

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Urša PEČAN

**UGOTAVLJANJE OKUŽENOSTI ZRNJA
RAZLIČNIH VRST ŽIT IZ PREKMURJA Z GLIVAMI
IZ RODOV *Fusarium* IN *Alternaria* TER
ONESNAŽENOST Z MIKOTOKSINI**

DIPLOMSKO DELO

Visokošolski strokovni študij – 1. stopnja

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Urša PEČAN

**UGOTAVLJANJE OKUŽENOSTI ZRNJA RAZLIČNIH VRST ŽIT IZ
PREKMURJA Z GLIVAMI IZ RODOV *Fusarium* IN *Alternaria* TER
ONESNAŽENOST Z MIKOTOKSINI**

DIPLOMSKO DELO
Visokošolski strokovni študij – 1. Stopnja

**DETERMINATING GRAIN INFECTIONS OF DIFFERENT
CEREALS FROM PRKMURJE WITH FUNGI OF GENUS *Fusarium*
AND *Alternaria* AND THEIR CONTAMINATION WITH
MYCOTOXINS**

B. SC. THESIS
Professional Study Programmes

Ljubljana, 2015

Diplomsko delo je zaključek Visokošolskega strokovnega študija Kmetijstvo - agronomija in hortikultura - 1. stopnja. Delo je bilo opravljeno na Katedri za fitomedicino, kmetijsko tehniko, poljedelstvo, pašništvo in travništvo Oddelka za agronomijo Biotehniške fakultete.

Študijska komisija Oddelka za agronomijo je za mentorico diplomskega dela imenovala doc. dr. Katarino KOS.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Zlata LUTHAR

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: doc. dr. Katarina KOS

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: doc. dr. Irena MAČEK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Urša PEČAN

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dv1
DK	UDK 633.1:632.4:582.282:615.372 (043.2)
KG	Mikotoksini / <i>Fusarium</i> / <i>Alternaria</i> / Zrnje/ žita / Okuženost/ Glive
AV	PEČAN, Urša
SA	KOS, Katarina (mentorica)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
LI	2015
IN	UGOTAVLJANJE OKUŽENOSTI ZRNJA RAZLIČNIH VRST ŽIT IZ PREKMURJA Z GLIVAMI IZ RODOV <i>Fusarium</i> IN <i>Alternaria</i> TER ONESNAŽENOST Z MIKOTOKSINI
TD	Diplomsko delo (Visokošolski stokovni študij – 1. stopnja)
OP	VII, 25, [2] str., 5 pregl., 10 sl., 1 pril., 32 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Mikotoksini, sekundarni metaboliti nitastih gliv, predstavljajo zdravstvena tveganja za živali in ljudi. Glive iz rodov <i>Fusarium</i> in <i>Alternaria</i> so pogosto prisotne na žitih namenjenih za živalsko krmo. Mikotoksini rodu <i>Fusarium</i> so splošno bolj znani, raziskani in tržno regulirani, vendar so tudi alternarijski mikotoksini pogosto prisotni v poljščinah in so zdravju močno škodljivi. Preučevali smo prisotnost omenjenih gliv na vzorcih žit (pšenica, tritikala, ječmen, oves, pira, rž in koruza). Vsi vzorci so bili pridobljeni v letu 2014, iz različnih lokacij v Prekmurju, pridelani na ekološki oziroma integrirani način pridelave. Rezultate smo predstavili grafično in tabelarično, uporabili smo opisno statistiko brez podrobnih statističnih analiz. Zaznali smo nekoliko večjo okuženost vseh vrst žit v primeru ekološke pridelave. Najbolj okužena vrsta žita je bila koruza, najmanj tritikala. Pri vzorcih koruze je prevladovala okuženost z glivami iz rodu <i>Fusarium</i> , s prevladujočo vrsto <i>F. graminearum</i> . Prevladujoča vrsta rodu <i>Fusarium</i> v primeru strnih žit, je bila <i>F. poae</i> . V vzorcih strnih žit je prevladovala okuženost z glivami iz rodu <i>Alternaria</i> , najbolj okužena sta bila oba vzorca ovsa in en vzorec rži. V primeru koruznih hibridov, so bile te okužbe zanemarljive. Mikotoksini, pripadajoči glivam iz rodu <i>Fusarium</i> so bili v visokih koncentracijah najdeni v vzorcih koruze, alternarijski mikotoksini pa v obeh vzorcih pira in rži ter v dveh vzorcih koruze.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dv1

DC UDK 633.1:632.4:582.282:615.372 (043.2)

CX Mycotoxins / *Fusarium* / *Alternaria* / Cereals/ grain / Infections/ Fungi

AU PEČAN, Urša

AA KOS, Katarina (supervisor)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Department of Agriculture

PY 2015

TI DETERMINATING GRAIN INFECTIONS OF DIFFERENT CEREALS FROM PRKMURJE WITH FUNGI OF GENUS *Fusarium* AND *Alternaria* AND THEIR CONTAMINATION WITH MYCOTOXINS

DT B. sc. thesis (Professional Study Programmes)

NO VII, 25, [2] p., 5 tab., 10 fig., 1 ann., 32 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Mycotoxins are secondary metabolites of filamentous fungi and represent a health risk to animals and humans. Fungi of genera *Fusarium* and *Alternaria* are often present in cereals intended for animal feed. While *Fusarium* mycotoxins are generally better known, studied and regulated in commercial markets, *Alternaria* mycotoxins are also often present in crops and are severely hazardous to health. We have investigated the presence of these fungi in the samples of various cereals (wheat, triticale, barley, oats, spelt, rye and maize). All the samples were derived from different locations in Prekmurje in the year of 2014, produced by organic or integrated production methods. Using only descriptive statistics (without detailed statistical analysis), we presented results graphically and in a tabular form. Results showed slightly higher contamination of cereals in the case of organic production. The species showing the highest contamination rate of the grains is maize, the least contaminated was triticale. Maize samples were mostly contaminated with *Fusarium* spp., the prevailing species being *F. graminearum*. The predominant species of *Fusarium* in the case of small grain cereals is *F. poae*. Infections caused by fungi of the genus *Alternaria* prevailed in samples of small grain cereals; the most infected are both samples of oats. In the case of maize hybrids these kinds of infections proved insignificant. Higher concentrations of *Fusarium* mycotoxins were found in maize samples and *Alternaria* mycotoxins were detected in both samples of spelt, rye and in two samples of maize.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
KAZALO SLIK.....	VII
KAZALO PRILOG	VII
1 UVOD	1
1.1 POVOD ZA RAZISKAVO.....	1
1.2 DELOVNA HIPOTEZA	1
1.3 NAMEN RAZISKAVE.....	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 MIKOTOKSINI	2
2.2 ROD <i>Fusarium</i>	3
2.2.1 Klasifikacija	3
2.2.2 Potek okužbe	3
2.2.3 Fuzarijski mikotoksini	4
2.2.3.1 Trihoteceni.....	4
2.2.3.2 Fumonizini.....	4
2.2.3.2 Zearalenon	5
2.3 ROD <i>Alternaria</i>	6
2.3.1 Klasifikacija	6
2.3.2 Potek okužbe	6
2.3.3 Alternarijski mikotoksini.....	7
2.3.3.1 Alternariol in alternariol metil eter.....	7
2.3.3.2 Alvertoksini.....	7
2.3.3.3 Tenuazojska kislina	7
2.4 UKREPI ZA PREPREČEVANJE OKUŽENOSTI.....	8
2.4.1 Dobra agronomska praksa	8
2.4.2 Omejevanje napada škodljivcev.....	8
2.4.3 Žetev, sušenje in skladiščenje	8

2.4.4 Biotično varstvo	8
2.4.5 Žlahtnjenje na odpornost	9
3 MATERIALI IN METODE	10
3.1 RASTLINSKI MATERIAL	10
3.2 METODE DELA	11
3.2.1 Priprava gojišča	11
3.2.2 Priprava zrn	11
3.2.3 Inokulacija, gojenje, določanje vrste in odčitavanje	11
3.2.4 Določanje vsebnosti mikotoksinov	12
4 REZULTATI	13
4.1 NAČIN PRIDELAVE	13
4.1.1 Vsebnost mikotoksinov	14
4.2 VRSTE ŽIT	14
4.3 RODOVNA ZASTOPANOST.....	15
4.3.1 <i>Fusarium</i> spp.	17
4.3.1.1 Vsebnost mikotoksinov	18
4.4.1 <i>Alternaria</i> spp.	19
4.4.1.1 Vsebnost mikotoksinov	19
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	20
6 POVZETEK	22
7 VIRI	23
ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Obravnavane vrste mikotoksigenih gliv rodu <i>Fusarium</i> , prisotne v strnih žitih in koruzi, s pripadajočimi mikotoksini (Logrieco in sod., 2002).....	5
Preglednica 2: Podatki o obravnavanih vzorcih strnih žit in koruze	10
Preglednica 3: Okuženost obravnavanih vzorcev žit glede na način pridelave.....	13
Preglednica 4: Vsebnost mikotoksinov v obravnavanih vzorcih glede na način pridelave (izraženo v mg/kg).....	14
Preglednica 5: Okuženost obravnavanih vzorcev žit z glivami iz rodov <i>Fusarium</i> in <i>Alternaria</i>	16

KAZALO SLIK

Slika 1: Zapakirani vzorci žit (A) in petrijevke z nacepljenimi zrnji v brezprašni komori (B) (foto: Urša Pečan).....	11
Slika 2: Petrijevka s petimi različnimi kulturami (A), <i>F. graminearum</i> , slikan pod lupo (B) in skupina <i>Alternaria</i> »črna« slikana pod lupo (C) (foto: Urša Pečan).....	12
Slika 3: Homogenizirani vzorci žit (A) in naprava LC-MS/MS (B) (foto: Urša Pečan).....	12
Slika 4: Skupna okuženost vzorcev z glivami iz rodov <i>Fusarium</i> in <i>Alternaria</i> glede na način pridelave.....	13
Slika 5: Skupna okuženost vzorcev z glivami iz rodov <i>Fusarium</i> in <i>Alternaria</i> glede na vrsto žita.....	14
Slika 6: Odstotek okuženosti vzorcev strnih žit in koruze z glivami iz rodov <i>Fusarium</i> in <i>Alternaria</i>	15
Slika 7: Skupna vrstna sestava gliv iz rodu <i>Fusarium</i> v vseh vzorcih	17
Slika 8: Vrstna sestava gliv iz rodu <i>Fusarium</i> v vzorcih strnih žit	17
Slika 9: Vrstna sestava gliv iz rodu <i>Fusarium</i> v vzorcih koruze.....	18
Slika 10: Skupinska sestava gliv iz rodu <i>Alternaria</i> v vseh vzorcih žit	19

