



UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET

**POTENCIJAL BIOSINTEZE AFLATOKSINA B₁ U
RAZLIČITIM VRSTAMA *Triticum* spp.**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor:

Prof. dr Siniša Markov

Kandidat:

MSc Jelena Krulj

Novi Sad, 2018.

Zahvalnica

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	2
2. PREGLED LITERATURE	4
2.1. PLESNI I MIKOTOKSINI – KONTAMINENTI HRANE	4
2.2. PLESNI RODA <i>Aspergillus</i>	6
2.2.1. Značaj i sistematika roda <i>Aspergillus</i>	6
2.2.2. Identifikacija <i>Aspergillus</i> vrsta	7
2.2.3. Aflatoksigene vrste roda <i>Aspergillus</i>	11
2.3. AFLATOKSINI.....	13
2.3.1. Biosinteza aflatoksina	13
2.3.2. Genetski i molekularni aspekti biosinteze aflatoksina.....	15
2.3.3. Uticaj abiotičkih i biotičkih faktora na rast plesni i biosintezu aflatoksina	17
2.3.4. Zdravstveni aspekt	21
2.3.5. Procena izloženosti populacije aflatoksinu B ₁ i zakonske regulative	23
2.4. <i>Triticum</i> spp.- ZNAČAJ STARIH I NOVIH VRSTA	25
2.5. UTICAJ PLESNI I MIKOTOKSINA NA PROMETNI I TEHNOLOŠKI KVALITET <i>Triticum</i> spp.....	32
2.6. POJAVA I UČESTALOST <i>A. flavus</i> I AFLATOKSINA U RAZLIČITIM <i>Triticum</i> spp.....	34
2.7. KLIMATSKE PROMENE – PROCENA RIZIKA POJAVE <i>A. flavus</i> I AFB ₁ U RAZLIČITIM VRSTAMA <i>Triticum</i> spp.	37
3. MATERIJAL I METODE	41
3.1. MATERIJAL	41
3.1.1. Ispitivani uzorci	41
3.1.2. Podloge za kultivaciju plesni	41
3.1.3. Hemikalije.....	42
3.2. MIKOLOŠKA ISPITIVANJA	43
3.2.1. Određivanje učestalosti i intenziteta pojave plesni na hlebnoj pšenici i spelti	43
3.2.2. Izolovanje i dobijanje monospornih izolata <i>A. flavus</i>	43

3.3.3. Identifikacija <i>A. flavus</i> na osnovu morfoloških osobina.....	44
3.3. MOLEKULARNA IDENTIFIKACIJA <i>A. flavus</i>	44
3.3.1. Ekstrakcija DNK.....	45
3.3.2. Lančana reakcija polimeraze (PCR)	46
3.3.3. Digestija PCR produkata restrikcionim enzimima.....	47
3.3.4. Vizuelizacija i analiza produkata PCR reakcije.....	48
3.3.5. Prečišćavanje PCR produkata	49
3.3.6. Analiza sekvenci i identifikacija BLAST metodom	50
3.4. ISPITIVANJE TOKSIGENOG POTENCIJALA IZOLATA <i>A. flavus</i>	50
3.4.1. Kvalitativna procedura skrininga za biosintezu AFB ₁ - TLC analiza.....	50
3.4.2. Kvantitativna potvrda biosinteze AFB ₁ - HPLC analiza	51
3.5. INOKULACIJA ODABRANIH VRSTA <i>Triticum</i> spp. SA <i>A. flavus</i> U POLJSKIM USLOVIMA	51
3.5.1. Određivanje ukupnog broja plesni	54
3.5.2. Određivanje sadržaja AFB ₁ primenom HPLC-FLD tehnike sa postkolonskom derivatizacijom.....	55
3.5.2.1. Priprema uzoraka.....	55
3.5.2.2. Ekstrakcija i prečišćavanje AFB ₁	55
3.5.2.3. Uslovi hromatografije	55
3.5.3. Određivanje fizičko-hemijskih karakteristika plevičastih omotača zrna <i>Triticum</i> spp.	56
3.5.3.1. Analiza strukture plevičastih omotača <i>Triticum</i> vrsta skenirajućom elektronskom mikroskopijom.....	56
3.5.3.2. Određivanje indeksa apsorpcije vode (WAI)	57
3.5.3.3. Sadržaj ukupnih (rastvorljivih i nerastvorljivih) prehrambenih vlakana	57
3.6. ISPITIVANJE UTICAJA USLOVA SKLADIŠTENJA NA AKUMULACIJU AFB ₁	57
3.6.1. Priprema uzoraka spelte	57
3.6.2. Priprema inokuluma, postupak inokulacije i uslovi inkubiranja	58
3.7. METODE OCENE PROMETNOG I TEHNOLOŠKOG KVALITETA KONTAMINIRANIH UZORAKA SPELTE.....	59
3.8. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA I EKSPERIMENTALNI PLAN.....	60
4. REZULTATI I DISKUSIJA.....	62
4.1. ZASTUPLJENOST PLESNI U UZORCIMA HLEBNE PŠENICE I SPELTE.....	62

4.1.1. Agrometeorološki uslovi u proizvodnim godinama 2015, 2016. i 2017.	62
4.1.2. Učestalost i intenzitet pojave mikrobiota u uzorcima hlebne pšenice i spelte	64
4.2. IDENTIFIKACIJA <i>A. flavus</i>	71
4.2.1. Identifikacija <i>A. flavus</i> na osnovu morfoloških osobina	71
4.2.2. Molekularna identifikacija izolata <i>A. flavus</i>	74
4.3. POTENCIJAL BIOSINTEZE AFB ₁ IZOLATA <i>A. flavus</i>	79
4.4. OTPORNOST ODABRANIH <i>Triticum</i> spp. NA INFEKCIJU <i>A. flavus</i> i BIOSINTEZU AFB ₁ NAKON INOKULACIJE U POLJSKIM USLOVIMA	81
4.4.1. Agrometeorološki uslovi tokom proizvodne 2016. godine.....	81
4.4.2. Intenzitet pojave plesni u kontrolnim uzorcima <i>Triticum</i> spp.	82
4.4.3. Ukupan broj i intenzitet pojave <i>A. flavus</i> na zrnju različitih <i>Triticum</i> vrsta nakon inokulacije.....	83
4.4.4. Sadržaj AFB ₁ u zrnju i plevičastim omotačima <i>Triticum</i> spp.....	85
4.4.5. Fizičko-hemijska svojstva plevičastih omotača zrna <i>Triticum</i> vrsta	88
4.5. UTICAJ USLOVA SKLADIŠTENJA NA AKUMULACIJU AFB ₁ U OLJUŠTENIM ZRNIMA SPELTE I ZRNIMA SA PLEVIČASTIM OMOTAČEM	91
4.5.1. Matematički i statistički modeli.....	95
4.5.1.1. Matematički modeli u obliku polinoma drugog reda (eng. <i>second order</i> <i>polynomial</i> - SOP).....	96
4.5.1.2. Model neuronske mreže	97
4.5.1.3. Analiza osetljivosti ANN modela	97
4.6. UTICAJ KONTAMINACIJE SPELTE AFLATOKSINOM B ₁ NA ODABRANE PARAMETRE PROMETNOG I TEHNOLOŠKOG KVALITETA	99
5. ZAKLJUČAK	103
6. LITERATURA	105
7. PRILOZI	127

1.UVOD

Zdravstveno bezbedna hrana, hrana bez bioloških, fizičkih i hemijskih kontaminenata u nedozvoljenim količinama jedan je od najvažnijih zahteva koji su proistekli iz kvaliteta života savremenog društva. Mikotoksini kao produkti sekundarnog metabolizma saprotrofnih plesni jedni su od najpoznatijih i najučestalijih (bio)hemijskih kontaminenata hrane. Neke vrste plesni iz roda *Aspergillus* sintetišu aflatoksine koje je Internacionalna agencija za izučavanje raka (IARC, 1993) svrstala u prvu grupu kancerogenih jedinjenja, među kojima je po svojoj toksičnosti i učestalosti pojave najznačajniji aflatoksin B₁ (AFB₁). S obzirom na globalni značaj prisustva AFB₁ u hrani, kako sa aspekta bezbednosti hrane, tako i sa aspekta globalne trgovine, prisustvo *A. flavus* i AFB₁ bi trebalo posmatrati kao značajan deo sistema kontrole u primarnoj proizvodnji hrane i prehrambenoj industriji.

Pšenica, kao i proizvodi od pšenice namenjeni humanoj i animalnoj ishrani često podležu infekciji plesnima, te i mogućnosti kontaminacije različitim mikotoksinima. Iako *Fusarium* vrste i njihovi toksini predstavljaju najučestalije kontaminante pšenice, u poslednjih nekoliko godina i druge toksigene vrste plesni su postale važni izvori kontaminacije pšenice mikotoksinima. Topla klima favorizuje veću učestalost pojave plesni *Aspergillus flavus*, a samim tim i aflatoksina u žitima. Premda aflatoksini najčešće kontaminiraju kukuruz i proizvode od kukuruza, klimatske promene značajno utiču na promenu učestalosti i intenziteta pojave aflatoksigenih plesni na žitima. Nekoliko skorašnjih naučnih saopštenja je ukazalo na učestaliju pojavu aflatoksina u žitima u evropskim zemljama u kojima ranije nije postojao problem sa aflatoksinima. Prema ovim istraživanjima, infekcija žitarica *Aspergillus* plesnima i frekventnija kontaminacija aflatoksinima je posledica klimatskih promena, kao što su veoma topli i sušni letnji periodi. Do infekcije pšenice mikotoksigenim aspergilima može doći i nakon žetve, od sazrevanja useva do njihove upotrebe, što rezultira potencijalnom sekundarnom kontaminacijom aflatoksinima, naročito ako su procesi sušenja zrna i samog skladištenja tehnološki neadekvatni.

Pre analize uzoraka hrane na mikotoksine, važno je znati koji od mikotoksina bi mogli da budu potencijalno prisutni. S obzirom da je biosinteza mikotoksina karakteristična za određene sojeve, a saznanje koji mikotoksini će biti potencijalno prisutni može se postići tačnom i preciznom identifikacijom plesni koje su prisutne u određenim segmentima lanca ishrane. Pravilna i precizna identifikacija vrsta roda *Aspergillus* je neophodna iz razloga što je produkcija aflatoksina rizična za zdravlje ljudi i životinja, te daje doprinos preduzimanju mera u cilju sprečavanja kontaminacije. Veliki broj faktora utiče na rast plesni i sintezu toksina

među kojima su temperatura i aktivnost vode (a_w) ključni. Podaci o biotičkim i abiotičkim faktorima koji mogu uticati na produkciju toksina, a upotpunjeni informacijom o frekvenciji i intenzitetu pojave mikrobiota prisutnih u sirovinama odnosno hrani predstavljaju važan korak u predviđanju moguće kontaminacije mikotoksinima.

1.1. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Uzimajući u obzir da višegodišnja istraživanja ukazuju na sve učestaliju kontaminaciju žitarica aflatoksinima na našim prostorima, te da sistemska kontrola celokupnog procesa proizvodnje hrane i hrane za životinje postaje neophodna, ciljevi ovih istraživanja su bili:

- Određivanje intenziteta pojave i frekvencije mikrobiota uz pregled rasprostranjenosti plesni na uzorcima hlebne pšenice i spelte, prikupljenih posle žetve u regionu Vojvodine tokom tri godine (2015-2017);
- Identifikacija i karakterizacija izolata *A. flavus* primenom polifaznog pristupa koji uključuje klasične mikrobiološke i molekularne metode;
- Ispitivanje otpornosti različitih *Triticum* vrsta: hlebne pšenice (*T. aestivum* L.), spelte (*T. aestivum* ssp. *spelt* L.), korasan (*T. turgidum* ssp. *turanicum* Jakubz) i hibrida pšenice (*T. aestivum* L.– F1) na infekciju sa *A. flavus* i produkciju AFB₁ u polju;
- Određivanje fizičko-hemijskih karakteristika plevičastih omotača u cilju ispitivanja uticaja plevičastih omotača na rast i razvoj *A. flavus* i biosintezu AFB₁;
- Ispitivanje uslova skladištenja, određivanjem uticaja temperature i aktivnosti vode (a_w vrednosti) na produkciju AFB₁ nakon kontaminacije oljuštenih zrna spelte i zrna sa plevičastim omotačima sa odabranim sojem *A. flavus* u laboratorijskim uslovima radi procene efikasnosti plevičastih omotača u zaštiti zrna spelte od kontaminacije;
- Ispitivanje uticaja AFB₁ na odabrane parametare prometnog i tehnološkog kvaliteta uzoraka spelte.

Na osnovu prikazane radne hipoteze uočava se potreba za ispitivanjem interakcije plesni *A. flavus* i *Triticum* vrsta čime se daje doprinos povećanju dostupnih podataka o pojavi AFB₁ u žitaricama na teritoriji Srbije. Realizacija istraživanja je od velikog značaja u sprovođenju strategije prevencije kontaminacije hrane plesnima *A. flavus* i AFB₁, a samim tim i u smanjenju toksičnih efekata koje ovi toksini mogu da prouzrokuju. Najveći deo

eksperimentalnih istraživanja urađen je u Laboratoriji za tehnologiju, kvalitet i bezbednost hrane, Naučnog instituta za prehrambene tehnologije u Novom Sadu, zatim na oglednim parcelama Instituta za ratarstvo i povrtarstvo Novi Sad, kao i laboratorijama Tehnološkog i Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta Novi Sad.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. PLESNI I MIKOTOKSINI – KONTAMINENTI HRANE

Rast plesni na/u hrani prouzrokuje fizičke i hemijske promene usled kojih može doći do nekoliko vrsta kvarenja hrane: promene ukusa i mirisa, dekolorizacije, gubitka nutritivnog kvaliteta, prisustva toksina i patogenih ili alergijskih propagula. Filtenborg i sar. (2004) smatraju da je manje od deset vrsta plesni normalno prisutno u prehrambenim proizvodima, a da su samo jedna do tri vrste, koje dominiraju, odgovorne za kvarenje hrane. Mikotoksini su prirodna niskomolekularna jedinjenja nastala kao sekundarni metaboliti filamentoznih mikota. Ovi metaboliti predstavljaju heterogeni hemijsko-toksigeni sklop sintetisan od velikog broja biohemijski jednostavnih međuprodukata primarnog metabolizma plesni uz aktivnost različitih enzima (Frisvad, 1989). Iako su mere kontrole za sprečavanje kontaminacije hrane u velikoj meri zastupljene i sistematski se sprovode u svim fazama proizvodnje, toksigene plesni su prisutne svuda u prirodi i redovno se javljaju kao kontaminanti prehrambenih namirnica. Rast plesni i biosinteza mikotoksina se odvijaju samo pod povoljnim uslovima, koji variraju u zavisnosti od adaptivnosti pojedinih vrsta plesni. Biotički faktori u sprezi sa abiotičkim faktorima odgovorni su za širok spektar kontaminacije i dominaciju mikobiota u hrani, što se uglavnom odnosi na fiziologiju plesni i njihovu adaptaciju na različite supstrate, kao i na uticaj faktora spoljašnje sredine.

Zbog razlika u hemijskoj strukturi i biosintetskom poreklu mikotoksini pripadaju različitim vrstama prirodnih jedinjenja. Smatra se da postoji nekoliko hiljada mikotoksina, a do danas je oko 400 hemijski identifikovano, od kojih samo određeni broj poseduje toksična svojstva (Paterson i Lima, 2010). Iako do sada nisu naučno potvrđeni razlozi biosinteze sekundarnih metabolita, poznato je da nemaju biohemijski značaj za rast plesni, pa je uglavnom njihova osnovna funkcija sticanje kompetitivne prednosti, jer inhibiraju rast bakterija, plesni, protozoa i drugih ekoloških konkurenata. Mikotoksini se ubrajaju u izrazito termostabilna jedinjenja i mogu se naći i u proizvodima koji su termički tretirani. Njihova biološka aktivnost na ljude i životinje obuhvata akutnu i hroničnu toksičnost (citotoksičnost, hepatotoksičnost, neurotoksičnost, teratogenost, mutagenost i kancerogenost), a bolesti koje prouzrokuju poznate su kao mikotoksikoze. Mikotoksikoze ljudi i životinja okarakterisane su kao oboljenja prouzrokovana kontaminiranom hranom (alimentarne intoksikacije). Aflatoksin B₁ je najistaknutiji u pogledu zastupljenosti i izražene toksičnosti (Dai i sar., 2017).

Aflatoksini su do sada najviše proučavani mikotoksini, ali poslednjih nekoliko godina, fumonizini, ohratoksini, patulin, zearalenon, trihoteceni i citrinin su mikotoksini koji postaju predmet povećanog istraživačkog interesovanja. Žitarice, orašasti plodovi, suvo voće i povrće, kafa, kakao, začini, uljarice i dr. ubrajaju se u sirovine najčešće kontaminirane mikotoksinima (Bryden, 2012). Mogu se naći i u voćnim sokovima, pivu i vinu kao rezultat upotrebe kontaminiranih žitarica i voća u njihovoj proizvodnji. Takođe mikotoksini mogu ući u lanac ishrane preko mesa ili drugih životinjskih proizvoda kao što su jaja, mleko i sir (CAST, 2003; Filtenborg i sar., 2004; Venâncio i Paterson, 2007; Reddy i sar., 2009b).

Većinu mikotoksina koji se smatraju važnim kontaminentima hrane prvenstveno produkuju tri roda plesni: *Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium* (CAST, 2003; Filtenborg i sar., 2004; Frisvad i sar., 2006; Venâncio i Paterson, 2007; Reddy i sar., 2009b; Paterson i Lima, 2010). Rod *Aspergillus* predstavlja veliku grupu plesni koje nastanjuju raznovrsne ekološke niše. Iako su vrste ovog roda rasprostranjene širom sveta, najzastupljenije su u područjima sa subtropskim i tropskim klimatskim uslovima. *Aspergillus* spp. su saprotrofne plesni koje rastu na velikom broju supstrata, a njihova sposobnost da rastu na visokim temperaturama i pri relativno niskoj raspoloživoj vodi čini ih veoma pogodnim za kolonizaciju većeg broja žitarica i orašastih plodova. U mikotoksine koje sintetišu vrste roda *Aspergillus* ubrajaju se aflatoksini, ohratoksini, versikolorini, sterigmatocistin, gliotoksin, citrinin, patulin, citreoviridin, ciklopiazonična kiselina, penicilinska kiselina i tremorgenji mikotoksini (CAST, 2003; Frisvad i sar., 2006). Fumonizini su takođe dodati ovoj grupi nakon što je potvrđeno da ih produkuju plesni *Aspergillus* sekcije *Nigri* (Nielsen i sar., 2009; Månsson i sar., 2009).

Članovi roda *Penicillium* spp. uglavnom rastu i mogu sintetisati mikotoksine pri širem temperaturnom opsegu od onog karakterističnog za rod *Aspergillus*, ali nemaju sposobnost prilagođavanja toplim i suvim uslovima, budući da se pretežno mogu izolovati u područjima sa umerenim klimatskim uslovima. Najvažniji sekundarni metaboliti koje ove plesni produkuju su zajednički za *Aspergillus*: ohratoksin A, citrinin, patulin, penicilinska kiselina, penitrem A, ciklopiazonska kiselina (Keblys i sar., 2004; Geisen i sar., 2018).

Fusarium spp. je kompleksan rod sa vrstama prilagođenim velikom broju staništa. Plesni ovog roda se mogu izolovati širom sveta i mnoge vrste su važni biljni patogeni. Međutim, većina vrsta su saprotrofne i najčešće se nalaze u zemljištu i trulim biljkama, od kojih manji broj predstavlja značajne producente mikotoksina. *Fusarium* vrste i njihovi toksini su najučestaliji kontaminanti pšenice. Neki od najvažnijih mikotoksina koje produkuju vrste ovog roda su trihoteceni, zearalenon i fumonizini. *Fusarium* vrste sintetišu i mikotoksine kao

što su fuzaproliferin, beauvericin, eniatini i moniliformin, fuzarini A-D i gliotoksin, koji su nedavno otkriveni i manje istraženi (Santini i sar., 2012; Stanciu i sar., 2015).

Imajući u vidu globalni značaj plesni i mikotoksina u različitim vrstama prehrambenih proizvoda kako sa aspekta bezbednosti hrane, tako i sa aspekta globalne trgovine, njihovo prisustvo u hrani predstavlja predmet velikog broja naučnih istraživanja (Bennett i Klich, 2003; CAST, 2003; Murphy i sar., 2006; Venâncio i Paterson, 2007).

2.2. PLESNI RODA *Aspergillus*

2.2.1. Značaj i sistematika roda *Aspergillus*

Rod *Aspergillus* obuhvata veliki broj izrazito varijabilnih i široko rasprostranjenih vrsta i po evolutivnom razvoju može se porediti sa ljudima i ribama (Fedorova i Khaldi, 2008). Predstavnici roda *Aspergillus* su saprotrofni i najčešće se nalaze u zemljištu i trulim biljkama, gde luče digestivne enzime transformišući organske supstrate do jednostavnijih hranljivih materija. Ove gljive imaju značajnu ulogu u ekosistemu, jer se smatraju reciklatorima ugljenika i azota. Spore *Aspergillus* spp. su vrlo male, obično u rasponu između 2-3 μm pa se lako šire pomoću vetra (Latge, 1999). Većina plesni roda *Aspergillus* su mezofili (rastu na umerenim temperaturama), mada su neke vrste prilagođene i visokim temperaturama, kao što je *A. fumigatus* koji može da raste na temperaturama preko 50°C (Bhabhra i Askew, 2005). Predstavnici ovog roda se javljaju širom sveta u različitim staništima, a njihov značaj se ogleda u raznovrsnosti delovanja i primene. Neke vrste spadaju među najproduktivnije proizvođače mikotoksina, od kojih su najznačajniji aflatoksini koji imaju štetno delovanje na zdravlje ljudi i životinja. Nasuprot tome, neke vrste se koriste za pravljenje tradicionalne azijske hrane i pića. Vrste roda *Aspergillus* su našle primenu i u biotehnologiji za proizvodnju različitih metabolita kao što su antibiotici, organske kiseline, lekovi i enzimi ili kao starteri u proizvodnji fermentisanih namirnica. *A. niger* je značajan u proizvodnji industrijski važnih jedinjenja kao što je limunska kiselina, dok *A. terreus* predstavlja izvor supstance koja se koristi za pravljenje leka za snižavanje holesterola u krvi (Gibbons i Rokas, 2013).

Postoji više različitih klasifikacija roda *Aspergillus*, a najčešće se navodi sledeća: **Carstvo:** *Fungi*, **Razdeo:** *Ascomycota*, **Klasa:** *Eurotiomycetes*, **Potklasa:** *Eurotiomycetidae*, **Red:** *Eurotiales*, **Familija:** *Trichocomaceae*, **Rod:** *Aspergillus* (Klich, 2007a).

Kao i kod većine plesni, zbog varijabilnosti morfoloških osobina, taksonomija roda *Aspergillus* je veoma složena. S obzirom na to, sistematika i klasifikacija ovih gljiva u velikoj

meri i danas nije potpuno rešena (Tabela 1). Klasifikacija vrsta može biti otežana zbog obimne divergencije morfoloških karakteristika nastalih usled visokog nivoa genetičke varijabilnosti. Nekoliko *Aspergillus* vrsta je dodeljeno sekciji *Flavi* na osnovu tradicionalnih morfoloških metoda (razlike u prečniku kolonija, boji, teksturi konidija i strukturi konidiofora). Međutim, istraživanja ukazuju da se sve vrste ove sekcije ne mogu razlikovati samo na osnovu morfoloških osobina (Pildain i sar., 2008).

Do danas je identifikovano oko 340 *Aspergillus* vrsta (Samson i sar., 2014). Klasifikacija i identifikacija roda *Aspergillus* se temelji na fenotipskim karakteristikama, ali poslednjih nekoliko decenija snažan uticaj ima molekularna i hemotaksonomska karakterizacija. Taksonomija ovog roda je evoluirala iz jednostavnog morfološkog koncepta u polifazni pristup koji je integrisan biohemijskim, ekološkim, genetičkim i molekularnim karakteristikama. Budući da metode za identifikaciju postaju sve osetljivije i tačnije, nove vrste se stalno dodaju, reklasifikuju ili ponovo pozicioniraju unutar roda (Frisvad i sar., 2005; Houbraken i sar., 2007; Varga i sar., 2007a; Hong i sar., 2008; Pildain i sar., 2008). Više dostupnih parametara za karakterizaciju omogućavaju postizanje veće taksonomske stabilnosti. U slučaju kada polifazni pristup ne daje tačne i sa sigurnošću pouzdane rezultate, klasifikacija predstavlja kompromis koji sadrži minimalne kontradikcije (Samson i Varga, 2009).

2.2.2. Identifikacija *Aspergillus* vrsta

Zbog industrijskih, ekonomskih i regulatornih razloga taksonomski sistem mora biti praktičan i pouzdan, pa veliki značaj ima preciznost i stabilnost taksonomije *Aspergillus* spp. Rod se lako identifikuje po karakterističnim konidioforama, ali je identifikacija vrste znatno složenija i tradicionalno se temelji na nizu morfoloških karakteristika (Samson i sar., 2014). Morfološka identifikacija vrsta roda *Aspergillus* je često praćena protokolima prema Raper i Fennell (1965), Klich (2002), Pitt i Hocking (2009) i Samson i sar. (2010). Makromorfološke karakteristike uključuju prečnik i brzinu rasta kolonija, boju konidija i micelije, proizvodnju eksudata (metaboličke kapi karakteristične boje) i rastvorljivih pigmenata, prisustvo sklerocija i kleistotecija. Mikromorfološka karakterizacija uglavnom zavisi od serijacije, oblika i veličine vezikula, morfologije konidija, prisustva i odsustva metula između vezikula i fialida, morfologije kleistotecija i askospora, prisustva Hülle ćelija (ćelije različitog oblika sa debelim zidom povezane sa kleistotecijama) (Rodrigues i sar., 2007).

Tabela 1. Sistematika *Aspergillus* spp. prema različitim literaturnim izvorima (Rodrigues, 2011)

Raper i Fennell, 1965		Gams i sar., 1985		Peterson, 2000		Peterson, 2008		
Podrod	Grupa	Podrod	Sekcija	Podrod	Sekcija	Podrod	Sekcija	Teleomorfi
<i>Aspergillus</i>	<i>A. glaucus</i> <i>A. restrictus</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i> <i>Restricti</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i> <i>Restricti</i> <i>Cervini</i> <i>Terrei</i> <i>Flavipedes</i> <i>Wenitti</i> <i>Flavi</i> <i>Nigri</i> <i>Circumdati</i> <i>Candidi</i> <i>Cremei</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i> <i>Restricti</i>	<i>Eurotium</i> <i>Eurotium</i>
<i>Circumdati</i>	<i>A. wenitti</i> <i>A. flavus</i> <i>A. niger</i> <i>A. ochraceus</i> <i>A. candidus</i> <i>A. cremus</i> <i>A. sarpus</i>	<i>Circumdati</i>	<i>Wenitti</i> <i>Flavi</i> <i>Nigri</i> <i>Circumdati</i> <i>Candidi</i> <i>Cremei</i> <i>Sparsi</i>	--	--	<i>Circumdati</i>	<i>Circumdati</i> <i>Nigri</i> <i>Flavi</i> <i>Cremei</i>	<i>Neopetromyces</i> <i>Petromyces</i> <i>Chaetosartorya</i>
<i>Clavati</i>	<i>A. clavatus</i>	<i>Clavati</i>	<i>Clavati</i>	--	--	--	--	
<i>Fumigati</i>	<i>A. fumigatus</i> <i>A. cervinus</i>	<i>Fumigati</i>	<i>Fumigati</i> <i>Cervini</i>	<i>Fumigati</i>	<i>Fumigati</i> <i>Clavati</i>	<i>Fumigati</i>	<i>Fumigati</i> <i>Clavati</i> <i>Cervini</i>	<i>Neosartorya</i> <i>Neocarpenteles</i> <i>Dichotomomyces</i>
<i>Ornati</i>	<i>A. ornatus</i>	<i>Ornati</i>	<i>Ornati</i>	--	--	<i>Ornati</i>	<i>Ornati</i>	<i>Sclerocleista</i>
<i>Nidulanieis</i>	<i>A. nidulans</i> <i>A. versicolor</i> <i>A. ustus</i> <i>A. terreus</i> <i>A. flavipes</i>	<i>Nidulanieis</i>	<i>Nidulanieis</i> <i>Versicolores</i> <i>Usti</i> <i>Terrei</i> <i>Flavipedes</i>	<i>Nidulanieis</i>	<i>Nidulanieis</i> <i>Ornati</i> <i>Sparsi</i>	<i>Nidulanieis</i>	<i>Nidulanieis</i> <i>Sparsi</i> <i>Usti</i>	<i>Emericella</i> <i>Emericella</i>
--	--	--	--	--	--	<i>Candidi</i>	<i>Candidi</i>	
--	--	--	--	--	--	<i>Terrei</i>	<i>Terrei</i> <i>Flavipides</i>	<i>Fennelia</i>
--	--	--	--	--	--	<i>Warcupi</i>	<i>Warcupi</i> <i>Zonati</i>	<i>Warcupiella</i> <i>Penicillioopsis</i>

Veličina i morfologija askospora, koje često imaju karakteristične oblike (diskovi sa krilima, brazdama itd.) mogu da budu važan kriterijum prilikom identifikacije vrsta (Samson i sar., 2014). Boja, oblik, dimenzije sklerocija (kompaktna masa očvrslih hifa koja sadrži rezerve hranljivih materija) značajno doprinose identifikaciji vrsta. Predstavnik roda *Aspergillus* karakterišu različiti fiziološki odgovori na specifične uslove: rast na određenim temperaturama (Samson i sar., 2007), određenim a_w i pH vrednostima, rast na specifičnim medijumima kao npr. kreatin-saharoza agaru (Varga i sar., 2007a), ekstracelularni enzimski produkti (Fraga i sar., 2008) itd., što može biti validan kriterijum prilikom identifikacije. Većina ovih karakteristika zavisi od uslova kultivacije, pa i različiti suptilni efekti kao što su razmena gasova, svetlost i zapremina medijuma može uticati na morfološke karakteristike kultura (Okuda i sar., 2000). Iz navedenih razloga, neophodno je da se identifikacija vrši sa čistim kulturama koje se uzgajaju na standardnim podlogama i pri standardnim uslovima (Klich, 2002).

Raznolikost *Aspergillus* spp. ukazuje na njihovu evolutivnu razvijenost i čini ih idealnim modelom za proučavanje u komparativnoj i funkcionalnoj genetici. Ovaj rod obuhvata najbolje ispitane plesni sa aspekta genetike. Molekularne metode su široko primenjene u identifikaciji velikog broja *Aspergillus* vrsta. DNK amplifikacija praćena analizom DNK sekvenci je moćan alat u identifikaciji predstavnika ovog roda. Lančana reakcija polimeraze – PCR (eng. *polimerase chain reaction*) je postala nezaobilazna metoda u molekularnim istraživanjima. Iako se izvodi i obično zahteva manje vremena za postizanje rezultata od mikrobioloških metoda. Umnožavanje DNK putem PCR-a se bazira na hibridizaciji specifičnih oligonukleotida (prajmera) i *in vitro* sintezi kopija željenog fragmenta koji je oivičen i obeležen datim prajmerima. Takvo umnožavanje je uglavnom praćeno agaroznom gel elektroforezom i predstavlja najjednostavniju primenu PCR-a za identifikaciju vrsta (Garibyan i Avashia, 2013).

DNK sekvence treba da ispunjavaju nekoliko kriterijuma da bi se uspešno koristile za identifikaciju vrsta. DNK sekvence ispitivanih organizama trebalo bi da budu ortologne (homologi geni u genomima različitih vrsta), dovoljno varijabilne da omogućavaju identifikaciju vrsta, sa niskim nivoima intraspecifične varijacije (Hebert i sar., 2003). DNK “bar kod” mora biti lako dostupan (univerzalno amplifikovan/sekvencioniran standardizovanim prajmerima), relativno kratak ($\leq \sim 500-600$ bp) i jednostavan za sekvencioniranje. Predloženi su različiti lokusi kao DNK “bar kodovi” za plesni, ali DNK region koji se najčešće koristi za identifikaciju *Aspergillus* vrsta je smešten u ribozomalnom-

DNK (rDNK) kompleksu, tj. unutrašnji transkribovani deo regiona 1 i 2 (ITS1 i ITS2) i promenljivi region na kraju 5' od 28S rRNK gena (D1-D2 region) (Slika 1).



Slika 1. ITS rDNK region (ITS1-5.8S-ITS2)

Geni sa ribozomalne DNK se često koriste kao molekularni hronometri pri analiziranju mikrobiološke filogenije i sistematike. rDNK region (ITS1-5.8S-ITS2) je univerzalni “bar kod” za plesni, jer je to najčešće sekvencionirani marker i koristi prajmere koji su univerzalni. ITS sekvence se preporučuju u cilju identifikacije novih vrsta, mada ponekad ne sadrže dovoljno različitosti za identifikaciju vrsta u okviru jednog roda, te se koriste sekundarni markeri. Sekundarni markeri, slično ITS, koriste univerzalne prajmere, ali za razliku od ITS markera, uglavnom prave razliku među svim vrstama. Sekundarni markeri koji se najčešće koriste su geni za β -tubulin, kalmodulin i topoizomeraza II geni (Rodrigues i sar., 2007; Schoch i sar., 2012). Topoizomeraza II gen se ne amplifikuje lako, što otežava njegovu upotrebu kao sekundarnog markera za identifikaciju. Nasuprot tome, gen za β -tubulin ima kratku sekvencu, lako se amplifikuje, ali je potvrđeno da varira u broju introna i PCR ponekad daje rezultat amplifikacije paralognih gena (geni koji su divergirali nakon duplikacije) (Hubka i Kolarik, 2012). Gen za kalmodulin se takođe lako amplifikuje, te je primenom ovog markera moguća identifikacija svih *Aspergillus* vrsta (osim *A. elegans* i *A. steinii*, gde se diferencijacija postiže pomoću ITS markera). Baza podataka za kalmodulin sekvence je upotpunjena skoro za sve vrste, stoga se preporučuje upotreba kalmodulina kao sekundarnog markera za identifikaciju *Aspergillus* vrsta (Samson i sar., 2014).

Vrste roda *Aspergillus* proizvode niz sekundarnih metabolita koji mogu da se koriste u identifikaciji vrsta, jer se smatra da imaju visoku specifičnost (Frisvad, 1989; Larsen i sar., 2005). Većina *Aspergillus* spp. sintetiše jedinstvenu kombinaciju ovih metabolita. Geni odgovorni za biosintezu sekundarnih metabolita *Aspergillus* vrsta su grupisani u klastere u subtjelomernim regionima hromozoma (Georgianna i sar., 2010). U različitim sekcijama ovog roda, svaku vrstu karakteriše specifičan profil, te grupisanje vrsta zasnovano na profilu metabolita daje dobru korelaciju u poređenju sa grupisanjem prema drugim karakteristikama (Houbraken i sar., 2007; Varga i sar., 2007b). Samson i Varga (2009) preporučuju da treba uzeti u obzir 4 do 8 metabolita u profilisanju određene vrste.

2.2.3. Aflatoksigene vrste roda *Aspergillus*

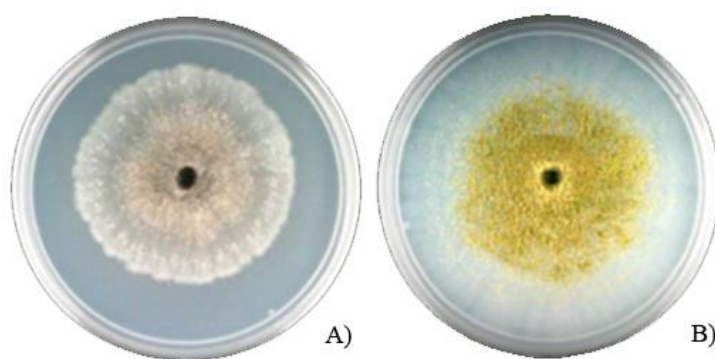
Sve plesni koje imaju sposobnost biosinteze aflatoksina pripadaju rodu *Aspergillus*. Do sada je identifikovano 14 vrsta koje produkuju bar jedan od četiri najpoznatija aflatoksina (B₁, B₂, G₁, G₂) (Tabela 2). Sekcija *Flavi* obuhvata glavne producente aflatoksina, među kojima su *A. flavus* i *A. parasiticus* najznačajniji i najrasprostranjeniji. Manje uobičajeni producenti aflatoksina iz ove sekcije su *A. nomius*, *A. pseudotamarii*, *A. bombycis* i *A. parvisclerotigenus*.

Tabela 2. *Aspergillus* spp. sa sposobnošću sinteze aflatoksina B i G grupe (Baranyi i sar., 2015)

Vrste plesni	Aflatoksin	
	B	G
<i>Aspergillus</i> sekcija <i>Flavi</i> (<i>Petromyces</i>)		
<i>A. arachidicola</i>	+	+
<i>A. bombycis</i>	+	+
<i>A. flavus</i>	+	-
<i>A. minisclerotigenes</i>	+	+
<i>A. nomius</i>	+	+
<i>A. novoparasiticus</i>	+	+
<i>A. parasiticus</i>	+	+
<i>A. parvisclerotigenus</i>	+	+
<i>A. pseudocaelatus</i>	+	+
<i>A. pseudonomius</i>	+	+
<i>A. pseudotamarii</i>	+	-
<i>A. togoensis</i>	+	-
<i>A. transmontanensis</i>	+	+
<i>A. mottae</i>	+	+
<i>A. sergii</i>	+	+
<i>Aspergillus</i> podrod <i>Nidulantes</i> (<i>Emericella</i>)		
<i>E. astellata</i>	+	-
<i>E. olivicola</i>	+	-
<i>E. venezuelensis</i>	+	-
<i>Aspergillus</i> sekcija <i>Ochraceorosei</i>		
<i>A. ochraceoroseus</i>	+	-
<i>A. rambellii</i>	+	-

Utvrđeno je da se sojevi *A. flavus* znatno razlikuju u pogledu toksigenosti, a samo oko 40% izolata ove vrste produkuje aflatoksine (Frisvad i sar., 2006). Sojevi *A. flavus* su podeljeni na osnovu morfologije sklerocija u dve grupe i to na L i S tip (slika 2). Izolati S tipa produkuju male mnogobrojne sklerocije (prosečan prečnik <400 μm) i mali broj konidija, dok

izolati L tipa proizvode veće sklerocije (prečnik >400 µm) i mnoštvo konidija. U pogledu sinteze aflatoksina sojevi *A. flavus* variraju od atoksigenih (sojevi koji ne sintetiziraju aflatoksine) do onih koji sintetiziraju preko 106 µg/kg aflatoksina na pogodnim žitnim supstratima. Pri istim uslovima izolati S tipa sintetiziraju veću količinu aflatoksina u odnosu na izolate L tipa. Za izolate L tipa je karakteristično da proizvode manje količine aflatoksina grupe B, dok izolati S tipa proizvode veće količine aflatoksina B grupe (Garber i Cotty, 1997). U istraživanjima Barros i sar. (2006) se navodi da sojevi S tipa mogu da proizvode i aflatoksine grupe G, međutim ti sojevi su posle okarakterisani kao posebna vrsta *A. minisclerotigenes* (Pildain i sar., 2008). S obzirom da se u identifikaciji postepeno uvedene molekularne metode, u poslednjih nekoliko godina sekcija *Flavi* je pretrpela obiman razvoj i promene. *A. flavus* var. *parvisclerotigenus*, sa morfologijom i profilom metabolita sličnim sa *A. minisclerotigenes*, podignut je na nivo vrste (*A. parvisclerotigenus*) (Frisvad i sar., 2005). Druge vrste kao što su *A. kambarensis*, *A. fasciculatus*, *A. thomii* i *A. subolivaceus* postali su sinonimi vrste *A. flavus* (Pildain i sar., 2008). Jedna vrsta koja je blisko povezana sa *A. parasiticus*, koja takođe proizvodi AFB i AFG, ali je morfološki slična *A. flavus*, nedavno je opisana kao *A. arachidicola* (Pildain i sar., 2008). Potencijal za proizvodnju aflatoksina nije samo povezan sa infekcijom ili kompetitivnom sposobnošću plesni, nego je pre svega uslovljen genetskom predispozicijom sojeva. S obzirom na to, genetska osnova za postizanje atoksigenosti izolata ove vrste uključuje ometanje proizvodnje ključnog enzima ili izbacivanje klastera gena koji su odgovorni za sintezu aflatoksina (Mehl i sar., 2014).



Slika 2. Makroskopski izgled kolonija *A. flavus* S tipa (A) i L tipa (B) na Czapek agaru (Donner, 2009)

Određivanje primarnog etiološkog agensa tj. uzročnika kontaminacije aflatoksinima je kritična tačka za predviđanje rizika kontaminacije, za projektovanje i sprovođenje strategije upravljanja. Međutim, tip *A. flavus* koji uzrokuje infekciju nije i najvažniji etiološki agens

kontaminacije. Na primer, čak i kada S soj *A. flavus* čini mali procenat ukupne infekcije, on može biti najvažniji uzročnik kontaminacije, što rezultira visokom koncentracijom aflatoksina. Strategija upravljanja koja se odnosi na smanjenje učestalosti S soja može biti efikasan način za smanjenje kontaminacije (Mehl i sar., 2014).

2.3. AFLATOKSINI

2.3.1. Biosinteza aflatoksina

Kod bakterija i nekih plesni (*Aspergillus* i *Penicillium*) geni odgovorni za biosintezu sekundarnih metabolita su organizovani u jedan genetski skup smešten na ribozomalnoj DNK, dok se kod drugih plesni, kao što je *Cephalosporium acremonium*, geni koji učestvuju u biosintezi nalaze na različitim hromozomima. Geni koji su uključeni u sekundarni metabolizam smatraju se varijabilnim u okviru srodnih vrsta, što olakšava identifikaciju u okviru jednog roda. Geni za biosintezu sekundarnih metabolita su obično grupisani u klustere i relativno lako se identifikuju iz sekvenci genoma, mada postoje izuzeci kao što je *A. nidulans* kod koga se dva odvojena klastera gena nalaze na različitim hromozomima koji su odgovorni za biosintezu sekundarnih metabolita meroterpenida austinola i dihidroaustinola (Brakhage, 2013).

Molekularne tehnike su široko primenjene u identifikaciji aflatoksigenih i atoksigenih sojeva *A. flavus* i srodnih vrsta, određujući prisustvo/odsustvo jednog ili više gena uključenih u biosintetski put aflatoksina. Nekoliko gena koji su uključeni u biosintezu aflatoksina su identifikovani, klonirani i ispitani. Oni uključuju regulatorni gen *aflR* vrsta *A. flavus* i *A. parasiticus* i nekoliko strukturnih gena, kao na primer *pkSA*, *nor-1*, *ver-1*, *uvm8* i *omtA* (Rodrigues i sar, 2007). Specifični regulatori se uglavnom nalaze u klasterima i pozitivno regulišu ekspresiju gena. Jedan od njih je $Zn(II)_2Cys_6$ klaster proteina, pronađen isključivo kod gljiva. Tipičan protein ove grupe je *AflR* (aflatoksin regulator), tako da su $Zn(II)_2Cys_6$ proteini neophodni za aktivaciju gena odgovornih za biosintezu aflatoksina i sterigmatocistina. Drugi transkripcioni faktori kodirani u biosintetskim klaster genoma su Cys_2His_2 klaster proteina (*Tri6* i *MRTRI6* za sintezu trihotecena) (Keller i sar., 2005).

Jedno od bitnih saznanja vezano za sekundarne metabolite je učešće velikih multi-modularnih enzima u njihovoj biosintezi. Ovi enzimi uključuju poliketid sintetaze (PKSs), neribozomalne peptid sintetaze (NRPSs), prenilttransferaze i terpen ciklaze. Analiza genoma je pokazala da susedni geni kodiraju uglavnom regulatorne proteine, oksidaze i hidrosilaze. PKSs i NRPSs koriste jednostavne malonil (PKS) ili aminokiselinske (NRPS) gradivne blokove ili njihove

derivate. Iako se supstrati mogu razlikovati značajno, ovi multi-modularni enzimi pokazuju izrazite sličnosti u građi i mehanizmu delovanja. Svaki modul je odgovoran za jedan ili više koraka elongacije i mogu se podeliti na osnovu domena koji kontroliše povezivanje peptidnih lanaca. Proces biosinteze započinje na adenilacijskom (A) domenu koji u prvom koraku katalizuje nastanak aminoacil-adenilata, dok se u drugom koraku odvija prenos aktivirane aminokiseline na susedni tiolacijski (T) domen poznat kao peptidni nosač proteina (eng. *peptidyl carrier protein* - PCP) koji služi kao sidro za rastući peptidni lanac (Brakhage i Schroeckh, 2011).

Calvo i sar. (2002) su postavili temelje veze između sekundarnog metabolizma i reproduktivnog stadijuma plesni. Većina sekundarnih metabolita nastaje nakon što plesni prođu eksponencijalnu fazu rasta i uđu u stacionarnu fazu koju karakteriše formiranje spora. Smatra se da su okidači ovog prelaza sadržaj ATP-a i redukovanih koenzima te prisutnost metalnih jona, posebno cinka. Takođe je utvrđeno da povećana aktivnost piruvat kinaze, te dostupnost kiseonika povećava sintezu toksina dok prisutnost veće koncentracije vodonika i fosfata inhibira sintezu metabolita. Stacionarna faza je ujedno početak aseksualne sporulacije i nastanka sekundarnih metabolita. Za razliku od vegetativnog rasta, stacionarna faza se pokreće određenim spoljašnjim faktorima i kontrolisana je putevima rasta g-proteina. Utvrđeno je da spoljašnji faktori koji pogoduju sporulaciji i sintezi sekundarnih metabolita su često slični i razlikuju se od onih koji odgovaraju vegetativnom rastu. Smatra se da metaboliti igraju važnu ulogu u pokretanju, regulaciji i procesu sporulacije vrsta roda *Aspergillus*. *Aspergillus* vrste kao što je *A. nidulans* imaju sposobnost da formiraju i seksualne i aseksualne spore. Seksualne spore nastaju u kleistotecijama u povoljnim uslovima životne sredine, dok u nepovoljnim uslovima dolazi do formiranja konidija. Sekundarni metaboliti mogu imati značajan uticaj tokom faze sporulacije, jer mogu delovati kao važni sporogeni faktori i kao ključni okidač za proizvodnju aseksualnih spora. Takođe, metaboliti smanjuju konkurenciju u okruženju jer predstavljaju efikasan "otrov" za mnoge konkuretne biljke, životinje i mikrobiološke vrste iz okruženja.

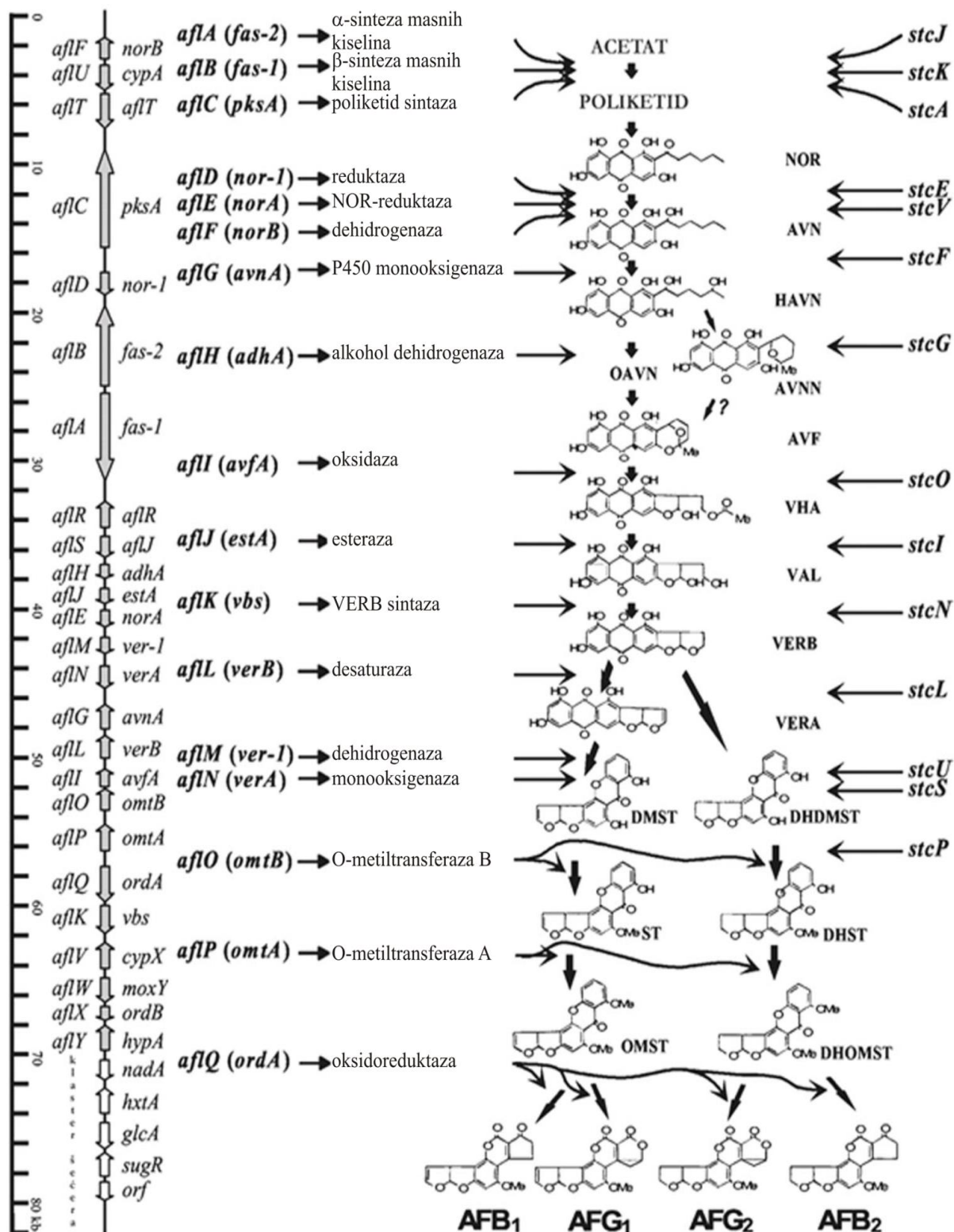
Iako postoji veza između sekundarnog metabolizma i stadijuma sporulacije, neke vrste plesni kao što su *P. urticae* i *A. nidulans* u fazi sporulacije pokazuju deficit sekundarnih metabolita. Pored toga sekundarni metaboliti kao što su brevianamidi A i B koje sintetiše *P. brevicompactum*, se pojavljuju tek nakon faze sporulacije. U cilju potvrđivanja veze sekundarnog metabolizma i sporulacije neka istraživanja su bazirana na dodavanju određenih hemijskih inhibitora koji su, kako se ispostavilo, istovremeno inhibirali sporulaciju i sintezu sekundarnih metabolita. Tako je kod vrsta *A. parasiticus* i *A. nidulans* hemijskom inhibicijom

(1,4-diamino-2-butanonom) došlo do smanjenja sporulacije i sinteze aflatoksina i sterigmatocistina (Calvo i sar., 2002).

2.3.2. Genetski i molekularni aspekti biosinteze aflatoksina

Više od dve decenije istraživanja je bilo potrebno da se identifikuju svi intermedijeri uključeni u biosintezu aflatoksina. Korišćenjem prekursora obeleženih izotopima ^{14}C , ^2H , ^{13}C i ^{18}O , a tehnikom nuklearne magnetne rezonance identifikovani su pojedini intermedijeri biosintetskog puta. Istraživanja su uglavnom sprovedena na vrsti *A. parasiticus* koja proizvodi četiri najvažnija aflatoksina AFB₁, AFB₂, AFG₁ i AFG₂. Nakon saznanja da je biosinteza aflatoksina regulisana genskim klasterima (Yu i sar., 1995; Brown i sar., 1996), biosintetski put aflatoksina je detaljno izučen i do sada je identifikovana većina enzima i gena uključenih u biosintezu (Do i Choi, 2007). Takođe, većina njihovih funkcija je razjašnjena, uključujući i moguće alternativne puteve sinteze (Ehrlich i sar., 2004, 2005; Wen i sar., 2005; Cary i Ehrlich, 2006). Biosinteza aflatoksina zahteva najmanje 25 enzima i dva regulatorna proteina kodirana susednim genima u 80-kb klasteru. Klasteri biosintetskih gena odgovorni za sekundarni metabolizam plesni nisu samo regulisani specifičnim transkripcionim faktorima, već mogu biti regulisani genima izvan biosintetičkog klastera, koji regulišu višestruke fiziološke procese i odgovore na ekološke i nutritivne faktore kao što su temperatura, pH, svetlost, izvori ugljenika i azota (Georgianna i Payne, 2009).

Geni uključeni u glavne korake biosinteze od početnih prekursora do aflatoksina i njihove funkcije su razmotreni u istraživanju Yu i sar. (2004). Ovi autori su predložili upotrebu tri slova koda "afl" za predstavljanje gena koji učestvuju u sintetskom putu aflatoksina. Veliko slovo po abecednom redu od "A" do "Y" predstavlja svaki pojedinačni gen potvrđen da je (ili potencijalno) uključen u biosintezu aflatoksina, npr. *aflA* do *aflY* za svih 25 gena (Slika 3). Geni čije je učestvovanje u putevima biosinteze okarakterisano i potvrđeno su označeni kao *aflA* do *aflQ* od inicijalne konverzije masnih kiselina do krajnjih produkata aflatoksina. *aflR* i *aflS* (ranije *aflJ*) su oznake za regulatore transkripcije. Geni čiji je učešće u biosintetskim putevima dvosmisleno ili nije u potpunosti razjašnjeno su označeni kao *aflT*, *aflU* (= *cipA*), *aflV* (= *cipX*), *aflW* (= *moxY*), *aflX* (= *ordB*), i *aflY* (= *hypA*). Biosintetski put aflatoksina, kao i intermedijeri i geni koji kodiraju enzime uključene u njihovu sintezu prikazani su na Slici 3.



Slika 3. Genski klasteri, enzimi i intermedijeri biosinteze aflatoksina (Yu i sar.,2004)

Dosadašnja istraživanja pokazuju da je furofuranski prsten odgovoran za toksično delovanje aflatoksina. S obzirom na strukturu potencijalno toksični intermedijeri biosinteze aflatoksina se dele u dve grupe: dihidrofurofuranska i tetrahidrofurofuranska. Dihidrofurofuranskim

intermedijerima pripadaju verzikolorin A (VERA), sterigmatocistin (ST) i O-metilsterigmatocistin (OMST). U ovu grupu takođe spadaju AFB₁ i AFG₁. Sterigmatocistin je inače krajnji toksični produkt vrste *A. versicolor*, jer ta plesan ne poseduje gene koji kodiraju enzime potrebne za nastavak biosinteze do aflatoksina (Calvo i sar., 2002). Tetrahidrofurofuranskoj grupi pripadaju verzikolorin B (VERB), dihidrodemetilsterigmatocistin (DHDMST), dihidrosterigmaticistin (DHST) i dihidro-O-metilsterigmatocistin (DHOMST). Grupi tetrahidrofurofuranskih derivata pripadaju i AFB₂ i AFG₂. Ostali intermedijeri uključujući norsolorinsku kiselinu (NOR), averantin (AVN), 5-hidroksiaverantin (HAVN), oksoavernatin (OAVN), averufanin (AVNN), averufin (AVF), verzikonol hemiacetal acetat (VHA) i verzikonol (VAL) nemaju furofuranski prsten (Yu i sar., 2004). Generalno, geni odgovorni za biosintezu aflatoksina kod *A. flavus*, *A. parasiticus* i *A. nomius* su visoko homologni; redosled gena unutar klastera je isti (Ehrlich i sar., 2005; Chang i sar., 2007). Značajan procenat neaflatoksigenih izolata *A. flavus*, mada ne i svi, sadrže razne delecije u genskom klasteru za sintezu aflatoksina (Ehrlich i sar., 2004; Chang i sar., 2006), koje su uobičajene za neke sojeve *A. orizae* (Chang i sar., 2006).

