusne DNK sekvence 13 nuklearnih gena i GCPSR metode u okviru *Fg* kompleksa identifikovano je 15 vrsta: [1] *Fusarium austroamericanum*, [2] *Fusarium meridionale*, [3] *Fusarium boothii*, [4] *Fusarium mesoamericanum*, [5] *Fusarium acacie-mearnsii*, [6] *Fusarium asiaticum*, [7] *Fusarium graminearum sensu stricto*, [8] *Fusarium cortaderie*, [9] *Fusarium brasilicum*, [10] *F. vorosii*, [11] *F. gerlachii*, [12] *F. aethiopicum*, [13] *F. ussurianum*, [14] *F. louisianense* poreklom iz Luizijane i [15] *F. nepalense* poreklom iz Nepala (O'Donnell et al., 2000, 2004, 2008; Starkey et al., 2007; Yli-Mattila et al., 2009; Sarver et al., 2011).

Prvi izolat vrste *F. vorosii* izolovan je sa klasa pšenice u Mađarskoj 2002. godine (NRRL 37605 = FgHF012). Pomenuta vrsta identifikovana je korišćenjem molekularnih metoda (RAPDs), IGS-RFLP i delimičnih sekvenci *RED* gena (Toth et al., 2005). Na osnovu proučavanja DNK sekvenci *TEF-1 $\alpha$*  i *RED* gena, Starkey et al. (2007) su dva izolata ove vrste poreklom sa pšenice sakupljene u 2003. godini u Japanu

(NRRL 38207 = Suga 0301112, NRRL 38208 = Suga 0301831) identifikovali kao *F. vorosii*. Isti autori utvrdili su da su izolati vrste *F. vorosii* pripadali 15ADON hemotipu. U istraživanjima **Lee et al.** (2016) na osnovu gena *TEF-1α*, *TRI101* i *MAT1-1-3* identifikovali su vrstu *F. vorosii* na kukuruзу, ječmu i pirinču u Koreji.

Prema podacima u literaturi vrsta *F. boothii* identifikovana je na ječmu, pšenici i kukuruзу u Južnoj Africi, Južnoj Americi, Aziji i drugim oblastima (**Boutigny et al.**, 2011; **Sampietro et al.**, 2010). **O'Donnell et al.** (2004) su na osnovu *MAT1-1* i *MAT1-2* kao i histon *H3* gena identifikovali ovu vrstu. Ispitivanjem izolata *F. graminearum* prikupljenih u periodu 2009-2014. godine sa zrna kukuruза u Kini na osnovu DNK sekvenci *TEF-1α* identifikovane su vrste *F. graminearum*, *F. meridionale* i *F. boothii* (**Duan et al.**, 2016). Pomenutu vrstu **Boutigny et al.** (2011) identifikovali su na ječmu u Južnoj Africi pomoću prajmera Fg11F/Fg11R i ef1/ef2.

## 6.6. Rasprostranjenost vrsta *Fg* kompleksa

Na distribuciju vrsta a samim tim i trihotecenskih hemotipova direktno ili indirektno su verovatno uticali različiti faktori uključujući klimu, plodored, različita tolerantnost useva prema patogenima i drugo. Informacije o rasprostranjenosti vrsta i njihovih hemotipova su ključne zbog povećane mogućnosti za kontaminaciju žitarica mikotoksinima. Pored toga, ovi rezultati su potrebni u razvoju strategije upravljanja fuzariozama klasa i truleži klipa u svetu a i u Srbiji, kao i da se poboljša razumevanje distribucije i značaj različitosti vrsta *Fg* kompleksa širom sveta.

Iako su osnovni faktori za geografsku rasprostranjenost vrsta kao i hemotipova u okviru *Fg* kompleksa još uvek nedovoljno poznati, pojava nekih vrsta može se povezati sa njihovim ekološkim, odnosno temperaturnim zahtevima. Utvrđeni su različiti genotipovi iste vrste, što ukazuje da može doći do ukrštanja genotipova u okviru populacije (**Zhang et al.**, 2010).

Obe novootkrivene vrste u Srbiji, *F. boothii* i *F. vorosii*, u okviru ove disertacije su po prvi put u Evropi identifikovane u Mađarskoj. S obzirom na geografsku blizinu, slične klimatske i agroekološke uslove, pojava ovih vrsta se mogla i očekivati u Srbiji, što su rezultati ove disertacije i potvrdili.

**Backhouse** (2014) navodi da vrsta *F. boothii*, ima zanimljivu geografsku distribuciju. U dosadašnjoj literaturi postoji nekoliko dostupnih podataka o pojavi ove

vrste na pšenici gajenoj na visinama iznad 1000 m u suptropskim i tropskim krajevima u Južnoj Africi, Keniji, Etiopiji i Meksiku. U ovim oblastima *F. boothii* se javlja u većem procentu na klasu pšenice u odnosu na druge vrste roda *Fusarium* (Boutigny et al., 2011; Malhipour et al., 2012; O'Donnell et al., 2008; Wagacha et al., 2010). U drugim delovima sveta, pojava *F. boothii* na pšenici je sporadična.

Prema podacima u svetu, kukuruz je biljka na kojoj se *F. boothii* češće pojavljuje nego na pšenici. Na zrnju kukuruza identifikovana je u Nepal, Argentini i Južnoj Koreji (Desjardins and Proctor, 2011; Lee et al., 2012; Sampietro et al., 2012). Boutigny et al. (2011) utvrdio je da je *F. boothii* jedina vrsta koja je povezana sa truleži klipa kukuruza u Južnoj Africi, dok je u relativno niskom procentu bila prisutna na klasu pšenice. Autori su zaključili da je ova vrsta fiziološki više prilagođena da prouzrokuje patogenost na kukuruzu, dok se na pšenici javlja samo pod određenim, specifičnim uslovima. Uočeno je da *F. boothii* ima manju mogućnost da preživi i razvija se u područjima sa hladnim zimama u odnosu na vrste *F. graminearum*, *F. asiaticum*, a takođe je i manje konkurentna u uslovima visoke vlažnosti i kiše u vreme cvetanja.

U literaturi postoji malo podataka o rasprostranjenosti vrste *F. vorosii*. Starkey et al. (2007) su na osnovu proučavanja DNK sekvenci *TEF-1 $\alpha$*  i *RED* gena identifikovali vrstu *F. vorosii* u Mađarskoj na pšenici koja je prikupljena 2002. godine, kao i u Japanu, takođe sa klasa pšenice prikupljenog 2003. godine. U kasnijim istraživanjima, Lee et al. (2016) su ovu vrstu identifikovali u Koreji na kukuruzu, ječmu i pirinču. Autori pojavu ove vrste objašnjavaju geografskom blizinom sa Japanom.

Većina filogenetskih vrsta *Fg* kompleksa vodi poreklo sa južne hemisfere, osim dve vrste, *F. gerlachii* i *F. graminearum ss* koje su kosmopoliti. Biogeografsku rasprostranjenost kompleksne vrste *F. graminearum* dao je Kerry O'Donnell (2004) koji je ukazao da je *F. graminearum ss* najrasprostranjenija i najdominantnija vrsta u svetu. Literaturni podaci ukazuju da su vrste *F. austroamericanum*, *F. meridionale*, *F. cortaderiae* i *F. brasilicum* lokalizovane u Južnoj Americi (Starkey et al., 2007; Sampietro et al., 2011), *F. acaciae-mearnsi* u Australiji i Africi (O'Donnell et al., 2004), *F. asiaticum*, *F. vorosii* i *F. ussurianum* u Aziji (O'Donnell et al., 2004), *F. aethiopicum* u Africi (O'Donnell et al., 2008), *F. boothii* i *F. mesoamericanum* u Centralnoj Americi (O'Donnell et al., 2004; 2008), *F. gerlachii* i *F. louisianense* u SAD-u (Starkey et al., 2007; Sarver et al., 2011) i *F. nepalense* vrsta otkrivena u

Nepalu (Sarver et al., 2011). Usled promene klime kao i razmene dobara širom sveta, došlo je do migracije ovih vrsta, tako da se većina vrsta sada proširila na sve kontinente.

Za razliku od rasprostranjenosti hemotipova *F. graminearum*, u Evropi ima malo informacija o distribuciji vrsta *Fg* kompleksa. Utvrđeno je da je vrsta *F. graminearum* *ss* dominantna u Francuskoj (Waalwijk et al., 2008), Nemačkoj (Talas et al., 2011), Italiji (Prodi et al., 2009, 2011), Velikoj Britaniji (Jennings et al., 2004), Belgiji (Audenaert et al., 2009), Luksemburgu (Pasquali et al., 2010), Poljskoj (Stepien et al., 2008), Švedskoj (Fredlund et al., 2013; Lindblad et al., 2013), Norveškoj (Aamot et al., 2015) i Danskoj (Nielsen et al., 2012). U istraživanjima Somma et al. (2014) oučili su da je dominantna vrsta na pšenici i kukuruzu *F. graminearum* *ss* (88/90), a takođe u ovom istraživanju su po prvi put identifikovali vrstu *F. cortaderiae* (2/90) u Italiji. Tokom 2002. godine na teritoriji Mađarske, sa zrna pšenice izolovana je vrsta *F. vorosii* (Toth et al., 2005; Starkey et al., 2007). Boutigny et al. (2014) identifikovali su *F. graminearum* *ss* kao dominantnu vrstu *Fg* kompleksa (289/294) na pšenici, ječmu i kukuruzu u Francuskoj. Pored vrste *F. graminearum* *ss*, na zrnju kukuruza identifikovane su još dve nove vrste *F. cortaderiae* (3/294) i *F. boothii* (2/294).