KAZALO PRILOG

PRILOGA A: Vsebnost mikotoksinov v vzorcih žit izraženi v mg/kg

1 UVOD

Zrnje žit in z njim povezani stranski proizvodi predstavljajo pomemben vir energije in proteinov za vse vrste rejenih živali. Kadar se na zrnje žit in živalsko krmo naselijo plesni, pride do povečanega tveganja za okuženost s sekundarnimi metaboliti, ki jih le-te proizvajajo. Številni sekundarni metaboliti imajo toksične učinke na ljudi in živali, skupno se imenujejo mikotoksini. Pomembni proizvajalci mikotoksinov so vrste rastlinskih patogenov iz rodov *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* in *Alternaria* (Placinta in sod., 1999). Glive iz rodov *Fusarium* in *Alternaria*, so pogosto prisotni poljski paraziti, ki okužujejo zrnje. Nekatere vrste gliv iz omenjenih rodov so rastlinski patogeni, druge so saprofiti, ki so pogosto najdeni na površju semen, v tleh in na mrtvih rastlinskih ostankih. Na žitih prisotne glive iz rodu *Alternaria* tvorijo strupene metabolite (altenuen, alternarioli, alvertoksini in tenuazojska kislina). Glive iz rodu *Fusarium* spp. tvorijo trihotecene A in B ter strupene ne-trihotecenske komponente. Na prisotnost in razširjenost določene bolezni močno vplivajo vremenski dejavniki, kot sta temperatura in zračna vlaga (Kosiak in sod., 2004).

1.1 POVOD ZA RAZISKAVO

V krmnih žitih pogosto ugotovimo večje vsebnosti mikotoksinov. Prekmurje je pretežno živinorejsko usmerjeno območje, kjer se krmna žita vrstijo na istih njivah več let zapored, kar omogoči glivam nemoteno ohranjanje v posevkih. Okužbe se pojavljajo v obdobju rasti, na polju in med skladiščenjem. Glive iz rodov *Fusarium* in *Alternaria* so stalne spremljevalke krmnih žit, ki lahko tvorijo pomembne mikotoksine.

1.2 DELOVNA HIPOTEZA

Domnevamo, da bo okuženost krmnih žit z glivami iz rodov *Fusarium* in *Alternaria* ter posledična prisotnost mikotoksinov, v ekološko pridelanih žitih kvantitativno večja kot pri žitih iz integrirane pridelave. Domnevamo tudi, da bo okuženost z glivami omenjenih rodov ter vrstna pestrost gliv iz rodu *Fusarium* ter onesnaženost z mikotoksini različna glede na vrsto krmnih žit.

1.3 NAMEN RAZISKAVE

Namen raziskave je ugotavljanje vrstne zastopanosti gliv iz rodu *Fusarium* in *Alternaria* vzorcih krmnih žit (pšenica, pira, tritikala, ječmen, oves, rž in koruza) iz Prekmurja, med katerimi je nekaj vzorcev (pšenica, pira, ječmen in oves) tudi iz ekološke pridelave. Vsi vzorci so bili pobrani v letu 2014. V sodelovanju z Veterinarsko fakulteto v Ljubljani smo pridobili tudi podatke o vsebnosti določenih mikotoksinov v teh vzorcih. Na podlagi pridobljenih podatkov bomo skušali ugotoviti morebitno povezavo med okuženostjo zrnja in vsebnostjo mikotoksinov.

2 PREGLED OBJAV

2.1 MIKOTOKSINI

Mikotoksini so sekundarni metaboliti nitastih gliv - plesni, ki delujejo škodljivo na ljudi in živali (Hussein in Brasel, 2001). Trenutno je poznanih več kot tristo mikotoksinov (Zain, 2011). Ti nizkomolekularni sekundarni metaboliti biokemijsko niso potrebni za normalno rast in razvoj glive. Znano je, da niso vse plesni toksigene in da niso vsi sekundarni metaboliti plesni strupeni (Hussein in Brasel, 2001). Mikotoksini so že v nizkih koncentracijah strupeni za vretenčarje in druge skupine živali. Drugi nizkomolekularni metaboliti gliv (npr. etanol), ki so strupeni v višjih koncentracijah, niso obravnavani kot mikotoksini (Bennett, 1987, cit. po Zain, 2011).

Primeri mikotoksinov, ki imajo največji zdravstveni in kmetijsko ekonomski pomen vključujejo aflatoksine, ohratoksine, trihotecene, zearalenon, fumonizine, termogene toksine in ergot alkaloidne. Posamezna vrsta glive lahko tvori enega ali več mikotoksinov in posamezen mikotoksin je lahko produkt več vrst gliv. Dejavniki ki prispevajo k prisotnosti mikotoksinov v hrani ali krmi vključujejo shranjevanje, okoljske in ekološke razmere, ki so običajno izven človeškega nadzora. V splošnem so mikotoksini lipofilni, zato se nalagajo v maščobnih delih rastlin in živali (Hussein in Brasel, 2001).

Do zastrupitve ljudi z mikotoksini lahko pride preko zauživanja okužene rastlinske hrane, zauživanja živil živalskega izvora, kjer so živali zauživale okuženo krmo ter izpostavljenosti zraku in prahu, ki vsebuje mikotoksine. Mikotoksini, kot tudi vse druge strupene učinkovine povzročajo akutna in kronična bolezenska stanja. Pri akutni toksičnosti gre za takojšen in očiten odziv na strupeno snov. Pri kronični toksičnosti, gre za izpostavljenost nizkim koncentracijam strupenih snovi tekom daljšega časovnega obdobja, česar posledica je običajno pojav rakavih obolenj in drugih običajno nepovratnih bolezenskih stanj (Zain, 2011).

2.2 ROD *Fusarium*

Glive iz rodu *Fusarium* so razširjeni rastlinski patogeni strnih žit (navadna in trda pšenica, ječmen, oves, rž in tritikala) (Bottalico in Perrone, 2002). Glive povzročajo različne bolezni, kot so žitne fuzarioze sadik, korenin, klasov in koruzne fuzarioze. Vrste *Fusarium graminearum* Schwabe (teleomorf *Gibberella zeae*), *F. culmorum* Sacc., *F. poae* Wollenw. in *F. avenaceum* Sacc. (teleomorf *G. avenacea*), so pogosto prisotni patogeni pšenice in ječmena. Vrste, pogosto prisotne na koruzi so *F. graminearum*, *F. moniliforme* Sheld. (*F. verticillioides* Sacc.) in *F. subglutinans* (Wollenw. in Reinking) P.E. Nelson, Toussoun in Marasas. Poleg teh lahko koruzo napadajo še *F. culmorum*, *F. proliferatum* Nirenberg ter *F. equiseti* Sacc. (Doohan in sod., 2003). Glive so prisotne na vseh večjih evropskih območjih, kjer se prideluje žito. Zaradi bolezni, ki jih povzročajo, so pridelki zmanjšani povprečno od 10-40 %. Opisane glive tvorijo mikotoksine v obdobju pred žetvijo ali po njej. Mikotoksini v pšenici in ječmenu, ki predstavljata 2/3 svetovne pridelave strnih žit in okoli 80 % vseh pridelanih strnih žit v Evropi, predstavljajo velik problem zaradi povečanega obsega okužb in kontaminacij živil (Bottalico in Perrone, 2002).

2.2.1 Klasifikacija

Klasifikacijo povzemamo po (Index Fungorum, 2015).

Kraljestvo: Fungi

Deblo: Ascomycota

Razred: Sordariomycetes

Red: Hypocreales

Družina: Nectriaceae

Rod: *Fusarium*

H. F. Link je leta 1809 poimenoval rod *Fusarium*, ki je znan po raznolikem naboru vrst. Njegovi predstavniki so znani kot zelo škodljivi rastlinski patogeni, ki tvorijo tudi različne mikotoksine. Glive iz rodu *Fusarium* proizvajajo dolge, večcelične makrokonidije, ki po obliki spominjajo na kanu ali banano. Te veliki nespolni konidiji so morfološko prepoznaven znak rodu (Glenn, 2007).

2.2.2 Potek okužbe

Glive iz rodu *Fusarium* na polju prezimijo kot saprofitski micelij v okuženih rastlinskih ostankih. Setev žit v tla, onesnažena z glivami se kaže v kasnejši okužbi rastlin. Posledice primarne okužbe so fuzarioze korenin in sadik. Kasneje v rastni dobi se inokulum prenaša preko zraka, običajno v obliki askospor ali konidijev, kar povzroča okužbe klasov (Parry in sod., 1995). Rastline so na okužbo najobčutljivejše med cvetenjem. Ob okužbi gliva ne prodira direktno skozi epidermis, temveč se hife razvijajo na površju klaska in se razraščajo proti listnim režam in drugim občutljivim delom socvetja (Goswami in Kistler,

2004). Fuzarioze klasa se pri pšenici pojavljajo ob cvetenju in v mlečni zrelosti. Prizadeti deli klasa začnejo odmirati ali pa se začnejo obarvati slamnato rumeno. Na klasnem vretenu se v vlažnih razmerah začne oblikovati oranžen sloj, ki predstavlja reproduktivne organe parazita (Aleksić in sod., 1983). Pri koruzi postajajo okuženi deli stebela mehki, običajno se steblo začne lomiti tik nad kolencem. Površina stebela postane sivkasta, ob zadostni količini vlage pa dobijo stebela svetlo rožnato prevleko (Almaši in sod., 2002). Ob setvi okuženega zrnja, ki je rezultat okužbe klasa, se razvijajo sistemično okužene rastline, s čemer je življenjski krog glive sklenjen (Parry in sod., 1995). Opaženo je bilo, da ob menjavi poljščin koruza – pšenica, ostaja na polju veliko rastlinskih ostankov na katerih se lahko razvija primarni vir fuzarijskega inokuluma (Seaman, 1982, cit. po Parry in sod., 1995).

2.2.3 Fuzarijski mikotoksini

Rod *Fusarium* tvori veliko strupenih sekundarnih metabolitov. S stališča zdravja in produktivnosti živali so najpomembnejši trihoteceni, fumonizini, zearalenon in moniliformin (D'Mello in Macdonald, 1997).