Utvrđeno je da su za sintezu aflatoksina G grupe kod vrste *A. parasiticus* uključeni dodatni enzimi. Gubitak sposobnosti za proizvodnju aflatoksina G kod *A. flavus* predstavlja rezultat brisanja gena *aflF* (= *norB*) i *aflU* (= *cipA*) u terminalnom regionu klastera (Ehrlich i sar., 2004). Nekoliko studija je potvrdilo da su putevi formiranja aflatoksina B i G grupe odvojeni (Yabe i sar., 1999; Ehrlich i sar., 2004).

2.3.3. Uticaj abiotičkih i biotičkih faktora na rast plesni i biosintezu aflatoksina

Biosinteza aflatoksina je pre svega uslovljena genetskim faktorima, ali u velikoj meri zavisi od faktora sredine kao što su: sastav supstrata, vlažnost, a_w , temperatura, stepen oštećenja zrna žitarica, koncentracija O₂ i CO₂, pH sredine, ukupan broj plesni tj. opterećenost sporama, prisustvo konkurentnih mikrobiota i dr. (Khalesi i Khatib, 2011). U zavisnosti od specifične kombinacije parametara, biosinteza aflatoksina može biti potpuno inhibirana, iako je normalan rast i dalje omogućen, ili put biosinteze može biti u potpunosti aktiviran. Poznavanje uticaja ovih faktora omogućava procenu koji od parametara ili njihova kombinacija mogu kontrolisati rast plesni i biosintezu aflatoksina.

Prirodna staništa producenata aflatoksina su topli aridni, poluaridni i tropski regioni sa promenama u klimi koje dovode do velikih oscilacija u količini biosintetisanih aflatoksina (Bock i sar., 2004). Plesni roda *Aspergillus* su retko prisutne u hladnim područjima

(temperature <20 °C), dok u toplim regionima (temperatura minimum 25 °C) aflatoksigene plesni se često mogu naći u zemljištu, vazduhu i na raznim površinama. Stoga, usevi gajeni u toplim podnebljima imaju veću verovatnoću da budu inficirani plesnima *A. flavus*. Među već pomenutim faktorima koji imaju izražen uticaj na rast plesni i sintezu metabolita, temperatura i a_w vrednost se izdvajaju kao najznačajniji. Sumirani podaci koji se odnose na ekološke potrebe *A. flavus* prema različitim autorima prikazani su u Tabeli 3.

Tabela 3. Pregled odabranih ekoloških činilaca za *A. flavus*

	Ispitivani opseg	T _{min}	T _{opt}	T _{max}	Literaturni izvor
TEMPERATURA (°C)					
Klijanje spora	10-50	12	33	43	Ayerst, 1969
	25-37	25	30	37	Pitt i Miscamble, 1995
Rast plesni	10-50	12	33	43	Ayerst, 1969
	15-33	15	33	-	Holmquist i sar., 1983
	25-37	25	30	37	Pitt i Miscamble, 1995
	3-31	12	31	31	Sautour i sar., 2002
	16-37	16	30	37	Samapundo i sar., 2007a
	20-37	20	28	37	Gallo i sar., 2016
	15-37	15	37	37	Lahouar i sar., 2016
Biosinteza aflatoksina	15-30	15	25	30	Giorni i sar., 2007
	10-43	15	25-30	37	Mousa i sar., 2011
	15-37	25	37	37	Lahouar i sar., 2016
	20-37	20	28	37	Gallo i sar., 2016
	20-30	25	30	30	Castaño i sar., 2017
	Ispitivani opseg	a _w min	a _w opt	a _w max	Literaturni izvor
AKTIVNOST VODE (a_w)					
Klijanje spora	0,70-1	0,78	>0,98	0,99	Ayerst, 1969
	0,80-1	0,81	0,99	0,99	Pitt i Miscamble, 1995
Rast plesni	0,70-1	0,78	>0,98	0,99	Ayerst, 1969
	0,85-0,99	0,85	0,99	0,99	Holmquist i sar., 1983
	0,80-1	0,83	0,97	0,99	Pitt i Miscamble, 1995
	0,80-0,99	0,83	0,97	0,99	Sautour i sar., 2002
	0,801-0,982	0,822	0,982	0,982	Samapundo i sar., 2007a
	0,90-0,99	0,90	0,96	0,99	Gallo i sar., 2016
	0,85-0,99	0,91	0,99	0,99	Lahouar i sar., 2016
Biosinteza aflatoksina	0,93-0,99	0,83	0,99	0,99	Giorni i sar., 2007
	0,82-0,99	0,86	0,98	0,99	Mouse i sar., 2011
	0,90-0,99	0,90	0,96	0,99	Gallo i sar., 2016
	0,85-0,99	0,94	0,99	0,99	Lahouar i sar., 2016
	0,70-0,95	0,85	0,95	0,95	Castaño i sar., 2017

Nekoliko *in vitro* studija je izvedeno u cilju određivanja optimalnih temperatura i a_w za rast plesni i produkciju aflatoksina. *A. flavus* i *A. parasiticus* mogu da rastu pri širokom temperaturnom opsegu (12 do 48 °C), ali je optimalan rast u temperaturnom rasponu od 25 °C do 37 °C (Sautour i sar., 2002; Samapundo i sar., 2007a; Gallo i sar., 2016). Optimalne a_w vrednosti za rast *A. flavus* i *A. parasiticus* variraju od 0,97 do 0,99 (Sautour i sar., 2002), ali je pojava rasta zabeležena na a_w vrednosti oko 0,80, pri temperaturi od 30 °C (Samapundo i sar.,

2007a). Biosinteza aflatoksina se odvija pri rasponu temperatura i a_w vrednosti koji nisu toliko široki kao oni koji se odnose na sam rast. Mada do produkcije aflatoksina može doći pri temperaturama između 20 i 37 °C i vrednostima $a_w > 0,85$, utvrđeno je da su optimalni parametri za produkciju 28 do 30 °C i $a_w > 0,95$ (Giorni i sar., 2007; Mouse i sar., 2011; Gallo i sar., 2016).

Infekcija plesnima i kontaminacija žitarica aflatoksinima može se podeliti u dve različite faze: infekcija u prvoj fazi tokom rasta u polju i povećanje kontaminacije posle sazrevanja useva u drugoj fazi. Rastom i razvojem biljke često postanu otporne na infekciju *A. flavus* i kontaminaciju aflatoksinima usled prirodnih mehanizama odbrane koji se javljaju kao odgovor na napad plesni. Međutim, kada su usevi izloženi stresnim uslovima kao što su suša i visoke temperature obično se javljaju značajne infekcije (Bircan i sar., 2008). Ovi faktori direktno utiču na fiziologiju biljaka i mehanizme otpornosti čineći biljke podložnim infekciji plesnima i kontaminaciji aflatoksinima. Na primer, fiziološki odgovor na stresogeni faktor kao što je suša izaziva veliko povećanje koncentracije aminokiselina u biljkama, uglavnom prolina za koga je utvrđeno da stimuliše sintezu aflatoksina. Takođe, proizvodnja fitoaleksina (antimikrobna jedinjenja nastala u biljci kao odgovor na napad plesni), koja inhibiraju klijavost spora i rast *A. flavus* (Wotton i Strange, 1985), je inhibirana stresnim uslovima izazvanim sušom (Strange i Subba Rao, 1994). U sušnim uslovima razvojem *A. flavus* na žitaricama pri sušnim uslovima ima konkurentnu prednost, zbog njegove kserotolerantne prirode, čak i u poređenju sa drugim *Aspergillus* vrstama (Klich, 2007b). Oštećenja zrna žitarica od strane insekata, ptica, glodara doprinose invaziji i prodoru toksigenih plesni (Payne, 1988; Guo i sar., 2004). Druga faza kontaminacije može se desiti u bilo kom trenutku od sazrevanja useva do njihove upotrebe. Tokom ovog perioda, a_w žitarica je obično dovoljno nizak ($<0,70$) da inhibira rast plesni i proizvodnju aflatoksina. Dakle, tokom skladištenja neophodni su adekvatni uslovi kao što su odgovarajuća relativna vlažnost koja obezbeđuje održavanje a_w ispod 0,85. Nasuprot tome, ako su usevi izloženi uslovima veće vlažnosti, suvo seme će povećati sadržaj vode koji pogoduje kontaminaciji (Adebajo i Popoola, 2003; Johnsson i sar., 2008; Riba i sar., 2010).

Mnoge biljke i supstrati stimulišu rast plesni i produkciju aflatoksina, ali se smatra da aflatoksini najčešće nastaju na supstratima sa visokim sadržajem ugljenih hidrata i masti, kao što su bademi, orasi, kikiriki, pistaći, kukuruz, pšenica, pirinač, seme pamuka i začini. Neke vrste roda *Aspergillus*, uglavnom *A. flavus* prvenstveno dobijaju nutrijente potrebne za saprotrofni rast i stoga zadržavaju sposobnost da luče razne hidrolaze koje im omogućavaju bolju dostupnost hranljivih sastojaka. Najznačajniji hidrolitički enzimi vrsta *Aspergillus*

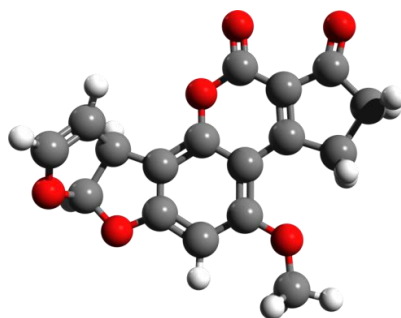
sekcije *Flavi* su proteaze, lipaze, amilaze i pektinaze (Mellon i sar., 2007). Lipaze igraju značajnu hidrolitičku ulogu u metabolizmu *A. flavus* u slučaju kad trigliceridi predstavljaju izvor ugljenika. Konkretno, *lipA* gen kodira lipazu u *A. flavus* stimuliše formiranje aflatoksina u sredini nutritivno bogatoj lipidima (Yu i sar., 2003). Masne kiseline su uključene u jednu od prvih enzimskih reakcija sinteze aflatoksina. Mellon i sar. (2000) su utvrdili da je rast *A. flavus* bio izraženiji na podlogama sa trigliceridima kao jedinim izvorom ugljenika. Osim toga, koncentracija produkovanih aflatoksina je bila 800 puta veća u supstratima bogatim lipidima nego u istom supstratu iz koga su ekstrahovani lipidi. Fanelli i sar. (1983) su ukazali da lipofilne epoksidne masne kiseline stimulišu proizvodnju aflatoksina. Takođe je poznato da izvori ugljenika i azota igraju značajnu ulogu u regulaciji biosinteze aflatoksina (Wilkinson i sar., 2007; Šenyuva i sar., 2008). Monosaharidi i disaharidi kao što su glukoza, saharoza, maltoza i galaktoza indukuju produkciju aflatoksina, dok to ne omogućavaju kompleksni hranljivi sastojci kao što su pepton, laktoza, oleinska kiselina i skrob. Ovi podaci potvrđuju činjenicu da su mastima bogati supstrati poput raznih uljarica, badema, pistaća, kikirikija češće kontaminirani aflatoksinima od supstrata bogatih skrobom. Tipovi i koncentracije izvora azota u podlozi su jednako bitni za rast plesni i biosintezu aflatoksina. Smatra se da aminokiseline prolin i cistin stimulišu produkciju aflatoksina više nego cistein, asparagin, triptofan ili metionin.

Nekoliko studija ukazuje na antagonizam između aflatoksigenih plesni i drugih mikroorganizama (Palumbo i sar., 2006; Afsharmanesh i sar., 2018; Siahmoshteh i sar., 2018). Nije u potpunosti razjašnjeno da li je kompeticija među mikroorganizmima posledica antagonističkog efekta ili razlika u prilagodljivosti na uslove spoljašnje sredine. Pozitivna korelacija prilikom rasta plesni je zabeležena među vrstama *A. flavus* i *A. niger* (Bayman i sar., 2002), što je verovatno posledica činjenice da sekcije *Flavi* i *Nigri* dele zajednička staništa i ekofiziološke karakteristike, tako da uslovi koji favorizuju rast jedne istovremeno favorizuju i rast druge vrste (Esteban i sar., 2006; Klich, 2007b). Alternativno objašnjenje može biti da infekcija jednom vrstom čini biljku podložnom za infekciju drugom vrstom (Bayman i sar., 2002). Nekoliko *in vitro* istraživanja pokazalo je da prisustvo drugih filamentoznih plesni, kao što su *A. niger*, *Rhizopus* spp., *Trichoderma* spp. i *Penicillium* spp. može značajno smanjiti akumulaciju aflatoksina, inhibirati njihovu biosintezu ili uticati na degradaciju (Calistru i sar., 1997; La Penna i sar., 2004). Brojne bakterije – *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Ralstonia* spp. i *Burkholderia* spp. (Palumbo i sar., 2006) i saprotrofni kvasci - *Pichia* spp., *Candida* spp., *Kluyveromyces* spp. (Hua i sar., 1999; La Penna i sar., 2004) utiču na rast *A. flavus* i biosintezu aflatoksina. Takođe je utvrđeno da netoksični sojevi

A. flavus imaju konkurentnu prednost prema aflatoksigenim izolatima (Cotty, 1994; Zanon i sar, 2016).

2.3.4. Zdravstveni aspekt

Otkriće aflatoksina 60-tih godina XX veka kada je na farmi u Engleskoj došlo do masovnog uginuća ćurića hranjenih kontaminiranim brašnom od kikirikija smatra se prekretnicom u istoriji mikotoksina. Analizom kikirikija izolovane su plesni *A. flavus* i otkriveno je do tada nepoznato jedinjenje aflatoksin B₁ koji predstavlja najtoksičniji poznati sekundarni metabolit. Aflatoksini su dobili naziv kombinacijom slova i reči: A (*Aspergillus*) + FLA (*flavus*) + TOKSIN (otrov) (Ellis i sar., 1991). Aflatoksini se ubrajaju u difuranokumarine koji se prema hemijskoj strukturi mogu podeliti u dve grupe: difurokumarociklopentane (AFB₁, AFB₂, AFB₂A, AFM₁, AFM₂, AFM₂A i aflatoksikol) i difurokumarolaktone (AFG₁, AFG₂, AFG₂A, AFGM₁, AFGM₂, AFB₃). AFB₂ i AFG₂ su dihidroksi derivati AFB₁, odnosno AFG₁. AFB₁ je najvažniji u pogledu zastupljenosti i toksičnosti i smatra se najviše ispitanim aflatoksinom. Kao i ostala heterociklična jedinjenja, aflatoksini imaju sposobnost da intenzivno fluoresciraju u ultraljubičastoj oblasti (365 nm). Naime, AFB₁ i AFB₂ emituju plavu (eng. *blue*), dok AFG₁ i AFG₂ fluoresciraju žuto-zelenom bojom (eng. *green*), na osnovu čega su i dobili ime. AFM₁, kao derivat AFB₁, takođe emituje plavu boju u ultraljubičastoj oblasti (Hruska i sar., 2014). Ove fizičko-hemijske osobine aflatoksina značajno su doprinele razvoju kvalitativnih i kvantitavnih metoda za njihovo određivanje u različitim matriksima. Aflatoksin B₁ (C₁₇H₁₂O₆) kao i drugi aflatoksini slabo je rastvorljiv u vodi, a dobro se rastvora u umereno polarnim organskim rastvaračima (metanol, hloroform). Može se izolovati u obliku bezbojnih do bledo žutih kristala, visoke tačke topljenja oko 268 °C. Izuzetno je stabilno hemijsko jedinjenje koje može da izdrži procese prerade hrane i da se nađe u svim životinjskim hranivima i gotovo svim prehrambenim proizvodima. Hemijska struktura AFB₁ prikazana je na Slici 4.



Slika 4. Struktura AFB₁ u 3D prikazu

Toksikološki značaj AFB₁ se ogleda u višestrukoj pretnji, jer je snažan toksin, kancerogen, teratogen, mutagen i imunosupresivni agens. Kancerogena i citotoksična svojstva aflatoksina tj. uloga AFB₁ u razvoju primarnog kancera jetre (eng. *primary liver cancer* - PLC) kod ljudi je dokazana, a postoje podaci koji ukazuju da aflatoksini mogu uzrokovati tumore i u drugim organima, kao što su kolon i bubrezi (Williams i sar., 2004). Učestalost pojave PLC usled izloženosti ljudi aflatoksinima je povećana kod individua obolelih od hepatitisa B i/ili C zbog sinergističkog uticaja aflatoksina i virusa prouzrokovaca hepatitisa na razvoj karcinoma jetre (Moss, 2002). AFB₁ se metaboliše u jetri preko enzimskog sistema citohroma P450 do glavnog kancerogenog metabolita AFB₁-8,9-epoksida ili manje mutagenih oblika kao što su AFM₁, AFK₁ ili AFP₁ (Crespi i sar., 1991). Ekso-oblik AFB₁-8,9-epoksida se lako vezuje za ćelijske makromolekule, uključujući genetski materijal (proteini i DNK) formirajući AFB₁-N7 guanin adukte, što za posledicu ima oštećenje DNK, mutacije i tumorozne promene.

Bolesti koje uzrokuju aflatoksini nazivaju se aflatoksikoze. Akutne aflatoksikoze se javljaju usled izloženosti visokim koncentracijama aflatoksina pri čemu simptomi mogu uključiti hemoragiju, akutna oštećenja jetre, edem, poremećaje u apsorpciji i/ili metabolizmu hranljivih sastojaka i mogu dovesti do smrti (Varga i sar., 2009). Učestaliju opasnost izaziva dugotrajna hronična ekspozicija aflatoksinima koja može uzrokovati hronične bolesti i maligne tumore jetre.

Aflatoksini B₁ i B₂ se u mlečnim žlezdama sisara transformišu u aflatoksine M₁ i M₂, koji se mogu naći u mleku i mlečnim proizvodima. Budući da je stabilan tokom pasterizacije i sterilizacije mleka i mlečnih proizvoda, izloženost relativno malim količinama AFM₁ može značajno narušiti ljudsko zdravlje, naročito dece koja su glavni konzumenti mleka i mlečnih proizvoda (Cavaliere i sar., 2006).

Aflatoksin B₁ je prema klasifikaciji Internacionalne agencije za ispitivanje kancera (eng. *International Agency for Research on Cancer* - IARC) uvršten u prvu grupu, u kojoj se nalaze jedinjenja sa dokazanim izrazito kancerogenim efektom (IARC, 1993). Usled povećanog broja istraživanja i dokazane kancerogenosti, kasnijom evaluacijom i ostali aflatoksini, AFB₂, AFG₁, AFG₂ i AFM₁ su uvršteni u jedinjenja prve grupe kancerogena (IARC, 2002). Pored dokazanog kancerogenog efekta i sposobnosti aflatoksina da prouzrokuju čitav niz negativnih efekata u organizmu ljudi, još uvek nije određen dozvoljeni dnevni unos aflatoksina (eng. *tolerable daily intake* - TDI), ali se smatra da svaki unos aflatoksina veći od 1 ng/kg telesne mase (TM) predstavlja rizik od pojave kancera jetre (JECFA, 1998).

2.3.5. Procena izloženosti populacije aflatoksinu B₁ i zakonske regulative

S obzirom da je kontrolu pojave mikotoksina u gotovim proizvodima praktično nemoguće vršiti u potpunosti, regulatorna tela kontinuirano procenjuju nivo prihvatljive izloženosti ljudi pojedinim štetnim delovanjima koje izazivaju mikotoksini, koristeći proces analize rizika kako bi se utvrdili dozvoljeni dnevni unosi. Analiza rizika je naučno zasnovan proces koji uključuje tri odvojena, ali sistemski povezana elementa: procenu rizika, upravljanje rizikom i međusobnu komunikaciju svih učesnika u lancu ishrane. Procena rizika se zasniva na procenama opasnosti ili toksičnosti izazvanim mikotoksinima, kao i očekivanog stepena izloženosti pojedinca ili cele populacije, što rezultira uspostavljanjem regulatornih nivoa za pojedine mikotoksine.

U svetu važe zakonski propisi koji se odnose na mikotoksine i uglavnom se zasnivaju na toksikološkim i epidemiološkim podacima, kao i podacima o pojavi i distribuciji mikotoksina u hrani i hrani za životinje. Evropska komisija (eng. *European Commission* - EC) na nivou Evropske Unije i FDA (eng. *Food and Drug Administration*) na nivou SAD-a predstavljaju dve najrazvijenije institucije u svetu koje se bave ovim problemom. Pored pomenutih, Zajednički ekspertski komitet Svetske zdravstvene organizacije za aditive hrane (JECFA), naučno savetodavno telo Svetske zdravstvene organizacije (WHO) i Organizacije za hranu i poljoprivredu (FAO), kao i Evropski organ za sigurnost hrane (EFSA), vrše izradu procene rizika na osnovu relevantnih naučnih dokaza u oblasti bezbednosti hrane. Navedene ustanove propisuju pravila kontrole mikotoksina u prehrambenim proizvodima i hrani za životinje, usvajaju pravilnike o maksimalno dozvoljenim koncentracijama (MDK) mikotoksina, o metodama koje se koriste pri njihovoj analizi, o pravilima uzorkovanja i pripremi uzoraka, kao i razna druga pravila i propise. Treba naglasiti da se posebna pažnja posvećuje procedurama uzorkovanja, imajući u vidu heterogenu distribuciju mikotoksina. U ranijem periodu, kontrolne mere bile su uglavnom fokusirane na aflatoksine, zbog dokazane toksičnosti i kancerogenih svojstava. Zakonska regulativa je prvobitno uspostavljena u industrijalizovanim zemljama, a propisi su često imali savetodavni ili usmerivački karakter. Vremenom je broj zemalja sa zakonskim propisima o dozvoljenim količinama mikotoksina porastao sa 33 u 1981. godini (Schuller i sar., 1983) na 100 u 2003. godini (FAO, 2004) za 13 različitih mikotoksina ili grupa mikotoksina. Do kraja 90-ih godina prošlog veka, uspostavljanje propisa koji se odnose na mikotoksine uglavnom je bilo nacionalnog karaktera. Kao posledica toga, maksimalno dozvoljene koncentracije (MDK) pojedinih mikotoksina su se razlikovale među zemljama. Izveštaj Radne grupe Saveta za poljoprivredne nauke i

tehnologiju (CAST), SAD, objedinio je informacije o skoro 80 zemalja širom sveta, gde se pominje da MDK za aflatoksine u 1997. godine variraju od 0 do 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (CAST, 2003). Zakonske regulative se stalno evaluiraju i unapređuju, shodno naučnim saznanjima i tehnološkim dostignućima. Usklađivanjem regulativa se doprinosi prevazilaženju postojećih nacionalnih propisa, što omogućava olakšanu međutrgovinsku razmenu zemalja.

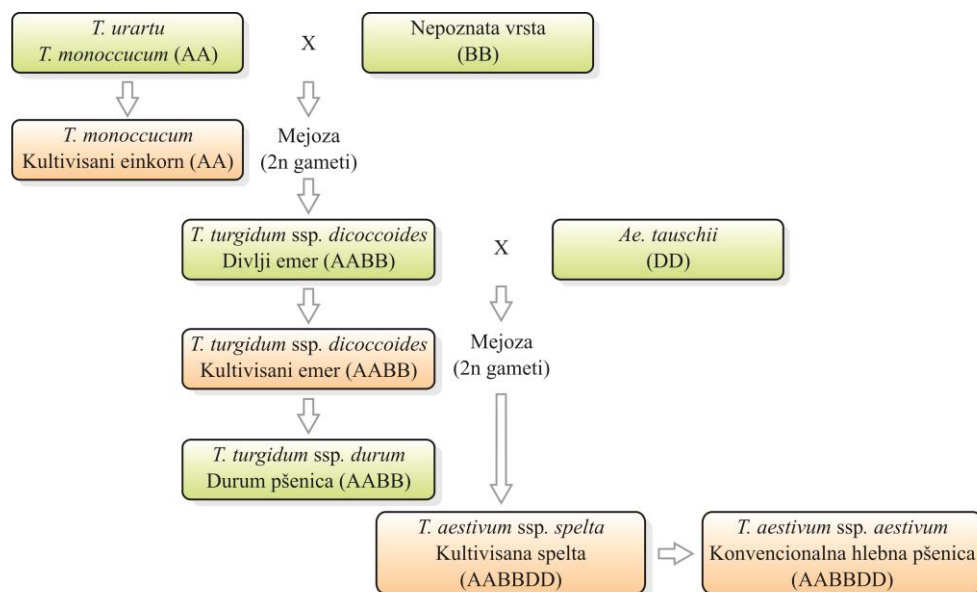
Brojni usevi često mogu biti kontaminirani aflatoksinima na nivou nanograma, mada se povremeno mogu javiti i veći nivoi kontaminacije (od desetina do stotina ng/g). Namirnice sa visokim rizikom od kontaminacije aflatoksinima uključuju kikiriki, kukuruz, seme pamuka, brazilske orahe, pistaće, začine, smokve. U namirnice sa srednjim rizikom kontaminacije ubrajaju se bademi i suvo grožđe, dok su orasi, pšenica, soja, pasulj, sirak, proso, zob, ječam i pirinač do sada smatrani manje podložnim kontaminaciji aflatoksinima (CAST, 2003). Izloženost štetnosti po zdravlje ljudi koju uzrokuju aflatoksini manje više je ista širom sveta, osim onih populacija (npr. Kina, Tajland, Tajvan, Gambija), gde je zabeležen visok nivo infekcije hepatitisom B, što pojačava toksični efekat aflatoksina (Henry i sar., 2002; CAST, 2003). S druge strane, izloženost nije ista zbog varijacija u potrošnji hrane, starosti jedinke, sezonske i geografske varijacije, kao i usled kulturološke, verske i ekonomske različitosti. Kontaminacija žitarica aflatoksinima preovladava u manje razvijenim tropskim i subtropskim zemljama, gde su klimatski uslovi pogodni za rast plesni i proizvodnju toksina. Istraživanje objavljeno od strane EFSA ukazuje na realnu opasnost od pojave aflatoksina u žitima u evropskim zemljama u slučaju globalnog porasta srednjih godišnjih temperature (EFSA, 2012).

Na nivou Evropske Unije postoji jedinstven pravilnik koji propisuje MDK za mikotoksine u prehrambenim proizvodima (European Commission, EC/1881/2006) i hrani za životinje (2002/32/EC). Od 2006. godine do danas usledilo je nekoliko izmena navedenog Pravilnika. Prema ovom Pravilniku važe različite granične vrednosti između 2 i 12 $\mu\text{g}/\text{kg}$ za aflatoksin B₁ kao i između 4 i 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ za ukupne aflatoksine u zavisnosti od vrste prehrambenog proizvoda. Maksimalno dozvoljena količina AFB₁ u hrani za životinje je u opsegu od 5 do 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ za AFB₁ u zavisnosti od vrste, kao i životinje kojoj je hrana namenjena. U Republici Srbiji kontrola aflatoksina vrši se na osnovu Pravilnika o maksimalno dozvoljenim količinama ostataka sredstava za zaštitu bilja u hrani i hrani za životinje (Službeni glasnik RS, 21/2017) koji je usklađen sa navedenim Pravilnikom Evropske Unije.

2.4. *Triticum* spp.- ZNAČAJ STARIH I NOVIH VRSTA

Konvencionalna, hlebna ili meka pšenica (*Triticum aestivum* L. em. Thell), heksaploidna vrsta (AABBDD, $2n = 6k = 42$), smatra se jednom od najvažnijih kultura, sa svetskom proizvodnjom od 749 miliona tona u 2016. godini, što ju je, posle kukuruza (1.060 milijardi tona), do sada činilo drugom kulturom u svetu po proizvedenoj količini (FAOSTAT, 2018). U mnogim zemljama pšenica se koristi kao osnovna namirnica, najčešće u obliku hleba i predstavlja vodeći izvor biljnih proteina u ljudskoj ishrani snabdevajući gotovo 20% ukupnih proteina u ishrani širom sveta (Braun i sar., 2010). Procenjeno je da se skoro dve trećine ukupne proizvodnje pšenice koristi u ljudskoj ishrani, a preostala trećina se koristi za stočnu hranu, semenje i neprehrambene proizvode. Durum (*Triticum turgidum* L. ssp. *durum* Desf.) je tetraploidna pšenica (AABB; $2n = 4k = 28$) koja se najčešće koristi za proizvodnju testenine. Stare plevičaste vrste pšenice (plevičaste forme), kao što su einkorn (*T. monococcum* L.), emer (*T. turgidum* L. ssp. *dicoccum* Schrank ex Schubler) i spelta (*T. aestivum* ssp. *spelta* L.) sadrže različit broj setova hromozoma: dva (diploidi - $2k$), četiri (tetraploidi - $4k$) odnosno šest (heksaploidi - $6k$). Korasan pšenica - kamut (*Triticum turgidum* ssp. *turanicum* Jakubz) jedna je od važnih tetraploidnih starih žita iz roda *Triticum* koja se i danas uzgaja. Konvencionalna pšenica je najrasprostranjenija vrsta koja čini 95% ukupne količine koja se uzgaja, dok durum čini preostalih 5%. Stare vrste se kultivišu u neznatnim količinama, uglavnom u proizvodnji tradicionalne hrane, s tim da uzgoj spelte poslednjih godina doživljava značajnu ekspanziju širom sveta. Plevičaste forme pšenice sa dugačkim stabljikama i klasovima i čvrstom plevom oko zrna bile su najstarije domestifikovane vrste, nastale spontanom ukrštanjem trava pre 10.000 godina tokom neolitskog doba. Ove vrste su odigrale ključnu ulogu u filogenezi modernih sorti pšenice (Slika 5). Jednostavna kultivacija, žetva i dugotrajni kapacitet skladištenja zrna pšenice omogućili su čoveku da uzgaja pomenute vrste i uvrsti ih u svakodnevnu ishranu. Globalna distribucija i upotreba pšenice je uglavnom posledica kvaliteta pšeničnog brašna i jedinstvenih reoloških osobina pšeničnog testa. Zbog svojih karakterističnih fizičko-hemijskih osobina, pšenični protein gluten daje testu dobra peciva svojstva.

Visoki prinosi sorti durum i hlebne pšenice doveli su do njihovog obimnog uzgoja i značajne zamene za stare vrste pšenice. Poslednjih godina, usled potrebe za divergentnošću useva, povećane potražnje za zdravim prehrambenim proizvodima i potvrđenim terapijskim svojstvima namirnica, javlja se ponovni interes za kultivaciju drevnih vrsta pšenice kao što su spelta, korasan, emer i einkorn.

Slika 5. Filogeneza *Triticum* vrsta (Arzani i Ashraf, 2017)

Brojna skorašnja istraživanja su pokazala da stare vrste usled dobrog nutritivnog sastava imaju i biološku vrednost, te pozitivno utiču na zdravstveno stanje organizma (Bakhøj i sar., 2003; Sofi i sar., 2010; Lachman i sar., 2013; Arzani i Ashraf, 2017; Dinu i sar., 2018). Globalno povećanje gojaznosti i metaboličkih bolesti povezanih sa ishranom rezultiralo je velikim interesovanjem za upotrebu starih vrsta žitarica u ishrani. Nedavno objavljene studije sugerišu da bi današnja ishrana trebala da bude slična onoj iz paleolitskog doba, koja je bila bogata ugljenim hidratima koji potiču iz podzemnih skrobnih gomolja kao što je krompir i iz skrobnih zrna pšenice, ječma, ovsa, raži, prosa i kukuruza (Hardy i sar., 2015; Solon-Biet i sar., 2016).

Pored značajnih nutritivnih svojstava, agronomske karakteristike starih vrsta ukazuju na pogodnost za održivu i ekološki prihvatljivu poljoprivrednu praksu, uz veće potencijale prinosa u marginalnim područjima i na višim nadmorskim visinama, kao i u uslovima organskog gajenja (Abdel-Aal i sar., 1998; Longin i Wurschum, 2016). Plevičaste vrste pšenice se mogu uzgajati pod nepovoljnim zemljišnim i klimatskim uslovima (Arzani, 2011). Znatno su otpornije na abiotičke i biotičke stresove kao što su bolesti, štetočine, suša, toplota, hladnoća, zagađenje i nedostaci hranljivih materija u zemljištu. Pored toga, pokazuju veću konkurentnost u suzbijanju korova (Loje i sar., 2003; Arzani, 2011; Hidalgo i Brandolini, 2014).

Spelta, poznata i kao krupnik ili pir (slika 6), najvažniji je predstavnik starih plevičastih vrsta, koja se morfološki razlikuje od hlebne pšenice po tankom, visokom stablu,

sa dugačkim, rastresitim klasovima bez osja (Onishi i sar., 2006). Zreli klasovi su sastavljeni od većeg broja klasića u kojima se nalaze dva do tri zrna koja su čvrsto obavijena plevičastim omotačima (Slika 6), pa prerada spelte uključuje i ljuštenje, tj. odvajanje zrna od ljuske, pa tek onda mlevenje. S obzirom na bogat nutritivni sastav, posljednjih godina došlo je do aktualizacije upotrebe spelte u cilju proizvodnje različitih prehrambenih proizvoda kao što su brašno, hleb, testenina, ekstrudirani i ekspanzirani proizvodi ili kao sirovine za proizvodnju slada, piva, votke i dr. (Cacak-Pietrzak i Gondek, 2010). Plevičasti omotači kod spelte čine 25-35% ukupne mase zrna (Medović, 2003), dok je kod hlebne pšenice taj udeo znatno manji (15-20%) (Bledzki i sar., 2012). Zaštitni efekat pleve ogleda se u otpornosti spelte na infekcije plesnima i zaštiti od kontaminacije mikotoksinima, kao i od ostataka pesticida i teških metala (Solaraska i sar., 2012). Pleva takođe doprinosi očuvanju svežine zrna tokom skladištenja. Plevičasti omotači, kao i materijal koji ostaje nakon odvajanja zrna od pleve, mogu se koristiti za različite namene kao što su proizvodnja punjenja za jastuke i dušeke (Mielke i Rodemann, 2007), kao obnovljiv izvor energije (Brlek i sar., 2012, Jovičić i sar., 2015, Wiwart i sar., 2017) ili kao hrana za životinje (Kalmendal i Bessei, 2012).



Slika 6. Spelta (*T. aestivum* ssp. *spelta*)

Jedna od starih *Triticum* vrsta koja je najduže u upotrebi za ljudsku ishranu je staroegipatska pšenica – kamut (Slika 7). Korasan pšenica poznata kao kamut je stara sorta koja je prirodnom otpornošću na rigorozne uslove kultivisanja postala pogodna za gajenje, uz dobre prinose. Ova, nedavno ponovo otkrivena žitarica, bliski "rođak" današnje durum pšenice, uzgajana je pre više hiljada godina na području antičkih civilizacija Bliskog istoka i starog Egipta. Danas se svojim karakteristikama ističe kao važna i korisna namirnica, pa je dobila svoje zaštićeno ime Kamut®. Klas kamuta je dugačak i znatno rastresitiji u poređenju sa klasom obične pšenice, dok je zrno malo zakrivljeno i do dva, tri puta veće od zrna konvencionalnih sorti. Ova vrsta se pokazala kao znatno otpornija od obične pšenice na sušu, bolesti i štetočine. Zbog prehrambene vrednosti, ali i hipoalergenih svojstava sve više privlači interes naučnika i stručnjaka iz područja nutricionizma.



Slika 7. Korasan pšenica (*Triticum turgidum* ssp. *turanicum*)

U proteklih 50 godina, primarni cilj savremenih programa oplemenjivanja pšenice je povećanje produktivnosti povećanjem prinosa. To je postignuto u velikoj meri poboljšanjem otpornosti na bolesti, smanjenjem visine biljaka i povećanjem indeksa biomase (Ortiz i sar., 2007; Trethowan i sar., 2007). Povećanje prinosa je od suštinskog značaja s obzirom na tendenciju porasta ljudske populacije u svetu. Međutim, nutritivni sastav gajenih kultura kao što je pšenica, posebno sadržaj mikroelemenata i kvalitet proteina pšenice, veoma je važan ali se često zanemaruje (Velu i sar., 2014). Brzim razvojem biotehnologije genetskog inženjersva omogućena je manipulacija genetičkim karakteristikama, čime se dobijaju sorte sa različitim osobinama, prinosom, hemijskim sastavom i otpornošću na bolesti (Arendt i Zannini, 2013). Klimatske promene imaju negativne efekte na prinos i kvalitet pšenice, stoga je od suštinskog značaja efikasna strategija za postizanje širokog biodiverziteta sorti pšenice i njihovo prilagođavanje promenljivom okruženju. Globalne klimatske promene takođe imaju brojne negativne efekte sa aspekta bezbednosti hrane, od kojih su najvažniji faktori degradacija zemljišta i pojačan uticaj biotičkih i, posebno, abiotičkih stresova (Lal, 2014; Arzani i Ashraf, 2016). Upotreba drevnih pšeničnih genetskih resursa kao komponente održivog agrobiodiverziteta može smanjiti rizike uticaja klimatskih promena na proizvodnju hrane. Takođe, značajna poboljšanja u stabilnosti prinosa useva se mogu postići upotrebom starih modifikovanih vrsta.

Poznato je da se moderne i stare vrste pšenice značajno razlikuju u pogledu sadržaja nutrijenata. Naučna saopštenja koja potkrepljuju ovu činjenicu proističu iz dugoročne studije koja je sprovedena u istraživačkom centru „*Rothamsted Research*“ u Velikoj Britaniji, što je kasnije potvrđeno kroz nekoliko drugih istraživanja koja ukazuju na značaj starih i modernih sorti (Fan i sar., 2008; Shewry i sar., 2016). S tehnološkog aspekta, stare vrste pšenice su

superiornije od modernih u pogledu većeg sadržaja nutritivno vrednih komponenti (Garvin i sar., 2006; Shewry i Hey, 2015; Boukid i sar., 2018; Shewry, 2018).

Karakteristike kvaliteta zrna, uključujući i sadržaj proteina, variraju među *Triticum* vrstama, ali su pod snažnim uticajem agronomskih faktora i lokaliteta gajenja (Ashraf, 2014; Arzani i Ashraf 2016). Komparativni pregled hemijskog sastava *Triticum* vrsta prikazan je u Tabeli 4. Sadržaj proteina zrna starih vrsta je znatno veći u poređenju sa modernim konvencionalnim vrstama pšenice (Abdel-Aal i sar., 1995; Ranhotra i sar., 1995; Loje i sar., 2003; Brandolini i sar., 2008; Shewry i sar., 2013). Veći sadržaj proteina ukazuje i na veći sadržaj slobodnih aminokiselina (Claus i sar., 2006). Brojne studije su pokazale da ne postoji ili je neznatna razlika u sadržaju ukupnih ugljenih hidrata, skroba i monosaharida starih i novih *Triticum* vrsta (Mohammadkhani i sar., 1998; Rodriguez-Quijano i sar., 2004; Brandolini i sar., 2008; Caballero i sar., 2008; Haghayegh i Schoenlechner, 2010). Povećan sadržaj skroba može dovesti do smanjenja ostalih hranljivih komponenti zrna pšenice. U pogledu sadržaja lipida, stare vrste karakteriše veći sadržaj nezasićenih masnih kiselina (Bodroža-Solarov i sar., 2014).

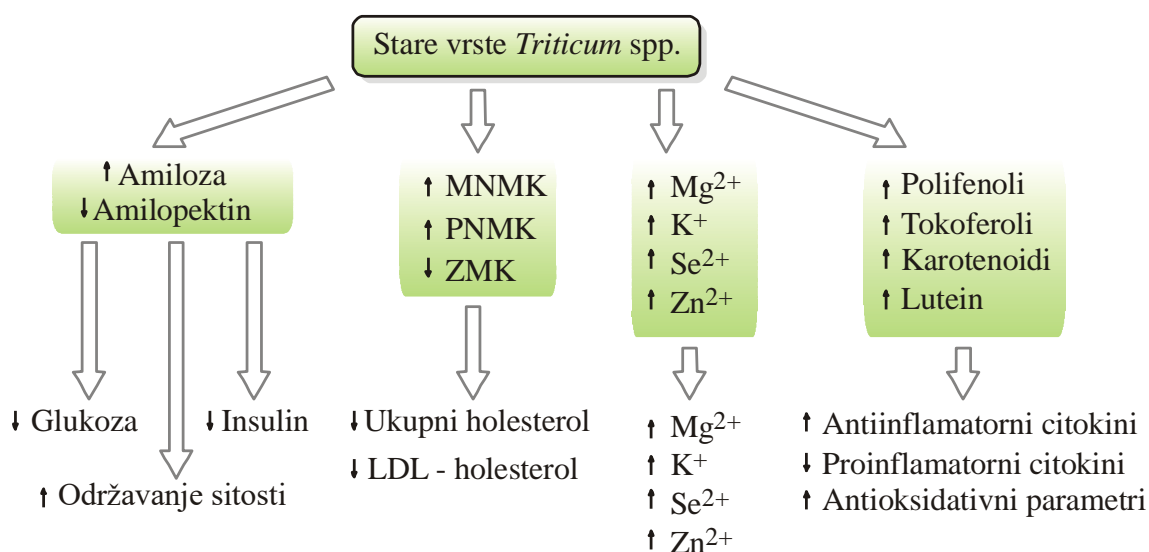
Osim glavnih sastojaka (proteina, ugljenih hidrata i lipida), zrno pšenice je važan izvor drugih biološki važnih nutrijenata, posebno vitamina i antioksidanata, kao i makro- i mikrohranljivih materija (Suchowilska i sar., 2012; Hidalgo i Brandolini 2014). Gvožđe, cink, bakar, selen, mangan i fosfor su elementi koji se javljaju u proseku 30-60% većim koncentracijama u starim *Triticum* vrstama u poređenju sa modernim vrstama hlebne pšenice (Zieliński i sar., 2008; Ruibal-Mendieta i sar. 2005; Escarnot i sar., 2012). Koncentracioni nivoi minerala korasan pšenice veći su 8 do 9 puta u odnosu na konvencionalnu pšenicu (Abdel-Aal i sar., 1998). Za razliku od modernih vrsta, stare vrste pšenice su superiornije u sadržaju bioaktivnih jedinjenja kao što su karotenoidi, flavonoidi, fitosteroli i fenolna jedinjenja (lignin i ferulinska kiselina) što ukazuje na njihove potencijalne zdravstvene koristi (Charmet, 2011; Giambanelli i sar, 2013). Zbog visoke hranljive vrednosti stare *Triticum* vrste postaju veoma značajne u proizvodnji širokog asortimana proizvoda – hleba, peciva, pasti, krepera i ekstrudiranih proizvoda na bazi ovih žitarica.

Tabela 4. Komparativni pregled hemijskog sastava *Triticum* vrsta (spelta, korasan, hlebna i durum pšenica)

Komponenta (izraženo na s.m.)	Spelta pšenica	Korasan pšenica	Hlebna pšenica	Durum pšenica	Literaturni izvor
Energija (kal/100g)	324	337	340	339	USDA
Proteini (g/100g)	14,7	14,5	10,7	13,7	USDA
Ugljenihidrati (g/100g)	68	71	75	71	USDA
Lipidi	2,9	2,1	2	2,5	USDA
Vlakna	5,9	11,1	12,7	11,6	USDA
Ca (mg/100g)	17,6	22	34	34	USDA
Fe	3,1	3,8	5,4	3,2	USDA
Mg	157	130	90	144	USDA
P	417	364	402	508	Piergiiovanni i sar., 1997
K	433	403	431	435	Piergiiovanni i sar., 1997
Na	1	5	2	2	Ranhotra i sar., 1996; USDA
Se (*10 ⁻²)	0,58	4-8	0,18	0,23	Piergiiovanni i sar., 1997; Valli i sar., 2016
Zn	4,2	3,7	3,5	4,2	Ranhotra i sar., 1996;USDA
Vitamin A (μg/100g)	n.p.*	0,3	0	0	USDA
Vitamini grupe B ₁ , B ₂ , B ₃ (mg/100g)	B ₁ -0,38, B ₂ - 0,17, B ₃ -7,21	n.p.	n.p.	n.p.	Ranhotra i sar., 1996
Vitamin B ₆ (μg/100g)	n.p.	B ₆ -0,26	B ₆ -0,38	B ₆ -0,42	USDA
Vitamin C (μg/100g)	n.p.	0	0	0	USDA
Vitamin E (μg/100g)	n.p.	0,61	0	1,01	USDA

*n.p. - nema podataka

Studije izvedene na klinički zdravim pojedincima su pokazale da se konzumiranjem proizvoda dobijenih od starih vrsta pšenice poboljšavaju proinflamatorni i antioksidativni parametri, kao i glikohemijski i lipidni status (Slika 8). Isti efekti nisu zabeleženi nakon upotrebe proizvoda napravljenih od komercijalno dostupnih modernih sorti (Dinu i sar., 2018). Rezultati istraživanja Valli i sar. (2016) su pokazali da je ishrana zasnovana na upotrebi hleba od korasan pšenice (pod brendiranim imenom Kamut®) doprinela povećanju aktivnosti antioksidativnih jedinjenja, što je u vezi sa visokim sadržajem selena i polifenola. Biološki aktivna antioksidativna jedinjenja u ljudskom organizmu deluju putem različitih, složenih i sinergijskih mehanizama.



*MNMK- mononezasićene masne kiseline, PNMK- polinezasićene masne kiseline, ZMK- zasićene masne kiseline

Slika 8. Efekti i potencijalni mehanizmi komponenti starih *Triticum* vrsta na glikohemijske, lipidne, mineralne profile, inflamatorna i oksidativna stanja organizma (Dinu i sar., 2018)

Korasan pšenica sadrži gluten, ali je, bez obzira na njegovo prisustvo, ispitivanjem zdravstvenih efekata u okviru dijetetskih interventnih studija utvrđeno da gluten kamuta dobro podnose mnogi, inače osetljivi na gluten iz pšenice (Valerii i sar., 2015). Vlakna ekstrahovana iz zrna kamuta su pokazala dobar prebiotski potencijal (Marotti i sar., 2012). Rastvorljiva vlakna, ekstrahovana iz zrna različitih sorti pšenice su korišćena kao jedini izvor ugljenika u medijumu za rast 2 bakterijska soja izolovana iz creva čoveka - *Bifidobacterium pseudocatenulatum* i *Lactobacillus plantarum*, pri čemu je prebiotski indeks korasan pšenice bio znatno veći u odnosu na prebiotski indeks drugih sorti pšenice.

2.5. UTICAJ PLESNI I MIKOTOKSINA NA PROMETNI I TEHNOLOŠKI KVALITET *Triticum* spp.

Usled karakterističnih fizičko-hemijskih osobina pšeničnog protein-lipid-ugljenohidratnog kompleksa - glutena, pšenično brašno daje testu jedinstvena i dobra viskoelastična svojstva koja omogućavaju proizvodnju širokog spektra prehrambenih proizvoda visokog kvaliteta. Vrednosti pokazatelja prometnog i tehnološkog kvaliteta pšenice moraju da zadovoljavaju određene kriterijume koji na direktan ili indirektan način utiču na kvalitet i upotrebu krajnjeg proizvoda. Nizak tehnološki kvalitet zrna pšenice predstavlja ograničavajući faktor za preradu i izvoz pšenice, te u velikoj meri utiče na nacionalnu i međunarodnu ekonomiju. Pored negativnih uticaja na zdravlje ljudi i životinja koje mogu da prouzrokuju kontaminacije žitarica plesnima i mikotoksinima, uticaj ovih kontaminenata na prometni i tehnološki kvalitet žitarica se ogleda u narušavanju senzornih i nutritivnih svojstava krajnjih proizvoda (Kosiak i sar., 2004). S obzirom na navedeno, nije retka pojava da se mlevenjem mešaju zrna pšenice različitog kvaliteta, odnosno da se brašno lošeg tehnološkog kvaliteta meša sa visokokvalitetnim kako bi se dobilo brašno prihvatljivog tehnološkog kvaliteta.

Kvalitet pšenice prvenstveno zavisi od genetske pozadine – sortimenta, kao i uslova i lokacije gajenja (klimatski uslovi i zemljište). Iako se od brašna starih *Triticum* vrsta (spelta, korasan, emer) može proizvesti hleb relativno zadovoljavajućih karakteristika, kvalitet ipak nije sasvim uporediv sa onim napravljenim od brašna hlebne pšenice (Arzani, 2011; Frakolaki i sar., 2018). Kvantifikovanjem sadržaja i kvaliteta proteina u starim i savremenim vrstama pšenicama, Konvalina i sar. (2014) su zabeležili veći sadržaj proteina u zrnu starih vrsta, ali je kvalitet glutena bio inferiorniji u poređenju sa hlebnom pšenicom. To potvrđuju i istraživanja Pruska-Kedzior i sar. (2008) i Filipčev i sar. (2013) ukazujući na lošiji kvalitet glutena brašna od spelte, što ima za posledicu obrazovanje testa sa manjom stabilnošću i elastičnošću i većom lepljivošću u poređenju sa testom napravljenim od brašna hlebne pšenice, čiji je gluten indeks znatno veći. Ovakva reološka svojstva su posledica većeg sadržaja gliadina u glutenu spelte, odnosno glutenina u glutenu hlebne pšenice (Pruska-Kedzior i sar., 2008). S obzirom na bogat nutritivni profil starih vrsta, njihovim mešanjem sa brašnom hlebne pšenice dobijaju se pekarski proizvodi dobrog kvaliteta i raznovrsnih hranljivih svojstava.

Veliki broj istraživačkih studija pokazuje da mikološka kontaminacija pšenice dovodi do smanjenja prometnog i tehnološkog kvaliteta i gubitka pecivnih osobina pšeničnog brašna (Gärtner i sar., 2008; Schmidt i sar., 2016; Capouchová i sar., 2017; Khaneghah i sar., 2018).

Infekcija pšenice plesnima u fazi cvetanja biljke, dovodi do formiranja zrna koja su štura i imaju manju masu u poređenju sa “zdravim” zrnima (Prange i sar., 2005). U našoj zemlji, na osnovu Pravilnika o kvalitetu žita, mlinskih i pekarskih proizvoda i testenina, maksimalno dozvoljena količina crnih primesa u žitu u vidu oštećenih zrna usled truleži, napada plesni, bakterija ili nekih drugih uzroka i u vidu fuzarioznih zrna (zrna zaražena *Fusarium* plesnima) je 3% (Službeni glasnik RS, 68/2016).

Poznato je da *Fusarium* vrste i njihovi toksini predstavljaju najučestalije kontaminente pšenice, pa se najveći broj istraživanja odnosi na negativan uticaj ovih plesni na tehnološki kvalitet pšenice (Gärtner i sar., 2008; Papoušková i sar., 2011; Khaneghah i sar., 2018). Smanjenje kvaliteta usled infekcije *Alternaria* vrstama navodi se u istraživanjima Lorenz (1986) i Đisalov i sar. (2018). Kao što je navedeno, zrna koja su inficirana plesnima u ranim fazama formiranja su uglavnom štura, što za posledicu ima redukovane vrednosti fizičkih parametara kvaliteta spelte, kao što su veličina zrna i masa 1000 zrna (Đisalov, 2015a). Istraživanja pokazuju da usled infekcije zrna pšenice plesnima dolazi do degradacije mrežaste strukture glutena (Dexter i sar. 1996; Prange i sar., 2005; Šarić i sar., 2008; Papoušková i sar., 2011). Infekcija pšenice plesnima *Aspergillus* spp. i *Penicillium* spp. je uticala na promenu kvaliteta glutena, što je imalo za posledicu ekstremno smanjenje maksimalne otpornosti i rastegljivosti testa, kao i smanjenje zapremine hleba nakon pečenja (Antes i sar., 2001). Energija testa dobijenog od brašna sa visokim nivoom infekcije *Alternaria* vrstama (60-70%) je relativno niska, što ukazuje na značajan pad tehnološkog kvaliteta usled prisustva plesni (Bagi i sar., 2005; Balaž i sar., 2005). Frakcije brašna dobijenog od zrna inficiranih sa *Fusarium* spp. i *Alternaria* spp. pokazale su manju moć upijanja vode i manju stabilnost tokom mešanja, kao i slabljenje proteinskog kompleksa tokom zagrevanja u odnosu na brašno pšenice tretirano sa fungicidima (Bodroža-Solarov i sar., 2012). Sadržaj proteina pšenice inficirane plesnima bio je veći od sadržaja neinficiranih frakcija što je bilo rezultat prisustva micelije plesni (Šarić i sar., 2008; Malaker i sar., 2009). Stepem pada tehnološkog kvaliteta pšenice zavisi od udela inficiranih zrna, ali i od faze razvoja zrna u kome je došlo do infekcije. U slučaju većeg udela pojedinih kategorija ovih primesa dolazi do značajnog smanjenja tehnološkog kvaliteta pšenice, čak do nivoa neupotrebljivosti za preradu. Nasuprot tome, Prange i sar. (2005) navode da infekcija pšenice *Fusarium* vrstama i njihovim mikotoksinima, kao što je deoksinivalenol, nije negativno uticala na kvalitet i pecivna svojstva pšenice, što je zabrinjavajuće s aspekta bezbednosti hrane, jer proizvodi dobrih tehnoloških parametara mogu biti visoko kontaminirani plesnima i mikotoksinima.

Ukoliko je nakon infekcije plesnima došlo i do biosinteze mikotoksina, spoljašnji delovi zrna su znatno više kontaminirani u poređenju sa središnjim delom, endospermom zrna (Abbas i sar., 1985). Početna koncentracija mikotoksina može se redukovati mlevenjem, uz odvajanje aleuronskog sloja, jer brašno i krupicu čine usitnjene čestice jezgra endosperma. Međutim, mekinje žitarica predstavljaju važnu frakciju sa nutritivnog aspekta, jer su bogate mineralnim materijama, vitaminima i prehrambenim vlaknima.

Budući da su dosadašnja istraživanja bila bazirana na uticaj tipičnih tzv. poljskih plesni (*Fusarium* spp., *Alternaria* spp.) na prometni i tehnološki kvalitet pšenice, podataka o uticaju *Aspergillus* vrsta još uvek nema dovoljno. Na osnovu nevedenih činjenica može se pretpostaviti da infekcija ovim plesnima dovodi do smanjenja kvaliteta pšenice u zavisnosti od nivoa infekcije i kontaminacije mikotoksinima.

2.6. POJAVA I UČESTALOST *A. flavus* I AFLATOKSINA U RAZLIČITIM *Triticum* spp.

Zbog svoje agronomske prilagodljivosti i sposobnosti da raste u različitim klimatskim oblastima, pšenica je podložna infekcijama mikotoksigenim plesnima kao što su rodovi *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* i *Alternaria* (Alkadri i sar., 2014). Iako *Fusarium* vrste i njihovi toksini predstavljaju najučestalije kontaminante pšenice, u poslednjih nekoliko godina i druge toksigene vrste plesni su postale važni izvori kontaminacije pšenice mikotoksinima. Pojava i intenzitet infekcije variraju u zavisnosti od klime koja se vezuje za geografski položaj neke oblasti, te se smatra da su aflatoksigene plesni najzastupljenije u tropskom i subtropskom regionu (Cotty i Jaime-Garcia, 2007).

