

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Lena TAJNŠEK

**POJAVLJANJE MIKOTOKSINOV ZEARALENON IN  
DEOKSINIVALENOL NA ZRNJU PŠENICE (*Triticum  
aestivum* L.) V ODVISNOSTI OD OKOLJSKIH  
DEJAVNIKOV**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Lena TAJNŠEK

**POJAVLJANJE MIKOTOKSINOV ZEARALENON IN  
DEOKSINIVALENOL NA ZRNJU PŠENICE (*Triticum aestivum* L.) V  
ODVISNOSTI OD OKOLJSKIH DEJAVNIKOV**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**THE OCCURRENCE OF MYCOTOXINS ZEARALENONE AND  
DEOXYNIVALENOL IN THE WHEAT GRAIN (*Triticum aestivum* L.)  
AS A FUNCTION OF ENVIRONMENTAL FACTORS**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2015

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa 17. seje Senata Univerze z dne 12. 2. 2009 in sklepa 31. seje Komisije za doktorski študij UL z dne 19. 9. 2012 (po pooblastilu Senata Univerze z dne 20. 1. 2009) in popravku odločbe z dne 3. 10. 2012 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za neposredni prehod na podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti ter opravljanje doktorata znanosti s področja živilstva. Za mentorja je bil imenovan prof. dr. Marjan SIMČIČ.

Doktorska disertacija je bila opravljena na Univerzi v Ljubljani, Biotehniški fakulteti, Oddelku za živilstvo (Katedra za tehnologije, prehrano in vino) ter Oddelku za agronomijo (Katedra za fitomedicino, kmetijsko tehniko, poljedelstvo, pašništvo in travništvo). Poskus je postavljen na površinah Centra za razvoj podeželja Jable in na Srednji kmetijski šoli Rakičan. Analize vsebnosti mikotoksinov so bile opravljene v laboratoriju LUFA Speyer (Landwirtschaftliche Untersuchungs und Forschungsanstalt Speyer) v Nemčiji.

Mentor: izr. prof. ddr. Marjan SIMČIČ

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: red. prof. dr. Veronika ABRAM  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: izr. prof. ddr. Marjan SIMČIČ  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: izr. prof. dr. Mirela KOPJAR  
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki  
fakultet Osijek

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je disertacija rezultat lastnega raziskovalnega 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.

Doktorandka:  
Lena Tajnšek

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dd
- DK UDK 633.11+664.641.12:632.4:615.9(043)=163.6
- KG mikotoksini / zearalenon / deoksinivalenol / plesni / *Fusarium* spp. / fuzarioze / pšenica / *Triticum aestivum* L. / Reska / Savinja / bela moka / črna moka / podnebni vplivi / pridelovalni postopki / gnojenje z dušikom
- AV TAJNŠEK, Lena, univ. dipl. inž. živ. tehnol.
- SA SIMČIČ, Marjan (mentor)
- KZ SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti, področje živilstva
- LI 2015
- IN POJAVLJANJE MIKOTOKSINOV ZEARALENON IN DEOKSINIVALENOL NA ZRNJU PŠENICE (*Triticum aestivum* L.) V ODVISNOSTI OD OKOLJSKIH DEJAVNIKOV
- TD Doktorska disertacija
- OP XIII, 112 str., 41 pregl., 13 sl., 14 pril., 191 vir.
- JI sl/en
- AI Raziskava je bila zasnovana v letih 2006–2008 z namenom preučitve vpliva dejavnikov okolja in različnih, dolgotrajno na nespremenjen način izvajanih, postopkov pridelovanja na kontaminiranost pšeničnih zrn z mikotoksinoma deoksinivalenol (DON) in zearalenon (ZEA) kot sekundarnih metabolitov rodu *Fusarium*. DON, ZEA in *Fusarium* spp. v pšeničnem zrnju smo ugotavljali v pšeničnem zrnju kultivarjev Reska in Savinja, ki sta bila v pridelavi v dveh trajnih poljskih poskusih, zasnovanih leta 1992: Jable (46°7'N, 14°11'E, višina 308 m) in Rakičan (46°38'N, 14°34'E, višina 184 m). Pšenica je bila v obeh poskusih pridelana v 10 agrotehničnih postopkih, v kolobarju koruza – pšenica – ječmen/oves, od ekološko prijaznih do intenzivnih tehnik pridelovanja. Analiza varianc in multiplih korelacij med agrotehničnimi ukrepi in okoljem ter pojavljanjem DON, ZEA in *Fusarium* spp. so pokazali značilnost povezave nekaterih od teh parametrov. Na kontaminiranost zrnja z DON, ZEA in *Fusarium* spp. vplivajo gnojenje z mineralnim dušikom (N-min), kultivar in vremenske razmere. Z izbiro ustrezne lokacije in gnojenja z N-min in organskimi gnojili lahko brez fungicidov pridelamo pšenico, pri kateri DON in ZEA ne presegata dopustnih varnostnih toleranc za varno hrano. Rezultati so pokazali, da lahko z ustreznimi agrotehničnimi ukrepi pomembno zmanjšamo tveganje za okužbo pšenice s *Fusarium* spp. in za kontaminacijo moke z DON in ZEA. Pri ekstenzivni pridelavi pšenice je tveganje za pojav DON in ZEA značilno manjše kot pri intenzivni. Primerjava kultivarjev je pokazala, da je Savinja bolj odporna na kontaminacijo z DON in ZEA kot Reska. Pokazala se je značilna korelacija med *Fusarium* spp. in kontaminacijo moke z DON in ZEA. Bela moka (tip 405) je bila z DON in ZEA manj kontaminirana kot črna moka (tip 1050), zmlata iz istega zrnja, vendar bi bilo treba opraviti še dodatne raziskave, preden bi lahko zaključili, da je črna moka, ki jo običajno priporočajo kot bolj zdravo od bele, bolj kontaminirana z mikotoksini. Multipla korelacija med *Fusarium* spp. in kontaminacijo zrnja z DON in ZEA ter med gnojenjem z N-min in DON in ZEA je pokazala statistično značilnost medsebojnih povezav.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd  
 DC UDC 633.11 + 664.641.12: 632.4: 615.9 (043) = 163.6  
 CX mycotoxins / zearalenone / deoxynivalenol / mold / *Fusarium* spp. / fusariosis / wheat / *Triticum aestivum* L. / Reska / Savinja / white flour / dark flour / climate effects / production methods / nitrogen fertilization  
 AU TAJNŠEK, Lena, univ. dipl. ing. živ. teh.  
 AA SIMČIČ, Marjan (supervisor)  
 PP SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Postgraduate Study of Biological and Biotechnical Sciences, Field Food Science and Technology  
 PY 2015  
 TI THE OCCURRENCE OF MYCOTOXINS ZEARELENONE AND DEOXYNIVALENOL IN THE WHEAT GRAIN (*Triticum aestivum* L.) AS A FUNCTION OF ENVIRONMENTAL FACTORS  
 DT Doctoral dissertation  
 NO XIII, 112 p., 41 tab., 13 fig., 14 ann., 191 ref.  
 LA sl  
 AL sl/en  
 AB The purpose of the current investigation, conceived in the years 2006-2008, was the identification of environment factors and influence of the long lasting production methods on the occurrence of mycotoxins deoxynivalenole (DON) and zearalenone (ZEA), the result of secondary metabolism of *Fusarium* spp. in the wheat grain. The occurrence of DON, ZEA, and *Fusarium* spp. were studied at Reska and Savinja wheat cultivars which were grown in two long-term field experiments (designed in 1992) on two locations in Slovenia: at Jable near Ljubljana (46°7'N, 14°11'E, 308 m altitude) and at Rakičan near Murska Sobota (46°38'N, 14°34'E, 184 m altitude). The cultivars Reska and Savinja in the both field experiments have been considered in crop rotation of maize-wheat-barley/oats in 10 methods of production with variants ranging organic up to intensely conventional. The results of statistical evaluation between parameters of environment and agritechnical measures and the occurrence of DON, ZEA, and *Fusarium* spp. showed a significant correlation for most of these parameters. Contamination of grains with DON, ZEA, and *Fusarium* spp. were influenced by agritechnical methods, cultivars and weather conditions. With adequately chosen location, N-min fertilisation and organic manuring we can optimize the methods for wheat production without fungicides, and reach a permissible tolerance to food safety. The investigations showed that adequately chosen agritechnical measures significantly reduce the risk of contamination of wheat with *Fusarium* spp. and the contamination of flour with DON and ZEA. The extensive wheat production implies an appreciably lesser risk of DON and ZEA occurrence. Cultivars also differ with regard to resistance to contamination with mycotoxins: comparison of cultivars to contamination with DON and ZEA showed that Savinja was more resistant to DON and ZEA contamination than Reska. Significant correlations have been found between *Fusarium* spp. and contamination with DON and ZEA. White flour (type 405) was in the most cases less contaminated with DON and ZEA than dark flour (type 1050), but the conclusion saying that dark flour which is usually recommended as healthier was more contaminated with the DON and ZEA than the white one would require further examination.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>VII</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>X</b>
<b>KAZALO PRILOG .....</b>	<b>XI</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....</b>	<b>XII</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA .....	1
1.2 CILJ RAZISKOVANJA .....	2
1.3 DELOVNE HIPOTEZE .....	2
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>4</b>
2.1 MIKOTOKSIKOLOGIJA .....	4
2.1.1 Plesni rodu <i>Fusarium</i> .....	15
2.1.2 Deoksinivalenol .....	18
2.1.3 Zearalenon .....	20
2.2 ANALITIKA .....	22
2.2.1 Vzorčenje .....	23
2.2.2 Analitske metode za identifikacijo mikotoksinov .....	23
2.3 TOKSIČNOST .....	26
2.3.1 Toksičnost mikotoksina DON .....	28
2.3.2 Toksičnost mikotoksina ZEA .....	30
2.4 VARNOST .....	32
2.4.1 Prehranski vnos DON .....	33
2.4.2 Prehranski vnos ZEA .....	33
2.5 OBVLADOVANJE .....	34
2.5.1 Preprečevanje kontaminacije z mikotoksini .....	34
2.5.2 Strategije preprečevanja okužb pred žetvijo .....	35
2.5.3 Strategije za preprečevanje okužb med žetvijo .....	36
2.5.4 Strategije preprečevanja okužb po žetvi .....	36
2.5.5 Preprečevanje okužb z uporabo naravnih in kemičnih agensov .....	37
2.5.6 Žarčenje .....	38
2.5.7 Stabilnost in detoksifikacija mikotoksinov .....	38
2.5.8 Inhibicija adsorpcije mikotoksinov v gastrointestinalnem traktu .....	39
<b>3 MATERIAL IN METODE .....</b>	<b>40</b>
3.1 OPIS LOKACIJ POSKUSA .....	40
3.1.1 IOSDV Jable .....	40
3.1.2 IOSDV Rakičan .....	41
3.2 ZASNOVA POLJSKIH POSKUSOV .....	41
3.3 KULTIVARJA RESKA IN SAVINJA .....	45
3.3.1 Reska .....	45
3.3.2 Savinja .....	45
3.4 SETEV IN ŽETEV PŠENICE TER ODVZEM VZORCEV .....	46

3.5	PRIPRAVA AGARJA IN TEST OKUŽENOSTI ZRNJA S <i>FUSARIUM</i> SPP.	46
3.6	PRIPRAVA VZORCEV ZA UGOTAVLJANJE MIKOTOKSINOV DON IN ZEA .....	46
3.7	ANALIZA MIKOTOKSINOV DON IN ZEA.....	47
3.8	STATISTIČNO OVREDNOTENJE REZULTATOV .....	51
<b>4</b>	<b>REZULTATI.....</b>	<b>53</b>
4.1	VPLIV VREMENA, POSTOPKOV PRIDELOVANJA IN KULTIVARJA NA POJAV <i>FUSARIUM</i> SPP. PRI KULTIVARJIH PŠENICE RESKA IN SAVINJA NA LOKACIJI JABLE.....	53
4.1.1	<b>Določanje pojavnosti <i>Fusarium</i> spp. na pšeničnem zrnju na lokaciji Jable .....</b>	<b>55</b>
4.2	VPLIV VREMENA, POSTOPKOV PRIDELOVANJA IN KULTIVARJA NA POJAV <i>FUSARIUM</i> SPP. PRI KULTIVARJIH PŠENICE RESKA IN SAVINJA NA LOKACIJI IOSDV RAKIČAN.....	61
4.3	KONTAMINIRANOST PŠENIČNEGA ZRNJA Z MIKOTOKSINOMA DON IN ZEA NA LOKACIJAH IOSDV JABLE IN IOSDV RAKIČAN V LETIH 2006 IN 2008 .....	68
4.3.1	<b>Mikotoksin DON v pšeničnem zrnju kultivarja Reska na lokacijah IOSDV Jable in IOSDV Rakičan .....</b>	<b>68</b>
4.3.2	<b>DON v vzorcih pšeničnega zrnja kultivarja Savinja na lokacijah IOSDV Jable in IOSDV Rakičan.....</b>	<b>72</b>
4.3.3	<b>ZEA na vzorcih pšeničnega zrnja kultivarja Reska na lokacijah IOSDV Jable in IOSDV Rakičan.....</b>	<b>75</b>
4.3.4	<b>ZEA na vzorcih pšeničnega zrnja kultivarja Savinja na lokacijah IOSDV Jable in IOSDV Rakičan.....</b>	<b>76</b>
4.3.5	<b>Korelacija med gnojenjem z N-min, pojavom <i>Fusarium</i> spp. in med mikotoksinoma DON in ZEA v beli in črni moki kultivarjev Reska in Savinja..</b>	<b>78</b>
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>	<b>80</b>
5.1	RAZPRAVA.....	80
5.2	SKLEPI.....	87
<b>6</b>	<b>POVZETEK (SUMMARY).....</b>	<b>90</b>
6.1	POVZETEK .....	90
6.2	SUMMARY .....	93
<b>7</b>	<b>VIRI .....</b>	<b>97</b>
	<b>ZAHVALA</b>	
	<b>PRILOGE</b>	



## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Glavne vrste plesni rodu <i>Fusarium</i> kot povzročitelji najpomembnejših mikotoksinov žitnih zrn (D'Mello in Macdonald, 1997; Backhouse in sod., 2001; Bottalico in Perrone, 2002; Parry in sod. 1995; Thrane, 2000) .....	12
Preglednica 2: Metode pridelovanja v poskusih IOSDV Jable in Rakičan, 1993–2008 .....	42
Preglednica 3: Potrebni reagent pri določanju mikotoksinov DON in ZEA v pšenici z encimsko imunskima testoma RIDASCREEN®FAST DON in RIDASCREEN® Zearalenon za kvantitativno določanje DON in ZEA v pšenici .....	49
Preglednica 4: Postopki priprave vzorca za določanje mikotoksinov DON in ZEA v pšenici z encimsko imunskima testoma RIDASCREEN®FAST DON in RIDASCREEN® Zearalenon .....	50
Preglednica 5: Desetletno povprečje temperatur zraka in količin padavin po mesecih v IOSDV Jable od leta 2001 do 2010 (SURs, 2011) .....	54
Preglednica 6: Mesečne temperature T (°C) in količine padavin (mm) IOSDV Jable v obdobju med leti 2005 in 2008 (SURs, 2011) .....	56
Preglednica 7: Okuženost pšeničnega zrnja s <i>Fusarium</i> spp. pri kultivarjih Savinja in Reska v odvisnosti od postopkov pridelovanja v IOSDV Jable v letih 2006–2008 (odstotki, %) .....	58
Preglednica 8: Okuženost pšeničnega zrnja s <i>Fusarium</i> spp. pri kultivarjih Savinja in Reska v odvisnosti od postopkov pridelovanja na lokaciji IOSDV Jable v letih 2006–2008 (transformirane vrednosti $tv = \arcsin\sqrt{p}$ ) .....	58
Preglednica 9: Analiza variance okuženosti s <i>Fusarium</i> spp. na zrnju pšeničnih kultivarjev Reska in Savinja v IOSDV Jable, leta 2006–2008 .....	59
Preglednica 10: Rang statističnih razlik v stopnji okuženosti zrnja s <i>Fusarium</i> spp. v povprečju dveh kultivarjev pšenice, v odvisnosti od postopka pridelovanja v IOSDV Jable, povprečje let 2006–2008 (transformiran odstotek okuženosti $tv = \arcsin\sqrt{p}$ ) .....	60
Preglednica 11: Statistične razlike v okuženosti zrnja s <i>Fusarium</i> spp. dveh kultivarjev pšenice, v odvisnosti od pridelovanja na lokaciji Jable, 2006–2008 (transformiran odstotek okuženosti: $tv = \arcsin\sqrt{p}$ ) .....	60
Preglednica 12: Mesečna temperatura in količina padavin v IOSDV Rakičan v letih 2005–2008 (SURs, 2011) .....	63
Preglednica 13: Desetletno povprečje temperatur zraka in padavin po mesecih v IOSDV Rakičan, 2001–2010 (SURs, 2011) .....	63
Preglednica 14: Okuženost zrnja s <i>Fusarium</i> spp. (odstotki, %) pri kultivarjih Savinja in Reska v odvisnosti od postopkov pridelovanja na lokaciji Rakičan v letih 2006–2008 .....	64
Preglednica 15: Okuženost s <i>Fusarium</i> spp. zrnja pri kultivarjih Savinja in Reska v odvisnosti od postopkov pridelovanja na lokaciji Rakičan v letih 2006–2008 (transformirane vrednosti, $tv = \arcsin\sqrt{p}$ ) .....	65
Preglednica 16: Statistična značilnost vpliva dejavnika 'leto' na okuženost zrnja s <i>Fusarium</i> spp. pri pšeničnih kultivarjih Savinja in Reska v IOSDV Rakičan v letih 2006–2008 .....	65
Preglednica 17: Analiza variance okuženosti zrnja pšeničnih kultivarjev Reska in Savinja s <i>Fusarium</i> spp. v IOSDV Rakičan v letih 2006–2008 .....	66
Preglednica 18: Rang statističnih razlik v stopnji okuženosti zrnja s <i>Fusarium</i> spp. v odvisnosti od postopka pridelovanja na lokacijah IOSDV Rakičan in Jable v povprečjih kultivarjev in let 2006–2008 (transformirane vrednosti, $tv = \arcsin\sqrt{p}$ ) .....	67