2.2.3.1 Trihoteceni

Prvi poznan mikotoksin iz skupine trihotecenov je bil trihotecin, izoliran iz glive *Trichothecium roseum* (Pers.) Link leta 1949. Fuzarijski trihoteceni so bili prepoznani kasneje (Glenn, 2007). Trihotecene večinoma proizvajajo različne vrste gliv iz rodu *Fusarium*, kot so *F. sporotrichioides*, *F. graminearum*, *F. poae*, in *F. culmorum* (Hussein in Brasel, 2001). Trihoteceni so družina podobnih cikličnih seskviterpenoidov razdeljenih v štiri skupine (od tipa A do tipa D). Tip A in B sta najpogostejša. Med trihotecene tipa A uvrščamo HT-2 toksin, T-2 toksin, neosolaniol in diacetoksiscirpenol (DAS). T-2 je močan inhibitor sinteze proteinov in delovanja mitohondrijev, deluje imunosupresivno in citotoksično. V skupino B sodijo deoksinivalenol (DON), nivalenol in fuzarenon-X. Najpogostejši predstavnik trihotecenov tipa B je deoksinivalenol (DON). Čeprav DON ni tako toksičen kot T-2 in HT-2, je eden izmed najpogostejših mikotoksinov v žitih (D'Mello in Macdonald, 1997; Cano-Sancho in sod., 2011).

2.2.3.2 Fumonizini

To družino mikotoksinov so prvič izolirali iz glivne kulture vrste *Fusarium verticillioides* (Glenn, 2007). Fumonizini (B₁ in B₂) so kancerogeni metaboliti *F. proliferatum* in *F. verticillioides*. Sestavljeni so iz dolgo verižne ogljikovodikove enote, ki igra vlogo pri toksičnosti. Fumonizini so citotoksični in kancerogeni za živali. FB₁ je najbolj toksičen in je dokazano rakotvoren pri podganah, povzroča pljučni edem pri prašičih in leukoencefalomalacijo pri konjih (Hussein in Brasel, 2001).

2.2.3.2 Zearalenon

Zearalenon je funkcionalno in strukturno edinstven mikotoksin, ki je bil prvič izoliran iz glive *Gibberella. zea* (anamorf *F. graminearum*). Zearalenon (ZEN) je fitoestrogena snov. Primarno ga proizvajajo nekatere glive iz rodu *Fusarium*, kot so *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. sporotrichioides* in *F. crookwellense* L.W. Burgess, P.E. Nelson in Toussoun. Je nesteroidna spojina, ki povzroča izdatnemu estrogenu podobne učinke na nekaterih rejenih živalih kot so govedo, ovce in prašiči. Posledice tega so časovna odstopanja od pričakovanega začetka pubertete in motnje v menstrualnem ciklu. Pri brejih živalih lahko prisotnost zearalenona povzroči splav, mrtvorrojene mladiče, mumifikacijo plodu in druge nepravilnosti. *F. graminearum* je vrsta, ki je najbolj odgovorna za estrogene učinke pri rejenih živalih. Zearalenon učinkuje tako, da se veže na estrogenske receptorje in s tem vpliva na transkripcijo v jedru, ki je odvisna od estrogena (Diekman in Green, 1992; Glenn, 2007; Zain, 2011).

Preglednica 1: Obravnavane vrste mikotoksigenih gliv rodu *Fusarium*, prisotne v strnih žitih in koruzi, s pripadajočimi mikotoksini (Logrieco in sod., 2002)

Vrsta	Mikotoksini	
	Strna žita	Koruzi
<i>F. avenaceum</i>	MON, BEA	MON
<i>F. cerealis</i>	NIV, FUS, ZEN, ZOH	NIV, FUS, ZEN, ZOH
<i>F. culmorum</i>	DON, ZEN, NIV, FUS, ZOH, AcDON	DON, NIV, ZEN, ZOH
<i>F. graminearum</i>	DON, ZEN, NIV, FUS, AcDON, DAcDON, DAcNIV	DON, AcDON, NIV, FUS, ZEN
<i>F. poae</i>	DAS, NIV, FUS, MAS, T-2, HT-2, BEA, NEO	DAS, NIV
<i>F. proliferatum</i>	FB1, BEA, MON, FUP, FB2	FB1, FB2, FUP, MON, BEA
<i>F. sporotrichoides</i>	T-2, HT-2, NEO, MAS, DAS	T2, HT-2
<i>F. subglutinans</i>	BEA, MON, FUP	MON, BEA, FUP
<i>F. tritinctum</i>	MON, BEA	-
<i>F. verticillioides</i>	FB1, FB2, FB3	FB1, FB2, FB3

AcDON – Mono-acetildeksinivalenol (3-AcDON, 15-AcDON); BEA – Beauvericin; DAcNIV - Diacetilnivalenol (4,15-AcNIV); DAS – Diacetoksiscirpenol; DON – Deoksinivalenol; FB1 – Fumonizin B1; FB2 – Fumonizin B2; FB3 – Fumonizin B3; FUS - Fusarenon-X (= 4-Acetil-NIV); FUP – Fuzaproliferin; HT2 - HT-2 toksin; MAS – Monoacetoksiscirpenol; MON – Moniliformin; NIV – Nivalenol; NEO – Neosolaniol; T2 - T-2 toxin; ZEN – Zearalenon; ZOH - zearalenoli (α in β izomeri)

2.3 ROD *Alternaria*

Večina gliv iz rodu *Alternaria* so saprofiti. Pogosto jih najdemo v tleh ali na razkrajajočem se rastlinskem tkivu. Nekatere vrste so priložnostni rastlinski patogeni, ki povzročajo vrsto bolezni na različnih kmetijskih rastlinah in s tem povzročajo ekonomske izgube. Vrste iz rodu *Alternaria* so poznane tudi kot skladiščne bolezni (Thomma, 2003). Zrnje žit je pogosto okuženo z glivami iz rodu *Alternaria*, zlasti z *A. alternata* Keissl., (Patriarca, 2007). Vrste *A. alternata*, *A. tenuissima* (Kunze) Wiltshire, *A. triticina* Prasad in Prabhu in *A. infectoria* E.G. Simmons so najpogosteje najdene na pšenici, ovsu in ječmenu. Več kot trideset različnih mikotoksinov je že bilo izoliranih iz gliv rodu *Alternaria* (Müller in Korn, 2013). Kadar se v času razvoja semena pojavljajo izdatne padavine, rosa ali preobilno namakanje je možnost okužbe povečana (Patriarca, 2007).

2.3.1 Klasifikacija

Klasifikacijo povzemamo po (Index Fungorum, 2015).

Kraljestvo: Fungi

Deblo: Ascomycota

Razred: Dothideomycetes

Red: Pleosporales

Družina: Pleosporaceae

Rod: *Alternaria*

Rod *Alternaria* je bil poimenovan leta 1817 z vrsto *A. alternata* (originalno *A. tenuis*) kot izolatnim tipom. Zaradi odsotnosti identificiranega spolnega stadija glive, je bil rod klasificiran v deblo nepopolnih gliv (Fungi imperfecti). Ključna taksonomska značilnost rodu *Alternaria* je tvorba velikih, večceličnih, temnih, mieliniziranih konidijev, z vzdolžno in prečno septo. Ti se ustvarjajo na samostojnih ali razvejanih verigah, na kratkih in pokončnih konidioforih. Konidiji se pojavijo kot izbokline protoplasta skozi konidioforno celično steno (Honda in sod., 1987, 1990, cit. po Thomma, 2003).

2.3.2 Potek okužbe

Na spošno so osebki iz rodu *Alternaria* listni patogeni, ki povzročajo relativno počasen propad gostiteljskega tkiva preko zmanjšanja fotosintetskega potenciala. Infekcija vodi do nastanka nekrotične pege. Ta ima lahko izgled tarče zaradi motenj rasti glive, ki jih povzročajo neprimerne okoljske razmere. Gliva prebiva v centru okužbe, ki je obkrožen z neokuženim klorotičnim halojem. Omenjena cona nastane z difuzijo glivnih metabolitov – mikotoksinov. Okužbe izgledajo podobno tudi pri ostalih nekrotrofnih patogenih. Ob okužbi glive rastlina nima prizadetega transporta vode ali hranil, saj korenine in žile niso njena tarčna tkiva. Ker glive *Alternaria* nimajo znanega spolnega stadija ali prezimitvenih spor, se ohranjajo v obliki micelija ali nespolnih spor na razpadajočih rastlinskih ostankih, oziroma kot latentna okužba v semenu. V prvem primeru se ustvarjene spore raznašajo z

vetrom na površino rastlin, kjer povzročajo nove okužbe. Običajno okužujejo šibkejša rastlinska tkiva, ki so pod stresom, v senescenci ali ranjena. V primeru semenske okužbe, gliva okuži sadiko takoj po kaljenju. Kljub razlikam v taksonomiji in patogenosti, imajo vse vrste iz rodu *Alternaria* podobne infekcijske vzorce. Dormantne spore z močno mieliniziranimi ovojnici v ugodnih razmerah tvorijo eno ali več kalilnih cevk, ki predrejo listne reže in povrhajo. Manj virulentne vrste vstopajo zgolj skozi poškodbe ali listne reže, agresivnejše pa prodirajo direktno skozi rastlinsko tkivo (Rotem, 1994).

2.3.3 Alternarijski mikotoksini

Najpomembnejše alternarijske mikotoksine uvrščamo v tri strukturne razrede. Alternariol, alternariol metil eter in altenuen so derivati dibenzopirona. Alvertoksini I, II in III so derivati perilena. Tenuazojska kislina je derivat tetramske kisline. Opisani mikotoksini imajo citotoksično, fetotoksično in teratogeno delovanje, imajo mutagene in estrogene učinke na sesalce. Kljub potencialni škodljivosti zdravju ob zaužitju alternarijskih mikotoksinov, njihova vsebnost v hrani in krmni ni mednarodno regulirana (Müller in Korn, 2013).

2.3.3.1 Alternariol in alternariol metil eter

Alternariol in alternariol metil eter primarno producira *Alternaria Alternata*, najden je bil tudi v drugih vrstah (*A. brassicae* Sacc., *A. capsici-annui* Sävul. in Sandu, *A. citri* Ellis in N. Pierce, *A. cucumerina* sensu Dingley, *A. dauci* (J.G. Kühn) J.W. Groves in Skolko, *A. kikuchiana* S. Tanaka, *A. tenuissima*, *A. tomato* (Cooke) L.R. Jones, in *A. solani* Sorauer). Spojini sta strupeni za bakterije, v manjši meri tudi za glive (Logrieco in sod., 2003), alternariol pa je mutagen v celičnih kulturah sesalcev (Brugger, 2006).

2.3.3.2 Alvertoksini

Alvertoksine I, II in III prav tako primarno proizvaja vrsta *A. alternata*. Najdeni so bili tudi v vrstah *A. mali* Roberts, *A. radicina* Meier, Drechsler in E.D. Eddy, *A. tenuissima* in *A. tomato* (Logrieco in sod., 2003). Alvertoksin II je v primerjavi z alternariolom in alternariol monometil etrom v primeru *in vitro* celične kulture sesalcev znatno mutagenejši (Fleck in sod., 2012).