Aflatoksini primarno predstavljaju problem na kukuruзу, jer se infekcija ove žitarice odvija na polju i u velikoj meri zavisi od ekoloških faktora. Faza od početka nalivanja zrna do sazrevanja kukuruza uobičajeno protiče od početka avgusta do kraja septembra u zavisnosti od sorte kukuruza. Biološka suma temperatura za kukuruz od setve do voštane zrelosti iznosi 2100 do 2900 °C. Pod biološkom sumom se podrazumeva suma srednjih dnevnih temperatura vazduha u vegetacionom periodu određene kulture od početka rasta do sazrevanja (Otorepec, 1980). Faza od klasanja do sazrevanja pšenice u optimalnim uslovima traje od 45 do 50 dana (period tokom maja i juna) i nakon nekoliko dana je biljka u fazi tehnološke zrelosti i spremna je za žetvu. Biološka suma temperatura vazduha za period setva – voštana zrelost za ozimu pšenicu je od 1400 do 1500 °C. Biološka suma temperatura je znatno veća za kukuruz nego za pšenicu, što objašnjava činjenicu da aflatoksini češće predstavljaju problem u kukuruзу nego u pšenici. Visoke temperature i odsustvo padavina pogoduju rastu aflatoksigenih plesni i sintezi

toksina. Ciklus razvoja plesni *A. flavus* u sistemu gajenja kukuruza je dobro poznat (Abbas i sar., 2009). *A. flavus* je ubikvitarna plesan, može se naći u različitim staništima, zemljištu, vazduhu i ostacima biljnog materijala. Sklerocije i konidije pri povoljnim spoljašnjim uslovima formiraju micelije koje dalje produkuju veliki broj konidija. Putem vetra ili insekata konidije bivaju nošene do kukuruza. Nakon kolonizacije plesni *A. flavus* na kukuruзу preko niti svile ili oštećenih zrna, plesan se može ponašati kao oportunistički patogen. U uslovima povišene temperature i smanjene količine vode, biljka postaje osetljivija i *A. flavus* će se dalje preko kanala svile prenositi do klasa i zrna kukuruza (O'Brian i sar., 2007).

O putu infekcije kod strnih žita na njivi do sada nema literaturnih podataka iz razloga što se plesni roda *Aspergillus* svrstavaju u tzv. skladišne plesni i njihova pojava, kao i produkcija toksina na njivi je do sada bila retka na području Srbije. Nekoliko naučnih saopštenja ukazuje na pojavu aflatoksigenih plesni i aflatoksina u *Triticum* vrstama u zemljama kao što su Maroko (Zinedinea i sar., 2007), Turska (Giray i sar., 2007), Alžir (Riba i sar., 2010), Egipat (El-Shanshoury i sar., 2014), gde preovlađuje suptropska i tropska klima. Sumirani podaci o rasprostranjenosti AFB₁ u *Triticum* spp. zabeleženim u svetu prikazani su u Tabeli 5.

Pored hlebne pšenice, druge *Triticum* vrste su bile predmet istraživanja na prisustvo toksičnih metabolita koje produkuju vrste roda *Fusarium* (Suchowilska i sar, 2010; Moudrý i sar., 2011; Wiwart i sar., 2016), *Penicillium* (Elmholt i Rasmussen, 2004) i *Alternaria* (Đisalov i sar., 2015b), međutim pojava *A. flavus* i aflatoksina je još uvek nedovoljno istražena. Studija Solarska i sar. (2012) je ukazala da je od ukupnog broja ispitanih uzoraka proizvoda od spelte sakupljenih u Poljskoj tokom 2010. i 2011. godine, 0,5 odnosno 2% sadržalo detektabilni nivo AFB₁.

Pojava infekcije *A. flavus* je bila retka u agroekološkim uslovima Srbije u proteklih 50 godina zbog čega je bio i nizak nivo aflatoksina u žitima (Lević i sar., 2013). Međutim, tokom poslednje decenije utvrđena je povećana zastupljenost plesni iz roda *Aspergillus* (Lević i sar., 2013; Krnjaja i sar., 2015), što je rezultovalo u neubičajeno visokim koncentracijama aflatoksina u kukuruзу na našim prostorima (Stefanović, 2014; Kos, 2015; Janić-Hajnal i sar., 2017). Za vegetacioni period pšenice do sada nisu bili karakteristični vremenski uslovi pogodni za biosintezu aflatoksina, te i literaturnih podataka o prisustvu aflatoksina u pšenici na području Srbije do sada nema, dok je podataka o pojavi *Aspergillus* vrsta na *Triticum* spp. vrlo malo.

Tabela 5. Distribucija AFB₁ u *Triticum* spp. u svetu

Zemlja	Godina	Broj uzoraka (n)	LOQ (µg/kg)	Broj uzoraka n>LOQ	Srednja vrednost (µg/kg)	Min/Max (µg/kg)	Literaturni izvor
Alžir	2004	3	0,005	2	-	-/3,41	Riba i sar., 2010
(Mitidja regija)	2006	13	0,005	8	-	-/13,45	Riba i sar., 2010
Alžir (Setif regija)	2004	2	0,005	1	-	0,87	Riba i sar., 2010
	2006	10	0,005	6	-	-/7,0	Riba i sar., 2010
Češka	2008	8	n.p.	0	-	-	Monbaliu i sar., 2009
Danska	2008	14	n.p.	0	-	-	Monbaliu i sar., 2009
Egipat	-	10	n.p.	0	-	-	El-Shanshoury i sar., 2014
Italija	2005	165	0,5*		1,0	n.p./1,7	Gallo i sar., 2008
	2006	203	0,5*		1,2	n.p./2,7	Gallo i sar., 2008
Kipar	1997	27	0,1*	0	-	-	Ioannou-Kakouri i sar., 2004
	1998	3	0,1*	0	-	-	Ioannou-Kakouri i sar., 2004
	1999/2003	30	0,2*	0	-	-	Ioannou-Kakouri i sar., 2004
Mađarska	2008	7	n.p.	0	-	-	Monbaliu i sar., 2009
Maroko	-	17	0,01	3	0,07	0,03/0,15	Zinedinea i sar., 2007
Rumunija	1997	25	4*	0	-	-	Curtui i sar., 1998
	2002/2004	35	5	n.p.	1,83	0/6,4	Tabuc i sar., 2009
	2005	26	0,83	9		0/5,7	Braicu i sar., 2008
	2005	20	n.p.	3	-	0/6	Morar i sar., 2007
Slovenija	2008-2012	80	0,2	0	-	-	Kirinčić i sar., 2015
Srbija	2012	30	1,0	0	-	-	Kos i sar., 2014a
Turska	2002/2003	41	0,1*	17	-	<0,01/0,14	Giray i sar., 2007
	-	43	n.p.	7	-	0,18/3,5	Gursoy i Bicici, 2003

*LOD jer vrednost LOQ nije dostupna; n.p.-nema podataka

Stojanović (1999) je ispitivao prisustvo plesni roda *Aspergillus* na uzorcima pšenice sa više lokaliteta (Kruševac, Kikinda i Pirot). Na lokalitetima Kruševac i Pirot nisu registrovani predstavnici roda *Aspergillus* ni u jednom uzorku pšenice. Na lokalitetu Kikinda mikopopulacije ovog roda su nađene kod 9% uzoraka, od čega su 5,3% bili toksigeni predstavnici, i to sa sposobnošću biosinteze aflatoksina (Stojanović, 1999). Visoka učestalost *A. flavus* (45,8%) na zrnju pšenice zabeležena je 2012. godine, kao posledica visokih temperatura i ekstremnih sušnih uslova tokom leta. Ispitivanjem pojave i toksigenog potencijala sojeva izolata *A. flavus* sa uzoraka pšenice sakupljenih nakon žetve 2015. godine, utvrđeno je da su neki pokazali potencijal za biosintezu AFB₁ (Krulj i sar., 2016b). Tokom preliminarnih istraživanja u okviru ove disertacije dato je prvo naučno saopštenje o pojavi *A. flavus* na spelti u Srbiji (Krulj i sar., 2017), što je ukazalo na potrebu za dodatnim istraživanjem, sa ciljem da se preko dobijenih novih saznanja da doprinos već postojećim i smanji rizik mogućnosti pojave aflatoksina, s tim i njihovo višestruko štetno dejstvo.

2.7. KLIMATSKE PROMENE – PROCENA RIZIKA POJAVE *A. flavus* I AFB₁ U RAZLIČITIM VRSTAMA *Triticum* spp.

Aflatoksigene plesni i aflatoksini se uglavnom javljaju kao kontaminanti u umereno kontinentalnim, subtropskim i tropskim regionima, kao što su zemlje Južne Amerike, Azije, Afrike, južna područja SAD i neki delovi Australije. Vremenski uslovi tokom perioda vegetacije žitarica znatno utiču na prinos useva. Raspored i količina padavina posebno u vegetacionom periodu, kao i srednje mesečne temperature, pored prinosa, utiču i na intenzitet infekcije žitarica plesnima. Poslednjih godina na globalnom nivou prisutne su značajne klimatske promene praćene ekstremno visokim ili niskim temperaturama, pojavama velikih i obilnih kiša sa poplavama ili pojavama velikih suša. Ovakvi stresogeni faktori značajno doprinose povećanju fungalne infekcije i kontaminacije žitarica mikotoksinima. Pojava nekih mikotoksina u žitaricama u područjima u kojima se nisu ranije javljali je sve izraženija u poslednje vreme (Mašić, 2003). Klimatske promene značajno utiču na izmenjenu učestalost i intenzitet pojave aflatoksigenih plesni na žitaricama, jer topla klima favorizuje veću učestalost pojave *A. flavus*, te frekventniju pojavu S sojeva ove vrste, koji se smatra većim producentom aflatoksina (Mehl i sar., 2014). Klima Srbije je pretežno umereno-kontinentalna sa izraženim lokalnim karakteristikama, koje su rezultat razlika u reljefu, raspodele vazdušnog pritiska većih razmera, ekspozicije terena, prisustva rečnih sistema, vegetacije i urbanizacije određenog prostora.

Temperatura i vlažnost supstrata određuju pojavu i stepen kontaminacije mikobiotama. *A. flavus* koji sintetiše samo aflatoksine grupe B. Prisutan je na usevima u skoro svim područjima, dok *A. parasiticus* i *A. nomius*, producenti oba tipa aflatoksina (B i G grupa) karakteristični su samo za određene regione. Iako se *A. flavus* može izolovati u svim klimatskim zonama, češće se javlja u umereno toplim zonama (geografske širine 26-35°), nego u tropskim ili umereno hladnijim zonama (geografske širine iznad 45°). S obzirom na to, nije čudno što se problemi vezani sa aflatoksinima javljaju u predelima sa geografskom širinom ispod 35° i generalno do sada nisu predstavljali značajan problem na žitaricama gajenim u Evropi (Klich, 2007a). U regionima sa umerenom klimom, kontaminacija može postati problem tokom suše (Cotty i Jaime-Garcia, 2007). Tačna uloga visoke temperature i suše na pojavu i intezitet infekcije žitarica nije u potpunosti razjašnjena. Visoka temperatura i suša utiču na fiziologiju biljaka, koje pod stresnim uslovima bivaju podložne infekciji plesnima i sintezi aflaktoksina.

Sve izraženija pojava aflatoksina u žitaricama pod uticajem klimatskih promena je zabeležena u nekoliko skorašnjih studija (Medina i sar., 2014; Battilani i sar., 2016; Gilbert i sar., 2016; Wu i Mitchell, 2016; Moretti i sar, 2018). Ova istraživanja ukazuju na uticaj sušnih uslova i povišenih temperatura vazduha na povećanu biosintezu aflatoksina i kontaminaciju žitarica ispitanih u kontrolisanim laboratorijskim uslovima ili pri realnim uslovima na polju (Diener i sar., 1987; Payne i sar., 1988; Piva i sar., 2006; Giorni i sar., 2007; Kos i sar., 2013; Pleadin i sar., 2014). Wu i sar. (2011) su objavili sveobuhvatan pregled na ovu temu, sa fokusom na uticaj klimatskih promena na kontaminaciju kukuruza patogenim plesnima. Kao relevantan primer ovi autori navode proizvodnju kukuruza u Srbiji. U leto 2012. godine zabeležena je najveća suša u Srbiji od kako se sprovodi praćenje vremenskih prilika (RHMZ, 2014). Broj dana sa temperaturom većom od 35 °C je bio skoro pet puta veći od proseka za prethodne tri godine. Rezultat je bio dramatičan porast kontaminacije kukuruza aflatoksinima, 68% ispitanih uzoraka kukuruza bilo je pozitivno za kontaminaciju (Kos i sar., 2013). Slično tome, 2003. godine u severnoj Italiji, Giorni i sar. (2007) su zabeležili pojavu kontaminacije kukuruza aflatoksinima, zbog povišene temperature i smanjenja padavina tokom letnjih meseci. Kontaminacija useva je rezultirala kontaminacijom mleka i mlečnih proizvoda aflatoksinom M₁ (metabolit aflatoksina B₁) (Giorni i sar., 2007; Kos, 2014b).

Imajući u vidu da su klimatske promene u poslednje vreme prisutne i na evropskom kontinentu, Agencija za bezbednost hrane (EFSA) je inicirala izradu istraživanja pod nazivom "Modelovanje, predviđanje i mapiranje pojave aflatoksina u žitaricama u EU usled klimatskih promena" (EFSA, 2012). Ova obimna studija ukazuje na realnu opasnost od pojave

aflatoksina u žitaricama usled globalne promene srednjih godišnjih temperatura. Na osnovu dostupnih literaturnih podataka, od ukupno 4 aflatoksina, AFB₁ je dominantno prisutan, pa je predmet ove studije bio fokusiran na pojavu AFB₁ u kukuruza, pšenici i pirinču. Iako rezultat gljivičnih oboljenja pšenice može biti pojava mikotoksina u zrnu, vrste roda *Aspergillus* su najčešće u vezi sa infekcijom kukuruza, pa su interakcije domaćin - patogen uglavnom proučavane u ovoj kulturi. S obzirom da interakcija *A. flavus* - pšenica nije dovoljno poznata, predloženo je da se analiza vrši uzimajući u obzir faktore koji utiču na rast i razvoj pšenice, a koji mogu da uslove infekciju aspergilima, a sa tim i biosintezu aflatoksina. Nekoliko naučnih publikacija opisuje put infekcije *A. flavus* na kukuruza (Scheidegger i Payne, 2005; Abbas i sar., 2009) koji je uporediv sa putevima infekcije *Fusarium* spp. (infekcija se odvija tokom cvetanja biljke i usled oštećenja useva prouzrokovanih insektima). Pod pretpostavkom da su procesi i faktori slični onima koji se javljaju kod kukuruza, put infekcije kod pšenice za *A. flavus* i *Fusarium* vrste takođe može biti uporediv. Infekcija pšenice sa *Fusarium* spp. se odvija tokom cvetanja i zavisi od vremenskih i agronomskih faktora. Do sada je razvijeno nekoliko modela širenja infekcije *Fusarium* vrsta u pšenici (Prandini i sar., 2009). Ovi modeli su iskorišćeni za kreiranje modela koji su prilagođeni infekciji aspergilima koristeći vremenske i agronomske faktore naznačene kao relevantne za ove plesni. Vrednosti parametara su prilagođene za *A. flavus* uzimajući u obzir minimalne i optimalne temperature, kao i a_w vrednosti za rast ove vrste i biosintezu aflatoksina. Definisani modeli su ukazali da postoji značajan rizik od pojave aflatoksina u zrnu kukuruza, znatno manji u zrnu pšenice, dok se za zrno pirinča pokazalo da nema rizika od pojave ovog toksina, ukoliko rast srednje godišnje temperature bude iznosio +2 °C ili +5 °C u pogođenim zemljama (EFSA, 2012).

Analiza rezultata klimatskih modela je pokazala da se u budućnosti očekuje porast temperature vazduha i smanjenje sume padavina u letnjem periodu vegetacije, što ukazuje na mogućnost povezanog fiziološkog stresa kod biljaka (Jančić, 2015). Očekivane povećane temperature vazduha će uticati na pojavu toplijih i blažih zima, ali i sušnijih letnjih meseci, zatim na uvećanje bioloških suma temperatura, posebno u letnjem periodu, što će imati za posledicu kraću vegetacionu sezonu, skraćenje perioda fiziološke faze nalivanja zrna i veću mogućnost pojave aflatoksigenih plesni i aflatoksina u pšenici. Trenutni programi adaptacije pšenice na novonastale klimatske promene u područja Evrope sa toplijim i sušnijim letima se zasnivaju na skraćanju vegetacione sezone, što smanjuje izloženost biljke stresu, ali rezultira manjim prinosima. Povećanja prinosa i adekvatan odgovor na klimatske promene uz povećanje tolerancije biljke na stres izazvan visokim temperaturama i sušom smatraju se glavnim prioritetima genetskog poboljšanja pšenice (Semenov i sar, 2014).

Slično globalnim i evropskim trendovima analize podataka ukazuju da je klima u Srbiji postala toplija u poslednjih 60 godina, suše su postale dugotrajnije idući od severa ka jugu Srbije (Tošić i Unkašević, 2014). Prema analizama izvršenim na nacionalnom nivou, period 1960 - 2012. godine karakterisao je trend porasta srednjih godišnjih temperature od 0,3 °C po deceniji. U zavisnosti od scenarija, do kraja veka može se očekivati povećanje temperature od 3,2 do 4°C, kao i deficit padavina od 20% (<http://www.klimatskastrategija.eu/>). Ove promene će pratiti intenzivni ekstremi – uglavnom temperaturni, što može doprineti učestalijim pojavama aflatoksigenih plesni i aflatoksina u hrani na našim prostorima.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. MATERIJAL

3.1.1. Ispitivani uzorci

Mikološka ispitivanja su obuhvatila uzorke zrna hlebne pšenice i spelte iz tri proizvodne godine (2015, 2016. i 2017) prikupljeni nakon žetve iz makroogleđa Poljoprivredne savetodavne službe AP Vojvodine sa više lokacija. Odabranim kulturama *A. flavus* izolovanim sa prikupljenih uzoraka, a koji su pokazali aflatoksigeni potencijal, veštački su inokulisane *Triticum* vrste na oglednim parcelama Instituta za ratarstvo i povrtarstvo u Rimskim Šančevima, Novi Sad. *Triticum* vrste su obuhvatile: hlebnu pšenicu (*Triticum aestivum* L.), speltu (*T. aestivum* ssp. *spelta* L.), korasan (*T. turgidum* ssp. *turanicum* Jakubz.) i hibrid pšenice (*Triticum aestivum* L.– F1). Takođe, odabranim izolatom *A. flavus* inokulisani su uzorci spelte (oljuštena zrna i zrna sa plevičastim omotačima) u laboratorijskim uslovima. Za potrebe ovog dela eksperimenta korišćena je neidentifikovana sorta spelte (*Triticum aestivum* ssp. *spelta*) poreklom iz Austrije, a dostupna na tržištu Srbije. Spelta je gajena pod ekološkim uslovima na gazdinstvu „Jeftić”, Bačko Gradište, Vojvodina, Srbija. Parametri prometnog i tehnološkog kvaliteta spelte su ispitani na uzorcima kontaminiranim sa AFB₁ uz poređenje sa kontrolnim (nekontaminirani) uzorcima.

3.1.2. Podloge za kultivaciju plesni

Za određivanje frekvencije i intenziteta pojave plesni korišćena je podloga DG18 agar (eng. *Dichloran 18% Glycerol agar*) (HiMedia, Indija).

Za izolovanje plesni kao čvrsta podloga korišćen je KDA (krompir dekstrozni agar) (HiMedia, Indija).

Za izolovanje roda *Aspergillus* korišćen je CZA podloga (Czapek-Dox agar) pripremljen rastvaranjem: 30 g saharoze, 2 g NaNO₃, 0,5 g MgPO₄, 0,35 g K₂SO₄, 0,5 g KCl, 0,01 g FeSO₄, 20 g agar u 1L destilovane vode, pH podešen na 5,6 (Jarak i Đurić, 2006).

Za razlikovanje *A. flavus* od drugih *Aspergillus* vrsta, kao selektivna čvrsta podloga korišćena je AFPA podloga (*Aspergillus flavus* i *parasiticus* agar) sledećeg sastava: 20 g ekstrakta kvasca, 10 g bakteriološkog peptona, 0,5 g fero amonijum citrata [(NH₄)₅Fe(C₆H₄O₇)₂] x 2H₂O, 1 mL dihlorana (0,2% stok rastvor u etanolu), 15 g agara rastvoreno u 1 L destilovane vode (Pitt i sar., 1983).

Za identifikaciju *Fusarium* vrsta korišćena je podloga SNA (eng. *Synthetic Nutrition Agar*): 1 g KH_2PO_4 , 1 g KNO_3 , 0,5 g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g KCl , 0,2 g glukoze, 0,2 g saharoze, 20 g agara rastvaranjem u 1 L destilovane vode. Sterilisana podloga je razlivena u petrijevke, a na površinu prohladene podloge u centar petrijevke je dodat sterilan filter papir veličine 1 cm^2 u cilju indukcije sporulacije (Nirenberg i O'Donnell, 1998).

Za dobijanje monospornih izolata *A. flavus* korišćen je 2% VA (Vodeni agar), dobijen rastvaranjem 20 g agara u 1 L vode.

U cilju ispitivanja potencijala biosinteze AFB_1 izolata *A. flavus* korišćena je YESA podloga (eng. *Yeast Extract Sucrose Agar*): 20 g ekstrakta kvasca, 150 g saharoze i 20 g agara u 1 L destilovane vode, finalno pH 6,5 (Samson i van Reenen-Hoekstra, 1988).

Ukupan broj plesni određen je primenom podloge MY50G (Sladni ekstrakt kvasac ekstrakt 50% glukoza agar): 20 g ekstrakta slada, 2,5 g ekstrakta kvasca, 10 g agara, 500 g glukoze rastvoreno 500 mL destilovane vode (Pitt i Hocking, 2009).

Sve mikrobiološke podloge su nakon pripreme sterilisane u autoklavu 20 min na 121 °C.

3.1.3. Hemikalije

Pored hemikalija korišćenih za pripremu mikrobioloških podloga, u radu su korišćene i sledeće hemikalije: acetonitril - HPLC čistoće (Merck, Nemačka), etanol (Merck, Nemačka), etil-acetat (Merck, Nemačka), fungicid Akord (Galenika-Fitofarmacija, Srbija), glicerol, p.a. čistoće (Zorka Pharma, Srbija), hloroform (Lach-Ner, Češka Republika), jod (Lach-Ner, Češka Republika), metanol - HPLC čistoće (Merck, Nemačka), mravlja kiselina - HPLC čistoće (Merck, Nemačka), natrijum hipohlorid ($\leq 5\%$ NaOCl , Tehnohemija, Srbija), toluen, p.a. čistoće 99,5% (Lach-Ner, Češka Republika), Tween 80 (HiMedia, Indija).

Test kitovi: DNA Isolation kit (Agilent Technologies, SAD), DNA 1000 Assay kit (Agilent Technologies, SAD), QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Nemačka), Paq5000 Hotstart PCR Master Mix (Agilent Technologies, SAD), prajmeri (Metabion International, Nemačka), Total Dietary Fiber Assay Kit (Megazyme, Irska).

Standardi aflatoksina: smeša ukupnih aflatoksina B_1 , B_2 , G_1 , G_2 (čistoće $> 99,9\%$), (Supelco, SAD).

Svi ostali reagensi i hemikalije upotrebljeni u eksperimentalnom radu bili su analitičke čistoće, poreklom od različitih proizvođača. Ultračista voda je dobijena korišćenjem Elix UV i Simplicity Water Purification System-a (Molsheim, Francuska).

3.2. MIKOLOŠKA ISPITIVANJA

3.2.1. Određivanje učestalosti i intenziteta pojave plesni na hleбноj pšenici i spelti

Učestalost i intenzitet pojave mikrobiota određeni su na uzorcima hlebne pšenice i spelte, prikupljenih posle žetve u regionu Vojvodine tokom tri proizvodne godine (2015, 2016. i 2017. godina). Od svakog uzorka hlebne pšenice i spelte izdvojeno je po 100 zrna za svako ponavljanje. Zrna su prvo površinski dezinfikovana potapanjem u 1% rastvor NaOCl uz mešanje u erlenmajer boci u trajanju od 5 min, a zatim isprana pod mlazom česemske vode u trajanju od 2 min i tri puta u sterilnoj destilovanoj vodi u trajanju od 2 min. Uzorci su prebačeni u sterilne petrijevke sa tri sloja filter papira i ostavljeni 1h da se prosuše. Nakon toga, 20 zrna po petrijevcu je postavljeno na podlogu DG 18 i inkubirano 7 dana u termostatu (Sutjeska, Srbija) pri temperaturi od 25 °C u mraku. Čiste kulture izolata dobijene su presejavanjem fragmenata micelija na KDA. U cilju morfološke identifikacije plesni do nivoa vrste, fragmenti micelija razvijeni na KDA podlozi su presejani na sledeće specifične podloge: SNA, AFPA i CZA. Mikroskopske morfološke identifikacije su izvršene prema sledećim ključevima za identifikaciju: Ellis (1971), Domsh i sar., (1980), Travassos i Lioyd (1980), Nelson i sar., (1983) i Samson i van Reenen-Hoekstra (1988). Učestalost (F) i intenzitet pojave (IP) plesni su izračunati na sledeći način (Lević i sar, 2013):

Učestalost F (%) = (Broj inficiranih uzoraka / Ukupan broj uzoraka) × 100;

Intenzitet pojave IP (%) = (Broj inficiranih zrna u uzorku / Ukupan broj zrna u istom uzorku) × 100.

3.2.2. Izolovanje i dobijanje monospornih izolata *A. flavus*

Kulture plesni *A. flavus* prečišćene su postupkom monospornog izolovanja (Leslie i Summerell, 2006) u cilju dobijanja čistih kultura koje su dalje korišćene za morfološku i molekularnu identifikaciju.

Za dobijanje monospornih izolata *A. flavus* korišćene su 7 dana stare kulture gajene na KDA podlozi. Fragmenti kolonija su preneti laboratorijskom ezom u epruvetu sa 10 mL slanog peptonskog bujona: 0,9% NaCl (Lach-Ner, Češka Republika) i 0,1% mesni pepton (HiMedia, Indija) uz dodatak Tween 80 (0,1%). Sadržaj epruvete je homogenizovan na vorteksu, a zatim je 1 mL ove suspenzije (razređenje 1:10) razliven na površinu podloge 2% Vodenog agara (VA). Nakon toga je iz epruvete sa gornjim razređenjem odmereno 1 mL suspenzije i sadržaj

je prenet u epuvetu sa 9 mL slanog peptonskog bujona, kako bi se dobilo razređenje 1:100. Nakon mešanja na vorteksu, 1 mL suspenzije razređenja 1:100 je razliven na površinu 2% VA podloge u drugu petrijevku. Suspenzije su kružnim pokretima razlivene po celoj površini podloge. Petrijevke su zatim inkubirane u mraku pod uglom od 45° u trajanju od 24 h, na temperaturi od 25 °C. Nakon inkubiranja, pregledom pomoću stereomikroskopa, sterilnom iglom isečeni su fragmenti podloge sa isklijalom sporom i preneti na KDA, zatim inkubirani sedam dana na 25 °C u mraku.

Dobijeni monosporni izolati su presejani u epruvete sa kosom podlogom KDA i inkubirani sedam dana na 25 °C u mraku, nakon čega su upakovani u plastične kese i čuvani u frižideru na +4 °C. U cilju revitalizacije izolata vršena je subkultivacija formirane kolekcije kultura svakih 6 meseci.

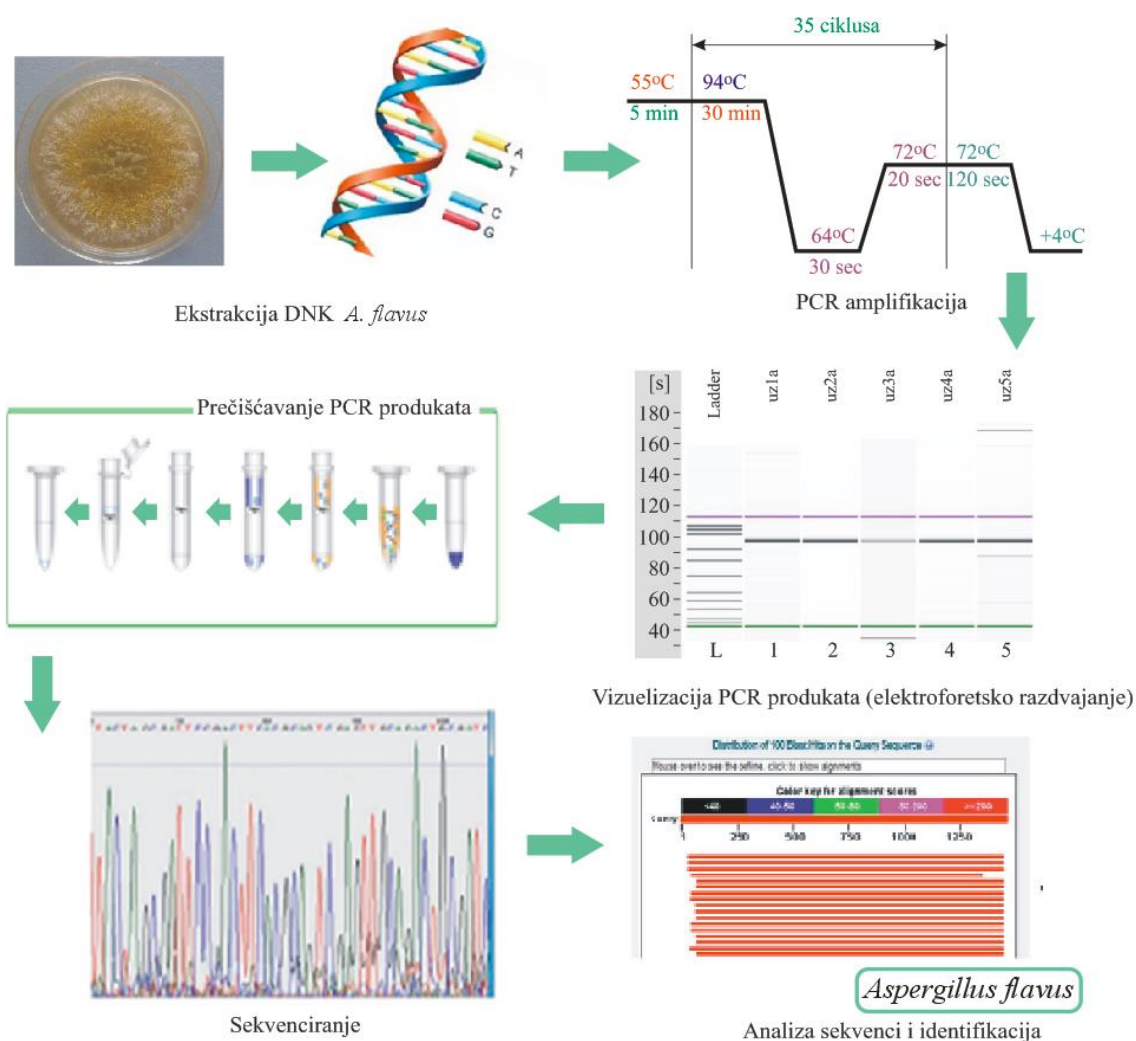
3.3.3. Identifikacija *A. flavus* na osnovu morfoloških osobina

Pri identifikaciji monospornih izolata ispitivane su makroskopske morfološke osobine (boja i intenzitet rasta kolonija, proizvodnja eksudata i rastvorljivih pigmenata, prisustvo sklerocija i dr.) kao i mikroskopske morfološke osobine (serijacija, oblik i veličina vezikula, način formiranja i izgled konidija). Morfološke odlike kultura *A. flavus* su posmatrane nakon sedam dana inkubiranja na KDA podlozi na 25 °C u mraku, ali i na podlogama specifičnim za identifikaciju *A. flavus*, kao što su CZA i AFPA. Izolati presejani na CZA su inkubirani 7 dana na temperaturi od 25 °C, dok su na AFPA podlozi inkubirani 3 dana na temperaturi od 30 °C posle čega su posmatrana makroskopska i mikroskopske karakteristike izolata. Mikroskopski preparat je pripremljen u kapi laktofenola u koju je nanet fragment kolonije ispitivanih izolata *A. flavus*. Tako pripremljen materijal je potom prekriven pokrovnim staklom i posmatran uz pomoć binokularnog mikroskopa B130 (Optika, Italija) pod direktnim uvećanjima od 10× do 40×. Morfološke identifikacije su izvršene prema identifikacionim ključevima Raper i Fennell (1965), Klich (2002), Pitt i Hocking (2009) i Samson i sar. (2010). Makro- i mikromorfološke karakteristike izolata upoređivane su sa referentnim sojem *A. flavus* ATCC 9643 (Microbiologics®, SAD), koji je aktiviran i čuvan prema uputstvu proizvođača.

3.3. MOLEKULARNA IDENTIFIKACIJA *A. flavus*

Metoda lančane reakcije polimeraze (eng. *Polymerase chain reaction* - PCR) kao najčešće korišćena metoda za molekularne detekcije i identifikacije vrsta plesni, primenjena je

za identifikaciju vrsta *Aspergillus* izolovanih sa zrna prikupljenih uzoraka pšenice i spelte. Odabrani izolati identifikovani su na osnovu analize DNK sekvenci dva genomska DNK regiona - ITS region i β -tubulin gena. Univerzalni prajmeri ITS1 i ITS4 (White i sar., 1990; Gardes i Bruns, 1993), koji umnožavaju segmente ITS1/5.8S/ITS2 regiona rRNK gena, korišćeni su u ovu svrhu. Pored ovog regiona, za filogenetske analize korišćen je β -tubulin, gen specifičan za identifikaciju *Aspergillus* vrsta umnožen parom prajmera Bt2a i Bt2b, kao i parom AflaFor i Bt2b. Kompletan postupak molekularne identifikacije vrste *A. flavus* primenjen u radu prikazan je na Slici 9.



Slika 9. Postupak molekularne identifikacije *A. flavus*

3.3.1. Ekstrakcija DNK

Ekstrakcija DNK je izvršena korišćenjem komercijalnog kita DNA Isolation kit (Agilent Technologies, SAD) po uputstvu proizvođača na sledeći način:

Za potrebe molekularne identifikacije *A. flavus*, svi izolati su zasejavani na KDA podlogu i inkubirani u mraku na temperaturi od 25 °C u trajanju od sedam dana. Iz svake kulture izolata *A. flavus* sterilnim špatulom sakupljeno je oko 60 mg micelije, pazeći da se izbegne unošenje fragmenata podloge u početni materijal za ekstrakciju. Micelija je zatim homogenizovana u sterilnom avanu uz dodavanje 500 µL NAC pufera (eng. *Nucleic Acid Binding*). Sadržaj je prebačen u sterilne mikrotube od 2 mL uz dodatnu homogenizaciju na vorteksu tokom 10 sekundi. Nakon toga, suspenzija je prebačena u DNK BSC kolonu sa filterom (eng. *Binding Spin Cup*), koja se nalazi u kolektorskoj tubici zapremine 2 mL. Filter u DNK BSC kolonama u procesu ekstrakcije ima ulogu da veže molekule DNK i da tako omogući njihovo izdvajanje. Uzorci su centrifugirani 1 min pri 14000 o/min nakon čega je tečna faza, propuštena kroz filter, odlivena. U svaki uzorak dodato je po 500 µL HSW (eng. *High Salt Wash*) pufera i ponovljen isti postupak centrifugiranja i odlivanja tečne faze. Usledilo je ispiranje etanolom kako bi se uklonile nečistoće koje su se pored DNK vezale za filter. Postupak dodavanja 500 µL 80% etanola, centrifugiranje 1 minut pri 14000 o/min i odlivanje tečne faze ponovljen je tri puta, s tim što je nakon trećeg ispiranja sadržaj centrifugiran pri 14000 o/min u trajanju od 2 minuta da bi se potpuno otklonili ostaci tečnosti. Na ovaj način uklonjene su sve nečistoće koje su se vezale za filter, a ostala je samo ekstrahovana DNK. Nakon centrifugiranja, DNK BSC kolona sa filterom je prebačena u novu tubicu sa poklopcem zapremine 1,5 mL i na filter je dodato 100 µL pufera za ispiranje (eng. *Elution buffer*). Uzorci su zatim inkubirani na sobnoj temperaturi 1 minut da bi se omogućilo oslobađanje DNK sa filtera. Posle inkubiranja usledilo je centrifugiranje od 1 minut pri 14000 o/min. Propuštena tečna faza koja je prošla kroz filter predstavljala je ukupnu izolovanu DNK koja je čuvana za dalje analize na -20 °C. Kvalitet i koncentracija izolovane DNK (ng/µL) provereni su na NanoDrop spektrofotometru 2000c (Thermo Scientific, SAD) merenjem apsorbance na talasnim dužinama $\lambda=230$ nm, $\lambda=260$ nm i $\lambda=280$ nm. U uzorcima kod kojih je dobijena visoka koncentracija DNK (100 ng/µl i više), pravljena su radna razblaženja od 50 ng/µl koja su korišćena u daljim analizama.

3.3. 2. Lančana reakcija polimeraze (PCR)

Sekvence prajmera korišćenih za PCR amplifikaciju su prikazane u Tabeli 6. Reakciona smeša je pripremljena u radnoj zapremini od 50 µL sledećeg sadržaja: 25 µL Paq5000 Hotstart PCR Master Mixa (Agilent Technologies, USA), po 1 µL svakog prajmera (100 pmol/µL, Metabion International, Deutschland), 1 µL ekstrahovane DNK (oko 20 ng/µL) i 22

μ L (PCR) dejonizovane vode. Kao negativna kontrola za detekciju kontaminacije korišćena je *DNase-free* voda (*Molecular Biology Grade Water*, Eppendorf, Nemačka) koja je dodata u pripremljenu PCR smešu umesto ciljane DNK.

Tabela 6. Sekvence prajmera korišćenih za PCR amplifikaciju u cilju identifikacije plesni

Naziv prajmera	Gen	Sekvenca prajmera	Veličina fragmenta	Literaturni izvor
ITS1	ITS region	5-TTCGTAGGTGAACCTGCGG-3	600 bp*	White i sar., 1990
ITS4		5-TCCTCCGTCTATTGATATGC-3		
AflaFor	β -tubulin/	5'- GTGTCCTGTTATATCTGCCACAT -3'	-	Barošević i sar., 2016
Bt2b	ITS region	5'- ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC -3'		
Bt2a	β -tubulin	5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3'	550 bp	Nasri i sar., 2007
Bt2b		5'- ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC -3'		

*bp – bazni parovi

Lančane reakcije polimeraze izvedene su na uređaju PCR Thermo Cycler (Sure Cycles 8800; Agilent Technologies, USA). Uslovi PCR reakcija su prikazani u Tabeli 7.

Tabela 7. Uslovi PCR reakcija za različite prajmere

Faza PCR reakcije	Prajmeri		ITS1/ITS4		AflaFor/Bt2b		Bt2a/Bt2b	
	T (°C)	t (s)	T (°C)	t (s)	T (°C)	t (s)	T (°C)	t (s)
Početna denaturacija	95	120	94	180	95	300		
Denaturacija	95	20	94	30	94	45		
35 ciklusa	Hibridizacija (vezivanje prajmera za matricu)	54	20	64	30	61	45	
	Elongacija (sinteza komplementarnih lanaca)	72	30	72	20	72	60	
Finalna elongacija	72	300	72	120	72	360		

3.3.3. Digestija PCR produkata restrikcionim enzimima

PCR produkti dobijeni sa prajmerima ITS1/ITS4 podvrgnuti su restrikcionoj digestiji enzimima *HhaI* i *MwoI* (Tabela 8) prema uputstvu proizvođača (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD). PCR produkti su inkubirani 1 h na 37 °C, digestija je izvršena u prisustvu 1 μ L 10X FD pufera (eng. *Fast Digest Buffer*) i 0,5 μ L FD enzima (eng. *Fast Digest*

Enzyme). Produkti digestije razdvojeni su automatskom *Lab-on-a-Chip* kapilarnom elektroforezom na 2100 Bioanalyzer-u (Agilent Technologies, SAD).

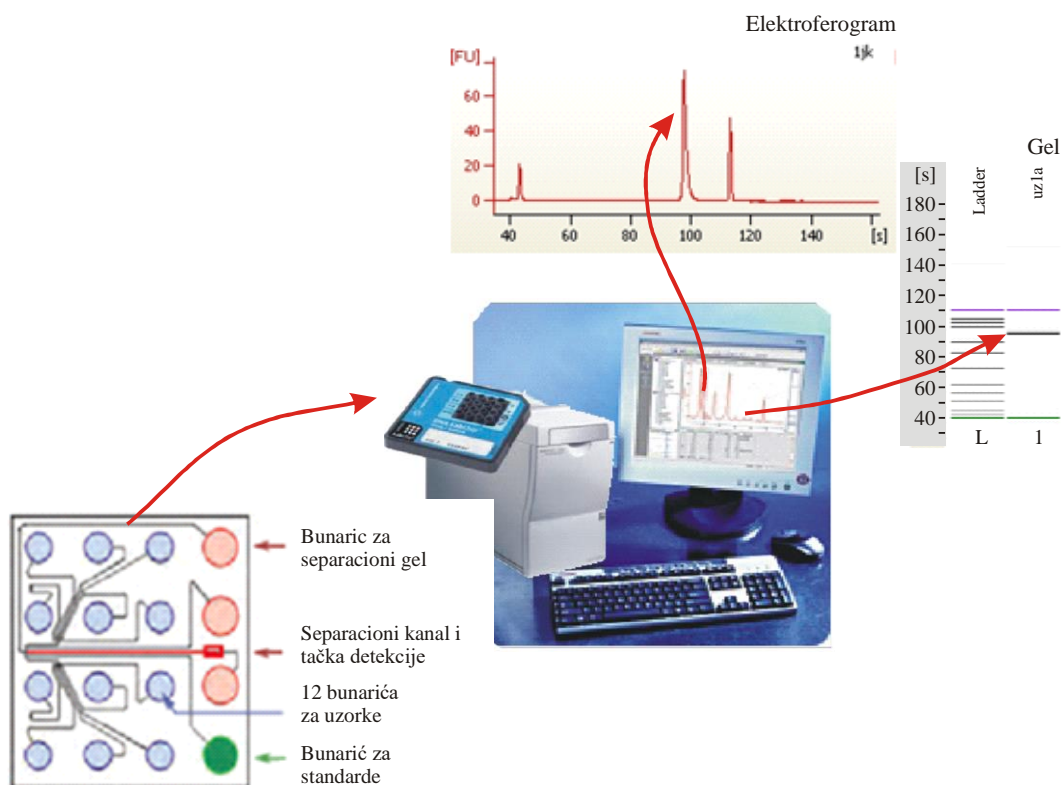
Tabela 8. Restrikcioni enzimi korišćeni za digestiju PCR produkata

Restrikcioni enzim	Restrikciono mesto
<i>HhaI</i>	5`-GCG*C-3` 3`-C*GCG-5`
<i>MwoI</i>	5`-GCNNNN*NNG-3` 3`-CGNN*NNNNNCG-5`

(*mesto sećenja lanca DNK; N-bilo koji nukleotid)

3.3.4. Vizuelizacija i analiza produkata PCR reakcije

Karakterizacija PCR produkata je izvedena postupkom elektroforetskog razdvajanja automatskom *Lab-on-a-Chip* kapilarnom elektroforezom, koristeći kit Agilent DNA 1000 (Agilent Technologies, SAD) prema uputstvu proizvođača. Sistem elektroforeze na 2100 Bioanalyzer-u (Agilent Technologies, SAD) je baziran na principima tradicionalne gel elektroforeze ali je pojednostavljen i prenet na formu čipa (Slika 10). Za vreme pripreme čipa, mikro kanali se pune polimerom i fluorescentnom bojom. Gel i boja se pod pritiskom razlivaju kroz kanale, a zatim se u bunariće nanose uzorci kao i smeša markera različitih dužina u opsegu od 25 bp do 1000 bp, koji obezbeđuju precizno izračunavanje veličine baznih parova dobijenih frakcija. Za identifikaciju PCR produkata uz uzorke je na gel nanošena i negativna kontrola (PCR reakcija bezgenomske DNK). Nakon popunjavanja bunarića, čip postaje električno kolo i elektrode aparata se uranjaju direktno u bunariće. Naelektrisani molekuli DNK se kreću u električnom kolu i razdvajaju se po dužini kroz mrežu pora formiranih u polimeru. Na osnovu standardne krive vremena putovanja fragmenata poznatih dužina u odnosu na samu dužinu određuje se dužina nepoznatih fragmenata na osnovu njihovog migracionog vremena. Dva dužinska markera (gornji i donji) se kreću sa svakim uzorkom ograničavajući opseg detekcije. Pozitivnom reakcijom smatrana je pojava traka produkata očekivane veličine (Tabela 6). Rezultati analize čip elektroforeze se mogu predstaviti na dva različita načina (Slika 10) - u vidu kvantitativnih profila (elektroferogrami) i u obliku virtualnog gela upotrebom odgovarajućeg softvera (eng. *DNA 1000 software assay on 2100 expert software*).



Slika 10. *Lab-on-a-Chip* kapilarna elektroforeza na 2100 Bioanalyzer-u

3.3.5. Prečišćavanje PCR produkata

Prečišćavanje PCR produkata izvedeno je upotrebom QIAquick PCR Purification Kit-a (Qiagen, Nemačka) prema uputstvu proizvođača:

Nakon PCR reakcije, 25 μL reakcione smeše i PCR produkta pomešano je sa 125 μL PB pufera i naneto na QIAquick kolonu smeštenu u kolekcionu mikrotubu zapremine 2 mL. Nakon centrifugiranja 60 sekundi pri 13000 r/min u cilju vezivanja DNK za filter, odlivena je tečna faza i dodato 750 μL PE pufera. Mikrotube sa smešom su centrifugirane 2 puta po 60 sekundi pri 13000 r/min , uz odlivanje tečne faze kako bi se ostaci pufera u potpunosti uklonili. QIAquick kolone su smeštene u nove mikrotube zapremine 1,5 mL, zatim je dodato 30 μL EB pufera. Nakon inkubiranja u trajanju od 60 sekundi na sobnoj temperaturi i centrifugiranja 1 minut pri 13000 r/min , sakupljen je eluat koji sadrži PCR produkte prečišćene od deoksinukleotida (dNTP) i prajmera zaostalih nakon PCR reakcije. Prečišćeni uzorci DNK su čuvani na 4 $^{\circ}\text{C}$ do kvantifikacije na NanoDrop spektrofotometru 2000c (Thermo Scientific, SAD) i pripreme za slanje na sekvenciranje.

3.3.6. Analiza sekvenci i identifikacija BLAST metodom

Umnoženi fragmenti DNK su nakon prečišćavanja poslani na sekvenciranje u oba smera na ABI 3730XL Automatic Sequencer-u Macrogen Europe Inc. (Amsterdam, Holandija). U cilju provere kvaliteta sekvenci i uklanjanja regiona koji nisu pouzdani korišćen je program Chroms Pro 2.1.8 softver (Technelysium Pty Ltd; DNA sequencing software). Sekvence su upoređene sa dostupnim sekvencama u NCBI bazi podataka (www.ncbi.nlm.nih.gov), pomoću Blast N alata (Altschul i sar., 1990; Zhang i Madden, 1997). Za svaku sekvencu, odabrani su izolati koji su pokazali najveću identičnost sa sekvencama naših izolata, na osnovu čega je izvršena identifikacija. Sekvence svih izolata su podnete u NCBI bazu podataka gde im je dodeljen pristupni broj (eng. *GenBank Accession Number*). Sve sekvence prikazane su u Prilogu 1.

3.4. ISPITIVANJE TOKSIGENOG POTENCIJALA IZOLATA *A. flavus*

Kvalitativna procedura trijaže za biosintezu AFB₁ izvršena je metodom tankoslojne hromatografije (TLC) primenom tankog sloja silika gela kao sorbenta, dok je kvantifikacija sintetisanog AFB₁ izvršena metodom HPLC tehnike.

3.4.1. Kvalitativna procedura skrininga za biosintezu AFB₁ - TLC analiza

Sposobnost sinteze AFB₁ izolata *A. flavus* ispitana je primenom jednostavne trijažne metode (Filtenborg i sar., 1983) kod koje su izvršene izvesne modifikacije u smislu tipa podloge i temperature inkubiranja (Bočarov-Stančić i sar., 2009a).

Izolati *A. flavus* su inkubirani na YESA podlozi u trajanju od 4 nedelje na 25 °C. Toksigeni potencijal je ispitivan nakon 14, 21 i 28 dana. Identifikacija AFB₁ vršena je TLC metodom na tankom sloju silica gela (ALUGRAM SIL G/ UV254, Macherey-Nagel, Nemačka) kao sorbenta. Na startnu liniju ploče dimenzija 20 × 20 cm je nanoseno do 30 µL radnog standarda AFB₁ koncentracije 2 µg/mL. Diskovi fragmenata plesni sa podlogom (po dva za svaku kulturu) su isečeni sterilnim staklenim bušaćem (prečnik 5 mm) zatim sterilnom pincetom postavljeni na TLC ploču. Jedan disk je postavljen na prethodno nanet standardni rastvor, a drugi pored bez dodatka standarda u cilju provere biosinteze. Na diskove podloge je dodato 20 µL rastvora hloroform/metanol (2:1 v/v) u cilju ekstrakcije AFB₁, nakon čega su uklonjeni ostaci podloge i micelija. Za razvijanje hromatograma korišćena je mobilna faza toluen/etil-acetat/mravlja kiselina (5:4:1, v/v/v). Sva razvijanja su vršena na sobnoj temperaturi (22 ± 2 °C) u mraku. Nakon razvijanja i sušenja, vršena je detekcija pod UV svetlom na 366 nm.

3.4.2. Kvantitativna potvrda biosinteze AFB₁ - HPLC analiza

Pozitivni rezultati dobijeni trijažnom TLC metodom potvrđeni su i kvantifikovani metodom HPLC na uređaju Agilent 1260 (Agilent Technologies, SAD) sa fluorescentnim detektorom (FLD). Podloga YESA prerasle plesnima *A. flavus* (10 g), nakon navedenog vremena inkubiranja, ekstrahovana je sa 50 mL rastvora hloroform/metanol (2:1, v/v) uz mešanje 30 min na magnetnoj mešalici. Nakon filtracije, 40 mL dobijenog ekstrakta je upareno do suva u struji azota pri temperaturi od 50 °C. Suv ostatak je rastvoren u 40 mL rastvora acetonitrila/vode (84:16, v/v) i čuvan na 4 °C - 6 °C (ne više od 7 dana) do prečišćavanja ekstrakta sa MycoSep[®]224AflaZon kolonama (Romer Labs Diagnostic GmbH, Austrija). Zapremina injektovanja je iznosila 20 µL, a razdvajanje AFB₁ je izvršeno na koloni Hipersil ODS C-18 (100 x 4.6 mm, 5 µm) (Agilent Technologies, SAD) pri temperaturi od 40 °C. Mobilna faza je bila rastvor voda/acetonitril (75:25, v/v) pri protoku od 1 mL/min. Detekcija AFB₁ na FLD detektoru je izvršena pri talasnim dužinama ekscitacije $\lambda_{ex}=365$ nm i emisije $\lambda_{em}=440$ nm. Ukupno vreme trajanja analize je bilo 10 min.

3.5. INOKULACIJA ODABRANIH VRSTA *Triticum* spp. SA *A. flavus* U POLJSKIM USLOVIMA

Ispitivanje otpornosti 4 vrste *Triticum* vrste: hlebne pšenice (*Triticum aestivum* L.), spelte (*T. aestivum* ssp. *spelt* L.), kamuta (*T. turgidum* ssp. *turanicum* Jakubz) i hibrida pšenice (*Triticum aestivum* L. – F1) na razvoj infekcije *A. flavus* i produkciju AFB₁ izvršeno je tokom 2016. godine. Veštačka inokulacija klasova je izvedena na oglednim parcelama Instituta za ratarstvo i povrtarstvo u Rimskim Šančevima, Novi Sad. U ispitivanja su bila uključena 2 izolata *A. flavus* No. 1 i *A. flavus* No. 2 koji su izolovani sa uzoraka hlebne pšenice sa područja Vojvodine nakon žetve 2015. godine (Krulj i sar., 2016a). Izolati korišćeni za inokulaciju u eksperimentu prethodno su testirani na potencijal biosinteze AFB₁ (Krulj i sar., 2016b). Pored veštačke inokulacije sa *A. flavus*, u tretmane je bila uključena destilovana voda, kao kontrola. Tretman fungicidom izvršen je upotrebom fungicida Akord (Galenika-Fitofarmacija, Srbija) - fungicid na bazi tebukonazola kao aktivne materije, koja prodirući u biljno tkivo inhibira sintezu ergosterola i na taj način sprečava razvoj plesni. Ogled je postavljen po metodu slučajnog blok sistema i četiri ponavljanja (Slika 11). Veličina elementarne parcele je iznosila 5 m², sa međurednim rastojanjem od 10 cm.

	Spelta	Hlebna pšenica	Korasan pšenica	Hibrid
<i>Aspergillus flavus</i> 1	1 ₁ S	1 ₁ P	1 ₁ K	1 ₁ H
	1 ₂ S	1 ₂ P	1 ₂ K	1 ₂ H
	1 ₃ S	1 ₃ P	1 ₃ K	1 ₃ H
	1 ₄ S	1 ₄ P	1 ₄ K	1 ₄ H
<i>Aspergillus flavus</i> 2	2 ₁ S	2 ₁ P	2 ₁ K	2 ₁ H
	2 ₂ S	2 ₂ P	2 ₂ K	2 ₂ H
	2 ₃ S	2 ₃ P	2 ₃ K	2 ₃ H
	2 ₄ S	2 ₄ P	2 ₄ K	2 ₄ H
Tretman fungicidom	3 ₁ S	3 ₁ P	3 ₁ K	3 ₁ H
	3 ₂ S	3 ₂ P	3 ₂ K	3 ₂ H
	3 ₃ S	3 ₃ P	3 ₃ K	3 ₃ H
	3 ₄ S	3 ₄ P	3 ₄ K	3 ₄ H
Kontrola (voda)	4 ₁ S	4 ₁ P	4 ₁ K	4 ₁ H
	4 ₂ S	4 ₂ P	4 ₂ K	4 ₂ H
	4 ₃ S	4 ₃ P	4 ₃ K	4 ₃ H
	4 ₄ S	4 ₄ P	4 ₄ K	4 ₄ H

*Sema označavanja za eksperiment u polju, X_yZ;

X-broj tretmana (1-*Aspergillus flavus* No. 1, 2 -*Aspergillus flavus* No. 2, 3 - tretman fungicidom,

4 – kontrolni tretman),

y - redni broj ponavljanja,

Z- *Triticum* species (S-spelta, P-hlebna pšenica, K-korasan pšenica, H-hibrid)

Slika 11. Šematski prikaz ogleda u poljskim uslovima

U cilju umnožavanja inokuluma, fragmenti micelija izolata *A. flavus* No. 1 i No. 2 su presejani na podlogu KDA i inkubirani 10 dana u termostatu na temperaturi od 25 °C. Na dan inokulacije, suspenzija inokuluma je pripravljena spiranjem spora sterilnom destilovanom vodom uz dodatak Tween 80 (0,1%). Dobijena suspenzija je profiltrirana kroz četvoroslojnu sterilnu gazu kako bi se uklonili ostaci fragmenata hifa. Koncentracija inokuluma je određena pomoću hemocitometra i u proseku se kretala oko 10⁶ infektivnih čestica/mL.

Inokulacija *Triticum* vrsta je izvršena u fazi punog cvetanja korišćenjem ručne prskalice. Uzete su u obzir fiziološke razlike *Triticum* spp., jer stare vrste pšenice cvetaju kasnije, odnosno kasnije sazrevaju u poređenju sa novim vrstama (Stallknecht i sar., 1996). Kontinualnim monitoringom različitih faza razvijanja *Triticum* vrsta, izvršena je procena faze punog cvetanja. Shodno tome, inokulacija spelte i kamuta je izvršena 31.5.2016., tj. petnaest dana nakon inokulacije hibrida i hlebne pšenice (16.5.2016). Inokulacija je ponovljena nakon sedam dana. Inokulisani klasovi su prekriveni prvo polietilenskim džakovima radi obezbeđivanja dovoljne vlažnosti za razvoj infekcije, a preko i papirnim džakovima radi zaštite od pregrevanja (Balaž i sar., 1992) (Slika 12).