Preglednica 19: Analiza variance okuženosti pšenice kultivarjev Reska in Savinja s <i>Fusarium</i> spp. v IOSDV Jable in IOSDV Rakičan v letih 2006–2008 .....	67
Preglednica 20: Kontaminiranost bele in črne moke kultivarja Reska z mikotoksinom deoksinivalenol (DON) .....	69
Preglednica 21: Analiza variance kontaminiranosti pšenične črne moke (tip 1050) kultivarja Reska z DON v.....	70
Preglednica 22: Statistična značilnost kontaminiranosti črne moke pšenice kultivarja Reska z DON v odvisnosti od gnojenja z N-min in hlevskim gnojem v IOSDV Rakičan v letu 2006 .....	70
Preglednica 23: Kontaminiranost bele in črne moke kultivarja Reska z mikotoksinom DON nad mejo detekcije (< 200 µg DON kg <sup>-1</sup> moke) na lokacijah IOSDV Jable in Rakičan v letu 2008 (µg DON kg <sup>-1</sup> moke) .....	70
Preglednica 24: Statistična značilnost aritmetičnih sredin kontaminiranosti z mikotoksinom DON v beli moki kultivarja Reska v Jablah v letu 2008 .....	71
Preglednica 25: Statistična razlika med kontaminiranostjo z DON pri različnih postopkih pridelovanja pri beli.....	71
Preglednica 26: Statistična značilnost aritmetičnih sredin kontaminiranosti pšenične črne moke, kultivar Reska, z mikotoksinom DON v Jablah v letu 2008 (transformirana vrednost okužbe $\sqrt{(\frac{1}{2} + x)}$ ) .....	72
Preglednica 27: Statistična razlika med kontaminiranostjo z DON pri različnih postopkih pridelovanja pri črni moki kultivarja Reska v Jablah v letu 2008 .....	72
Preglednica 28: Kontaminiranost bele in črne moke kultivarja Savinja z DON nad mejo detekcije (< 200 µg DON kg <sup>-1</sup> moke) na lokacijah IOSDV Jable in IOSDV Rakičan v letu 2008 (µg DON kg <sup>-1</sup> moke).....	73
Preglednica 29: Kontaminiranost bele moke kultivarja Savinja z DON v IOSDV Jable leta 2008 (transformirane vrednosti okužbe $\sqrt{(\frac{1}{2} + x)}$ ) .....	73
Preglednica 30: Testiranje razlik glede na DON med tremi vzorci bele (b) in tremi vzorci črne (č) moke kultivarja Savinja na IOSDV Jable za leto 2008 (transformirana vrednost okužbe $\sqrt{(\frac{1}{2} + x)}$ ) .....	74
Preglednica 31: Razlika v kontaminiranosti moke z DON med belo in črno moko pri kultivarju Savinja v IOSDV Jable v letu 2008 (transformirana vrednost okužbe $\sqrt{(\frac{1}{2} + x)}$ ) .....	74
Preglednica 32: Kontaminiranost črne moke z DON pri kultivarju Savinja v IOSDV Jable v letu 2008 (transformirana vrednost okužbe $\sqrt{(\frac{1}{2} + x)}$ ) .....	74
Preglednica 33: Kontaminiranost bele in črne moke z ZEA nad mejo detekcije (<5 µg ZEA kg <sup>-1</sup> moke) pri kultivarju Reska na lokacijah IOSDV Jable in IOSDV Rakičan v letu 2008 (µg kg <sup>-1</sup> moke).....	75
Preglednica 34: Analiza variance kontaminiranosti pšenične črne moke z ZEA; IOSDV Jable 2008, kultivar Reska; transformirana vrednost okužbe $\sqrt{(\frac{1}{2} + x)}$ .....	75
Preglednica 35: Statistična značilnost kontaminiranosti črne pšenične moke kultivarja Reska z mikotoksinom ZEA v odvisnosti od gnojenja z N-min in organskimi gnojili na lokaciji IOSDV Jable v letu 2008.....	76
Preglednica 36: Kontaminiranost bele in črne moke kultivarja Savinja z mikotoksinom ZEA nad mejo detekcije (< 5 µg ZEA kg <sup>-1</sup> moke) na lokacijah IOSDV Jable in IOSDV Rakičan v letu 2008 (µg kg <sup>-1</sup> moke).....	77
Preglednica 37: Statistična značilnost vpliva postopkov pridelovanja pšenice kultivarja Savinja na kontaminacijo njene črne moke z mikotoksinom ZEA (IOSDV Jable, 2008) ..	77

Preglednica 38: Razlika v kontaminiranosti z mikotoksinom ZEA med belo moko (b) variante BN2 in črno moko (č) variante BN2 pri kultivarju Savinja na lokaciji IOSDV Jable leta 2008 (t-test).....	77
Preglednica 39: Korelacijska analiza med gnojenjem z N-min in organskimi gnojili ter pojavom <i>Fusarium</i> spp. in mikotoksinov pri kultivarjih pšenice Reska in Savinja v IOSDV Jable.....	78
Preglednica 40: Korelacijska analiza med gnojenjem z N-min in organskimi gnojili ter pojavom <i>Fusarium</i> spp. in mikotoksinov DON in ZEA pri kultivarjih pšenice Reska in Savinja na lokaciji IOSDV Rakičan.....	79
Preglednica 41: Preglednica vplivov postopkov pridelovanja na pojav mikotoksinov DON in ZEA v pšenični moki na lokacijah IOSDV Jable in IOSDV Rakičan (2006 in 2008)....	82

## KAZALO SLIK

Slika 1: Vrstična elektronska mikrostruktura okužbe pšenične (kultivar Nandu) pleve z glivo <i>F. graminearum</i> (Boenisch in Schäfer, 2011).....	6
Slika 2: Kemijska struktura mikotoksina deoksinivalenol (DON) (Pestka in sod., 2008) ..	18
Slika 3: Kemijska struktura mikotoksina zearalenon (ZEA) (Ouanes in sod., 2005) .....	21
Slika 4: Shema trajnega poljskega eksperimenta IOSDV Jable .....	43
Slika 5: Gibanje letnih temperatur na lokaciji Jable od postavitve IOSDV poskusa, obdobje 1993–2010 (SURs, 2011). V enačbi trenda pomeni x leto, y pa povprečno letno temperaturo v danem letu. ....	53
Slika 6: Gibanje letnih količin padavin na lokaciji Jable v obdobju od 1993 do 2010 (SURs, 2011). V enačbi .....	55
Slika 7: Okuženost pšeničnih zrn kultivarja Reska s <i>Fusarium</i> spp. v postopkih pridelovanja AN0 (levo) in BN0 (desno) na lokacijah IOSDV Jable (levo) in IOSDV Rakičan (desno) v letu 2006 .....	56
Slika 8: Okuženost pšeničnih zrn kultivarja Reska (levo) in Savinja (desno) s <i>Fusarium</i> spp. v postopkih pridelovanja BN1 na lokaciji IOSDV Rakičan v letu 2006 .....	56
Slika 9: Okuženost pšeničnih zrn kultivarja Reska s <i>Fusarium</i> spp. v postopkih pridelovanja BN2 na lokaciji IOSDV Rakičan (levo) in IOSDV Jable (desno) v letu 2006 .....	57
Slika 10: Okuženost pšeničnih zrn kultivarja Savinja s <i>Fusarium</i> spp. v postopkih pridelovanja BN3 (levo) in AN3 (desno) na lokaciji IOSDV Rakičan v letu 2006. ....	57
Slika 11: Gibanje letnih temperatur na lokaciji Rakičan od postavitve poskusa IOSDV leta 1993 do leta 2010 (SURs, 2011). V enačbi trenda pomeni x leto, y pa povprečno letno temperaturo v danem letu. ....	62
Slika 12: Gibanje letne količine padavin na IOSDV Rakičan od zasnove poskusa, obdobje 1993–2010 (SURs, 2011). V enačbi trenda pomeni x leto, y pa povprečno letno količino padavin v danem letu. ....	64
Slika 13: Interakcija 'Lokacija x leto' glede okuženosti pšeničnih kultivarjev Savinja in Reska s <i>Fusarium</i> spp. na zrnju na lokacijah IOSDV Jable in IOSDV Rakičan v letih 2006–2008 .....	66

## KAZALO PRILOG

**Priloga A:** Povprečne letne temperature in letne vsote padavin, dolgoletna povprečna temperatura in dolgoletna povprečna vsota padavin v obdobju od začetka postavitve poskusa IOSDV (1993–2010) v Jablah in Rakičanu (SURS, 2011)

**Priloga B1:** Vlažnost in okuženost pšeničnega zrnja s *Fusarium* spp. pri kultivarjih Savinja in Reska v odvisnosti od postopkov pridelovanja na lokaciji Jable v letu 2006 (odstotki, %)

**Priloga B2:** Vlažnost in okuženost pšeničnega zrnja s *Fusarium* spp. pri kultivarjih Savinja in Reska v odvisnosti od postopkov pridelovanja na lokaciji Rakičan v letu 2006 (odstotki, %)

**Priloga B3:** Vlažnost in okuženost pšeničnega zrnja s *Fusarium* spp. pri kultivarjih Savinja in Reska v odvisnosti od postopkov pridelovanja na lokaciji Jable v letu 2007; žetev 14. 7. 2007 (odstotki, %)

**Priloga B4:** Vlažnost in okuženost pšeničnega zrnja s *Fusarium* spp. pri kultivarjih Savinja in Reska v odvisnosti od postopkov pridelovanja na lokaciji Rakičan v letu 2007; žetev 9. 7. 2007 (odstotki, %)

**Priloga B5:** Vlažnost in okuženost pšeničnega zrnja s *Fusarium* spp. pri kultivarjih Savinja in Reska v odvisnosti od postopkov pridelovanja na lokaciji Jable v letu 2008; žetev 26. 7. 2008 (odstotki, %)

**Priloga B6:** Vlažnost in okuženost pšeničnega zrnja s *Fusarium* spp. pri kultivarjih Savinja in Reska v odvisnosti od postopkov pridelovanja na lokaciji Rakičan v letu 2008; žetev 16. 7. 2008 (odstotki, %)

**Priloga B7:** Okuženost pšeničnega zrnja s *Fusarium* spp. (v odstotkih, %) na lokaciji IOSDV Jable v letih 2006, 2007 in 2008 (po blokkih, s povprečji)

**Priloga B8:** Okuženost pšeničnega zrnja s *Fusarium* spp. (v odstotkih, %) na lokaciji IOSDV Rakičan v letih 2006, 2007 in 2008 (po blokkih, s povprečji)

**Priloga B9:** Okuženost pšeničnega zrnja s *Fusarium* spp. (transformirane vrednosti) na lokaciji IOSDV Jable v letih 2006, 2007 in 2008 (po blokkih, s povprečji)

**Priloga B10:** Okuženost pšeničnega zrnja s *Fusarium* spp. (transformirane vrednosti) na lokaciji IOSDV Rakičan v letih 2006, 2007 in 2008 (po blokkih, s povprečji)

**Priloga C1:** Kontaminiranost pšenične moke kultivarjev Reska in Savinja z mikotoksinoma deoksinivalenol in (DON) in zearalenon (ZEA) na lokaciji IOSDV Jable v letu 2006 ( $\mu\text{g kg}^{-1}$  moke)\*

**Priloga C2:** Kontaminiranost pšeničnega zrnja kultivarjev Reska in Savinja z mikotoksinoma deoksinivalenol (DON) in zearalenon (ZEA) na lokaciji IOSDV Rakičan v letu 2006 ( $\mu\text{g kg}^{-1}$  moke)\*

**Priloga C3:** Kontaminiranost pšeničnega zrnja kultivarjev Reska in Savinja z mikotoksinoma deoksinivalenol (DON) in zearalenon (ZEA) na lokaciji IOSDV Jable v letu 2008 ( $\mu\text{g kg}^{-1}$  moke)\*

**Priloga C4:** Kontaminiranost pšeničnega zrnja kultivarjev Reska in Savinja z mikotoksinoma deoksinivalenol (DON) in zearalenon (ZEA) na lokaciji IOSDV Rakičan v letu 2008 ( $\mu\text{g kg}^{-1}$  moke)\*

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ADI/TDI	sprejemljivi dnevni vnos, izražen v mg kg <sup>-1</sup> telesne mase na dan (acceptable or tolerable daily intake)
a <sub>w</sub>	vodna aktivnost (water activity)
DON	deoksinivalenol
EFSA	Evropska agencija za varno hrano (European Food Safety Authority)
ELISA	encimski imunski test (enzyme-linked immunosorbent assay)
FWK	Wasserfeldkapazität (poljska kapaciteta za vodo); količina vode v tleh dva dneva potem, ko so bila tla popolnoma zasičena z vodo in je gravitacijska voda odtekla; WHC (water holding capacity)
GC	plinska kromatografija (gas chromatography)
GRAS	splošno priznano kot varno (generally regarded as safe)
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (high performance liquid chromatography)
HPLC-FLD	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (high performance liquid chromatography with postcolumn fluorescence derivatization)
IOSDV	nem. Internationalen organischen Stickstoff – Dauerdüngungsversuche (Mednarodni trajni poskusi z organskim dušikom)
JECFA	Skupni strokovni komite za aditive živil (Joint Expert Committee on Food Additives)
JECFI	Skupni strokovni komite o obsevanju živil (Joint Expert Committee on Food Irradiation)
LC	tekočinska kromatografija (liquid chromatography)
LC-MS	tekočinska kromatografija z masno spektrometrijo (liquid chromatography – mass spectrometry)
LC-MS/MS	tekočinska kromatografija s tandemsko masno spektrometrijo (liquid chromatography - tandem mass spectrometry)
LD <sub>50</sub>	količina toksina, ki povzroči smrt 50 % populacije testiranih živali (lethal dose <sub>50</sub> )
N-min	mineralni dušik
nFK	koristna poljska kapaciteta za vodo (nutzbare Wasserfeldkapazität); kapaciteta vode, ki jo pri polni zasičenosti tal lahko koristijo rastline; AWC (available water capacity of soil)
NOAEL	odmerek brez opaznega zdravju škodljivega učinka (no observed adverse effect level)
PHA	fitohemaglutinin (lektin, ekstrahiran iz fižola; sestoji iz dveh proteinov; aglutinira človeške eritrocite in stimulira limfocite, da se pričnejo deliti, kar izkoriščajo pri citogenetskih raziskavah)
PMTDI	začasni maksimalni še dopustni dnevni vnos (provisional maximum tolerable daily intake)
PMTWI	začasni maksimalni še dopustni tedenski vnos (provisional maximum tolerable weekly intake)
RIA	radioimunološki test (radioimmunoassay)
SPI	spiroksimin
TEB	tebukonazol
F izr.	Izračunana F-vrednost

$t_{izr}$ .	izračunana vrednost t-porazdelitve
TLC	tankoplastna kromatografija (thin layer chromatography)
VDLUFA	Zveza nemških raziskovalnih in preskuševalnih ustanov v kmetijstvu (Verband Deutscher Landwirtschaftlichen Untersuchungs- und Forschungsanstalten)
WHO	Svetovna zdravstvena organizacija (World Health Organization)
ZEA	Zearalenon

## 1 UVOD

### 1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Mikotoksini so rezultat sekundarnega metabolizma mikotoksikogenih plesni, ki se med drugim razraščajo tudi pri nožnih glivičnih obolenjih pri žitih; pri pšenici, koruzi, ječmenu in tritikali se pogosto pojavljajo glive iz rodu *Fusarium*. Vidni znaki obolenj so lahko prisotni po vseh delih rastlin, predvsem na socvetjih (klasih, latih, storžih, metlicah) in zrnju, s tem zmanjšujejo njihov pridelek in zlasti kakovost. Med izjemno problematične mikotoksine se uvrščata mikotoksina deoksinivalenol (DON) in zearalenon (ZEA), zato sta oba v zadnjem času predmet številnih raziskav po svetu (European Commission, 1999; Atroshi in sod., 2002; Schothorst in van Egmond, 2004; Binder in sod., 2007; Škrinjar, 2008; Horstmann, 2008; Kumar in sod., 2008; Muri in sod., 2009; Leatherhead Food Research, 2010; Jakovac Štrajn in sod., 2010; Kalcher Tavčar in sod., 2011; Srey in sod., 2014 itd.). Preko živil ali krme lahko mikotoksina DON in ZEA preideta v človeški ali živalski organizem. DON, na primer, škodljivo deluje na imunski sistem, povzroča tudi neješčnost in bruhanje, veliko grožnjo pa predstavlja zdravju ljudi in domačih živali tudi zaradi škodljivega učinkovanja na prebavni sistem; na molekularnem nivoju DON moti normalno celično funkcijo in zavira sintezo beljakovin z vezavo na ribosome in z aktivacijo celičnih kinaz, ki s transdukcijo vodijo v proliferacijo, diferenciacijo in apoptozo (Waškiewicz in sod., 2014). Pšenica, kontaminirana z visokimi odmerki mikotoksina DON, po uživanju pogosto izzove akutno stanje, simptome, kot so slabost, povišana telesna temperatura, glavobol in bruhanje. Nizki odmerki dolgoročno povzročajo kronična obolenja, npr. imunotoksičnost (Nogueira da Costa in sod., 2011). Zaradi tolikšne toksičnosti FDA v ZDA svetuje omejitev na največji dovoljen vnos 5 µg/g mikotoksina DON iz žitnih proizvodov za vso živalsko krmo in 10 µg/g mikotoksina DON iz žitnih proizvodov za govedo (Waškiewicz in sod., 2014), ZEA pa deluje na hormon estrogen in posledično zmanjšuje fertilitnost pri živalih in ljudeh. Mikotoksin ZEA je rastlinski hormon, ki poleg svojih anaboličnih lastnosti izraža predvsem estrogene učinke, zaradi katerih povzroča motnje plodnosti pri živalih (kravah, konjih, ovcah, svinjah ipd.), kar predstavlja tudi potencialno tveganje za zdravje človeka, ki se prehranjuje z živilom rastlinskega in živalskega izvora. Kot imunotoksična spojina, podobna estrogenu in nekaterim drugim hormonskim motilcem, ima ZEA toksične učinke na delovanje imunskega sistema, spodbujanje zmanjšanja telesne mase (ki ni v celoti pojasnjena z zmanjšano porabo hrane), povzroča atrofijo timusa s histološkimi spremembami fenotipa in zmanjšanje odstotka B-celic v vranici, oslabi pa tudi nastajanje protiteles in izločanje peroksidaze iz makrofagov (Hueza in sod., 2014). Analiza vsebnosti ZEA in DON, zlasti v zrnju pšenice in drugih žitih, postaja zaradi dosedanjih raziskav v EU zakonska obveznost, ki jo je morala privzeti tudi Slovenija (European Commission, 1999).