2.3.3.3 Tenuazojska kislina

Tenuazojska kislina je najpreprostejši derivat acetiltetramske kisline. Prvotno je bila izolirana iz kulturnega filtrata glive *A. alternata* (*A. tenuis*). Kasneje so jo odkrili tudi v drugih vrstah iz rodu *Alternaria* kot so *A. capsici-annui*, *A. citri*, *A. kikuchiana*, *A. japonica* Yoshii, *A. longipes* (Ellis in Everh.) E.W. Mason, *A. porri* (Ellis) Cif., *A. radicina*, *A. tenuissima* in *A. tomato*. Tenuazojska kislina je fitotoksin in mikotoksin, ima blago antibakterijsko delovanje, pri velikih odmerkih pa deluje zaviralno na viruse. Zaradi

širokega spektra biološke aktivnosti je zelo zanimiva snov za proučevanje, vendar so zaradi močne toksičnosti možnosti uporabe omejene (Royles, 1995; Logrieco in sod., 2003).

2.4 UKREPI ZA PREPREČEVANJE OKUŽENOSTI

2.4.1 Dobra agronomska praksa

Najpomembnejši ukrepi pri varstvu pred prisotnostjo mikotoksinov so ustvarjanje razmer, pri katerih do okužbe s toksigenimi glivami ne pride. K temu pripomore dobra kmetijska praksa, ki vključuje širok kolobar, ustrezno obdelavo tal, optimalen datum setve ter primerno gnojenje in namakanje (Munkvold, 2003).

2.4.2 Omejevanje napada škodljivcev

Stopnja poškodb povzročena s strani žuželk, močno vpliva na okuženost z mikotoksini. Ugotovljeno je bilo, da obseg poškodb koruznega posevka, ki so jih povzročile žuželke, dobro napove tudi okuženost s fuzarijskimi mikotoksini. Žuželke prenašajo spore gliv s površja rastlin v notranjost stebel in zrn ali s svojimi prehranjevalnimi navadami ustvarjajo infekcijske rane preko katerih vstopajo patogeni (Avantaggiato in sod., 2002). Zato vse strategije odvracanja škodljivih žuželk od posevkov posledično vplivajo na nižjo vsebnost mikotoksinov v pridelkih (Zain, 2011).

2.4.3 Žetev, sušenje in skladiščenje

Zgodnejša žetev običajno zmanjšuje glivične okužbe poljščin na polju in posledično onesnaženost pridelkov z mikotoksini. A zaradi neugodnih vremenskih razmer in zasedenosti strojev, ki se jih potrebuje, to ni vedno mogoče. Ključno je hitro sušenje kmetijskih pridelkov na nizko stopnjo vlage, saj se tako ustvarijo neugodne razmere za rast in širjenje gliv. Pridelki so tako tudi bolj odporni pred napadom škodljivcev. Med shranjevanjem je potrebno vzdrževati nizko temperaturo in inertno atmosfero za preprečevanje aktivnost žuželk, saj se ob njihovi prisotnosti poveča zračna vlaga, ki je posledica dihanja (Zain, 2011).

2.4.4 Biotično varstvo

Veliko truda je bilo vložena v vzpostavitev različnih strategij biološkega omejevanja pojavnosti toksigenih gliv kot so razvoj atoksičnih gliv, ki tekmujejo s svojimi sorodnimi vrstami za prevlado v posevkih (Zain, 2011). Nekatere nepatogene vrste gliv rodu *Fusarium* izkazujejo močan antagonizem s patogenimi vrstami. Posebej omembe vredna je *F. equiseti*, ker ima podobne ekološke zahteve (temperatura in substrat) kot patogene vrste.

Nekateri sevi glive *Trichoderma* so prav tako dokazali redukcijo patogenih gliv preko določenih mehanizmov kot so kompeticija za hrano in prostor, antibioza, spremembe v rizoferi, mikoparazitizem in spodbuda rastlinskih obrambnih mehanizmov. V primeru antagonizma z glivami *Fusarium* spp. je teh podatkov malo. Glive *Clonostachys* spp., sorodniki rodu *Trichoderma*, so se izkazali za izjemne antagoniste pri zaviranju sporulacije *F. verticillioides*, *F. proliferatum* in *F. graminearum* (Luongo in sod., 2005).

2.4.5 Žlahtnjenje na odpornost

Žlahtnjenje na odpornost je ena izmed najbolj obetavnih strategij pri zmanjševanju pojavnosti mikotoksinov. Viri odpornosti na *Fusarium* spp., še posebej *F. verticillioides*, so bili identificirani in vključeni v javne in privatne žlahtniteljske programe (Munkvold, 2003). Identificirani so bili potencialni biokemijski in genetski odpornostni markerji različnih poljščin, še posebej koruze. Razviti so prototipi genetsko modificiranih poljščin, ki vsebujejo gene za odpornost na fitotoksične učinke različnih trihotecenov. Princip delovanja je vstavitve glivnih genov (*F. sporotrichioides*), ki kodirajo zapise za proteine, z zmožnostjo pretvarjanja trihotecenov v manj strupene derivate. Gen izoliran iz kvasovk pa kodira odpornostni transportni protein, ki transportira trihotecene le zunajcelično (Cleveland, 2003).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 RASTLINSKI MATERIAL

V letu 2014 smo pridobili osemnajst različnih vzorcev semen strnih žit in koruze iz različnih lokacij v Prekmurju (Predanovci, Filovci, Vučja vas, Iljaševci, Skakovci, Rakičan, Kamnovci, Krašiči in Šprinc). Izmed strnih žit je naš vzorec zajemal ozimno krmno pšenico, tritikalo, ozimni ječmen, jari oves, piro ter ozimno rž. Poleg slednjih, smo obravnavali še tri koruzne hibride. Večina pridobljenih žit je bila pridelana na način integrirane pridelave (13 vzorcev), ostalih pet vzorcev pa je bilo pridelanih na ekološki način (Preglednica 2).

Preglednica 2: Podatki o obravnavanih vzorcih strnih žit in koruze

Vrsta žita	Sorta ali hibrid	Lokacija pridelave	Način pridelave
Ozimna krmna pšenica	'Alixan'	Predanovci	integrirana
Ozimna krmna pšenica	'Žitarka'	Filovci	integrirana
Ozimna krmna pšenica	'Pur pur'	Vučja vas	ekološka
Ozimna krmna pšenica	'Kamut'	Iljaševci	ekološka
Tritikala	'Calorius'	Skakovci	integrirana
Tritikala	'Agostino'	Rakičan	integrirana
Ozimni ječmen	'Merle'	Skakovci	integrirana
Ozimni ječmen	'Hanelore'	Šprinc	integrirana
Ozimni ječmen	Mešano seme	Vučja vas	ekološka
Jari oves	Neznana	Vučja vas	ekološka
Oves	'Škorpion'	Kamnovci	integrirana
Pira	'Red korn'	Vučja vas	ekološka
Pira	'Ostro'	Krašiči	integrirana
Ozimna rž	'Dukato'	Skakovci	integrirana
Ozimna rž	'Gutino'	Dolga vas	integrirana
Koruza	BC 306	Rakičan	integrirana
Koruza	PR38A79	Rakičan	integrirana
Koruza	NK OCTET	Rakičan	integrirana

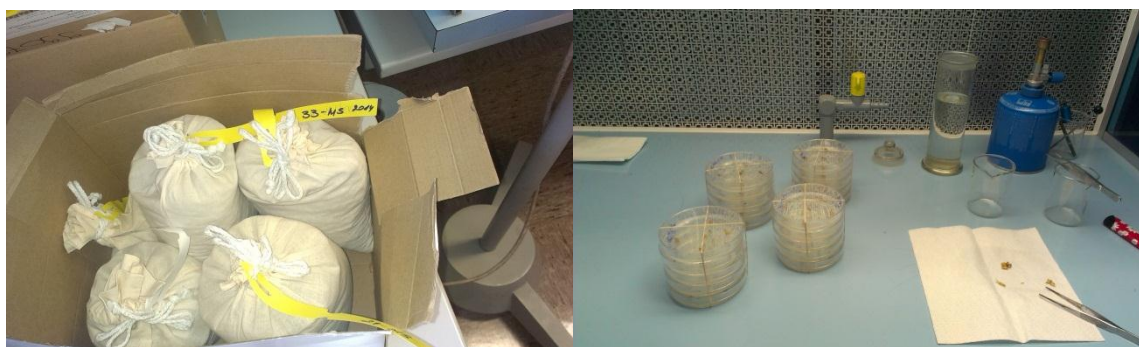
3.2 METODE DELA

3.2.1 Priprava gojišča

Pripravili smo gojišče za osnovno izolacijo gliv iz tkiv. Zatehtali smo 14 g krompirjevega agarja, 10 g tehničnega agarja in prelili s 1000 ml bidestilirane vode, premešali ter dali v avtoklav. Avtoklaviranje je potekalo 15 minut pri 121°C in tlaku 103,4 kPa. V 10 ml destilirane in sterilizirane vode smo raztopili 0,0121 g penicilina G ter 0,0542 g streptomycin sulfata. Raztopino z antibiotikoma smo dodali ohlajenemu avtoklaviranemu gojišču. Nadaljnjo smo v brezprašni komori gojišče razlili v sterilne plastične petrijevke premera 90 mm in počakali, da se strdi.