Slika 12. Veštačka inokulacija *Triticum* vrsta u polju

U fazi pune zrelosti, žetva pšenice je obavljena ručnim skidanjem klasova, nakon čega su klasovi propušteni kroz laboratorijsku vršilicu radi oslobađanja zrna iz klasova. Izgled klasova *Triticum* vrsta veštački kontaminiranih kao i klasova iz kontrolnog tretmana i tretmana fungicidom nakon žetve prikazani su na Slici 13.

Vršidba i skladištenje su sprovedeni u skladu sa standardnom poljoprivrednom procedurom i dobrom profesionalnom praksom. Spelta ima specifične zahteve u pogledu odvajanja plevičastih omotača od zrna, tako da su uzorci spelte oljušteni laboratorijskom ljuštilicom (model MDF1, RePietro, Gaggiano, Italija) u Institutu Tamiš u Pančevu. Oljuštena zrna čuvana su odvojeno od plevičastih omotača na tamnom i suvom mestu.



Slika 13. Izgled klasova različitih vrsta *Triticum* spp. nakon žetve

Sa uzoraka veštački inokuliranih zrna, izvršeno je reizolovanje i dobijeni su monosporni reizolati *A. flavus* korišćenjem istih metoda kao pri izolaciji (Poglavlje 3.2.2.). Kolonije dobijenih reizolata su morfološki identifikovane kao *A. flavus*. Nakon mikrobiološke analize, ukupnog broja plesni i određivanja intenziteta pojave *A. flavus*, uzorci *Triticum* spp. su čuvani u papirnim vrećama na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do izvođenja daljih eksperimentalnih analiza.

3.5.1 Određivanje ukupnog broja plesni

Određivanje ukupnog broja plesni (UBP) izvršeno je prema horizontalnoj metodi za određivanje broja kvasaca i plesni (SRPS ISO 21527-2, 2011) uz modifikaciju (primenjena je podloga MY50G agar umesto podloge DG18).

3.5.2. Određivanje sadržaja AFB₁ primenom HPLC-FLD tehnike sa postkolonskom derivatizacijom

3.5.2.1. Priprema uzoraka

Uzorci su samleveni na laboratorijskom mlinu (KnifetecTM 1095 mill, Foss, Švedska), a zatim homogenizovani mešanjem. Tako pripremljeni uzorci su čuvani u papirnim vrećama na -20 °C do izvođenja eksperimentalnih analiza. Pre svake analize, uzorci su temperirani do sobne temperature.

3.5.2.2. Ekstrakcija i prečišćavanje AFB₁

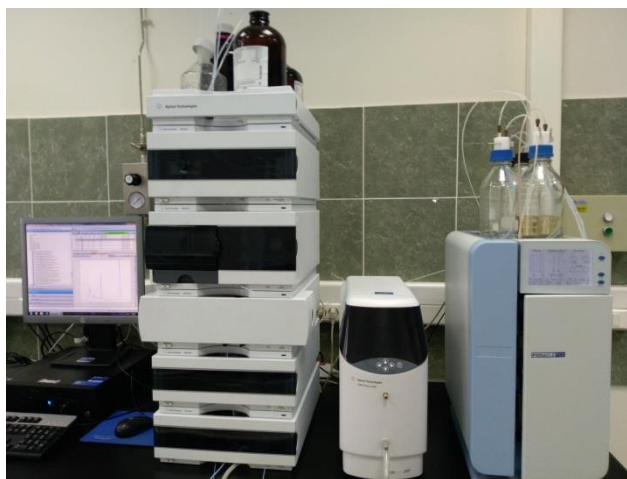
Odmereni uzorci (25±0,001 g) su ekstrahovani sa 100 mL smeše acetonitrila i dejonizovane vode (84:16, v/v) uz polučasovno mešanje na Griffin šejkeru (Griffin and George, Velika Britanija). Nakon toga, uzorak je profiltriran kroz filter papir Whatman No. 4 (Whatman International Ltd, Velika Britanija). Prečišćavanje filtrata je vršeno korišćenjem MycoSep[®]224AflaZon kolona prema uputstvu proizvođača (Romer Labs Diagnostic GmbH, Austrija).

Prečišćeni ekstrakt (2 mL) je prebačen u staklenu epruvetu i uparen do suva na ReactiTerm bloku (Reacti-Therm I#18821, Thermo Scientific, Bellefonte, USA). Nakon uparavanja uzorak je rastvoren u 0,4 mL mobilne faze (voda/metanol/acetonitril (60:20:20 v/v/v)) profiltriran kroz špic-filter od regenerisane celuloze (RC, 4 mm, 0.2 µm) (Agilent Technologies, Strathaven, Lanarkshire, Velika Britanija) i prebačen u vialu za dalju hromatografsku analizu.

3.5.2.3. Uslovi hromatografije

Hromatografske analize su izvedene na uređaju HPLC Agilent 1260 (Agilent Technologies Inc., Nemačka) opremljenim degazerom, kvaternom pumpom, injektorom za unošenje uzorka u sistem (eng. *autosampler*), termostatiranog dela za hromatografsku kolonu i fluorescentnim detektorom (FLD) (Slika 14). Razdvajanje AFB₁ izvršeno je upotrebom ZORBAX Eclipse Plus C18 kolona (4,6 × 100 mm, 3,5 µm) (Agilent Technologies Inc., SAD) pri konstantnoj temperaturi od 42 °C. Primenjen je izokratski režim eluiranja gde je mobilna faza bila smeša vode/metanola/acetonitrila (60:20:20 v/v/v) uz protok od 0,9 mL/min. Zapemina injektovanja iznosila je 10 µL. Nakon kolonskog razdvajanja uzoraka izvršena je derivatizacija na Pinnacle PCX uređaju (Pickering Laboratories, LCTehGmbH, Nemačka). Reagens korišćen za derivatizaciju je rastvor joda (100 mg joda/200 mL vode)

prema Evropskom standardu (CEN/EN 12955:1999). Zapremina reaktora je bila 1,4 mL, brzina protoka 0,3 mL/min i temperatura reaktora 85 °C. Detekcija AFB₁ na FLD detektoru je izvršena pri talasnim dužinama ekscitacije $\lambda_{ex}=365$ i emisije $\lambda_{em}=435$ nm. Hromatogrami su analizirani korišćenjem programa Chemstation LC software (Agilent Technologies Inc., SAD). Vrednosti granica detekcije (LOD) i granica kvantifikacije (LOQ) za AFB₁ su iznosile 0,4 odnosno 1,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Janić-Hajnal i sar., 2017).



Slika 14. HPLC sistem sa Pinnacle PCX uređajem za derivatizaciju

3.5.3. Određivanje fizičko-hemijskih karakteristika plevičastih omotača zrna *Triticum* spp.

3.5.3.1. Analiza strukture plevičastih omotača *Triticum* vrsta skenirajućom elektronskom mikroskopijom

Strukturne osobine plevičastih omotača su analizirane pomoću skenirajućeg elektronskog mikroskopa JSM-6460LV (SEM, JEOL Ltd., Japan) na 25 kV. Delovi plevičastih omotača su isečeni oštrim sečivom kako bi se minimalno narušila struktura uzorka. Priprema uzorka pre posmatranja podrazumevala je fiksiranje uzoraka na aluminijumski nosač i zamrzavanje tečnim azotom. Dehidrirani uzorci su sušeni do kritične tačke pomoću Critical Point Dryer 030 (BAL-TEC AG, Nemačka) i prevučeni tankim slojem zlata, raspršivanjem po površini uzorka (BAL-TEC SCD 005 sputter coater Balzers, Lihtenštajn). Posmatranje na elektronskom mikroskopu je izvedeno pri dva različita uvećanja: 20 \times i 200 \times .

3.5.3.2. Određivanje indeksa apsorpcije vode (WAI)

Indeks apsorpcije vode (eng. *water absorption index* - WAI) je određen prema metodi Anderson (1982) opisanoj u radu Bledzki i sar. (2010). U izmerenu epruvetu za centrifugu od 50 mL dodato je 30 mL destilovane vode i 2,5 g samlevenog uzorka koji je odmeren sa preciznošću od 1 mg. Nakon mešanja uzorka na Vortex mikseru 2 min, uzorak je centrifugiran 20 minuta na 3000 o/min. Supernatant je dekantovan, a istaloženi deo uzorka je izmeren i indeks apsorpcije vode WAI (g/g) je izračunat kao:

$$\text{WAI (g/g)} = \text{masa istaloženog uzorka (g)} / \text{masa uzorka (g)}$$

3.5.3.3. Sadržaj ukupnih (rastvorljivih i nerastvorljivih) prehrambenih vlakana

Sadržaj ukupnih, rastvorljivih i nerastvorljivih prehrambenih vlakana određen je po standardnoj AOAC (2000) metodi (Official Method No. 991.43). Metoda se zasniva na enzimatskom uklanjanju skroba i proteina iz uzoraka pri temperaturama od 90 °C odnosno 60 °C. Nerastvorljiva prehrambena vlakna se zatim odvajaju filtracijom, dok se rastvorljiva vlakna visoke molekulske mase talože sa 78% rastvorom etanola i odvajaju filtracijom. Obe frakcije su osušene do konstantne mase, izmerene, pri čemu zbirno predstavljaju sadržaj ukupnih prehrambenih vlakana.

3.6. ISPITIVANJE UTICAJA USLOVA SKLADIŠTENJA NA AKUMULACIJU AFB₁

Efekat različitih temperatura (15, 23, 30 i 37 °C) i različitih vrednosti aktivnosti vode - a_w (0,85; 0,90; 0,95 i 0,99) na akumulaciju AFB₁ nakon veštačke inokulacije u laboratorijskim uslovima ispitan je na uzorcima zrna spelte sa plevičastim omotačem, kao i uzorcima kod kojih je plevičasti omotač prethodno uklonjen. Inokulacija uzoraka izvršena je izolatom *A. flavus* No. 1, prethodno korišćenim za inokulaciju u poljskim uslovima (Poglavlje 3.5), a koji je izolovan sa zrna hlebne pšenice nakon žetve 2015. godine (Krulj i sar., 2016a).

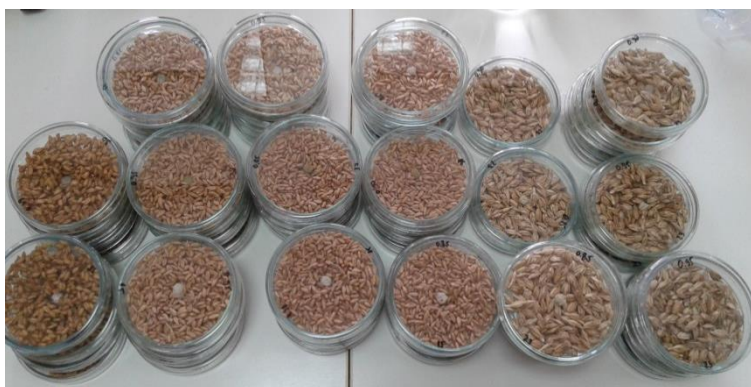
3.6.1. Priprema uzoraka spelte

Uzorci spelte, uključujući oljuštena zrna i zrna sa plevičastim omotačima, za koje je prethodno utvrđeno da nisu kontaminirani sa AFB₁, su sterilisana gama zračenjem intenzitetom od 12 kGy u Institutu za nuklearne nauke "Vinča", Beograd, Srbija. Sterilisani uzorci su zatim skladišteni na temperaturi od 4 °C do upotrebe.

Inicijalan sadržaj vlage oljuštenog zrna spelte je iznosio 11,6%, a zrna sa plevičastim omotačima 10,9%. Podešavanje a_w vrednosti uzoraka izvršeno je prema modifikovanoj proceduri opisanoj u istraživanjima Mousa i sar. (2011). Uzorci su podešeni na odgovarajuće a_w vrednosti (0,85; 0,90; 0,95 i 0,99) dodavanjem tačno, prethodno određene zapremine sterilne destilovane vode u erlenmajer koji sadrži 100 g sterilnih zrna spelte. Ekvilibracija je izvršena tokom 48 h na 4 °C. Kriva adsorpcije za količinu dodate vode u odnosu na odabrane a_w vrednosti prethodno je određena, omogućavajući tačno izračunavanje količine dodate vode da bi se postigla određena reproduktivna a_w vrednost. Vrednosti a_w su merene pomoću mernog instrumenta Testo 650 sa preciznom sondom (Testo AG, SAD). Merenja su izvršena u tri ponavljanja.

3.6.2. Priprema inokuluma, postupak inokulacije i uslovi inkubiranja

Primenjeni eksperimentalni dizajn odgovara 4×4 Latinskom kvadratnom dizajnu sa dva faktora (temperatura i a_w). Ispitane temperature inkubiranja su bile 15 °C, 23 °C, 30 °C i 37 °C, dok su ispitane a_w vrednosti bile 0,85; 0,90; 0,95 i 0,99. Izolat *A. flavus* kojim je vršena inokulacija gajen je na podlozi KDA na 25 °C tokom 10 dana. Zrna uzoraka spelte podešene a_w vrednosti su postavljena u jednom sloju u staklene petrijevke (90 mm). Petrijevke su zatim centralno inokulisane diskovima fragmenata plesni isečenim sterilnim staklenim bušačem (prečnik 5 mm) sa ivica kolonije izolata *A. flavus* (Slika 15). Šest petrijevki po svakom tretmanu je postavljeno u plastične kese sa zip patent zatvaračem. U kese sa petrijevkama, za svaku podešenu a_w vrednost dodata je čaša sa rastvorom glicerola i vode iste a_w vrednosti kako bi se vlažnost unutar kese održala konstantnom tokom perioda inkubiranja (Samapundo i sar., 2007b).



Slika 15. Inokulisani uzorci oljuštenih zrna spelte i zrna sa plevičastim omotačima

Nakon inkubiranja u trajanju od 28 dana, uzorci su osušeni do konstantne mase na 105 °C tokom 12 h. Uzorci spelte inkubirani sa plevičastim omotačima su oljušteni ručno i svaki

uzorak je podeljen u dve frakcije: oljuštena zrna i plevičasti omotači. Svi uzorci, oljuštena zrna, plevičasti omotači i zrna inkubirana bez pleve su samleveni na laboratorijskom mlinu (Bag Miker 400P, Interscience, St. Nom, Francuska) i skladišteni u polipropilenskim vrećama na -20 °C. Sadržaj AFB₁ je određen primenom HPLC-FLD tehnike sa postkolonskom derivatizacijom po metodi navedenoj u poglavlju 3.5.2.

3.7. METODE OCENE PROMETNOG I TEHNOLOŠKOG KVALITETA KONTAMINIRANIH UZORAKA SPELTE

Uzorci spelte kontaminirani sa različitim koncentracijama AFB₁, dobijeni nakon ogleda veštačke inokulacije sa *A. flavus* u laboratorijskim uslovima i inkubirani pri određenim uslovima temperature i a_w , upotrebljeni su za ocenu prometnog i tehnološkog kvaliteta kontaminiranih uzoraka u poređenju sa kontrolnim (nekontaminiranim) uzorkom spelte.

Određivanje sadržaja proteina

Određivanje sadržaja proteina u ispitivanim uzorcima spelte izvršeno je metodom bliske infracrvene spektroskopije (Near Infrared Reflectance, NIR) na uređaju Infratec 1241 Grain Analyzer (Foss Analytical AB, Danska). Sadržaj proteina izražen je u procentima na suhu materiju.

Određivanje mase 1000 zrna

Masa 1000 zrna ili apsolutna masa uzoraka spelte određena je merenjem mase 1000 celih zrna bez primesa, sa tačnošću 0,1 g. Masa 1000 zrna izražena je u gramima (g).

Reološke osobine

Kvalitet i procesne karakteristike brašna i testa spelte su određene na uređaju micro-doughLAB (Patern Instruments, Australija). Uzorku brašna spelte (4 g) dodata je određena količina vode da bi se postigla konzistentnost testa od 500 FJ (farinografskih jedinica). Snimanjem parametara kao što su moć upijanja vode, vreme potrebno za razvoj testa, stabilitet, određena su svojstva testa pri mešanju.

3.8. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA I EKSPERIMENTALNI PLAN

Eksperimentalni podaci izvedeni u okviru disertacije su obrađeni primenom softverskog paketa STATISTICA 10.0 (StatSoft Inc., SAD). Sva merenja su rađena u tri ponavljanja, a podaci su izraženi kao srednje vrednosti \pm standardne devijacije ($\bar{X} \pm SD$). Analiza varijanse (ANOVA) i post hoc Tukey-ev HSD (eng. *Honest Significant Difference*) test korišćeni su za utvrđivanje statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti merenja sa pragom značajnosti 95%.

Ispitivanja uticaja faktora temperature i a_w vrednosti na akumulaciju AFB₁ u zrnju spelte sa i bez plevičastog omotača sprovedeno je primenom eksperimentalnog dizajna 4×4 Latinski kvadrat (eng. *Latin square*). ANOVA je primenjena u cilju ispitivanja uticaja nezavisnih promenljivih na odzivne promenljive u matematičkom modelu u obliku polinoma drugog reda (eng. *second order polynomial* – SOP), kao i da bi se odredila statistička značajnost ovih uticaja. SOP modeli su korišćeni za predikciju uticaja ispitanih faktora a_w i temperature.

Za razvoj modela predikcije akumulacije AFB₁ u zrnju spelte sa i bez plevičastog omotača na osnovu temperature skladištenja i aktivnosti vode korišćena je i neuronska mreža (eng. *Artificial Neural Network* - ANN) sa višeslojnim perceptron strukturom (engl. *Multi-Layer Perceptron* – MLP) koja je imala tri sloja (ulazni, skriveni i izlazni). Ova vrsta modela je prihvaćena u velikom broju istraživanja i primenjena je za aproksimaciju rešavanja nelinearnih funkcija (Hu i Veng, 2009, Karlović i sar., 2013). Pre izračunavanja ANN modela predikcije, ulazni i izlazni podaci su normalizovani kako bi se poboljšalo ponašanje ANN tokom ciklusa učenja (Grieu i sar., 2011; Pezo i sar., 2013). Algoritam Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno (BFGS) je korišćen kao iterativna metoda za rešavanje nelinearnih problema optimizacije. Eksperimentalna baza podataka za ANN je nasumično podeljena na: ciklus za učenje, unakrsnu proveru i testiranje podataka (60%, 20% i 20% eksperimentalnih podataka, respektivno). BFGS algoritam je korišćen da se ubrza i uravnoteži konvergencija nalaženja rešenja (Basheer i Hajmeer, 2000). Koeficijent determinacije je korišćen kao parametar za proveru performansi dobijenog ANN modela.

Analiza osetljivosti je široko prihvaćen postupak koji se koristi u teoriji odlučivanja za ispitivanje uticaja malih promena nezavisnih promenljivih na rezultat posmatranog modela (Montano i Palmer, 2003). ANN model može da vrši aproksimaciju eksperimentalnih merenja, koji mogu da imaju izražene merne šumove i/ili da merenja budu nepotpuna, pa je analiza senzitivnosti važna kako bi se proverilo da li ANN model može da daje pogrešan

rezultat (Taylor, 2006). Na osnovu razvijenog ANN modela, u ovoj studiji vršena je analiza osjetljivosti, kako bi se preciznije ispitaio uticaj ulaznih promenljivih na posmatrane izlaze. Infinitesimalne vrednosti (+0,0001%) su dodate svakoj ulaznoj promenljivoj, u 10 jednako udaljenih pojedinačnih tačaka koje su ograničene ekstremima merenih vrednosti a_w i temperature.

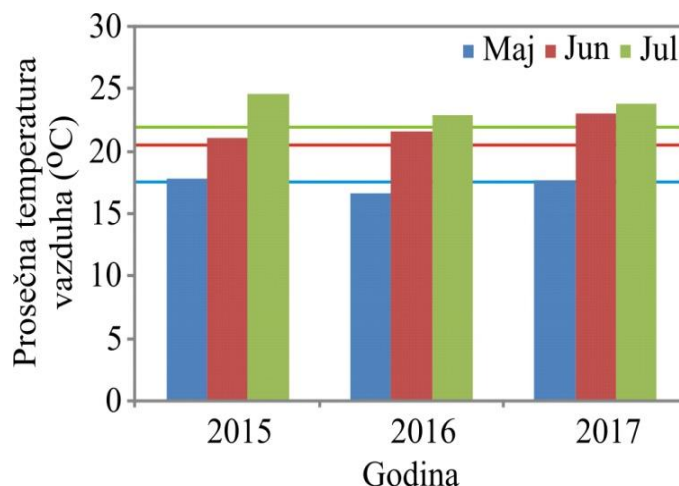
4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. ZASTUPLJENOST PLESNI U UZORCIMA HLEBNE PŠENICE I SPELTE

4.1.1. Agrometeorološki uslovi u proizvodnim godinama 2015, 2016. i 2017.

Agrometeorološki uslovi tokom fenofaza cvetanja i formiranja zrna pšenice (period od maja do jula) značajno utiču na mikološki profil zrna nakon žetve. Cvetanje je najosetljivija faza za infekciju plesnima, naročito kada su cvetovi biljke oprašeni (Parry i sar., 1995). U toj fazi, otvoreni cvetovi omogućavaju hifama plesni lakši prodor i na taj način dolazi do pojave i širenja infekcije (Brown i sar., 2010). Takođe, cvetovi sadrže visok nivo hranljivih materija koje stimulišu rast hifa (Strange i sar., 1974).

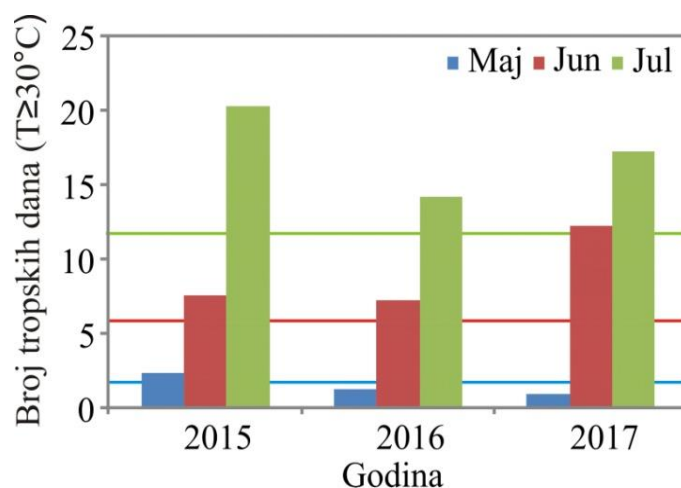
Prosečne mesečne temperature vazduha izmerene u Vojvodini za period od maja do juna tokom tri analizirane godine (2015 - 2017) u poređenju sa višegodišnjim prosekom (1981 - 2010) prikazane su na Slici 16. Podaci su preuzeti od Republičkog hidrometeorološkog zavoda Srbije (RHMZ) koji rukovodi merenjima u klimatološkim stanicama iz 7 najvažnijih oblasti gajenja pšenice u Vojvodini (Severni Banat, Srednji Banat, Južni Banat, Severna Bačka, Južna Bačka, Zapadna Bačka i Srem), iz kojih potiču sakupljeni uzorci.



Slika 16. Prosečne temperature vazduha u periodu od maja do jula 2015 - 2017. godine u poređenju sa vrednostima višegodišnjeg proseka (1981- 2010)

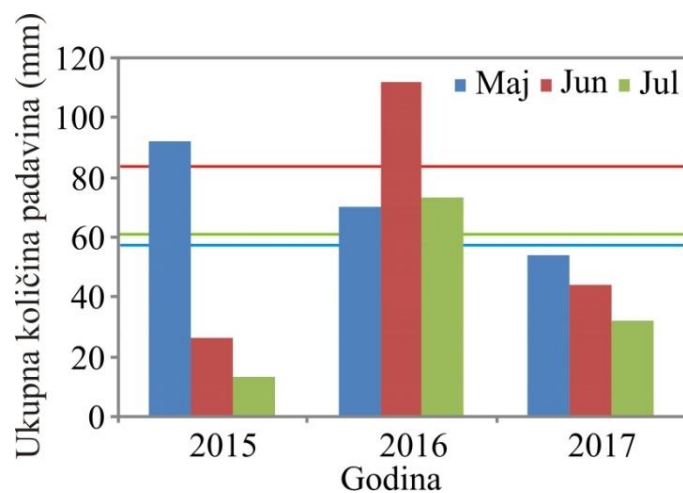
Tokom tromesečnog perioda za sve tri analizirane godine zabeležene su više vrednosti srednjih mesečnih temperatura vazduha u poređenju sa višegodišnjim prosekom. Izuzetak je bio maj 2016. godine, kada je prosečna temperatura iznosila 16,71 °C, što je niže od vrednosti

višegodišnjeg proseka za isti mesec koja je iznosila 17,75 °C. Najtoplija godina u periodu istraživanja bila je 2017. sa prosečno najvišim mesečnim temperaturama vazduha, kao i najvećim brojem tropskih dana (broj dana sa temperaturom višom od 30 °C). U poređenju sa višegodišnjim prosekom broj tropskih dana je bio znatno veći tokom juna i jula svih ispitivanih godina, dok je u maju bio u granicama ili nešto ispod višegodišnjeg proseka (Slika 17). Prema analizama izvršenim na nacionalnom nivou, period od 1960. do 2012. godine karakterisao je trend porasta srednjih godišnjih temperatura od 0,3 °C po deceniji. Trend porasta je bio najizraženiji u periodu od juna do avgusta i iznosio je 0,57 °C po deceniji. U zavisnosti od scenarija, do kraja veka na našim prostorima može se očekivati povećanje temperature od 3,2 do 4 °C (<http://www.klimatskastrategija.eu/>).



Slika 17. Broj tropskih dana u periodu od maja do jula 2015 - 2017. godine u poređenju sa vrednostima višegodišnjeg proseka (1981- 2010)

Vrednosti prosečnih količina padavina na području Vojvodine za posmatrani period prikazane su na Slici 18. Sume padavina registrovanih u 2017. godini, bile su znatno manje u poređenju sa tridesetogodišnjim periodom, dok je u 2016. godini zabeleženo najviše vodenog taloga, posebno tokom juna, kada je suma padavina iznosila 112,27 mm. Proizvodna 2015. godina se odlikovala manjom sumom padavina u odnosu na višegodišnji prosek, kao i druge dve posmatrane godine, s izuzetkom maja meseca kada je ukupna količina padavina iznosila 92,19 mm.



Slika 18. Ukupna količina padavina u periodu od maja do jula 2015 - 2017. godine u poređenju sa vrednostima višegodišnjeg proseka (1981- 2010)

Na raznovrsnost mikrobiota zrna *Triticum* spp. utiču različiti faktori, uključujući i agrometeorološke uslove. Tako na primer, u godinama sa velikim količinama padavina u vegetacionom periodu biljke izraženija je pojava *Fusarium* vrsta na zrnju, dok plesni roda *Aspergillus* preovlađuju u godinama sa toplim i sušnim vremenskim uslovima (Rodrigues, 2011). Rast i razvoj tzv. poljskih vrsta plesni kao što su predstavnici rodova *Alternaria*, *Cladosporium* i *Fusarium* favorizuju potpuno drugačiji ekofiziološki činioci od onih karakterističnih za rast tzv. plesni skladišta *Aspergillus* spp. i *Penicillium* spp. Prva grupa plesni je prilagođena hladnijim i vlažnijim uslovima, dok druga grupa ima izraženiju kserofilnu i termofilnu prirodu (Rosso i Robinson, 2001; Filtenborg i sar., 2004).

4.1.2. Učestalost i intenzitet pojave mikrobiota u uzorcima hlebne pšenice i spelte

Mikološka ispitivanja uzoraka hlebne pšenice i spelte prikupljenih iz regiona Vojvodine izvedena su nakon žetve tokom trogodišnjeg perioda (2015-2017). Deo rezultata koji se odnosi na učestalost i intenzitet pojave mikrobiota na uzorcima iz 2015. godine publikovan je u radu Krulj i sar. (2016a).

Učestalost i intenzitet pojave mikrobiota na zrnju hlebne pšenice roda 2015., 2016. i 2017. godine prikazani su u Tabeli 9.

Tabela 9. Učestalost (F) i intenzitet pojave (IP) mikobiota u uzorcima hlebne pšenice roda 2015 - 2017. godine

Rodovi i vrste plesni	Godina					
	2015.		2016.		2017.	
	F	IP	F	IP	F	IP
(%)						
<i>Alternaria</i> spp.	100	36,8	100	38,3	100	31
<i>Arthrrium phaeospermum</i> (Corda) M.B. Ellis	20	1	-	-	-	-
<i>Aspergillus flavus</i> Link ex Fr.	40	2	16,6	1,5	45	7
<i>A. fumigatus</i> Fres.	20	1	-	-	10	2
<i>A. nidulans</i> G Winter	20	1	-	-	20	4,2
<i>A. niger</i> van Tieghem	20	1	-	-	15	0,5
<i>A. ochraceus</i> Wilhelm	-	-	5	0,2	10	0,4
<i>A. steynii</i> Frisvad i Samson	-	-	-	-	5	1
<i>Aspergillus</i> spp.	-	-	-	-	5	1
<i>Aureobasidium pullulans</i> (De Bary) G. Arnaud	-	-	-	-	5	1
<i>Cladosporium</i> spp.	80	5,7	80	4,6	80	3,9
<i>Curvularia</i> spp.	-	-	-	-	5	1,0
<i>Dematiaceous Hyphomycetes</i> (nesporulišuce)	100	10,8	100	6,8	100	10,3
<i>Epicoccum purpuraceus</i> Link	-	-	5	2	5	1,4
<i>Fusarium culmorum</i> (Wm. G. Sm.) Sacc.	-	-	5	1	5	0,2
<i>F. graminearum</i> Schwabe	100	13,2	100	19,4	60	4
<i>F. poae</i> (Peck) Wolenw.	20	1	10	2	10	0,5
<i>F. sporotrichioides</i> Sherb.	20	1	10	3,2	10	1
<i>Fusarium</i> spp.	-	-	40	1,1	-	-
<i>Gilmaniella humicola</i> G.L.Barron	20	2	-	-	-	-
<i>Nigrospora oryzae</i> (Berk and Br.) Petch	40	1,5	20	3	5	1,2
<i>Penicillium</i> spp.	20	3	10	0,5	20	4,2
<i>Rhizopus</i> spp.	-	-	-	-	20	2,4
<i>Sporotrix</i> sp.	20	1	-	-	5	0,5
<i>Stemphylium</i> spp.	20	9,5	40	6,6	40	8,5
<i>Trichocladium pyriforme</i> M. Dixon	20	2	-	-	10	1,4
<i>Ulocladium</i> spp.	40	6,5	80	13	60	9,6

Determinacijom mikopopulacija identificirano je 18 mikobiota u uzorcima hlebne pšenice iz 2015. godine, 15 iz 2016. godine, dok su najraznovrsnije mikobiote (24) determinisane u

uzorcima iz 2017. godine. Razlike u raznovrsnosti i nivou kontaminacije bile su posledica vremenskih prilika koje su vladale tokom vegetacije ispitivanih useva. Najveći intenzitet pojave poljskih plesni kao što su *Alternaria* spp. i *Fusarium* spp. zabeležen je u uzorcima iz semi-humidne 2016. godine, dok je pojava *Penicillium* i *Aspergillus* vrsta bila najintenzivnija u uzorcima iz semi-aridne 2017. godine. Intenzitet pojave plesni na inficiranim zrnima varirao je od 1,0 do 36,8% kod uzoraka roda 2015. godine, od 0,2 do 38,3% kod uzoraka iz 2016. godine i od 0,2 do 31% kod uzoraka iz 2017. godine.

Identifikacijom izolovanih plesni uočena je dominantnost *Alternaria* vrsta. One su konstantovane kod svih uzoraka hlebne pšenice (100%). Prema rezultatima istraživanja autora Balaž i sar. (2003), Stanković i sar. (2007) i Krnjaja i sar. (2011) pojava *Alternaria* vrsta je varirala u zavisnosti od agroekoloških uslova karakterističnih za datu godinu ispitivanja. Pored činjenice da ove plesni izazivaju ekonomske gubitke u proizvodnji i preradi, mnoge *Alternaria* vrste su proizvođači toksina sa različitim toksikološkim svojstvima (Vučković i sar., 2013; Janić-Hajnal i sar., 2015). Višegodišnjim ispitivanjima mikobiota semena strnih žita sa većeg broja lokaliteta u Srbiji, ustanovljeno je da su najzastupljenije bile plesni roda *Alternaria* (60-70%), a zatim plesni iz rodova *Fusarium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium* i *Mucor* (Bagi i sar. 2005; Balaž i sar., 2005). Pored roda *Alternaria*, učestalost i intenzitet pojave drugih predstavnika *Dematiaceous Hyphomycetes* (plesni koje sadrže melanin), kao što su: *Cladosporium*, *Stemphylium* i *Ulocladium*, bili su izraženi tokom svih ispitanih godina. Vrste roda *Cladosporium* su identifikovane sa visokom učestalošću (80%), uz intenzitet pojave 5,7%, odnosno 4,6% i 3,9% u ispitivanim godinama (2015-2017). Predstavnici ovog roda kao i *Nigrospora oryzae* su plesni koje se uobičajeno mogu izolovati sa zrna pšenice širom sveta (Fahrnunnisa i sar., 2006; Lević i sar., 2012a).

Pojava vrsta roda *Fusarium* bila je najizraženija u semi-humidnoj 2016. godine, dok je nivo kontaminacije uzoraka roda 2017. godine ovim plesnima bio izrazito nizak. Od determinisanih predstavnika roda *Fusarium*, najveću učestalost i intenzitet pojave je imala vrsta *F. graminearum* (100 odnosno 19,4%), zatim *F. sporotrihoides* (10, odnosno 3,2%). Mikobiota *F. graminearum* je poznata kao najpatogenija vrsta ovog roda. *Fusarium* vrste mogu dovesti do truleži klasa pšenice, tako da fuzarioze predstavljaju jedne od najčešćih i najznačajnijih bolesti koje se javljaju kod ovih biljnih vrsta. Štetno delovanje *Fusarium* vrsta pojačano je njihovom sposobnošću da sintetišu sekundarne metabolite toksične za ljude i životinje. Pored zdravstvene bezbednosti, fuzariozna zrna pšenice značajno utiču na pogoršanje tehnološkog kvaliteta, što se manifestuje padom kvaliteta proteina i glutena. Prema istraživanjima drugih autora (Stojanović i sar., 2005) *Fusarium* predstavlja najčešće

determinisan rod plesni na pšenici u Srbiji (intenzitet pojave 45%), a od vrsta iz ove grupe uglavnom je to *F. oxysporum*. Krnjaja i sar. (2011) navode da su *F. graminearum* i *F. poae* dominantne vrste na ozimjoj pšenici.

Prisustvo *Aspergillus* spp. i *Penicillium* spp. variralo je u zavisnosti od proizvodne godine. Pojava ovih plesni na zrnima neposredno nakon žetve ukazuje na to da je podela plesni na poljske i skladišne u znatnoj meri relativna. Najveći broj vrsta roda *Aspergillus* (6) determinisan je u uzorcima iz 2017. godine, kada je zabeleženo odsustvo padavina u periodu cvetanja i formiranja zrna. Intenzitet pojave *Arthrinium phaeospermum* i *Sporotrix* sp. je bio manje značajan i iznosio je samo 1% zrna hlebne pšenice roda 2015. godine (Tabela 9). *A. phaeospermum* je uobičajena plesan koja se javlja na zrnima meke i durum pšenice (Abdullah i Atroshi, 2016), kao i ozime spelte (Kurowski i Wysocka, 2009). *Sporotrix* sp., plesan determinisana i na uzorcima iz 2017. godine, ranije je identifikovana na klasu pšenice u Srbiji (Lević i sar., 2012a). Vrsta *Aureobasidium pullulans* (kvasolika mikobiota), identifikovana kod hlebne pšenice roda 2017. godine je ubikvitarna plesan karakteristična za umerene regione i često se može izolovati sa zrna pšenice, ječma i ovsu. Nizak intenzitet pojave *Curvularia* spp. u iznosu od 1%, zabeležen je i na zrnima ječma prema istraživanjima autora Lević i sar. (2012b).

Učestalost i intenzitet pojave mikobiota u uzorcima spelte roda 2015, 2016. i 2017. godine prikazani su u Tabeli 10. U uzorcima spelte iz 2015. godine determinisano je 6 mikobiota, 15 iz 2016. godine i 16 iz 2017. godine. Identifikacija plesni je pokazala znatno manji broj vrsta i rodova izolovanih sa zrna spelte u poređenju sa hlebnom pšenicom za sve tri posmatrane godine. Uočene razlike u raznovrsnosti i nivou mikološke kontaminacije hlebne pšenice i spelte su bile posledica morfoloških i bioloških svojstva ovih *Triticum* vrsta. Kao stara vrsta pšenice spelta se smatra manje osetljivom na infekciju plesnima. Zbog viših stabljika biljke i tvrdih adherentnih plevičastih omotača, spelta je manje podložna infekciji mikobiotama (Solaraska i sar., 2012). Plevičasti omotači se smatraju fizičkom barijerom koja štiti zrno od patogena (Bavec i Bavec, 2006; Vučković i sar, 2013; Suchý i sar., 2018).

Tabela 10. Učestalost (F) i intenzitet pojave (IP) plesni u uzorcima spelte roda 2015 - 2017. godine

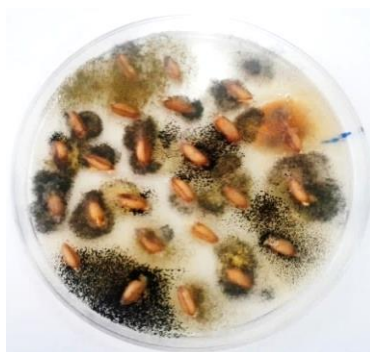
Rodovi i vrste plesni	Godina					
	2015.		2016.		2017.	
	F	IP	F	IP	F	IP
(%)						
<i>Alternaria</i> spp.	100	32,4	100	34,6	80	25
<i>Aspergillus flavus</i> Link ex Fr.	-	-	33	6	70	8
<i>A. fumigatus</i> Fres.	-	-	-	-	10	1
<i>A. nidulans</i> G Winter	-	-	-	-	90	14
<i>A. niger</i> van Tieghem	-	-	20	1	85	10
<i>A. ochraceus</i> Wilhelm	-	-	-	-	40	2
<i>A. versicolor</i> (Vuill.) Tiraboschi	-	-	-	-	8	1
<i>Aspergillus</i> spp.	-	-	-	-	75	8
<i>Cladosporium</i> spp.	-	-	80	4,1	40	3,5
<i>Dematiaceous Hyphomycetes</i> (nesporulišuce)	100	22	100	7,4	90	5,2
<i>Epicoccum purpuraceus</i> Link	-	-	20	2,2	10	2
<i>Fusarium culmorum</i> (Wm. G. Sm.) Sacc.	-	-	10	4	-	-
<i>F. graminearum</i> Schwabe	100	10,4	100	13,7	5	5
<i>F. oxysporum</i> Schlecht. emend. Snyder i Hans.	-	-	20	2	-	-
<i>F. sporotrichioides</i> Sherb.	-	-	33	0,5	-	-
<i>Fusarium</i> spp.	-	-	40	4,5	-	-
<i>Nigrospora oryzae</i> (Berk and Br.) Petch	-	-	15	2	-	-
<i>Pyrenophora graminea</i> S. Ito i Kurib.	-	-	20	1,2	-	-
<i>Penicillium</i> spp.	40	2	-	-	20	3,5
<i>Rhizopus</i> spp.	-	-	-	-	20	1
<i>Stemphylium</i> spp.	20	7	100	7,2	40	5,8
<i>Tilletia</i> spp.	-	-	16	0,2	-	-
<i>Ulocladium</i> spp.	20	8	100	8	60	4,9

Noviji literaturni podaci ukazuju na učestalije prisustvo različitih plesni na zrnima spelte, što je značajno sa stanovišta smanjenja prinosa i kvaliteta zrna (Kurowski i sar., 2012; Wachowska, 2012). S obzirom da *Fusarium* vrste i njihovi toksini predstavljaju najučestalije kontaminante žitarica, pa i hlebne pšenice, ove vrste plesni su do sada najviše izučavane i na

zrnima spelte (Hudec i Lacko-Bartošova, 2012). Istraživanja su pokazala da se na spelti uz visoku učestalost i intenzitet pojave javljaju i plesni roda *Alternaria* (Đisalov i sar., 2015b), što je potvrđeno i ovim ispitivanjima. Intenzitet pojave roda *Alternaria* iznosio je 32,4% u izorcima iz 2015, 34,6% u uzorcima iz 2016. i 25% u uzorcima iz 2017. godine. Rezultati istraživanja drugih autora pokazali su da su *A. alternata* i *A. logipes* najčešće vrste izolovane sa zrna hlebne pšenice u Srbiji (Ivanović i sar., 2001), dok su na zrnima spelte preovlađujuće vrste *A. alternata* i *A. tenuissima* (Vučković i sar., 2012), kao i *A. infectoria* (Đisalov i sar., 2015b). Slično kao i kod uzoraka hlebne pšenice, pojava *Fusarium* vrsta na uzorcima spelte bila je najizraženija u 2016. godini, kada je intenzitet pojave *F. graminearum* iznosio 13,7%, a učestalost 100%. Pored *F. graminearum* u uzorcima iz 2016. godine identifikovane su i druge *Fusarium* vrste: *F. culmorum*, *F. oxysporum* i *F. sporotrichioides*. Iako su *Fusarium* vrste slabi patogeni žitarica (izuzev *F. graminearum*) mnoge od njih se javljaju kao producenti različitih mikotoksina (Bočarov-Stančić i sar., 2007; Bočarov-Stančić i sar., 2009b).

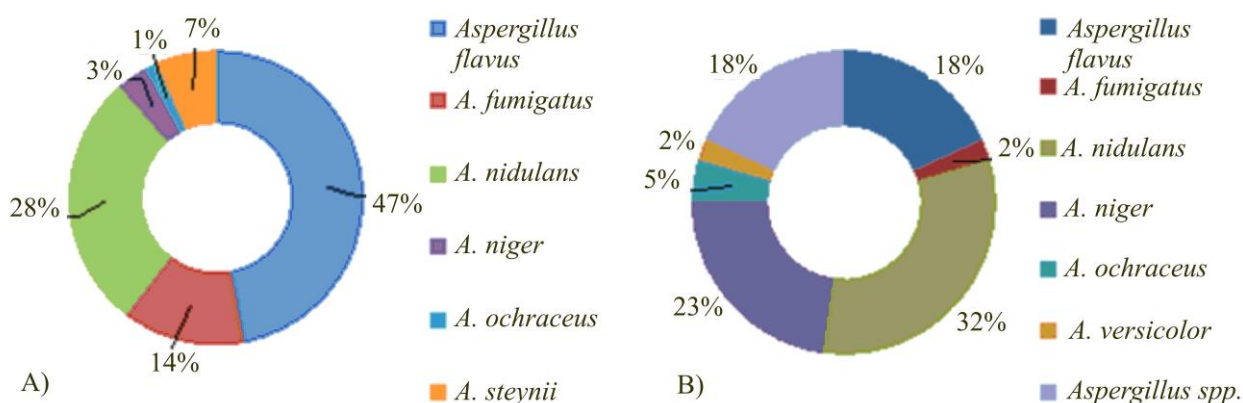
Tilletia spp. plesan koja izaziva glavnicu kod pšenice (Rajkovi i Dolovac, 2006), u našim istraživanjima identifikovana je u uzorcima spelte sa niskim intenzitetom pojave 0,2%, Zgraja i sar. (2016) su determinisali ovu mikobiotu na zrnima spelte u Nemačkoj. *Pyrenophora graminea* plesan karakteristična za ječam koja izaziva prugavost lista, izolovana je sa zrna uzoraka spelte požnjevenih 2016. godine (učestalost 20%, intenzitet pojave 1,2%).

Tokom istraživanja uočene su značajne varijacije u nivou kontaminacije *Aspergillus* vrstama. Intenzitet pojave i učestalost *Aspergillus* vrsta najizraženiji su bili na uzorcima iz 2017. godine (Tabela 10, Slika 19).



Slika 19. Zrna spelte roda 2017. godine inficirana *Aspergillus* spp. i drugim mikobiotama (DG18, 7 dana, 25 °C)

Od 6 vrsta roda *Aspergillus* determinisanih na zrnima spelte roda 2017. godine, najučestalija je bila *A. nidulans* (90%), sa intenzitetom pojave od 14%, dok je na zrnima pšenice dominantna vrsta bila *A. flavus* (učestalost 45%, intenzitet pojave 7%). Vrsta *A. flavus* se uglavnom u našim područjima do sada javljala kao kontaminant kukuruza, međutim zabeležen je relativno visok intenzitet pojave (45,8%) na pšenici roda 2012. godine (Lević i sar., 2013). Kao posledica izuzetno stresnih agrometeoroloških uslova, visoke temperature i suše tokom 2012. godine, uočena je visoka učestalost i intenzitet pojave *A. flavus* na mnogim biljnim vrstama u Srbiji. Prema saopštenju Republičkog hidrometeorološkog zavoda Srbije (RHMZ) 2012. godine registrovana je najveća suša od kada se sprovodi praćenje vremenskih prilika u Srbiji. Iako se smatra da mali broj uzoraka nakon žetve bude inficiran skladišnim plesnima, rezultati skorašnjih istraživanja potvrđuju da kontaminacija ovim plesnima u polju nije retka pojava. Raspodela *Aspergillus* vrsta u odnosu na ukupan broj izolovanih vrsta sa zrna hlebne pšenice i spelte iz 2017. godine prikazan je na Slici 20.



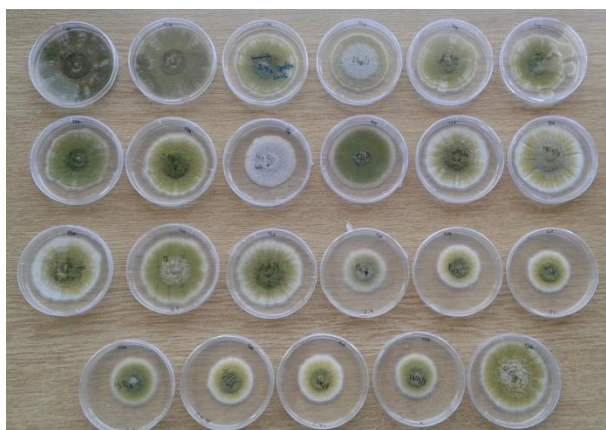
Slika 20. Raspodela *Aspergillus* vrsta izolovanih sa A - hlebne pšenice i B - spelte iz 2017. godine

U hronologiji pojave *Aspergillus* vrsta u agroekološkim uslovima u Srbiji, *A. niger* je bila učestalija vrsta od *A. flavus*, a u zavisnosti od biljne vrste domaćina najčešće se pojavljuje na suncokretu, soji, kukuružu, ječmu i pšenici (Bočarov-Stančić, 1996; Lević i sar., 2013). Ova vrsta je bila zastupljenija u uzorcima spelte nego u uzorcima hlebne pšenice. Sa uzoraka hlebne pšenice i spelte iz 2017. godine, izolovana je i vrsta *A. ochraceus*. Ona se smatra mezofilnim kserofilom i može se izolovati iz različitih vrsta namirnica biljnog i životinjskog porekla, mada najčešće sa suvih i uskladištenih namirnica (Pardo i sar., 2006). Termofilna vrsta *A. fumigatus*, vrlo česta na pšenici i ječmu (Boudra i Morgavi, 2005), identifikovana je tokom ovog istraživanja i na zrnima hlebne pšenice i spelte. Od 7 *Aspergillus* spp.

determinisanih 2017. godine na zrnima hlebne pšenice i spelte, treba izdvojiti potencijalno ohratoksigenu vrstu *A. steynii*, pripadnika sekcije *Curmidati*, koja se može izolovati sa različitih biljnih vrsta (Gil-Serna i sar., 2011, 2015). S obzirom da je vrsta *A. flavus* najčešće odgovorna za kontaminaciju primarnih poljoprivrednih proizvoda aflatoxinima kako u polju tako i nakon žetve, dalja istraživanja su usmerena na potvrdu identifikacije ove *Aspergillus* vrste.

4.2. IDENTIFIKACIJA *A. flavus*

Identifikacija i karakterizacija monospornih kultura *A. flavus* izolovanih iz uzoraka hlebne pšenice i spelte i sakupljenih u kolekciju kultura, izvedena je na dva metodološki različita načina: morfološkom analizom (na osnovu makro- i mikromorfoloških karakteristika) i molekularnom analizom (analizom DNK sekvenci). Monosporni izolati obezbeđuju genetsku čistoću kultura neophodnu za dobijanje pouzdanih rezultata. Izgled kolonija nekih od monospornih kultura iz kolekcije izolata prikazan je na Slici 21.

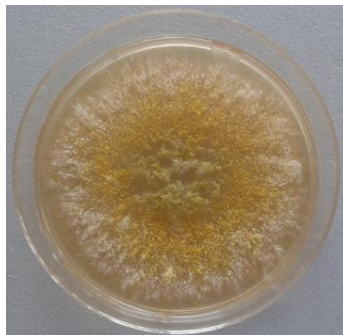


Slika 21. Monosporne kolonije *A. flavus* iz kolekcije izolata (KDA, 7 dana, 25 °C)

4.2.1. Identifikacija *A. flavus* na osnovu morfoloških osobina

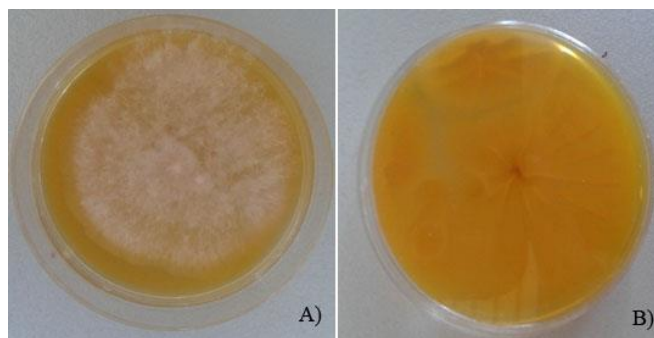
Identifikacija vrsta roda *Aspergillus* sekcija *Flavi* bazira se na makro- i mikromorfološkoj karakterizaciji. Boja kolonija i izgled zida konidija na Czapek-Dox agaru (CZA) predstavljali su bitne karakteristike prilikom identifikacije. *A. flavus* karakterišu brzorastuće žuto-zelene kolonije, prečnika 65-70 μm nakon 7 dana rasta u mraku na 25 °C na CZA sa kvaščevim ekstraktom (CYA), te na CYA sa 200 g saharoze ili agaru sa sladnim ekstraktom (Klich, 2007a). Vrsta podloge za kultivaciju je od velikog značaja u identifikaciji *A. flavus*. Kolonije *A. flavus* gajene na Czapek-Dox agaru su žuto-zelene (Slika 22), dok je

boja kolonija *A. parasiticus* tamno zelena (Klich, 2002)., što je u radu primenjeno kao važan kriterijum za diferencijaciju.



Slika 22. Izgled kolonije *A. flavus* (CZA, 7 dana, 25 °C)

AFPA (*Aspergillus flavus* i *parasiticus* agar) je selektivna podloga za brzu identifikaciju vrsta *A. flavus* i *A. parasiticus* (Pitt i sar., 1983). Izgled kolonije *A. flavus* inkubirane na 30 °C, 3 dana na AFPA prikazana je na Slici 23. Mogućnost za razlikovanje vrsta *Aspergillus* iz sekcije *Flavi* zasniva se na intenzivnoj narandžastoj boji koja se uočava na reverznoj strani dna petrijevke na kojoj su gajeni izolati *A. flavus*. U ovim istraživanjima, kod svih ispitivanih izolata, uočena je intenzivna narandžasta boja. Nijedan od izolata nije pokazivao krem ili braon boju kolonije na reverznoj strani AFPA podloge, što bi odgovaralo vrstama *A. oryzae* odnosno *A. tamarii* (Rodrigues i sar., 2009).

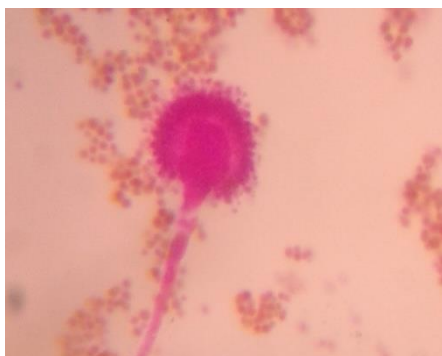


Slika 23. *A. flavus* na AFPA (3 dana, 30°C): A - lice kolonije, B - naličje kolonije

Konidije plesni *A. flavus* imaju relativno tanke i glatke zidove. Oblik konidija varira od sferičnog do eliptičnog. *A. nomius* je morfološki sličan *A. flavus* prema boji kolonije, ali su zidovi konidija grublji i rapaviji (Kurtzman i sar., 1987). Prisustvo metula i fjalida u konidijalnim glavicama ranije je smatrano značajnom karakteristikom za razlikovanje *A. flavus* i *A. parasiticus*, s obzirom da se prva vrsta smatrala uniserijalnom, a druga biserijalnom (Klich, 2002). Kasnije je utvrđeno da su za obe vrste karakteristične i uni- i biserijalne konidijalne glavice (Rodrigues i sar., 2009). U pogledu serijalnosti konidijalnih glavica, 71%

ispitanih izolata *A. flavus* su bili pretežno biserijalni. Rezultati ovih istraživanja su u skladu sa rezultatima Rodrigues i sar. (2009), koji navode da je 63% ispitanih izolata *A. flavus* karakterisala biserijalnost konidijalnih glavica.

Mikroskopskim izgledom *A. flavus* (Slika 24) prikazana je konidiofora koja se završava proširenjem eliptičnog tipa - izdužena vezikula sa metulama i fjalidama, i radijalno raspoređenim konidiosporama.

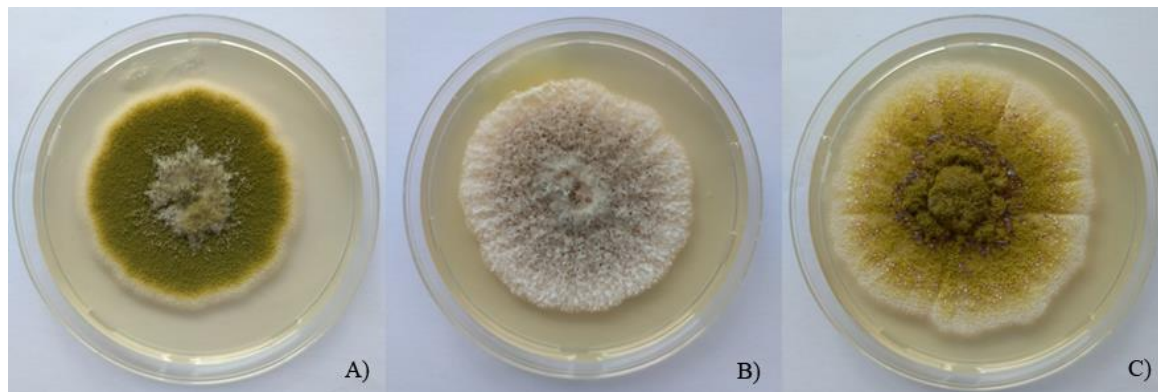


Slika 24. Mikroskopski prikaz konidijalne glavice *A. flavus* sa metulama i fjalidama, i radijalno raspoređenim konidiosporama (uvećanje 40×)

Kao što je navedeno u literaturnom pregledu poznato je da neki sojevi *A. flavus* proizvode crnu, kompaktnu masu očvrslih hifa koja sadrži rezerve hranljivih materija pod nazivom sklerocije. Njihov prečnik je obično 400-700 μm (Klich, 2007a). Na osnovu veličine sklerocija vrsta *A. flavus* se može podeliti na dva tipa (Cotty, 1994): S tip koji proizvodi brojne male sklerocije (prosečan prečnik $<400 \mu\text{m}$) i visok nivo aflatoksina B, dok L tip proizvodi manji broj većih sklerocija ($>400 \mu\text{m}$) i manju količinu aflatoksina B₁ (Garber i Cotty, 1997). Prisustvo sklerocija je zabeleženo kod 57% izolata *A. flavus* obuhvaćenih ovim istraživanjima. Kozakiewicz (1989) navodi da je formiranje sklerocija karakteristika koja se javlja samo kod vrste *A. flavus*, mada je kasnije utvrđeno da i druge *Aspergillus* vrste mogu da formiraju sklerocije (Rodrigues i sar, 2009). Nekoliko autora pokušalo je da uspostavi korelaciju između sposobnosti formiranja sklerocija i aflatoksigenosti, ali objavljeni podaci su kontradiktorni. Različite studije ukazuju na pozitivnu korelaciju između proizvodnje većih količina aflatoksina i prisustva malih sklerocija (Chang i sar., 2002; Novas i Cabral, 2002, Pildain i sar., 2004), dok drugi autori navode da ne postoji veza između prisustva sklerocija tj. njihove veličine i aflatoksigenosti (Giorni i sar., 2007; Razzaghi-Abianeh i sar., 2006). Neki istraživači čak ukazuju na inverznu korelaciju navodeći vrste L tipa kao najtoksičnije (Abbas i sar., 2005). Nepodudarnost rezultata zasniva se na činjenici da uslovi kultivacije plesni nisu

standardizovani i da su u navedenim istraživanjima korišćeni različiti tipovi podloga za kultivaciju.