U istraživanjima Zhang et al. (2012) uočeno je da je vrsta *F. graminearum* široko rasprostranjena u područjima gde se pšenica i kukuruz gaje u plodoredu. Nasuprot tome, u područjima gde se pšenica gaji u plodoredu sa pirinčem uglavnom je identifikovana vrsta *F. asiaticum* (Zhang et al., 2012; Lee et al., 2010; Index Mundi, 2014). Osim toga, uočena je visoka korelacija između prosečnih temperatura i učestalosti vrsta *F. graminearum* *ss* i *F. asiaticum*. Vrsta *F. graminearum* javlja se na temperaturama ispod 15°C, dok se vrsta *F. asiaticum* pojavljuje na temperaturama preko 15°C (Suga et al., 2008). Jasna geografska rasprostranjenost vrsta *Fg* kompleksa na pšenici i ječmu uočena je u Japanu. Na severu je izolovana vrsta *F. graminearum* *ss* dok je na jugu dominantna vrsta bila *F. asiaticum* (Suga et al., 2008). Još jedan očigledan primer geografske distribucije zabeležen je u Iranu, u zapadnom delu zemlje, gde je od 129 izolata poreklom sa pšenice, čak 125 izolata identifikovano kao *F. graminearum* *ss*. Nasuprot tome, u istočnom Iranu, populacija je mnogo raznovrsnija, identifikovano je devet vrsta *Fg* kompleksa među 26 izolata (Davari et al., 2013).

Rezultati istraživanja koji su objavljeni u Koreji pokazali su da je većina izolata poreklom sa kukuruza bila *F. graminearum* *ss* (74%), dok su vrste *F. meridionale*, *F.*



*boothii* i *F. asiaticum* bile prisutne u niskom procentu (Jeon et al., 2003). Do sličnih rezultata došli su Lee et al. (2012) koji su proučavajući 568 izolata *Fg* kompleksa, uočili da je dominantna vrsta na kukuruзу bila *F.graminearum* ss (75%), zatim *F. boothii* (12%), *F. asiaticum* (12%) i *F. meridionale* (1%). Nasuprot tome, uočeno je da su glavni prouzrokovajući truleži klipa kukuruза u Nepalу bile vrste *F. asiaticum*, *F. meridionale* i *F. boothii*, dok vrsta *F. graminearum* ss, koja dominira na kukuruзу širom sveta, nije detektovana (Desjardins and Proctor, 2011).

Istraživanja u Južnoj Americi uglavnom su sprovedena u umerenim regionima Argentine, jugu Brazila i Urugvaju, i ukazala su da na zrnu kukuruза preovladavaju vrste *F. meridionale* i *F. boothii* za koje je utvrđeno da su endemske za Južnu Ameriku (Sampietro et al., 2011; Aoki et al., 2012). Nasuprot tome, u Argentini Ramirez et al. (2007) utvrdili su da je svih 113 izolata koji su prikupljeni sa pšenice bili *F. graminearum* ss. U istraživanjima Del Ponte et al. (2013) uočeno je da se na pšenici javlja vrsta *F. graminearum* ss, na kukuruзу *F. meridionale*, dok se na pirinču javlja *F. asiaticum*.

U Srbiji do sada nema podataka o prisustvu i rasprostranjenosti vrsta u okviru *Fg* kompleksa. S obzirom na literaturne podatke o prisustvu novootkrivenih vrsta u susednim zemljama - *F. boothii* i *F. vorosii*, moglo se i očekivati prisustvo pomenutih vrsta na zrnu žita u Srbiji, što su rezultati ove disertacije i potvrdili.

## 7. ZAKLJUČAK

Na osnovu rezultata istraživanja o biodiverzitetu vrste *Fusarium graminearum* poreklom sa zrna pšenice, ječma i kukuruza mogu se doneti sledeći zaključci:

- ❖ Po prvi put detektovano je prisustvo vrste *F. vorosii* na pšenici i *F. boothii* na pšenici i kukuruza na teritoriji Srbije.
- ❖ Proučavanjem morfoloških karakteristika ispitivanih izolata uočena je velika varijabilnost u izgledu makroskopskih svojstava na osnovu kojih nije bilo moguće utvrditi morfološke razlike između vrsta *F. graminearum* ss, *F. vorosii* i *F. boothii* u okviru *Fg* kompleksa u Srbiji.
- ❖ Najmanji prosečni dnevni porast na PDA podlozi imao je izolat 2813 identifikovan kao *F. graminearum* ss, dok je izolat vrste *F. boothii* (4135) imao najveći dnevni porast.
- ❖ Praćenjem porasta izolata *F. graminearum* na PDA podlozi uočeno je da izolat vrste *F. vorosii* ima najveći porast micelije nakon 48 h, kao i nakon 96 h od svih ispitivanih izolata.
- ❖ Konidije izolata vrste *F. graminearum* ss imale su dimenzije 25,30-74,70 x 4,17-6,03 µm, kod izolata *F. vorosii* konidije su bile 31,4-52,20 x 5,04-6,12 µm, a kod izolata *F. boothii* dimenzije makrokonidija bile su u opsegu 31,97-71,64 x 4,12-4,67 µm. Na osnovu proučavanja ovih karakteristika uočeno je da prosečne vrednosti u dužini i širini makrokonidija mogu značajno varirati, pa se ovi parametri ne mogu koristiti za morfološko razdvajanje pomenutih vrsta.
- ❖ Testovi patogenosti na klipku kukuruza i klasu pšenice ispitivanih izolata *F. graminearum* pokazali su da su svi ispitivani izolati, bez obzira na poreklo, prouzrokovali simptome crvenoružičaste truleži klipa kukuruza, odnosno fuzariozu klasa pšenice, kao i da postoji velika razlika u agresivnosti, kako između izolata različitih vrsta, tako i između izolata iste vrste. Reizolacijom i ponovnom identifikacijom potvrđena je patogenost izolata i ispunjeni su Kohovi postulati.

❖ Test patogenosti na listu ječma u laboratorijskim uslovima pokazao je da su svi ispitivani izolati bez obzira na poreklo (pšenica, ječam, kukuruz) prouzrokovali simptome na listu ječma i uočena je velika varijabilnost u virulentnosti između izolata.

❖ Testovi patogenosti pokazali su da vrste *F. graminearum* ss, *F. vorosii* i *F. boothii* identifikovane u okviru *Fg* kompleksa u Srbiji mogu ostvariti infekciju, kako u laboratorijskim, tako i u poljskim uslovima.

❖ Potencijal produkcije mikotoksina ZEA i DON pomoću ELISA testa kod ispitivanih izolata, pokazao je da su najveće koncentracije sintetisali izolati poreklom sa pšenice, dok su izolati poreklom sa ječma imali najmanji potencijal produkcije oba ispitivana mikotoksina.

❖ Najveće koncentracije ZEA sintetisao je izolat *F. vorosii*, a najveće koncentracije DON-a sintetisao je izolat *F. graminearum* ss, dok su izolati *F. boothii* sintetisali generalno niske koncentracije oba mikotoksina.

❖ Poređenjem koncentracija mikotoksina kod izolata poreklom sa kukuruza uočeno je da postoji visoko statistički značajna korelacija između sintetisanih koncentracija ZEA i DON, dok kod izolata poreklom sa pšenice i ječma nije uočena korelacija između ova dva mikotoksina.

❖ Kvalitativna i kantitativna analiza mikotoksina pomoću HPLC metode pokazala je da su izolati *F. boothii* i *F. vorosii* sintetisali samo 15ADON, dok je većina izolata *F. graminearum* ss produkovala sva tri mikotoksina (15ADON, 3ADON i NIV).

❖ Pomoću HPLC metode određen je hemotip ispitivanih izolata i uočeno da su izolati *F. boothii* i *F. vorosii* pripadali 15ADON hemotipu. Većina izolata *F. graminearum* ss pripadala je 15ADON hemotipu (86,7%), dok je 3ADON hemotip detektovan u manjem procentu (13,3%). NIV hemotip nije detektovan.

❖ Multipleks PCR reakcija, primenjena je u ovim istraživanjima za brzu detekciju hemotipova kod izolata *F. graminearum*. Kao rezultat multipleks PCR reakcije, korišćenjem seta prajmera *TRI3* i *TRI12*, amplifikovani su fragmenti očekivane veličine od 610 bp i 670 bp što je ukazalo da su svi ispitivani izolati pripadali 15ADON hemotipu.

❖ Poređenjem rezultata dobijenih hemijskim analizama sa molekularnim analizama koje određuju pripadnost hemotipova, uočeno je da postoje razlike u detekciji 3ADON hemotipa.

❖ Rezultati ove disertacije su prvi rezultati o prisustvu i biodiverzitetu hemotipova u našim agroekološkim uslovima i mogu doprineti boljem poznavanju mikotoksikološkog profila izolata *F. graminearum*, što je od izuzetnog značaja, jer je poznavanje hemotipova važna informacija za uspostavljanje strategije za procenu rizika od mikotoksina.

❖ Koristeći *TEF-1 $\alpha$*  gen uočeno je da on nije bio dovoljno informativan da razdvoji sve prisutne vrste u okviru *Fg* kompleksa, iako su detektovane razlike čak u nekoliko nukleotida između izolata iste vrste. Na osnovu *TEF-1 $\alpha$*  gena izolat 1339/2 identifikovan je kao *F. vorosii*, dok su svi ostali izolati identifikovani kao *F. graminearum ss.*

❖ Gen *histon H3* bio je dovoljno specifičan i informativan da se identifikuju tri vrste u okviru *Fg* kompleksa *F. graminearum ss* (9), *F. boothii* (2) i *F. vorosii* (1).

❖ Na osnovu proračuna genetičke sličnosti odabranih sekvenci za gen  *$\beta$ -tubulin*, jedan izolat (1339/2) identifikovan je kao *F. vorosii*, dok se izolati *F. boothii* (2822 i 4135) nisu jasno izdvojili od izolata *F. graminearum ss* kao posebna vrsta u okviru *Fg* kompleksa.

❖ Na osnovu multilokusne sekvence tri gena *TEF-1 $\alpha$* ,  *$\beta$ -tubulin* i *histon H3* identifikovane su tri vrste *F. graminearum ss*, *F. boothii* i *F. vorosii* poreklom sa zrna žitarica iz Srbije.

❖ Rekonstrukcija filogenetskog stabla na osnovu tri različita genomna regiona pružila je uvid u prisustvo i rasprostranjenost vrsta *Fg* kompleksa u našoj zemlji, kao i evolutivnu međupovezanost između izolata vrste *F. graminearum ss*, *F. vorosii* i *F. boothii* poreklom iz Srbije.