3.2.2 Priprava zrn

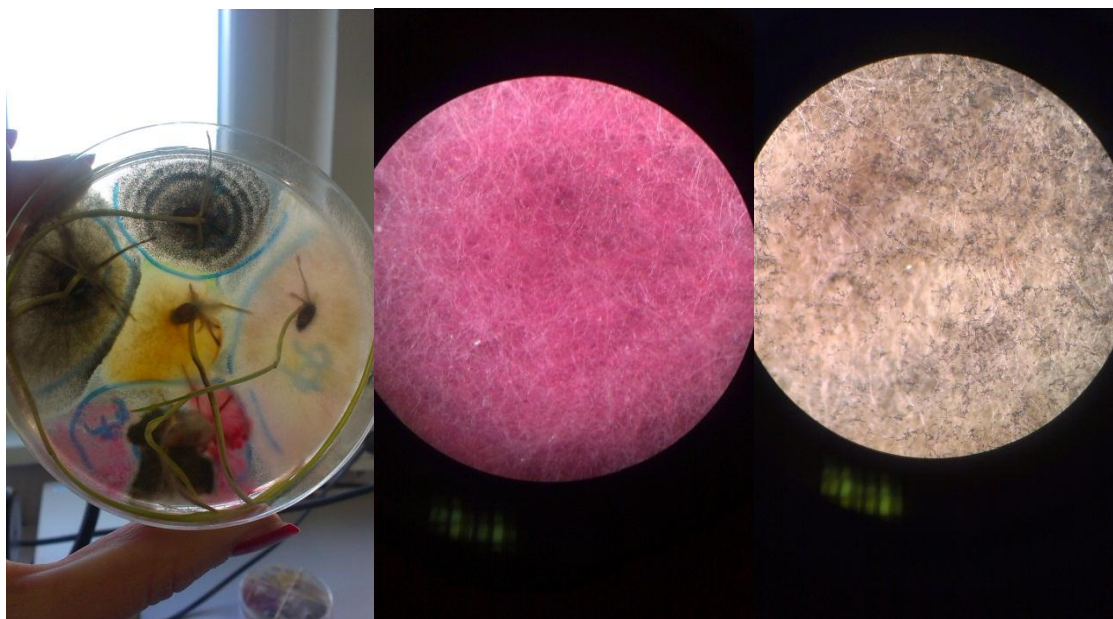
Iz vsakega vzorca smo naključno izbrali 100 nepoškodovanih zrn. Najprej smo jih sprali pod vročo tekočo vodo. Nato je sledilo površinsko razkuževanje. Zrnje smo za 10 minut namočili v raztopino 13 % natrijevega hipoklorita, za tem smo ga ponovno sprali pod tekočo vročo vodo in ga še za 3 minute namočili v sterilizirano destilirano vodo. Nadaljnje delo je potekalo v brezprašni komori. Zrnje smo zavili v sterilno gazo, da se je nekoliko osušilo.



A B
Slika 1: Zapakirani vzorci žit (A) in petrijevke z nacepljenimi zrnji v brezprašni komori (B) (foto: Urša Pečan)

3.2.3 Inokulacija, gojenje, določanje vrste in odčitavanje

V brezprašni komori smo v posamezno petrijevko z gojiščem nacepili pet zrn. Za vsak vzorec smo vzeli 20 petrijevk in tako smo skupno za vsak vzorec nacepili po 100 zrn. Nacepljena gojišča smo postavili v rastno komoro s primerno temperaturo in zračno vlago za optimalen razvoj gliv (20°C in 60 % relativna zračna vlaga). Po tednu dni smo petrijevke vzeli iz rastne komore in z mikroskopiranjem določili rod in vrsto glive, ki se je razvila na posameznem semenu. Določevanje je potekalo s pomočjo priročnika: *The Fusarium laboratory manual* (Leslie J.F. in Summerell B.A. 2006). Rezultate smo predstavili grafično in tabelarično, uporabili smo opisno statistiko brez podrobnih statističnih analiz.



A B C
Slika 2: Petrijevka s petimi različnimi kulturami (A), *F. graminearum*, slikana pod lupo (B) in skupina *Alternaria* »črna« slikana pod lupo (C) (foto: Urša Pečan)

3.2.4 Določanje vsebnosti mikotoksinov

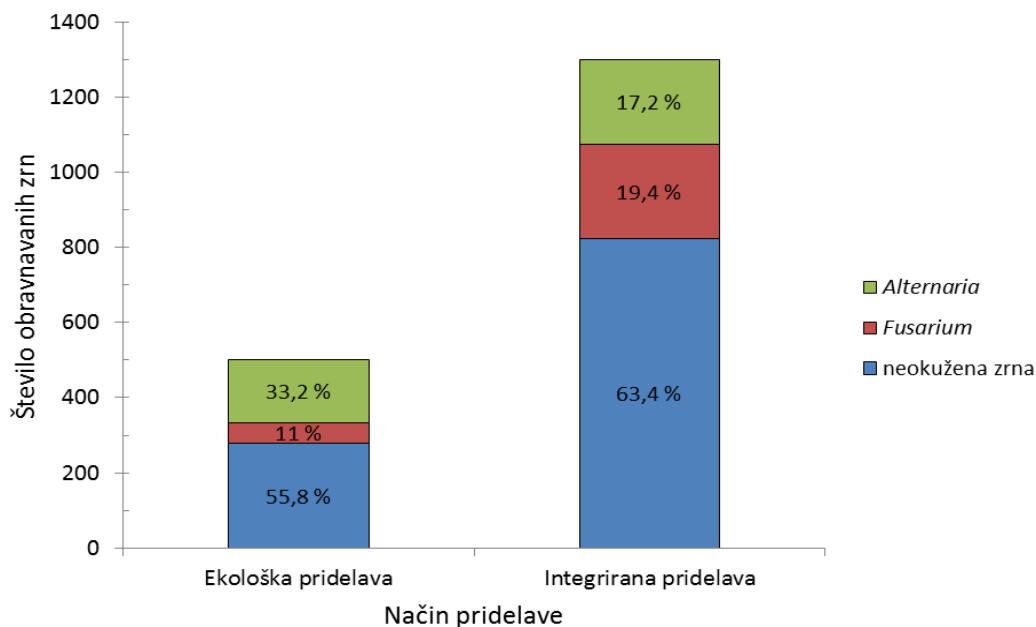
Vzporedno z našim poskusom so na Inštitutu za higijeno in patologijo prehrane živali Veterinarske fakultete v Ljubljani v istih vzorcih žit določali vsebnost posameznih mikotoksinov. Najprej so posamezne vzorce zmleli. Homogenim vzorcem so nato dodali topilo, sledilo je mešanje in filtracija. Odpipetirali so manjšo količino vzorca in počakali, da se posuši. V nastalem suhem ekstraktu so z metodo tekočinske kromatografije s tandemsko masno spektrometrijo (LC-MS/MS) določali vsebnost posameznih mikotoksinov.



A B
Slika 3: Homogenizirani vzorci žit (A) in naprava LC-MS/MS (B) (foto: Urša Pečan)

4 REZULTATI

4.1 NAČIN PRIDELAVE



Slika 4: Skupna okuženost vzorcev z glivami iz rodov *Fusarium* in *Alternaria* glede na način pridelave

Preglednica 3: Okuženost obravnavanih vzorcev žit glede na način pridelave

Vrsta in sorta žita	Način pridelave	<i>Fusarium spp.</i>	<i>Alternaria spp.</i>
pšenica 'Pur pur'	EKO	12	27
pšenica 'Kamut'	EKO	14	22
ječmen Mešano seme	EKO	3	35
oves Neznana	EKO	15	47
pira 'Red korn'	EKO	11	35
	skupaj okuženih zrn iz EKO	55	166
pšenica 'Alixan'	INT	5	3
pšenica 'Žitarka'	INT	5	16
tritikala 'Calorius'	INT	1	10
tritikala 'Agostino'	INT	0	31
ječmen 'Merle'	INT	2	21
ječmen 'Hanelore'	INT	0	10
oves 'Škorpijon'	INT	23	38
pira 'Ostro'	INT	12	31
rž 'Dukato'	INT	4	19
rž 'Gutino'	INT	3	40
koruza BC 306	INT	64	0
koruza NK OCTET	INT	82	2
koruza PR38A79	INT	51	3
	skupaj okuženih zrn iz INT	252	224

Iz slike 4 in preglednice 3 je razvidno, da je okuženost zrnja, pridelanega na ekološki način (44, 2 %), večja od okuženosti vzorcev integrirane pridelave (36,6 %). V primeru ekološke pridelave prevladuje okuženost z glivami iz rodu *Alternaria* (33,2 %), okužb z glivami iz rodu *Fusarium* je 11 %. V primeru integrirane pridelave pa so stopnje okuženosti z glivami iz obeh rodov dokaj podobne.

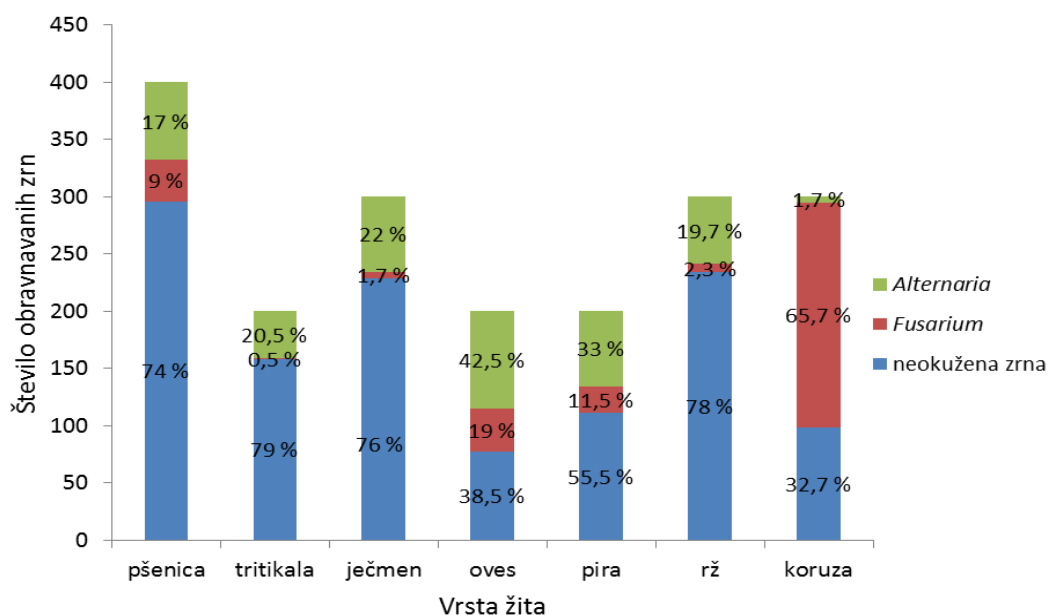
4.1.1 Vsebnost mikotoksinov

Preglednica 4: Vsebnost mikotoksinov v obravnavanih vzorcih glede na način pridelave (izraženo v mg/kg)

Vzorci (način pridelave)	mg/kg					
	<i>Fusarium</i> spp.		<i>Alternaria</i> spp.		Skupaj	
	seštevek	povprečje	seštevek	povprečje	seštevek	povprečje
EKO	2,50	0,50	0,11	0,02	2,61	0,52
INT	20,66	1,59	0,37	0,03	21,03	1,62
INT brez koruze	5,12	0,51	0,28	0,03	5,40	0,54

Iz preglednice 4 je razvidno, da je v primeru ekološke pridelave vsebnost mikotoksinov nižja. Seštevek vseh mikotoksinov znaša v primeru ekološke pridelave v povprečju 0,52 mg/kg, medtem ko je seštevek mikotoksinov, nahajajočih se v žitih integrirane pridelave v povprečju 1,62 mg/kg. Če na podlagi opisne statistike in primerjave povprečij primerjamo vsebnost mikotoksinov le v vzorcih strnih žit, je povprečna skupna okuženost v obeh primerih načina pridelave precej podobna.