Bez obzira na definisane morfološke karakteristike, ova istraživanja su utvrdila da postoje varijacije unutar vrste *A. flavus* koje se odnose na nijansu boje, strukturu i izgled kolonija, te mogućnost formiranja sklerocija prilikom kultivacije izolata pod istim uslovima (Slika 25).



Slika 25. Izgled kolonija različitih izolata *A. flavus* inkubiranih na PDA, 7 dana, 25 °C
(A- referentni soj, B - izolat No. 1. C - izolat No. 2)

Greške prilikom identifikacije izolata *Aspergillus* vrsta na osnovu morfoloških osobina nisu neuobičajene (Wang i sar., 2001; Batista i sar., 2008), što ukazuje na nedostatke ovog pristupa identifikacije.

4.2.2. Molekularna identifikacija izolata *A. flavus*

S obzirom da klasične mikrobiološke metode identifikacije nisu u potpunosti omogućile preciznu i jasno definisanu karakterizaciju *A. flavus*, primena molekularnih metoda je bila neophodna za pouzdanu i tačnu identifikaciju ispitivanih izolata. Rod *Aspergillus* sekcija *Flavi* obuhvata šest ekonomski značajnih, a morfološki i filogenetski sličnih vrsta: *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*, *A. oryzae*, *A. sojae* i *A. tamarii*. Vrste *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. oryzae* i *A. sojae* su pokazale visok stepen sličnosti DNK, kao i sličnost u veličini genoma. S obzirom na komplementarnost DNK vrsta *A. flavus* i *A. oryzae*, kao i *A. parasiticus* i *A. sojae*, utvrđeno je da je teško postići pravilnu diferencijaciju s obzirom da je sličnost DNK ovih vrsta bila 100% odnosno 91% (Kurtzman i sar., 1987). *A. oryzae* i *A. sojae* su ranije smatrani netoksigenim sojevima *A. flavus* odnosno *A. parasiticus*. Filogenetskim studijama je dokazano da *A. oryzae* vodi poreklo od netoksigenih vrsta *A. flavus* (Chang i sar., 2006) ili da je vrsta izgubila sposobnost proizvodnje aflatoksina tokom procesa domestikacije (Samson i sar., 2000). Rokas i sar. (2007) su potvrdili da na genomskom i

proteomskom nivou, *A. flavus* i *A. oryzae* dele 99,5% odnosno 98% sličnosti, što je više od procenta identiteta koji je pronađen između dva soja iste vrste *A. niger* (99,3% i 96,7%). Objavljeni podaci takođe pokazuju da geni *A. parasiticus* i *A. flavus* obično dele 97-99% nukleotidnog identiteta. Velika sličnost među pomenutim *Aspergillus* vrstama predstavlja izazov koji se postavlja prilikom tačne identifikacije vrsta sekcije *Flavi*.

U ovom istraživanju molekularna analiza je izvršena PCR amplifikacijom dva genomska regiona DNK: deo unutrašnjeg transkribovanog regiona (ITS) rDNK i deo β -tubulin gena (β -tub). ITS region se smatra univerzalnim i primarnim molekularnim markerom za molekularnu identifikaciju plesni (White i sar., 1990). Međutim, svaki rod ima svoje specifičnosti, pa u okviru roda *Aspergillus*, geni za kalmodulin i β -tubulin su često korišćeni i predloženi su kao pogodni bar kodovi. Samson i Varga (2009) preporučuju da za opis i identifikaciju vrste, treba ispitati najmanje dve genomske sekvence, koristeći tehniku nazvanu multilokus pristup (eng. *multilocus approach*). Mnoga istraživanja su potvrdila prednosti tog pristupa (Ito i sar., 2001; Peterson, 2001, 2008; Pildain i sar., 2008), uključujući i ovu studiju koja je obuhvatila PCR amplifikaciju i karakterizaciju dva genomska regiona *A. flavus* DNK.

Produkti PCR reakcije umnoženi parom prajmera AflaFor/Bt2b su prečišćeni i sekvencirani. Nakon obrade, nukleotidne sekvence deponovane su u GenBank bazu podataka usled čega su im dodeljeni pristupni brojevi MH582473-KM516085 (Tabela 11). Višestrukim uparivanjem dobijenih sekvenci međusobno, kao i sa sekvencama drugih izolata dostupnih iz GenBank baze podataka, urađena je potvrda identifikacije dobijenih sekvenci. Blast analiza 38 sekvenci izolata pokazala je 99% nukleotidnu identičnost sa vrstama *A. flavus* dostupnim iz GenBank baze podataka.

Tabela 11. Rezultati molekularne identifikacije izolata *A. flavus*

Broj sekvence	Izolati <i>A. flavus</i> dostupni u GenBank bazi podataka	NCBI pristupni broj sekvence iz Blasta	Procentat poklapanja (%)	NCBI pristupni broj ispitivanih izolata
1	<i>Aspergillus flavus</i> strain CBS 117632	EF203137	99	MH582473
2	<i>Aspergillus flavus</i> var. <i>flavus</i> strain ABS85	KY056793	99	MH582474
3	<i>Aspergillus flavus</i> strain CBS 117632	EF203137	99	MH582475
4	<i>Aspergillus flavus</i> isolate CA17	JN394566	99	MH582476
5	<i>Aspergillus flavus</i> voucher CCDCA 11423	MG746538	99	MH582477
6	<i>Aspergillus flavus</i> voucher CCDCA 11423	MG746538	99	MH582478

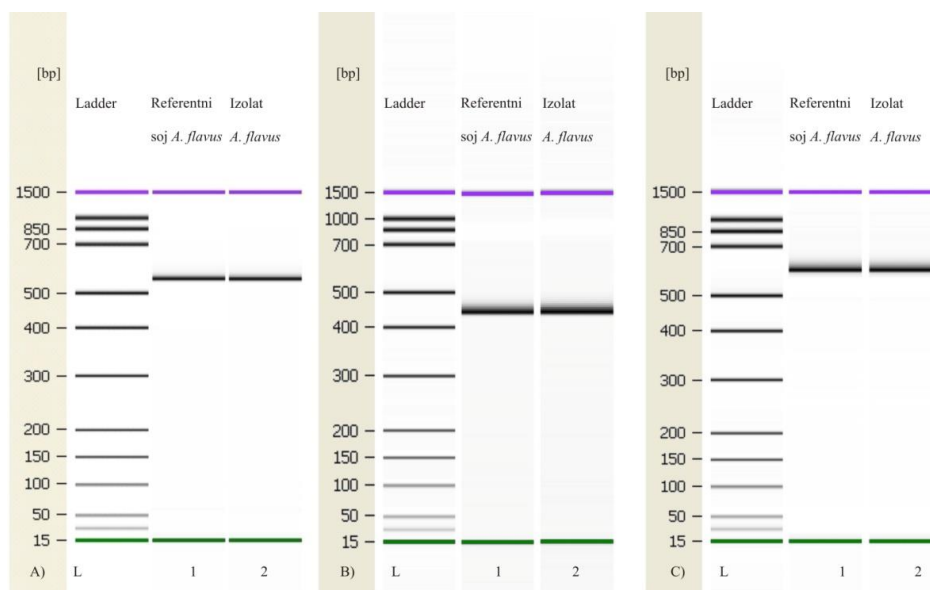
Tabela 11. Rezultati molekularne identifikacije izolata *A. flavus* (nastavak)

Broj sekvence	Izolati <i>A. flavus</i> dostupni u GenBank bazi podataka	NCBI pristupni broj sekvence iz Blasta	Procenat poklapanja (%)	NCBI pristupni broj ispitivanih izolata
7	<i>Aspergillus flavus</i> voucher CCDCA 11423	MG746538	99	MH582479
8	<i>Aspergillus flavus</i> strain SEJ-A2	HQ285504	99	MH582480
9	<i>Aspergillus flavus</i> voucher CCDCA 11423	MG746538	99	MH582481
10	<i>Aspergillus flavus</i> strain CBS 117632	EF203137	99	MH582482
11	<i>Aspergillus flavus</i> isolate CA10	JN394559	99	MH582483
12	<i>Aspergillus flavus</i> strain MUMS-Z20	MG387190	99	MH582484
13	<i>Aspergillus flavus</i> strain MUMS-Z19	MG387189	99	MH582485
14	<i>Aspergillus flavus</i> voucher CCDCA 11423	MG746538	99	MH582486
15	<i>Aspergillus flavus</i> voucher CCDCA 11423	MG746538	99	MH582487
16	<i>Aspergillus flavus</i> strain CBS 117632	EF203137	99	MH582488
17	<i>Aspergillus flavus</i> isolate CA10	JN394559	99	MH582489
18	<i>Aspergillus flavus</i> strain MUMS-Z20	MG387190	99	MH582490
19	<i>Aspergillus flavus</i> strain CBS 117632	EF203137	99	MH582491
20	<i>Aspergillus flavus</i> isolate CA10	JN394559	99	MH582492
21	<i>Aspergillus flavus</i> strain CBS 117632	EF203137	99	MH582493
22	<i>Aspergillus flavus</i> isolate CA10	JN394559	99	MH582494
23	<i>Aspergillus flavus</i> strain CBS 117632	EF203137	99	MH582495
24	<i>Aspergillus flavus</i> isolate CA10	JN394559	99	MH582496
25	<i>Aspergillus flavus</i> isolate CA10	JN394559	99	MH582497
26	<i>Aspergillus flavus</i> voucher CCDCA 11423	MG746538	99	MH582498
27	<i>Aspergillus flavus</i> voucher CCDCA 11423	MG746538	99	MH582499
28	<i>Aspergillus flavus</i> voucher CCDCA 11423	MG746538	99	MH582500
29	<i>Aspergillus flavus</i> isolate CA10	JN394559	99	MH582501
30	<i>Aspergillus flavus</i> isolate CA10	JN394559	99	MH582502
31	<i>Aspergillus flavus</i> strain CBS 117632	EF203137	99	MH582503

Tabela 11. Rezultati molekularne identifikacije izolata *A. flavus* (nastavak)

Broj sekvence	Izolati <i>A. flavus</i> dostupni u GenBank bazi podataka	NCBI pristupni broj sekvence iz Blasta	Procenat poklapanja (%)	NCBI pristupni broj ispitivanih izolata
32	<i>Aspergillus flavus</i> isolate CA17	JN394566	99	MH582504
33	<i>Aspergillus flavus</i> isolate CA10	JN394559	99	MH582505
34	<i>Aspergillus flavus</i> isolate CA10	JN394559	99	MH582506
35	<i>Aspergillus flavus</i> isolate CA10	JN394559	99	MH582507
36	<i>Aspergillus flavus</i> strain MUMS-Z20	MG387190	99	MH582508
37	<i>Aspergillus flavus</i> strain CBS 117632	EF203137	99	MH582509
38	<i>Aspergillus flavus</i> strain CBS 117632	EF203137	99	MH582510

Metoda lančane reakcije polimeraze (PCR), elektroforetsko razdvajanje, kao i sekvenciranje umnoženih fragmenata uspešno su primenjeni za identifikaciju ispitivanih izolata *Aspergillus* u ovom istraživanju. Sve pomenute analize rađene na ispitivanim izolatima paralelno su rađene i na referentnom soju *A. flavus* ATCC 9643, u cilju poređenja i potvrde identifikacije. Nakon ekstrakcije DNK testiranih izolata *A. flavus* izvedene su PCR reakcije sa parovima prajmera ITS1/ITS4, AflaFor/Bt2b i Bt2a/Bt2b. Rezultati amplifikacije ciljanih fragmenta rDNK koji obuhvataju ITS genomni region i gen β -tubulin gen razdvojeni su na gelu *lab-on-chip* elektroforezom. Veličina fragmenata dobijenih PCR reakcijom primenom prajmera ITS1/ITS4 iznosila je 600 bp za sve izolate, kao i referentni soj. Za fragmente dobijene PCR reakcijom sa prajmerima AflaFor/Bt2b veličina je iznosila 447 bp, dok je veličina fragmenata svih izolata umnoženih prajmerima Bt2a/Bt2b bila 565 bp (Slika 26). Specifičnost prajmera AflaFor je što produkuje fragment jedino u prisustvu *A. flavus* DNK (Barošević i sar., 2016). Kod negativne kontrole (PCR smeša sa *DNase free* vodom) nije zabeležena amplifikacija.

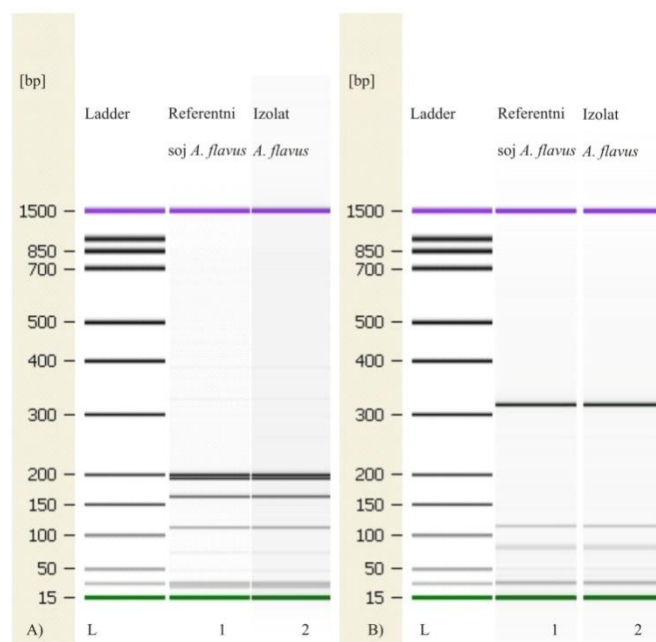


Slika 26. Elektroferogrami PCR proizvoda dobijenih korišćenjem seta prajmera (A- Bt2a/Bt2b, B- AflaFor/Bt2b, C- ITS1/ITS4)

Rezultatima dobijenim elektroforetskim razdvajanjem PCR proizvoda dobijenih korišćenjem seta prajmera ITS1/ITS4, AflaFor/Bt2b i Bt2a/Bt2b utvrđeno je prisustvo traka istih veličina u okviru jednog seta prajmera, tj. isti izgled elektroferograma svih ispitivanih izolata, što ukazuje na identičnost izolata roda *Aspergillus* na molekularno-genetičkom nivou. S obzirom da je razdvajanje amplifikovanih PCR produkata različitih vrsta na gelu potvrđeno sekvenciranjem, metoda lančane reakcije polimeraze u kombinaciji sa *Lab-on-a-chip* elektroforezom se može uspešno koristiti za brzu diferencijaciju vrsta plesni *Aspergillus* - sekcija *Flavi*.

Digestija produkata PCR reakcije umnoženih sa parom univerzalnih prajmera ITS1/ITS4 izvedena je primenom restrikcionih enzima *HhaI* i *MwoI* formirajući određeni broj fragmenata karakterističnih veličina. Veličine fragmenata dobijenih restrikcionim enzimom *HhaI* iznosile su 112 bp, 163 bp, 194 bp, 200 bp, dok su veličine fragmenata nakon restrikcije enzimom *MwoI* iznosile 51 bp, 81 bp, 115 bp i 318 bp (Slika 27). Poređenjem broja i veličine fragmenata ispitivanih izolata sa profilom referentnog soja može se zaključiti da razlike nisu uočene, te da formirani profil kod svih izolata odgovara profilu referentnog soja *A. flavus*. Istraživanja Mirhendi-ja i sar. (2007) su pokazala da je veličina fragmenata PCR produkata dobijenih korišćenjem prajmera ITS1/ITS4 pre digestije iznosila 595 bp, što odgovara rezultatima dobijenim u ovom istraživanju (600 bp), dok su veličine fragmenata dobijenih nakon digestije enzimom *HhaI* prema ispitivanjima ovih autora iznosile 89 bp, 143 bp, 179 bp i 184 bp. Razlike u veličini fragmenata dobijenih primenom istog enzima mogu biti posledica

različitih metoda elektroforetskog razdvajanja. Isti autori (Mirhendi i sar., 2007) su za razdvajanje PCR produkata nakon digestije primenili standardno elektroforetsko razdvajanje na 2% agaroznom gelu, dok je u ovim testovima razdvajanje izvedeno *Lab-on-a-chip* elektroforezom. Slične razlike su zabeležene pri primeni enzima *MwoI* pri poređenju rezultata ovih ispitivanja sa rezultatima autora Diba i sar. (2014) koji su testirali mogućnost primene ovog enzima za identifikaciju i molekularnu karakterizaciju medicinski važnih *Aspergillus* vrsta.



Slika 27. Elektroferogrami PCR proizvoda dobijenih korišćenjem prajmera ITS1/ITS4 i restrikcijom enzimima (A- *HhaI*, B- *MwoI*)

Upoređivanjem odabranih fenotipskih karakteristika izolata koje uključuju boju i izgled kolonija na specifičnim selektivnim podlogama, prisustvo sklerocija, serijalnost konidijalnih glavica, izgled konidija, zajedno sa molekularnom identifikacijom koja je izvršena pomoću analiza sekvenci ITS i β -tubulin gena, upotrebom različitih parova prajmera, uočena je neophodnost primene molekularnih metoda u cilju tačne i pouzdane identifikacije. Slični zaključci su već navedeni od strane različitih autora koji su vršili istraživanja sekcije *Flavi* i drugih vrsta roda *Aspergillus* (Ito i sar., 2001; Peterson i sar., 2001, 2008; Zalar i sar., 2008).

4.3. POTENCIJAL BIOSINTEZE AFB₁ IZOLATA *A. flavus*

Prisustvo aflatoksina u različitim biljnim supstratima uslovljeno je faktorima koji obuhvataju varijaciju vrsta plesni, genetsku predispoziciju, genetsku osetljivost biljke domaćina, vlažnost, temperaturu, aeraciju, faktore stresa, prisustvo drugih mikrobiota

(Bryden, 2009). Interakcija između biotičkih i abiotičkih faktora utiče na infekciju poljoprivrednih i nekih prehrambenih sirovina plesnima, kao i na biosintezu toksina. Ispitivanjem sposobnosti za biosintezu AFB₁ 38 kultura *A. flavus* izolovanih sa zrna hlebne pšenice i spelte nakon žetve u tri proizvodne godine (2015 - 2017) utvrđeno je da su dva izolata (1₂ oznaka u daljem tekstu No. 1 i 20₁ oznaka u daljem tekstu No. 2) poreklom sa zrna hlebne pšenice ispoljila aflatoksigeni potencijal nakon 14 i 21 dana gajenja na temperaturi 25 °C na podlozi YESA (Tabela 12). Ostali izolati nisu pokazali sposobnost biosinteze AFB₁ pri navedenim uslovima za testirani vremenski period. Rezultati dobijeni kvalitativnom trijažnom TLC metodom, kvantifikovani su HPLC metodom. Detekcija i kvantifikacija AFB₁ u podlozi YESA nakon 21 dana pokazala je da su izolati No. 1 i No. 2 proizveli AFB₁ u količinama 140 µg/kg, odnosno 210 µg/kg (Tabela 12).

Tabela 12. Biosinteza AFB₁ izolata *A. flavus* nakon rasta na YESA na 25°C

Oznaka izolata	NCBI pristupni broj	Toksigeni potencijal izolata <i>A. flavus</i>		
		TLC		HPLC
		14 dana	21 dan	21 dan
No. 1	MH582473	+	+	140 µg/kg agara
No. 2	MH582474	+	+	210 µg/kg agara

Podataka o aflatoksigenom potencijalu *A. flavus* izolovanih sa zrna pšenice je malo, dok je sposobnost biosinteze AFB₁ *A. flavus* izolovanih sa drugih biljnih kultura prilično dobro izučena. U istraživanjima Bočarov-Stančić i sar. (2009a), jedan od tri izolata *A. flavus* poreklom uglavnom sa zrna žitarica i stočne hrane pokazao je sposobnost za biosintezu AFB₁ nakon 14 dana kultivisanja na KDA. Lasram i sar. (2016) su testirali uticaj različitih faktora (izvor ugljenika, a_w, temperatura i vreme inkubiranja) na toksigeni potencijal *A. flavus*, sa skladištenog zrna ječma. *A. flavus* je pokazao optimalnu sintezu AFB₁ pri a_w vrednostima 0,95 - 0,98 i temperaturi od 28 °C nakon 5 dana inkubiranja. Reddy i sar. (2009a) su izolovali 85 izolata *A. flavus* sa skladištenih zrna pirinča i testirali proizvodni potencijal AFB₁ na različitim podlogama, pri čemu su 43 izolata ispoljila sposobnost biosinteze AFB₁ (u rasponu od 0,2 µg/g do 40 µg/g agara) nakon inkubiranja u trajanju od 5 dana. Isti autori su ispitali 5 izolata *A. flavus*, poreklom sa sirka, na potencijal biosinteze AFB₁ na žitaricama (ječam, kukuruz, pirinač, pšenica i sirak) i uljaricama (kikiriki i susam). Rezultati su pokazali da je na svim zrnima žitarica posle 7 dana inkubiranja došlo do biosinteze AFB₁ u rasponu od 245,4 µg/kg do 15645,2 µg/kg (Reddy i sar., 2011). Rezultati produkcije AFB₁ dobijeni u ovoj

studiji bili su niži od onih koje su pomenuti autori naveli, što se takođe može objasniti uticajima različitih faktora sredine, dostupnim nutrijentima i genetskom predispozicijom sojeva za produkciju toksina. Rezultati ovih ispitivanja su u skladu sa prethodnom studijom Saleemi i sar. (2010), koji su naveli da je sadržaj AFB₁ određen testiranjem proizvodnog potencijala toksigenskih izolata poreklom iz hrane za ćurke u YESA medijumu nakon 7 dana inkubiranja varirao od 1,57 µg/kg do 1988,7 µg/kg.

Ispitivanjima nekih autora uočena je pozitivna korelacija između sposobnosti formiranja sklerocija i aflatoksinogenosti (Chang i sar., 2002; Novas i Cabral, 2002, Pildain i sar., 2004). Rezultati ovih oglada su pokazali da izolati koji su posedovali sposobnost biosinteze AFB₁, posedovali su i sposobnost formiranja sklerocija tokom kultivacije na KDA 7 dana na 25 °C. Nasuprot tome, neke kulture *A. flavus* iz kolekcije izolata su formirale sklerocije pri pomenutim uslovima, ali nisu imale potencijal biosinteze AFB₁.

Uzimajući u obzir prikazane rezultate (Tabela 12), može se zaključiti da su dva izolata *A. flavus* (No. 1 i No. 2) koji potiču sa zrna hlebne pšenice pokazala potencijal za biosintezu AFB₁ pod određenom uslovima kultivacije. Ispitivanje potencijala biosinteze sekundarnih metabolita *in vitro* može doprineti predviđanju biosinteze mikotoksina u različitim uslovima i različitim supstratima, doprinoseći razumevanju puteva biosinteze mikotoksina u cilju razvoja efikasnih kontrolnih mera.

4.4. OTPORNOST ODABRANIH *Triticum* spp. NA INFEKCIJU *A. flavus* i BIOSINTEZU AFB₁ NAKON INOKULACIJE U POLJSKIM USLOVIMA

Inokulacija spelte, hlebne pšenice, korasana i hibrida pšenice izolatima *A. flavus* No. 1. i No. 2. izvedena je u cilju ispitivanja otpornosti pomenutih *Triticum* vrsta na infekciju sa *A. flavus* i akumulaciju AFB₁. Primenom mikrobioloških metoda određen je intenzitet pojave *A. flavus* nakon inokulacije, a primenom hromatografskih analiza određene su koncentracije AFB₁ u zrnima, kao i u plevičastim omotačima, kako bi se odredila njihova uloga i uticaj na biosintezu AFB₁.

4.4.1. Agrometeorološki uslovi tokom proizvodne 2016. godine

Vremenski uslovi tokom inokulacije klasova koja je izvedena u fazi cvetanja i u ranim fazama razvoja zrna pšenice (maj - jul) značajno su uticali na razvoj plesni, jer period cvetanja biljke predstavlja najosetljiviju fazu za kolonizaciju zrna plesnima (Siou i sar., 2014), uključujući i plesni roda *Aspergillus*. Kao što je prethodno navedeno, pojava ovih plesni i sinteza toksičnih metabolite, posebno preovlađuju u godinama s toplim i suvim vremenskim

uslovima. Temperatura pri kojoj može doći do produkcije aflatoksina od strane *A. flavus* i *A. parasiticus* je u opsegu od 15 °C do 37 °C, dok su optimalne vrednosti za produkciju između 25 °C i 30 °C (Mousa i sar., 2011). *A. flavus* i *A. parasiticus* mogu da rastu i pri vrlo niskim a_w vrednostima od 0,83 (Giorni i sar., 2007). Tokom 2016. godine zabeleženi su relativno umerene srednje prosečne temperature (20,5 °C) i povećane sume padavina (98,8 mm) koji se odnose na period od maja do jula (Republička hidrometeorološka služba Srbije, 2016). Najveće izmerene temperature su zabeležene tokom juna (vrednosti prosečne i maksimalne temperature su iznosile 21,7 odnosno 34,8 °C), sa 6 "tropskih" dana (prosečna dnevna temperatura preko 30 °C) u periodu nalivanja zrna (Tabela 13). Ovakvi uslovi su bili povoljni za razvoj infekcije *A. flavus* i biosintezu AFB₁ nakon veštačke inokulacije različitih vrsta pšenice.

Tabela 13. Vrednosti temperatura i padavina za period maj-jul 2016. godine

	Temperatura vazduha (°C)					Padavine (mm)
	T _{sr.vr.}	T _{min}	T _{max}	T _{x≥25}	T _{x≥30}	Suma padavina
Maj	16,9	5,2	30,8	10	1	85,0
Jun	21,7	10,4	34,8	21	6	143,2
Jul	22,8	12,0	34,3	28	13	68,4
Prosek	20,5	9,2	33,3	19,7	6,7	98,8

4.4.2. Intenzitet pojave plesni u kontrolnim uzorcima *Triticum* spp.

Intenzitet pojave plesni nakon žetve u kontrolnim uzorcima spelte, hlebne pšenice, korasana i hibrida (uzorci tretirani destilovanom vodom) prikazan je u Tabeli 14. Najveći broj mikrobiota identifikovan je u uzorcima hibrida pšenice (11), dok je najmanji broj registrovan u korasan pšenici (8).

U svim *Triticum* vrstama, dominantan rod je bio *Alternaria*, tipičan kosmopolitski rod sa izuzetnom sposobnošću prilagođavanja različitim uslovima spoljašnje sredine, pa spada u glavne kontaminanti pšenice, ječma, raži i ova (Andersen i sar., 2015). Intenzitet pojave *Alternaria* spp. bio je u rasponu od 15% (korasan pšenica) do 31% (hlebna pšenica). Prema istraživanjima Stanković i sar. (2007), rezultati dvogodišnje studije (2005 i 2006) su pokazali sličan intenzitet pojave ovog roda na uzorcima hlebne pšenice.

Tabela 14. Intenzitet pojave (% , srednja vrednost) mikobiota u kontrolnim uzorcima različitih

Triticum vrsta

Rodovi i vrste plesni	Spelta	Hlebna pšenica	Korasan	Hibrid
<i>Alternaria</i> spp.	22,0	31,0	15,0	29,0
<i>Aspergillus flavus</i> Link ex Fr.	5,0	-	-	-
<i>A. ochraceus</i> Wilhelm	1,0	-	-	-
<i>Cladosporium</i> spp.	-	2,0	-	-
<i>Dematiaceous Hyphomycetes</i> (nesporulišuce)	11,0	15,0	14,0	9,0
<i>Epicoccum purpurascens</i> Link	-	-	1,0	5,0
<i>Mucoraceae</i> (<i>Mucor</i> i <i>Rhizopus</i> spp.)	-	-	1,0	2,0
<i>Fusarium</i> sp.	-	4,0	1,0	3,0
<i>F. culmorum</i> (Wm. G. Sm.) Sacc.	-	6,0	-	7,0
<i>F. graminearum</i> Schwabe	3,0	12,0	5,0	14,0
<i>F. sporotrichioides</i> Sherb.	2,0	2,0	-	5,0
<i>Penicillium</i> spp.	1,0	1,0	-	1,0
<i>Stemphylium</i> spp.	9,0	9,0	18,0	9,0
<i>Ulocladium</i> spp.	11,0	7,0	15,0	9,8
Sterilna micelija	2,0	5,0	3,0	6,0

Među vrstama roda *Fusarium*, *F. graminearum* (14%) je preovladavao na uzorcima hibrida, kao i *F. sporotrichioides* (5%). Vrsta *F. culmorum* je identifikovana na zrnju hlebne pšenice i hibrida sa niskim vrednostima za intenzitet pojave (6, odnosno 7%). Relativno visok intenzitet pojave roda *Fusarium* može biti uzrokovan agrometeorološkim uslovima tokom vegetacije pšenice. Smatra se da u godinama sa povećanim nivoom padavina se stvaraju pogodni uslovi za razvoj *Fusarium* vrsta na zrnima pšenice. Visok intenzitet pojave plesni grupe *Dematiaceous Hyphomycetes*, kao što su *Stemphylium* spp. i *Ulocladium* spp., zabeleženi su u svim vrstama pšenice. Još jedan važan rod iz grupe *Demateaceus* je *Cladosporium* spp. determinisan u hleбноj pšenici sa intenzitetom pojave od 2%. Incidenca *Penicillium* spp. je bila niska (1%) u uzorcima svih *Triticum* vrsta, izuzev korasan pšenice, u kojoj prisustvo ovog roda nije detektovano. Identifikovane vrste roda *Aspergillus*, kao što su *A. flavus* i *A. ochraceus*, bile su prisutne samo u spelti, sa intenzitetom pojave od 5% odnosno 1%.

4.4.3. Ukupan broj i intenzitet pojave *A. flavus* na zrnju različitih *Triticum* vrsta nakon inokulacije

Ukupan broj plesni *A. flavus* na uzorcima zrna *Triticum* vrsta nakon veštačke inokulacije izolatima *A. flavus* No. 1 i *A. flavus* No. 2, kao i kontrolnim i uzorcima tretiranim fungicidom prikazani su u Tabeli 15.

Tabela 15. Ukupan broj plesni *A. flavus* (cfu/g) u različitim *Triticum* vrstama nakon inokulacije ($\bar{X} \pm SD$)

Treatmani	Spelta	Hlebna pšenica	Korasan pšenica	Hibrid
<i>A. flavus</i> No. 1	1200±200 ^d	900±200 ^c	550±100 ^c	550±100 ^b
<i>A. flavus</i> No. 2	750±100 ^c	750±100 ^c	650±100 ^c	700±200 ^b
Fungicid	100±0 ^a	250±100 ^a	100±0 ^a	250±100 ^a
Kontrola	200±0 ^b	450±100 ^b	250±100 ^b	350±100 ^a

Različita slova napisana u indeksima u istoj koloni tabele označavaju statistički značajne razlike u srednjim vrednostima uzoraka (na nivou $p < 0,05$), na osnovu post-ANOVA Tukey-evog HSD testa

Poređenjem kontrolnih uzoraka različitih vrsta pšenice, može se uočiti da su na uzorcima spelte i korasan pšenice plesni bile prisutne u najmanjem broju (200 cfu/g i 250 cfu/g), što potvrđuje činjenicu da su stare vrste prirodno otpornije na uticaj spoljašnjih faktora, a samim tim i na infekciju plesnima. Hlebna pšenica je bila najviše podložna infekciji mikobiotama (450 cfu/g). Nasuprot kontrolnim uzorcima, u uzorcima spelte tretiranim sa *A. flavus* No. 1. i No. 2. ukupan broj je iznosio 1200 (cfu/g) i 750 (cfu/g). Ova činjenica ukazuje na relativno dobru podložnost spelte infekciji sa *A. flavus* u polju. Najslabiji odgovor na infekciju izolatima *A. flavus* No. 1 i No. 2 zabeležen je kod korasan pšenice (550 i 650 cfu/g). U uzorcima svih vrsta pšenice tretiranih fungicidom došlo je do statistički značajnog smanjenja ($p < 0,05$) ukupnog broja plesni, što ukazuje na efikasnost primenjene hemijske zaštite.

Rezultati intenziteta pojave *A. flavus* na različitim vrstama *Triticum* spp. nakon inokulacije izolatima *A. flavus* No. 1 i *A. flavus* No. 2, kao i kontrolnim i uzorcima tretiranim fungicidom prikazani su u Tabeli 16.

Tabela 16. Intenzitet pojave (% , srednja vrednost) *A. flavus* na različitim *Triticum* vrstama nakon inokulacije

Treatmani	Spelta	Hlebna pšenica	Khorasan pšenica	Hibrid
<i>A. flavus</i> No. 1	62	6	3	7
<i>A. flavus</i> No. 2	25	9	5	13
Fungicid	2	0	0	0
Kontrola	5	0	0	0

Dobijeni rezultati ukazuju na značajne razlike u intenzitetu pojave *A. flavus* u analiziranim vrstama pšenice. Poređenjem kontrolnih uzoraka, može se videti da je prisustvo *A. flavus* zabeleženo samo kod spelte (5%), dok kod drugih vrsta pojava ove plesni nije uočena. Intenzitet pojave *A. flavus* na spelti je iznosio 62% (*A. flavus* No. 1) i 25% (*A. flavus* No. 2). Najslabiji odgovor na infekciju u oba slučaja zabeležen je kod korasan pšenice (3 i

5%) (Tabela 16). Primećen je veći intenzitet pojave *A. flavus* No. 1 u svim vrstama pšenice, sem kod hibrida gde je *A. flavus* No. 2 bio dominantniji.

4.4.4. Sadržaj AFB₁ u zrnu i plevičastim omotačima *Triticum* spp.

Sadržaj AFB₁ u *Triticum* spp. nakon inokulacije izolatima *A. flavus* No. 1 i *A. flavus* No. 2 u poljskim uslovima prikazan je u Tabeli 17. Navedeni podaci ukazuju na značajne razlike u sadržaju AFB₁ u analiziranim *Triticum* vrstama (spelti, hlebnoj pšenici, korasan pšenici i hibridu pšenice). Najotpornija vrsta na infekciju *A. flavus* bila je korasan pšenica, dok je najizraženija podložnost infekciji zabeležena kod spelte. Prosečan sadržaj AFB₁ u svim vrstama pšenice, osim u hibridu, bio je veći u uzorcima tretiranim izolatom *A. flavus* No. 1, u poređenju sa izolatom *A. flavus* No. 2. Istraživanja koja su sprovedena pre inokulacije, a odnosila su se na proveru toksičnosti izolata u laboratorijskim uslovima, pokazala su da su izolati *A. flavus* No. 1 i *A. flavus* No. 2, nakon 21 dan rasta na YESA podlozi na 25 °C u mraku, produkovali AFB₁ u količinama od 140 µg/kg i 210 µg/kg, respektivno (Krulj i sar., 2016b).

Tabela 17. Sadržaj AFB₁ u plevičastim omotačima i oljuštenim zrnima *Triticum* vrsta ($\bar{X} \pm SD$)

<i>Triticum</i> vrste	Uzorci	Sadržaj AFB ₁ (µg/kg)			
		<i>A. flavus</i> No. 1	<i>A. flavus</i> No. 2	Fungicid	Kontrola
Spelta	Plevičasti omotači	648±23,1 ^d	97,3±3,09 ^c	<LOD*	7,10±0,20 ^a
	Oljuštena zrna	256±12,8 ^c	30,7±5,34 ^b	<LOD	<LOD
Hlebna pšenica	Plevičasti omotači	18,3±0,29 ^a	4,83±0,33 ^a	<LOD	<LOD
	Oljuštena zrna	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Hibrid pšenice	Plevičasti omotači	49,1±1,59 ^b	109±1,82 ^d	<LOD	<LOD
	Oljuštena zrna	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Korasan pšenica	Plevičasti omotači	7,92±1,53 ^a	5,24±0,80 ^a	<LOD	<LOD
	Oljuštena zrna	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

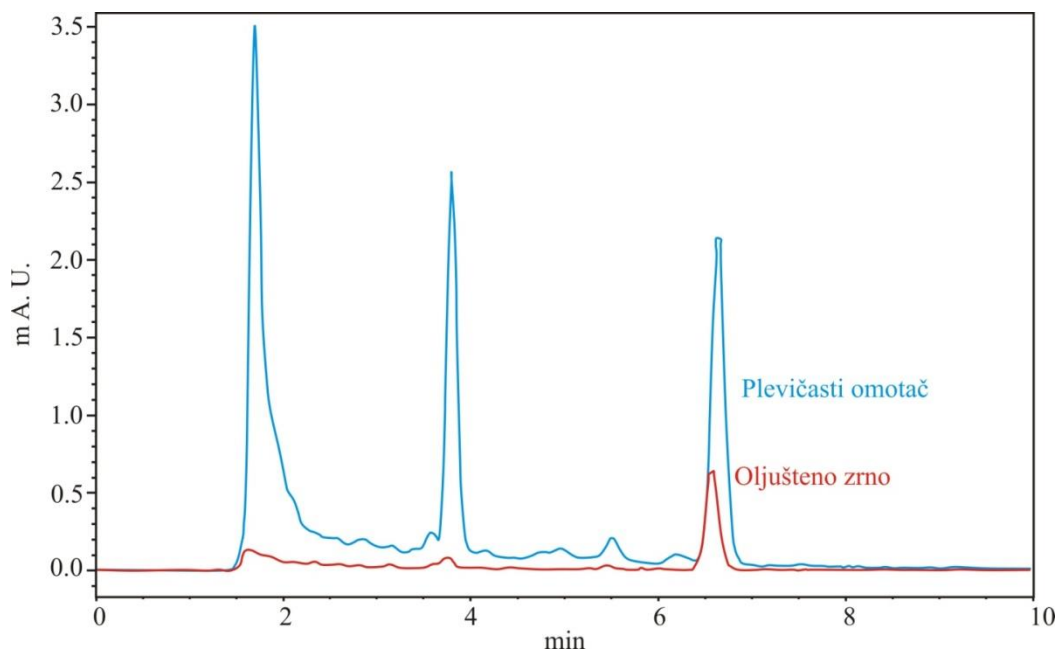
Različita slova napisana u indeksima u istom redu tabele, označavaju statistički značajne razlike u srednjim vrednostima uzoraka (na nivou $p < 0,05$), na osnovu post-ANOVA Tukey-evog HSD testa

*LOD=0,4 µg/kg

U svim uzorcima tretiranim fungicidom, sadržaj AFB₁ je očekivano bio ispod granica detekcije (<LOD). Poređenjem kontrolnih uzoraka različitih vrsta pšenice, tj. uzoraka tretiranih vodom, može se zaključiti da je samo u spelti detektovano prisustvo AFB₁ u količini

od 7,10 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Visok nivo AFB_1 (256 mg/kg) je kvantifikovan u zrnju spelte, dok kod drugih *Triticum* vrsta, AFB_1 u zrnju nije detektovan (<LOD). Ovo ukazuje na to da se otpornost spelte na infekciju *A. flavus* razlikuje u poređenju sa drugim vrstama. Literaturnih podataka o akumulaciji AFB_1 u zrnju spelte do sada nema. Rezultati dvogodišnje studije (2009 i 2010) u Poljskoj pokazali su relativno nisku učestalost pojave aflatoksina (0,2 i 5 %, respektivno) u prirodno kontaminiranim organskim proizvodima od spelte (Solarska i sar., 2012).

Uzimajući u obzir sadržaj AFB_1 u plevičastim omotačima spelte, zabeležena je značajna razlika između uzoraka sa izolatima *A. flavus* No. 1 i No. 2. Sadržaj AFB_1 u uzorcima plevičastih omotača tretiranih sa *A. flavus* No. 1 je iznosio 648 $\mu\text{g}/\text{kg}$, a 97,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ u uzorcima sa *A. flavus* No. 2, što je u proseku tri puta više od sadržaja dobijenih za uzorke zrna spelte (30,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ odnosno 256 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (Slika 28). Uzimajući u obzir pomenute razlike u sadržaju mikotoksina, može se zaključiti da plevičasti omotači efikasno štite zrno od infekcije *A. flavus* i njenih toksičnih metabolita. Rezultati ovih istraživanja su u skladu sa dobijenim podacima u istraživanjima Vučković i sar. (2013) koja se odnose na toksine *Alternaria* vrsta. Koncentracije alternariola i alternariol monometil etra nakon veštačke inokulacije spelte *Alternaria* vrstama bile su u proseku četiri puta veće u plevičastim omotačima u odnosu na zrno Vučković i sar. (2013).



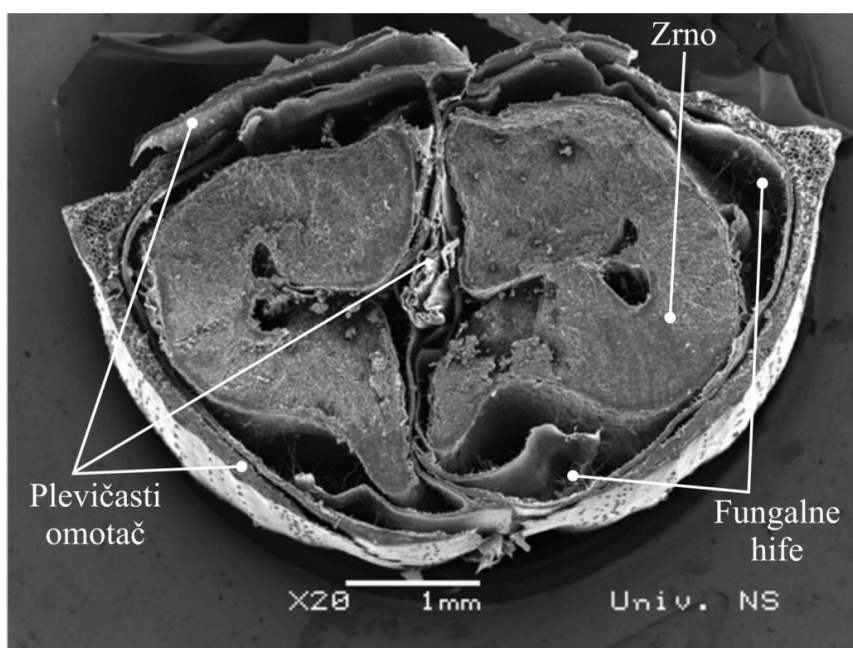
Slika 28. Hromatogrami AFB_1 u plevičastim omotačima i oljuštenim zrnima spelte

Imajući u vidu odnos toksina u plevičastim omotačima i zrnju, važno je istaći da plevičasti omotač hlebne pšenice čini oko 15-20 % ukupne mase zrna (Bledzki i sar., 2012), dok

plevičasti omotač spelte čini 25-35 % ukupne mase (Medović, 2003). Ova činjenica je značajna ako se uzme u obzir sadržaj AFB₁ po ukupnoj masi zrna. Najniži nivo AFB₁ (7,92 µg/kg u slučaju *A. flavus* No. 1 i 5,24 µg/kg u slučaju *A. flavus* No. 2) zabeležen je u plevičastim omotačima korasan pšenice, koja se pokazala najotpornijom na rast i razvoj *A. flavus* i biosintezu AFB₁. Generalno, korasan pšenica se smatra manje podložnom vrstom fiziološkom stresu izazvanom spoljašnjim faktorima od konvencionalne hlebne pšenice, što je zajednička karakteristika većine starih vrsta.

Neka od skorašnjih istraživanja su pokazala da se zdravije zrno spelte dobija u slučaju kad je zaštićeno plevičastim omotačima, koji na taj način štite zrno od patogena iz roda *Alternaria* (Vučković i sar., 2013) i *Fusarium* (Suchowilska i sar., 2010; Wiwart i sar., 2016). Nasuprot tome, u studijama Wiwart i sar. (2004) i Suchowilska i sar. (2007) saopšteno je da se spelta pokazala manje otpornom na infekciju sa *F. culmorum* u odnosu na hlebnu pšenicu, što se može dovesti u vezu s činjenicom da zrna pod plevom stvaraju povoljnije uslove za rast patogena. Rezultati naših istraživanja su u skladu sa pomenutim studijama.

Mikrografija poprečnog preseka klasića spelte daje prikaz plevičastog omotača koji čvrsto obavija zrno (Slika 29), dok hlebna pšenica, hibrid i khorasan pšenica kao golozrne vrste, imaju plevičaste omotače koji se vršidbom lako odvajaju. Rezultati određivanja sadržaja AFB₁ u *Triticum* vrstama pokazali su da plevičasti omotači golozrnih vrsta ne pružaju povoljne uslove za rast *A. flavus*, prodiranje hifa u zrno, kao i biosintezu AFB₁, dok je utvrđeno da je zrno spelte osetljivo na infekciju prouzrokovanu rastom plesni.



Slika 29. Mikrografija (SEM) poprečnog preseka klasića spelte (uvećanje 20×)

Pored činjenice da plevičasti omotači imaju zaštitnu ulogu u prodoru micelija plesni, duga stabljika i rastresiti klasovi mogu doprineti sporijem širenju prirodne infekcije filamentoznih plesni koje uglavnom potiču iz zemljišta. Takođe, rastresiti klasovi spelte pružaju veću aktivnu površinu tokom inokulacije omogućavajući konidijama da dospeju do svih delova klasića. To nije slučaj sa vrstama pšenice kao što su hlebna pšenica, korasan i hibrid pšenice koje karakterišu gusto zbijena zrna u klasovima.

4.4.5. Fizičko-hemijska svojstva plevičastih omotača zrna *Triticum* vrsta

Vlakna plevičastih omotača su trodimenzionalni polimerni kompoziti koji se uglavnom sastoje od celuloze (36%), hemiceluloze (18%), lignina (16%) poreklom iz ćelijskih zidova i male količine proteina (6%), skroba (9%) i masti (5%) koji potiču iz sadržaja ćelija. Ostali sastojci vlakana su neorganske materije i pepeo (Bledzki i sar., 2010). Polimerna vlakna ćelijskih zidova sadrže hidroksilne i druge grupe koje u svom sastavu imaju kiseonik koji može da veže vodu putem vodoničnih veza. Hemiceluloza je uglavnom odgovorna za sorpciju vlage, ali i prisutna celuloza, nekristalna celuloza i lignin takođe imaju važnu ulogu u hidrataciji (Bledzki i sar., 2012). Ukupan sadržaj prehrambenih vlakana (TDF) određen je u plevičastim omotačima različitih vrsta *Triticum* spp. u cilju utvrđivanja hidratacionih svojstava vlakana određen je indeks apsorpcije vode (WAI) (Tabela 18). Statistički značajno ($p < 0,05$) veća vrednost WAI je zabeležena kod plevičastih omotača spelte (5,13 g vode/g uzorka) u odnosu na druge vrste pšenice, što može biti posledica većeg sadržaja ukupnih vlakana.

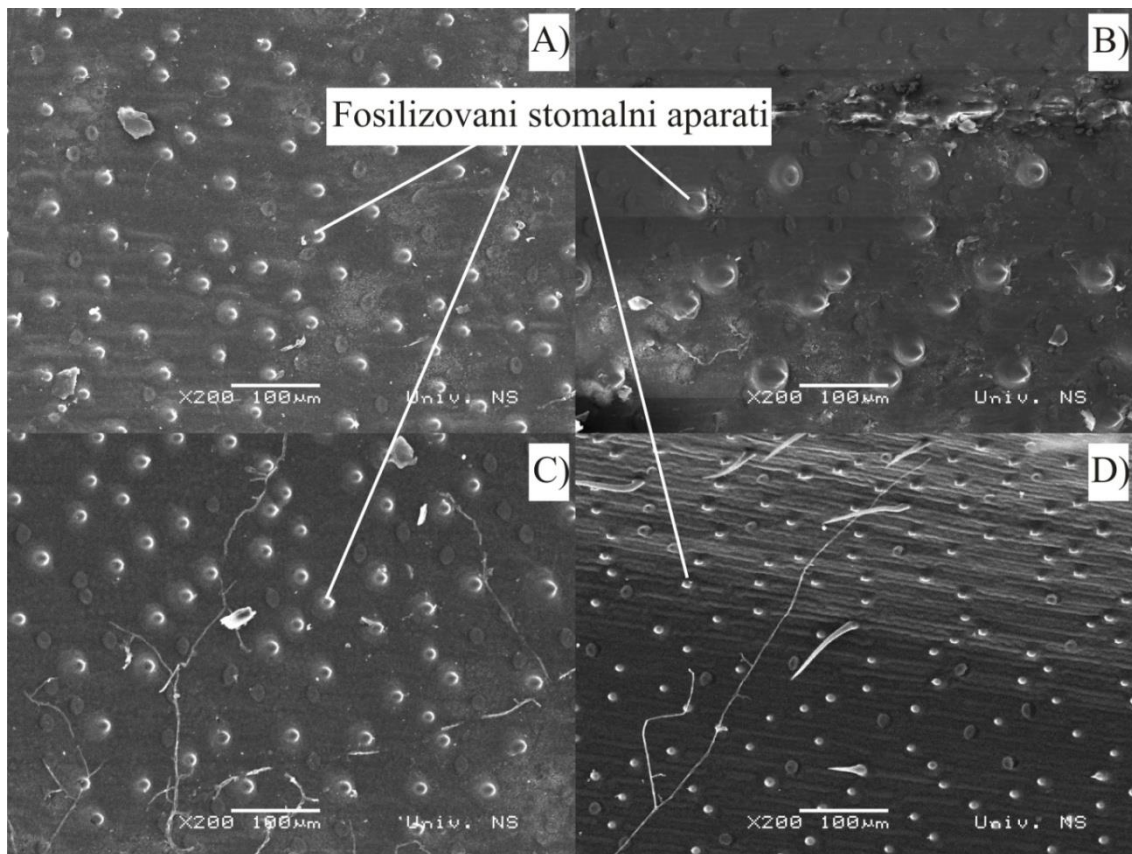
Tabela 18. Indeks apsorpcije vode (WAI) i ukupna prehrambena vlakna (TDF) plevičastih omotača različitih *Triticum* vrsta

<i>Triticum</i> vrste	Indeks apsorpcije vode (WAI), (g/g)	Ukupna prehrambena vlakna (TDF), (% na s.m.)
Spelta	5,13 ^b	72,2 ^b
Hlebna pšenica	4,08 ^a	58,6 ^a
Korasan pšenica	4,44 ^a	66,2 ^b
Hibrid	4,11 ^a	69,3 ^b

Različita slova napisana u indeksima u istom redu tabele, označavaju statistički značajne razlike u srednjim vrednostima uzoraka (na nivou $p < 0,05$), na osnovu post-ANOVA Tukey-evog HSD testa.

Hidrataciona svojstva vlakana su takođe u vezi sa hemijskom strukturom polisaharidnih komponenti i drugim faktorima kao što su poroznost, veličina čestica, jonski oblik, pH, temperatura, jonska jačina. Razlike u sastavu i strukturi, površinskoj poroznosti i veličini

čestica plevičastih omotača mogu doprineti razlikama u kapacitetu zadržavanja vode (Liu i sar., 2016). Izgled i spoljne karakteristike plevičastih omotača prikazani su na mikrografijama (Slika 30).



Slika 30. Mikrografije spoljašnje strane plevičastih omotača: A - spelte, B - hlebne pšenice, C - hibrida i D - korasan pšenice (uvećanje 200×)

Statističke vrednosti, dobijene analizom mikrografija u programu Gwyddion, uključuju nekoliko osnovnih vrednosti koje pokazuju raspodelu visina fosilizovanih stomalnih aparata plevičastih omotača, kao što su srednje vrednosti, medijane i površine pora (Tabela 19). Stomin aparat reguliše proces transpiracije i razmene gasova. U tom svojstvu značajno doprinosi sposobnosti biljke da kontroliše promet gasova i odavanje vodene pare. Istraživanja Pritsch i sar. (2000) su se odnosila na ispitivanje prodora micelija plesni kroz stomalni aparat plevičastih omotača tokom rane infekcije sa *F. graminearum*. Mikroskopski pregled inokulisane pšenice pokazao je da plesni prodiru kroz stomalni kompleks, omogućavajući sporulaciju u roku od 48 do 76 h nakon inokulacije. Srednje vrednosti i medijane otvora stominog aparata plevičastih omotača spelte su manje od vrednosti izmerenih za hibrid i hlebnu pšenicu (72,7 μm i 68 μm za speltu, u poređenju sa 79,6 μm i 74 μm za hibrid i 97,0 μm i 91,0 μm za hlebnu pšenicu) (Tabela 19). U zavisnosti od vrste biljke i uslova okoline

dužina otvora stoma se kreće od 10 do 80 μm (Hetherington i Woodward, 2003). Površina stominog aparata plevičastih omotača izračunava se sukcesivnim sumiranjem površina svake pore koja je prikazana na mikrografijama spoljašnje strane plevičastih omotača (Slika 30). Površina stominog aparata plevičastih omotača spelte bila je manja u poređenju sa drugim vrstama pšenice ($5,1 \times 10^{-6} \text{ mm}^2$ za speltu, u poređenju sa $10,7 \times 10^{-6} \text{ mm}^2$, $10,7 \times 10^{-6} \text{ mm}^2$ i $11,4 \times 10^{-6} \text{ mm}^2$ za hibrid, korasan i hlebnu pšenicu, respektivno). Podaci za veličinu i površinu stominog aparata plevičastih omotača pokazuju da manji stomalni otvori mogu usloviti smanjenu brzinu transpiracije. Studija Aasamaa i sar. (2001) pokazala je da veličina stominog aparata ima ključnu ulogu u kontroli sadržaja vode kod lišća šumskog drveća, te da postoji pozitivna korelacija između dimenzije stomalnih pora i provodljivosti. Rezultati ove studije ukazuju da sporiji gubici vode kroz stomin aparat mogu biti uzrok zadržavanja vode kod spelte, pa usled povećane vlage stvaraju se povoljni uslovi za razvoj plesni. Korelacija između srednjih vrednosti veličine pore i WAI i površine stominog aparata je iznosila -0,96, na nivou statističke značajnosti od $p < 0,05$.

Koren kvadrata srednjih vrednosti (eng. *root mean square* - RMS) je izražen da bi se pokazala zavisnost visine neravnina u okviru svake posmatrane stomalne pore (ova vrednost se računa na osnovu varijanse sive boje na SEM slici). Varijacije u visini za speltin omotač (14,6 μm) bile su najmanje u odnosu na druge vrste pšenice (17,5 μm , 26,1 μm i 17,7 μm za hibrid, korasan i hlebnu pšenicu, respektivno).