Rutinska analiza toksinov v zrnju ali moki je način, kako preprečimo uživanje z DON in ZEA preveč kontaminiranih živil; toda pridelek je takrat že na trgu, in v primeru, ko kakovost ni ustrezna, je škoda nepopravljiva. Zato se je po možnosti bolje preventivno izogniti neugodnim razmeram, v katerih se pojavljajo *Fusarium* spp. Tako je treba definirati tudi okoljske razmere, ki vzpodbujajo pojav *Fusarium* spp. ter mikotoksinov na pšenici.



Medtem ko potekajo številna preučevanja vsebnosti mikotoksinov v pšeničnem zrnju ali v moki, vplivi rasti in razvoja pšenice na pojav mikotoksinov še niso definirani. Obstajajo le redke raziskave pojavnosti mikotoksinov na zrnju ali v moki, ki izhajajo iz razčlenjevanja diferenciranih in obenem natančno določenih pridelovalnih razmer. Nekateri dejavniki, ki omogočajo večji pojav *Fusarium* spp. in mikotoksinov, so znani, na primer sledenje žita za žitom v njivskem kolobarju ali na *Fusarium* spp. bolj ali manj odporni kultivarji; drugi pomembni dejavniki vpliva na pojav mikotoksinov pa še niso raziskani, na primer, kolikšen je vpliv intenzivnejšega ali ekstenzivnejšega gnojenja z dušikom, kakšen vpliv imajo različne vrste organskih gnojil (gnoj, slama, brez organskega gnojenja itd.).

Utemeljitev raziskovalnega problema teme disertacije določa ideja, da bi na podlagi različne kontaminiranosti zrnja z mikotoksinoma ZEA in DON pri specifičnih okoljskih razmerah (različni postopki pridelovanja, vključno z različnimi lokacijami) definirali razmere pridelovanja (na primer visoki odmerki gnoja ali N-min), ki bi se jim bilo treba v pridelavi izogibati.

## 1.2 CILJ RAZISKOVANJA

Namen dela je preučiti vpliv različnih postopkov pridelovanja pšenice v kolobarju na pojavljanje mikotoksinov gliv iz rodu *Fusarium* spp. (pregl. 1), predvsem *F. graminearum* in *F. culmorum*, na pšenici, ki je pridelana v različnih, vendar večinoma neznanih okoljskih razmerah. Študija obravnava preučevanje vpliva na tak način opredeljenih okoljskih razmer na okužbo zrnja s *Fusarium* spp. in na pojav mikotoksinov DON in ZEA. V nasprotju z večino dosedanjih tovrstnih raziskav, ki so potekale večinoma v malo niansiranih pridelovalnih postopkih in v katerih je bil pojav mikotoksinov DON in ZEA preučevan pogosto le v zrnju kot enovitem organizmu, obravnava ta študija preučevanje *Fusarium* spp. in pojavljanje mikotoksinov pri zelo različnih intenzivnostih pridelovanja, v daljših časovnih razsežnostih, in sicer na zrnju, zmletem v belo in črno moko. S koriščenjem dveh objektov trajnih statičnih poljskih poskusov v kolobarju, ki potekata na različnih območjih Slovenije (Jable na Mengeškem polju in Rakičan pri Murski Soboti), želimo ugotoviti, kako skozi daljše časovno obdobje diverzificirani postopki pridelovanja pšenice in drugih poljščin v kolobarju vplivajo na pojav *Fusarium* spp., predvsem pa na vsebnost mikotoksinov DON in ZEA v beli in črni pšenični moki.

Končni cilj raziskave je, da bi z na ta način pridobljenimi izsledki pomembno izboljšali možnosti za zagotavljanje mikotoksikološko varnejše pridelave pšenice za živilsko industrijo, v primerjavi s sedanjo, precej nekontrolirano proizvodnjo pšeničnih izdelkov.

## 1.3 DELOVNE HIPOTEZE

- V konvencionalni pridelavi poljščin, kjer gnojijo z mineralnim dušikom (v nadaljevanju N-min), je pojav *Fusarium* spp. in mikotoksinov deoksinivalenol (DON) in zearalenol (ZEA), ki ju izločalo nekatere glive iz rodu *Fusarium* L. kot produkt sekundarnega metabolizma, večji kot v pridelavi brez N-min (ekološko prijazna pridelava).

- Vizualni znaki *Fusarium* spp. na pšeničnem zrnju korelirajo s pojavom DON in ZEA v pšeničnem zrnju in moki.
- Klima oziroma vremenske razmere rastišča v posameznem letu (padavine in temperatura) pomembno vplivajo na pojav DON in ZEA v pšeničnem zrnju in moki.
- Z optimiziranjem pridelovalnih postopkov lahko vplivamo na zmanjšanje pojavljanja *Fusarium* spp. in vsebnosti mikotoksinov DON in ZEA v pšeničnem zrnju in moki.
- Črna moka ima višjo vsebnost DON in ZEA kot bela moka.
- Kultivar pšenice vpliva na vsebnost DON in ZEA v pšeničnem zrnju in moki.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 MIKOTOKSIKOLOGIJA

Zgodovinski pregled večjih zastrupitev živali in ljudi s toksini v preteklosti navajajo različni avtorji (Northolt in sod., 1996; van Egmond, 1996; Kocić Tanackov in Dimić, 2013 idr.): leta 1762 ergotizem (*Claviceps purpurea*); alimentarna toksična aleukija (*Fusarium sporotrichioides*) leta 1944, zastrupitve med 2. svetovno vojno s trihoteceni v pšenici, ki je prezimila na polju in jo je prerasla plesen; v letih 1924–1936 ter leta 1957 različne večje zastrupitve goveda, konj in svinj s kontaminirano krmo s plesnimi *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*; leta 1952 balkanska endemska nefropatija zaradi ohratoksina A itd. Največje izbruhe obolenj zaradi *Fusarium* sp. so registrirali v koruzi v letih 1968, 1972, 1974 in 1984 ter v pšenici v zgodnjih 70. letih 20. stoletja. Posledično so hkrati oziroma v naslednjih letih evidentirali večje epidemije bolezni pri živalih, zlasti pri pujskih: motnje v delovanju estrogena, bruhanje, zavračanje hrane, hemoragične bolezni idr. (Lević in sod., 2004).

Mikotoksine so pričeli najintenzivneje raziskovati po letu 1960, ko je po zaužitju zemeljskih oreškov arašidov, ki so bili okuženi s plesnijo *Aspergillus flavus*, zaradi akutne nekroze jeter in hiperplazije žolčevoda (aflatoksikoza) poginilo 100.000 puranov ter ogromno rac in fazanov (D'Mello in Macdonald, 1997).

Kot prve so glede na incident aflatoksikoze tolikšnega obsega perutnine identificirali in izolirali aflatoksine, ki danes spadajo med najbolj raziskane mikotoksine, od leta 1970 naprej pa še mnoge druge. Do danes je znanih že približno 400 različnih mikotoksinov s potencialnim toksičnim učinkom, ki jih proizvaja več kot 100 različnih plesni. Literarni podatki navajajo 432 identificiranih toksikogenih gliv, slaba četrtina jih je toksičnih za sesalce. Največ podatkov najdemo o aflatoksinih, ohratoksinu A, sterigmatocistinu, patulinu, penicilinski kislini, citrininu, zearalenonu, penitremu A, ergot alkaloidih in toksinih višjih gliv (Watson, 1985). Verjetno bodo precej še neznanih mikotoksinov odkrili v bližnji prihodnosti, ko bo analitika še bolj napredovala, tudi zaradi bojazni pred večjo ekonomsko škodo, ki jo lahko povzročajo mikotoksikoze pri intenzivni živinoreji (Kalcher Tavčar in sod., 2007).

Z uživanjem hrane smo ljudje dnevno izpostavljeni morebitnim mikotoksinom v živilih. Dolgotrajna izpostavljenost lahko povzroča razvojne in hormonske motnje, bolezni in deformacije. Žita in izdelki iz žit predstavljajo osnovno hrano pretežnega dela razvitega sveta, zato je njihova neoporečnost še posebno pomembna (Kovač, 2009).

Mikotoksini v žitih so poleg ostankov pesticidov, težkih kovin, radioaktivnosti in alkaloidov iz semen strupenih plevelov večji onesnaževalci, ki predstavljajo pomembno, za žita značilno kemijsko tveganje surovin za mletje. Kemijski onesnaževalci izvirajo iz slabe pridelovalne prakse ter neupoštevanja sodobnih agrotehničnih načel, vključno z nepravilnim skladiščenjem. Z nadaljnjimi postopki v predelavi živil jih ni mogoče odstraniti, zato predstavljajo resno tveganje, na katero mlevska industrija nima dovolj vpliva, zato jih mora z ustreznim sistemom kontrole tveganja vhodnih surovin zaznati in izločiti. Odkrivanje teh tveganj v surovinah in izdelkih pa je finančno zahtevno, zato je za

čim manjše verjetnosti pojavljanja nujno potrebno preventivno ukrepanje v pridelavi (Kovač, 2009).

FAO (Food and Agriculture Organization) ocenjuje, da je v današnjem času kar 25 % svetovnega pridelka poljščin okuženega z mikotoksini, kar seveda ne predstavlja le velikega deleža neustrezne hrane z zdravstvenega vidika, pač pa tudi zelo občutno ekonomsko izgubo (Aziz in Moussa, 2002). Vpogled v kontaminiranost s plesnijo in posledično pojavnost mikotoksinov v žitih (koruza, pšenica, ječmen, tritikala, krmni grah), ki jih kmetje v Sloveniji pridelujejo in uporabljajo tudi za prehrano živali, so raziskovali Jakovac Štrajn in sod. (2010) ter ugotovili, da je bilo skupno kontaminiranih kar 73 % vzorcev (največ s plesnijo *Fusarium* spp.), z mikotoksinom DON (66 %) v vsebnosti od 150–14420  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , sledijo ZEA (30 %, 20–630  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), fumonizin B1 (28 %, 10–4863  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) in fumonizin B2 (21 %, 10–1629  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ). Toksina HT-2 in T-2 sta bila ugotovljena v okviru nizkih vrednosti v dveh, aflatoksin B1 in ohratoksin A pa v enem vzorcu. Dobljeni rezultati kažejo na to, da je nadaljnja kontrola saprofitskih mikroorganizmov in mikotoksinov v krmi iz primarne proizvodnje v Sloveniji vsekakor potrebna in upravičena.

Ni pa pomembno le odkrivanje kontaminacije krme in hrane, temveč tudi odkrivanje in odstranjevanje vzrokov za pojav teh povzročiteljev mikotoksikoz. Tudi druge, v zadnjih letih opravljene raziskave (npr. Gregorčič in sod., 2009), nakazujejo, da smo danes ljudje in živali skoraj zagotovo kronično izpostavljeni mikotoksinom (rakava obolenja, obolenja ledvic, imunosupresija idr.), zato se intenzivno raziskujejo možnosti za preprečevanje kontaminacije pridelkov. Strokovnjaki razvijajo na plesni odporne vrste, kultivarje rastlin in različne fungicide, vendar do danes še ne poznamo nobene zares učinkovite zaščitne metode, s katero bi se izognili pojavu mikotoksinov v pridelkih (Jakovac Štrajn in sod., 2004).

Kalcher Tavčar in sod. (2007) so v letih 2002–2006 preučevali kontaminacijo krme, med drugim tudi z mikotoksinom ZEA, in sicer v 420 vzorcih, odvzetih večinoma v živinorejskih obratih, mešalnicah krmnih mešanic ali pa ob uvozu surovin za izdelavo krmnih mešanic. Z metodo tekočinske kromatografije v povezavi s fluorescenčnim detektorjem in predhodnim čiščenjem vzorcev na imunoafinitetnih kolonah so ugotovili povprečno vsebnost mikotoksina ZEA (povprečna vsebnost 178  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) kar v 42 % preiskanih vzorcih različne krme (vrednosti ZEA so se gibale med 20 in 3690  $\mu\text{g kg}^{-1}$  vzorca).

V največji meri povzročajo težave pri živalih in višjih rastlinah plesni iz rodov *Aspergillus*, *Penicillium* in *Fusarium*. Okuženost z omenjenimi plesnimi ne povzroča le manjšega pridelka, kvara živil in krme (ter posledično njuno slabše hranilne vrednosti), pač pa tudi pomembno onesnaženje živil z mikotoksini (Kalcher Tavčar in sod., 2007), ki so problematični zaradi zastрупitev ter bolezni, ki jih povzročajo; imenujemo jih mikotoksikoze. Te vodijo v kronične zastрупitve, kar povzroča poškodbe prebavnega trakta in odpovedi vitalnih organov (ledvic, jeter, pljuč) (Casteel in Rottinghaus, 2000).

Po definiciji so mikotoksini izključno naravni sekundarni toksični izločki oz. metaboliti, ki jih med razraščanjem na rastlinah in živilih sintetizirajo nitaste, saprofitske plesni (Bauer

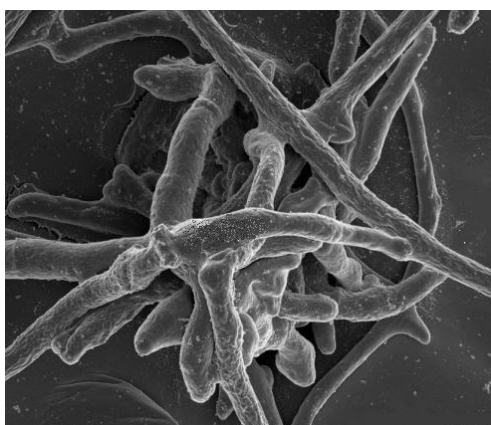
in sod., 2003). Na organizme, celične kulture in izolirane celične sestavine delujejo toksično (Steyn, 1980).

Besedo mikotoksin sestavlja grška beseda »mykes« s pomenom »glive« in latinska beseda »toxicum« s pomenom »strup«. Beseda torej pomeni strup glive ter se kot taka uporablja izključno za imenovanje in opis sekundarnih metabolitov plesni (Bullerman, 2003). Do leta 2000 so odkrili več kot 300 mikotoksinov (Kalcher Tavčar in sod., 2007).

Kemijsko so mikotoksini zelo različne, relativno enostavne, nizkomolekularne in termostabilne naravne organske alifatske ali ciklične spojine z nekaj ogljikovimi atomi. Njihova rast lahko povzroči organoleptične, fizikalne in kemijske spremembe (barva, vsebina, vonj) živila (Nemanič, 1989).

Mikotoksini so presnovni produkt plesni, ki se poleg kvasovk in dimorfnih gliv uvrščajo v heterotrofno, evkarionsko skupino mikroorganizmov, imenovano glive (ph. Mycota). So aerobi, za razrast pa jim zadošča že zelo malo kisika, ker ga dobijo od substrata, na katerem se nahajajo. Najbolje uspevajo na vlažnem substratu z relativno vlago 13–20 % in vlago okolja nad 80 % ter zmerno visoko temperaturo od 20 °C do 30 °C. Razvijajo se pri pH 1,5 do 8,5, sicer jim bolj ustreza višja pH-vrednost. V vročih poletjih in deževnih hladnejših jesenih je pojavnost mikotoksinov večja (Nemanič, 1989).

Plesni so večcelični mikroorganizmi, sestavljeni iz številnih osnovnih celic – razvejanih niti oz. hif, ki so lahko septirane, njihov preplet pa tvori micelij (strukturni prikaz plesni je dobro viden na sliki 1), s katerim se plesni pritrjujejo, prehranjujejo (absorbirajo) in razmnožujejo ter skozenj izločajo poleg encimov za razgradnjo makromolekul tudi sekundarne metabolite, in sicer v fazi, ko je aktivna rast gliv ustavljena, tj. v stacionarni fazi rasti. Ti sekundarni metaboliti oz. mikotoksini lahko v miceliju tudi ostanejo (endotoksini) ali pa iz njega prehajajo na/v medij, na/v katerem plesen, ki jih izloča, raste (eksotoksini) (Steyn, 1980).



Slika 1: Vrstečna elektronska mikrostruktura okužbe pšenične (kultivar Nandu) pleve z glivo *F. graminearum* (Boenisch in Schäfer, 2011)

Figure 1: Scanning electron microstructure of infection of wheat (cultivar Nandu) chaff with the fungus *F. graminearum* (Boenisch and Schäfer, 2011)

Dolgi izrastki, nitke oz. hife se sicer v splošnem spletajo v micelije, kadar pa se hife močno zgostijo, se tvori sklerocij, s katerim se glive za več let prilagodijo na neugodne okoljske razmere in se z njim nesporno razmnožujejo; tvorijo eksospore in endospore (Hawksworth, 1983). Kljub nastanku neugodnih življenjskih pogojev (pri izjemno visokih in nizkih temperaturah ter v ekstremno kislem ali suhem okolju) se torej celice lahko pretvorijo v spore, ki preživijo.

V nasprotju z ostalimi glivami je metabolizem plesni sestavljen iz primarnega metabolizma, ki ga predstavlja hranilo iz substrata, najpogosteje iz ogljikovih hidratov, ki se uporabljajo neposredno za rast in razvoj plesni, nastanek primarnih metabolitov, kot so metanol, različne organske kisline in polioli, glikogen in lipidi, in sekundarnega metabolizma, ki ga predstavlja sinteza mikotoksinov kot sekundarnih metabolitov. Sekundarni metabolizem naj bi imel vlogo preprečevanja rasti kompetitivnih mikroorganizmov oz. njihovega uničenja (funkcija lastne obrambe pred drugimi mikroorganizmi) (Benford in sod., 2001). Domneva se, da imajo mikotoksini plesni velik ekološki pomen v smislu zaščite genoma pred mikroorganizmi, insekti in drugimi višje razvitimi živalmi, saj se sekundarni metaboliti, tako tudi mikotoksini, tvorijo proti in po koncu rasti celične mase ter v času začetka sinteze spor, torej niso nujno potrebni za rast same plesni (Northolt in sod., 1996).