❖ Ova istraživanja predstavljaju početak proučavanja biogeografske distribucije vrsta *Fg* kompleksa u Srbiji, a dobijeni rezultati predstavljaju uvod u bližu genetičku karakterizaciju. Sekvenciranje većeg broja izolata i uključivanje još dodatnih gena, kao i njihovo poređenje i određivanje međuodnosa sa drugim izolatima u svetu doprineće boljem poznavanju biodiverziteta *Fg* kompleksa iz čega može nastati uspešna strategija u suzbijanju ovih štetnih patogena.

❖ Morfološka, patogena, toksigena i molekularna karakterizacija izolata *F. graminearum* poreklom sa zrna pšenice, ječma i kukuruza iz Srbije, pružila je uvid u prisustvo, rasprostranjenost i biodiverzitet vrsta *Fg* kompleksa u našoj zemlji.

## 8. LITERATURA

- Aamot, H.U., Ward, T.J., Brodal, G., Vrålstad, T., Larsen, G.B., Klemsdal, S.S., Elameen, A., Uhlig, S., Hofgaard, I. S. (2015): Genetic and phenotypic diversity within the *Fusarium graminearum* species complex in Norway. *European Journal of Plant Pathology*, 142:501–519.
- Ablova, I.B., Slusarenko, A.N. (1997): Problems associated with breeding winter wheat for head scab resistance. In: *Fusarium* head scab: global status and future prospects. Mexico, DF, CIMMYT.
- Abramson, D., Clear, R.M., Smith, D.M. (1993): Trichothecene production by *Fusarium* spp. isolated from Manitoba grain. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 15: 147–152.
- Abramson, D., Clear, R.M., Gaba, D., Smith, D.M., Patrick, S.K., Saydak, D. (2001): Trichothecene and moniliformin production by *Fusarium* species from western Canadian wheat. *Journal of Food Protection*, 64: 1220–1225.
- Adams, J.F. (1921): Observations on wheat scab in Pennsylvania and its pathological histology. *Phytopathology*, 11: 115-123.
- AgroChart (2013): Serbia. Grain and Feed Annual.  
<http://www.agrochart.com/en/news/news/030513/serbia-grain-and-feed-annual-mar-2013/>
- Alvarez, C.L., Azcarate, M.P., Pinto, V.F. (2009): Toxigenic potential of *Fusarium graminearum sensu stricto* isolates from wheat in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 135: 131–135.
- Aoki, T., O'Donnell, K. (1999): Morphological and molecular characterization of *Fusarium pseudograminearum* sp. Nov., formerly recognised as the group 1 population of *F. graminearum*. *Mycologia*, 91: 587-609.
- Aoki, T., Ward, T., Kistler, H., O'Donnell, K. (2012): Systematics, phylogeny and trichothecene mycotoxin potential of *Fusarium* head blight cereal pathogens.

- Mycotoxins, 62: 91–102.
- Astolfi, P., Reynoso, M.M., Ramirez, M.L., Chulze, S.N., Alves, T.C.A., Tessmann, D.J., Del Ponte, E.M. (2011a): Genetic population structure and trichothecene genotypes of *Fusarium graminearum* isolated from wheat in southern Brazil. *Plant Pathology*, 61: 289–295.
- Astolfi, P., Dos Santos, J., Schneider, L., Gomes, L.B., Silva, C.N., Tessmann, D.J., Del Ponte, E.M. (2011b): Molecular survey of trichothecene genotypes of *Fusarium graminearum* species complex from barley in southern Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, 148: 197–201.
- Audenaert, K., Van Broeck, R., Bekaert, B., De Witte, F., Heremans, B., Messens, K. (2009): *Fusarium* head blight (FHB) in Flanders: population diversity, inter-species associations and DON contamination in commercial winter wheat varieties. *European Journal of Plant Pathology*, 125: 445–458.
- Backhouse, D. (2014): Global distribution of *Fusarium graminearum*, *F. asiaticum* and *F. boothii* from wheat in relation to climate. *European Journal Plant Pathology*, 139: 161–173.
- Bagi, F.S. (1999): Ispitivanje heterogenosti populacije gljive *Fusarium graminearum* Schwabe patogena pšenice i kukuruza. Magistarska teza. Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, 1–130.
- Bai, G.H., Shaner, G.E. (1994): Wheat scab: respective and control. *Plant Disease*, 78: 760–766.
- Ban, T. (1997): Evaluation resistance to *Fusarium* head blight in indigenous Japanese species of *Agropyron*. *Ephytica*, 97: 39-44.
- Balaž, F. (1982): Proučavanje pojave fuzariozne truleži stable kukuruza u zavisnosti od stanja vodnog režima zemljišta i biljaka u raznim agroekološkim uslovima. Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, 1-132.
- Berova, S., Mladenova, M. (1974): Influence of wheat ear and grain fusariosis (*Fusarium graminearum* (Schwabe)) on the chemical, technological and baking qualities. *Rastenievdni Nauki*, 11: 125-133.

- Blandino, M., Haidukowski, M., Pascale, M., Plizzari, L., Scudellari, D., Reyneri, A. (2012): Integrated strategies for the control of *Fusarium* head blight and deoxynivalenol contamination in winter wheat. *Field Crops Research*, 133: 139-149.
- Bozac, P., Popescu, S., Botau, D., Boldura, O.M., Pirvulescu, P. (2015): Molecular characterization for some new *Fusarium* isolates collected from the West Part of Romania. *Romanian Biotechnological Letters*, 21, 11560-11568
- Booth, C. (1971): The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, 179-182.
- Boutigny, A.L., Ward, T.J., Van Coller, G.J., Flett, B., Lamprecht, S.C., O'Donnell, K., Viljoen, A. (2011): Analysis of the *Fusarium graminearum* species complex from wheat, barley, and maize in South Africa provides evidence of species-specific differences in host preference. *Fungal Genetics and Biology*, 48, 914-920.
- Boutigny, A.L., Ward, T.J., Ballois, N., Iancu, G., Ioos, R. (2014): Diversity of the *Fusarium graminearum* species complex on French cereals. *European Journal of Plant Pathology*, 138:133-148.
- Bočarov-Stančić, A. (1996): Učestalost *Fusarium* spp. i njihovih mikotoksina u pšeničnom zrnju. Proizvodnja i prerada žita i brašna, Tehnološki fakultet, Zavod za tehnologiju žita i brašna, Novi Sad, 131-142.
- Bočarov-Stančić, A., Mašić, Z., Škrinjar, M. (2000): Prirodno prisustvo *Fusarium* vrsta i fuzariotoksina kod žitarica i krmnih smeša poreklom iz Jugoslavije. XII Savetovanje veterinarara Srbije, V. Banja, 78-84.
- Brennan, J.M., Fagan, B., van Maanen, A., Cooke, B.M., Doohan, F.M. (2003): Studies on *in vitro* growth and pathogenicity of European *Fusarium* fungi. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 577-587.
- Broders, K.D., Lipps, P.E., Paul, P.A., Dorrance, A.E. (2007): Evaluation of *Fusarium graminearum* Associated with Corn and Soybean Seed and Seedling Disease in Ohio. *Plant Disease*, 91: 1155-1160.
- Burgess, L.W., Nelson, P.E., Toussoun, T.A., Forbes, G.A. (1988): Distribution of



- Fusarium* species in sections *Roseum*, *Arthrosporiella*, *Gibbosum* and *Discolor* recovered from grassland, pasture and pine nursery soils of eastern Australia. *Mycologia* 80: 815–824.
- Burgess, L.W., Summerell, B.A., Bullock, S., Gott, K.P., Backhouse, D. (1994): *Laboratory Manual for Fusarium Research*, 3rd ed. University of Sydney/Royal Botanic Gardens, Sydney, Australia.
- Burlakoti, R.R., Neate, S.M., Adhikari, T.B., Gyawali, S., Salas, B., Steffenson, B.J., Schwarz, P.B. (2011): Trichothecene profiling and population genetic analysis of *Gibberella zeae* from barley in North Dakota and Minnesota. *Phytopathology*, 101:687–695.
- Clear, R.M., Patrick, S.K. (2000): *Fusarium* head blight pathogens isolated from *Fusarium*-damaged kernels of wheat in western Canada, 1993 to 1998. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 22: 51–60.
- Cai, L., Giraud, T., Zhang, N., Begerow, D., Cai, G., Shivas, R.G. (2011): The evolution of species concepts and species recognition criteria in plant pathogenic fungi. *International Journal of Mycology*, ISSN 1560-2745.
- Caron, D. (2000): Fusarioses des épis – Sain-on pr 'evoir leur' developpement. *Perspectives Agricoles*, 253: 56–62.
- Carter, J.P., Rezanoor, H.N., Holden, D., Desjardins, A.E., Plattner, R.D., Nicholson, P. (2002): Variation in pathogenicity associated with the genetic diversity of *Fusarium graminearum*. *European Journal of Plant Pathology*, 108: 573-583.
- Castañares, E., Albuquerque, D.R., Dinolfo, M.I., Pinto, V.F., Patriarca, A., Stenglein, S.A. (2014): Trichothecene genotypes and production profiles of *Fusarium graminearum* isolates obtained from barley cultivated in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 179:57–63.
- Champeil, A., Fourbet, J.F., Dore, T., Rossignol (2004): Influence of cropping system on *Fusarium* head blight and mycotoxin levels in winter wheat. *Crop Protection*, 23: 531–537.
- Cumagun, C.J.R., Rabenstein, F., Miedaner, T. (2004): Genetic variation and