Tabela 19. Deskriptivna statistika raspodele visina neravnina za plevičaste omotače različitih vrsta pšenice (uočava se na mikrografijama, Slika 30)

	Spelta	Hlebna pšenica	Korasan	Hibrid pšenice
Srednja vrednost: μm	72,7	97,0	69,5	79,6
Medijana: μm	68,0	91,0	58,0	74,0
RMS: μm	14,6	17,7	26,1	17,5
RMS (za plevičasti omotač): μm	25,5	28,4	37,0	28,9
Površina pore : $\times 10^{-6} \text{ mm}^2$	5,10	11,4	10,7	10,7

Ukupna vrednost RMS za zrno je dobijena posebno za svaku neravninu (obeležavanjem delova SEM slike koji učestvuju u računanju), a varijansa je izračunata iz tih vrednosti. Slično kao i za RMS, izračunate varijacije u visini neravnina za speltin omotač (25,5 μm) bile su najmanje u odnosu na druge vrste pšenice (28,9 μm , 37,0 μm i 28,4 μm za hibrid, korasan i hlebnu pšenicu, respektivno). Prikazani podaci za raspodelu visina neravnina plevičastih omotača spelte se razlikuju u poređenju sa drugim vrstama pšenice.

Ovakav strukturni profil plevičastih omotača omogućava povećanje vlage u klasićima spelte, što je uzrokovano zadržavanjem vlage u plevičastim omotačima i njihovom raspodelom visina neravnina, doprinoseći razvoju filamentoznih plesni, uključujući i toksigene vrste. Vrednost aktivnosti vode veća od minimalne koja je neophodna za rast mikrobiota tj. veći sadržaj vlage omogućava intenzivniji rast plesni u kombinaciji sa stresogenim uslovima dovodi do biosinteze sekundarnih metabolita kao što je AFB₁. Razumevanje odnosa i koherentnog rasta *Triticum* vrsta i *A. flavus* tokom perioda razvoja pšenice je bitno jer interakcija *A. flavus*-pšenica nije dovoljno izučena. Pregledom naučnih saznanja koja su bazirana na ispitivanju pojave *A. flavus* i aflatoksina, utvrđeno je da literaturni izvori ne potkrepljuju činjenice i saznanja koji se odnose na ispitivanje otpornosti *Triticum* vrsta na infekciju sa *A. flavus* i akumulaciju AFB₁ u polju. Analizom sadržaja AFB₁ u zrnju, kao i ispitivanjem potencijalnog doprinosa plevičastih omotača razvoju *A. flavus* može se zaključiti da se *Triticum* vrste značajno razlikuju u pogledu sposobnosti akumulacije AFB₁. Predstavljeni rezultati su pokazali da plevičasti omotači mogu imati zaštitni efekat, ali ako su uslovi povoljni, spelta može postati pogodan supstrat za rast i razvoj *A. flavus* kao i biosintezu AFB₁. Rezultati istraživanja su dali model akumulacije AFB₁ u različitim vrstama *Triticum* spp. što u svetlu novonastalih klimatskih promena predstavlja bitan aspekt u sektoru koji se odnosi na bezbednost hrane.

4.5. UTICAJ USLOVA SKLADIŠTENJA NA AKUMULACIJU AFB₁ U OLJUŠTENIM ZRNIMA SPELTE I ZRNIMA SA PLEVIČASTIM OMOTAČEM

Najvažniji faktori koji utiču na rast plesni i sintezu toksina su temperatura, aktivnost vode (a_w vrednost) supstrata, relativna vlažnost, sastav gasa, sastav supstrata, koncentracija inokuluma, mikrobne interakcije i potencijalna oštećenja insektima (Guynot i sar., 2003; Giorni i sar., 2008). Interakcija između pojedinih ili svih navedenih faktora određuje da li će doći do pojave kontaminacije i biosinteze mikotoksina. Interakcija između dostupne vode i temperature je suštinska, zato što predstavlja ekološku nišu u kojoj plesni mogu da kličaju, rastu i aktivno se nadmeću za raspodelu raspoloživih nutrijenata (Marín i sar., 1998; Samapundo i sar., 2007a, 2007b). Efekti različitih temperatura (15, 23, 30 i 37 °C) i aktivnosti vode (0,85; 0,90; 0,95 i 0,99) na sintezu AFB₁ ispitani su na inokulisanim uzorcima spelte. Ispitivanje je izvedeno na uzorcima spelte sa plevičastim omotačima kao i prethodno oljuštenim zrnima. Sadržaj AFB₁ nakon inkubiranja u trajanju od četiri nedelje određen

odvojeno u zrnima i plevičastim omotačima, kako bi se uvideo efekat plevičastih omotača na akumulaciju AFB₁ u zrnu.

Pojava aflatoksina u spelti je do sada bila retko zabeležena. U istraživanjima autora Solarska i sar. (2012) u Poljskoj navodi se relativno mali procenat kontaminiranih uzoraka organskih proizvoda od spelte tokom dve proizvodne godine (2010 i 2011). Efekti klimatskih promena i kontinualne inovacije u poljoprivrednoj praksi uzrokuju pojavu većeg broja vrsta plesni na žitaricama u polju, koji se kasnije mogu naći i u skladištu. Imajući u vidu promene klimatskih uslova kao što su povišene temperature, učestalije suše i povećan sadržaj CO₂ kao faktore koji značajno utiču na biosintezu AFB₁, istraživanja Medina i sar. (2017) ukazuju da su temperatura i a_w vrednost supstrata ključni faktori koji u skladištu stimulišu produkciju AFB₁. Sadržaj AFB₁ određen u uzorcima zrna spelte inkubiranim bez plevičastih omotača (ZBPO), u plevičastim omotačima (PO) i u zrnima nakon ljuštenja – oljuštenim zrnima (OZ) prikazan je u Tabeli 20. Značajne razlike u sadržaju AFB₁ se mogu uočiti u zrnima inkubiranim bez pleve i zrnima inkubiranim sa plevičastim omotačima. Sadržaj AFB₁ u uzorcima zrna bez pleve iznosio je u opsegu od 30,6 µg/kg do 21.535,5 µg/kg u zavisnosti od uslova inkubiranja. Znatno niži sadržaj je određen u oljuštenim zrnima u opsegu od 1,3 µg/kg do 112,4 µg/kg, dok je sadržaj u plevičastim omotačima iznosio od 28,96 µg/kg do 13.654,2 µg/kg.

Optimalni uslovi za biosintezu tj. uslovi pri kojima je ostvarena najveća produkcija AFB₁ bili su temperatura 30 °C i a_w 0,99 u svim vrstama uzoraka (23.535,54 µg/kg u zrnu bez plevičastih omotača, 112,37 µg/kg u oljuštenim zrnima i 13.654,23 µg/kg u plevičastim omotačima) (Tabela 20). Kao što je prethodno navedeno, plevičasti omotači spelte čine 25-35% ukupne mase zrna (Medović, 2003).

Reddy i sar. (2011) su ispitivali sadržaj AFB₁ u uzorcima zrna hlebne pšenice inokulisanim sa *A. flavus*, pri čemu se sadržaj mikotoksina kretao u opsegu od 1.506,1 µg/kg do 7.402,4 µg/kg. Rezultati ovih ispitivanja su pokazali da je prisustvo plevičastih omotača predstavljalo zaštitnu barijeru za razvoj infekcije. Rast plesni i biosinteza toksina bili su izraženiji kod zrna bez plevičastih omotača zbog bolje raspoloživosti skroba i drugih hranljivih materija iz zrna. U zavisnosti od ispitivanih uslova temperature i a_w , nivo AFB₁ je bio od 10 do 170 puta veći u plevičastim omotačima, u poređenju sa oljuštenim zrnima.

Tabela 20. Sadržaj AFB₁ (µg/kg) u uzorcima zrna spelte inkubiranih bez plevičastih omotača (ZBPO), oljuštenim zrnima (OZ) i plevičastim omotačima (PO) u funkciji temperature i a_w vrednosti ($\bar{X} \pm SD$)

a _w	AFB ₁ ZBPO (µg/kg)				AFB ₁ OZ (µg/kg)				AFB ₁ PO (µg/kg)			
	15 °C	23 °C	30 °C	37 °C	15 °C	23 °C	30 °C	37 °C	15 °C	23 °C	30 °C	37 °C
0,85	36,8 ^{bA} ±7,5	64,5 ^{bA} ±9,1	281,4 ^{cA} ±11,3	30,6 ^{bA} ±6,8	1,3 ^{aA*} ±0,9	1,3 ^{aA} ±0,5	25,1 ^{aA} ±7,1	19,1 ^{aA} ±5,8	29,0 ^{bA} ±9,8	103,6 ^{cA} ±31,4	208,9 ^{bA} ±24,9	91,1 ^{cA} ±13,8
0,90	66,4 ^{bB} ±9,6	434,6 ^{cB} ±15,8	2.815,5 ^{cA} ±119,2	221,1 ^{cB} ±13,8	1,4 ^{aA} ±0,6	2,1 ^{aA} ±0,7	32,4 ^{aA} ±6,4	22,3 ^{aAB} ±3,9	92,4 ^{cB} ±17,6	252,2 ^{bB} ±21,8	1.856,5 ^{bB} ±135,7	165,1 ^{bB} ±11,5
0,95	140,1 ^{bC} ±19,8	2.431,0 ^{cC} ±86,6	4.066,7 ^{cB} ±145,1	317,7 ^{cD} ±39,5	1,5 ^{aA} ±0,9	19,5 ^{aB} ±4,2	50,2 ^{aB} ±7,2	24,3 ^{aB} ±3,7	142,9 ^{bC} ±17,8	1.004,6 ^{bC} ±127,4	2.523,6 ^{bC} ±206,3	180,1 ^{bC} ±20,1
0,99	386,3 ^{cD} ±29,6	14.928,9 ^{cD} ±232,9	21.535,5 ^{cC} ±537,6	250,7 ^{cC} ±29,1	5,0 ^{aB} ±1,1	40,2 ^{aC} ±8,6	112,4 ^{aC} ±10,7	20,4 ^{aA} ±4,1	252,4 ^{bD} ±26,0	6.800,2 ^{bD} ±155,4	13.654,2 ^{bD} ±398,2	204,6 ^{bD} ±22,9

Različita mala slova napisana u indeksima u istom redu tabele, za iste temperature, označavaju statistički značajne razlike u srednjim vrednostima uzoraka (na nivou $p < 0,05$), na osnovu post-ANOVA Tukey-evog HSD testa; različita velika slova napisana u eksponentima u istoj koloni tabele, označavaju statistički značajne razlike u srednjim vrednostima uzoraka (na nivou $p < 0,05$), na osnovu post-ANOVA Tukey-evog HSD testa, n=3 ponavljanja

*LOD = 0,4 µg/kg

Rezultati ovih istraživanja su u skladu sa studijama Reddy i sar. (2009b), kao i Vučković i sar. (2013) koji potvrđuju zaštitnu ulogu plevičastih omotača. U prethodnoj faza ovih istraživanja, proverom otpornosti *Triticum* vrsta inokulisanih takođe izolatom *A. flavus* No. 1 u polju, sadržaj AFB₁ je iznosio 256 µg/kg u zrnu i 648 µg/kg u plevičastim omotačima (Krulj i sar., 2018). Rezultati sadržaja AFB₁ dobijeni inkubiranjem u laboratorijskim uslovima su bili očekivano veći u poređenju sa rezultatima dobijenim u polju, što se može objasniti kontrolisanim laboratorijskim uslovima. Nekoliko *in vitro* studija bazirano je na ispitivanju optimalnih temperatura i a_w vrednosti za rast *A. flavus* i biosintezu AFB₁. *A. flavus* i *A. parasiticus* mogu da rastu pri širokom opsegu temperatura (od 12 °C do 48 °C), ali njihov je rast optimalan u rasponu od 25 °C do 37 °C (Pitt i Hocking, 1997; Schmidt-Heydt i sar., 2010). Optimalna a_w vrednost za rast *A. flavus* i *A. parasiticus* varira od 0,97 do 0,99 (Gibson i sar., 1994; Sautour i sar., 2002), ali je rast zabeležen i pri vrednosti aktivnosti vode od 0,78 (Santin, 2005). Temperaturni opseg za biosintezu AFB₁ varira od 20 °C do 35 °C pri $a_w > 0,85$, ali je utvrđeno da se optimalna sinteza javlja od 28 °C do 30 °C i pri $a_w > 0,95$ (O'Brian i sar., 2007; Schmidt-Heydt i sar., 2009). Vrednosti minimalnih i optimalnih temperatura koje uslovljavaju biosintezu AFB₁ razlikuju se u objavljenim studijama, što se pripisuje varijabilnosti u prirodi i sastavu supstrata, kao i genetskim razlikama producenata (Klich, 2007b).

Pri svim ispitanim a_w vrednostima (0,85; 0,90; 0,95 i 0,99) i svim temperaturama (15, 23, 30 i 37 °C) došlo je do biosinteze AFB₁ u svim vrstama uzoraka, pri čemu se sa povećanjem a_w vrednosti povećavao prinos AFB₁ (Tabela 20). Prema tome, spelta pri a_w vrednostima u opsegu od 0,85 do 0,99 i temperaturama u opsegu od 15 do 37 °C predstavlja pogodan supstrat za rast *A. flavus* i biosintezu toksina. Istraživanja Mohale i sar. (2013) su potvrdila da je veća količina AFB₁ produkovana pri većoj a_w vrednosti ($a_w=0,99$) u poređenju sa nižim a_w vrednostima ($a_w=0,85$). Nekoliko studija je bazirano na ispitivanju uslova biosinteze AFB₁ na drugim supstratima. Mousa i sar. (2011) su odredili sadržaj AFB₁ u pirinču testirajući a_w vrednosti u opsegu od 0,86 do 0,99, pri čemu je a_w vrednost 0,97 bila optimalna. Isti autori su zaključili da pri svim ispitanim temperaturama (10 °C - 43 °C) nije došlo do biosinteze AFB₁ pri vrednosti a_w od 0,82. Istraživanja Samapundo i sar. (2007a) su pokazala da pri a_w vrednosti od 0,801 nije došlo do rasta *A. flavus* i *A. parasiticus* na zrnu kukuruza, dok se pri a_w od 0,822 rast javio na temperaturama od 25 °C i 30 °C. Naša istraživanja pokazuju da pri temperaturama od 15 °C i 37 °C razlike u sadržaju AFB₁ u zrnu nakon ljuštenja pri različitim a_w vrednostima nisu bile značajne. Prema nekim studijama, temperature 15 °C i 37 °C se smatraju marginalnim za biosintezu AFB₁ (Mousa i sar., 2011),

stoga različita raspoloživost vode na tim temperaturama nije značajno uticala na sadržaj AFB₁. Pri navedenim temperaturama najveća količina toksina je detektovana u plevičastim omotačima. Količina AFB₁ zaostala na zrnu nakon ljuštenja bila je niska tako da su razlike u prinosu toksina pri različitim a_w vrednostima bile zanemarljive.

U nekoliko studija je izučavan uticaj različitih temperatura na rast *A. flavus* i biosintezu AFB₁, a kao optimalne vrednosti navode se temperature u opsegu od 25 °C do 30 °C u zavisnosti od primenjenih podloga za rast (Marín i sar., 2012; Castano i sar., 2017). U našem eksperimentu, optimalna temperatura za proizvodnju AFB₁ u zrnu bez pleve, oljuštenom zrnu i plevičastim omotačima je bila 30 °C (Tabela 20). Biosinteza aflatoksina se odvijala u temperaturnom opsegu između 15 °C i 37 °C, mada su dve temperature bile naročito pogodne za povećanu biosintezu aflatoksina: 23 °C i 30 °C. Nešto niže koncentracije su zabeležene u zrnu bez pleve i plevičastim omotačima nakon kultivacije na 23 °C pri svim ispitanim a_w vrednostima, dok kod oljuštenih zrna samo pri a_w 0,99. Prinos AFB₁ kod oljuštenog zrna pšenice je bio veći na 37 °C u poređenju sa 23 °C pri a_w nivoima 0,85, 0,90 i 0,95. U istom tipu uzoraka biosinteza AFB₁ bila je skoro zanemarljiva pri 15 °C (1,3-2,0 µg/kg). Rezultati naših istraživanja su u saglasnosti sa istraživanjima Mousa i sar. (2011) koji su saopštili da je optimalna temperatura za proizvodnju toksina na zrnu pirinča u opsegu od 25 °C do 30 °C. Nasuprot tome, Lahouar i sar. (2016) su odredili da je optimalna temperatura za akumulaciju AFB₁ na zrnu sirka 37 °C, iako je optimalna vrednost a_w bila slična onoj dobijenoj u našim ispitivanjima (0,97-0,99). Njihov zaključak nije iznenađujući jer su testirali izolate dobijene iz uzoraka sirka sakupljenih na području Tunisa. Nasuprot izolatu *A. flavus* primenjenom u našem eksperimentu, a izolovanom sa zrna hlebne pšenice sakupljene na severu Srbije, gde preovlađuje umerena klima, izolati iz Tunisa su bili prilagođeni rastu na visokim temperaturama tako da je na temperaturi od 37 °C bila favorizovana biosinteza AFB₁.

4.5.1. Matematički i statistički modeli

Razvoj matematičkih modela koji se koriste u predviđanju akumulacije mikotoksina u uzorcima hrane, na osnovu faktora sa visokom značajnošću kao što su aktivnost vode i temperatura, predstavlja ključni korak u proceni rizika. U ovom istraživanju predloženo je nekoliko numeričkih pristupa za predviđanje sadržaja AFB₁ u odnosu na ispitivane promenljive koje se odnose na uslove skladištenja.

4.5.1.1. Matematički modeli u obliku polinoma drugog reda (eng. *second order polynomial - SOP*)

Na osnovu opštih preporuka koje su predložili Peters i sar. (1996), pre određivanja modela neuronske mreže (ANN), potrebno je razviti SOP model, da bi se ispitali uticaji nezavisnih promenljivih na odzivne funkcije, koristeći efektivnu ANOVA-u. Vrednosti statističkih promenljivih, koje se koriste za određivanje sposobnosti modela da opiše uticaje a_w i temperature, prikazane su u Tabeli 21. Na izračunavanje AFB_{1ZBPO} u SOP modelu su najviše uticali linearni član a_w i kvadratni član temperature (statistički značajno na nivou $p < 0,05$). Ovi članovi SOP modela su takođe bili uticajni za predviđanje AFB_{1OZ} (statistički značajno na nivou $p < 0,10$). Linearni član temperature skladištenja u SOP modelu je takođe bio uticajan na predikciju AFB_{1OZ} (statistički značajno na nivou $p < 0,10$). Na osnovu ANOVA analize, linearni član a_w je bio najuticajniji u SOP modelu za izračunavanje AFB_{1PO} (statistički značajno na nivou $p < 0,05$), dok je kvadratni član temperature skladištenja bio statistički značajan na nivou $p < 0,10$.

Tabela 21. ANOVA proračun za promenljivu AFB_1 (prikazana je suma kvadrata razlika)

Član polinoma	df	AFB_{1ZBPO}	AFB_{1OZ}	AFB_{1PO}
Temp	1	$1,8 \cdot 10^6$	$1,9 \cdot 10^{3**}$	$1,3 \cdot 10^6$
Temp ²	1	$1,2 \cdot 10^{8*}$	$1,9 \cdot 10^{3**}$	$3,7 \cdot 10^{7**}$
a_w	1	$1,5 \cdot 10^{8*}$	$2,2 \cdot 10^{3**}$	$4,7 \cdot 10^{7*}$
a_w^2	1	$5,0 \cdot 10^7$	$3,9 \cdot 10^2$	$1,6 \cdot 10^7$
Temp \times a_w	1	$1,4 \cdot 10^6$	$5,6 \cdot 10^1$	$1,2 \cdot 10^6$
Greška modela	10	$2,5 \cdot 10^8$	$5,2 \cdot 10^3$	$9,4 \cdot 10^7$
r^2		0,571	0,554	0,521

*Statistički značajan na nivou $p < 0,05$, **Statistički značajan na nivou $p < 0,10$; Članovi greške modela nisu bili statistički značajni; df - broj stepeni slobode

U ANOVA analizi se pokazalo da rezultati svih SOP modela imaju zanemarljiva odstupanja, iz čega može da se izvuče zaključak da zadovoljavajuće predstavljaju merene podatke iz eksperimenta. Treba naglasiti da je trend promene vrednosti AFB_1 pretežno nelinearan, a da je vrednost koeficijenta determinacije SOP modela (r^2) bila relativno niska, što ukazuje na ograničene mogućnosti modela za predviđanje vrednosti AFB_1 , čime se opravdava upotreba neuronske mreže, kao složenijeg i preciznijeg modela predikcije.

4.5.1.2. Model neuronske mreže

Razvijeni matematički model neuronske mreže (ANN) pokazao je dobre osobine generalizacije za set eksperimentalnih podataka, u okviru kojih može da se koristi predviđanje sadržaja AFB_{1ZBPO} , AFB_{1OZ} i AFB_{1PO} , na osnovu zadatih vrednosti a_w i temperature za širok dijapazon vrednosti ovih ulaznih parametara. Analizom performansi ANN modela, zaključeno je da je broj neurona u skrivenom sloju za optimalnu mrežu bio 6 (neuronska mreža MLP 2-6-3), što je zaključeno na osnovu visoke vrednosti r^2 , kao i niska vrednost za SOS (Tabela 22). Tokom ciklusa testiranja modela ANN dobijena vrednost r^2 bila je 0,998, što je mnogo bolje u odnosu na vrednosti u rasponu od 0,521–0,571 kod SOP modela.

Tačnost modela i poklapanje eksperimentalnih vrednosti sa vrednostima izlaznih promenljivih predstavljaju performanse ANN modela, koje se prikazuju sumom r^2 vrednosti između merenih i izračunatih promenljivih AFB_{1ZBPO} , AFB_{1OZ} i AFB_{1PO} , tokom ciklusa učenja, testiranja i validacije neuronske mreže, što je prikazano u Tabeli 22.

Tabela 22. Zbirne performanse neuronske mreže (koeficijenti determinacije i greške modela), za ciklus učenja, testiranja i validacije

Ime mreže	Performanse			Greška			Algoritam	Funkc. greške	Funk. akt. za sloj	
	Učenje	Test.	Valid.	Učenje	Test.	Valid.			Skriveni	Izlazni
MLP 2-6-3	0,637	0,998	0,898	0,085	0,014	0,085	BFGS 12	SOS	Tanh	Identitet

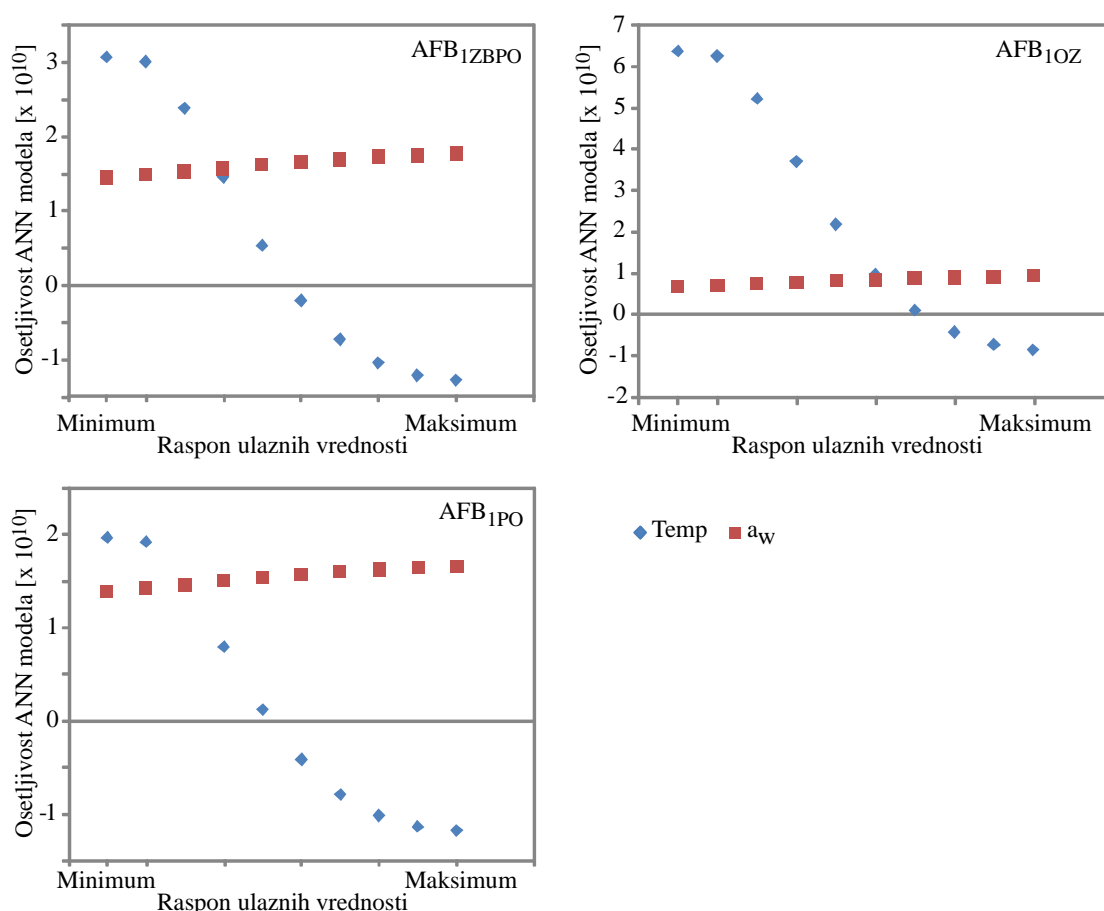
Termin performanse modela ANN predstavlja koeficijent determinacije, a greška modela predstavlja netačnost modela u predstavljanju eksperimentalnih podataka. Test. - ciklus testiranja; Valid. - ANN ciklus validacije; Funkc. - funkcija; Skriv. - skriven; Akt. - funkcija aktivacije.

Razvijeni ANN model je kompleksan (ima 39 težinskih koeficijenata), zbog jako izraženog nelinearnog karaktera sistema (Pezo i sar., 2013; Chattopadhyay i Rangarajan, 2014). Tačnost modela zasnovana je na koeficijentu determinacije. Vrednost r^2 između izlaza AFB_{1ZBPO} , AFB_{1OZ} i AFB_{1PO} tokom perioda testiranja mreže bile su 0,998; 0,997 i 0,999. Vrednosti r^2 iznad 0,997 ukazuju da model dobro predstavlja eksperimentalne podatke.

4.5.1.3. Analiza osetljivosti ANN modela

U ovoj studiji primenom analize osetljivosti (eng. *sensitivity analysis*) ispitan je uticaj ulazne promenljive čija je vrednost bila na određenoj poziciji u rasponu vrednosti ulaznih promenljivih, na izlazne promenljive. Ova analiza pokazuje koliko su odzivne promenljive osetljive na male promene ulaznih parametara. Vrednost osetljivosti je zapravo jednaka

vrednosti prvog izvoda ulazne promenljive. Za svaku ulaznu promenljivu, prvi izvod se određuje u odnosu na deset jednako udaljenih tačaka na posmatranom intervalu ove promenljive, koji su definisani minimalnim i maksimalnim vrednostima. Računate vrednosti osetljivosti određuju se korišćenjem Tejlorove formule (Turányi i Tomlin, 2014). Uticaj određene ulazne promenljive na izlaznu promenljivu, odnosno računanje promene izlaznog parametra za infinitezimalno malu promenu ulazne promenljive, kao i uticaj ulazne promenljive koja uzima vrednost na određenoj poziciji intervala ulaznih vrednosti prikazana je na Slici 31. Dobijene vrednosti ove numeričke analize odgovaraju nivoima eksperimentalne greške, a takođe pokazuju i uticajnost parametara a_w i temperature na sadržaj AFB_{1ZBPO} , AFB_{1OZ} i AFB_{1PO} .



Slika 31. Analiza osetljivosti ANN modela – uticaj ulaznih promenljivih na izlazne promenljive

Infinitezimalne promene temperature skladištenja blizu minimuma intervala temperature (oko 15 °C, na osnovu Tabele 20) pozitivno utiču na sadržaj AFB_{1ZBPO} , AFB_{1OZ} i AFB_{1PO} , dok male promene temperature blizu maksimuma ulaznog prostora temperatura (blizu 37 °C) nemaju značaja na promenu akumulacije AFB_1 (Slika 31). Primećuje se da promene temperature skladištenja najviše utiču na promene u generisanju AFB_1 oljuštenog

zrna spelte (AFB_{1OZ}). Uticaj a_w bio je na stalnom nivou u celom rasponu vrednosti ulaznog spektra, za sve AFB_1 , ali u odnosu na uticaj temperature, ovaj uticaj je bio izraženiji na AFB_{1ZPO} i AFB_{1PO} nego na AFB_{1OZ} .

ANN model za predviđanje biosinteze aflatoksina ukazuje na veći uticaj faktora a_w u poređenju sa faktorom temperature, čiji uticaj postaje važniji pri malim vrednostima a_w . Rezultati ove analize sasvim odgovaraju zaključcima SOP modela. Pokazalo se da razvijeni model može da se koristi za predviđanje biosinteze AFB_1 u zrnu spelte, pa samim tim može da predstavlja efikasan alat za predikciju biosinteze AFB_1 u cilju smanjivanja rizika od kontaminacije spelte mikotoksinima.

4.6. UTICAJ KONTAMINACIJE SPELTE AFLATOKSINOM B_1 NA ODABRANE PARAMETRE PROMETNOG I TEHNOLOŠKOG KVALITETA

U cilju određivanja uticaja kontaminacije na prometni i tehnološki kvalitet spelte, ispitani su različiti nivoi kontaminacije spelte sa AFB_1 u poređenju sa kontrolnim nekontaminiranim uzorkom. Istraživanja mnogih autora su ukazala na smanjenje parametara prometnog i tehnološkog kvaliteta (sadržaj proteina i glutena, veličina zrna, apsolutna masa, vreme razvoja testa, stabilnost testa, želatinizacija skroba) kao i gubitke pecivnih svojstava pšeničnog brašna u slučaju kontaminacije pšenice plesnima (Schmidt i sar., 2016; Capouchová i sar., 2017; Khaneghah i sar., 2018).

Uticaj različitih nivoa kontaminacije spelte sa AFB_1 na parametre kvaliteta kao što su apsolutna masa i sadržaj proteina prikazani su u Tabeli 23. Masa 1000 zrna ili apsolutna masa je fizički parametar prometnog kvaliteta koji ukazuje na veličinu i nalivenost endosperma zrna tj. mogućnost iskorišćenja brašna. U istraživanjima Prange i sar. (2005) kod uzoraka pšenice koji su bili zaraženi plesnima zabeležena je pojava šturih zrna koja su imala manju apsolutnu masu u poređenju sa "zdravim" zrnima. Inokulacijom spelte *Fusarium* i *Alternaria* vrstama takođe je zabeleženo smanjenje apsolutne mase zrna spelte (Suchowilska i Wiwart, 2006; Đisalov, 2015a). Prema literaturnim navodima Bodroža-Solarov i sar. (2009), masa 1000 zrna različitih genotipova spelte se kretala u opsegu 39,7 - 40,9 g i bila je niža u poređenju sa hlebnom pšenicom, čija vrednost je iznosila 43,8 g. Rezultati naših ispitivanja su pokazali da je vrednost apsolutne mase kontrolnog nekontaminiranog uzorka spelte iznosila 42,45 g. Na osnovu rezultata prikazanih u Tabeli 32, može se uočiti da u uzorcima inokuliranim sa *A. flavus* pri visokim nivoima kontaminacije sa AFB_1 od 100 i 250 $\mu\text{g/kg}$ došlo je do smanjenja apsolutne mase (39,75 g odnosno 40,20 g) sa statističkom značajnošću

($p < 0,05$) u poređenju sa uzorcima kontaminiranim sa 25, 50 i 100 $\mu\text{g/kg}$ AFB_1 čija je apsolutna masa iznosila 42,45 g, 42 g i 41,85 g, respektivno.

Tabela 23. Parametri kvaliteta uzoraka spelte kontaminiranih sa različitim količinama AFB_1 ($\bar{X} \pm SD$)

Količina AFB_1 ($\mu\text{g/kg}$)	Parametri kvaliteta	
	Apsolutna masa (g)	Sadržaj proteina (% na s.m.)
0	$42,45 \pm 1,25^a$	$15,6 \pm 0,18^a$
25	$42,0 \pm 0,85^a$	$15,65 \pm 0,15^a$
50	$41,85 \pm 0,92^a$	$15,7 \pm 0,21^a$
100	$39,75 \pm 0,45^b$	$15,75 \pm 0,25^a$
250	$40,20 \pm 0,93^b$	$16,10 \pm 0,20^b$

Različita slova napisana u indeksima u istoj koloni tabele, označavaju statistički značajne razlike u srednjim vrednostima uzoraka (na nivou $p < 0,05$), na osnovu post-ANOVA Tukey-evog HSD testa, $n=3$ ponavljanja

Jedan od najbitnijih hemijskih pokazatelja kvaliteta pšenice na osnovu kog se pšenica razvrstava u klase jeste sadržaj proteina. Tehnološka svojstva brašna pšenice i karakteristike testa su uglavnom određene strukturom i količinom proteina glutena. Sadržaj proteina u spelti varira u opsegu od 12,49% do 18,40% (Mikos i Podolska, 2012). Uzorak spelte u ovim istraživanjima sadržao je 15,6% proteina. Sadržaj proteina (16,10%) u uzorku kontaminiranom sa 250 $\mu\text{g/kg}$ AFB_1 bio je veći od sadržaja proteina u uzorcima sa nižim nivoima kontaminacije (Tabela 23). Slične rezultate zabeležili su Šarić i sar. (2008) i Malaker i sar. (2009) proučavajući uticaj infekcije zrna plesnima *Alternaria* i *Fusarium* na kvalitet hlebne pšenice. Ovi autori navode da se sadržaj proteina povećao usled povećanja infekcije zrna plesnima. Sadržaj proteina u suvoj materiji plesni može da iznosi i do 40%, pa veći sadržaj proteina u inficiranim frakcijama pšenice verovatno potiče od micelije plesni prisutnih u značajnim količinama u inficiranim zrnima (Šarić i sar., 2008). Rezultati ovih istraživanja su pokazali da neki parametri kvaliteta spelte mogu biti narušeni samo pri visokim vrednostima kontaminacije sa AFB_1 , što je zabrinjavajuće s obzirom na zdravstvene rizike i štetnosti po ljude i životinje koje ovaj kontaminant može da izazove i pri mnogo nižim koncentracijama.

Tehnološki kvalitet pšenice i brašna se može proceniti na osnovu ispitivanja osobina testa korišćenjem specifičnih reoloških metoda. Istraživanjima Antes i sar. (2001) utvrđena je promena kvaliteta glutena pšenice, što je imalo za posledicu pogoršanje nekih parametara testa, a samim tim i smanjenje zapremine hleba napravljenog od brašna pšenice kontaminirane plesnima *Aspergillus* spp. i *Penicillium* spp.

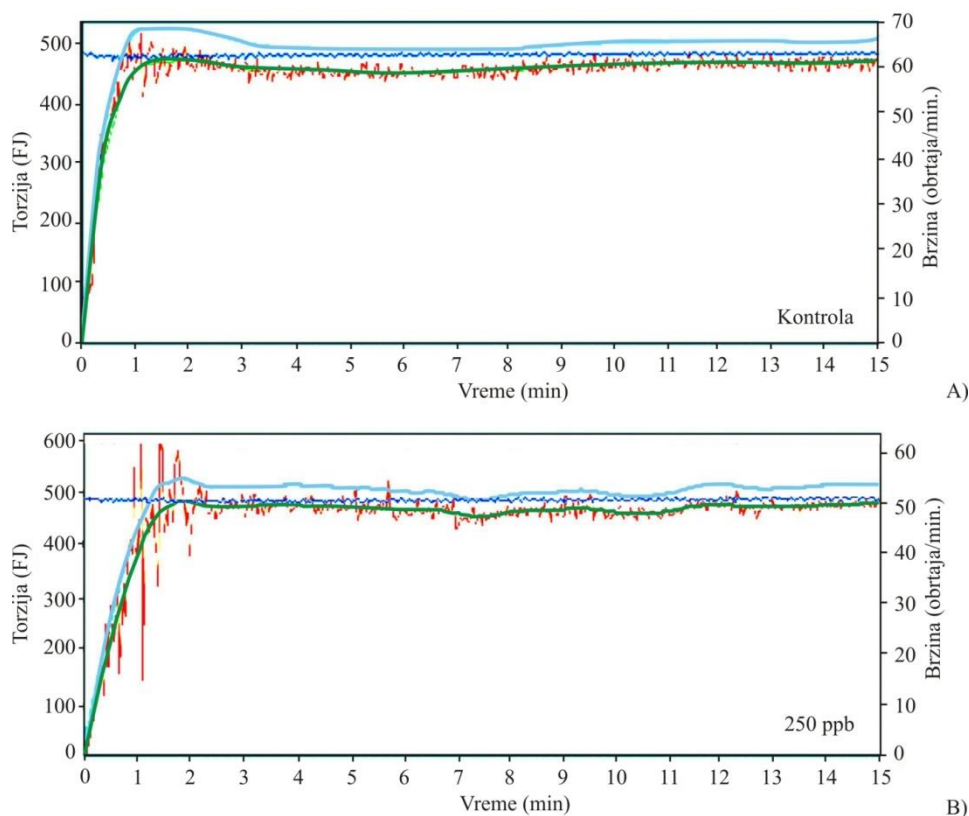
Parametri testa brašna spelte pri mešanju dobijeni korišćenjem Micro-dough LAB uređaja prikazani su u Tabeli 24.

Tabela 24. Parametri testa pri mešanju dobijeni korišćenjem Micro-dough LAB uređaja

Parametar	Količina AFB ₁ (µg/kg)		
	0	50	250
Moć upijanja vode* (%)	58,5	67,6	66,7
Razvoj testa (min)	0,7	1,1	1,2
Stabilitet (min)	14,3	13,9	13,8

* računato na 14% vlage brašna, za postizanje konzistencije od 500 FJ

Povećanje količine AFB₁ u uzorcima spelte dovelo je do povećanja moći upijanja vode brašna spelte, kao i povećanja vremena razvoja testa. Stabilitet testa je pokazao tendenciju opadanja sa porastom nivoa kontaminacije. Duže vreme razvoja testa i kraći stabilitet kod kontaminiranih uzoraka može da ukaže na promenu u sposobnosti hidratacije i smanjenje tolerancije brašna na mešenje. Farinografske krive kontrolnog i uzorka spelte kontaminiranog sa 250 µg/kg AFB₁ prikazane su na Slici 32.



Slika 32. Farinografske krive A – kontrolnog uzorka spelte, B – uzorka spelte kontaminiranog sa 250 µg/kg AFB₁

Određivanjem parametara prometnog i tehnološkog kvaliteta uzoraka spelte kontaminiranih sa AFB₁ uz komparaciju sa kontrolnim (nekontaminiranim) uzorkom daje uvid o uticaju

kontaminacije na parametre kvaliteta i doprinosi evaluaciji uticaja plesni *A. flavus* na zdravstvenu bezbednost i kvalitet spelte.

5. ZAKLJUČAK

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

- Determinacijom plesni sa uzoraka zrna hlebne pšenice i spelte prikupljenih iz regiona Vojvodine uočen je znatno veći broj rodova i vrsta mikrobiota identifikovanih na zrnu hlebne pšenice u poređenju sa speltom tokom sve tri posmatrane godine (2015-2017). Najraznovrsnije mikrobiote (24 roda i vrste plesni) determinisane su na uzorcima hlebne pšenice iz 2017. godine. Najveći intenzitet pojave tzv. poljskih plesni kao što su *Alternaria* spp. i *Fusarium* spp. zabeležen je u uzorcima iz semi-humidne 2016. godine, dok je pojava *Penicillium* i *Aspergillus* vrsta bila najintenzivnija u uzorcima iz semi-aridne 2017. godine. Uočene razlike u raznovrsnosti i nivou mikološke kontaminacije hlebne pšenice i spelte su bile posledica morfoloških i bioloških svojstva ovih *Triticum* vrsta, dok su razlike po godinama u okviru jedne vrste bile posledica vremenskih prilika koje su vladale tokom vegetacije ispitivanih useva.
- Od 6 *Aspergillus* vrsta determinisanih na zrnu spelte roda 2017. godine, najučestalija je bila *A. nidulans* (učestalost 90%), sa intenzitetom pojave od 14%, dok je na zrnu pšenice dominantna vrsta bila *A. flavus* (učestalost 45%, intenzitet pojave 7%).
- Identifikacija i karakterizacija 38 izolata *A. flavus* određeni su primenom polifaznog pristupa koji uključuje klasične mikrobiološke i molekularne metode. Upoređivanjem fenotipskih karakteristika zajedno sa molekularnom karakterizacijom koja je izvršena pomoću analiza sekvenci ITS i β -tubulin gena uočena je neophodnost primene molekularnih metoda u cilju tačne i pouzdane identifikacije. Razdvajanje amplifikovanih *PCR* produkata različitih vrsta na gelu potvrđeno je sekvenciranjem, pa se metoda lančane reakcije polimeraze u kombinaciji sa *Lab-on-a-chip* elektroforezom može uspešno koristiti za brzu diferencijaciju vrsta plesni roda *Aspergillus* - sekcija *Flavi*.
- Ispitivanjem potencijala za biosintezu AFB₁ *A. flavus* izolovanih sa zrna hlebne pšenice i spelte utvrđeno je da su dva izolata (*A. flavus* No. 1 i No. 2) poreklom sa hlebne pšenice pokazala aflatoksigeni potencijal nakon 14 i 21 dana inkubiranja na temperaturi od 25 °C na podlozi YESA u količinama 140 µg/kg agara i 210 µg/kg agara.

- Prilikom testiranja otpornosti različitih *Triticum* vrsta: hlebne pšenice, spelte, korasana i hibrida pšenice inokulisanih toksigenim izolatima *A. flavus* u fazi cvetanja, kvantifikovan je visok nivo AFB₁ (256 µg/kg) u zrnu spelte, dok kod drugih *Triticum* vrsta, AFB₁ nije detektovan (<LOD). Određivanjem fizičko-hemijskih karakteristika plevičastih omotača *Triticum* spp. potvrđen je njihov efekat na rast i razvoj *A. flavus* i biosintezu AFB₁. Rezultati sadržaja AFB₁ u *Triticum* vrstama pokazali su da plevičasti omotači golozrnih vrsta ne pružaju povoljne uslove za rast *A. flavus*, kao i biosintezu AFB₁, dok je utvrđeno da je zrno spelte osetljivo na infekciju uzrokovanu rastom plesni.
- Poređenjem ukupnog broja plesni određenog na kontrolnim uzorcima različitih *Triticum* spp., uočeno je da su na uzorcima spelte i korasan pšenice mikrobiote bile prisutne u najmanjem broju (200 cfu/g odnosno 250 cfu/g), što potvrđuje činjenicu da su stare *Triticum* vrste prirodno otpornije na uticaj spoljašnjih faktora, a samim tim i na infekciju mikobiotama. Hlebna pšenica je bila najviše podložna infekciji mikobiotama (450 cfu/g).
- Ispitivanjem uticaja različitih temperatura (15, 23, 30 i 37 °C) i aktivnosti vode (0,85; 0,90; 0,95 i 0,99) na sintezu AFB₁ u veštački inokulisanim uzorcima spelte sa plevičastim omotačima kao i prethodno oljuštenim zrnima određeni su optimalni uslovi za biosintezu AFB₁. Uslovi pri kojima je ostvarena najveća produkcija AFB₁ bili su temperatura 30 °C i a_w 0,99 u svim vrstama uzoraka (zrna spelte inkubirana bez plevičastih omotača, plevičasti omotači i oljuštena zrna). Rezultati su pokazali da je prisustvo plevičastih omotača predstavljalo zaštitnu barijeru za prodiranje plesni i akumulaciju AFB₁.
- Matematički modeli, razvijeni primenom faktora sa visokom značajnošću kao što su temperatura skladištenja i aktivnost vode, mogu biti korišćeni u predviđanju akumulacije AFB₁ u zrnu spelte, što predstavlja ključni korak u proceni rizika.
- Različiti nivoi kontaminacije spelte sa AFB₁ u poređenju sa kontrolnim nekontaminiranim uzorkom uticali su na smanjenje određenih parametara tehnološkog kvaliteta i potencijalne gubitke pecivnih svojstava speltinog brašna pri sadržaju AFB₁ od 50 µg/kg i 250 µg/kg.

6. LITERATURA

- Aasamaa, K., Sober, A. and Rahi, M. (2001). Leaf anatomical characteristics associated with shoot hydraulic conductance, stomatal conductance and stomatal sensitivity to changes of leaf water status in temperate deciduous trees. *Australian Journal of Plant Physiology*, 28, 765–774.
- Abbas, H. K., Weaver, M. A., Zablotowicz, R. M., Horn, B. W. and Shier, W. T. (2005). Relationships between aflatoxin production and sclerotia formation among isolates of *Aspergillus* section *Flavi* from the Mississippi Delta. *European Journal of Plant Pathology*, 112(3), 283-287.
- Abbas, H.K., Mirocha, C.J., Pawlosky, R.J. and Pusch, D.J. (1985). Effect of cleaning, milling, and baking on deoxynivalenol in wheat. *Applied and Environmental Microbiology*, 50(2), 482-486.
- Abbas, H.K., Wilkinson, J.R., Zablotowicz, R.M., Accinelli, C., Abel, C.A., Bruns, H.A. and Weaver, M.A. (2009). Ecology of *Aspergillus flavus*, regulation of aflatoxin production, and management strategies to reduce aflatoxin contamination of corn. *Toxin Reviews*, 28(2-3), 142-153.
- Abdel-Aal, E.S.M., Hucl, P. and Sosulski, F.W. (1995). Compositional and nutritional characteristics of spring einkorn and spelt wheats. *Cereal chemistry*, 72, 621-624.
- Abdel-Aal, E.S.M., Sosulski, F.W. and Hucl, P. (1998). Origins, characteristics and potentials of ancient wheats. *Cereal Foods World*, 43, 708–715.
- Abdullah, S.K. and Atroshi, H.I.M. (2016). Mycobiota associated with grains of soft wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars grown in Duhok Province, Kurdistan region, Iraq. *Journal of Agricultural Technology*, 12(1), 91-104.
- Adebajo, L.O. and Popoola, O.J. (2003). Mycoflora and mycotoxins in kolanuts during storage. *African Journal of Biotechnology*, 2(10), 365-368.
- Afsharmanesh, H., Perez-Garcia, A., Zeriuoh, H., Ahmadzadeh, M. and Romero, D. (2018). Aflatoxin degradation by *Bacillus subtilis* UTB1 is based on production of an oxidoreductase involved in bacilysin biosynthesis. *Food Control*, in press, doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.03.002.
- Alkadri, D., Rubert, J., Prodi, A., Pisi, A., Mañes, J. and Soler, C. (2014). Natural co-occurrence of mycotoxins in wheat grains from Italy and Syria. *Food chemistry*, 157, 111-118.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215, 403-410.
- Andersen, B., Nielsen, K.F., Pinto, V.F. and Patriarca, A. (2015). Characterization of *Alternaria* strains from Argentinean blueberry, tomato, walnut and wheat. *International Journal of Food Microbiology*, 196, 1-10.
- Anderson, R.A. (1982). Water absorption and solubility and amylograph characteristics of roll-cooked small grain products. *Cereal Chemistry*, 59(4), 265-269.
- Antes, S., Birzele, B., Prange, A., Krämer, J., Meier, A., Dehne, H.W. and Köhler, P. (2001). Rheological and breadmaking properties of wheat samples infected with *Fusarium* spp. *Mycotoxin research*, 17(1), 76-80.
- AOAC (2000). *Official Methods of Analysis*, 17th ed., Maryland, USA: Association of Official Analytical Chemists.
- Arendt, E.K. and Zannini, E. (2013). Wheat and other *Triticum* grains. *Cereal grains for the food and beverage industries*. Woodhead Publishing, United Kingdom. pp. 1-67.

- Arzani, A. and Ashraf, A. (2016). Smart engineering of genetic resources for enhanced salinity tolerance in crop plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 35, 146–89.
- Arzani, A. and Ashraf, M. (2017). Cultivated Ancient Wheats (*Triticum* spp.): A Potential Source of Health-Beneficial Food Products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(3), 477-488.
- Arzani, A. (2011). Emmer (*Triticum turgidum* ssp. *dicoccum*) flour and bread. In: Preedy VR, Watson, R.R., Patel, V.B., editors. *Flour and fortification in health and disease prevention*. Amsterdam: Elsevier, Academic Press Imprint. pp. 69–78.
- Ashraf, M. (2014). Stress-induced changes in wheat grain composition and quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54, 1576–1583.
- Ayerst, G. (1969). The effects of moisture and temperature on growth and spore germination in some fungi. *Journal of Stored Products Research*, 5(2), 127-141.
- Bagi, F., Stojšin, V. and Balaž, F. (2005). Cereal seed mycopopulations in Serbia. *Matica Srpska Journal for Natural Sciences*, 108, 189-195.
- Bakhøj, S., Flint, A., Holst, J. J. and Tetens, I. (2003). Lower glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) response but similar glucagon-like peptide 1 (GLP-1), glycaemic, and insulinaemic response to ancient wheat compared to modern wheat depends on processing. *European Journal of Clinical Nutrition*, 57(10), 1254-1261.
- Balaž, F., Bagi, F., Škrinjar, M.R. and Stojšin, V. (2003). Mikopopulacija semena strnih žita u 2002. godini. *Žito-hleb*, 30(4-5), 149-155.
- Balaž, F., Jevtić, R., Denčić, S., Jerković, Z. and Momčilović, V. (1992). Effect of various factors on the intensity of infection of wheat spike inoculated by *Fusarium graminearum*. *Sch. Hodowla Roślin, Aklimatyzacja i Nasiennictwo*, Sept. 22-24., pp. 105-113.
- Balaž, F., Stojšin, V., Bagi, F., Suknjaja, N., Mastilović, J. and Torbica, A. (2005). Uloga zaraženosti semena patogenim i saprofitnim gljivama u pogoršanju tehnološkog kvaliteta pšenice i mogućnosti zaštite. II simpozijum o zaštiti bilja u Bosni i Hercegovini, Zbornik izvoda, Teslić, 14.-16.12.2005.god., pp. 7-8.
- Baranyi, N., Kocsubé, S. and Varga, J. (2015). Aflatoxins: Climate change and biodegradation. *Current Opinion in Food Science*, 5, 60-66.
- Barošević, T., Bagi, F., Budakov, D., Kocsubé, S., Varga, J., Grahovac, M. and Stojšin, V. (2016). Molecular and morphological identification of *Aspergillus* species on corn seeds. III International Congress, "Food Technology, Quality and Safety", 25-27 October 2016, Novi Sad, Serbia. Proceedings, pp. 365-371.
- Barros, G., Torres, A., Rodriguez, M. and Chulze, S. (2006). Genetic diversity within *Aspergillus flavus* strains isolated from the peanut-cropped soils in Argentina. *Soil Biology & Biochemistry*, 38, 145–152.
- Basheer, I. A. and Hajmeer, M. (2000). Artificial neural networks: fundamentals, computing, design, and application. *Journal of Microbiological Methods*, 43(1), 3-31.
- Batista, P.P., Santos, J.F., Oliveira, N.T., Pires, A.P.D., Motta, C.M.S. and Lima, E.A.L.A. (2008). Genetic characterization of Brazilian strains of *Aspergillus flavus* using DNA markers. *Genetics and Molecular Research*, 7, 706-717.
- Battilani, P., Toscano, P., Van der Fels-Klerx, H.J., Moretti, A., Camardo Leggieri, M., Brera, C., Rortais, A., Goumperis, T. and Robinson, T. (2016). Aflatoxin B1 contamination in maize in Europe increases due to climate change. *Scientific reports*, 6, 24328.
- Bavec, F. and Bavec, M. (2006). Spelt. In *Organic Production and Use of Alternative Crops*, Boca Raton: CRC Press/Taylor and Francis, pp. 37-45.
- Bayman, P., Baker, J.L. and Mahoney, N.E. (2002). *Aspergillus* on tree nuts: incidence and associations. *Mycopathologia*, 155(3), 161-169.
- Bennett, J. and Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(3), 497-516.

- Bhabhra, R. and Askew, D.S. (2005). Thermotolerance and virulence of *Aspergillus fumigatus*: role of the fungal nucleolus. *Medical Mycology*, 43(1), S87-S93.
- Bircan, C., Barringer, S.A., Ulken, U. and Pehlivan, R. (2008). Increased aflatoxin contamination of dried figs in a drought year. *Food Additives and Contaminants Part A-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment*, 25(11), 1400-1408.
- Bledzki, A. K., Mamun, A. A. and Volk, J. (2010). Physical, chemical and surface properties of wheat husk, rye husk and soft wood and their polypropylene composites. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 41, 480-488.
- Bledzki, A.K., Mamun, A.A., Bonnia, N.N. and Ahmad, S. (2012). Basic properties of grain by-products and their viability in polypropylene composites. *Industrial Crops and Products*, 37, 427-434.
- Bočarov-Stančić, A. (1996). Uticaj ekoloških i drugih faktora na rasprostranjenost plesni i mikotoksina u žitaricama i mogućnost njihove dekontaminacije. Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet u Novom Sadu, Univerzitet u Novom Sadu.
- Bočarov-Stančić, A., Lević, J., Stanković, S., Krnjaja, V., Kovačević, T. and Tančić, S. (2007). The toxigenic potential of *Fusarium poae* originated from wheat. *Proceedings for Natural Sciences, Matica Srpska Novi Sad*, 113, 113-123.
- Bočarov-Stančić, A., Lević, J., Dimić, G., Stanković, S. and Salma, N. (2009a). Investigation of toxigenic potential of fungal species by the use of simple screening method. *Proceedings for Natural Sciences, Matica Srpska Novi Sad*, 108, 59-67.
- Bočarov-Stančić, A., Lević, J., Stanković, S., Stanišić, M. and Bilek, S. (2009b). Dynamics of deoxynivalenol and zearalenone production by *Fusarium graminearum* under laboratory conditions. *Proceedings for Natural Sciences, Matica Srpska, Novi Sad*, 116, 15-24.
- Bock, C.H., Mackey, B. and Cotty, P.J. (2004). Population dynamics of *Aspergillus flavus* in the air of an intensively cultivated region of south-west Arizona. *Plant Pathology*, 53(4), 422-433.
- Bodroža-Solarov, M., Mastilović, J., Filipčev, B. and Šimurina, O. (2009). *Triticum aestivum* spp. *spelta* - The potential for the organic wheat production. *Journal on Processing and Energy in Agriculture*, 13, 128-131.
- Bodroža-Solarov, M., Brkljača, J., Vučković, J. and Balaž, F. (2012). Changes in technological quality of winter wheat with different intensity of *Fusarium* spp. and *Alternaria* spp. contamination. *Proceedings of 15th International Feed Technology Symposium „Feed-to-Food/Cost Feed for Health joint Workshop* (pp. 366-370).
- Bodroža-Solarov, M., Vujić, Đ., Ačanski, M., Pezo, L., Filipčev, B. and Mladenov, N. (2014). Characterization of the liposoluble fraction of common wheat (*Triticum aestivum*) and spelt (*T. aestivum* ssp. *spelta*) flours using multivariate analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(13), 2613-2617.
- Boudra, H. and Morgavi, D. P. (2005). Mycotoxin risk evaluation in feeds contaminated by *Aspergillus fumigatus*. *Animal feed science and technology*, 120(1-2), 113-123.
- Boukid, F., Folloni, S., Sforza, S., Vittadini, E. and Prandi, B. (2018). Current Trends in Ancient Grains-Based Foodstuffs: Insights into Nutritional Aspects and Technological Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(1), 123-136.
- Braicu, C., Puia, C., Bodoki, E. and Socaciu, C. (2008). Screening and quantification of aflatoxins and ochratoxin A in different cereals cultivated in Romania using thin-layer chromatography-densitometry. *Journal of Food Quality*, 31(1), 108-120.
- Brakhage, A.A. and Schroeckh, V. (2011). Fungal secondary metabolites—strategies to activate silent gene clusters. *Fungal Genetics and Biology*, 48(1), 15-22.
- Brakhage, A.A. (2013). Regulation of fungal secondary metabolism. *Nature Reviews Microbiology*, 11, 21-32.