Vir ogljika za sintezo svojih beljakovin plesni črpajo iz substratovih ogljikovih hidratov, maščob in tudi beljakovin. Vse vrste plesni lahko asimilirajo organski dušik, anorganski dušik (amonijevi ioni, nitrati, sečnina) pa le nekatere izmed njih (Northolt in sod., 1996).

Sposobnost sinteze različnih ekstracelularnih encimov in rast pri nizkih  $a_w$ -vrednostih omogoča pojavljanje najpogosteje odgovornih plesni (*Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*) za prisotnost mikotoksinov v številni in zelo raznoliki hrani. Zaradi hif imajo plesni izjemne penetracijske sposobnosti ter se zato nahajajo tudi zelo globoko v substratih (Trček, 1996).

Mikrofloro toksikogenih plesni Nemanič (1989) deli na:

- plesni polja, ki rastejo na žitu pred žetvijo (predvsem rodovi *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Helminthosporium*),
- plesni, ki rastejo na poškodovanih ali starajočih se rastlinah (rodovi *Fusarium*, *Cheatomium*, *Aspergillus flavus*) ter
- plesni skladišča, ki začnejo z rastjo že pred žetvijo, ob ugodnih razmerah pa z rastjo in tvorbo mikotoksinov nadaljujejo med skladiščenjem (*Penicillium*, *Aspergillus*).

Po Mossu (1992) preidejo mikotoksini v hrano po treh poteh: z okužbo z mikotoksikogeno plesnijo na polju še pred žetvijo, z okužbo z mikotoksikogeno plesnijo med skladiščenjem surovine ali pa s sekundarno kontaminacijo z mikotoksini. Poljske plesni se pojavljajo predvsem na zrnju žit med zorenjem. Najpomembnejše poljske plesni spadajo v rod *Fusarium* in se pogosto namnožijo v hladnem in vlažnem vremenu med dozorevanjem pridelkov. V ustreznih skladiščnih pogojih večina teh plesni odmre, vendar pa njihove spore in sekundarni toksični presnovki, ki jih imenujemo mikotoksini, v substratu ostanejo. Nekatere plesni lahko daljše obdobje mirujejo in se ob povečani vlagi začnejo ponovno razmnoževati (Jakovac Štrajn in sod., 2010).



Polje se okuži s plesnijo s sporami iz zraka, s sklerociji v zemlji, zaradi vpliva ostalih prisotnih mikroorganizmov ali zaradi genetske dispozicije same rastline na polju. Plesen začne s tvorbo mikotoksinov ob ustreznih ekoloških razmerah in pri tem lahko sploh ne vpliva negativno na rast rastline (pojavljajo se v obliki nevidnih znakov, na primer miceliji vrste *Aspergillus flavus* na koruzi, ki izloča aflatoksin) ali pa so znaki okužbe (kraste, rastlinska rja itd.) vidni že navzven, kot na primer *Fusarium graminearum* na pšenici, ječmenu ali koruzi in *Fusarium culmorum* na pšenici, ječmenu, rži in ovsu, kjer jih lahko opazimo že s prostim očesom, oba sintetizirata DON in ZEA. Okužba z vrstami *Fusarium* se stopnjuje v hladnem in vlažnem ozračju v obdobju dozorevanja pridelka (Trček, 1996).

Agrotehnični postopki, ki vplivajo na nastanek mikotoksinov med rastjo, so kolobarjenje, rastline za podor, namakanje in gnojenje. Izjemnega pomena je kolobarjenje, ki temelji na prekinitvi prenašanja okužbe iz letine v letino; tako se npr. zelo obnese rotacija pšenice in stročnic, koruza pa se v rotaciji s pšenico močno odsvetuje, saj je prav tako oz. celo še bolj dovzetna za okužbe s plesnijo rodu *Fusarium* (Nicholson in sod., 2003).

Skladiščne plesni so v krmi praviloma v večjem ali manjšem obsegu, ker se krma z njimi kontaminira med spravilom in skladiščenjem. Razmnožujejo se v razmerah, ko poljske plesni že odmirajo. V to skupino spadajo plesni iz rodov *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Acremonium*, *Verticillium*. Na krmi, ki je skladiščena v neprimernem okolju, povzročijo te plesni raznobarvne plesnive prevleke. Tudi v na videz popolnoma zdravem zrnju se lahko nahajajo spore, iz katerih se v ugodnih razmerah razvijejo plesni, ki povzročijo kvarjenje krme. Relativna zračna vlaga pod 60 % preprečuje rast skoraj vseh vrst plesni. Pri enaki temperaturi kot plesni, vendar pri višji optimalni relativni vlagi (85–95 %), se v krmi pogosto začnejo razmnoževati kvasovke. Takšna krma spremeni barvo, okus in vonj. Kvasovke se dobro razvijajo ob prisotnosti kisika in v rahlo kislem mediju (Žust in sod., 2004).

Preprečevanje okužb po žetvi je pomemben korak pri preprečevanju kontaminacije z mikotoksini, vključuje pa izpopolnjene pogoje sušenja in skladiščenja skupaj z uporabo naravnih in kemičnih agensov ter namakanjem. Vlažnost je pri skladiščenju pomemben dejavnik rasti mikotoksikogenih plesni in nastanka mikotoksinov ter je eden glavnih razlogov za visoko kontaminacijo z mikotoksini v deželah v razvoju (Hell in sod., 2000).

Drugi kritični dejavnik, ki vpliva na rast plesni in nastanek mikotoksinov po žetvi, je temperatura. Temperaturni dvig za 2–3 °C v skladišču lahko povzroči napad plesni in insektov (žitni molji, žužki itd.), zato je redno preverjanje temperature v določenih intervalih zelo priporočljivo (temperatura se ne sme spreminjati). Skladišča morajo biti suha in zgrajena tako, da so varna pred dežjem ali kakršnimkoli drugim vdorom vode ter zaščitena pred glodalci in ptiči (Codex Alimentarius Commission, 2014).

Nekateri sevi plesni izločajo v krmo ob določenih pogojih mikotoksine, ki lahko povzročijo nastanek proizvodnih, zdravstvenih in reprodukcijskih motenj pri domačih živalih, kot ostanki v živilih živalskega izvora pa ogrozijo tudi zdravje ljudi. Razmere, ki pogojujejo tvorbo mikotoksinov, za večino plesni niso poznane. Na splošno velja, da suša, visoke temperature in vlaga, ko so gostiteljske rastline neodporne, pospešujejo njihov



nastanek (Kalcher Tavčar, 2007). Nekateri sevi posameznih vrst plesni izločajo mikotoksine samo v določenih razmerah, druge pa tvorijo pod različnimi zunanji vplivi več vrst toksinov, ki se razlikujejo po kemični zgradbi in toksičnosti.

Na živalih se učinki mikotoksinov ne opazijo specifično. Znamenja za okužbo živali so lahko slabša ješčnost, zaostajanje v rasti, manjša proizvodna sposobnost in slabša odpornost proti okužbam. Vse živalske vrste niso enako občutljive na mikotoksine. Vplivajo tudi starost, spol, prehransko ter imunsko stanje organizma. Ena najbolj občutljivejših živalskih vrst na mikotoksine so pujski, bolj kot poskusne miške, podgane ali prežvekovalci (Jakovac Štrajn, 2008).

V zadnjem času se je zaradi potrošnikovih zahtev po surovinah ekološke pridelave ter izdelkih brez prisotnih konzervansov in hkrati daljšim rokom trajnosti verjetnost okužbe s plesnimi povečala (Trček, 1996).

Še do nedavnega so se znanstveniki pri obvladovanju tveganja za zdravje večinoma ukvarjali s preučevanjem le ene sestavine kot dejavnika tveganja. Na področju varnosti živil pa se vedno bolj poudarja celostno obravnavanje; zmanjšanje tveganja ene sestavine namreč lahko poveča tveganje druge sestavine, kot lahko, na primer, zmanjšana uporaba fungicidov v pridelovanju poljščin posledično privede v potencialno povečanje vsebnosti mikotoksinov. Odgovorni za obvladovanje tveganja bi pred končno odločitvijo morali pretehtati vse potencialne posledice določenih ukrepov. V nedavni raziskavi so tehtali med različnimi snovmi kot dejavnikom tveganja, in sicer med fungicidoma spiroksimin (SPI) in tebukonazol (TEB) na eni strani ter mikotoksinoma DON in ZEA na drugi strani po kriteriju dostopnosti podatkov o porabi in toksičnosti navedenih snovi ter pod pogojem, da se mikotoksini tvorijo na polju (mikotoksina aflatoksin in ohratoksin A sta sicer pomembna zaradi kancerogenih učinkov, a se večinoma tvorita med skladiščenjem in ne na polju). Za oceno, kako vplivajo pridelki poljščin, ki so bile škropljene s fungicidi SPI in TEB, v primerjavi z vplivom mikotoksinov DON in ZEA, na zdravje ljudi, so uporabili model integrirane verjetnostne ocene tveganja toksičnih učinkov teh dveh mikotoksinov na posamezne skupine ljudi, ki jih združuje porazdelitev, značilna za stopnjo dovzetnosti posameznikov glede toksičnih učinkov (Van der Voet in Slob, 2007).

Porazdelitev individualne stopnje izpostavljenosti strupenim snovem predstavlja osnovo za primerjavo med sestavinami, učinki, področji in skupinami populacij (osnovano na dostopnih podatkih ter na predpostavki, da nobena izmed teh štirih sestavin nima vpliva na zdravje ljudi v obravnavanih scenarijih). Distribucija je bila naslednja:  $DON < TEB = ZEA < SPI$ , torej je DON sestavina z najvišjim potencialnim negativnim učinkom na zdravje. Muri in sod. (2009) so prikazali uporabo modela integrirane verjetnostne ocene tveganja toksičnih učinkov kot primer študije, katere namen je primerjava dejavnikov tveganja za zdravje ljudi zaradi izpostavljenosti fungicidom in mikotoksinom v hrani. Na fungicide lahko gledamo kot na snovi, ki se uporabljajo za zaščito rastlin pred okužbo s plesnimi in posledičnim preprečevanjem nastanka mikotoksinov, lahko pa kot na posledične potencialne ostanke uporabljenih fungicidov na in v pridelku. Fungicidi so pesticidi, katerih toksični potencial je izjemno natančno preučen, zato prav za vsak pesticid (fungicid) obstajajo obsežni toksikološki podatki. Žal je bistveni del teh podatkov zaupen in zato nedostopen splošni javni rabi. Nasprotno so

mikotoksini mnogo manj raziskani, zato je na voljo le malo podatkov o njihovi toksičnosti, pa še ti so pogosto rezultat prostovoljnih nestandardiziranih toksikoloških testov, zato so ponavadi objavljeni v znanstvenih revijah, ki so na voljo javni rabi (Muri in sod., 2009).

Fungicidi v različnih količinah različno učinkujejo na različne vrste plesni (različno na tiste, ki tvorijo oziroma ne tvorijo mikotoksinov). Nicholson in sod. (2003) na primer navajajo, da ima fungicid azoksistrobin zelo visoko aktivnost proti *Microdochium nivale* (ki ne tvori toksinov), proti *Fusarium* spp. pa le zelo omejeno učinkuje (boljši učinek ob uporabi polovičnih doz), ter da imajo TEB, metkonazol in HGCA2 nasprotno zelo visoko aktivnost proti *Fusarium* spp., proti *M. nivale* pa so neučinkoviti. Navajajo tudi, da polna doza uporabe značilno zmanjša obolenje s *Fusarium* spp. in posledično akumulacijo mikotoksina DON, vendar tudi v primeru, ko gre za močno obolenje s *Fusarium* spp. in se akumulirajo večje vrednosti DON v zrnju, celo že polovična doza fungicida (tebuconazole, metconazole and HGCA2) značilno zmanjša obolenje s *Fusarium* spp. ter akumulacijo mikotoksina DON. V primeru neizrazitega obolenja že polovične in tudi četrtinske doze uporabe fungicidov tebuconazole ali HGCA2 značilno zmanjšajo obolenja in pojavnost toksinov.

Znanstveniki in potrošniki različno dojemajo vsebnost mikotoksinov oz. fungicidov kot tveganje za zdravje. Potrošniki pogosto zavračajo sintetične sestavine v hrani, medtem ko je zavedanje glede vsebnosti mikotoksinov precej manjše. Splošna javnost povezuje tveganje za zdravje s pesticidi in ne z mikotoksini, kar pa ne velja za večino znanstvenikov, ki menijo, da k tveganju za zdravje ljudi močneje prispevajo potencialni učinki mikotoksinov kot pa ostanki fungicidov (Williams in Hammitt, 2001).

Znano je, da je pojavnost mikotoksinov višja v pridelkih ekološkega kot konvencionalnega načina pridelovanja, kar se zdi logično glede na to, da se fungicidi pri ekološkem kmetovanju ne uporabljajo, zaradi česar ni inhibirana niti rast plesni niti nastanek mikotoksinov. Kljub temu pa se je že v mnogih študijah pokazalo, da ima način pridelovanja na pojavnost mikotoksinov manjši vpliv kot ostali parametri; najvplivnejši dejavnik je toplo in vlažno vreme, večji vpliv od samega načina pridelovanja pa ima tudi prejšnji pridelek in razlike med kultivarji (Schachermayr in Fried, 2000).

Danes poznamo že več kot 300 mikotoksinov. V žitih so za zdravje živali najpomembnejši aflatoksini, fumonizini, ZEA, DON in alkaloidi rženega rožička (ergot alkaloidi), nekoliko manj problematični pa so toksin T-2 in drugi trihoteceni, ohratoksini in citrinin (Kumar in sod., 2008).

Iz raziskave Binderja in sodelavcev (2007), ki je bila narejena na 2798 različnih vzorcih žit in krme, izhaja, da se v Evropi v vrednostih nad dovoljeno mejno vrednostjo najpogosteje pojavljajo DON, ZEA in T-2, v azijsko-pacifiškem območju pa DON, ZEA, fumonizini in aflatoksini (Binder in sod., 2007).

V sklopu ugotavljanja prisotnosti onesnaževal v živilih rastlinskega izvora v primarni proizvodnji so Gregorčič in sodelavci (2009) na Kmetijskem inštitutu Ljubljana analizirali vsebnost mikotoksinov, poleg ostalih žit, tudi v 10 vzorcih pšenice. V nobenem vzorcu pšenice niso odkrili aflatoksinov, fumonizinov, toksina T-2 ali ohratoksina A, v 90 %

vzorcev pa so našli DON in v 50 % vzorcev mikotoksin ZEA, pri obeh je bila mejna vrednost v 20 % vzorcev presežena.

V koruznem zdrobu, namenjenem za industrijsko proizvodnjo krme, je Škrinjar (2008) našla plesen *Fusarium pallidoroseum* in njen presnovni metabolit mikotoksin ZEA z visoko vsebnostjo,  $210 \mu\text{g kg}^{-1}$ , in presenetljivo je v pšenični moki našla tudi plesen *Absidia ramosa* ter njen produkt sekundarnega metabolizma ZEA, tudi z visoko vsebnostjo,  $180 \mu\text{g kg}^{-1}$  moke.

Po Uredbi Komisije ES št. 1881/2006, z dne 19. decembra 2006, o določitvi mejnih vrednosti nekaterih onesnaževal v živilih, so Gregorčič in sod. (2009) upoštevali mejno vrednost za DON v pšenici  $1250 \mu\text{g kg}^{-1}$  (kot je to navedeno v Uredbi komisije komisije (ES) št. 1881/2006 (2006a) v točki (2.4.1) za nepredelana žita, razen pšenice, ovsu in koruze), za ZEA pa  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$  (kot je opredeljeno v isti Uredbi v točki (2.5) za nepredelana žita, koruze). Od 90 % onesnaženosti vzorcev (rž, ječmen, pšenica, pira, koruza, oves) z mikotoksini je bilo kar 15 % vzorcev s prekoračeno omenjeno mejno vrednostjo, kar napeljuje na oceno o splošni razširjeni močni onesnaženosti z mikotoksinoma DON in ZEA. Od vseh mikotoksinov je bil najpogosteje najdeni mikotoksin DON, ki so ga našli kar v 90 % vseh odvzetih vzorcev, sledi ZEA v 44 % vzorcih. Dve tretjini vzorcev je vsebovalo več kot le en mikotoksin (učinek množenja ali vsaj seštevanja). V vzorcih žit so bili predvsem mikotoksini rodu *Fusarium* (DON, HT-2, T-2 in ZEA) (Gregorčič in sod., 2009).

Pričakovano pa so bile vsebnosti mikotoksinov plesni rodov *Penicillium* in *Aspergillus*, ki izločajo izjemno škodljive aflatoksine in ohratoksin A, v vseh vzorcih koruze pod mejo zaznavanja, saj se v naših podnebnih razmerah omenjene plesni razvijajo predvsem v skladiščih (na poljih so manj pogoste), vzorčenje žit pa je potekalo takoj po žetvi (julija in avgusta) (Gregorčič in sod., 2009).

Med skladiščenjem nastajajo mikotoksini predvsem rodov sporogenih plesni, torej prav rodov *Penicillium* in *Aspergillus*, saj njihove spore z debelimi stenami zlahka preživijo in pridejo v ozračje, od koder se nepravilno skladiščena žita okužijo (aflatoksini) (Moss, 1992).

Drugotna kontaminacija z mikotoksini se nanaša na prehranjevalno verigo. Mikotoksini v živilu v tem primeru niso rezultat rasti plesni na tem živilu, pač pa vanj pridejo s prehranjevalno verigo. Tako se, na primer, meso živali okuži zaradi prehranjevanja živali z okuženo krmo; najpogosteje gre za ohratoksin v prašičjem mesu (Moss, 1992).

Vse plesni niso toksikogene. Medtem ko le omejeno število vrst plesni proizvaja kar nekaj mikotoksinov, pa obstajajo tudi mikotoksini, ki jih lahko proizvaja celo več rodov plesni (pregl. 1). Tako npr. trihotecene v glavnem proizvajajo plesni rodu *Fusarium*, lahko pa tudi plesni rodov *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Stachybotrys*, *Verticimonosporium*, *Cephalosporium*, *Myrothecium* in *Cylindrocarpon* (D'Mello in Macdonald, 1997).