- covariation for aggressiveness deoxynivalenol production and fungal colonization among progeny of *Gibberella zeae* in wheat. *Plant Pathology*, 53: 446–453.
- Cvetnić, Z., Pepeljnjak, S., Ševgić, M.(2005): Toxigenic Potencial of *Fusarium* Species Isolated from Non-harvest Maize. *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju*, 56: 275-280.
- Davari, M., Wei, S.H., Babay, A., Arzanlou, M., Waalwijk, C., van der Lee, T.A.J., Zare, R., Gerrits, E.A.H.G., Hoog, G.S., Diepeningen, A.D. (2013): Geographic differences in trichothecene chemotypes of *Fusarium graminearum* in the Northwest and North of Iran. *World Mycotoxin Journal*, 6:137–150.
- Del Ponte, E.M., Tessmann, D.J., Spolti, P., Kuhnem, P.R., Silva, C.N. (2013): Species Identification, Genetic Diversity and Phenotypic Variation Studies on the *Fusarium graminearum* Complex Populations from Brazil. In: Magliano TMA, Chulze SN, editors. *Fusarium head blight in Latin America*. Dordrecht: Springer Science, 15–30.
- Desjardins, A.E., Hohn, T.M. (1997): Mycotoxins in plant pathogenesis. *Molecular Plant. Microbe Interactions*, 10: 147-152.
- Desjardins, A.E., Busman, M., Manandhar, G., Jarosz, A.M., Manandhar, H.K., Proctor, R.H. (2008): Distribution of the mycotoxins nivalenol and deoxynivalenol in naturally and experimentally infected maize. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 5428–5436.
- Desjardins, A.E., Proctor, R.H. (2011): Genetic diversity and trichothecene chemotypes of the *Fusarium graminearum* clade isolated from maize in Nepal and identification of a putative new lineage. *Fungal Biology*, 115: 38–48.
- Devegowda, G., Raju, M.N., Swamy, H.V. (1998): Mycotoxins: Novel solution for their counteraction. *Feedstuffs*, 70: 12-15.
- Devegowda, G., Aravind, K. L.(2002): Mycotoxins: Economic risk and control – The biological solution. *Proc. Altechs 16<sup>th</sup> Ann. European, Midle Eastern and African Lecture Tour*, 59-73.
- Dill–Macky, R., Jones, R.K. (2000): The effect of previous crop residues and tillage on

- fusarium head blight of wheat. *Plant Disease*, 84: 71–76.
- Dong, F., Qiu, J., Xu, J., Yu, M., Wang, S., Sun, Y., Zhang, G., Shi, J. (2016): Effect of environmental factors on *Fusarium* population and associated trichothecenes in wheat grain grown in Jiangsu province, China. *International Journal of Food Microbiology*, 230: 58-63.
- Doohan, F.M., Brennan, J., Cooke, B.M. (2003): Influence of Climatic Factors on *Fusarium* Species Pathogenic to Cereals. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 755-768.
- Duan, D., Qin, Z., Yang, Z., Li, W., Sun, S., Zhu, Z., Wang, X. (2016): Identification of Pathogenic *Fusarium* spp. Causing Maize Ear Rot and Potential Mycotoxin Production in China. *Toxins*, 8: 186-203.
- Dubin, H.J., Gilchrist, L., Reeves, J., McNab, A. (1997): *Fusarium* head scab: global status and future prospects. Mexico, DF, CIMMYT.
- FAOSTAT: FAO statistical database. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy. <http://faostat.fao.org/default.aspx>
- Fisher, N.L., Burgess, L.W., Toussoun, T.A., Nelson, P.E. (1982): Carnation leaves as a substrate and for preserving cultures of *Fusarium* species. *Phytopathology*, 72: 151–153.
- Fernandez, M.R., Chen, Y. (2005): Pathogenicity of *Fusarium* species on different plant parts of spring wheat under controlled conditions. *Plant Disease*, 89: 164-169.
- Francis, R.G., Burgees, L.W. (1977): Characteristics of two populations of *Fusarium roseum* 'Graminearum' in eastern Australia. *Transactions of the British Mycological Society*, 68: 421-427.
- Fredlund, E., Gidlund, A., Sulyok, M., Börjesson, T., Krska, R., Olsen, M. (2013): Deoxynivalenol and other selected *Fusarium* toxins in Swedish oats—occurrence and correlation to specific *Fusarium* species. *International Journal of Food Microbiology*, 167: 76–283.
- Fernando, W.G.D., Miller, J.D., Seaman, W.L., Seifert, K., Paulitz, T.C. (2000): Daily

- and seasonal dynamics of airborne spores of *Fusarium graminearum* and other *Fusarium* species sampled over wheat fields. *Canadian Journal of Botany*, 78: 497–505.
- Gagkaeva, T., Levitin, M. (1997): Composition of *Fusarium graminearum* Schwabe populations collected from different regions of Russia. *Cereal Research Communications*, 25: 591-593.
- Gale, L.R., Chen, L.F., Hernick, C.A., Takamura, K., Kistler, H.C. (2002): Population analysis of *Fusarium graminearum* from wheat fields in eastern China. *Phytopathology*, 92, 1315–1322.
- Gale, L.R., Ward, T.J., Balmas, V., Kistler, H.C. (2007): Population subdivision of *Fusarium graminearum* sensu stricto in the upper Midwestern United States. *Phytopathology*, 97:1434–1439.
- Gale, L.R., Harrison, S.A., Ward, T.J., O'Donnell, K., Milus, E.A., Gale, S.W., Kistler, H.C. (2011): Nivalenol-type populations of *Fusarium graminearum* and *F. asiaticum* are prevalent on wheat in southern Louisiana. *Phytopathology*, 101: 124–134.
- Geiser, D.M., Gasco, J.M.M., Kang, S., Mkalowska, I., Veeraraghavan, N., Ward, T.J., Zhang, N., Kuldau, G.A., O'Donnell, K. (2004): A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 473–479.
- Gilbert, J., Tekauz, A. (2000): Review: recent developments in research on fusarium head blight of wheat in Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 22: 1–8.
- Góral T., Buśko M., Cichy H., Jackowiak H., Perkowski, J. (2002): Resistance of winter triticale lines and cultivars to *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation in kernels. *Journal of Applied Genetics*, 43: 237 — 248.
- Goswami, R.S., Kistler, H.C. (2005): Pathogenicity and in planta mycotoxin accumulation among members of the *Fusarium graminearum* species complex on wheat and rice. *Phytopathology*, 95: 1397–1404.
- Guo, X.W., Fernando, W.G.D., Seow-Brock, H.Y. (2008): Population structure, chemotype diversity, and potential chemotype shifting of *Fusarium*

*graminearum* in wheat fields of Manitoba. Plant Disease, 92, 756–762.

- Hagler, J.W.M., Towers, N.R., Mirocha, C.J., Eppley, R.M., Bryden, W.L. (2001): Zearalenone: Mycotoxin or mycoestrogen. In: *Fusarium* – Paul E. Nelson Memorial Symposium (Summerell, B.A., Leslie, J.F., Backhouse, D., Bryden W.L. and Burgess, L.W., ed.), AS Press, The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, 321–331.
- Haratian, M., Sharifnabi, B., Alizadeh, A., Safaie, N. (2008): PCR analysis of the Tri13 gene to determine the genetic potential of *Fusarium graminearum* isolates from Iran to produce nivalenol and deoxynivalenol. Mycopathologia, 166:109–116.
- Harris, L.J., Desjardina, A.E., Plattner R.D., Nicholson P., Butler, G., Young, J.C., Weston, G., Proctor, R.H., Hohn, T.M. (1999): Possible Role of Trichothecene Mycotoxins in Virulence of *Fusarium graminearum* on Maize. Plant Disease, 83(10): 954-960.
- Heier, T., Jain, S.K, Kogel, K.H., Pons-Kuhnemann, J. (2005): Influence of N-fertilization and fungicide strategies on *Fusarium* head blight severity and mycotoxin content in winter wheat. Journal of Phytopathology, 153: 551-557.
- Hörberg, H.M. (2002): Patterns of splash dispersed conidia of *Fusarium poae* and *Fusarium culmorum*. European Journal of Plant Pathology, 108: 73–80.
- Hornok, L., Toth, A. (2001): Reports on natural occurrence of toxigenic fungi and mycotoxins in Hungary between 1990—1999, pp. 68, in: Logrieco, A. (ed.), Occurrence of toxigenic fungi and mycotoxins in plants, food and feed in Europe, Agriculture and Biotechnology, COST Action 835, EUR 19695, European Commission.
- Hsu, I., Smaley, E.B., Strong, F.M., Ribelin, W.E. (1972): Identification of T-2 toxin in moldy corn associated with a lethal toxicosis in dairy cattle. Applied Microbiology, 24: 684-690.
- Hussein, H.M., Christensen, M.J., Baxter, M. (2002): Occurrence and distribution of *Fusarium* species in maize fields in New Zealand. Mycopathologia, 156:25–30.
- Imathiu, M.S., Ray, V.R., Back, M., Hare, C.M., Edwards, G.S. (2009): *Fusarium*

*langsethiae* pathogenicity and aggressiveness towards oats and wheat in wounded and unwounded *in vitro* detached leaf assays. European Journal of Plant Pathology, 124: 117–126.

IndexMundi(2014)

<http://www.indexmundi.com/agriculture/?country=jp&commodity=corn&graph=production>

Ito, Y., Outsubo, K.I. (1997): Effects of neonatal administration of zearalenone on the genital organs of female mice. Cereal Research Communications, 25: 453-454.

Ittu, M., Trif, A., Belc, N. (2004): Toxigenic Fungi and Mycotoxins in Romania: Challenges and Approaches. In: An Overview on Toxigenic Fungi and Mycotoxins in Europe (A. Logrieco i A. Visconti eds). Kluwer Academic Publishers, London, 185-194.

Ivanović, M., Ivanović, D. (2001): Mikoze i pseudomikoze biljaka. Poljoprivredni fakultet, Beograd, 1–547.

Jaćimović, G. (2012): Optimiranje mineralne ishrane pšenice u zavisnosti od vremenskih uslova godine. Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet Novi Sad.

Jajić, I., Bočarov-Stančić, A., Bijelić M. (2007): Investigations of the Capability of *Fusarium* Isolates from Corn for Biosynthesis of Fusriotoxins. Matica Srpska Proceedings for Natural Sciences, Novi Sad, 113: 125-133.

Jajić, I., Jurić, V., Abramović, B. (2008a): First survey of deoxynivalenol occurrence in crops in Serbia. Food Control, 19: 545-550.

Jajić, I., Jurić, V., Glamocic, D., Abramović, B. (2008b): Occurrence of deoxynivalenol in maize and wheat in Serbia. International Journal Molecular Sciences, 9: 2114-2126.