4.2 VRSTE ŽIT

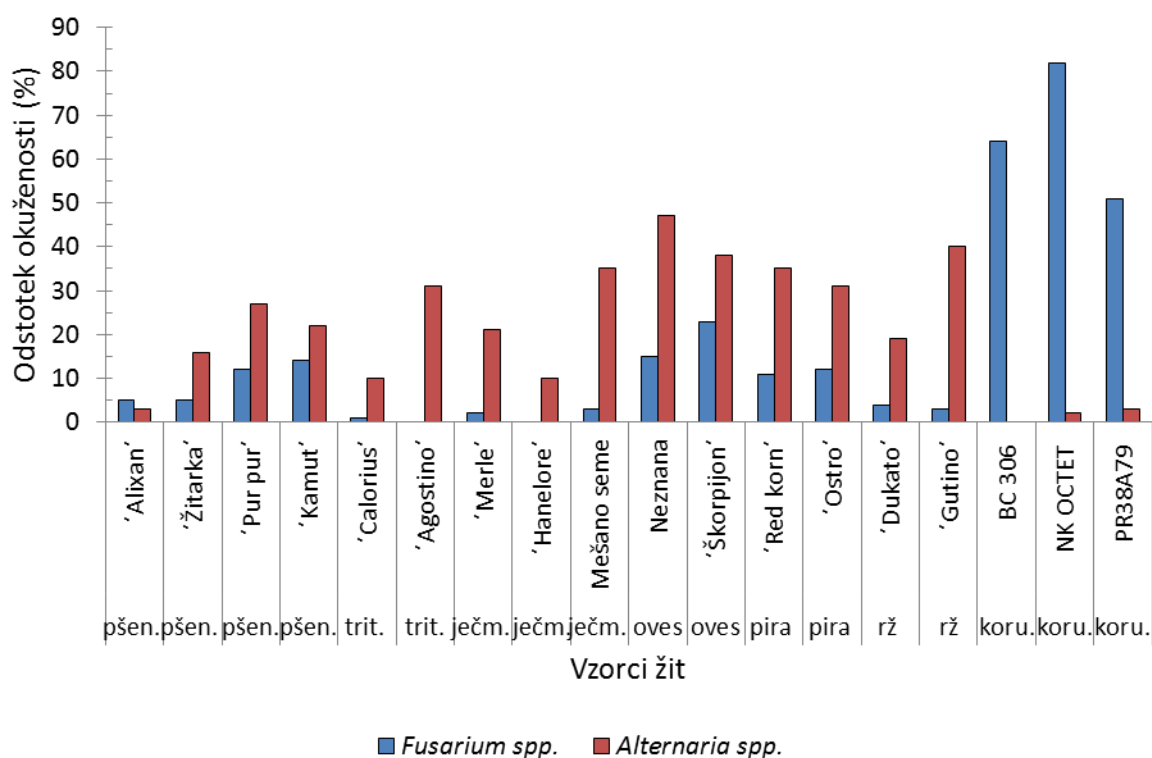


Slika 5: Skupna okuženost vzorcev z glivami iz rodov *Fusarium* in *Alternaria* glede na vrsto žita

Iz slike 5 je razvidno, da je bilo najbolj okuženo žito koruza (67,4 %), sledita mu oves (61,5 %) in pira (44,5 %). Najmanj okužena žita so bila tritikala (21 %), ječmen (23,7 %) in pšenica (26 %). Pri koruzi prevladuje okuženost z glivami iz rodu *Fusarium* (65,7 %). V primeru strnih žit pa okužbe z glivami iz rodu *Alternaria*.

4.3 RODOVNA ZASTOPANOST

Na sliki 6 so predstavljeni odstotki okuženosti obravnavanih vzorcev z glivami iz rodov *Fusarium* in *Alternaria*.



Slika 6: Odstotek okuženosti vzorcev strnih žit in koruze z glivami iz rodov *Fusarium* in *Alternaria*

Preglednica 5: Okuženost obravnavanih vzorcev žit z glivami iz rodov *Fusarium* in *Alternaria* (Sivo označeni vzorci pomenijo ekološko pridelavo)

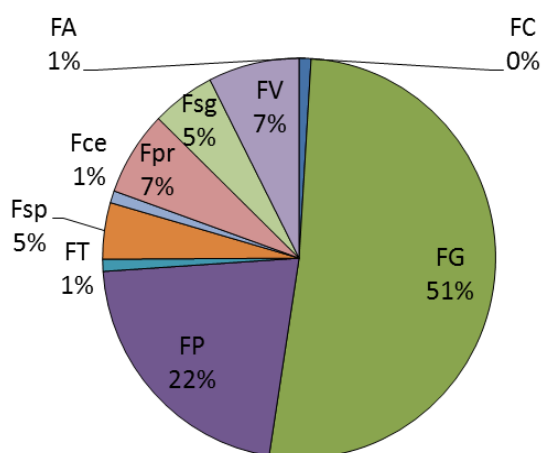
	FA	FC	FG	FP	FT	Fsp	Fce	Fpr	Fsg	FV	<i>Fusarium</i> spp.	AS	AČ	AČK	<i>Alternaria</i> spp.
pšenica 'Alixan'	0	0	1	4	0	0	0	0	0	0	5	1	2	0	3
pšenica 'Žitarka'	0	0	2	3	0	0	0	0	0	0	5	5	11	0	16
pšenica 'Pur pur'	1	0	8	2	0	1	0	0	0	0	12	4	22	1	27
pšenica 'Kamut'	1	0	7	1	0	5	0	0	0	0	14	6	16	0	22
tritikala 'Calorius'	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	3	7	0	10
tritikala 'Agostino'	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16	15	0	31
ječmen 'Merle'	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2	1	20	0	21
ječmen 'Hanelore'	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	8	0	10
ječmen Mešano seme	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	3	13	21	1	35
oves Neznana	0	0	0	10	2	3	0	0	0	0	15	8	34	5	47
oves 'Škorpijon'	0	0	0	21	1	1	0	0	0	0	23	6	30	2	38
pira 'Red korn'	0	0	0	8	0	3	0	0	0	0	11	1	34	0	35
pira 'Ostro'	0	0	1	11	0	0	0	0	0	0	12	5	26	0	31
rž 'Dukato'	0	0	2	0	0	0	2	0	0	0	4	7	12	0	19
rž 'Gutino'	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	3	11	24	5	40
koruza BC 306	0	0	44	4	0	0	1	2	3	10	64	0	0	0	0
koruza NK OCTET	0	0	60	0	0	0	0	12	9	1	82	1	1	0	2
koruza PR38A79	0	0	26	1	0	1	0	7	4	12	51	0	3	0	3
skupaj	3	0	158	66	3	14	3	21	16	23	307	90	286	14	390

Iz slike 6 in preglednice 5 je razvidno, da je okuženost strnih žit z glivami *Fusarium* spp. relativno majhna. Najbolj okužen je bil vzorec integrirano pridelanega ovsa sorte 'Škorpijon' (23 %), medtem ko tritikala 'Agostino' in ječmen 'Hanelore' okuženosti nista izkazala. Pri vzorcih koruze močno prevladuje okuženost z glivami *Fusarium* spp., ki se giblje od 51 % do 82 %. Najvišji odstotek okužbe je izkazal hibrid NK OCTET (82 %), vzorec hibrida BC 306 je bil okužen v 64 % in hibrid PR38A79 v 51 %. Okuženosti koruznih hibridov z glivami iz rodu *Alternaria* je izredno nizka. Vzorec hibrida NK OCTET je v 1 % okužen s skupino *Alternaria* »siva« in v 1 % z *Alternaria* »črna«. Vzorec PR38A79 je 3 % okužen s skupino *Alternaria* »črna«. Pri vzorcu hibrida BC 306 se okuženost ni pojavila. Izmed strnih žit je z glivami iz rodu *Alternaria* najbolj okužen vzorec ekološko pridelanega ovsa neznanega porekla (47 %). Sledi mu integrirano pridelana rž 'Gutino', slednja vzorca imata tudi najvišji odstotek okuženosti s skupino *Alternaria* »črna koncentrična« in sicer 5 %. Z glivami iz rodu *Alternaria* so najmanj okuženi vzorci pšenice, izmed njih je najbolj okužena ekološko pridelana pšenica 'Pur pur' s 27 %, najmanj pa integrirano pridelana pšenica 'Alixan' s 3 % okuženostjo.

4.3.1 *Fusarium* spp.

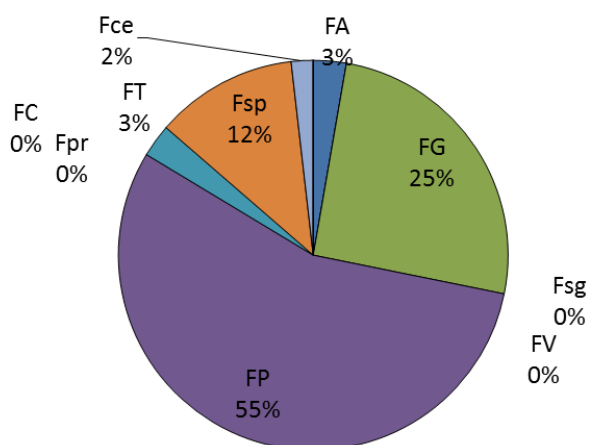
Oznake kratic *Fusarium* spp.:

FA – *F. avenaceum*; FC - *F. culmorum*; FG - *F. graminearum*; FP - *F. poae*; FT - *F. tritinctum*; Fsp - *F. sporotrichioides*; Fce - *F. cerealis*; Fpr - *F. proliferatum*; Fsg - *F. subglutinans*; FV - *F. verticillioides*



Slika 7: Skupna vrstna sestava gliv iz rodu *Fusarium* v vseh vzorcih

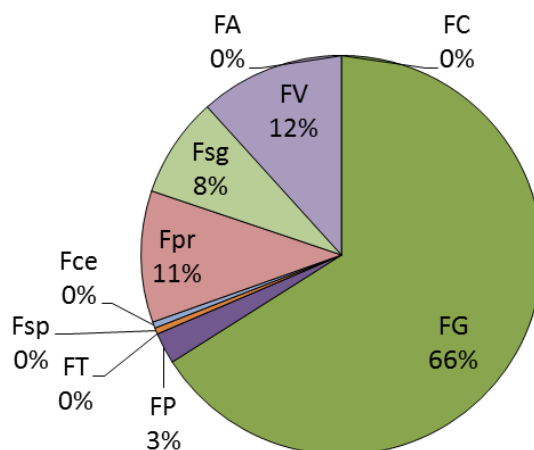
Iz slike 7 je razvidno, da je skupno v vseh vzorcih največja zastopanost vrste *F. graminearum* (51 %). *F. poae* je dosegla 22 % skupne okuženosti. Sledita glivi *F. verticillioides* in *F. subglutinans* s pojavnostjo 7 %. V nobenem vzorcu nismo našli *F. culmorum*.