- Brandolini, A., Hidalgo, A. and Moscaritolo, S. (2008). Chemical composition and pasting properties of einkorn (*Triticum monococcum* L. subsp. *monococcum*) whole meal flour. *Journal of Cereal Science*, 47, 599–609.
- Braun, H.J., Atlin, G. and Payne, T. (2010). Multi-location testing as a tool to identify plant response to global climate change. In: Reynolds MP, editor. *Climate change and crop production*. London, UK: CAB International. pp. 115–138.
- Brelek, T., Bodroža-Solarov, M., Vukmirović, D., Čolović, R., Vučković, J. and Lević, J. (2012). Utilization of spelt wheat hull as a renewable energy source by pelleting. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 18(5), 752-758.
- Brown, D.W., Yu, J.H., Kelkar, H.S., Fernandes, M., Nesbitt, T.C., Keller, N.P., Adams, T.H. and Leonard, T.J. (1996). Twenty-five coregulated transcripts define a sterigmatocystin gene cluster in *Aspergillus nidulans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(4), 1418-1422.
- Brown, N.A., Urban, M., Van de Meene, A.M., and Hammond-Kosack, K.E. (2010). The infection biology of *Fusarium graminearum*: Defining the pathways of spikelet to spikelet colonisation in wheat ears. *Fungal biology*, 114(7), 555-571.
- Bryden, W.L. (2009). Mycotoxins and mycotoxicoses: significance, occurrence and mitigation in the food chain. *General, Applied and Systems Toxicology*, 3529–3553.
- Bryden, W.L. (2012). Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. *Animal Feed Science and Technology*, 173(1-2), 134-158.
- Caballero, L., Bancel, E., Debiton, C. and Branlard, G. (2008). Granule-bound starch synthase (GBSS) diversity of ancient wheat and related species. *Plant breeding*, 127, 548–553.
- Cacak-Pietrzak, G. and Gonddek, E. (2010). Właściwości przemiałowe ziarna orkisz i pszenicy zwyczajnej (eng. „Milling value of spelt wheat and common wheat grain“). *Acta Agrophysica*, 16(2), 263-273.
- Calistru, C., McLean, M. and Berjak, P. (1997). In vitro studies on the potential for biological control of *Aspergillus flavus* and *Fusarium moniliforme* by *Trichoderma* species. *Mycopathologia*, 137(2), 115-124.
- Calvo, A.M., Wilson, R.A., Bok, J.W. and Keller, N.P. (2002). Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66, 447-459.
- Capouchová, I., Papoušková, L., Konvalina, P., Vepříková, Z., Dvořáček, V., Zrčková, M., Janovská, D., Škeříková, A. and Pazderů, K. (2017). Effect of *Fusarium* spp. Contamination on Baking Quality of Wheat. In *Wheat Improvement, Management and Utilization*. InTech.
- Cary, J.W. and Ehrlich, K.C. (2006). Aflatoxigenicity in *Aspergillus*: molecular genetics, phylogenetic relationships and evolutionary implications. *Mycopathologia*, 162(3), 167-177.
- CAST (2003). *Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, and Human Systems*. Council for Agricultural Science and Technology, Task Force Report No. 139, Iowa, USA.
- Castaño, S.M., Medina, A. and Magan, N. (2017). Comparison of dry matter losses and aflatoxin B₁ contamination of paddy and brown rice stored naturally or after inoculation with *Aspergillus flavus* at different environmental conditions. *Journal of Stored Products Research*, 73, 47-53.
- Cavaliere, C., Foglia, P., Pastorini, E., Samperi, R. and Laganà, A. (2006). Liquid chromatography/tandem mass spectrometric confirmatory method for determining aflatoxin M₁ in cow milk: comparison between electrospray and atmospheric pressure photoionization sources. *Journal of chromatography A*, 1101(1-2), 69-78.

- Chang, P. K., Bennett, J. W. and Cotty, P. J. (2002). Association of aflatoxin biosynthesis and sclerotial development in *Aspergillus parasiticus*. *Mycopathologia*, 153(1), 41-48.
- Chang, P.K., Ehrlich, K.C. and Hua, S.S.T. (2006). Cladal relatedness among *Aspergillus oryzae* isolates and *Aspergillus flavus* S and L morphotype isolates. *International Journal of Food Microbiology*, 108(2), 172-177.
- Chang, P.K., Wilkinson, J.R., Horn, B.W., Yu, J., Bhatnagar, D. and Cleveland, T.E. (2007). Genes differentially expressed by *Aspergillus flavus* strains after loss of aflatoxin production by serial transfers. *Applied microbiology and biotechnology*, 77(4), 917-925.
- Charmet, G. (2011). Wheat domestication: lessons for the future. *Comptes Rendus Biologies*, 334, 212–220.
- Chattopadhyay, P.B. and Rangarajan, R. (2014). Application of ANN in sketching spatial nonlinearity of unconfined aquifer in agricultural basin. *Agricultural Water Management*, 133, 81-91.
- Claus, A., Schreiter, P., Weber, A., Graeff, S., Herrmann, W., Claupein, W., Schieber, A. and Carle, R. (2006). Influence of agronomic factors and extraction rate on the acrylamide contents in yeast-leavened breads. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 8968-8976.
- Cotty PJ, 1994. Influence of field application of an atoxigenic strain of *Aspergillus flavus* on the populations of *A. flavus* infecting cotton bolls and on the aflatoxin content of cottonseed. *Phytopathology*, 84, 1270–1277.
- Cotty, P.J. and Jaime-Garcia, R. (2007). Influences of climate on aflatoxin producing fungi and aflatoxin contamination. *International Journal of Food Microbiology*, 119(1-2), 109-115.
- Crespi, C.L., Penman, B.W., Steimel, D.T., Gelboin, H.V. and Gonzalez, F.J. (1991). The development of a human cell line stably expressing human CYP3A4: role in the metabolic activation of aflatoxin B1 and comparison to CYP1A2 and CYP2A3. *Carcinogenesis*, 12(2), 355-359.
- Curtui, V., Usleber, E., Dietrich, R., Lepschy, J. and Märtlbauer, E. (1998). A survey on the occurrence of mycotoxins in wheat and maize from western Romania. *Mycopathologia*, 143(2), 97-103.
- Dai, Y., Huang, K., Zhang, B., Zhu, L. and Xu, W. (2017). Aflatoxin B₁-induced epigenetic alterations: An overview. *Food and Chemical Toxicology*, 109, 683-689.
- Dexter, J.E., Clear, R.M. and Preston, K. R. (1996). *Fusarium* head blight: effect on the milling and baking of some Canadian wheats. *Cereal Chemistry*, 73(6), 695-701.
- Diba, K., Mirhendi, H., Kordbacheh, P. and Rezaie, S. (2014). Development of RFLP-PCR method for the identification of medically important *Aspergillus* species using single restriction enzyme *MwoI*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(2), 503-507.
- Diener, U.L., Cole, R.J., Sanders, T.H., Payne, G.A., Lee, L.S. and Klich, M.A. (1987). Epidemiology of aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. *Annual Review of Phytopathology*, 25, 249-270.
- Dinu, M., Whittaker, A., Pagliai, G., Benedettelli, S. and Sofi, F. (2018). Ancient wheat species and human health: Biochemical and clinical implications. *The Journal of nutritional biochemistry*, 52, 1-9.
- Đisalov, J. (2015a). Identifikacija *Alternaria* spp. na zrnju spelte i uticaj zaraze na komponente prinosa, sadržaj mikotoksina i tehnološki kvalitet. Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu.

- Disalov, J., Bodroža-Solarov, M., Bagi, F., Petrović, K., Čulafić, J., Bočarov-Stančić, A. and Brlek, T. (2015b). First report of *Alternaria tenuissima* and *Alternaria infectoria* on organic spelt wheat in Serbia. *Plant Disease*, 99(11), 1647-1647.
- Disalov, J.N., Bodroža-Solarov, M.I., Krulj, J.A., Pezo, L.L., Čurčić, N. Ž., Kojić, J.S. and Ugrenović, V.M. (2018). Impact of *Alternaria* spp. and *Alternaria* Toxins on Quality of Spelt Wheat. *Journal of Agricultural Science*, 10(2), 89.
- Do, J.H. and Choi, D.K. (2007). Aflatoxins: detection, toxicity, and biosynthesis. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 12(6), 585-593.
- Domsh, K.H., Gams, W. and Anderson, T.H. (1980). *Compendium of Soil Fungi*. Academic Press, Subsidiary of Harcourt Brace Jovanovich Publishers, London.
- Donner, M. (2009). Distribution and molecular characterization of aflatoxin-producing and nonproducing isolates of *Aspergillus* section *Flavi* for biological control of aflatoxin contamination in maize in Nigeria. Institut für Nutzpflanzenwissenschaften und Ressourcenschutz. Ph. D. Thesis. Bonn: University of Bonn.
- EFSA (2012). Modelling, predicting and mapping the emergence of aflatoxins in cereals in the EU due to climate change, [e-book], dostupno na <https://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/en-223>.
- Ehrlich, K.C., Chang, P.K., Yu, J. and Cotty, P.J. (2004). Aflatoxin biosynthesis cluster gene *cypA* is required for G aflatoxin formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(11), 6518-6524.
- Ehrlich, K.C., Yu, J. and Cotty, P.J. (2005). Aflatoxin biosynthesis gene clusters and flanking regions. *Journal of Applied Microbiology*, 99(3), 518-527.
- Ellis, M.B. (1971). *Dematiaceous Hyphomycetes*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England.
- Ellis, W.O., Smith, J.P., Simpson, B.K., Oldham, J.H. and Scott, P.M. (1991). Aflatoxins in food: occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection, and methods of control. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 30(4), 403-439.
- Elmholt, S. and Rasmussen, P.H. (2004). Susceptibility of spelt to ochratoxin A producing fungi. *DARCOFenews*.
- El-Shanshoury, A.R., El-Sabbagh, S.M., Emara, H.A., and Saba, H.E. (2014). Occurrence of moulds, toxicogenic capability of *Aspergillus flavus* and levels of aflatoxins in maize, wheat, rice and peanut from markets in central delta provinces, Egypt. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3, 852-865.
- Escarnot, E., Jacquemin, J.-M., Agneessens R. and Paquot M., (2012). Comparative study of the content and profiles of macronutrients in spelt and wheat, a review. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 16(2), 243-256.
- Esteban, A., Abarca, M.L., Bragulat, M.R. and Cabañes, F.J. (2006). Effect of water activity on ochratoxin A production by *Aspergillus niger* aggregate species. *International Journal of Food Microbiology*, 108(2), 188-195.
- European Commission (2002). Commission Regulation 2002/32/EC of 7 May 2002 on undesirable substances in animal feed. *Official Journal of the European Parliament*, L 140, 10-21.
- European Commission (2006). Commission Regulation 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards *Fusarium* toxins in maize and maize products. *Official Journal of the European Union*, L 364, 5-18.
- European Standard (1999). CEN/EN 12955:1999. Foodstuffs – Determination of aflatoxin B1, and the sum of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in cereals, shell – fruits and derived products – High performance liquid chromatographic method with post column

- derivatization and immunoaffinity column clean up. Brussels: European Committee for Standardization, Central Secretariat.
- Fahrnunnisa, M., Hashmi, H. and Ghaffar, A. (2006). Seed-borne mycoflora of wheat, sorghum and barley. *Pakistan Journal of Botany*, 38 (1), 185-192.
- Fan, M.S., Zhao, F.J., Fairweather-Taitc, S.J., Poultona, P.R., Dunhama, S.J. and McGrath, S.P. (2008). Evidence of decreasing mineral density in wheat grain over the last 160 years. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 22, 315–324.
- Fanelli, C., Fabbri, A.A., Finotti, E. and Passi, S. (1983). Stimulation of aflatoxin biosynthesis by lipophilic epoxides. *Microbiology*, 129(6), 1721-1723.
- FAO (2004). Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. FAO Food and Nutrition Paper 81. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- FAOSTAT (2018). FAOSTAT data. Available from: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> Accessed 2018 March 23.
- Fedorova, N.D. and Khaldi., N. (2008). Genomic Islands in the Pathogenic Filamentous Fungus *Aspergillus fumigatus*. *PLOS Genetic*, 4(4): e1000046.
- Filipčev, B., Šimurina, O., Bodroža-Solarov, M. and Brkljača, J. (2013). Dough rheological properties in relation to cracker-making performance of organically grown spelt cultivars. *International Journal of Food Science and Technology*, 48(11), 2356-2362.
- Filtborg, O., Frisvad, J.C. and Svendsen, J.A. (1983). Simple screening method for molds producing intracellular mycotoxins in pure cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 45(2), 581-585.
- Filtborg, O., Frisvad, J.C. and Samson, R.A. (2004). Specific association of fungi to foods and influence of physical environmental factors. Introduction Fo Food-and Airborne Fungi (eds.: R.A. Samson, E.S. Hoekstra, J.C. Frisvad and O. Filtborg), pp. 306-320.
- Fraga, M.E., Santana, D.M.N., Gatti, M.J., Direito, G.M., Cavaglieri, L.R. and Rosa, C.A.R. (2008). Characterization of *Aspergillus* species based on fatty acid profiles. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 103(6), 540-544.
- Frakolaki, G., Giannou, V., Topakas, E. and Tzia, C. (2018). Chemical characterization and breadmaking potential of spelt versus wheat flour. *Journal of Cereal Science*, 79, 50-56.
- Frisvad, J.C. (1989). The use of high-performance liquid chromatography and diode array detection in fungal chemotaxonomy based on profiles of secondary metabolites. *Botanical journal of the Linnean Society*, 99(1), 81-95.
- Frisvad, J.C., Skouboe, P. and Samson, R.A. (2005). Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B1, sterigmatocystin and 3-O-methylsterigmatocystin, *Aspergillus rambellii* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 28(5), 442-453.
- Frisvad, J.C., Thrane, U., Samson, R.A. and Pitt, J.I. (2006). Important mycotoxins and the fungi which produce them. In *Advances in food mycology*. Springer, Boston, MA. pp. 3-31.
- Gallo, A., Solfrizzo, M., Epifani, F., Panzarini, G. and Perrone, G. (2016). Effect of temperature and water activity on gene expression and aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus* on almond medium. *International Journal of Food Microbiology*, 217, 162-169.
- Gallo, G., Bianco, M., Bognanni, R. and Saimbene, G. (2008). Mycotoxins in durum wheat grain: hygienichealthquality of Sicilian production. *Journal of Food Science*, 73, T42-T47.
- Gams, W., Christensen, M., Onions, A.H., Pitt, J.I. and Samson, R.A. (1985). Infrageneric taxa of *Aspergillus*. In *Advances in Penicillium and Aspergillus systematic*. Samson, R.A. i Pitt, J.I.(eds), Plenum Press, NY, USA, pp. 55-62.

- Garber, R. K. and Cotty, P. J. (1997). Formation of sclerotia and aflatoxins in developing cotton bolls infected by the S strain of *Aspergillus flavus* and potential for biocontrol with an atoxigenic strain. *Phytopathology*, 87(9), 940-945.
- Gardes, M. and Bruns, T.D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular ecology*, 2(2), 113-118.
- Garibyan, L. and Avashia, N. (2013). Polymerase Chain Reaction. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(3), e6.
- Gärtner, B.H., Munich, M., Kleijer, G. and Mascher, F. (2008). Characterisation of kernel resistance against *Fusarium* infection in spring wheat by baking quality and mycotoxin assessments. *European Journal of Plant Pathology*, 120(1), 61-68.
- Garvin, D.F., Welch, R.M. and Finley, J.W. (2006). Historical shifts in the seed mineral micronutrient concentration of US hard red winter wheat germplasm. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 2213-2220.
- Geisen, R., Schmidt-Heydt, M., Stoll, D., and Touhami, N. (2018). Aspects of the Occurrence, Genetics, and Regulation of Biosynthesis of the Three Food Relevant *Penicillium* Mycotoxins: Ochratoxin A, Citrinin, and Patulin. In *Physiology and Genetics* Springer, Cham. pp. 413-433.
- Georgianna, D., Fedorova, N.D., Burroughs, J.L., Dolezal, A.L., Bok, J.W., Horowitz-Brown, S., Woloshuk, C.P., Jiujiang, Y., Keller, N.P. and Payne, G.A. (2010). Beyond aflatoxin: four distinct expression patterns and functional roles associated with *Aspergillus flavus* secondary metabolism gene clusters. *Molecular Plant Pathology*, 11(2), 213-226.
- Georgianna, D.R., and Payne, G.A. (2009). Genetic regulation of aflatoxin biosynthesis: from gene to genome. *Fungal Genetics and Biology*, 46(2), 113-125.
- Giambanelli, E., Ferioli, F., Kocaoglu, B., Jorjadze, M., Alexieva, I., Darbinyan, N. and D'Antuono, L.F. (2013). A comparative study of bioactive compounds in primitive wheat populations from Italy, Turkey, Georgia, Bulgaria and Armenia. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 3490-3501.
- Gibbons, J.G., and Rokas, A. (2013). The function and evolution of the *Aspergillus* genome. *Trends in microbiology*, 21(1), 14-22.
- Gibson, A.M., Baranyi, J., Pitt, M.J., Eyles, M.J. and Roberts, T.A (1994). Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Aspergillus flavus* and related species. *International Journal of Food Microbiology*, 23, 419-431.
- Gilbert, M.K., Mack, B.M., Payne, G.A. and Bhatnagar, D. (2016). Use of functional genomics to assess the climate change impact on *Aspergillus flavus* and aflatoxin production. *World Mycotoxin Journal*, 9, 665-672.
- Gil-Serna, J., Patiño, B., Cortes, L., Gonzalez-Jaen, M.T. and Vazquez, C. (2015). *Aspergillus steynii* and *Aspergillus westerdijkiae* as potential risk of OTA contamination in food products in warm climates. *Food microbiology*, 46, 168-175.
- Gil-Serna, J., Vazquez, C., Sardinias, N., Gonzalez-Jaen, M.T. and Patino, B. (2011). Revision of ochratoxin A production capacity by the main species of *Aspergillus* section *Circumdati*. *Aspergillus steynii* revealed as the main risk of OTA contamination. *Food Control*, 22, 343-345.
- Giorni, P., Battilani, P., Pietri, A. and Magan, N. (2008). Effect of a_w and CO_2 level on *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production in high moisture maize post-harvest. *International Journal of Food Microbiology*, 122, 109-113.
- Giorni, P., Magan, N., Pietri, A., Bertuzzi, T. and Battilani, P. (2007). Studies on *Aspergillus* section *Flavi* isolated from maize in northern Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 113, 330-338.

- Giray, B., Gozde, G., Engin, A. B., Aydın, S. and Sahin, G. (2007). Aflatoxin levels in wheat samples consumed in some regions of Turkey. *Food Control*, 18, 23–29.
- Grieu, S., Faugeroux, O., Traoré, A., Claudet, B. and Bodnar, J. L. (2011). Artificial intelligence tools and inverse methods for estimating the thermal diffusivity of building materials. *Energy and Buildings*, 43(2-3), 543-554.
- Guo, B.Z., Sobolev, V., Holbrook, C.C. and Lynch, R.E. (2004). Impact of phytoalexins and lesser cornstalk borer damage on resistance to aflatoxin formation. *Mycopathologia*, 157(4), 476.
- Gursoy, N. and Bicici, M. (2003). Determination of fungal infections on wheat and maize grains and some of their mycotoxins in Cukurova region. In I National Mycotoxins Symposium. Instambul, Turkey, 68-74.
- Guynot, M.E., Marin, S., Sanchis, V. and Ramos, A.J. (2003). Modified atmosphere packaging for prevention of mold spoilage of bakery products with different pH and water activity levels. *Journal of Food Protection*, 66(10), 1864-1872.
- Haghighy, G. and Schoenlechner, R. (2010). Comparison of functional properties of isolated emmer and einkorn wheat starches. *Journal of Food, Agriculture i Environment*, 8, 239-243.
- Hardy, K., Miller, J.B., Brown, K.D., Thomas, M.G. and Copeland, L. (2015). The importance of dietary carbohydrate in human evolution. *The Quarterly Review of Biology*, 90, 251-268.
- Hebert, P.D., Ratnasingham, S. and de Waard, J.R. (2003). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270(Suppl 1), S96-S99.
- Henry, S.H., Bosch, F.X. and Bowers, J.C. (2002). Aflatoxin, hepatitis and worldwide liver cancer risks. In *Mycotoxins and food safety* (pp. 229-233). Springer, Boston, MA.
- Hetherington, A. M. and Woodward, F. I. (2003). The role of stomata in sensing and driving environmental change. *Nature*, 424, 901-908.
- Hidalgo, A. and Brandolini, A. (2014). Nutritional properties of einkorn wheat (*Triticum monococcum* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94, 601–612.
- Holmquist, G.U., Walker, H.W. and Stahr, H.M. (1983). Influence of temperature, pH, water activity and antifungal agents on growth of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. *Journal of Food Science*, 48(3), 778-782.
- Hong, S.B., Shin, H.D., Hong, J., Frisvad, J.C., Nielsen, P.V., Varga, J. and Samson, R. A. (2008). New taxa of *Neosartorya* and *Aspergillus* in *Aspergillus* section *Fumigati*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 93(1-2), 87-98.
- Houbraken, J., Due, M., Varga, J., Meijer, M., Frisvad, J.C. and Samson, R. A. (2007). Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Usti*. *Studies in Mycology*, 59, 107-128.
- Hruska, Z., Yao, H., Kincaid, R., Brown, R., Cleveland, T. and Bhatnagar, D. (2014). Fluorescence excitation–emission features of aflatoxin and related secondary metabolites and their application for rapid detection of mycotoxins. *Food and Bioprocess Technology*, 7(4), 1195-1201.
- http://www.hidmet.gov.rs/latin/meteorologija/klimatologija_srbije.php
- <http://www.klimatskastrategija.eu/>
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Hu, X. and Weng, Q. (2009). Estimating impervious surfaces from medium spatial resolution imagery using the self-organizing map and multi-layer perceptron neural networks. *Remote Sensing of Environment*, 113(10), 2089-2102.

- Hua, S.S.T., Baker, J.L. and Flores-Espiritu, M. (1999). Interactions of Saprophytic Yeasts with anor Mutant of *Aspergillus flavus*. Applied and Environmental Microbiology, 65(6), 2738-2740.
- Hubka, V. and Kolarik, M. (2012). β -tubulin paralogue tubC is frequently misidentified as the benA gene in *Aspergillus* section *Nigri* taxonomy: primer specificity testing and taxonomic consequences. Persoonia, 29, 1-10.
- Hudec, K. and Lacko-Bartošova, M. (2012). Occurrence of *Fusarium* species and DON concentration in kernels of *Triticum spelta*. Research Journal of Agricultural Science, 44(2), 42-46.
- International Agency for Research on Cancer, IARC (1993). Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. IARC Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, vol. 56. World Health Organization, IARC, Lyon, France, 19-23.
- International Agency for Research on Cancer, IARC (2002). Monograph on the evaluation of carcinogenic risk to humans, vol. 82. World Health Organization, IARC, Lyon, France. 171.
- Ioannou-Kakouri, E., Aletrari, M., Christou, E., Ralli, A., Koliou, A. and Christofidou, M. (2004). Occurrence and control of mycotoxins in foodstuffs in Cyprus. In: An overview on toxigenic fungi and mycotoxins in Europe. A. Logrieco, A. Visconti. Kluwer Academic, The Netherlands, 51-65.
- Ito, Y., Peterson, S.W., Wicklow, D.T. and Goto, T. (2001). *Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section *Flavi*. Mycological Research, 105, 233–239.
- Ivanović, M., Martić, M., Đurić, N. and Dragović, G. (2001). The most common wheat disease in the conditions of Pančevački rit. Zbornik naučnih radova Instituta PKB Agroekonomik, 7, 27-31.
- Jančić, M. (2015). Uticaj klimatskih promena na biljnu proizvodnju. Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu.
- Janić-Hajnal, E., Orčić, D., Torbica, A., Kos, J., Mastilović, J. and Škrinjar, M. (2015). *Alternaria* toxins in wheat from the autonomous province of Vojvodina, Serbia: A preliminary survey. Food Additives and Contaminants, 32 (3), 361-370.
- Janić-Hajnal, E., Kos, J., Krulj, J., Krstović, S., Jajić, I., Pezo, L., Šarić, B. and Nedeljković, N. (2017). Aflatoxins contamination of maize in Serbia: The impact of weather conditions in 2015. Food Additives and Contaminants: Part A, 34, 1999-2010.
- Jarak, M. and Đurić S. (2006). Praktikum iz mikrobiologije. Poljoprivredni fakultet Novi Sad. Univerzitet u Novom Sadu, p. 51.
- Johnsson, P., Lindblad, M., Thim, A., Jonsson, N., Vargas, E., Medeiros, N., Brabet, C., Quaresma de Araújo, M. and Olsen, M. (2008). Growth of aflatoxigenic moulds and aflatoxin formation in Brazil nuts. World Mycotoxin Journal, 1(2), 127-137.
- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) (1998). Aflatoxins. Safety evaluation of certain food additives and contaminants. Food Additives Series No.40 [Internet]. The International Programme on Chemical Safety. Available from: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v040je16.htm/>
- Jovičić, N., Matin, A. and Kalambura, S. (2015). The energy potential of spelt biomass (in Croatian) Krmiva, 57(1), 23-28.
- Kalmendal, R. and Bessei, W. (2012). The preference for high-fiber feed in laying hens divergently selected on feather pecking. Poultry science, 91(8), 1785-1789.
- Karlović, S., Bosiljkov, T., Brnčić, M., Ježek, D., Tripalo, B., Dujmić, F. and Džineva, I. (2013). Comparison of artificial neural network and mathematical models for drying of

- apple slices pretreated with high intensity ultrasound. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 19(6), 1372-1377.
- Keblys, M., Bernhoft, A., Höfer, C.C., Morrison, E., Larsen, H.J.S. and Flåøyen, A. (2004). The effects of the *Penicillium* mycotoxins citrinin, cyclopiazonic acid, ochratoxin A, patulin, penicillic acid, and roquefortine C on in vitro proliferation of porcine lymphocytes. *Mycopathologia*, 158(3), 317.
- Keller, N.P., Turner, G. and Bennett, J.W. (2005). Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. *Nature Reviews Microbiology*, 3(12), 937-947.
- Khalesi, M. and Khatib, N. (2011). The effects of different ecophysiological factors on ochratoxin A production. *Environmental toxicology and pharmacology*, 32(2), 113-121.
- Khaneghah, A.M., Martins, L.M., von Hertwig, A.M., Bertoldo, R. and Sant'Ana, A.S. (2018). Deoxynivalenol and its masked forms: Characteristics, incidence, control and fate during wheat and wheat based products processing-A review. *Trends in Food Science i Technology*, 71, 13-24.
- Kirinčič, S., Škrjanc, B., Kos, N., Kozolc, B., Pirnat, N. and Tavčar-Kalcher, G. (2015). Mycotoxins in cereals and cereal products in Slovenia—Official control of foods in the years 2008–2012. *Food Control*, 50, 157-165.
- Klich, M.A. (2002). Identification of common *Aspergillus* species. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht.
- Klich, M.A. (2007a). *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. *Molecular Plant Pathology*, 8(6), 713–722.
- Klich, M.A. (2007b). Environmental and developmental factors influencing aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Mycoscience*, 48, 71-80.
- Konvalina, P., Stehno, Z., Capouchová, I., Zechner, E., Berger, S., Grausgruber, H., Janovská, D. and Moudrý, J. (2014). Differences in grain/straw ratio, protein content and yield in landraces and modern varieties of different wheat species under organic farming. *Euphytica*, 199(1-2), 31-40.
- Kos, J., Mastilović, J., Hajnal, E.J. and Šarić, B. (2013). Natural occurrence of aflatoxins in maize harvested in Serbia during 2009-2012. *Food Control*, 34, 31-34.
- Kos, J., Škrinjar, M., Mandić, A., Mišan, A., Bursić, V., Šarić, B. and Janić Hajnal, E. (2014a). Presence of aflatoxins in cereals from Serbia. *Food & Feed Research*, 41(1), 31-38.
- Kos, J., Lević, J., Đuragić, O., Kokić, B. and Miladinović, I. (2014b). Occurrence and estimation of aflatoxin M1 exposure in milk in Serbia. *Food Control*, 38, 41-46.
- Kos, J. (2015). Aflatoksini: analiza pojave, procena rizika i optimizacija metodologije određivanja u kukuružu i mleku. Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu.
- Kosiak, B., Torp, M., Skjerve, E. and Andersen, B. (2004). *Alternaria* and *Fusarium* in Norwegian grains of reduced quality-a matched pair sample study. *International Journal of Food Microbiology*, 93, 51- 62.
- Kozakiewicz, Z., (1989). *Aspergillus* Species on Stored Products. Wallingford: CAB International.
- Krnjaja, V., Lukić, M., Delić, N., Tomić, Z., Mandić, V., Bijelić, Z. and Gogić, M. (2015). Mycobiota and mycotoxins in freshly harvested and stored maize. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 31(2), 291-302.
- Krnjaja, V., Stanković, S. and Lević, J. (2011). The presence of toxigenic *Fusarium* species and fusariotoxins deoxynivalenol and zeralenone in winter wheat. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 27(1), 63-73.

- Krulj, J., Bočarov Stančić, A., Krstović, S., Jajić, I., Kojić, J., Vidaković, A. and Bodroža-Solarov, M. (2016a). Mycobiota on common wheat (*Triticum aestivum*) and spelt (*Triticum aestivum* spp. *spelt*) grains from the region of Vojvodina in 2015. *Food & Feed Research*, 43, 1-8.
- Krulj, J., Bočarov Stančić, A., Krstović, S., Kojić, J., Đisalov, J., Brlek, T. and Bodroža-Solarov, M. (2016b). Toxigenic potential of *Aspergillus flavus* cultures isolated from wheat grains, Proceedings of the III International Congress "Food Technology, Quality and Safety". October, 27-29, 2016. Novi Sad, Serbia, pp. 418-423.
- Krulj, J., Đisalov, J., Bodroža-Solarov, M., Bočarov Stančić, A., Markov, S., Mladenov, N. and Kojić, J. (2017). First report of *Aspergillus flavus* on organic spelt wheat in Serbia. *Plant Disease* 101, 1045-1045.
- Krulj, J., Đisalov, J., Bočarov Stančić, A., Pezo, L., Kojić, J., Vidaković, A. and Bodroža-Solarov, M. (2018). Occurrence of aflatoxin B₁ in *Triticum* species inoculated with *Aspergillus flavus*. *World Mycotoxin Journal*, 11(2), 247-257.
- Kurowski, T.P. and Wysocka, U. (2009). Fungi colonizing grain of winter spelt grown under two production systems. *Phytopathologia*, 54, 45-52.
- Kurowski, T.P., Damszel, M. and Wysocka, U. (2012). Fungi colonizing the grain of spring wheat grown in the conventional and organic systems. *Phytopathologia*, 63, 39-50.
- Kurtzman, C.P., Horn, B.W. and Hesseltine, C.W. (1987). *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarisii*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 53, 147-158.
- La Penna, M., Nesci, A. and Etcheverry, M. (2004). In vitro studies on the potential for biological control on *Aspergillus* section *Flavi* by *Kluyveromyces* spp. *Letters in applied microbiology*, 38(4), 257-264.
- Lachman, J., Hejtmankova, K. and Kotikova, Z. (2013). Tocols and carotenoids of einkorn, emmer and spring wheat varieties: selection for breeding and production. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 57, 207-214.
- Lahouar, A., Marin, S., Crespo-Sempere, A., Saïd, S. and Sanchis, V. (2016). Effects of temperature, water activity and incubation time on fungal growth and aflatoxin B₁ production by toxinogenic *Aspergillus flavus* isolates on sorghum seeds. *Revista Argentina de microbiologia*, 48(1), 78-85.
- Lal, R. (2014). Food security in a changing climate. *Ecology & Hydrobiology*, 8, 13-21.
- Larsen, T.O., Smedsgaard, J., Nielsen, K.F., Hansen, M.E. and Frisvad, J.C. (2005). Phenotypic taxonomy and metabolite profiling in microbial drug discovery. *Natural Product Reports*, 22(6), 672-695.
- Lasram, S., Hamdi, Z., Chenenaoui, S., Mliki, A. and Ghorbel, A. (2016). Comparative study of toxigenic potential of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger* isolated from Barley as affected by temperature, water activity and carbon source. *Journal of Stored Products Research*, 69, 58-64.
- Latge, J.P. (1999). *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(2), 310-350.
- Leslie, J.F. and Summerell, B.A. (2006). *The Fusarium laboratory manual*, Blackwell Publishing, 38.
- Lević, J., Stanković, S., Krnjaja, V., Tančić, S., Ivanović, D. and Bočarov-Stančić, A. (2012a). Relationships of mycobiota on rachide and kernels of wheat. *European Journal of Plant Pathology*, 134, 249-256.
- Lević, J., Stanković, S., Krnjaja, V., Bočarov-Stančić, A. and Ivanović, D. (2012b). Distribution frequency and incidence of seed-borne pathogens of some cereals and industrial crops in Serbia. *Pesticides & Phytomedicine*, 27(1), 33-40.

- Lević, J., Gošić-Dondo, S., Ivanović, D., Stanković, S., Krnjaja, V., Bočarov-Stančić, A. and Stepanić, A. (2013). An outbreak of *Aspergillus* species in response to environmental conditions in Serbia. *Pesticides & Phytomedicine*, 28, 167-179.
- Liu, C., Lin, X. L., Wan, Z., Zou, Y., Cheng, F. F. and Yang, X. Q. (2016). The physicochemical properties, *in vitro* binding capacities and *in vivo* hypocholesterolemic activity of soluble dietary fiber extracted from soy hulls. *Food & Function*, 7, 4830-4840.
- Loje, H., Moller, B., Laustsen, A.M. and Hansen, A. (2003). Chemical composition, functional properties and sensory profiling of einkorn (*Triticum monococcum* L.). *Journal of Cereal Science*, 37, 231-240.
- Longin, C.F.H. and Wurschum, T. (2016). Back to the future – tapping into ancient grains for food diversity. *Trends in Plant Sciences*, 21, 731–737.
- Lorenz, K. (1986). Effects of blackpoint on grain composition and baking quality of New Zealand wheat. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 29(4), 711-718.
- Malaker, P.K., Mian, I.H., Bhuiyan, K.A., Reza, M.M.A. and Mannan, M.A. (2009). Effect of black point disease on quality of wheat grain. *Bangladesh Journal of Agricultural Research*, 34(2), 181-187.
- Månsson, M., Klejnstrup, M.L., Phipps, R.K., Nielsen, K.F., Frisvad, J.C., Gotfredsen, C.H. and Larsen, T.O. (2009). Isolation and NMR characterization of fumonisin B2 and a new fumonisin B6 from *Aspergillus niger*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(2), 949-953.
- Marín, S., Sanchis, V., Saenz, R., Ramos, A. J., Vinas, I. and Magan, N. (1998). Ecological determinants for germination and growth of some *Aspergillus* and *Penicillium* spp. from maize grain. *Journal of Applied Microbiology*, 84(1), 25-36.
- Marín, S., Ramos, A. J., & Sanchis, V. (2012). Modelling *Aspergillus flavus* growth and aflatoxins production in pistachio nuts. *Food Microbiology*, 32(2), 378-388.
- Marotti, I., Bregola, V., Aloisio, I., Di Gioia, D., Bosi, S., Di Silvestro, R., Quinn, R. and Dinelli, G. (2012). Prebiotic effect of soluble fibres from modern and old durum-type wheat varieties on *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(10), 2133-2140.
- Mašić, Z., Daković, A., Sinovec Z., Škrinjar M. and Čanović-Tomašević M. (2003). Sprečavanje i prevencija mikotoksikoza 2. deo. 15. Savetovanje Veterinara Srbije, Zlatibor, 09-13.09.2003., Zbornik radova i kratkih sadržaja, 71-78.
- Medina, A., Gilbert, M.K., Mack, B.M., Obrian, G., Rodriguez, A., Bhatnagar, D., Payne, G. and Magan, N. (2017). Interactions between water activity and temperature on the *Aspergillus flavus* transcriptome and aflatoxin B1 production. *International Journal of Food Microbiology*, 256, 36-44.
- Medina, A., Rodriguez, A. and Magan, N. (2014). Effect of climate change on *Aspergillus flavus* and aflatoxin B1 production. *Frontiers in Microbiology*. *Food Microbiology*, 5, 13-20.
- Medović, A. (2003). Čurug spelt wheat from the 4th century: In a tight grip of field bindweed and black-bindweed. *Work of the Museum of Vojvodina*, 51, 147-157.
- Mehl, H.L., Jaime, R., Callicott, K.A., Probst, C., Garber, N.P., Ortega-Beltran, A., Grubisha, L.C. and Cotty, P.J. (2014). *Aspergillus flavus* diversity on crops and in the environment can be exploited to reduce aflatoxin exposure and improve health. *Annals of the New York Academy of Science*, 1273, 7–17.
- Mellon, J.E., Cotty, P.J. and Dowd, M.K. (2000). Influence of lipids with and without other cottonseed reserve materials on aflatoxin B1 production by *Aspergillus flavus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3611-3615.

- Mellon, J. E., Cotty, P. J. and Dowd, M. K. (2007). *Aspergillus flavus* hydrolases: their roles in pathogenesis and substrate utilization. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77(3), 497-504.
- Mielke, H. and Rodemann, B. (2007). Der Dinkel, eine besondere Weizenart-Anbau, Pflanzenschutz, Ernte und Verarbeitung. (in German). *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes*, 59, 40-45.
- Mikos, M. and Podolska, G. (2012). Bread-making quality of old common bread (*Triticum aestivum* ssp. *vulgare* L.) and spelt (*Triticum aestivum* ssp. *spelta* L.) wheat cultivars. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 10(3-4), 221-224.
- Mirhendi, H., Diba, K., Kordbacheh, P., Jalalizand, N. and Makimura, K. (2007). Identification of pathogenic *Aspergillus* species by a PCR-restriction enzyme method. *Journal of Medical Microbiology*, 56(11), 1568-1570.
- Mohale, S., Medina, A. and Magan, N.(2013). Effect of environmental factors on in vitro and in situ interactions between atoxigenic and toxigenic *A. flavus* strains and control of aflatoxin contamination of maize. *Biocontrol Science and Technology*, 23, 776-793.
- Mohammadkhani, A., Stoddard, F.L. and Marshall, D.R. (1998). Survey of amylose content in *Secale cereale*, *Triticum monococcum*, *T. turgidum* and *T. Tauschii*. *Journal of Cereal Science*, 28, 273-280.
- Monbaliu, S., Van Poucke, C., Detavernier, C.L., Dumoulin, F., Van De Velde, M., Schoeters, E., Van Dyck, S., Averkieva, O., Van Peteghem, C. and De Saeger, S. (2009). Occurrence of mycotoxins in feed as analyzed by a multi-mycotoxin LC-MS/MS method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(1), 66-71.
- Montano, J.J. and Palmer, A. (2003). Numeric sensitivity analysis applied to feedforward neural networks. *Neural Computing and Applications*, 12(2), 119-125.
- Morar, O.A., Braicu, C., Modoran, C. and Florian, V. (2007). Evaluation of the mycotic and mycotoxic content and bakery features of wheat from Transylvania in the conditions of the year 2005. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Agriculture*, 596-601.
- Moretti, A., Pascale, M., and Logrieco, A.F. (2018). Mycotoxin risks under a climate change scenario in Europe. *Trends in Food Science & Technology*. /doi.org/10.1016/j.tifs.2018.03.008, in press.
- Moss, M.O. (2002). Risk assessment for aflatoxins in foodstuffs. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 50(3-4), 137-142.
- Moudry, J., Konvalina, P., Stehno, Z. and Capouchová, I. (2011). Ancient wheat species can extend biodiversity of cultivated crops. *Scientific Research and Essay*, 6, 4273-4280.
- Mousa, W., Ghazali, F. M., Jinap, S., Ghazali, H. M. and Radu, S. (2011). Modelling the effect of water activity and temperature on growth rate and aflatoxin production by two isolates of *Aspergillus flavus* on paddy. *Journal of Applied Microbiology*, 111(5), 1262-1274.
- Murphy, P.A., Hendrich, S., Landgren, C. and Bryant, C.M. (2006). Food mycotoxins: an update. *Journal of Food Science*, 71(5), R51-R65.
- Nasri, T., Hedayati, M.T., Abastabar, M., Pasqualotto, A. C., Armaki, M. T., Hoseinnejad, A. and Nabili, M. (2015). PCR-RFLP on β -tubulin gene for rapid identification of the most clinically important species of *Aspergillus*. *Journal of Microbiological Methods*, 117, 144-147.
- Nelson, P.E., Toussoun, T.A. and Marasas, W.F.O. (1983). *Fusarium* Species. The Pennsylvania State University Press, University Park and London.
- Nielsen, K.F., Mogensen, J.M., Johansen, M., Larsen, T.O. and Frisvad, J.C. (2009). Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395(5), 1225-1242.

- Nirenberg, H.I. and O' Donnell, K. (1998). New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*, 90 (3), 434-458.
- Novas, M. V. and Cabral, D. (2002). Association of mycotoxin and sclerotia production with compatibility groups in *Aspergillus flavus* from peanut in Argentina. *Plant Disease*, 86(3), 215-219.
- O'Brian, G.R., Georgianna, D.R., Wilkinson, J.R., Yu, J., Abbas, H.K., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., Nierman, W. and Payne, G.A. (2007). The effect of elevated temperature on gene transcription and aflatoxin biosynthesis. *Mycologia*, 99(2), 232-239.
- Okuda, T., Klich, M.A., Seifert, K.A. and Ando, K. (2000). Media and incubation effects on morphological characteristics of *Penicillium* and *Aspergillus*. Integration of modern taxonomic for *Penicillium* and *Aspergillus* classification, 83-99.
- Onishi, I., Hongo, A., Sasakuma, T., Kawahara, T., Kato, K. and Miura, H. (2006). Variation and segregation for rachis fragility in spelt wheat, *Triticum spelta* L. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53(5), 985-992.
- Ortiz, R., Trethowan, R.M., Ortiz Ferrara, G. Iwanaga, M., Dodds, J.H. Crouch, J.H. Crossa, J. and Braun, H.J. (2007). High yield potential, shuttle breeding and a new international wheat improvement strategy. *Euphytica*, 157, 365-384.
- Otorepec, S. (1980). *Agrometeorologija*. Beograd, Naučna knjiga, Nolit.
- Palumbo, J.D., Baker, J.L. and Mahoney, N.E. (2006). Isolation of bacterial antagonists of *Aspergillus flavus* from almonds. *Microbial ecology*, 52(1), 45-52.
- Papoušková, L., Capoučová, I., Kostelanská, M., Škeříková, A., Prokinová, E., Hajšlová, J., Salava, J. and Faměra, O. (2011). Changes in baking quality of winter wheat with different intensity of *Fusarium* spp. contamination detected by means of new rheological system Mixolab. *Czech Journal of Food Sciences*, 29, 420-429.
- Pardo, E., Marin, S., Ramos, A. J. and Sanchis, V. (2006). Ecophysiology of ochratoxigenic *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium verrucosum* isolates. Predictive models for fungal spoilage prevention—a review. *Food Additives and Contaminants*, 23(4), 398-410.
- Parry, D.W., Jenkinson, and McLeod, L. (1995). *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals-A review. *Plant Pathology*, 44, 207-238.
- Payne, G.A. (1998). Process of contamination by aflatoxin-producing fungi and their impact on crops. In *Mycotoxins in Agriculture and Food Safety*, Edited by Sinha K., K., S., Bhatnagar, D., Marcel Dekker, Inc., New York.
- Paterson, R.R. and Lima, N. (2010). Toxicology of mycotoxins. In *Molecular, clinical and environmental toxicology*. Birkhäuser Basel. pp. 31-63.
- Peterson, S.W. (2000). Phylogenetic relationships in *Aspergillus* based on rDNA sequence analysis. In *Integration of Modern Taxonomic Methods for Penicillium and Aspergillus Classification*, Samson, R.A. i Pitt, J.I. (eds.). Harwood Academic Publishers, Amsterdam, pp. 323-355.
- Peterson, S.W., Ito, Y., Horn, B.W. and Goto, T. (2001). *Aspergillus bombycis*, a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, *A. nomius*. *Mycologia*, 93, 689-703.
- Peterson, S.W. (2008). Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. *Mycologia*, 100, 205-226.
- Peters, G., Morrissey, M., Sylvia, G. and Bolte, J. (1996). Linear Regression, Neural Network and Induction Analysis to Determine Harvesting and Processing Effects on Surimi Quality. *Journal of Food Science*, 61, 876-880.
- Pezo, L.L., Čurčić, B.L., Filipović, V.S., Nićetin, M.R., Koprivica, G.B., Mišljenović, N.M. and Lević, L.B. (2013). Artificial neural network model of pork meat cubes osmotic dehydration. *Hemijska industrija*, 67(3), 465-475.

- Piergiovanni, A.R., Rizzi, R., Pannacciulli, E. and Gatta, C D. (1997). Mineral composition in hulled wheat grains: a comparison between emmer (*Triticum dicoccon* Schrank) and spelt (*T.spelta* L.) accessions. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 48(6), 381-386.
- Pildain, M.B., Vaamonde, G. and Cabral, D. (2004). Analysis of population structure of *Aspergillus flavus* from peanut based on vegetative compatibility, geographic origin, mycotoxin and sclerotia production. *International Journal of Food Microbiology*, 93(1), 31-40.
- Pildain, M. B., Frisvad, J. C., Vaamonde, G., Cabral, D., Varga, J., and Samson, R. A. (2008). Two novel aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(3), 725-735.
- Pitt, J.I., Hocking, A.D. and Glenn, D. R. (1983). An improved medium for the detection of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. *Journal of Applied Bacteriology*, 54(1), 109-114.
- Pitt, J.I. and Miscamble, B.F. (1995). Water relations of *Aspergillus flavus* and closely related species. *Journal of Food Protection*, 58(1), 86-90.
- Pitt, J.I. and Hocking, A.D. (2009). *Fungi and food spoilage*. Springer, US.
- Pitt, J.I. and Hocking, A.D. (1997). *Fungi and food spoilage*. Blackie Academic i Professional. New South Wales, Australia.
- Piva, G., Battilani, P. and Pietri, A. (2006). Emerging issues in Southern Europe: aflatoxins in Italy. In: Barug, D., Bhatnagar, D., Van Egmond, H.P., Van der Kamp, J.W., Van Osenbruggen, W.A. and Visconti, A. (eds.) *The mycotoxin factbook*. Wageningen Academic Publishers, the Netherlands, pp. 139-153.
- Pleadin, J., Vulić, A., Perši, N., Škrivanko, M., Capek, B. and Cvetnić, Ž. (2014). Aflatoxin B1 occurrence in maize sampled from Croatian farms and feed factories during 2013. *Food Control*, 40, 286-291.
- Prandini, A., Sigolo, S., Filippi, L., Battilani, P. and Piva, G. (2009). Review of predictive models for *Fusarium* head blight and related mycotoxin contamination in wheat. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 927-931.
- Prange, A., Birzele, B., Krämer, J., Meier, A., Modrow, H. and Köhler, P. (2005). *Fusarium*-inoculated wheat: deoxynivalenol contents and baking quality in relation to infection time. *Food Control*, 16(8), 739-745.
- Pravilnik o kvalitetu žita, mlinskih i pekarskih proizvoda i testenina (Službeni glasnik Republike Srbije, 52/95, 56/2003, 4/2004, 43/2013, 68/2016).
- Pravilnik o maksimalno dozvoljenim količinama ostataka sredstava za zaštitu bilja u hrani i hrani za životinje (Službeni glasnik Republike Srbije, 29/2014, 37/2014 - isp., 39/2014, 72/2014, 80/2015, 84/2015, 35/2016, 81/2016 i 21/2017).
- Pritsch, C., Muehlbauer, G.J., Bushnell, W.R., Somers, D.A. and Vance, C.P. (2000). Fungal development and induction of defense response genes during early infection of wheat spikes by *Fusarium graminearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13, 159-169.
- Pruska-Kedzior, A., Kedzior, Z. and Klockiewicz-Kaminska, E. (2008). Comparison of viscoelastic properties of gluten from spelt and common wheat. *European Food Research and Technology*, 227(1), 199-207.
- Rajkovi, S. and Dolovac, N. (2006). Common bunt (*Tilletia tritici*) in different wheat genotypes. In *Proc. XVth Biennial Workshop on the Smut Fungi*, Prague, June 11–14, 2006, 42, pp.16-19.
- Ranhotra, G.S., Gelroth, J.A., Glaser, B.K. and Lorenz, K.J. (1995). Baking and nutritional qualities of a spelt wheat sample. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1), 118-122.
- Ranhotra, G.S., Gelroth, J.A., Glaser, B.K. and Stallknecht, G.F. (1996). Nutritional profile of three spelt wheat cultivars grown at five different locations. *Cereal Chemistry*, 73, 533–535.

- Raper, K.B. and Fennell, D.I. (1965). The genus *Aspergillus*. Williams i Wilkins, Baltimore.
- Razzaghi-Abyaneh, M., Shams-Ghahfarokhi, M., Allameh, A., Kazeroon-Shiri, A., Ranjbar-Bahadori, S., Mirzahoseini, H. and Rezaee, M. B. (2006). A survey on distribution of *Aspergillus* section *Flavi* in corn field soils in Iran: population patterns based on aflatoxins, cyclopiazonic acid and sclerotia production. *Mycopathologia*, 161(3), 183-192.
- Reddy, K. R. N., Saritha, P., Reddy, C. S. and Muralidharan, K. (2009a). Aflatoxin B1 producing potential of *Aspergillus flavus* strains isolated from stored rice grains. *African Journal of Biotechnology*, 8(14).
- Reddy, K.R.N., Abbas, H.K., Abel, C.A., Shier, W.T., Oliveira, C.A.F. and Raghavender, C.R. (2009b). Mycotoxin contamination of commercially important agricultural commodities. *Toxin Reviews*, 28(2-3), 154-168.
- Reddy, K.R.N., Raghavender, C.R., Salleh, B., Reddy, C.S. and Reddy, B.N. (2011). Potential of aflatoxin B1 production by *Aspergillus flavus* strains on commercially important food grains. *International Journal of Food Science and Technology*, 46(1), 161-165.
- Republički Hidrometeorološki Zavod Srbije - RHMZ. (2014). Agrometeorološki uslovi u proizvodnoj 2013/2014 godini na teritoriji Republike Srbije.
- Republički Hidrometeorološki Zavod Srbije – RHMZ:
http://www.hidmet.gov.rs/latin/meteorologija/klimatologija_srbije.php
- Riba, A., Bouras, N., Mokrane, S., Mathieu, F., Lebrihi, A. and Sabaou, N. (2010). *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxins in Algerian wheat and derived products. *Food and Chemical Toxicology*, 48(10), 2772-2777.
- Rodrigues, P., Soares, C., Kozakiewicz, Z., Paterson, R.R.M., Lima, N. and Venâncio, A. (2007). Identification and characterization of *Aspergillus flavus* and aflatoxins, Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology, Formatex. ISBN 978-84-611-9423-0, 527-534.
- Rodrigues, P., Venâncio, A., Kozakiewicz, Z., and Lima, N. (2009). A polyphasic approach to the identification of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from Portuguese almonds. *International Journal of Food Microbiology*, 129(2), 187-193.
- Rodrigues, P.C.A. (2011). Mycobiota and aflatoxigenic profile of Portuguese almonds and chestnuts from production to commercialization. Doctoral dissertation, Instituto Politecnico de Braganca, Portugal.
- Rodriguez-Quijano, M., Vasquez, J.F. and Carrillo, J.M. (2004). Waxy proteins and amylose content in diploid *Triticeae* species with genomes A, S and D. *Plant Breeding*, 123, 294–296.
- Rokas, A., Payne, G., Fedorova, N.D., Baker, S.E., Machida, M., Yu, J., Georgianna, D.R., Dean, R.A., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., Wortman, J.R., Maiti, R., Joardar, V., Amedeo, P., Denning, D.W. and Nierman, W.C. (2007). What can comparative genomics tell us about species concepts in the genus *Aspergillus*? *Studies in Mycology*, 59, 11-7.
- Rosso, L. and Robinson, T. P. (2001). A cardinal model to describe the effect of water activity on the growth of moulds. *International Journal of Food Microbiology*, 63(3), 265-273.
- Ruibal-Mendieta N.L., Delacroix D.L., Mignolet, E., Marie Pycke, J., Marques C., Rozenberg, R., Petitjean G., Habib-Jiwan J.-L., Meurens M., Quetin-Leclercq, J., Delzenne N.M. and Larondelle, Y. (2005). Spelt (*Triticum aestivum* ssp. *spelta*) as a source of breadmaking flours and bran naturally enriched in oleic acid and minerals but not phytic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2751-2759.
- Saleemi, M.K., Khan, M.Z., Khan, A. and Javed, I. (2010). Mycoflora of poultry feeds and mycotoxins producing potential of *Aspergillus* species. *Pakistan Journal of Botany*, 42 (1), 427-434.