Jajić, M.I., Jevtić, M.R., Jurić, B.V., Krstović, Z.S., Telečki, S.M., Matić, J.J., Đilas, M.S., Abramović, F.B. (2011): Presence of deoxynivalenol in small-grain samples from 2009/10 harvest season. Matica Srpska Proceedings for Natural Sciences, Novi Sad, 120: 19-24.

- Jajić, I., Krstović, S., Kos, J., Abramović, B. (2014): Incidence of Deoxynivalenol in Serbian Wheat and Barley. *Journal of Food Protection*, 77: 853-858.
- Jakšić, S., Prunić, B., Milanov, D., Jajić, I., Bjelica, J., Abramović, B. (2011): Fumonisin and co-occurring mycotoxins in north Serbian corn. *Zbornik Matice Srpske Za Prirodne Nauke*, 120: 49-59.
- Jakšić, S., Abramović, B., Jajić, I., Balos, M., Mihaljev, Z., Despotović, V., Sojic, D. (2012): Co-occurrence of fumonisins and deoxynivalenol in wheat and maize harvested in Serbia. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 89: 615-619.
- Jennings, P., Coates, M.E., Walsh, K., Turner, J.A., Nicholson, P. (2004): Determination of deoxynivalenol- and nivalenol-producing chemotypes of *Fusarium graminearum* isolated from wheat crops in England and Wales. *Plant Pathology*, 53: 643–652.
- Jeon, J.J., Kim, H., Kim, H.S., Zeller, K.A., Lee, T., Yun, S.H., Bowden, R.L., Leslie, J.F., Lee, Y.W. (2003): Genetic diversity of *Fusarium graminearum* from maize in Korea. *Fungal Genetics*, 50: S142.
- Ji, L.J. (2007): Population and genetic diversity of *Fusarium graminearum* clade from different ecological regions China. Baoding: Agricultural University of Hebei, 8–20.
- Jurić, B.V., Jajić, I.M., Savković T.R., Abramović B.F., Ristić M.D., Jurić, J.F. (2007): Wheat Safety in Relation to Presence and Content of Deoxynivalenol. *Matica Srpska Proceedings for Natural Sciences*, Novi Sad, 113: 17-25.
- Kabeere, F., Hill, M.J., Hampton, J.G. (1997): Transmission of *Fusarium graminearum* (Schwabe) from maize seeds to seedlings. *Seed Science and Technology*, 25: 245-252.
- Karugia, G.W., Suga, H., Gale, L.R., Nakajima, T., Tomimura, K., Hyakumachi, M. (2009): Population structure of the *Fusarium graminearum* species complex from a single Japanese wheat field sampled in two consecutive years. *Plant Disease*, 93: 170–174.

- Kestemont, M. H., Donis, T., Chandelier, A., Cavelier, M. (2002): Occurrence of head blight agents and deoxynivalenol in Belgian wheat, pp 98, in: Abstracts, VIIth European Seminar "*Fusarium* — Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity" and WG-4 COST 835 Action Workshop (Mycotoxins in Cereals), Poznan, Poland, September 4-7.
- Klitich, C.R.J., Leslie, J.F. (1994): Journal of Association of Analytical Chemists, 77: 501-506.
- Kos, J., Hajnal, E.J., Sarić, B., Jovanov, P., Nedeljković, N., Milovanović, I., Krulj, J. (2016): The influence of climate conditions on the occurrence of deoxynivalenol in maize harvested in Serbia during 2013-2015. Food Control, 1-7.
- Kristensen, R., Torp, M., Kosiak, B., Holst-Jensen, A. (2005): Phylogeny and toxigenic potential is correlated in *Fusarium* species as revealed by partial translation elongation factor 1 alpha gene sequences. Mycological Research, 109: 173-186.
- Krnjaja, V., Lević, J., Stanković, S., Tomić, Z. (2007): Pathogenicity and diversity of vegetative compatibility of *Fusarium verticillioides*. Matica Srpska Proceedings for Natural Sciences, Novi Sad, 113: 103-111.
- Krnjaja, V., Lević, J., Stanković, S., Tančić, S. (2008): Pathogenic and genetic characterisation of *Fusarium sporotrichoides*. Cereal Research Communications, 36: 511-512.
- Krnjaja, V., Stanković, S., Lević, J. (2011): The presence of toxigenic *Fusarium* species and fusarioxins deoxynivalenol and zearalenone in winter wheat. Biotechnology in Animal Husbandry, 27: 63-73.
- Krnjaja, V., Lević, J., Stanković, S., Petrović, T., Tomić, Z., Mandić, V., Bijelić, Z. (2013): Moulds and mycotoxins in stored maize grains. Biotechnology in Animal Husbandry, 29: 527-536.
- Krnjaja, V., Lukić, M., Delić, N., Tomić, Z., Mandić, V., Bijelić, Z., Gogić, M. (2015a): Mycobiota and mycotoxins in freshly harvested and stored maize. Biotechnology in Animal Husbandry 31: 291-302.
- Krnjaja, V., Mandić, V., Lević, J., Stanković, S., Petrović, T., Vasić, T., Obradović, A.



- (2015b): Influence of N-fertilization on *Fusarium* head blight and mycotoxin levels in winter wheat. *Crop Protection*, 67: 251-256.
- Krnjaja, V., Tomić, Z., Stanković, S., Petrović, T., Bijelić, Z., Mandić, V., Obradović, A. (2015c): *Fusarium* infection and deoxynivalenol contamination in winter wheat. *Biotechnology in Animal Husbandry* 31: 123-131.
- Kuhnem, P.R., Del Ponte, E.M., Dong, Y., Bergstrom, G.C. (2015): *Fusarium graminearum* isolates from wheat and maize in New York show similar range of aggressiveness and toxigenicity in cross-species pathogenicity tests. *Phytopathology*, 105: 441-448.
- Lacey, J., Bateman, G.L., Mirocha, C.J. (1999): Effects of infection time and moisture on development of ear blight and deoxynivalenol production by *Fusarium* spp. in wheat. *Annals of Applied Biology*, 134: 277–283.
- Langseth, W., Bernhoft, A., Rundberget, T., Kosiak, B., Gareis, M. (1999). Mycotoxin production and cytotoxicity of *Fusarium* strains isolated from Norwegian cereals. *Mycopathologia*, 144: 103–113.
- Langseth, W., Ghebremeskel, M., Kosiak, B., Kolsaker, P., Miller, D. (2001). Production of culmorin compounds and other secondary metabolites by *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* strains isolated from Norwegian cereals. *Mycopathologia*, 152: 23–34.
- Latković, D., Marinković, B., Jaćimović, G., Crnobarac, J. (2014): Biološke i agrotehničke osnove proizvodnje kukuruza. *Biljni lekar*, 2-3: 109-125.
- Lee, J., Chang, I.Y., Kim, H., Yun, S.H., Leslie, J., Lee, Y.W. (2009): Genetic diversity and fitness of *Fusarium graminearum* populations from rice in Korea. *Applied and Environmental Microbiology*, 75: 3289–3295.
- Lee, S.H., Lee, J., Nam, Y.J., Lee, S., Ryu, J.G., Lee, T. (2010): Population Structure of *Fusarium graminearum* from maize and rice in 2009 in Korea. *Plant Pathology*, 26: 321–327.
- Lee, T., Zhang, H., Diepeningen, A., Waalwijk, C. (2015): Biogeography of *Fusarium graminearum* species complex and chemotypes. *Food Additives and*

- Contaminants, 32: 453–460.
- Lee, T., Paek, J.S., Lee, K.A., Lee, S., Choi, J.H., Ham, H., Hong, S.K., Ryu, J.G. (2016): Occurrence of Toxigenic *Fusarium vorosii* among Small Grain Cereals in Korea. *The Plant Pathology Journal*, 32: 407-413.
- Leslie, J.F., Zeller, K. A., Summerell, B. A. (2001): Icebergs and species in populations of *Fusarium*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 59: 107–117.
- Leslie, J.F., Summerell, B.A. (2006): *The Fusarium Laboratory Manual*, 1<sup>st</sup> edition. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA, 1–369.
- Lević, J. (2008): Vrste roda *Fusarium* u oblasti poljoprivrede, veterinarske i humane medicine. Cicero, Beograd, 1226.
- Lew, H., Adler, A., Thimm, N., Krska, R., Wiedner, G., Schuh, M. (2001b): Occurrence of toxigenic fungi and related mycotoxins in plants, food and feed in Austria. In: Occurrence of toxigenic fungi and mycotoxins in plants, food and feed in Europe, A. Logrieco, Ed., European Commission, Cost Action 835: 3.
- Levitin, M., Ivashchenko, V., Shipilova, N., Gagkaeva, T. (2000): *Fusarium* head blight of the cereal crops in Russia. *Plant Protection*, 51: 111-122.
- Li, W., Hu, Y.C., Chen, Y., Zhang, A.X., Chen, H.G. (2010) Phylogenetic analysis, chemotype diversity, and pathogenicity of the *Fusarium graminearum* clade in the Yangtze basin. *Mycosystema*, 29: 51–58.
- Lindblad, M., Gidlund, A., Sulyok, M., Börjesson, T., Krska, R., Olsen, M., (2013). Deoxynivalenol and other selected *Fusarium* toxins in Swedish wheat—Occurrence and correlation to specific *Fusarium* species. *International Journal of Food Microbiology*, 167: 284–291.
- Ljubojević, D., Jakšić, S., Zivkov-Balos, M., Mihaljev, Z., Puvaca, N., Prica, N., Kapetanov, M. (2014): Presence of aflatoxins, zearalenone, ocratoxin a and trichotecenes in corn in republic of Serbia. In XVI International Symposium Feed Technology, Novi Sad, Serbia, 193-197.
- Logrieco, A., Moretti A., Ritieni, A., Bottalico, A., Corda P. (1995): Occurrence and Toxigenicity of *F. proliferatum* from Preharvest Maize Ear Rot and Associated