Preglednica 1: Glavne vrste plesni rodu *Fusarium* kot povzročitelji najpomembnejših mikotoksinov žitnih zrn (D'Mello in Macdonald, 1997; Backhouse in sod., 2001; Bottalico in Perrone, 2002; Parry in sod. 1995; Thrane, 2000)

Table 1: Main species of genus *Fusarium* as the promoters of the most important associated mycotoxins (D'Mello and Macdonald, 1997; Backhouse et al., 2001; Bottalico and Perrone, 2002; Parry et al. 1995; Thrane, 2000)

Anamorfna oblika	Teleomorfna oblika	Mikotoksini
<i>Fusarium avenaceum</i> (Corda ex Fr.) Sacc.	<i>Gibberella avenacea</i> R.J. Cook	DON, NIV
<i>Fusarium culmorum</i> (Cooke) Sacc.	neznana	DON, ZEA
<i>Fusarium cerealis</i> (Cooke) Sacc.	neznana	ZEA, fusarin, DON
<i>Fusarium equiseti</i> (Corda) Sacc.	<i>Gibberella intricans</i> Wollenw.	NIV, ZEA
<i>Fusarium graminearum</i> Schwabe	<i>Gibberella zeae</i> (Schwabe) Petch	DON, ZEA, T-2
<i>Fusarium poae</i> (Peck) Wollenw.	neznana	Scirpentriol, NIV
<i>Fusarium trinctum</i> (Corda) Sacc.	<i>Gibberella trincta</i> El-Ghol, McRit, Schoult. & Rid.	T-2
<i>Fusarium oxysporum</i> Schlecht. ex Fr.	neznana	ZEA, T-2
<i>Fusarium moniliforme</i> J.Sheld.	<i>Gibberella fujikoroii</i> (Savada) Wellenw.	Fumonizini
<i>Microdochium nivale</i> (Fr.) Samuels & Hallett	<i>Monographella nivalis</i> (Schaffn.) E. Müller	ne proizvaja

Najpomembnejši rodovi mikotoksinogenih plesni so rod *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. niger*, *A. glaucus*, *A. ochraceus*), ki proizvaja aflatoksine B1 (najpogostejši in najbolj kancerogen med vsemi oblikami aflatoksina), B2, B3, B4, G1, G2, M1, M2, aflatoksikol in ohratoksine, rod *Fusarium* (*F. graminearum*, *F. moniliforme*, *F. proliferatum*, *F. nygamai*, *F. Anthophilum*), ki proizvaja DON, nivalenol, ZEA, toksin T-2, diacetoksiskirpenol, moniliformin in fumonizin ter rod *Penicillium* (*P. Citrinum*), ki proizvaja patulin, ohratoksine, citrinin, penitrem A in ciklopsko kislino. Plesni iz rodu *Claviceps purpurea* so vir ergot alkaloidov, ki povzročajo najstarejšo znano, v današnjih časih skoraj izkoreninjeno obliko mikotoksikoze, t. i. ergotizem (močno stisnjenje žil v udih, posledično gangreno) (Pussa, 2008).

Poleg mikotoksina DON se v žitih pogosto pojavljajo tudi drugi mikotoksini, trihoteceni 3-acetil deoksivalenol, 15-acetil deoksivalenol, fusarenon-X, T2-triol, diacetoksiskirpenol, neosolaniol, monoacetoksiskirpenol in verucol, ki pa po razpoložljivih informacijah niso prisotni v velikem obsegu, njihove vrednosti pa so večinoma nizke, zato zanje ni treba upoštevati posebnih ukrepov (Uredba komisije (ES) ..., 2006a).

Mikotoksini, ki se v splošnem najpogosteje pojavljajo v analiziranih vzorcih hrane in krme, so aflatoksini, ki jih proizvajata *Aspergillus flavus* in *Aspergillus parasiticus*, ohratoksini, ki so produkti več vrst plesni rodov *Aspergillus* in *Penicillium*, ter fumonizini, trihoteceni, DON/nivalenol itd., katere večinoma sintetizirajo plesni rodu *Fusarium* (Jeršek in sod., 2004).

Živila, predvsem rastlinskega izvora, so lahko onesnažena z različnimi mikotoksini in kot taka toksično vplivajo na ljudi in živali. *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* in *A. oryzae* izločajo aflatoksine B1, B2, G1 in G2 v koruzi, soji, žitu, oreških, suhem sadju in začimbah ter delujejo hepatotoksično, kancerogeno in imunosupresivno. Mikotoksin citrinin, ki ga izločajo *Penicillium citrinum* in *P. viridicatum* v žitih in oreških, deluje nefrotoksično. Citreoviridin, ki se pojavlja v rižu in ga izloča *P. Citreoviride*, deluje

nevrotoksično, prav tako delujejo tudi mikotoksini ergotamin, ergotoksin in ergot alkaloidi v rži in ječmenu in pšenici, izloča pa jih rženi rožiček (*Claviceps purpurea* L.). V rižu lahko najdemo tudi kancerogene mikotoksine luteoskirin, cikloklorotin, eritroskirin, islandtoksin in rugulosin, ki jih izloča *Penicillium islandicum* in povročajo tudi poškodbe ledvic. Fumonizine B1, B2 in C izloča *F. moniliforme* v koruzi, deluje mutageno ter povzroča pljučne edeme. Ohratoksin A, B in C se pojavljajo v žitih, kavi, kakavu, vinu, pivu, suhemu sadju, predvsem rozinah, stročnicah, začimbah, zlasti sladki mleti papriki, in v grozdnem soku. Izločajo jih predvsem vrste rodu *Penicillium* in *Aspergillus*, zlasti *Penicillium verrucosum* in *Aspergillus ochraceus*; delujejo nefrotoksično in imunosupresivno (Bullerman, 2003). Najbolj obremenjena živila z ohratoksinom A v Sloveniji so začimbe, predvsem sladka mleta paprika, suho sadje, zlasti rozine in surova kava (Kahne Jurišević, 2005).

Poškodbe živčevja povzročata penicilinska kislina (formula  $C_8H_{10}O_4$ ), izločata jo *Penicillium aurantiogriseum* in *Penicillium roqueforti* v koruzi in stročnicah. Rubratoksin A in B izloča *Penicillium rubrum*, oba toksina pa povzročata poškodbe ledvic. Sterigmatocistin v žitih, kavi in siru izloča *Aspergillus versicolor*, deluje pa hepatotoksično, kancerogeno ter povzroča kožne izpuščaje. Toksin T-2 je mikotoksin, ki se pojavlja v žitih, izloča ga *Fusarium sporitrichioides*, povzroča pa alimentarno toksično alevkijo. V žitih in tudi v oreških se v veliki meri nahajajo trihoteceni, ki jih izloča rod *Fusarium* (*F. sporitrichioides*, *F. tricinctum*, *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. crookwellense* itd.). Ti povzročajo alimentarno toksično alevkijo, diarejo, bruhanje, zavračanje hrane, dermatitis, poškodbe živčevja, epileptične napade in splav ter delujejo imunosupresivno (Smith in sod., 1994; Bullerman, 2003).

Žita predstavljajo primarni vir ogljikovih hidratov v prehrani ljudi in živali celega sveta, zato je njihova mikrobiološka, kemična in mikotoksikološka varnost izjemnega pomena. Različne vrste žit so različno dovzetne za napad plesni, predvsem rodu *Fusarium*. Razlike v dovzetnosti so posledica kultivacije v različnih državah, ki so posledica genetskih osnov različnih kultivarjev, različnih vplivov okolja, zlasti podnebnih razmer, in različnih agrotehničnih dejavnikov (Edwards, 2004).

Vrste rodu *Fusarium* proizvajajo različne mikotoksine z različnimi negativnimi učinki na zdravje ljudi in živali ter so odgovorne tudi za resno obolenje pšenice, *Fusarium* spp. klasov – FHB (*Fusarium* head blight), zaradi katerega prihaja do znatnih izgub tako na kakovosti kot na višini pridelka. Čeprav je okužba s plesnijo rodu *Fusarium* običajno problem, ki se pojavlja pred žetvijo, pa lahko ta okužba spremlja tudi slabo vodeno sušenje pšenice po žetvi (Aldred in Magan, 2004).

V kolikšni meri se bo plesen razraščala in sintetizirala posamezne mikotoksine, je odvisno od spleta interakcij med rastnimi razmerami, ki se pojavljajo in razvijajo glive (Casteel in Rottinghaus, 2000), odvisno je torej od številnih dejavnikov, kot so vrsta plesni, njena biološka aktivnost, sestava substrata za rast, poškodbe pridelka zaradi suše in škodljivcev, vlaga živila, relativna vlaga okolja, zračenje, pH-vrednost, prisotnost kisika in ogljikovega dioksida ter razmerje dušik : ogljik v substratu, najbolj pa na sintezo mikotoksinov vplivajo temperatura, vodna aktivnost ( $a_w$ -vrednost) in prisotnost kisika. Visoka vlažnost in zmerna do visoka temperatura zraka ugodno vplivata na rast plesni (Nemanič, 1989).



Ker imajo podnebne razmere med rastjo, zlasti med cvetenjem, velik vpliv na vsebnost mikotoksinov iz rodu *Fusarium*, lahko z dobro kmetijsko prakso dejavnike tveganja zmanjšamo na najnižjo možno raven in tako do neke mere preprečimo onesnaženost z glivo *Fusarium* (Uredba komisije (ES) ..., 2006a). S spremljanjem vremenskih razmer ob dozorevanju in spravilu žit (dolgotrajno sušno obdobje ali nasprotno dolgotrajno deževno obdobje) se lahko v grobem oceni verjetnost kontaminacije žita z glivami in verjetnost prisotnosti mikotoksinov. Če je rizičnost letine in področja pridelave velika in na to kažejo tudi hitro določljivi kvalitetni indikatorji, na primer visoka vlažnost zrnja ali nizko padno število (Hagberg falling number) pri pšenici, se prisotnost mikotoksinov testira sistematično (Kovač, 2009).

Splošna načela za preprečevanje in zmanjševanje onesnaženosti z mikotoksini iz rodu *Fusarium* (DON, ZEA, fumonizini in ostali trihoteceni) v žitih so navedena v Priporočilu Komisije 2006/583/ES z dne 17. avgusta 2006 o preprečevanju in zmanjševanju prisotnosti toksinov iz rodu *Fusarium* v žitu in žitnih izdelkih (Priporočilo komisije ..., 2006). Nadzor nad onesnaženjem žit s toksini je v rokah dobre kmetijske prakse, ki ji sledi dobra proizvodna praksa med prevozom, skladiščenjem, predelavo in dostavo žit. Le na določene dejavnike tveganja, npr. na vremenske razmere, kmetijska praksa nima neposrednega vpliva, s pomočjo celovitega pristopa na razumen način pa je možno obravnavati vse možne različne dejavnike tveganja ter zmanjšati njihovo kopičenje. Dejavniki tveganja, ki jih je treba upoštevati pri dobrih kmetijskih praksah, so kolobarjenje, izbira kultivarja, načrtovanje pridelka, upravljanje tal in pridelka, žetev, sušenje, skladiščenje ter prevoz iz skladišča. Kolobarjenje je zelo učinkovito zlasti pri zmanjševanju onesnaženja zimskih žit, in sicer je zelo primerno kolobarjenje s pridelki, kot so krompir, sladkorna pesa, detelja, lucerna ali vrtnine, ker niso trave in zato niso gostiteljice vrst iz rodu *Fusarium*, ki sicer prizadenejo žita. Zaporedna setev kultur drobnozrnatih žit, kot je pšenica, naj bi se izvajalo le pod pogojem opravljene ocene tveganja okužbe s toksini iz rodu *Fusarium*. Pšenica, ki je bila pridelana v njivskem kolobarju po gostitelju glive *Fusarium* spp. (koruza ali strna žita), namreč kaže višje vrednosti DON, še zlasti v primeru, ko je prejšnji posevek koruza (Priporočilo komisije, 2006). Priporočilo komisije (2006) ne navaja nobenih smernic za zmanjševanje onesnaženosti z mikotoksini iz rodu *Fusarium* (DON, ZEA itd.), ki je povezana z načinom in količino gnojenja.

Prisotnost plesni na živilu še ne predstavlja nujno tudi prisotnosti mikotoksinov v živilu, saj so ekološki pogoji za sintezo mikotoksinov zahtevnejši od pogojev, ki so potrebni za rast plesni. Kopičenje mikotoksinov se poveča ob ugodnih razmerah za sporulacijo vegetativnih celic in ne pri formiranju sklerocijev – zgoščenega kompaktnega spleta hif, ki služi nesplošnemu razmnoževanju in 'zimovanju' ob neugodnih razmerah, saj jih plesni po končani sintezi v posameznih stopnjah glikolize in ciklusa trikarboksilnih skupin izločajo šele ob koncu eksponencialne faze rasti oz. po prehodu v stacionarno fazo rasti (Nemanič, 1989).

Najpogosteje pride do tvorbe mikotoksinov v fazi pridelave na polju in med skladiščenjem, lahko pa tudi v fazi predelave hrane, ob za to ugodnih pogojih (Bauer in sod., 2003).

Možnosti za razvoj plesni iz rodu *Fusarium* so se v številnih srednjeevropskih državah v zadnjih desetletjih občutno povečale, predvsem zaradi ožjega kolobarjenja z visokim

deležem žit, uvajanja minimalne obdelave, veliko žetvenih in drugih organskih ostankov na njivah ter uporabe regulatorjev rasti, ki praviloma skrajšujejo višino rastlin. Vsi ti dejavniki pospešujejo rast plesni, še zlasti v monokulturnih posevkih koruze, kjer postaja vedno večji problem. Največ mikotoksinov v krmi ugotavljajo v deževnih letih, ko so razmere za razvoj plesni še posebno ugodne. Med žiti je najbolj onesnažena koroza. Paziti je treba pri gnojenju z dušikom, ker ta poveča občutljivost rastlin na *Fusarium* spp. Če koroza sledi koruzi, je verjetnost za pojav mikotoksinov v zrnju precej večja kot pa pri drugih predposevkih. Sama obdelava tal, z oranjem ali brez, po mnenju Horstmann (2008) nima tako velikega vpliva na vsebnost mikotoksinov, kot lahko pogosto zasledimo v literaturi. Po njegovem mnenju se močno poveča vsebnost mikotoksinov v rastlinah, poškodovanih zaradi toče ali škodljivcev.

Veliko različnih naravnih in kemičnih agensov se lahko uporablja za preprečevanje rasti mikotoksikogenih plesni in nastanka mikotoksinov. Učinkoviti so tudi nekateri fungicidi. Učinek fungicida je odvisen od kemične sestave, uporabljenega razmerja, vrste žita, vrste plesni in pogojev pri skladiščenju (European Commission, 1999). Na rast mikotoksikogenih plesni vpliva tudi uporaba herbicidov (Kabak in sod., 2006).

Francoski raziskovalci so pri trdi pšenici (*Triticum durum* Desf.), ki je tolerantna na *Fusarium* spp., ugotovili večjo aktivost lipoksigenaze, ki preprečuje akumulacijo mikotoksina DON v rastlini. Tudi fenolne kisline, ki so v plevah pšenice, so močan inhibitor biosinteze mikotoksina DON, nasprotno pa močna zakisanost tal aktivira sintezo mikotoksina DON v glivi *Fusarium*. Tudi pri koruzi se je pokazalo, da ni direktne povezave med pogostnostjo bolezni in vsebnostjo fumonizina. Zato znanstveniki razvijajo molekularne markerje za rezistentnost rastline na *Fusarium* spp. klasa, ki proizvajajo DON (Simonin, 2008).

### 2.1.1 Plesni rodu *Fusarium*

Plesni rodu *Fusarium* (v nadaljevanju poglavja *Fusarium*) so zelo razširjene, pojavljajo se pogosto in tako rekoč povsod (rastline, semena, tla itd.); pšenica je okužbi s plesnijo rodu *Fusarium* močno podvržena.

Sistematika rodu *Fusarium* je zaradi izjemne plastičnosti njegovih pojavnih oblik deloma konfuzna in neenotna, saj je bilo v zadnjih 80 letih opravljenih več poglobljenih študij tega rodu (Wollenweber in Reinking, 1935; Nelson in sod., 1983, itd.), pa nobena ne zadovoljuje vseh kriterijev za praktično uporabne taksonomske namene (Nelson, 1991). Mednarodno združenje za testiranje semena (International Seed Testing Association – ISTA) ne predvideva enotne uradne metodike za ugotavljanje posameznih vrst rodu *Fusarium* na semenu žit, izjema je rod *Microdochium* (ISTA, 2013).

Vrste plesni rodu *Fusarium* pripadajo razredu *Fungi imperfecti* (nepopolne nitaste glive) oziroma razredu *Deteromycota*, spolne oblike rodu *Fusarium* pa pripadajo razredu *Ascomycota*. Rod *Fusarium* se pri različnih avtorjih deli v 9–80 različnih vrst (Nelson, 1991), od katerih so mnoge fitopatogene (npr. *Fusarium graminearum* je patogena za žita in trave), kar pomeni, da povzročajo obolenja rastlin; bolezni zaradi napada plesni rodu



*Fusarium* označujemo z izrazom *Fusarium* spp. Za razred *Deuteromycota* je značilno, da se te glive razmnožujejo nespolno s pomočjo konidiospor, nekaj pa tudi spolno (z askosporami). Nespolno fazo (anamorfna oblika) zastopa plesen *Fusarium*, spolno fazo (telemorfno obliko) pa *Giberella*. *Fusarium* spp. klasov, znano pod imenom fuzarijska bledica klasov oz. FHB (*Fusarium* head blight) izzovejo vrste plesni iz rodu *Fusarium*: *F. graminearum*, *F. culmorum* in *F. cerealis*, tako se imenujejo »agresivni paraziti«. Drugi *Fusarium* spp., ki se tudi lahko pojavljajo na pšenici in ječmenu, so *F. avenaceum*, *F. tricinctum*, *F. sporotrichoides*, *F. poeae*, *F. acuminatum*, *F. oxysporum*, *F. equiseti*, *F. sambucinum*, pa se imenujejo »slabi paraziti« oz. »oportunisti«, saj napadejo že samo od mraza, insektov ali ptic poškodovano zrnje. *F. graminearum* in *F. culmorum* sta najbolj razširjeni patogeni vrsti plesni, ki povzročata *Fusarium* spp. v srednjeevropskem klimatskem območju (Bottalico, 1998), v ZDA pa je to *F. graminearum* (Schmale in Bergstrom, 2003).