- Samapundo, S., Devlieghere, F., De Meulenaer, B. and Debevere, J. (2007a). Growth kinetics of cultures from single spores of *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides* on yellow dent corn meal. *Food Microbiology*, 24(4), 336-345.
- Samapundo, S., Devlieghere, F., Geeraerd, A.H., De Meulenaer, B., Van Impe, J.F. and Debevere, J. (2007b). Modelling of the individual and combined effects of water activity and temperature on the radial growth of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* on corn. *Food Microbiology*, 24(5), 517-529.
- Samson, R.A. and van Reenen-Hoekstra, E.S. (1988). Introduction to Foodborne Fungi. Centralbureau voor Schimmelcultures, Institute of the Royal Netherlands Academy of Art and Sciences, Baarn, Delft.
- Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C. and Filtenborg, O. (2000). Identification of the common food and airborne fungi, *Aspergillus*. In Introduction to Food and Airborne Fungi, Utrecht: CBS, pp. 64–97.
- Samson, R.A. and Varga, J.N. (2007). *Aspergillus* systematics in the genomic era (No. 50). Utrecht, The Netherlands, CBS Fungal Biodiversity Centre.
- Samson, R.A., and Varga, J. (2009). What is a species in *Aspergillus*? *Medical Mycology*, 47(sup1), S13-S20.
- Samson, R.A., Houbraeken, J. and Thrane, U. (2010). Food and indoor fungi. CBS KNAW Biodiversity Center, Utrecht.
- Samson, R.A., Visagie, C.M., Houbraeken, J., Hong, S.-B., Hubka, V., Klaassen, C.H.W. , Perrone, G., Seifert, K.A., Susca, A., Tanney, J.B., Varga, J., Kocsube, S., Szigeti, G., Yaguchi, T. and Frisvad, J.C. (2014). Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in mycology*, 78, 141-173.
- Santin. E. (2005). Mould growth and mycotoxin production. In *Mycotoxin blue book*, Nottingham, United Kingdom: University Press, 225-234.
- Santini, A., Meca, G., Uhlig, S. and Ritieni, A. (2012). Fusaproliferin, beauvericin and enniatins: occurrence in food—a review. *World Mycotoxin Journal*, 5(1), 71-81.
- Sautour, M., Mansur, C. S., Divies, C., Bensoussan, M. and Dantigny, P. (2002). Comparison of the effects of temperature and water activity on growth rate of food spoilage moulds. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28(6), 311-315.
- Scheidegger, K.A. and Payne, G.A. (2005). Unlocking the secrets behind secondary metabolism: A review of *Aspergillus flavus* from pathogenicity to functional genomics. *Journal of Toxicology-Toxin Reviews*, 22, 423-459.
- Schmidt, M., Horstmann, S., De Colli, L., Danaher, M., Speer, K., Zannini, E. and Arendt, E. K. (2016). Impact of fungal contamination of wheat on grain quality criteria. *Journal of Cereal Science*, 69, 95-103.
- Schmidt-Heydt, M., Abdel-Hadi, A., Magan, N. and Geisen, R. (2009). Complex regulation of the aflatoxin biosynthesis gene cluster of *Aspergillus flavus* in relation to various combinations of water activity and temperature. *International Journal of Food Microbiology*, 135(3), 231-237.
- Schmidt-Heydt, M., Rüfer, C.E., Abdel-Hadi, A., Magan, N. and Geisen, R. (2010). The production of aflatoxin B1 or G1 by *Aspergillus parasiticus* at various combinations of temperature and water activity is related to the ratio of aflS to aflR expression. *Mycotoxin Research*, 26, 241-246.
- Schoch, C.L., Seifert, K.A. and Huhndorf, S. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, 6241–6246.
- Schuller, P.L., Van Egmond, H. P. and Stoloff, L. (1983). Limits and regulations on mycotoxins In *Proceedings of the International Symposium on Mycotoxins*, 6–8

- September 1981 (Naguib, K., Naguib, M.M., Park, D.L. and Pohland, A.E. eds) pp. 111–129. Cairo, Egypt: General Organization for Government Printing Offices.
- Semenov, M.A., Stratonovitch, P., Alghabari, F. and Gooding, M.J. (2014). Adapting wheat in Europe for climate change. *Journal of Cereal Science*, 59(3), 245-256.
- Şenyuva, H.Z., Gilbert, J., Öztürkoğlu, S., Özcan, S. and Gürel, N. (2008). Changes in free amino acid and sugar levels of dried figs during aflatoxin B1 production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(20), 9661-9666.
- Shewry, P.R., Hawkesford, M.J., Piironen, V., Lampi, A., Gebruers, K., Boros, D., Andersson, A.A.M., Åman, P., Rakszegi, M., Bedo, Z. and Ward, J.L. (2013). Natural variation in grain composition of wheat and related cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 8295–8303.
- Shewry, P.R. and Hey, S. (2015). Do “ancient” wheat species differ from modern bread wheat in their contents of bioactive components? *Journal of Cereal Science*, 65, 236–243.
- Shewry, P.R., Pellny, T.K. and Lovegrove, A. (2016). Is modern wheat bad for health. *Nature plants*, 2, 1-3.
- Shewry, P. R. (2018). Do ancient types of wheat have health benefits compared with modern bread wheat? *Journal of Cereal Science*, 79, 469-476.
- Siahmoshteh, F., Hamidi-Esfahani, Z., Spadaro, D., Shams-Ghahfarokhi, M. and Razzaghi-Abyaneh, M. (2018). Unraveling the mode of antifungal action of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens* as potential biocontrol agents against aflatoxigenic *Aspergillus parasiticus*. *Food Control*, 89, 300-307.
- Siou, D., Géglise, S., Laval, V., Repinçay, C., Canalès, R., Suffert, F. and Lannou, C. (2014). Effect of wheat spike infection timing on *Fusarium* head blight development and mycotoxin accumulation. *Plant pathology*, 63, 390-399.
- Sofi, F., Ghiselli, L., Cesari, F., Gori, A. M., Mannini, L., Casini, A., Vazzana, C., Vecchio, V., Gensini, G.F., Abbate, R. and Benedettelli, S. (2010). Effects of short-term consumption of bread obtained by an old Italian grain variety on lipid, inflammatory, and hemorheological variables: an intervention study. *Journal of Medicinal Food*, 13(3), 615-620.
- Solarska, E., Kuzdralinski, A. and Marzec, M. (2012). Toxigenic fungi and mycotoxins in organic spelt and its products. *The Journal of Agriculture, Science and Technology*, 2, 168-177.
- Solon-Biet, S.M., Cogger, V.C., Pulpitel, T., Heblinski, M., Wahl, D., McMahon, A.C., Warren, A., Durrant-Whyte, J., Walters, K.A., Krycer, J.R., Ponton, F., Gokarn, R., Wali, J., Ruohonen, K., Conigrave, A.D., James, D.E., Raubenheimer, D., Morrison, C.D., Le Couteur, D.G. and Simpson, S.J. (2016). Defining the nutritional and metabolic context of FGF21 using the geometric framework. *Cell Metabolism*, 24, 555–565.
- SRPS ISO 21527-2:2011. Horizontalna metoda za određivanje broja kvasaca i plesni –Deo 2: Tehnika brojanja kolonija u proizvodima sa aktivnošću vode manjom od 0,95 ili jednakom 0,95.
- Stallknecht, G.F., Gilbertson, K.M. and Ranney, J.E. (1996). Alternative wheat cereals as food grains: Einkorn, emmer, spelt, kamut, and triticale. *Progress in new crops*, 156-170.
- Stanciu, O., Banc, R., Cozma, A., Filip, L., Miere, D., Mañes, J. and Loghin, F. (2015). Occurrence of *Fusarium* Mycotoxins in Wheat from Europe—A Review. *Acta Universitatis Cibiniensis. Series E: Food Technology*, 19(1), 35-60.
- Stanković, S.Ž., Lević, J.T., Krnjaja, V.S., Bočarov-Stančić, A.S., Tančić, S.L. and Kovačević, T.M. (2007). Učestalost toksigenih vrsta *Fusarium* i fuzariotoksina u zrnu pšenice u Srbiji. *Proceedings for Natural Sciences, Matica Srpska Novi Sad*, 113, 93-102.

- StatSoft Inc (2010). STATISTICA (data analysis software system). Version 10.0. Available at: <http://www.statsoft.com/>
- Stefanović, S. (2014). Uporedno ispitivanje prisustva aflatoksina B1 u hrani za životinje i aflatoksina M1 u mleku. Doktorska disertacija, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu.
- Stojanović, T. (1999). Kvalitet pšenice i brašna sa mikološkog i mikotoksikološkog aspekta. Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu.
- Stojanović, T., Škrinjar, M. and Psodorov, Đ. (2005). Fusarioses of wheat grain categories and their mycotoxicological infection. Proceedings for Natural Sciences, Matica Srpska Novi Sad, 108, 43-50.
- Strange, R.N., Majer, J.R. and Smith, H. (1974). The isolation and identification of choline and betaine as the two major components in anthers and wheat germ that stimulate *Fusarium graminearum* in vitro. *Physiological Plant Pathology*, 4(2), 277-290.
- Strange, R.N. and Subba Rao, P.V. (1994). The phytoalexin response of groundnut and its role in disease resistance. *Oleagineux*, 49, 227-233.
- Suchowilska, E. and Wiwart, M. (2006). Multivariate analysis of image descriptors of common wheat (*Triticum aestivum*) and spelt (*T. spelta*) grain infected by *Fusarium culmorum*. *International agrophysics*, 20(4), 345.
- Suchowilska, E., Wiwart, M. and Borusiewicz, A. (2007). The reaction of the selected *Triticumaestivum*, *Triticumspelta* and *Triticumdicoccum* species to spike infection by *Fusarium culmorum*. Proceedings of the Conference "Organic farming 2007". February 6-7, 2007. Nitra, Slovak Republic. pp. 172-174.
- Suchowilska, E., Kandler, W., Sulyok, M., Wiwart, M. and Krska, R. (2010). Mycotoxin profiles in the grain of *Triticum monococcum*, *Triticum dicoccum* and *Triticum spelta* after head infection with *Fusarium culmorum*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90, 556-565.
- Suchowilska, E., Wiwart, M., Kandler, W. and Krska, R. (2012). A comparison of macro- and microelement concentrations in the whole grain of four *Triticum* species. *Plant, Soil and Environment*, 58, 141-147.
- Suchý, K., Konvalina, P., Capouchová, I., Janovská, D., Leišová-Svobodová, L., Štěrba, Z., Moudrý, J., Bucur, D., Bernas, J., Kopecký and Tran, D. K. (2018). Influence of husk on grain contamination by *Fusarium* spp. and *Alternaria* spp. in hulled spelt (*Triticum spelta* L.). *Environmental Engineering i Management Journal (EEMJ)*, 17(4).
- Šarić, M.D., Stojanović, T.V., Škrinjar, M.M. and Menkovska, M.M. (2008). Effects of moulds on the safety and processing quality of *Triticum aestivum*. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*, 114, 105-114.
- Tabuc, C., Marin, D., Guerre, P., Sesan, T. and Bailly, J.D. (2009). Molds and mycotoxin content of cereals in southeastern Romania. *Journal of food protection*, 72(3), 662-665.
- Taylor B.J. (Ed.). (2006). *Methods and procedures for the verification and validation of artificial neural networks*. Springer Science i Business Media.
- Tošić, I., and Unkašević, M. (2014). Analysis of wet and dry periods in Serbia. *International Journal of Climatology*, 34(5), 1357-1368.
- Travassos, L.R. and Lloyd., K.O. (1980). *Sporotrix scenckii* and related species of *Ceratocysis*. *Microbiological Reviews*, 44 (4), 683-722.
- Trethowan, R.M. Reynolds, M.P., Ortiz-Monasterio, I. and Ortiz R. (2007). The genetic basis of Green Revolution in wheat production. *Plant Breeding Reviews*, 28, 39-58.
- Turányi, T. and Tomlin, A.S. (2014). Reduction of Reaction Mechanisms. In *Analysis of Kinetic Reaction Mechanisms*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 183-312.
- United States Department of Agriculture, USDA. Food Composition Database. Avialbe from: <http://ndb.nal.usda.gov/>

- Valerii, M.C., Ricci, C., Spisni, E., Di Silvestro, R., De Fazio, L., Cavazza, E., Lanzini, A., Campieri, M., Dalpiaz, A., Pavan, B., Volta, U. and Dinelli, G. (2015). Responses of peripheral blood mononucleated cells from non-celiac gluten sensitive patients to various cereal sources. *Food Chemistry*, 176, 167-174.
- Valli, V., Danesi, F., Gianotti, A., Di Nunzio, M., Saa, D.L.T. and Bordoni, A. (2016). Antioxidative and anti-inflammatory effect of in vitro digested cookies baked using different types of flours and fermentation methods. *Food Research International*, 88, 256-262.
- Varga, J., Due, M., Frisvad, J.C. and Samson, R.A. (2007a). Taxonomic revision of *Aspergillus* section *Clavati* based on molecular, morphological and physiological data. *Studies in Mycology*, 59, 89-106.
- Varga, J., Frisvad, J.C. and Samson, R.A. (2007b). Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Candidi* based on molecular, morphological and physiological data. *Studies in Mycology*, 59, 75-88.
- Varga, J., Frisvad, J. and Samson, R. (2009). A reappraisal of fungi producing aflatoxins. *World Mycotoxin Journal*, 2(3), 263-277.
- Velu, G., Ortiz-Monasterio, I., Cakmak, I., Hao, Y. and Singh, R.P. (2014). Biofortification strategies to increase grain zinc and iron concentrations in wheat. *Journal of Cereal Science*, 59(3), 365-372.
- Venâncio, A. i Paterson, R. (2007). The challenge of mycotoxins. In: *Food Safety - A Practical and Case Study Approach (0-387-33509-9)*, McElhatton, A. and Marshall, R.J. (eds.), Springer, Ch. 2, pp. 24-47.
- Vučković, J., Bagi, F., Bodroža-Solarov, M., Stojšin, V., Budakov, D., Ugrenović, V. and Aćimović, M. (2012). *Alternaria* spp. on spelt kernels (*Triticum aestivum* ssp. *spelta*). *Plant Doctor*, 1, 50-55.
- Vučković, J., Bodroža-Solarov, M., Vujić, Đ., Bočarov-Stančić, A. and Bagi, F. (2013). The protective effect of hulls on the occurrence of *Alternaria* mycotoxins in spelt wheat. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 1996-2001.
- Wang, L., Yokoyama, K., Takahasi, H., Kase, N., Hanya, Y., Yashiro, K., Miyaji, M. and Nishimura, K. (2001). Identification of species in *Aspergillus* section *Flavi* based on sequencing of the mitochondrial cytochrome b gene. *International Journal of Food Microbiology*, 71, 75-86.
- Wachowska, U. (2012). Health of Spelt Wheat (*Triticum spelta*) Cultivated in Ecological and Conventional Systems. *Acta fytotechnica et zootechnica* (online), roč. 15, 2012, č. Mimoriadne-Special, 72-75.
- Wen, Y., Hatabayashi, H., Arai, H., Kitamoto, H.K. and Yabe, K. (2005). Function of the *cypX* and *moxY* genes in aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(6), 3192-3198.
- White, T.J., Burns, T., Lee, S. and Taylor, J.W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocol: A Guide to Methods and Applications*, Innis, M.A., Gelfald, D.H., Sninsky, J.J. i White, T.J. (eds.), Academic press, New York, USA, pp. 315-322.
- Wilkinson, J.R., Yu, J., Bland, J.M., Nierman, W.C., Bhatnagar, D. and Cleveland, T.E. (2007). Amino acid supplementation reveals differential regulation of aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus* NRRL 3357 and *Aspergillus parasiticus* SRRC 143. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(6), 1308-1319.
- Williams J.H., Philips T.D., Jolly P.E., Stiles J.K., Jolly C.M. and Aggarwal, D. (2004). Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *American Journal of Clinical Nutrition*, 80, 1106-1122.

- Wiwart, M., Perkowski, J., Jackowiak, H., Packa, D., Borusiewicz A. and Buśko, M. (2004). Response of some cultivars of spring spelt (*Triticum spelta*) to *Fusarium culmorum* infection. *Die Bodenkultur*, 103, 3.
- Wiwart, M., Suchowilska, E., Kandler, W., Sulyok, M., Wachowska, U. and Krska, R. (2016). The response of selected *Triticum* spp. genotypes with different ploidy levels to head blight caused by *Fusarium culmorum* (WG Smith) Sacc. *Toxins*, 8, 112.
- Wiwart, M., Bytner, M., Graban, Ł., Lajszner, W. and Suchowilska, E. (2017). Spelt (*Triticum spelta*) and Emmer (*T. dicoccon*) chaff used as a renewable source of energy. *BioResources*, 12(2), 3744-3750.
- Wotton, H.R. and Strange, R.N. (1985). Circumstantial evidence for phytoalexin involvement in the resistance of peanuts to *Aspergillus flavus*. *Microbiology*, 131(3), 487-494.
- Wu, F., Bhatnagar, D., Bui-Klimke, T., Carbone, I., Hellmich, R., Munkvold, G., Paul, P., Payne, G. and Takle, E. (2011). Climate change impacts on mycotoxin risks in US maize. *World Mycotoxin Journal*, 4, 79-93.
- Wu, F. and Mitchell, N. J. (2016). How climate change and regulations can affect the economics of mycotoxins. *World Mycotoxin Journal*, 9, 653-663.
- Yabe, K., Nakamura, M. and Hamasaki, T. (1999). Enzymatic formation of G-group aflatoxins and biosynthetic relationship between G-and B-group aflatoxins. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(9), 3867-3872.
- Yu, J., Chang, P.K., Cary, J.W., Wright, M., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., Payne, G.A. and Linz, J.E. (1995). Comparative mapping of aflatoxin pathway gene clusters in *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(6), 2365-2371.
- Yu, J., Mohawed, S. M., Bhatnagar, D. and Cleveland, T. E. (2003). Substrate-induced lipase gene expression and aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus*. *Journal of Applied Microbiology*, 95(6), 1334-1342.
- Yu, J., Chang, P.K., Ehrlich, K.C., Cary, J.W., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., Payne, G.A., Linz, J.E., Woloshuk, C.P. and Bennett, J.W. (2004). Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(3), 1253-1262.
- Zalar, P., Frisvad, J. C., Gunde-Cimerman, N., Varga, J. and Samson, R. A. (2008). Four new species of *Emericella* from the Mediterranean region of Europe. *Mycologia*, 100(5), 779-795.
- Zanon, M.S.A., Barros, G.G. and Chulze, S.N. (2016). Non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* as potential biocontrol agents to reduce aflatoxin contamination in peanuts harvested in Northern Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 231, 63-68.
- Zgraja, G., Krämer, S., Jonitz, A. and Wagner, W. (2016). Identification and Quantification of *Tilletia caries* and *T. controversa* in Seed Samples and Discrimination of the Two Species. *Research i Reviews: Journal of Botanical Sciences*, 5(2), 5-11.
- Zhang, J. and Madden, T.L. (1997). Power BLAST: A new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation. *Genome Research*, 7, 649-656.
- Zieliński, H., Ceglińska, A. and Michalska, A. (2008). Bioactive compounds in spelt bread. *European Food Research and Technology*, 226(3), 537-544.
- Zinedinea, A., Juanb, C., Sorianob, J.M., Moltób, J.C., Idrissia, L. and Mañesb, J. (2007). Limited survey for the occurrence of aflatoxins in cereals and poultry feeds from Rabat, Morocco. *International Journal of Food Microbiology*, 115(1), 124-127.

7. PRILOZI

Prilog 1. Sekvence PCR produkata deponovanih u GenBank bazi podataka

MH582473	>seq1 [organism= <i>Aspergillus flavus</i>] <i>Aspergillus flavus</i> JK0 beta-tubulin (benA) gene, partial cds TATCTGCCACATGTTTGCTAACAACTTTGCAGGCAAACCATCTCTGGCGAGC ACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATACACCTCGAACGA ACGACGACCATATGGCATTAGAAGTTGGAATGGATCTGACGGCAAGGATAG TTACAATGGCTCCTCCGATCTCCAGCTGGAGCGTATGAACGTCTACTTCAAC GAGGTGCGTACCTCAAAATTTTCAGCATCTATGAAAACGCTTTGCAACTCCTG ACCGTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTGCCGTCCTCGTT GATCTTGAGCCTGGTACCATGGACGCCGTCGGTGCCGGTCCCTTCGGTCAGC TCTTCCGTCCCGACAACCTTCGTTTCGCCAGTCCGTGC
MH582474	>seq2 [organism= <i>Aspergillus flavus</i>] <i>Aspergillus flavus</i> JK1 beta-tubulin (benA) gene, partial cds TATGTGTTCCGGTTATCTGCCACATGTTTGCTAACAACTTTGCAGGCAAACCA TCTCTGGCGAGCACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATA CACCTCGAACGAACGACGACCATATGGCATTAGAAGTTGGAATGGATCTGA CGGCAAGGATAGTTACAATGGCTCCTCCGATCTCCAGCTGGAGCGTATGAAC GTCTACTTCAACGAGGTGCGTACCTCAAAATTTTCAGCATCTATGAAAACGCT TTGCAACTCCTGACCGCTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGT GCCGTCCTCGTTGATCTTGAGCCTGGTACCATGGACGCCGTCGGTGCCGGTC CCTTCGGTCAGCTCTTCCGTCCCGACAACCTTCGTTTTTCGGCCAG
MH582475	>seq3 [organism= <i>Aspergillus flavus</i>] <i>Aspergillus flavus</i> JK2 beta-tubulin (benA) gene, partial cds TATCTGCCACATGTTTGCTAACAACTTTGCAGGCAAACCATCTCTGGCGAGC ACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATACACCTCGAACGA ACGACGACCATATGGCATTAGAAGTTGGAATGGATCTGACGGCAAGGATAG TTACAATGGCTCCTCCGATCTCCAGCTGGAGCGTATGAACGTCTACTTCAAC GAGGTGCGTACCTCAAAATTTTCAGCATCTATGAAAACGCTTTGCAACTCCTG ACCGTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTGCCGTCCTCGTT GATCTTGAGCCTGGTACCATGGACGCCGTCGGTGCCGGTCCCTTCGGTCAGC TCTTCCGTCCCGACAACCTTCGTTTCGCCAGTCCGTGC
MH582476	>seq4 [organism= <i>Aspergillus flavus</i>] <i>Aspergillus flavus</i> JK3 beta-tubulin (benA) gene, partial cds LOsa TATCTGCCACATGTTTGCTAACAACTTTGCAGGCAAACCATCTCTGGCGAGC ACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATACACCTCGAACGA ACGACGACCATATGGCATTAGAAGTTGGAATGGATCTGACGGCAAGGATAG TTACAATGGCTCCTCCGATCTCCAGCTGGAGCGTATGAACGTCTACTTCAAC GAGGTGCGTACCTCAAAATTTTCAGCATCTATGAAAACGCTTTGCAACTCCTG ACCGTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTGCCGTCCTCGTT G
MH582477	>seq5 [organism= <i>Aspergillus flavus</i>] <i>Aspergillus flavus</i> JK4 beta-tubulin (benA) gene, partial cds TATCTGCCACATGTTTGCTAACAACTTTGCAGGCAAACCATCTCTGGCGAGC ACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATACACCTCGAACGA ACGACGACCATATGGCATTAGAAGTTGGAATGGATCTGACGGCAAGGATAG TTACAATGGCTCCTCCGATCTCCAGCTGGAGCGTATGAACGTCTACTTCAAC GAGGTGCGTACCTCAAAATTTTCAGCATCTATGAAAACGCTTTGCAACTCCTG ACCGTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTGCCGTCCTCGTT GATCTTGAGCCTGGTACCATGGACGCCGTCGGTGCCGGTCCCTTCGGTCAGC TCTTCCGTCCCGACAACCTTCGTTTTTCGCCAGTCCGGTGC
MH582478	>seq6 [organism= <i>Aspergillus flavus</i>] <i>Aspergillus flavus</i> JK5 beta-tubulin (benA) gene, partial cds

	GTGTCCTGTTATATCTGCCACATGTTTGCTAACAACCTTTGCAGGCAAACCATC TCTGGCGAGCACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATACA CCTCGAACGAACGACGACCATATGGCATTAGAAGTTGGAATGGATCTGACG GCAAGGATAGTTACAATGGCTCCTCCGATCTCCAGCTGGAGCGTATGAACGT CTACTTCAACGAGGTGCGTACCTCAAATTTTCAGCATCTATGAAAACGCTTT GCAACTCCTGACCGCTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTGC CGTCCTCGTTGATCTTGAGC
MH582479	>seq8 [organism= <i>Aspergillus flavus</i>] <i>Aspergillus flavus</i> JK7 beta-tubulin (benA) gene, partial cds GTGTCCTGGTATATCTGCCACATGTTTGCTAACAACCTTTGCAGGCAAACCAT CTCTGGCGAGCACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATAC ACCTCGAACGAACGACGACCATATGGCATTAGAAGTTGGAATGGATCTGAC GGCAAGGATAGTTACAATGGCTCCTCCGATCTCCAGCTGGAGCGTATGAACG TCTACTTCAACGAGGTGCGTACCTCAAATTTTCAGCATCTATGAAAACGCTT TGCAACTCCTGACCGCTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTG CCGTCCTCGTTGATCTTGAGCCTGG
MH582480	>seq9 [organism= <i>Aspergillus flavus</i>] <i>Aspergillus flavus</i> JK8 beta-tubulin (benA) gene, partial cds TATCTGCCACATGTTTGCTAACAACCTTTGCAGGCAAACCATCTCTGGCGAGC ACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATACACCTCGAACGA ACGACGACCATATGGCATTAGAAGTTGGAATGGATCTGACGGCAAGGATAG TTACAATGGCTCCTCCGATCTCCAGCTGGAGCGTATGAACGTCTACTTCAAC GAGGTGCGTACCTCAAATTTTCAGCATCTATGAAAACGCTTTGCAACTCCTG ACCGCTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTGCCGTCCTCGTT GATCTTGAGCCTGGTACCATGGACGCCGTCGTCGGTCCCTTCGGTCAGC TCTCCGTCCTCGACAACCTTCGCGTCGGCCAGTC
MH582481	>seq10 [organism= <i>Aspergillus flavus</i>] <i>Aspergillus flavus</i> JK9 beta-tubulin (benA) gene, partial cds TATCTGCCACATGTTTGCTAACAACCTTTGCAGGCAAACCATCTCTGGCGAGC ACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATACACCTCGAACGA ACGACGACCATATGGCATTAGAAGTTGGAATGGATCTGACGGCAAGGATAG TTACAATGGCTCCTCCGATCTCCAGCTGGAGCGTATGAACGTCTACTTCAAC GAGGTGCGTACCTCAAATTTTCAGCATCTATGAAAACGCTTTGCAACTCCTG ACCGCTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTGCCGTCCTCGTT GATCTTGAGCCTGTTCATGGACGCCGTCACGCCGTCCTTCGGTCAGCT CTTCGGTCCCGACAA
MH582482	>seq11 [organism= <i>Aspergillus flavus</i>] <i>Aspergillus flavus</i> JK10 beta-tubulin (benA) gene, partial cds CTGCCACATGTTTGCTAACAACCTTTGCAGGCAAACCATCTCTGGCGAGCACG GCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATACACCTCGAACGAACG ACGACCATATGGCATTAGAAGTTGGAATGGATCTGACGGCAAGGATAGTTA CAATGGCTCCTCCGATCTCCAGCTGGAGCGTATGAACGTCTACTTCAACGAG GTGCGTACCTCAAATTTTCAGCATCTATGAAAACGCTTTGCAACTCCTGACC GCTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTGCCGTCCTCGTTGAT CTTGAGCCTGGTACCATGGACGCCGTCGTCGGTCCCTTCGGTCAGCTCTT CCGTCCTCGACAACCTTCGTTTTCGGCCAGTCCGGTGC
MH582483	>seq12 [organism= <i>Aspergillus flavus</i>] <i>Aspergillus flavus</i> JK11 beta-tubulin (benA) gene, partial cds TTTTAACTGCCACATGTTTGCTAACAACCTTTGCAGGCAAACCATCTCTGGCG AGCACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATACACCTCGAA CGAACGACGACCATATGGCATTAGAAGTTGGAATGGATCTGACGGCAAGGA TAGTTACAATGGCTCCTCCGATCTCCAGCTGGAGCGTATGAACGTCTACTTC AACGAGGTGCGTACCTCAAATTTTCAGCATCTATGAAAACGCTTTGCAACTC CTGACCGCTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTGCCGTCCTC

	GTTGATCTTGAGCCTGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTTCGGTC AGCTCTTCCGTCCCGACAACCTTCGTTTTTCGGCCAGTCCGGTG
MH582484	>seq13 [organism= <i>Aspergillus flavus</i>] <i>Aspergillus flavus</i> JK12 beta-tubulin (benA) gene, partial cds TATATCTGCCACATGTTTGCTAACAACTTTGCAGGCAAACCATCTCTGGCGA GCACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATACACCTCGAAC GAACGACGACCATATGGCATTAGAAGTTGGAATGGATCTGACGGCAAGGAT AGTTACAATGGCTCCTCCGATCTCCAGCTGGAGCGTATGAACGTCTACTTCA ACGAGGTGCGTACCTCAAAATTTACAGCATCTATGAAAACGCTTTGCAACTCC TGACCGCTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTGCCGTCCCTCG TTGATCTTGAGCCTGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTTCGGTCA GCTCTTCCGTCCCGACAACCTTCGTTTTTCGGCCAGTCCGGTGCT
MH582485	>seq14 [organism= <i>Aspergillus flavus</i>] <i>Aspergillus flavus</i> JK13 beta-tubulin (benA) gene, partial cds TATCTGCCACATGTTTGCTAACAACTTTGCAGGCAAACCATCTCTGGCGAGC ACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATACACCTCGAACGA ACGACGACCATATGGCATTAGAAGTTGGAATGGATCTGACGGCAAGGATAG TTACAATGGCTCCTCCGATCTCCAGCTGGAGCGTATGAACGTCTACTTCAAC GAGGTGCGTACCTCAAAATTTACAGCATCTATGAAAACGCTTTGCAACTCCTG ACCGCTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTGCCGTCCCTCGTT GATCTTGAGCCTGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTTCGGTCAGC TCTTCCGTCCCGACAACCTTCGTTTTTCGGCCAGTCCGGTGCT
MH582486	>seq15 [organism= <i>Aspergillus flavus</i>] <i>Aspergillus flavus</i> JK14 beta-tubulin (benA) gene, partial cds TTTGCTAACAACTTTGCAGGCAAACCATCTCTGGCGAGCACGGCCTTGACGG CTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATACACCTCGAACGAACGACGACCATAT GGCATTAGAAGTTGGAATGGATCTGACGGCAAGGATAGTTACAATGGCTCCT CCGATCTCCAGCTGGAGCGTATGAACGTCTACTTCAACGAGGTGCGTACCTC AAAATTTACAGCATCTATGAAAACGCTTTGCAACTCCTGACCGCTTCTCCAGG CCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTGCCGTCCCTCGTTGATCTTGAGCCTGG TACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTTCGGTCAGCTCTTCCGTCCCGAC AACTTCGTTTTTCGGCCAGTC
MH582487	>seq16 [organism= <i>Aspergillus flavus</i>] <i>Aspergillus flavus</i> JK15 beta-tubulin (benA) gene, partial cds CCTGCCACATGTTTGCTAACAACTTTGCAGGCAAACCATCTCTGGCGAGCAC GGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATACACCTCGAACGAAC GACGACCATATGGCATTAGAAGTTGGAATGGATCTGACGGCAAGGATAGTT ACAATGGCTCCTCCGATCTCCAGCTGGAGCGTATGAACGTCTACTTCAACGA GGTGCGTACCTCAAAATTTACAGCATCTATGAAAACGCTTTGCAACTCCTGAC CGTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTGCCGTCCCTCGTTGA TCTTGAGCCTGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTTCGGTCAGCTCT TCCGTCCCGACAACCTTCGTTTTTCGGCCAGTCCGGTGC
MH582488	>seq17 [organism= <i>Aspergillus flavus</i>] <i>Aspergillus flavus</i> JK16 beta-tubulin (benA) gene, partial cds TATCTGCCACATGTTTGCTAACAACTTTGCAGGCAAACCATCTCTGGCGAGC ACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATACACCTCGAACGA ACGACGACCATATGGCATTAGAAGTTGGAATGGATCTGACGGCAAGGATAG TTACAATGGCTCCTCCGATCTCCAGCTGGAGCGTATGAACGTCTACTTCAAC GAGGTGCGTACCTCAAAATTTACAGCATCTATGAAAACGCTTTGCAACTCCTG ACCGCTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTGCCGTCCCTCGTT GATCTTGAGCCTGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTTCGGTCAGC TCTTCCGTCCCGACAACCTTCGTTTCGCCAGTCCGTGC
MH582489	>seq18 [organism= <i>Aspergillus flavus</i>] <i>Aspergillus flavus</i> JK17 beta-tubulin (benA) gene, partial cds

	TACTGCCACATGTTTGCTAACAACCTTTGCAGGCAAACCATCTCTGGCGAGCA CGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATACACCTCGAACGAA CGACGACCATATGGCATTAGAAGTTGGAATGGATCTGACGGCAAGGATAGT TACAATGGCTCCTCCGATCTCCAGCTGGAGCGTATGAACGTCTACTTCAACG AGGTGCGTACCTCAAAATTTAGCATCTATGAAAACGCTTTGCAACTCCTGA CCGCTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTGCCGTCCCTCGTTG ATCTTGAGCCTGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTTCGGTCAGCT CTTCCGTCCCGACAACCTTCGTTTTCGGCCAGTCCGGTGC
MH582490	>seq19 [organism= <i>Aspergillus flavus</i>] <i>Aspergillus flavus</i> JK18 beta-tubulin (benA) gene, partial cds TGTCCTGTTTATCTGCCACATGTTTGCTAACAACCTTTGCAGGCAAACCATCT CTGGCGAGCACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATACAC CTCGAACGAACGACGACCATATGGCATTAGAAGTTGGAATGGATCTGACGG CAAGGATAGTTACAATGGCTCCTCCGATCTCCAGCTGGAGCGTATGAACGTC TACTTCAACGAGGTGCGTACCTCAAAATTTAGCATCTATGAAAACGCTTTG CAACTCCTGACCGCTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTGCC GTCCTCGTTGATCTTGAGCCTGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCT CGTTCAGCTCTTCCGTCCCGACAACCTTCGTTTTCGGCCAGTCCGGTGC
MH582491	>seq20 [organism= <i>Aspergillus flavus</i>] <i>Aspergillus flavus</i> JK19 beta-tubulin (benA) gene, partial cds TGCCACATGTTTGCTAACAACCTTTGCAGGCAAACCATCTCTGGCGAGCACGG CCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATACACCTCGAACGAACGA CGACCATATGGCATTAGAAGTTGGAATGGATCTGACGGCAAGGATAGTTAC AATGGCTCCTCCGATCTCCAGCTGGAGCGTATGAACGTCTACTTCAACGAGG TGCGTACCTCAAAATTTAGCATCTATGAAAACGCTTTGCAACTCCTGACCG CTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTGCCGTCCCTCGTTGATC TTGAGCCTGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTTCGGTCAGCTCTTC CGTCCCGACAACCTTCGTTTCGCCAGTCCGTGC
MH582492	>seq21 [organism= <i>Aspergillus flavus</i>] <i>Aspergillus flavus</i> JK20 beta-tubulin (benA) gene, partial cds TATCTGCCACATGTTTGCTAACAACCTTTGCAGGCAAACCATCTCTGGCGAGC ACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATACACCTCGAACGA ACGACGACCATATGGCATTAGAAGTTGGAATGGATCTGACGGCAAGGATAG TTACAATGGCTCCTCCGATCTCCAGCTGGAGCGTATGAACGTCTACTTCAAC GAGGTGCGTACCTCAAAATTTAGCATCTATGAAAACGCTTTGCAACTCCTG ACCGCTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTGCCGTCCCTCGTT GATCTTGAGCCTGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTTCGGTCAGC TCTTCCGTCCCGACAACCTTCG
MH582493	>seq22 [organism= <i>Aspergillus flavus</i>] <i>Aspergillus flavus</i> JK21 beta-tubulin (benA) gene, partial cds GTGTCCTGTTATATCTGCCACATGTTTGCTAACAACCTTTGCAGGCAAACCATC TCTGGCGAGCACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATACA CCTCGAACGAACGACGACCATATGGCATTAGAAGTTGGAATGGATCTGACG GCAAGGATAGTTACAATGGCTCCTCCGATCTCCAGCTGGAGCGTATGAACGT CTACTTCAACGAGGTGCGTACCTCAAAATTTAGCATCTATGAAAACGCTTT GCAACTCCTGACCGCTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTGC CGTCCCTCGTTGATCTTGAGCCTGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCT TCGGTCAGCTCTTCCGTCCCGACAACCTTCGTTTTCGGCCAGTCCGGTGC
MH582494	>seq23 [organism= <i>Aspergillus flavus</i>] <i>Aspergillus flavus</i> JK22 beta-tubulin (benA) gene, partial cds CTGCCACATGTTTGCTAACAACCTTTGCAGGCAAACCATCTCTGGCGAGCACG GCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATACACCTCGAACGAACG ACGACCATATGGCATTAGAAGTTGGAATGGATCTGACGGCAAGGATAGTTA CAATGGCTCCTCCGATCTCCAGCTGGAGCGTATGAACGTCTACTTCAACGAG

	GTGCGTACCTCAAAATTTTCAGCATCTATGAAAACGCTTTTGCAACTCCTGACC GCTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTGCCGTCCTCGTTGAT CTTGAGCCTGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTTCGGTCAGCTCT CCGTCCCACAACCTTCGTTTTTCGGCCAGTCCGGTGC
MH582495	>seq24 [organism= <i>Aspergillus flavus</i>] <i>Aspergillus flavus</i> JK23 beta-tubulin (benA) gene, partial cds CCTGTTTTATCTGCCACATGTTTGCTAACAACTTTGCAGGCAAACCATCTCTG GCGAGCACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATACACCTC GAACGAACGACGACCATATGGCATTAGAAGTTGGAATGGATCTGACGGCAA GGATAGTTACAATGGCTCCTCCGATCTCCAGCTGGAGCGTATGAACGTCTAC TTCAACGAGGTGCGTACCTCAAAATTTTCAGCATCTATGAAAACGCTTTGCAA CTCCTGACCGCTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTGCCGTC CTCGTTGATCTTGAGCCTGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTTCG GTCAGCTCTTCGGTCCCACAACCTTCGTTTTTCGGCCAGTCCGGTGC
MH582496	>seq25 [organism= <i>Aspergillus flavus</i>] <i>Aspergillus flavus</i> JK24 beta-tubulin (benA) gene, partial cds TATCTGCCACATGTTTGCTAACAACTTTGCAGGCAAACCATCTCTGGCGAGC ACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATACACCTCGAACGA ACGACGACCATATGGCATTAGAAGTTGGAATGGATCTGACGGCAAGGATAG TTACAATGGCTCCTCCGATCTCCAGCTGGAGCGTATGAACGTCTACTTCAAC GAGGTGCGTACCTCAAAATTTTCAGCATCTATGAAAACGCTTTGCAACTCCTG ACCGCTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTGCCGTCCTCGTT GATCTTGAGCCTGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTTCGGTCAGC TCTCCGTCCCACAACCTTCGT
MH582497	>seq26 [organism= <i>Aspergillus flavus</i>] <i>Aspergillus flavus</i> JK25 beta-tubulin (benA) gene, partial cds TATCTGCCACATGTTTGCTAACAACTTTGCAGGCAAACCATCTCTGGCGAGC ACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATACACCTCGAACGA ACGACGACCATATGGCATTAGAAGTTGGAATGGATCTGACGGCAAGGATAG TTACAATGGCTCCTCCGATCTCCAGCTGGAGCGTATGAACGTCTACTTCAAC GAGGTGCGTACCTCAAAATTTTCAGCATCTATGAAAACGCTTTGCAACTCCTG ACCGCTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTGCCGTCCTCGTT GATCTTGAGCCTGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTTCGGTCAGC TCTCCGTCCCACAAGTTCG
MH582498	>seq27 [organism= <i>Aspergillus flavus</i>] <i>Aspergillus flavus</i> JK26 beta-tubulin (benA) gene, partial cds TATCTGCCACATGTTTGCTAACAACTTTGCAGGCAAACCATCTCTGGCGAGC ACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATACACCTCGAACGA ACGACGACCATATGGCATTAGAAGTTGGAATGGATCTGACGGCAAGGATAG TTACAATGGCTCCTCCGATCTCCAGCTGGAGCGTATGAACGTCTACTTCAAC GAGGTGCGTACCTCAAAATTTTCAGCATCTATGAAAACGCTTTGCAACTCCTG ACCGCTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTGCCGTCCTCGTT GATCTTGAGCCTGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTTCGGTCAGC TCTCCGTCCCACAAGTTCG
MH582499	>seq28 [organism= <i>Aspergillus flavus</i>] <i>Aspergillus flavus</i> JK27 beta-tubulin (benA) gene, partial cds TATCTGCCACATGTTTGCTAACAACTTTGCAGGCAAACCATCTCTGGCGAGC ACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATACACCTCGAACGA ACGACGACCATATGGCATTAGAAGTTGGAATGGATCTGACGGCAAGGATAG TTACAATGGCTCCTCCGATCTCCAGCTGGAGCGTATGAACGTCTACTTCAAC GAGGTGCGTACCTCAAAATTTTCAGCATCTATGAAAACGCTTTGCAACTCCTG ACCGCTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTGCCGTCCTCGTT GATCTTGAGC
MH582500	>seq29 [organism= <i>Aspergillus flavus</i>] <i>Aspergillus flavus</i> JK28 beta-tubulin (benA) gene,

	<p>partial cds TATCTGCCACATGTTTGCTAACAACTTTGCAGGCAAACCATCTCTGGCGAGC ACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATACACCTCGAACGA ACGACGACCATATGGCATTAGAAGTTGGAATGGATCTGACGGCAAGGATAG TTACAATGGCTCCTCCGATCTCCAGCTGGAGCGTATGAACGTCTACTTCAAC GAGGTGCGTACCTCAAATTTTCAGCATCTATGAAAACGCTTTGCAACTCCTG ACCGTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTGCCGTCCTCGTT GATCTTGAGCCTGGTTCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTTCGGTCAGC TCTCCGTCCCGACAAGTTCG</p>
MH582501	<p>>seq30 [organism=<i>Aspergillus flavus</i>] <i>Aspergillus flavus</i> JK29 beta-tubulin (benA) gene, partial cds TATCTGCCACATGTTTGCTAACAACTTTGCAGGCAAACCATCTCTGGCGAGC ACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATACACCTCGAACGA ACGACGACCATATGGCATTAGAAGTTGGAATGGATCTGACGGCAAGGATAG TTACAATGGCTCCTCCGATCTCCAGCTGGAGCGTATGAACGTCTACTTCAAC GAGGTGCGTACCTCAAATTTTCAGCATCTATGAAAACGCTTTGCAACTCCTG ACCGTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTGCCGTCCTCGTT GATCTTGAGCCTGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTTCGGTCAGC TCTCCGACCCGACAACCT</p>
MH582502	<p>>seq31 [organism=<i>Aspergillus flavus</i>] <i>Aspergillus flavus</i> JK30 beta-tubulin (benA) gene, partial cds AAGGATAGTTACAATGGCTCCTCCGATCTCCAGCTGGAGCGTATGAACGTCT ACTTCAACGAGGTGCGTACCTCAAATTTTCAGCATCTATGAAAACGCTTTGC AACTCCTGACCGTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTGCCG TCCTCGTTGATCTTGAGCCTGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTTC GGTCAGCTCTTCCGTCCCGACAACCTTCGTTTTCGGCCAGTCCGGTGC</p>
MH582503	<p>>seq32 [organism=<i>Aspergillus flavus</i>] <i>Aspergillus flavus</i> JK31 beta-tubulin (benA) gene, partial cds CCTGTTATACCTGCCACATGTTTGCTAACAACTTTGCAGGCAAACCATCTCTG GCGAGCACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATACACCTC GAACGAACGACGACCATATGGCATTAGAAGTTGGAATGGATCTGACGGCAA GGATAGTTACAATGGCTCCTCCGATCTCCAGCTGGAGCGTATGAACGTCTAC TTCAACGAGGTGCGTACCTCAAATTTTCAGCATCTATGAAAACGCTTTGCAA CTCCTGACCGTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTGCCGTC CTCGTTGATCTTGAGCCTGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTTCG GTCAGCTCTTCCGTCCCGACAACCTTCGTTTCGGCCAGTCCGGTGC</p>
MH582504	<p>>seq34 [organism=<i>Aspergillus flavus</i>] <i>Aspergillus flavus</i> JK33 beta-tubulin (benA) gene, partial cds TCTGCCACATGTTTGCTAACAACTTTGCAGGCAAACCATCTCTGGCGAGCAC GGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATACACCTCGAACGAAC GACGACCATATGGCATTAGAAGTTGGAATGGATCTGACGGCAAGGATAGTT ACAATGGCTCCTCCGATCTCCAGCTGGAGCGTATGAACGTCTACTTCAACGA GGTGCGTACCTCAAATTTTCAGCATCTATGAAAACGCTTTGCAACTCCTGAC CGTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTGCCGTCCTCGTTGA TCTTGAGCCTGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTTCGGTCAGCTCT TCCGTCCCGACAACCTTCGTTTTTCGGCCAGTCCGGTGC</p>
MH582505	<p>>seq35 [organism=<i>Aspergillus flavus</i>] <i>Aspergillus flavus</i> JK34 beta-tubulin (benA) gene, partial cds TGTGTCCTGTTTTATCTGCCACATGTTTGCTAACAACTTTGCAGGCAAACCAT CTCTGGCGAGCACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATAC ACCTCGAACGAACGACGACCATATGGCATTAGAAGTTGGAATGGATCTGAC GGCAAGGATAGTTACAATGGCTCCTCCGATCTCCAGCTGGAGCGTATGAACG TCTACTTCAACGAGGTGCGTACCTCAAATTTTCAGCATCTATGAAAACGCTT TGCAACTCCTGACCGTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTG</p>

	CCGTCCTCGTTGATCTTGAGCCTGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCC CTTCGGTCAGCTTCTTCCGTCCCGACAACCTTCGTGTCCGGCCAGTCGCGGTGC
MH582506	>seq36 [organism= <i>Aspergillus flavus</i>] <i>Aspergillus flavus</i> JK35 beta-tubulin (benA) gene, partial cds TATCTGCCACATGTTTGCTAACAACCTTTGCAGGCAAACCATCTCTGGCGAGC ACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATACACCTCGAACGA ACGACGACCATATGGCATTAGAAGTTGGAATGGATCTGACGGCAAGGATAG TTACAATGGCTCCTCCGATCTCCAGCTGGAGCGTATGAACGTCTACTTCAAC GAGGTGCGTACCTCAAAATTTTCAGCATCTATGAAAACGCTTTGCAACTCCTG ACCGTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTGCCGTCCCTCGTT GATCTTGAGCCTGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTTCGGTCAGC TCTTCCGTCCCGACAACCTTCGTGTCCGGCCAGTCCGTGC
MH582507	>seq37 [organism= <i>Aspergillus flavus</i>] <i>Aspergillus flavus</i> JK36 beta-tubulin (benA) gene, partial cds TATCTGCCACATGTTTGCTAACAACCTTTGCAGGCAAACCATCTCTGGCGAGC ACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATACACCTCGAACGA ACGACGACCATATGGCATTAGAAGTTGGAATGGATCTGACGGCAAGGATAG TTACAATGGCTCCTCCGATCTCCAGCTGGAGCGTATGAACGTCTACTTCAAC GAGGTGCGTACCTCAAAATTTTCAGCATCTATGAAAACGCTTTGCAACTCCTG ACCGTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTGCCGTCCCTCGTT GATCTTGAGCCTGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTTCGGTCAGC TCTTCCGTCCCGACAACCTTCGTTTCGGCCAGTCCGTGC
MH582508	>seq38 [organism= <i>Aspergillus flavus</i>] <i>Aspergillus flavus</i> JK37 beta-tubulin (benA) gene, partial cds GTGTCCTGTTATATCTGCCACATGTTTGCTAACAACCTTTGCAGGCAAACCATC TCTGGCGAGCACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATACA CCTCGAACGAACGACGACCATATGGCATTAGAAGTTGGAATGGATCTGACG GCAAGGATAGTTACAATGGCTCCTCCGATCTCCAGCTGGAGCGTATGAACGT CTACTTCAACGAGGTGCGTACCTCAAAATTTTCAGCATCTATGAAAACGCTTT GCAACTCCTGACCGCTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTGC CGTCCTCGTTGATCTTGAGCCTGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCT TCGGTCAGCTCTTCCGTCCCGACAACCTTCGTTT
MH582509	>seq39 [organism= <i>Aspergillus flavus</i>] <i>Aspergillus flavus</i> JK38 beta-tubulin (benA) gene, partial cds TGTGTCCTGTTATATCTGCCACATGTTTGCTAACAACCTTTGCAGGCAAACCAT CTCTGGCGAGCACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATAC ACCTCGAACGAACGACGACCATATGGCATTAGAAGTTGGAATGGATCTGAC GGCAAGGATAGTTACAATGGCTCCTCCGATCTCCAGCTGGAGCGTATGAACG TCTACTTCAACGAGGTGCGTACCTCAAAATTTTCAGCATCTATGAAAACGCTT TGCAACTCCTGACCGCTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTG CCGTCCCTCGTTGATCTTGAGCCTGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCC CTTCGGTCAGCTCTTCCGTCCCGACAACCTTCGTTTCGGCCAGTCCGTGC
MH582510	>seq40 [organism= <i>Aspergillus flavus</i>] <i>Aspergillus flavus</i> JK39 beta-tubulin (benA) gene, partial cd TATCTGCCACATGTTTGCTAACAACCTTTGCAGGCAAACCATCTCTGGCGAGC ACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATACACCTCGAACGA ACGACGACCATATGGCATTAGAAGTTGGAATGGATCTGACGGCAAGGATAG TTACAATGGCTCCTCCGATCTCCAGCTGGAGCGTATGAACGTCTACTTCAAC GAGGTGCGTACCTCAAAATTTTCAGCATCTATGAAAACGCTTTGCAACTCCTG ACCGTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTGCCGTCCCTCGTT GATCTTGAGCCTGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTTCGGTCAGC TCTTCCGTCCCGACAACCTTCGTTTCGGCCAGTCCGTGC

Univerzitet u Novom Sadu
Tehnološki fakultet
Ključna dokumentacijska informacija

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Jelena Krulj
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	dr Siniša Markov, redovni profesor
Naslov rada: NR	Potencijal biosinteze aflatoksina B ₁ u različitim vrstama <i>Triticum</i> spp.
Jezik publikacije: JP	Srpski, latinica
Jezik izvoda: JI	srp. / eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2018.
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad, Srbija
Fizički opis rada: FO	poglavlja: 7 / stranica: 133 / slika: 32 / tabela: 24 / referenci: 371 / priloga: 1
Naučna oblast: NO	Biotehnologija
Naučna disciplina: ND	
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	<i>Aspergillus flavus</i> , aflatoksin B ₁ , <i>Triticum</i> spp.
UDK	

Čuva se: ČU	U biblioteci Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, Bul. cara Lazara 1, 21000 Novi Sad
Važna napomena: VN	Nema
<p>Izvod: IZ</p> <p>Prisustvo plesni i mikotoksina u hrani predstavlja višestruku opasnost, kako sa aspekta bezbednosti hrane, tako i sa aspekta globalne trgovine. Učestalost i intenzitet pojave plesni na uzorcima zrna hlebne pšenice i spelte prikupljenih u regionu Vojvodine određeni su nakon žetve tokom trogodišnjeg perioda (2015-2017). Istraživanja su obuhvatila identifikaciju i karakterizaciju 38 izolata <i>A. flavus</i> primenom polifaznog pristupa koji uključuje klasične mikrobiološke i molekularne metode. Ispitivanjem potencijala biosinteze AFB₁ izolata <i>A. flavus</i> utvrđeno je da su dva izolata poreklom sa zrna hlebne pšenice pokazala aflatoksigeni potencijal. Veštačka inokulacija različitih <i>Triticum</i> vrsta: hlebne pšenice, spelte, korasan i hibrida pšenice toksigenim izolatama izvršena je u fazi cvetanja u cilju poređenja otpornosti ovih vrsta na pojavu <i>A. flavus</i> i produkciju AFB₁. Visok nivo AFB₁ (256 µg/kg) je kvantifikovan samo u zrnu spelte, dok kod drugih <i>Triticum</i> vrstama, zrno nije bilo kontaminirano AFB₁ (<LOD). Određivanjem fizičko-hemijskih karakteristika plevičastih omotača <i>Triticum</i> vrsta potvrđen je njihov potencijalni uticaj na rast i razvoj <i>A. flavus</i> i biosintezu AFB₁. Efekti različitih temperatura (15, 23, 30 i 37 °C) i aktivnosti vode (0,85; 0,90; 0,95 i 0,99) na biosintezu AFB₁ ispitani su na veštački inokulisanim uzorcima spelte sa plevičastim omotačima kao i prethodno oljuštenim zrnima. Optimalni uslovi za biosintezu tj. uslovi pri kojima je ostvaren najveći prinos AFB₁ bili su temperatura 30 °C i a_w 0,99 u svim tipovima uzoraka (zrna spelte inkubirana bez plevičastih omotača - ZBPO, plevičasti omotači - PO i zrna nakon ljuštenja tj. oljuštena zrna - OZ). Rezultati su pokazali da je prisustvo plevičastih omotača bilo zaštitna barijera za razvoj infekcije i akumulaciju AFB₁ u zrnu. Matematički modeli, razvijeni primenom faktora sa visokom značajnošću kao što su temperatura skladištenja i aktivnost vode, mogu biti korišćeni u predviđanju akumulacije AFB₁ u zrnu spelte što predstavlja ključni korak u proceni rizika. Ispitivanjem uticaja različitih nivoa kontaminacije spelte AFB₁ u poređenju sa kontrolnim nekontaminiranim uzorkom ukazano je na smanjenje određenih parametara tehnološkog kvaliteta i potencijalne gubitke pecivnih svojstava speltinog brašna pri sadržaju AFB₁ od 50 µg/kg i 250 µg/kg.</p>	
Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP	14.09.2017.
Datum odbrane: DO	

Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO	<ol style="list-style-type: none">1. Dr Gordana Dimić, redovni profesor, Tehnološki fakultet, Novi Sad, predsednik2. Dr Siniša Markov, redovni profesor, Tehnološki fakultet, Novi Sad, mentor3. Dr Dragoljub Cvetković, vanredni profesor, Tehnološki fakultet, Novi Sad, član4. Dr Marija Bodroža Solarov, naučni savetnik, Naučni institut za prehrambene tehnologije u Novom Sadu, član5. Dr Aleksandra Bočarov Stančić, naučni savetnik, Institut za primenu nauke u poljoprivredi, Beograd, član
--	--

University of Novi Sad
Faculty of Technology
Key word documentation

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD Thesis
Author: AU	Jelena Krulj
Mentor: MN	Siniša Markov, PhD, full professor, Faculty of Technology, Novi Sad
Title: TI	Potential biosynthesis of aflatoxin B ₁ in different species of <i>Triticum</i> spp.
Language of text: LT	Serbian, latin
Language of abstract: LA	eng. / srp.
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2018.
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	Serbia, 21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1
Physical description: PD	chapters: 7 / pages: 133 / figures: 32 / tables: 24 / references: 371 / annex: 1
Scientific field SF	Biotechnology
Scientific discipline SD	
Subject, Key words SKW	<i>Aspergillus flavus</i> , aflatoxin B ₁ , <i>Triticum</i> spp.
UC	
Holding data: HD	Library of Faculty of Technology, Novi Sad

Note: N	/
Abstract: AB	<p>The presence of fungi and mycotoxins in food presents a multiple risk, both from the aspect of food safety and from the aspect of global trade. The frequency and incidence of mycobiota on common wheat and spelt grains samples collected in the region of Vojvodina were determined after harvest during the three-year period (2015-2017). The research covered the identification and characterization of 38 <i>A. flavus</i> isolates using a polyphase approach including classical microbiological and molecular methods. Testing the <i>A. flavus</i> isolates for AFB₁ biosynthesis, it was found that two isolates originating from wheat grains possess the aflatoxigenic potential. Artificial inoculation of different <i>Triticum</i> species: common wheat, spelt, khorasan and hybrid wheat with toxigenic isolates was carried out in the flowering stage in order to compare the resistance of these species to the occurrence of <i>A. flavus</i> and the production of AFB₁. The highest AFB₁ level (256 µg/kg) was determined only in the dehulled spelt grains, in comparison to other species where AFB₁ was not detected in dehulled grains. In order to investigate the impact of wheat hulls on development of <i>A. flavus</i>, including the biosynthesis of toxic fungal metabolites, physico-chemical and structural properties of different <i>Triticum</i> spp. hulls were characterized. The effects of different temperatures (15, 23, 30 and 37 ° C) and water activity (0.85; 0.90; 0.95 and 0.99) on AFB₁ biosynthesis were examined on artificially inoculated hull-less as well as hulled spelt grains. The optimal conditions for AFB₁ biosynthesis (the conditions in which the highest AFB₁ yield was achieved) were temperature 30 °C and 0.99 a_w in the all tested spelt samples (hull-less grain, dehulled grains and hulls). Accumulation of AFB₁ was significantly higher in hull-less than in dehulled grains that implicate the protective effect of spelt hulls. Mathematical models, developed using high-significance factors such as storage temperature and water activity, can be used to predict the accumulation of AFB₁ in spelt grains, which is a key step in risk assessment. By examining the influence of different levels contamination levels of spelt grain with AFB₁ and comparing to the control (uncontaminated) sample, the reduction in certain technological quality parameters and the potential loss of dough properties of spelt flour with AFB₁ content of 50 µg/kg and 250 µg/kg was pointed out.</p>
Accepted on Senate on: AS	14.09.2017.
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	<ol style="list-style-type: none"> 1. Gordana Dimić, PhD, full professor, Faculty of Technology, Novi Sad, president 2. Siniša Markov, PhD, full professor, Faculty of Technology, Novi Sad, mentor 3. Dragoljub Cvetković, PhD, associate professor, Faculty of Technology, Novi Sad, member 4. Marija Bodroža Solarov, PhD, principal research fellow, Institute of Food Technology, Novi Sad, member 5. Aleksandra Bočarov Stančić, PhD, principal research fellow, Institute for Science Application in Agriculture, Belgrade, member