- Mycotoxins in Italy. *Plant Disease*, 79: 727-723.
- Logrieco, A., Mule, G., Moretti, A., Bottalico, A. (2002): Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. In: *Mycotoxins in Plant Disease* (A. Logrieco, J.A. Bailey, L. Corazza, B.M. Cooke eds.). *European Journal of Plant Pathology*, 108:597–609. Kluwer Academic Publishers.
- Logrieco, A., Bottalico, A., Mule, G., Moretti, A., Perrone, G. (2003): Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 645-667.
- Lončarević, A., Penčić, V., Smiljaković, H., Gotovčić, S. (1972): Mikotoksikoza svinja prouzrokovana gljivicama roda *Fusarium*. *Dokum. tehno. teh. polj.* 9-10: 1-7.
- Maier, F.J., Oettler, G. (1996): Genetic variation for head blight resistance in triticale caused by *Fusarium graminearum* isolates of different deoxynivalenol production. *Euphytica*, 89: 387-397.
- Malbrán, I., Mourellos, C.A., Girotti, J.R., Balatti, P.A., Lori, G.A. (2014): Toxigenic capacity and trichothecene production by *Fusarium graminearum* isolates from Argentina and their relationship with aggressiveness and fungal expansion in the wheat spike. *Phytopathology*, 104:357–364.
- Malihipour, A., Gilbert, J., Piercey-Normore, M., Cloutier, S. (2012): Molecular phylogenetic analysis, trichothecene chemotype patterns, and variation in aggressiveness of *Fusarium* isolates causing head blight in wheat. *Plant Disease*, 96: 1016–1025.
- Marasas, W.F.O., Nelson, P.E., Toussoun, T.A. (1984): Toxigenic *Fusarium* species. Identity and Mycotoxicology. The Pennsylvania State University Press University Park and London, 1-328.
- Marinković, B., Crnobarac, J., Latković, D., Jaćimović, G. (2012): Tehnologijom gajenja NS hibrida kukuruza do optimalnih i/ili rekordnih prinosa. 46. savetovanje agronoma Srbije, Zlatibor, 29.01-04.02.2012., Institut za ratarstvo i povrtarstvo Novi Sad, Zbornik referata, 239-255.
- Mašić, Z., Sinovec, Z., Živkov-Baloš, M., Đilas, S., Mihaljev, Ž. (2002): Stočna hrana

- kao faktor poremećaja zdravlja svinja. XIV savetovanje veterinara Srbije, 33-45.
- Mateo, J.J., Llorens, A., Mateo, R., Jimenez, M. (2001): Critical study of and improvements in chromatographic methods for the analysis of type B trichothecenes. *Journal of Chromatography A*, 918: 99–112.
- McDonald, B.A. (1997): The population genetic of fungi: tools and techniques. *Phytopathology*, 87: 445–453.
- McKnight, T., Hart, J. (1966): „Some field observations on crown rot disease of wheat caused by *Fusarium graminearum*“, *Queensland Journal of Agricultural and Animal Science*, 23:373-378.
- Messiaen, C.M., Cassini, R. (1968): Recherches sur les fusarioses. IV. La systematique des *Fusarium*. *Ann. Epiphyt*, 19: 387-454.
- Mesterházy, A. (1989): Progress in breeding of wheat and corn genotypes not susceptible to infection by *Fusaria*. In: *Fusarium, mycotoxins, taxonomy and pathogenicity*. Ed.: Chelkowski, J. Elsevier, Amsterdam, 357-386.
- Mesterházy, A., Bartók, T., Mirocha, C.G., Komoróczy, R. (1999): Nature of wheat resistance to *Fusarium* head blight and the role of deoxynivalenol for breeding. *Plant breeding*, 188: 97-110.
- Mesterházy, A., Bartók, T., Kászonyi, G., Varga, M., Tóth, B., Varga, J. (2005): Common resistance to different *Fusarium* spp. Causing *Fusarium* head blight in wheat. *European Journal of Plant Pathology*, 112: 267-281.
- Milosavljević, Z., Gvozdić, Lj., Jakšić, K. (2010): Bilten, Poljoprivredna Stručna Služba Kosovska Mitrovica, 4.
- Miller, D.J., Trenholm, L.H. (1994): *Mycotoxins in Grain: Compounds Other than Aflatoxin*. Eagan Press, St. Paul, USA.
- Mirocha, C.J., Pathre, S.V., Christensen, C.M. (1977): Chemistry of *Fusarium* and *Stachybotrys* mycotoxins. *Mycotoxic Fungi, Mycotoxins, Mycotoxicoses*, New York, 365-420.
- Monds, R.D., Cromey, M.G., Lauren, D.R., Marshall, J. (2005): *Fusarium graminearum*, *F. cortaderiae* and *F. pseudograminearum* in New Zealand:

- Molecular phylogenetic analysis, mycotoxin chemotypes and co-existence of species. *Mycological Research*, 109: 410–420.
- Moretti, A., Logrieco, A., Visconti, A., Bottalico, A. (2002): An Overview of Mycotoxins and Toxigenic Fungi in Italy. In: An Overview on Toxigenic Fungi and Mycotoxins in Europe (A. Logrieco and A. Visconti eds). Kluwer Academic Publishers, London, 141-160.
- Morrissey, R., Vesonder, R.F. (1985): Effect of deoxynivalenol (vomitoxin) on fertility, pregnancy, and postnatal development of Sprague-Dawley rats. *Applied and Environmental Microbiology*, 49: 1062-1066.
- Mulé, G., Logrieco, A., Altomare, C., Perrone, G., Bottalico, A. (1998): Trichothecene-producing *Fusarium* species systematics & biodiversity. *Bull. Inst. Compr.Agr.Sci.Kinki Univ.* 6: 23-29.
- Muntañola-Cvetković, M. (1987): Opšta mikologija. NIRO Književne novine, Beograd.
- Nedělník, J., Lindušková, H., Kmoč, M. (2012): Influence of Growing Bt maize on *Fusarium* Infection and Mycotoxins Content – a Review. *Plant Protection*, 48: 18-24.
- Nelson, P.E., Toussoun, T.A., Marasas, W.F.O. (1983): *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. The Pennsylvania State Univ., Press, University Park.
- Nielsen, L.K., Jensen, J.D., Rodríguez, A., Jørgensen, L.N., Justesen, A.F. (2012). TRI12 based quantitative real-time PCR assays reveal the distribution of trichothecene genotypes of *F. graminearum* and *F. culmorum* isolates in Danish small grain cereals. *International Journal of Food Microbiology*, 157: 384–392.
- Nirenberg, H.I., O'Donnell, K. (1998): New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*, 90: 434–458.
- Nganje, W.E., Johnson, D.D., Wilson, W.W., Leistritz, F.L., Bangsund, D.A., Tiapo, N.M. (2001): Economic Impacts of *Fusarium* Head Blight in Wheat and Barley: 1998–2000. In Proceedings of Agribusiness and Applied Economics Report, North Dakota State University, Fargo, ND, USA, 1–41.
- Nganje, W.E., Bangsund, D.A., Leistritz, F.L., Wilson, W.W., Tiapo, N.M. (2002):

- Estimating the Economic Impact of a Crop Disease: The Case of *Fusarium* Head Blight in U.S. Wheat and Barley. In National *Fusarium* Head Blight Forum Proceedings, USA, 275–281.
- Novković, N., Mutavdžić, B. (2010) Konkurentnost poljoprivrede Vojvodine, Invited paper, DETUROPE, „Central European Journal of Regional Development and Tourism“, 2: 5–30.
- O’Donnell, K., Cigelnik, E. (1997): Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 7: 103–116.
- O’Donnell, K., Cigelnik, E., Nirenberg, H.I. (1998): Molecular Systematics and Phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* Species Complex. *Mycologia*, 90: 465–493.
- O’Donnell, K., Kistler, H.C., Tacke, B.K., Casper, H.H. (2000): Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*,97: 7905-7910.
- O’Donnell, K., Ward, T.J., Geiser, D.M., Kistler, H.C, Aoki, T. (2004): Genealogical concordance between mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade. *Fungal Genetics Biology*, 41: 600-623.
- O’Donnell, K., Ward, T.J., Abera, D., Kistler, H.C., Aoki, T., Orwing, N., Kimura, M., Bjornstad, A., Klemsdal, S.S. (2008): Multilocus genotyping and molecular phylogenetics resolve a novel head blight pathogen within the *Fusarium graminearum* species complex from Ethiopia. *Fungal Genetics Biology*, 45: 1514-1522.
- Ostrý, V., Ruprich, J. (2001) Fumonisin in corn-based products and *Fusarium* occurrence in wheat grains in the Czech Republic. In: Occurrence of toxigenic fungi, European Commission, Cost Action, 835: 25-36.
- Ožegović, L., Pepeljnjak S., (1995): Mikotoksikoze. Školska knjiga, Zagreb, 1-258.

- Parry, D.W., Jenkinson, P., McLeod, L. (1995): Fusarium ear blight (scab) in small cereals– a review. *Plant Pathology*, 44: 207-238.
- Pasquali, M., Giraud, F., Brochot, C., Cocco, E., Hoffmann, L., Bohn, T. (2010): Genetic *Fusarium* chemotyping as a useful tool for predicting nivalenol contamination in winter wheat. *International Journal Food Microbiology.*, 137, 246–253.
- Pena, R.J. (2007): Current and future trends of wheat quality needs. In: Buck, H.T., Nisi, J.E., Salomon, N. (Eds.). *Wheat production in stressed environments*. Springer, 411-424.
- Perišić, M. (1953): *Fusarium graminearum* Schw.- parazit pšenice u Sloveniji. *Zaštita bilja*, 75: 527-531.
- Prodi, A., Tonti, S., Nipoti, P., Pancaldi, D., Pisi, A. (2009): Identification of deoxynivalenol and nivalenol producing chemotypes of *Fusarium graminearum* isolates from durum wheat in a restricted area of northern Italy. *Journal of Plant Pathology* 91:727–731.
- Prodi, A., Purahong, W., Tonti, S., Salomoni, D., Nipoti, P., Covarelli, L., Pisi, A. (2011): Difference in chemotype composition of *Fusarium graminearum* populations isolated from durum wheat in adjacent areas separated by the Apennines in NorthernCentral Italy. *Journal of Plant Pathology*, 27:354–359.
- Puri, D.K., Zhong, S. (2010): The 3ADON Population of *Fusarium graminearum* Found in North Dakota Is More Aggressive and Produces a Higher Level of DON than the Prevalent 15ADON Population in Spring Wheat. *The American Phytopathological Society*, 100: 1007-1014.
- Qu, B., Li, H.P., Zhang, J.B., Xu, Y.B., Huang, T., Wu, A.B., Zhao, C.S., Carter, J., Nicholson, P., Liao, Y.C. (2008): Geographic distribution and genetic diversity of *Fusarium graminearum* and *F. asiaticum* on wheat spikes throughout China. *Plant Pathology*, 57: 15-24.
- Ramirez, M.L., Reynoso, M.M., Farnochi, M.C., Torres, A.M., Leslie, J.F., Chulze, S.N. (2007): Population genetic structure of *Gibberella zeae* isolated from wheat in Argentina. *Food Additives and Contaminants*, 24: 1115–1120.