Plesni rodu *Fusarium* so najpogostejše plesni, ki se v našem podnebjju pojavljajo na žitih. Rod *Fusarium* vključuje sledeče vrste: *F. acuminatum*, *F. anthophilium*, *F. avenaceum*, *F. cerealis* (*crookwellense*), *F. chlamydosporum*, *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. graminearum*, *F. heterosporum*, *F. nygamai*, *F. oxysporum*, *F. poeae*, *F. proliferatum*, *F. sambucinum*, *F. semitectum*, *F. sporotrichoides*, *F. subglutaminans*, *F. tricinctum*, *F. verticilioides* in druge (Logrieco in sod., 2002).

Škrinjar in Kocić Tanackov (2004) sta med 11 preiskovanimi vzorci ječmena na prisotnost in vrsto plesni ugotovili 11,7–13,0-odstotni delež okuženih zrn. Po izolaciji gliv so ugotovili za rod *Fusarium* največjo zastopanost v največjem številu različnih vrst (*F. acuminatum*, *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. poeae*, *F. sporotrichioides*) in vse, razen *F. acuminatum*, izločajo mikotoksin ZEA, ki se je pojavljal prav v vseh vzorcih, a v manjši vsebnosti (od 5,2 do 52,0  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ; v povprečju 18,6  $\mu\text{g kg}^{-1}$  vzorca).

V Sloveniji je od rodu *Fusarium* v največji meri zastopana plesen vrste *F. graminearum*; v hladnejših klimatskih področjih, npr. v severozahodni Evropi (Nizozemska, Skandinavija), pa prevladuje vrsta *F. culmorum* (Snijders, 1990). Vse vrste plesni rodu *Fusarium* razgrajujejo celulozo in se nahajajo v vseh vrstah tal. Zaradi močne konkurence v odnosu z večino drugih saprofitov lahko te preživijo več kot leto dni v površinskem sloju tal in pri tem ostanejo tudi aktivne (Teich, 1989). Nato plesni iz tal preidejo na rastlino, na kateri so latentno prisotne, pri čemer je najugodnejši čas za infekcijo 2–3 dni pred cvetenjem. Simptomi *Fusarium* spp. na klasu postanejo vidni okoli dva tedna po infekciji, posamezni klaski na še zelenem klasu porumenijo. Napadena zrna so pogosto zgubana in drobna. V deževni dobi se lahko na plevah pojavijo rožnati in črni madeži, skladišče konidijev. Ob kontaminaciji se zgodi, da pri kombajniranju zrnje ne pade iz plev. Mikrobná kolonizacija zrnja je v glavnem omejena na zunanji sloj zrnja, na pleve in na prostor med plevami in perikarpom, se pa lahko zgodi, da prodre tudi v endosperm (Van Nierop in sod., 2006). Vrsta in stopnja infekcije variira v odvisnosti od klimatskih razmer, lokacije pridelovanja in nagnjenosti kultivarja (De la Pena in sod., 1999).

Hitro rastoče kolonije plesni rodu *Fusarium* so kosmičastega videza in so na splošno svetle barve (bele do krem, rumene, rjave, roza in tudi rdeče, vijolične in lila). Koruzni storži in žito, ki so močno okuženi s temi plesnimi, so rožnate ali rdeče barve (Kalcher Tavčar in

sod., 2007). Nekatero saprofitske vrste se lahko mimogrede razraščajo kot sekundarni patogeni na odmrlih in odmirajočih tkivih in lahko proizvajajo mikotoksine (trihotecene, toksin T-2, ZEA, vomitoksin, DON, fumonizin itd.). Plesen vrste *Fusarium graminearum* se zaradi dobro razvitega hidrolitičnega potenciala (ima encime za razgradnjo lignina in celuloze) in posledične zmožnosti intenzivne predelave ogljikovih hidratov ter zaradi ugodnih teksturnih (vlaknasta micelijska struktura omogoča izdelavo proizvodov naravne prijetne teksture) in prehranskih lastnosti uporablja kot izvor mikoproteinov pri industrijskem načinu proizvodnje biomase. In čeprav so sevi vrste *Fusarium graminearum* znani proizvajalci mikotoksinov (trihotecenov in ZEA), so sevi za omenjeno uporabo neškodljivi (Trček, 1996), saj ne le da uporabljeni sevi ne tvorijo določljivih količin toksinov, pri proizvodnji mikoproteinov se tudi uporablja kontinuirni tip kultivacije, ki vzdržuje kulturo v eksponencialni fazi rasti, medtem ko se toksini običajno tvorijo v stacionarni fazi rasti (Moss, 1992).

*Fusarium graminearum* spoznamo na gojišču agar (z začetnim in tudi končnim pH 5, saj *Fusarium graminearum* med rastjo ne spremeni vrednosti pH) po hitro razraščajočih kolonijah pri  $T = 26\text{ °C}$  z več možnimi barvami: rumeno, oranžno, rdečo in temno rdečo. Na hrbtni strani je močno temno rdeča na sredini in temno oranžna na robu, s staranjem pa postane kaki oker barve v celoti. Sporulacija lahko traja dolgo. V nasprotju z mikronidiji, ki se sploh ne pojavljajo, so makronidiji bolj ali manj pregrajeni (3–7 celic). Lahko je prisoten tudi hialin (svetlo rjave barve), ki se pojavlja v skupkih, posamezno ali v verigi. *F. graminearum* se ne razvija pri temperaturi nad  $37\text{ °C}$ . Idealna  $a_w = 0,89$ . Nastanek spor pospešuje ultravijolična svetloba (Hawksworth, 1983).

Znano je (Smith in sod., 1994), da *Fusarium graminearum* proizvaja naslednje toksične metabolite: 4-acetamido-4-hidroksi-2-butenoijsko kislino, fuzarin, C butenolid, kulmorin, trihotecene, ZEA.

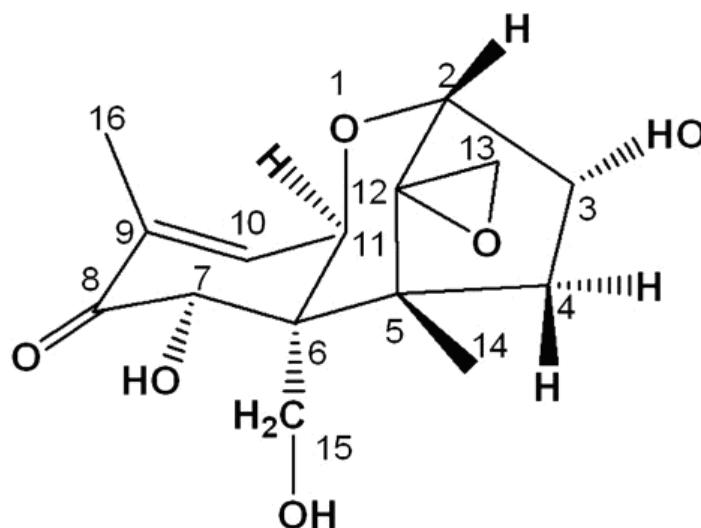
Kontaminacija s plesnijo vrst *F. graminearum* in *F. culmorum* se je do nedavnega ugotavljala pri mikrobiološki kontroli pšenice in ječmena ob prevzemu (MEBAK, 1997), novi evropski predpisi pa zahtevajo kontrolo pšenice in ječmena na prisotnost skupnega števila plesni iz rodu *Fusarium* (Uredba komisije (ES) ..., 2006a). Plesnivost povzročata ti dve vrsti plesni (*F. graminearum* in *F. culmorum*) v obliki bolezni žit, imenovane „*Fusarium* spp. klasov“, ki ima pri ječmenu in pšenici značaj izključenosti, kar pomeni, da se sarža zrna, ki je sprejemljiva glede na vse druge kazalnike kakovosti, je pa kontaminirana s tema dvema plesnima, obravnava kot neustrezna za nadaljnjo predelavo (Schwarz in sod., 1996). Od vseh mikoz so na žitih najpogosteje in kvantitativno v največjem obsegu zastopane prav *Fusarium* spp. klasa (Ožegović in Pepeljnjak, 1995).

Rod *Fusarium* ima visok potencial za biosintezo mikotoksinov ZEA in DON, ki ju izloča plesen rodu *Fusarium* (najpogosteje *F. culmorum* in *F. graminearum*), zato predstavlja v Evropi v žitih velik problem predvsem kontaminacija s tema dvema mikotoksinoma (Bočarov Stančić, 1996; Lević in sod., 2004); splošno razumevanje delovanja mikotoksinov DON in ZEA je tako z vidika zdravja ljudi in živali ter njihove produktivnosti zelo pomembno.

## 2.1.2 Deoksinivalenol

Eden od mikotoksinov, ki še do nedavnega, tudi zaradi nizkih vsebnosti, v katerih se lahko pojavlja, in nerazvitosti ustrezne analitike ni bil znan, je deoksinivalenol (DON). Njegovi sinonimi, ki se pojavljajo v literaturi, so: vomitoksin, 4-deoksinivalenol, dehidronivalenol, toksin RD, raztopina deoksinivalenola, dezoksinivalenol in 4-dezoksinivalenol (NCBI, 2012).

DON izločajo nitaste glive rodu *Fusarium*; večinoma *F. graminearum* in *F. culmorum*, ki kontaminirajo še zeleno rastlino, izjemoma tudi ne dovolj suha zrna (Kovač, 2009).



Slika 2: Kemijska struktura mikotoksina deoksinivalenol (DON) (Pestka in sod., 2008)  
Figure 2: Chemical structure of the mycotoxin deoxynivalenole (DON) (Pestka et al., 2008)

DON ima molsko maso 296,32 g mol<sup>-1</sup> ter molekulska formulo C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub>. Vsebuje eno primarno in dve sekundarni hidroksilni skupini ter konjugirano karbonilno skupino, zaradi česar absorbira UV-svetlobo, kar se izrablja pri detekciji z metodama TLC (thin layer chromatography oziroma tankoplastna kromatografija) in HPLC (high performance liquid chromatography oziroma tekočinska kromatografija visoke ločljivosti).

Na C<sub>12</sub>/C<sub>13</sub> (sl. 2) ima DON epoksidno skupino, za katero je že od leta 1970 znano, da predstavlja primarno toksičnost mikotoksina DON (Ueno in sod., 1986), saj je ta nujno potrebna za inhibicijo biosinteze proteinov. Mikotoksin se z epoksidno skupino veže na ribosome. Mikotoksin je zaradi zelo stabilne epoksidne skupine zelo stabilna spojina (stabilen je v širokem pH-območju) ter preživi T vrenja, pečenja in celo pare pri 135 °C (Bullerman, 2003), zato lahko mikotoksin DON z nepoškodovano epoksidno skupino najdemo v kruhu in pecivu, testeninah, pivu, žitih za zajtrk in drugih izdelkih. Med prehransko verigo ali skladiščenjem se ne razgradi in ga je težko izločiti iz zrnja ali moke žit. DON se dobro topi v vodi in polarnih topilih, npr. v metanolu ali acetonitrilu. Zaradi dobre topnosti v vodi se lahko velik delež mikotoksina DON odstrani z umivanjem zrnja, vendar je to neekonomično ter predstavlja dodaten problem pri odpadnih vodah. Tudi z encimskimi reakcijami, ki vodijo v uničenje epoksidne skupine (vir toksičnosti) v trihotecenih, se da zmanjšati ali povečati delež mikotoksina DON, kar pa je najverjetneje

posledica medsebojne pretvorbe te molekule ali prekursorjev (možna sta dva mehanizma encimskih reakcij: encimsko katalizirana redukcijska anaerobna de-epoksidacija in nukleofilni napad epoksidne skupine s tioli v rastlinah) (Smith in sod., 1994).

DON spada med trihotecene, v skupino kemičnih spojin s podobno kemijsko strukturo, ki združuje več kot 200 strukturno sorodnih mikotoksinov. Kljub temu so v primerjavi z ostalimi mikotoksini trihoteceni kemično najbolj raznolika skupina. Vsi trihoteceni so triciklični seskviterpeni z dvojno vezjo med C-9 in C-10 atomom in epoksi skupino med C-12 in C-13, zato spadajo med 12, 13-epoksi-trihotecene (Smith in sod., 1994).

Glede na kemijsko strukturo se trihoteceni delijo v štiri glavne skupine; v trihotecene tipa A (neketonska funkcionalna skupina na C-8, 2), trihotecene tipa B (funkcionalna skupina na C-8, 3 atomu je keton), trihotecene tipa C (druga epoksi skupina na C-7,8 ali C-9,10;4) in trihotecene tipa D (makrociklični obroč med C-4 in C-5 z dvojno estersko vezjo). Znanih je več kot 150 trihotecenov, a se dejansko le nekateri pojavljajo v večjih količinah v pridelkih žit, in sicer trihoteceni tipa A (toksin T-2, toksin HT-2, neosolaniol in diacetoksiskirpenol (DAS) in monoacetoksiskirpenol) ter trihoteceni tipa B (DON = vomitoksin), 3-acetilDON (3AcDON), 15-acetilDON (15AcDON), nivalenol in fusarenon-X (D'Mello in Macdonald, 1997). Najpomembnejša predstavnika prve skupine trihotecenov tipa A sta toksin T-2 in toksin HT-2, najpomembnejši predstavnik druge skupine tipa B pa je DON (Smith in sod., 1994).

Plesni *Fusarium sporotrichoides* proizvajajo večinoma trihotecene tipa A, v manjši meri jih proizvajajo tudi plesni *F. poae*, trihotecene tipa B pa proizvajajo v glavnem plesni *Fusarium culmorum* in *F. graminearum*. Pomembna je tudi plesen *F. moniliforme*, saj proizvaja tri mikotoksine; fumonizine, moniliformin in fusarin C. Fumonizini vključujejo 6 strukturno sorodnih metabolitov, od katerih sta pomembnejša fumonizin B1 in fumonizin B2. V precej manjši meri lahko proizvajajo trihotecene tudi plesni iz rodov *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Stachybotrys*, *Verticimonosporium*, *Cephalosporium*, *Myrothecium* in *Cylindrocarpon* (Smith in sod., 1994).

Najpogosteje se trihoteceni pojavljajo v žitih (pšenici, ječmenu, koruzi, ovsu, rži), lahko jih najdemo tudi v soji in izdelkih iz soje, sledove pa v krompirju, bananah, mangu, gorčičnih semenih, arašidih in sončničnih semenih. Večina raziskav na področju trihotecenov je v zadnjih letih usmerjena predvsem na mikotoksin DON, katerega večinoma najdejo v pšenici, ječmenu, ovsu, rži in koruzi, manj pogosto pa tudi v rižu, sireku in tritikali (Jakovac Štrajn in sod., 2004).

DON se lahko kot produkt pojavlja pri okužbi s *Fusarium graminearum* (spolna oblika *Gibberella zea*) in *F. culmorum*, obe plesni sta pomembni rastlinski patogeni vrsti v žitu. *Fusarium gramineum* kot nespolna oblika povzročča obolenja s *Fusarium* spp. na pšenici, *Gibberella* kot spolna oblika pa plesnivost storžev na koruzi. Dokazana je bila neposredna povezava med pojavnostjo obolenj s *Fusarium* spp. in kontaminacijo pšenice z DON (D'Mello in Macdonald, 1997). Pojavnost *Fusarium* spp. je močno odvisna od vlažnosti v času cvetenja in od dolžine njegovega trajanja, bolj kot od količine padavin. *F. graminearum* npr. raste optimalno pri 25 °C in vodni aktivnosti nad 0,88, *F. culmorum* pa raste optimalno pri 21 °C in pri vodni aktivnosti nad 0,87 (Smith in sod., 1994).

Pojavnost DON je v pšeničnem zrnju v splošnem visoka, v vrednostih 1–20 mg kg<sup>-1</sup>, v večjih količinah se pojavlja v žitih zlasti v tropskih območjih. Tako so v vzhodni Afriki v koruznih pridelkih našli mikotoksin DON v vsebnosti do 16 mg kg<sup>-1</sup> koruznega zrnja, v vzorcih iz Argentine pa je bilo 20–22 % vzorcev koruze okuženih s toksinom T-2. V vzhodnem Egiptu so odkrili kar 50-odstotno kontaminacijo vzorcev hrane in krme z mikotoksinom DON, z vsebnostjo 0,07–4,0 mg kg<sup>-1</sup> (Scott, 1989).

Vzorci koruznega zdroba iz Italije, Portugalske in Zambije so vsebovali fumonizine B1 + B2 z vsebnostjo do 4,5 mg kg<sup>-1</sup> zrnja z 82–100-odstotno pojavnostjo, v Indiji pa so našli kar 300–600 mg kg<sup>-1</sup> zrnja, okuženega s plesnijo *Fusarium moniliforme* (Chatterjee in Mukherjee, 1994).

Weidenbörner (2011) navaja, da se mikotokin DON v pšenični moki v Argentini pojavlja v vrednostih 400–800 µg kg<sup>-1</sup> (povprečje 560 µg kg<sup>-1</sup>), v Indiji 346–8380 µg kg<sup>-1</sup> v polnozrnatih moki ter 440–4850 µg kg<sup>-1</sup> v beli moki, na Japonskem 11–690 µg kg<sup>-1</sup> (povprečje 251 µg kg<sup>-1</sup>), v Veliki Britaniji 100–249 µg kg<sup>-1</sup> ter v Nemčiji 65–1379 µg kg<sup>-1</sup>; v Združenih državah Amerike so našli v mešanici za muffine DON v vrednosti 1500–5800 µg kg<sup>-1</sup> (povprečje 4000 µg kg<sup>-1</sup>).

Raad je s sod. (2007) našel v vzorcih živil s statističnega seznama dnevne prehrane odraslega mestnega prebivalca Libanona različne količine DON; v kruhu v povprečju 524 µg kg<sup>-1</sup>, v piškotih in rogljičkih 340 µg kg<sup>-1</sup>, v slaščicah 110 µg kg<sup>-1</sup>, v testeninah in kosmičkih 65 µg kg<sup>-1</sup>, v pitah in picah 121 µg kg<sup>-1</sup>, v rižu 322 µg kg<sup>-1</sup>, v oreških, semenih in olivah 66 µg kg<sup>-1</sup> in v alkoholnih pijačah 52 µg kg<sup>-1</sup>.