Slika 8: Vrstna sestava gliv iz rodu *Fusarium* v vzorcih strnih žit

Iz slike 8 je razvidno, da so bila strna žita najbolj okužena z glivo *F. poae*. Druga najbolj zastopana vrsta iz rodu *Fusarium* je bila *F. graminearum* z vrstno zastopanostjo 25 %. Na

tretjem mestu vrstne zastopanosti je *F. sporotrichioides* z 12 %. Med strnimi žiti nismo našli vrst *F. culmorum*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans* in *F. verticillioides*.



Slika 9: Vrstna sestava gliv iz rodu *Fusarium* v vzorcih koruze

Iz slike 9 je razvidno, da je v vzorcih koruze, v največji meri zastopana vrsta *F. graminearum* (66 %). Vrsta *F. verticillioides* je vrstno zastopana v 12 %. Vrstna zastopanost *F. proliferatum* v vzorcih koruze obsega 11 %. Pri vzorcih koruze nismo našli vrst *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. sporotrichoides*, *F. cerealis* in *F. tritinctum*.

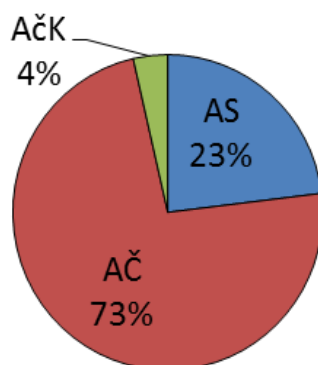
4.3.1.1 Vsebnost mikotoksinov

Iz priloge A je razvidno, da je vsebnost deoksinivalenola in zearalenona visoka predvsem v vzorcih koruznih hibridov. Vsebnost fuzarijskih mikotoksinov je najvišja v primeru hibrida BC 306. Pri omenjenem hibridu je najvišja vsebnost zearalenona, čigar vrednost znaša 5,38 mg/kg. Prav tako je visoka vsebnost DON-a (4,46 mg/kg). Najnižjo koncentracijo mikotoksinov je vseboval hibrid PR38A79. Vsebnost DON-a je znašala 0,50 mg/kg in vsebnost zearalenona 0,04 mg/kg. Strna žita so bila onesnažena le s deoksinivalenolom. Največjo vrednost DON-a je vsebovala pšenica 'Alixain' 1,03 mg/kg.

4.4.1 *Alternaria* spp.

Oznake kratic skupin gliv *Alternaria*:

AS - *Alternaria* »siva«; AČ - *Alternaria* »črna«; AČK - *Alternaria* »črna koncentrična«



Slika 10: Skupinska sestava gliv iz rodu *Alternaria* v vseh vzorcih žit

Iz slike 10 je razvidno, da je v vzorcih vrstno najbolj zastopana skupina *Alternaria* »črna« (73 %), sledi ji *Alternaria* »siva« (23 %), v 4 % se je pojavila še *Alternaria* »črna koncentrična«.

4.4.1.1 Vsebnost mikotoksinov

Iz priloge A je razvidno, da sta povišano vsebnost alternariol metil etra izkazala oba vzorca pira. Ekološko pridelana sorta 'Red korn' ga je vsebovala 0,104 mg/kg, druga pira sorte 'Ostro' pa 0,053 mg/kg. Pri slednji je bila najdena najvišja vsebnost tenuazojske kisline (0,068 mg/kg). Ta se je pojavila še v obeh vzorcih rži 'Gutino' (0,050 mg/kg) in 'Dukato' (0,040 mg/kg), v tritikali sorte 'Calorius' (0,038 mg/kg) in v obeh vzorcih ovsa 'Škorpigon' (0,028 mg/kg) ter ekološko pridelanemu semenu, neznanega porekla (0,010 mg/kg). Preostala strna žita onesnaženosti z alternarijskimi mikotoksini niso izkazala.

Koruzni hibrid BC 306 je izkazal najvišjo vsebnost alternarijskega mikotoksina alternariola (0,058 mg/kg). Poleg omenjenega je alternariol vseboval še hibrid NK OCTET (0,022 mg/kg). Slednji je vseboval še mikotoksin alternariol metil eter (0,016 mg/kg). Pri najbolj okuženem hibridu PR38A79 je bila vsebnosti alternarijskih mikotoksinov pod mejo detekcije.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

V diplomski nalogi smo na podlagi opisne statistike in primerjave povprečij potrdili, da na prisotnost mikotoksigenih gliv, poleg načina pridelave, vpliva tudi vrsta žita. Odstotek okuženosti je variiral od vrste do vrste. Medtem, ko so pri strnih žitih prevladovali patogeni rodu *Alternaria*, je bila koruza pogosteje okužena z glivami iz rodu *Fusarium*. Poleg tega so tudi posamezne vrste gliv znotraj istega rodu preferirale različne vrste žit.

Na podlagi opisne statistike in primerjave povprečij smo potrdili hipotezo, da bo odstotek okužb pri vzorcih iz ekološke pridelave višji. Odstotek okuženih vzorcev z glivami iz rodov *Alternaria* in *Fusarium* znaša v primeru ekološke pridelave 44,2 % in v primeru integrirane pridelave 36,6 %. Dobljene odstotke okuženosti lahko pripišemo dejstvu, da je pri integrirani pridelavi dovoljena uporaba sintetičnih fitofarmacevtskih sredstev, kar lahko zmanjša verjetnost in obseg okužbe. Do drugačnih ugotovitev pa so prišli Celar in sod. (2015), saj navajajo da je bila okuženost pšenice z glivami iz rodu *Fusarium* v primeru ekološke pridelave izrazito nižja. To so pripisali dejstvu, da se kmetovalci pri ekološkem načinu pridelave poslužujejo širšega kolobarja namesto zgolj dvopolja koruza – pšenica. »Okuženi ostanki koruze imajo namreč velik infekcijski potencial za okužbo kasnejše posejane pšenice oz. ostalih strnih žit« (Celar in sod., 2015).

Vsebnost mikotoksinov pa je bila nižja v primeru ekološke pridelave. Če iz vzorcev izvzamemo močno okužene in z mikotoksini onesnažene koruzne hibride integrirane pridelave, je onesnaženost v obeh primerih pridelave zelo podobna. Zato smo na podlagi opisne statistike in primerjave povprečij ovrgli hipotezo, ki je trdila, da bo vsebnost mikotoksinov v primeru ekološke pridelave višja.

Na podlagi opisne statistike in primerjave povprečij smo potrdili hipotezo, ki je trdila da bo okuženost različna glede na vrsto žit. Najvišji odstotek okuženosti z obema rodovoma gliv so dosegli koruza (67,4 %), oves (61,5 %), in pira (44,5 %). Pri ovsu in piri bi lahko visok odstotek okuženosti pripisali obliki hrambe semena. Obe žiti imata seme obdano s plevicami, zaradi česar bi lahko bilo površinsko razkuževanje manj učinkovito. Visoka stopnja okuženosti koruze, bi lahko bila posledica preozkega kolobarja in njene velike razširjenosti v krajih, kjer prevladuje živinorejska usmeritev. Najmanj okužena žita so bila tritikala (21 %), ječmen (24 %) in pšenica (26 %).

Prevladujoča vrsta iz rodu *Fusarium* je bila v primeru strnih žit *F. poae*. Pri vzorcih koruznih hibridov je prevladovala vrsta *F. graminearum*. Z omenjenim rodovom sta bila najbolj okužena koruzna hibrida NK OCTET (82 %) in BC 306 (64 %). Okuženosti pa nista izkazala tritikala sorte 'Agostino' ter ječmen 'Hanelore'.

Prevladujoča skupina alternarijskih črnob je bila *Alternaria* »črna«. Najbolj okužena vzorca z glivami iz rodu *Alternaria* sta bila oves neznanega porekla (47 %) in rž sorte 'Gutino' (40 %). Okuženosti pa ni izkazal le koruzni hibrid BC 306.

Visok delež okuženih žit bi bila lahko posledica nadpovprečno visoke količine letnih padavin. V letu 2014 je letna količina padavin, izmerjena v Murski soboti, znašala 1093 mm. Povprečje letnih količin padavin v letih od 2001 do 2010 je v Murski soboti znašalo 783 mm (SURS, 2015). Prisotnost vode je ključni dejavnik v življenjskem krogu glive. Ob pomanjkanju le-te je upočasnjeno kaljenje trosov, linearno razraščanje hif in sporulacija (Magan in Lacey, 1984).

Onesnaženost z mikotoksini ni sovpadala s stopnjo okuženosti posameznih vzorcev. Nobeno strno žito ni izkazalo onesnaženosti z zearalenonom. Z deoksinivalenolom (DON) so bila onesnažena vsa strna žita, razen pšenice sorte 'Kamut', vendar njihova koncentracija v nobenem primeru ni presegla predpisanih mejnih vrednosti za DON, ki znašajo v primeru ovsa in trde pšenice 1,750 mg/kg v primeru vseh ostalih strnih žit pa 1,250 mg/kg (Uredba komisije (ES)..., 2007). Strna žita so izkazala bistveno večjo stopnjo okuženosti z alternarijskimi glivami kot je znašala vsebnost njihovih mikotoksinov. Ker pa alternarijski mikotoksini nimajo določenih mejnih vrednosti, ne moremo govoriti o prekoračenih dovoljenih vrednostih.

Koncentracije fuzarijskih mikotoksinov so v primerih hibridov BC 306 in NK OCTET krepko prekoračile predpisane mejne vrednosti, ki za koruzo v primeru deoksinivalenola znašajo 1,750 mg/kg in v primeru zearalenona 0,350 mg/kg (Uredba komisije (ES)..., 2007).

6 POVZETEK

V krmnih žitih pogosto ugotovimo večje vsebnosti mikotoksinov. Prekmurje je pretežno živinorejsko usmerjeno območje, kjer se krmna žita vrstijo na istih njivah več let zapored, kar omogoči glivam nemoteno ohranjanje v posevkih.