- Reid, L.M., Hamilton, R.I., Mather, D.E. (1996): Screening Maize for Resistance to Gibberella Ear Rot. Research Branch Agriculture and Agri-Food Canada, Technical Bulletin 5E.
- Reynoso, M.M., Ramirez, M.L., Torres, A.M., Chulze, S.N. (2011): Trichothecene genotypes and chemotypes in *Fusarium graminearum* strains isolated from wheat in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 145, 444–448.
- Sampietro, D.A., Marín, P., Iglesias, J., Presello, D.A., Vattuone, M.A., Catalan, C.A. (2010): A molecular based strategy for rapid diagnosis of toxigenic *Fusarium* species associated to cereal grains from Argentina. *Fungal Biology*, 114: 74–81.
- Sampietro, D.A., Díaz, C.G., Gonzalez, V., Vattuone, M.A., Ploper, L.D., Catalan, C.A., Ward, T.J. (2011): Species diversity and toxigenic potential of *Fusarium graminearum* complex isolates from maize fields in northwest Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 145: 359–364.
- Sampietro, D.A., Ficoseco, M.E., Jimenez, C.M., Vattuone, M.A., and Catalan, C.A. (2012): Trichothecene genotypes and chemotypes in *Fusarium graminearum* complex strains isolated from maize fields of northwest Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 153, 229–233.
- Samuels, G.J., Nirenberg, H.I., Seifert, K.A. (2001): Perithecial species of *Fusarium*. In: Summerell, B. A., Leslie, J. F., Backhouse, D., Bryden, W. L., Burgess, L. W. (eds). *Fusarium: Paul E. Nelson memorial symposium*. St. Paul, Minnesota: APS Press, 1–14.
- Sarver, B.A.J., Ward, T.J., Gale, L.R., Broz, K., Kistler, H.C., Aoki, T., Nicholson, P., Carter, J., O'Donnell, K. (2011): Novel *Fusarium* head blight pathogens from Nepal and Louisiana revealed by multilocus genealogical concordance. *Fungal Genetics and Biology*, 48: 1096–1107.
- Schmale, D.G., Wood-Jones, A.K., Cowger, C., Bergstrom, G.C., Arellano, C. (2011): Trichothecene genotypes of *Gibberella zeae* from winter wheat fields in the eastern USA. *Plant Pathology*, 60: 909–917.
- Scudamore, K.A. (2005): Principles and applications of mycotoxin analysis. The mycotoxin blue book, Edited by Duarte D, Nottingham University Press. United



Kingdom.

- SCOOP (1996): Scientific co-operation on questions relating to food: Working document in support of a SCF risk assessment of aflatoxin: Task 3.2.1 (SCOOP/CNTM/1). Task Co-ordinator, UK.
- Scoz, L.B., Astolfi, P., Reartes, D.S., Schmale, D.G., Moraes, M.G., Del Ponte, E.M. (2009): Trichothecene mycotoxin genotypes of *Fusarium graminearum sensu stricto* and *Fusarium meridionale* in wheat from Southern Brazil. *Plant Pathology*, 58: 344–351.
- Seifert, K. A. (1995): Notes on the typification of *Gibberella zeae*. *Sydowia*, 48: 83–89.
- Seifert, K.A., Lévesque, C.A. (2004): Phylogeny and molecular diagnosis of mycotoxigenic fungi. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 449–471.
- Sinovec, Z., Resanović, R., Sinovec, S. (2006): Mikotoksini pojava, efekti i prevencija. Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu. *Caligraph Beograd*, 9-179.
- Snyder, W.C., Hansen, H.N. (1945): The species concept in *Fusarium* with reference to *Discolor* and other sections. *American Journal of Botany*, 32: 657-666.
- Somma, S., Petruzzella, A.L., Logrieco, A.F., Meca, G., Cacciola, O.S., Moretti, A. (2014): Phylogenetic analyses of *Fusarium graminearum* strains from cereals in Italy, and characterisation of their molecular and chemical chemotypes. *Crop and Pasture Science*, 65:52–60.
- Stanković S., Krnjaja, V., Cvijanović, G., Stanković G. (2007): Zaštita uskladištenog kukuruza od patogenih vrsta gljiva. *Multifunkcionalna poljoprivreda i ruralni razvoj. Tematski zbornik, knjiga 2*:1204-1212.
- Stanković, S., Lević, J., Krnjaja, V., Bočarov-Stančić, A., Tančić, S., Kovačević, T. (2007a): Frequency of toxigenic *Fusarium* species and fusariotoxins in wheat grain in Serbia. *Matica Srpska Proceedings for Natural Sciences, Novi Sad*, 113: 93-102.
- Stanković, S., Lević, J., Petrović, T., Logrieco, A., Moretti, A. (2007b): Pathogenicity and mycotoxin production by *Fusarium proliferatum* isolated from onion and

- garlic in Serbia. *European Journal of Plant Pathology*, 118: 165-172.
- Stanković, S., Lević, J., Krnjaja, V., Bočarov-Stančić, A., Tančić, S., Kovačević, T. (2007c): Frequency of Toxigenic *Fusarium* Species and Fusariotoxins in Wheat Grain in Serbia. In: *Matica Srpska Proceedings for Natural Sciences*, Novi Sad, 113: 93-102.
- Stanković, S., Tančić, S., Lević, J., Krnjaja, V. (2008): Production of deoxinivalenol by *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* isolated from wheat kernels in Serbia. *Cereal Research Communications*, 36: 395-396.
- Stanković, S., Lević, J., Krnjaja, V., Dodik, D., Stanković, G., Ivanović, D., Kandić, V. (2010): Kontaminacija zrna ječma fumonizinom B<sub>1</sub> i deoksinivalenolom u Srbiji. X Savetovanje o zaštiti bilja. 29.11. – 3.12.2011. godine Zlatibor, Zbornik apstrakata, 120.
- Stanković, S., Lević, J., Ivanović, D., Krnjaja, V., Stanković, G., Tančić, S. (2012): Fumonisin B<sub>1</sub> and its co-occurrence with other fusariotoxins in naturally-contaminated wheat grain. *Food Control* 23: 384-388.
- Starkey, D.E., Ward, T.J., Aoki, T., Gale, L.R., Kistler, H.C., Geiser, D.M., Suga, H., Toth, B., Varga, J., O'Donnell, K. (2007): Global molecular surveillance reveals novel *Fusarium* head blight species and trichotecene toxin diversity. *Fungal Genetics Biology*, 44: 1191-1204.
- Stepanić, A., Stanković, S., Lević, J., Ivanović, M., Krnjaja, V. (2011): Fusariotoxins in Wheat Grain in Serbia. *Pesticidi i fitomedicina*, 26: 317 - 323.
- Stępień, Ł., Popiel, D., Koczyk, G., Chelkowski, J. (2008): Wheat-infecting *Fusarium* species in Poland—their chemotypes and frequencies revealed by PCR assay. *Journal of Applied Genetics*, 49: 433–441.
- Suga, H., Karugia, G.W., Ward, T., Gale, L.R., Tomimura, K., Nakajima, T., Miyasaka, A., Koizumi, S., Kageyama, K., Hyakumachi, M. (2008): Molecular characterization of the *Fusarium graminearum* species complex in Japan. *Phytopathology*, 98: 159–166.
- Summerell, B.A., Salleh, B., Leslie, J.F. (2003): A utilitarian approach to *Fusarium*

- identification. *Plant Disease*, 87: 117–128.
- Sutton, J.C. (1982): Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 4: 195-209.
- Szuets, P., Mesterhazy, A., Falkay, G.Y., Rartok, T. (1997): Early telarche symptoms in children and their relations to zearalenon contamination in food-stuffs. *Cereal Research Communications*, 25: 429-436.
- Šrobarova, A., Kollerova, E., Bacigalova, K. (1997): The variability of *Fusarium graminearum* Schwabe. *Cereal Research Communications*, 25: 619-620.
- Talas, F., Parzies, H.K., Miedaner, T. (2011): Diversity in genetic structure and chemotype composition of *Fusarium graminearum sensu stricto* populations causing wheat head blight in individual fields in Germany. *European Journal Plant Pathology*, 1: 39–48.
- 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: 2731–2739.
- Tan, D.C., Flematti, G.R., Ghisalberti, E.L., Sivasithamparam, K., Chakraborty, S., Obanor, F., Jayasena, K., Barbetti, M.J. (2012): Mycotoxins produced by *Fusarium* spp. associated with Fusarium head blight of wheat in Western Australia. *Mycotoxin Research*, 28:89–96.
- Tančić, S. (2009): Varijabilnost toksigenih vrsta roda *Fusarium* i fuzariotoksina u različitim agroekološkim uslovima uzgajanja kukuruza i pšenice. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, 1–119.
- Tančić, S., Staanković, S., Lević, J. (2009): Varijabilnost patogenih svojstava *Fusarium* spp. poreklom iz zrna kukuruza i pšenice. *Pesticidi i fitomedicina*, 24: 259–269.
- Tančić, S., Staanković, S., Lević, J., Krnjaja, V. (2015): Correlation of deoxynivalenol and zearalenone production by *Fusarium* species originating from wheat and maize grain. *Pesticidi i fitomedicina*, 30: 99–105.
- Taylor, J.W., Jacobson, D.J., Kroken, S., Kasuga, T., Geiser, D.M., Hibbett, D.S.,