V Argentini se DON v kruhu nahaja z vsebnostjo 269–384 µg kg<sup>-1</sup>, v Nemčiji z vsebnostjo 15–788 µg kg<sup>-1</sup>, s povprečjem 92 µg kg<sup>-1</sup>, v ZDA do 240 µg kg<sup>-1</sup> ter v Veliki Britaniji z vsebnostjo 10–336 µg kg<sup>-1</sup> (Weidenbörner, 2011). Na Norveškem je bila v letih 1996–1999 vsebnost DON v ovsu višja kot v ječmenu in pšenici (Langesth in Rudberget, 1999).

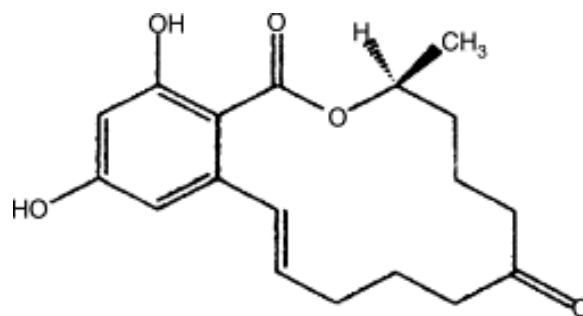
Oralna doza 0,05–1,00 mg DON kg<sup>-1</sup> teže živali povzroča bruhanje, pri nekaterih poskusnih živalih tudi zastoj prebave, oralna doza polovične smrtnosti (LD<sub>50</sub>) znaša 46 mg kg<sup>-1</sup> za miš (European Commission, 1999). O mutagenosti ali kancerogenosti DON ni dokazov, vendar pa zavira sintezo DNA in proteinov (Pussa, 2008).

### 2.1.3 Zearalenon

Sinonimi za mikotoksin ZEA so: F2; komponenta F-2; fermentacijska estrogenska snov; FES; mikotoksin F2; toksin F2; (-)-zearalenon; (S)-zearalenon; trans-zearalenon; (10S)-zearalenon; zenon (WHO, 1993) in RAL mikotoksin (Kuiper Goodman in sod., 1987).

ZEA je znan že dolgo in ga poleg mikotoksinov fumonisina B1 in fumonisina B2, v nasprotju z mikotoksinom DON, plesen rodu *Fusarium* ne izloča med rastjo na rastlini, pač pa med rastjo na premalo suhih zrnih, po žetvi ali med skladiščenjem. So potencialno kancerogeni in teratogeni. Pogoj za pojav je presežena vlažnost; to je nad 16 %. Tveganje obvladujemo s kontrolo vsebnosti vode v žitih in ustreznim dosuševanjem (Kovač, 2009).





Slika 3: Kemijska struktura mikotoksina zearalenon (ZEA) (Ouanes in sod., 2005)  
Figure 3: Chemical structure of the mycotoxin zearalenone (ZEA) (Ouanes et al., 2005)

Kemična struktura mikotoksina ZEA ( $C_{18}H_{22}O_5$ ) z molekulsko maso 318,36 je razvidna z zgornje slike (6-(10-hidroksi-6-okso-trans-1-undeconil)- $\beta$ -resorciklični lakton). Znan je tudi po tem, da se nahaja v številnih žitnih pridelkih: koruzi, ječmenu, ovsu, pšenici, rižu (Kuiper Goodman in sod., 1987) in seveda tudi v kruhu (Aziz in sod., 1997).

Mikotoksin ZEA najpogosteje proizvajata plesni vrst *Fusarium graminearum* in *F. semitectum*. Lahko pa ga izločajo tudi *F. oxysporum*, *F. proliferatum* ter *F. verticillioides* (Levič in sod., 2004). Dokazali so ga poleg izolatov *Fusarium sp.* v koruzi iz Avstralije, Evrope, Severne Amerike (Vesonder in sod., 1991), Nove Zelandije (diMenna in sod., 1997), Filipinov, Tajske in Indonezije (Yamashita in sod., 1995), v krmi iz Južne Amerike (Dalcero in sod., 1997), Afrike (Doko in sod., 1996), Kitajske in v republikah nekdanje Sovjetske zveze (Ueno in sod., 1986).

Povezava med kontaminacijo z glivo *Fusarium spp.* in vsebnostjo ZEA v krmi je močno odvisna od klimatskih razmer, to je relativne vlažnosti in temperature, vlage v tleh, poškodb zaradi insektov, pomanjkanja mineralnih hranil v tleh in drugih dejavnikov; najvišja vsebnost mikotoksina ZEA v krmi pa je nedvomno povezana z nadaljnjo rastjo plesni v odvisnosti od slabo vodenega skladiščenja pridelkov (Škrinjar in Kocić Tanackov, 2004).

V naključno izbranih vzorcih koruznega zrnja iz let 1987 in 1989–1993 so v Baden Württembergu npr. našli v 11–80 % vseh vzorcev pšenice s povprečno letno vsebnostjo ZEA 3–180  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (najvišjo vsebnostjo 8000  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) in v 7–68 % vseh vzorcev ječmena s povprečno letno vsebnostjo 3–36  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (najvišjo vsebnostjo 310  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) (Müller in sod., 1997a; Müller in sod., 1997b). Frekvenca kontaminacije z ZEA v 140 vzorcih pšenice za humano prehrano iz vseh regij Bolgarije po žetvi leta 1995, ko sta pomlad in poletje spadala med najbolj deževne, je bila 69 %, s povprečno vsebnostjo 17  $\mu\text{g kg}^{-1}$  pridelka in najvišjo vsebnostjo 120  $\mu\text{g kg}^{-1}$  pridelka (Vrabcheva in sod., 1996). V Argentini so našli 30 % vzorcev iz let 1983–1994 s povprečno vsebnostjo 165  $\mu\text{g kg}^{-1}$  in najvišjo vsebnostjo 2000  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (Resnik in sod., 1996). Weidenböner (2011) navaja, da se v pšenični moki ZEA na Japonskem pojavlja v vsebnosti od 1 do 6  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , v Nemčiji od 1 do 8  $\mu\text{g kg}^{-1}$  v beli moki ter od 2 do 24  $\mu\text{g kg}^{-1}$  v polnozrnatni moki, v mešanici za peko kolačkov v ZDA pa se pojavlja v vrednostih od 12 do 4  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

V kruhu se v Egiptu pojavlja ZEA v vsebnosti  $34 \mu\text{g kg}^{-1}$ , na Novi Gvineji  $250\text{--}750 \mu\text{g kg}^{-1}$  (s povprečjem  $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) ter v Veliki Britaniji z vsebnostjo  $15,8 \mu\text{g kg}^{-1}$  pridelka (Weidenbörner, 2011).

Vsebnost ZEA v pšenici in rižu, ki sta bila pridelana z alternativnimi oziroma ekološkimi postopki, je bila višja kot v pridelkih konvencionalne pridelave. Tako je bila povprečna vsebnost pozitivnih vzorcev ekološko in alternativno pridelane pšenice  $24 \mu\text{g kg}^{-1}$  in riža  $51 \mu\text{g kg}^{-1}$ , konvencionalno pridelane pšenice pa  $6 \mu\text{g kg}^{-1}$  in riža  $4 \mu\text{g kg}^{-1}$  (Marx in sod., 1995).

Rod *Fusarium graminearum* lahko izloča ZEA v zelo različnih količinah; v Srbiji od  $2,3 \text{ mg kg}^{-1}$  pa celo do  $3740 \text{ mg kg}^{-1}$  žita (Lević in sod., 2004).

Znano je, da mikotoksin ZEA proizvajajo naslednje vrste plesni rodu *Fusarium*: *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. crookwellense*. Znan je po tem, da je zelo obstojen na primer pri nizki temperaturi pasterizacije in učinkuje tudi v velikih razredčitvah. ZEA je stabilna kemijska spojina, ki se ne razgradi niti pri spravljanju sena niti pri siliranju niti v predelovalni industriji krme oziroma živil (Diana in sod., 2007).

ZEA se med drugim lahko veže na estrogenske receptorje, kar vodi v zmanjšano plodnost in različne deformacije spolnih organov. Spada v skupino fitoestrogenih mikotoksinov (doslej je ugotovljenih 15 različnih vrst z različno biološko aktivnostjo). Torej je mikotoksin z estrogenim učinkom in pri samicah povzroča motnje v plodnosti in mrtvorrojene mladiče, pri samcih pa slabšo kakovost semena (Smith in sod., 1994).

Večina intenzivne rasti plesni rodu *Fusarium* poteka, ko je relativna vlažnost nad 70 %, medtem ko sta rosa in megla v obdobju vegetacije še posebej primerni za razvoj plesni na zrnih. Optimalna temperatura za razvoj te skupine plesni je  $18\text{--}24 \text{ }^\circ\text{C}$ , optimalna vrednost pH-medija za rast plesni in nastanek ZEA pa je  $4,0\text{--}6,5$  (Pussa, 2008).

## 2.2 ANALITIKA

Razvitih je bilo več metod za identifikacijo in kvantifikacijo mikotoksinov; najboljša je tista, ki je najbolj občutljiva in specifična, najhitrejša in čim preprostejša. Za vsakega od mikotoksinov bi morali biti predpisani ustrezna metoda določanja in tehnika vzorčenja glede na vrsto živila (Moss, 1992).

Pri sistematičnem nadzoru vsebnosti mikotoksinov so se v svetu in pri nas uveljavile različne metode priprave vzorcev in metode določanja s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC), plinsko kromatografijo (GC – gas chromatography) in tekočinsko kromatografijo z masno selektivnim detektorjem (LC-MS). V zadnjem času se posveča veliko pozornosti tudi imunološkim metodam, kot sta encimski imunski test (ELISA) in radioimunski preskus (RIA). Zaradi velikega števila stopenj pri sami analizi se pojavljajo napake, ki se med seboj seštevajo, zato je merilna negotovost pri določanju mikotoksinov v živilu dopustna tudi do 45 % (Bullerman, 2003).



Celoten postopek analize mikotoksinov sestavljajo tri stopnje: vzorčenje (povprečni vzorec iz celotne količine), priprava vzorca (mletje vzorca v mlinih ter odvzem zmletega podvzorca od skupnega vzorca) in analiza vzorca (ekstrakcija, čiščenje, detekcija in kvantitativna določitev mikotoksina) (Kahne Juriševič, 2005).

### 2.2.1 Vzorčenje

Merila za pripravo vzorcev in metode analize za uradni nadzor vsebnosti mikotoksinov v živilih določa Uredba komisije (ES) št. 401/2006, z dne 23. februarja 2006, o določitvi metod vzorčenja in analiz za uradni nadzor vsebnosti mikotoksinov v živilih (Uredba komisije (ES) ..., 2006b). Pri vzorčenju določa previdnostne ukrepe (pazljiva priprava in homogenizacija vzorcev), saj je porazdelitev mikotoksinov običajno nehomogena.

Ker razporeditev mikotoksinov po substratu ni enakomerna, je zelo težko (zlasti pri trših vzorcih) določiti mesta zadrževanja mikotoksinov, zato je nujna izjemna pazljivost pri vzorčenju, da bi bilo to pravilno (Trček, 1996).

V živilih so lahko prisotni mikotoksini razporejeni zelo nehomogeno in neenakomerno, zato ima največjo vlogo pri pravilnosti določitve vsebnosti mikotoksinov prav vzorčenje (Whitaker, 2003).

Plesni, ki tvorijo mikotoksine, se začnejo razraščati na izoliranem oz. posameznem delu ali delčku živila; ob ustreznih pogojih se metaboliti plesni kopičijo le na teh posameznih delih živila, zato lahko vsebnost toksina variira celo od 0 pa do več 1000  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Torej se vzorčenje pogosto ponesreči, zaradi česar se le z merjenjem vsebnosti v vzorcu nikoli ne da s 100-odstotno natančnostjo določiti točne vsebnosti toksina v celotni hrani oz. živilu, ki ga analiziramo (Whitaker, 2003).

Upoštevati je treba vse elemente vzorčenja (metodo za selekcioniranje vzorca, velikost vzorca, velikost zmletih delcev, velikost podvzorca, tip analitske metode, število analitskih meritev, maksimalno dovoljeno vsebnostjo), saj je priprava reprezentativnega laboratorijskega vzorca zaradi natančnega postopka vzorčenja, ki odloča o končnem rezultatu analize, zelo zahtevno in odgovorno delo (Smith in sod., 1994).

Minimalna količina vzorca za analizo toksina, da dobimo reprezentativen vzorec, znaša za moko 3 kg, za zrnje pšenice, ječmena in riža 5 kg in za zrnje koruze 10 kg. Raziskave so pokazale, da večja vzorčena količina vzorca, večji podvzorec vzeti v analizo in bolj fino zmlet vzorec zmanjšujejo napako analize (Whitaker, 2003). Sommerfeld in Gabel (2002) pa sta dokazala, da velikost vzorca ne vpliva toliko na končni rezultat kot dejansko število reprezentativnih vzorcev in enako število vzorčnih mest.

### 2.2.2 Analitske metode za identifikacijo mikotoksinov

Za izolacijo mikotoksigenih rodov obstajajo specifična trda gojišča. Z opazovanjem mikroskopskih lastnosti (barve konidijev, načina tvorbe micelija, obsega sporulacije) in s

primerjavo s tipskimi mikroorganizmi lahko identificiramo izolate do nivoja rodu oz. vrste (Frisvad in sod., 1992).

Ali izolati sintetizirajo mikotoksine, ugotovimo šele po analizi sekundarnih metabolitov ob pomoči kromatografskih tehnik (GC, HPLC, TLC); potrebna pa je pazljivost pri izbiri gojišč, saj je od njih odvisna sposobnost plesni za sintezo mikotoksina (Trček, 1996).

V nasprotju s številnimi drugimi toksini mikotoksini niso imunogene snovi, takšne postanejo šele po spojitvi z beljakovinskimi molekulami. Uspešnost spajanja je odvisna od funkcionalnih skupin, prisotnih na molekuli toksina. Nekateri mikotoksini (npr. ohratroksin) imajo v svoji zgradbi reaktivne skupine in se lahko direktno povezujejo z beljakovinskimi nosilci, kar pa ne velja za večino mikotoksinov, kot npr. pri trihotecenih in aflatoksinu, ko je potrebno v molekulo vnesti reaktivne (karboksilne) skupine (Kanisawa in Hsieh., 1984).

Za imunološko detekcijo mikotoksinov se uporablja biokemijska metoda ELISA (angl. enzyme-linked immunosorbent assay; encimski imunski test) ali tehnika RIA (radio-immuno assay) in imunoafinitetna kolonska kromatografija. Metodo ELISA so razvili neodvisno in istočasno v dveh raziskovalnih skupinah; Perlmann in Engvall (Engvall, 1971) na Švedskem ter Schuurs in van Weemen na Nizozemskem v 60. letih (Lequin, 2005).

Tehniki ELISA in RIA temeljita na kompeticiji specifičnega označenega in neoznačenega (iz analiziranega vzorca) toksina za vezivno mesto na protitelesih. Ob večji količini mikotoksina v vzorcu se veže manj označenega toksina in obratno. Pri tehniki RIA je toksin označen radioaktivno, pri tehniki ELISA pa je na antigen (toksin) vezan encim, ki specifično prepoznava detekcijsko protitelo. Kolonska kromatografija temelji na specifičnosti vezave protiteles, vezanih na nosilec v koloni. Po spiranju s topilom (npr. metanolom) detektiramo mikotoksin z merjenjem fluorescence (Candlish in sod., 1989).

Razvila sta se dva načina določanja antigenov s testom ELISA, kompetitivna in nekompetitivna tehnika ELISA. Kompetitivna se deli na indirektno in direktno metodo določanja. Indirektna kompetitivna metoda se uporablja za detekcijo specifičnih protiteles v vzorcih, direktna kompetitivna metoda ELISA (sendvič test ELISA) pa za določanje antigenov. Pri obeh načinih metode ELISA je na zadnje dodano protitelo vezan encim (od tu izhaja ime metode), ki omogoči spremembo barve substrata in posledično detekcijo prisotnosti preiskovanega protitelesa ali antigena (Smith in sod., 1994).

Imunoafinitetna kolonska kromatografija je popularna tehnika, ki se uporablja, ko so potrebni zelo čisti proteini z visoko specifičnostjo interakcije antigena in protitelesa. Protitelesa so vezana na stacionarno trdno fazo, skozi katero potuje vzorec in z njim antigen, ki se veže na imobilizirana protitelesa, za katera je specifičen; nespecifični proteini in peptidi se sperejo (Smith in sod., 1994).

Pri analizi mikotoksinov v žitih s kolonsko kromatografijo je treba mikotoksin po ustreznem vzorčenju najprej z ekstrakcijo (s topili) izolirati iz vzorca. Ekstrakt se čisti interferirajočih komponent na imunoafinitetnih kolonah (imunoafinitetne kolone so

trenutno najučinkovitejše in najbolj selektivne). Izbira načina čiščenja ekstrakta odločilno vpliva na mejo detekcije postopka. Imunoafinitetna kolona ima na nosilcu vezana specifična protitelesa, na katera se vežejo le molekule mikotoksina iz ekstrakta, ostale komponente pa se sperejo iz kolone, zatem se vezan mikotoksin z ustreznim topilom eluira iz kolone. Takšen eluat je pripravljen na kvantitativno analizo na prisotnost mikotoksina z metodo HPLC-FLD, ki simultano identificira in kvantitativno določi vsebnost mikotoksina v analiziranem vzorcu (Bullerman, 2003). V koloni je nosilec (stacionarna faza), na katerega se bolj ali manj vežejo posamezne komponente v vzorcu, ki jih injiciramo. Nato začnemo kolono spirati s primernim topilom ali mešanico (mobilna faza). Izbrati moramo takšno mobilno fazo, da se v njej dobro topi tista spojina, ki nas zanima, saj jo le tako lahko speremo z nosilca in iz kolone ven. Eluat teče skozi detektor in rezultat je zapis, kromatogram, na katerem so posamezni kromatografski vrhovi komponent definirani z retenzijskimi časi. Identifikacija mikotoksina poteka na osnovi primerjave retenzijskega časa kromatografskega vrha komponente v vzorcu z retenzijskim časom komponente standardne raztopine in s pomočjo izračuna površine kromatografskih vrhov s pomočjo računalniškega programa.