Naš namen je bil ugotoviti vrstno zastopanost gliv iz rodu *Fusarium* in *Alternaria* na osemnajstih vzorcih različnih krmnih žit (pšenica, pira, tritikala, ječmen, oves, rž in koruza) iz Prekmurja, med katerimi je nekaj vzorcev (pšenica, pira, ječmen in oves) tudi iz ekološke pridelave. Vsi vzorci so bili pobrani v letu 2014. V sodelovanju z Veterinarsko fakulteto v Ljubljani smo pridobili tudi podatke o vsebnosti določenih mikotoksinov v teh vzorcih.

Površinsko razkuženo zrnje žit smo nacepili na gojišče za osnovno izolacijo gliv. Vsak vzorec je imel po 100 ponovitev. Nacepljena gojišča smo postavili v rastno komoro s primerno temperaturo in zračno vlago za optimalen razvoj gliv. Po tednu dni smo petrijevke vzeli iz rastne komore in z mikroskopiranjem določili rod in vrsto glive, ki se je razvila na posameznem semenu.

Na podlagi opisne statistike in primerjave povprečij smo dokazali, da na prisotnost mikotoksigenih gliv poleg načina pridelave vpliva tudi vrsta žita. Najbolj okužena žita so bila koruza, oves in pira. Medtem ko so pri strnih žitih prevladovali patogeni rodu *Alternaria*, je bila koruza pogosteje okužena z glivami rodu *Fusarium*. Poleg tega so tudi posamezne vrste gliv znotraj istega rodu preferirale različne vrste žit. Najpogosteje prisotna gliva iz rodu *Fusarium* je bila primeru koruze vrsta *F. graminearum*, v primeru strnih žit pa *F. poae*.

Naše domneve, da je zrnje ekološke pridelave v primerjavi z zrnjem pridelanim na intergriran način bolj okuženo, so se prav tako potrdile, vendar razlike v odstotku okuženosti niso znatne. Vsebnost mikotoksinov pa je bila v primeru ekološke pridelave nižja. Vsebnost mikotoksinov zgolj v strnih žitih, je bila pri obeh načinih pridelave skoraj enaka.

Onesnaženost z mikotoksini v večini primerov ni korelirala z odstotkom okuženosti žit. Omembe vredna je precejšnja prekoračitev dovoljenih vrednosti vsebnosti deoksinivalenola in zearalenona v primeru koruznih hibridov. O prekoračenih vrednostih alternarijskih mikotoksinov ne moremo govoriti, saj meje za enkrat še niso postavljene.

7 VIRI

- Aleksić D., Aleksić Ž., Ančev E., Arsenijević M., Arsić M., Balarin I. 1983. Priručnik izveštajne i prognozne službe zaštite poljoprivrednih kultura. Beograd, Savez društva za zaštitu bilja Jugoslavije: 682 str.
- Almaši R., Bača F., Bošnjaković A., Čamprag D., Drinić D., Ivanović D. 2002. Bolesti, štetočine i korovi kukuruza i njihovo suzbijanje. Novi Sad, Institut za kukuruz "Zemun polje", Beograd-Zemun, DOO "Školska knjiga" Novi Sad: 694 str.
- Avantaggiato G., Quaranta F., Desiderio E., Visconti A. 2002. Fumonisin contamination of maize hybrids visibly damaged by *Sesamia*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83: 13-18
- Bottalico A., Perrone G. 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *European Journal of Plant Pathology*, 108: 611-624
- Brugger E.M., Wagner J., Koch K., Podlech J., Metzler M., Lehmann L. 2006. Mutagenicity of the mycotoxin alternariol in cultured mammalian cells. *Toxicology Letters*, 164: 221-230
- Cano-Sancho G., Valle-Algarra F.M., Jiménez M., Burdaspal P., Legarda T.M., Ramos A.J., Sanchis V., Marín S. 2011. Presence of trichothecenes and co-occurrence in cereal-based food from Catalonia (Spain). *Food Control*, 22: 490-495
- Celar F.A., Šantavec I., Tavčar Kalcher G., Kos K. 2015. Povezava med stopnjo okuženosti klasov in zrn pšenice s fuzariozami ter vsebnost mikotoksina deoksinivalenola. V: 12. slovensko posvetovanje o varstvu rastlin, 3. - 4. marec 2015, Ptuj. Zbornik predavanj in referatov. Ljubljana, Društvo za varstvo rastlin Slovenije, 2015 (v tisku)
- Cleveland T.E., Dowd F.P., Desjardins A.E., Bhatnagar D., Cotty P.J. 2003. United States Department of Agriculture—Agricultural Research Service research on pre-harvest prevention of mycotoxins and mycotoxigenic fungi in US crops. *Pest Management Science*, 59: 629-642
- Diekman M.A., Green M.L. 1992. Mycotoxins and Reproduction in Domestic Livestock. *Journal of Animal Science*, 70: 1615–1627
- Doohan F.M., Brennan J., Cooke B.M. 2003. Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereals. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 755-768
- D’Mello J.P.F., Macdonald A.M.C. 1997. Mycotoxins. *Animal Feed Science Technology*, 69: 155-166

- Fleck S.C., Burkhardt B., Pfeiffer E., Metzler M. 2012. *Alternaria* toxins: Alternotoxin II is a much stronger mutagen and DNA strand breaking mycotoxin than alternariol and its methyl ether in cultured mammalian cells. *Toxicology Letters*, 214: 27-32
- Glenn A.E. 2007. Mycotoxigenic *Fusarium* species in animal feed. *Animal Feed Science and Technology*, 137: 213-240
- Goswami R.S., Kistler H.C. 2004. Pathogen profile Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant Pathology*, 5: 515-525
- Hussein H.S., Brasel J.M. 2001. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, 167: 101-134
- Index Fungorum. 2015.
<http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp> (1.7.2015)
- Kosiak B., Torp M., Skjerve E., Andersen B. 2004. *Alternaria* and *Fusarium* in Norwegian grains of reduced quality — a matched pair sample study. *International Journal of Food Microbiology*, 93: 51-62
- Leslie J.F., Summerell B.A. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Ames, Blackwell Professional: 388 str.
- Logrieco A., Mule G., Moretti A., Bottalico A. 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. *European Journal of Plant Pathology*, 108: 597-609
- Luongo L., Galli M., Corazza L., Meekes E., De Hass L., Van Der Plas L., Kohl J. 2005. Potential of fungal antagonists for biocontrol of *Fusarium* spp. in wheat and maize through competition in crop debris. *Biocontrol Science and Technology*, 15: 229-242
- Magan N., Lacey J. 1984. Effect of temperature and pH on water relations of field and storage fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, 82: 71-81
- Munkvold G.P., 2003. Cultural and genetic approaches to managing mycotoxins in maize. *Annual Review of Phytopathology*, 41: 99-116
- Müller M.E.H., Korn U. 2013. *Alternaria* mycotoxins in wheat A 10 years survey in the Northeast of Germany. *Food Control*, 34: 191-197
- Parry D.W., Jenkinson P., McLeod L. 1995. *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals—a review. *Plant Pathology*, 44: 207-238
- Patriarca A., Azcarate M.P., Terminiello L., Fernández Pinto V. 2007. Mycotoxin production by *Alternaria* strains isolated from Argentinean wheat. *International Journal of Food Microbiology*, 119: 219-222

Placinta C.M., D'Mello J.P.F., Macdonald A.M.C. 1999. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology*, 78: 21-37

Royles B.J.L. 1995. Naturally Occurring Tetramic Acids: Structure, Isolation, and Synthesis. *Chemical Reviews*, 95: 1981-2001

Rotem J. 1994. The genus *Alternaria*: biology, epidemiology and pathogenicity. St. Paul, The American Phytopathological Society, MN: 326 str.

SURS - Statistični urad Republike Slovenije
<http://pxweb.stat.si/pxweb/Dialog/Saveshow.asp> (12.7.2015)

Thomma B.P.H.J. 2003. Pathogen profile *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathology*, 4: 255-236

Uredba komisije (ES) št. 1126/2007 o spremembi Uredbe (ES) št. 1881/2006 o določitvi mejnih vrednosti nekaterih onesnaževal v živilih glede toksinov iz rodu *Fusarium* v koruzi in koruznih proizvodih. Uradni list Evropske unije. L 225: 14-17 str.
<http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:255:0014:0017:SL:PDF> (9.9.2015)

Zain E.M. 2011. Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*, 15: 129-144

ZAHVALA

Za pomoč pri pisanju, iskanju podatkov, za hitre popravke in prijaznost se najlepše zahvaljujem mentorici doc. dr. Katarini Kos.

Za ves trud vložen v določevanje posameznih vrst gliv, se zelo lepo zahvaljujem prof. dr. Franciju Aco Celarju, za recenzijo in kritiko se zahvaljujem še doc. dr. Ireni Maček.

Veterinarski fakulteti v Ljubljani se zahvaljujem za pridobljene podatke o koncentracijah mikotoksinov.

PRILOGA A

Vsebnost mikotoksinov v vzorcih žit izraženi v mg/kg

Sivo označeni vzorci pomenijo ekološko pridelavo

ND – koncentracije so pod mejo detekcije

	Deoksinivalenol (DON)	Zearalenon (ZEN)	Tenuazojska kislina	Tentoksin	Alternariol	Alternariol metil eter
pšenica 'Alixan'	1,03	ND	ND	ND	ND	ND
pšenica 'Žitarka'	0,620	ND	ND	ND	ND	ND
pšenica 'Pur pur'	0,400	ND	ND	ND	ND	ND
pšenica 'Kamut'	ND	ND	ND	ND	ND	ND
tritikala 'Calorius'	0,340	ND	0,038	ND	ND	ND
tritikala 'Agostino'	0,260	ND	ND	ND	ND	ND
ječmen 'Merle'	0,270	ND	ND	ND	ND	ND
ječmen 'Hanelore'	0,600	ND	ND	ND	ND	ND
ječmen Mešano seme	0,830	ND	ND	ND	ND	ND
oves Neznana	0,610	ND	0,010	ND	ND	ND
oves 'Škorpigon'	1,010	ND	0,028	ND	ND	ND
pira 'Red korn'	0,660	ND	ND	ND	ND	0,104
pira 'Ostro'	0,370	ND	0,068	ND	ND	0,053
rž 'Dukato'	0,100	ND	0,040	ND	ND	ND
rž 'Gutino'	0,520	ND	0,050	ND	ND	ND
koruza BC 306	4,46	5,38	ND	ND	0,058	ND
koruza NK OCTET	3,02	2,14	ND	ND	0,022	0,016
koruza PR38A79	0,50	0,04	ND	ND	ND	ND