- Fisher, M. C. (2000): Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 31: 21–32.
- Teich, A.H. (1989): Epidemiology of wheat (*Triticum aestivum* L.) scab caused by *Fusarium* spp. In *Fusarium, Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity: Topics in Secondary Metabolites*, Elsevier, 269-282.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994): CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673-4680.
- Toit, L.J., Kirby, H.W. Pedersen, W.L. (1997): Evaluation of an aeroponics system to screen maize genotypes for resistance to *Fusarium graminearum* seedling blight. *Plant Disease*, 81: 175-179.
- Tomczak, M., Wisniewska, H., Stepien, L., Kostecki, M., Chelkowski, J., Golinski, P. (2002): Deoxynivalenol, Nivalenol and Moniliformin in Wheat Samples with Head Blight (Scab) Symptoms in Poland (1998-2000). In: *Mycotoxins in Plant Disease* (A. Logrieco, J.A. Bailey, L. Corazza, B.M. Cooke eds). *European Journal of Plant Pathology*, 108: 625-630. Kluwer Academic Publishers.
- Toth, B., Mesterhazy, A., Horvath, Z., Bartok, T., Varga, M., Varga, J. (2005). Genetic variability of central European isolates of the *Fusarium graminearum* species complex. *European Journal of Plant Pathology*, 113: 35–45.
- Ueno, Y. (1983): *Trichotecens: Chemical, Biological and Toxicological Aspects*. Kondansha LTD, Tokyo, Japan.
- Uhlig, S., Eriksen, G.S., Hofgaard, I.S., Krska, R., Beltrán, E., Sulyok, M. (2013). Faces of a changing climate: semiquantitative multi-mycotoxin analysis of grain grown in exceptional climatic conditions in Norway. *Toxins*, 5: 1682–1697.
- Ullrich, S.E. (2011): Significance, Adaptation, Production and Trade of Barley. Book chapter in *Barley Production, Improvement and Uses*, Edited by Steven E., Blackwell Publishing Ltd, 3-14.
- Umpiérrez, F.M., Garmendia, G., Pereyra, S., Rodríguez, H.A., Ward, T.J., Vero, S.

- (2013): Regional differences in species composition and toxigenic potential among *Fusarium* head blight isolates from Uruguay indicate a risk of nivalenol contamination in new wheat production areas. *International Journal of Food Microbiology*, 166:135–140.
- Varga, J., Toth, B., Mesterhazy, A., Teren, J., Fazekas, B. (2002): Mycotoxigenic fungi and mycotoxins in foods and feeds in Hungary. In: *An Overview on Toxigenic Fungi and Mycotoxins in Europe* (A. Logrieco and A. Visconti eds.) Kluwer Academic Publishers, London, 123-139.
- Von der Ohe, C., Gauthier, V., Tamburic-Ilincic, L., Brule-Babel, A., Fernando, W., Clear, R. (2010): A comparison of aggressiveness and deoxynivalenol production between Canadian *Fusarium graminearum* isolates with 3-acetyl and 15-acetyldeoxynivalenol chemotypes in field-grown spring wheat. *European Journal of Plant Pathology*, 407–417.
- Waalwijk, C., Kastelein, P., de Vries, I., Kerényi, Z., van der Lee, T., Hesselink, T., Köhl, J., Kema, G. (2003): Major changes in *Fusarium* spp. in wheat in the Netherlands. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 743–754.
- Waalwijk, C., de Vries, P.M., Köhl, J., Xu, X., van der Lee, T.A.J., Kema, G.H.J. (2008): Development of quantitative detection methods for *Fusarium* in cereals and their application. In: Leslie J, Bandyopadhyay R, Visconti A, editors. *Mycotoxins: detection methods, management, public health and agricultural trade*. Wallingford: CAB International, 195–205.
- Wagacha, J.M., Steiner, U., Dehne, H.W., Zuehlke, S., Spiteller, M., Muthomi, J., Oerke, E.C. (2010): Diversity in mycotoxins and fungal species infecting wheat in Nakuru District, Kenya. *Journal of Phytopathology*, 158:527–535.
- Wang, Y.Z. (1997): Epidemiology and management of wheat scab in China In H.J. Dubin, L. Gilchrist, J. Reeves & A. McNab, eds. *Fusarium* head scab: global status and future prospects. Mexico, DF, CIMMYT.
- Ward, T.J., Bielawski, J.P., Kistler, H.C., Sullivan, E., O'Donnell, K. (2002): Ancestral polymorphism and adaptive evolution in the trichothecene mycotoxin gene cluster of phytopathogenic *Fusarium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*

- of the United States of America, 99: 9278–9283.
- Ward, T.J., Clear, R.M., Rooney, A.P., O'Donnell, K., Gaba, D., Patrick, S., Starkey, D.E., Gilbert, J., Geiser, D.M., Nowicki, T.W. (2008): An adaptive evolutionary shift in *Fusarium* head blight pathogen populations is driving the rapid spread of more toxigenic *Fusarium graminearum* in North America. *Fungal Genetics and Biology*, 45, 473–484.
- Wegulo, S.N. (2012): Factors influencing deoxynivalenol accumulation in small grain cereals. *Toxins*, 4: 1157-1180.
- Wiese, M.V. (1987): Compendium of wheat diseases. APS Press, The American Phytopathological Society, second edition, 16-18.
- Windels, C. E. (2000): Economic and social impacts of *Fusarium* head blight: Changing farms and rural communities in the northern Great Plains. *Phytopathology*, 90: 17–21.
- Wollenweber, H.W. (1931): *Fusarium*-Monographie. Fungi parasitici et saprophytici. *Z. Parasitenkd.* 3: 269–516.
- Wollenweber, H.W., Reinking, O.A. (1935): Die Fusarien, ihre Beschreibung, Schadwirkung und Bekämpfung. Berlin: Paul Parey, 355.
- Wyatt, D.R. (2005): Mycotoxin interactions. U: The Mycotoxin Blue Book (Ed.: Diaz, D. E.) Nottingham University Press, United Kingdom, 269-278.
- Yli-Mattila, T., Paavanen-Huhtala, S., Parikka, P., Konstantinova, P., Gagkaeva, T., Eskola, M., Rizzo, A. (2002): Occurrence of *Fusarium* fungi and their toxins in Finnish cereals in 1998 and 2000. *Journal of Applied Genetics* 43A:207-214.
- Yli-Mattila, T., Gagkaeva, T., Ward, T.J., Aoki, T., Kistler, H.C., O'Donnell, K. (2009): A novel Asian clade within the *Fusarium graminearum* species complex includes a newly discovered cereal head blight pathogen from the Russian Far East. *Mycologia*, 101, 841–852.
- Yue, Y.T., Zhang, F.X., Yang, H.M., Yang, O.Z., Liu, B.H. (2010): Simultaneous Determination of Deoxynivalenol and Nivalenol in Traditional Chinese Medicine by SPE and LC. *Chromatographia*, 72:551-555.

- Zeller, K.A., Summerell, B.A., Bullock, S., Leslie, J.F. (2003): *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium konzum*) sp. nov. from prairie grasses, a new species in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*, 95: 943–954.
- Zhang, J.B., Li, H.P., Dang, F.J., Qu, B., Xu, Y.B. (2007): Determination of the trichothecene mycotoxin chemotypes and associated geographical distribution and phylogenetic species of the *Fusarium graminearum* clade from China. *Mycological Research*, 111: 967–975.
- Zhang, H., Zhang, Z., van der Lee, T., Chen, W.Q., Xu, J. (2010): Population Genetic Analyses of *Fusarium asiaticum* Populations from Barley Suggest a Recent Shift Favoring 3ADON Producers in Southern China. *Phytopathology*, 100: 328–336.
- Zhang, H., van der Lee, T., Waalwijk, C., Chen, W., Xu, J., Zhang, Y., Feng, J. (2012): Population analysis of the *Fusarium graminearum* species complex from wheat in China show a shift to more aggressive isolates. *Plos One*, 7: e31722.

## BIOGRAFIJA

Ana Obradović rođena je 19. 11. 1986. u Loznici. Osnovnu školu i gimnaziju Vuk Karadžić završila je u Loznici. Poljoprivredni fakultet, Odsek za zaštitu bilja i prehrambenih proizvoda, Univerziteta u Beogradu završila je 2010. godine sa prosečnom ocenom 9,21 i ocenom 10 iz diplomskog rada.

Doktorske studije na istom fakultetu, smer Poljoprivredne nauke modul: Fitomedicina upisala je školske 2010./2011. godine. Od februara 2011. godine radi u Institutu za kukuruz „Zemun Polje“ na mestu mlađeg istraživača u Laboratoriji za fitopatologiju i entomologiju.

Od februara 2010. godine angažovana je na realizaciji projekta „Redukcija toksigenih gljiva roda *Fusarium* i njihovih mikotoksina u proizvodnji zdravstveno bezbedne hrane na bazi žita”, TR31023, koje finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Do sada je objavila i saopštila 28 naučnih radova, od čega je pet objavljeno u međunarodnim časopisima, četiri u nacionalnim časopisima, a 19 je saopšteno na međunarodnim i domaćim skupovima. Član je Društva za zaštitu bilja Srbije.



## Izjava o autorstvu

Potpisana **Ana Obradović**

Broj indeksa **10/32**

### Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom:

**„Diverzitet kompleksa vrste *Fusarium graminearum* patogena strnih žita i kukuruza u Srbiji“**

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena doktorska disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica.

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

# Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorske disertacije

Ime i prezime autora: **Ana Obradović**

Broj indeksa: **10/32**

Studijski program: **Poljoprivredne nauke, Fitomedicina**

Naslov doktorske disertacije:

**„Diverzitet kompleksa vrste *Fusarium graminearum* patogena strnih žita i kukuruza u Srbiji“**

Mentor **prof. dr Goran Delibašić, redovni profesor**

Drugi mentor **dr Slavica Stanković, naučni savetnik**

Potpisana **Ana Obradović**

Izjavljujem da je štampana verzija moje doktorske disertacije istovetna elektronskoj verziji koju sam predao za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

**„Diverzitet kompleksa vrste *Fusarium graminearum* patogena strnih žita i kukuruza u Srbiji“**

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
- 3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade**
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na kraju).

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_