Za mikotoksina ZEA in DON je metoda ekstrakcije vzorca s primernim topilom, čiščenje dobljenega ekstrakta s solventno ekstrakcijo ter analiza očiščenega ekstrakta s HPLC z masnim detektorjem primerna in jo izvajajo tudi v laboratoriju CHELAB v Italiji, ki je za analize mikotoksinov akreditiran pri italijanski akreditacijski hiši SINAL. Po tej metodi so analizirali vsebnost mikotoksinov DON in ZEA v 10 vzorcih pšenice, odvzetih v Sloveniji leta 2009 z namenom vpogleda onesnaževal rastlinskega izvora v živilih v primarni proizvodnji (Gregorčič in sod., 2009).

Pri imunoloških testih potrebujejo mikotoksini za detekcijo specifična protitelesa. Protitelesa so definirana kot glikoproteini, ki kažejo lastnosti imunoglobulinov. Ker so mikotoksini neantigenske snovi z nizko molekulsko maso, ne morejo neposredno inducirati antigenskega odgovora, pač pa jih je treba povezati s proteinskim nosilcem, ki poskrbijo za imunogenost mikotoksina (Smith in sod., 1994).

Metoda ELISA je kot imunološka tehnika določanja hitra in zanesljiva ter omogoča obsežen pregled vzorcev na vsebnost mikotoksinov. Znanstveniki so razvili visoko afinitetna monoklonska protitelesa za številne mikotoksine, tako je metoda ELISA (zlasti kompetitivna ELISA) najbolj uporabljana tehnika določanja mikotoksinov v svetu (Smith in sod., 1994). Uporablja se za detekcijo protiteles in antigenov v vzorcih, primerna je za določanje protiteles na različne viruse ali za dokazovanje prisotnosti alergenov v hrani (FDA, 2007).

Za validacijo in simultano določanje mikotoksina DON in ZEA je primerna tudi metoda LC-MS/MS, ki je bila razvita prav za določanje teh in še drugih mikotoksinov in njihovih metabolitov v pšenici, koruzi, ovsu, kosmičih in kruhu. Ekstrakcija se izvaja z mešanico acetonitrila ali oetne kisline. Po končani ekstrakciji se ekstrat filtrira, po filtraciji se ekstrakt koncentrira, ostanek pa raztopi v mobilni fazi. Zaradi majhnega izkoristka prostih in zamaskiranih mikotoksinov in njihovih razlik v polarnosti čiščenje vzorca ni vključeno. Metoda omogoča hkratno določanje kar 13 mikotoksinov, ki jih izloča plesen rodu *Fusarium*, in sicer le v eni stopnji kromatografije s pomočjo združitve sistema UPLC

Waters Acquity z masnim spektrometrom Premier XE (De Boevre in sod., 2012). Rezultati izvajanja te metode LC-MS/MS v celoti ustezajo merilom iz Uredbe Komisije (ES) št. 401/2006 (Uredba komisije (ES) ..., 2006b).

### 2.3 TOKSIČNOST

Če bi mikotoksini vplivali negativno le na živali in njihovo produktivnost, po vsej verjetnosti ne bi izzvali tolikšnega zanimanja med ljudmi (Hussin in Brasel, 2001).

Bolezen, ki jo povzroča s toksikogenimi plesnimi in njihovimi izločki mikotoksini onesnažena hrana, se imenuje mikotoksikoza (Bauer in sod., 2003). V večini primerov ostanejo mikotoksikoze neregistrirane, razen v primerih, ko pride do zastrupitve večje populacije ljudi ali živali.

Mikotoksini vstopijo v organizem posredno ali neposredno. Posredna kontaminacija hrane se nanaša na primer, ko vstopi v proces predhodno okužena sestavina s toksikogeno plesnijo, ki se sicer med procesom lahko odstrani, a njeni mikotoksini v večini primerov ostanejo v živilu (Smith in sod., 1994).

Mikotoksini v organizmu ne sprožijo tvorbe protiteles, zato je njihov učinek zelo toksičen in se kaže v obliki kancerogenosti, teratogenosti, mutagenosti, genotoksičnosti in imunotoksičnosti (Nemanič, 1989), tako pri živalih kot pri ljudeh (Atroshi in sod., 2002).

Mikotoksini intoksificirajo organizem z različnimi mehanizmi; lahko delujejo na sintezo proteinov in na transkripcijo (npr. aflatoksin), na deaminacijo in transaminacijo aminokislin, lahko blokirajo sekrecijo lipidov v jetrih, napadejo celice in preprečijo sintezo mukopeptidov in/ali cepijo fosfolipidne in proteinske strukture (npr. ohratoksin) in zelo pogosto delujejo tudi na metabolizem nukleinskih kislin (Atroshi in sod., 2002).

Toksični učinki po zaužitju mikotoksinov pri ljudeh in živalih so odvisni od številnih dejavnikov, kot so količina vnosa mikotoksina, trajanje izpostavljenosti toksinu, vrsta toksina, mehanizem njegovega delovanja, metabolizem in obrambni mehanizem ljudi in živali (Hussin in Brasel, 2001). Mikotoksini po zaužitju pridejo s cirkulacijo v različne organe živali in ljudi, kjer se izrazijo toksični efekti ali pa razpadejo v aktiven intermediat in nato izrazijo svojo toksičnost. Lahko pa mikotoksini oz. njihovi metaboliti razpadejo v razkrojne produkte, ki se izločijo iz organizma (Smith in sod., 1994).

Odvisno od časa in pogostnosti izpostavljenosti organizma toksičnim mikotoksinom je toksičnost lahko akutna (časovno kratkotrajna izpostavljenost smrtni dozi toksina; do 24 ur ali manj) ali kronična (izpostavljenost nižjim vsebnostim toksina v daljšem časovnem obdobju) (Jeršek in sod., 2004). Izpostavljenost je lahko intravenozna (preko krvi), dermalna (preko kože), peroralna (zaužitje) in inhalatorna (vdihavanje). Kratka izpostavljenost večjim dozam (npr. v enem obroku) lahko povzroči drugačne posledice kot ponavljajoča se izpostavljenost nižjim dozam mikotoksinov v daljšem časovnem obdobju.

Smith in sod. (1994) navajajo tri različne oblike mikotoksikoz:

- primarna akutna mikotoksikoza (jasno izraženi hujši zdravstveni akutni sindromi, npr. hepatitis, nefritis, nekroze epitelija, ki se pojavijo po zaužitju večje količine mikotoksinov);
- primarna kronična mikotoksikoza (časovno daljša izpostavljenost organizma manjšim količinam mikotoksinom; težka diagnoza);
- sekundarne bolezni mikotoksikoze (zaradi imunosupresivnega učinka mikotoksinov pride do padca odpornosti, kar povzroči naknadna različna virusna obolenja dihalnih organov, kolibacilozo, salmonelozo, kandidozo, kokcidozo itd.).

Pri primarni akutni mikotoksikozi se izrazijo spremembe na prebavnem traktu, centralnem živčnem sistemu (tresenje, ataksija, koma) in na koži (nekroza, fotosenzibilnost), motnje v cirkulaciji in delovanju srca, dihalnih organov in urinalnega trakta ter zlatenica (Nemanič, 1989).

Različne patološke študije so dokazale vrsto toksičnosti za različne mikotoksine, npr. aflatoksin je bil prisoten v organizmu pri sindromu krhkosti žil in hemoragičnosti telesnih tkiv, aflatoksin, toksin T-2, vomitoksin, sporidesmin so bili dokazani v organizmu pri diareji, bruhanju, hemoragičnosti črevesja, povečanju žolčnih kanalov, fibrozi, anoreksiji (Benford in sod., 2001).

Trihoteceni, med katerimi so pomembni DON, T-2, HT-2 in diacetoksiscirpenol (DAS), na splošno zavirajo sintezo proteinov v evkariontskih celicah. Najpomembnejši je DON, ki je sicer eden manj akutno toksičnih trihotecenov, vendar pa je najbolj razširjen. Drugi trihoteceni, T-2 in HT-2 lahko povzročajo hematološke spremembe in imunosupresijo, zmanjšano ješčnost, kožne spremembe in drisko (Smith in sod., 1994).

Toksičnost spojin dokazujejo z biološkimi testi na živalih, ki so pokazali, da je akutna toksičnost, izražena v LD<sub>50</sub> (lethal dose = količina toksina, ki povzroči smrt 50 % populacije testiranih živali), odvisna od vrste mikotoksina ter vrste, spola, starosti in fizičnega oz. zdravstvenega stanja konzumenta ter od frekvence in časa izpostavljenosti mikotoksinu (Bauer in sod., 2003).

LD<sub>50</sub> za trihotecene pri miših je 500 mg kg<sup>-1</sup> telesne teže, za samce podgan 5490 mg kg<sup>-1</sup> telesne teže. Manjše doze od LD<sub>50</sub> povzročajo kronična obolenja nekaerih organov (poškodbe jeter, vnetja kože, živčna drhtenja, aktiviranje tumorjev) ali celotnega telesa (otrplost, zaspanost) (Trček, 1996).

Določanje kronične toksičnosti služi ocenjevanju vrednosti NOAEL (no observed adverse effect level; odmerek brez opaznega zdravju škodljivega učinka), ki predstavlja osnovo določitve vrednosti ADI (Acceptable or Tolerable Daily Intake oz. sprejemljivega dnevnega vnosa, izraženega v mg kg<sup>-1</sup> telesne mase na dan), ta pa predstavlja količino določene kemijske snovi, ki jo človek še lahko zaužije vsak dan brez posebnega tveganja za zdravje.

Okužba z mikotoksini tudi oslabi imunski sistem, zato je lahko virusna, bakterijska ali parazitska infekcija posledica primarne okužbe z mikotoksini (Smith in sod., 1994).



Poskusi na živalih so pokazali, da imajo aflatoksini, sterigmatocistin in ohratoksin A kancerogeni učinek. Alfatoksin B1 dokazano deluje kancerogeno na človeška jetra (Ueno in sod., 1986).

### 2.3.1 Toksičnost mikotoksina DON

DON in tudi ostali trihoteceni se v levkocitih in drugih aktivno proliferativnih (hitro rastočih) evkariontskih celicah vežejo na ribosomsko podenoto 60S, s tem se aktivirajo mitogensko aktivirane protein kinaze, ki vplivajo na celično rast, diferenciacijo in apoptozo (programirano celično smrt) ter so zelo pomembne pri uravnavanju imunskega odziva organizma. Od živali so na DON bolj občutljivi prašiči kot perutnina, prežvekovalci in laboratorijske živali (kunci, miši, podgane itd.). Rotter in sod. (1996) navajajo, da srednje do nizke količine toksina v krmi ( $1-3 \text{ mg kg}^{-1}$ ) povzročijo pri prašičih odklanjanje krme, zmanjšujejo ješčnost in prirast, večje vsebnosti ( $\sim 20 \text{ mg kg}^{-1}$ ) pa povzročajo bruhanje.

Jakovac Štrajn (2008) je v raziskavi na veliki farmi prašičev preučevala učinek mikotoksinov, ki jih izločajo plesni rodu *Fusarium*, na prvič breje svinje (mladice) v obporodnem obdobju. Pri skupini mladic, ki je s krmo konzumirala DON v vrednosti  $5077 \mu\text{g kg}^{-1}$  (poskusna skupina), so, v primerjavi s kontrolno skupino, ugotovili statistično značilno zmanjšano ješčnost in manjši povprečni prirast pujskov. Med skupinama sicer ni bilo razlik v številu živorojenih, mrtvorjenih, poginulih in odstavljenih pujskov. Manjši delež obeh vrst limfocitov je bil v poskusni skupini; test proliferacije limfocitov, pri katerem so uporabljali različne kombinacije mikotoksina DON in mitogena PHA (fitohemaglutinin; mitogen je kemična snov, ponavadi neka oblika proteina, ki stimulira indukcijo mitoze), je pokazal, da se skupini statistično značilno razlikujeta v vseh kombinacijah, razen pri dodatku PHA  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Odziv limfocitov je bil v vseh primerih večji pri poskusni skupini, značilno večja je bila v tej skupini tudi apoptoza perifernih krvnih limfocitov, povprečne vrednosti vseh hematoloških in biokemijskih parametrov pa se med skupinama v poskusu niso pomembno razlikovale. Opravljeni imunološki testi so pokazali, da krmljenje s takšno krmo lahko učinkuje na imunski odziv mladic v obporodnem obdobju in obenem lahko povzroča imunosupresivne (spontana apoptoza, celice T pomagalk in citotoksične celice T) in imunostimulatorne (stimulacija limfocitov) spremembe pri živalih. Delovanje takšne krme na imunski sistem prašičev se je izkazalo torej za kompleksno, zato je zanesljivost ocene dejanskega učinka DON na imunski sistem prašičev otežena. Znano je namreč, da lahko DON deluje imunozaviralno ali imunostimulativno, odvisno od njegove količine, vrste živali in časa izpostavljenosti. Stimulativni učinki nizkih vsebnosti trihotecenov so povezani z njihovo sposobnostjo, da spodbudijo gene, povezane z imunostjo in vnetjem. Nasprotno pa je supresivni učinek trihotecenov na funkcijo levkocitov verjetno tesno povezan s povečanjem apoptoze, kar so dokazali na makrofagih, limfocitih B in T *in vitro* in *in vivo* (Pestka in sod., 2004).

V drugi raziskavi so Jakovac Štrajn in sodelavci (2011) raziskovali vpliv z mikotoksini onesnažene hrane na reproduktivne sposobnosti in koncentracije imunoglobulinov pri prašičih in ugotovili, da je bila poraba krme pri poskusni skupini brejih mladic, ki je

prejemala mikotoksina DON v vrednosti  $5,08 \text{ mg kg}^{-1}$  in ZEA v vrednosti  $0,09 \text{ mg kg}^{-1}$ , manjša kot pri kontrolni skupini, ki je v prehrani prejemala mikotoksina v vrednostih le  $0,29 \text{ mg kg}^{-1}$  (DON),  $0,02 \text{ mg kg}^{-1}$  (ZEA), tudi skupna stopnja rasti je bila pri poskusni skupini bistveno nižja kot pri kontrolni skupini. V povprečju so ugotovili za 80 minut daljši porod pri poskusni skupini in na 17. dan po kotitvi je bila koncentracija IgM (imunoglobulin M) v serumu poskusnih mladic bistveno višja, koncentracija IgA (imunoglobulin A) v kolostrumu poskusnih mladic pa bistveno nižja kot pri kontrolni skupini. V serumu poskusnih pujskov je bila koncentracija IgA in IgG (imunoglobulin G) 12, 24 in 48 ur po prvem sesanju bistveno nižja kot pri pujskih kontrolne skupine.

Čeprav je pogosto težko primerjati eksperimentalne rezultate študij, ki raziskujejo toksičnost mikotoksina DON, s situacijami resničnega življenja, saj so vselej prisotni tudi drugi trihoteceni in njihov sočasni vpliv ni raziskan, pa so Jakovac Štrajn in sod. (2011) pokazali, da lahko kroničen vnos DON vpliva na imunski sistem (zaznavne so spremembe nekaterih parametrov krvi, vključno s serumskimi imunoglobulini); za akutno toksičnost mikotoksina DON je značilno bruhanje, zlasti pri prašičih, zavračanje krme in posledično hujšanje ter tudi driska; akutna zastropitev lahko povzroči tudi nekrozo v različnih tkivih, na primer v prebavilih, kostnem mozgu in limfnih tkivih.

Stopnja akutne toksičnosti (izražena kot  $LD_{50}$  v  $\text{mg kg}^{-1}$ ) pri trihoteceni je odvisna od vrste samega trihotecena (od kemijske konfiguracije stranskih verig). Nekateri trihoteceni imajo podobno stopnjo toksičnosti (ne glede na različne mehanizme delovanja). T-2 toksin ima npr.  $LD_{50}$  cca.  $6 \text{ mg kg}^{-1}$  (pri miših, podganah, postrveh, piščancih in morskih prašičkih). DON je od toksina T-2 10-krat manj toksičen, makrociklični toksini pa 10-krat bolj toksični. Pri novorojenih živalih trihoteceni delujejo 15-krat bolj toksično kot pri odraslih živalih (Smith in sod., 1994).

Trihoteceni so zelo toksični na ravni subceličnih, celičnih in organskih sistemov ter zaradi topnosti v polarnih organskih topilih preko proteinskih prenašalcev penetrirajo skozi celični lipidni dvosloj ter reagirajo z DNA, RNA in celičnimi organeli ter inhibirajo sintezo DNA, RNA in proteinov. Toksičnost trihotecenov na subcelularnem nivoju je posledica zmožnosti inhibiranja sinteze proteinov ter kovalentne vezave na sulfhidrilne skupine. DON inhibira proteinsko sintezo z inhibicijo elongacije in terminacije, tarčni organel delovanja trihotecenov pa je podenota evkariontskih ribosomov 60S, tako da je stopnja aktivnosti proteinske inhibicije v korelaciji z afiniteto ribosomov. Trihoteceni povzročajo celično lizo in inhibicijo mitoze. Ali so mutageni, še ni potrjeno (Smith in sod., 1994).

Najpogostejši simptomi toksikoze s trihoteceni so vnetja kože oz. dermalne toksikoze, hemoragične poškodbe (obilne krvavitve), patološke spremembe (destrukcije) v hematopoetskih organih (organih, ki tvorijo krvne celice) in oslabitev imunskega odziva, niso pa genotoksični in ne predstavljajo karcinogenega tveganja. Signifikantna značilnost toksikoze s trihoteceni je bruhanje, verjetno povezano s kemoreceptorsko sprožilno cono v podaljšan hrbtenjači (Smith in sod., 1994).

V nasprotju z aflatoksini DON ne potrebuje aktivacije, saj je njegova prisotnost zadosten sprožilni dejavnik toksikoz. Vsi so podobno toksični (ne glede na način delovanja) tako pri moških kot ženskih osebkih kot tudi pri različnih vrstah organizmov (Smith in sod., 1994).

DON se po letu 1993 najpogosteje pojavlja v strnih žitih v Nemčiji (v vsebnosti 0,3–92 mg kg<sup>-1</sup>) in povzroča vnetje oz. draženje žrela, bljuvanje, bolečine v trebuhu, drisko, kri v blatu, vrtoglavice, bolečine v glavi in spremembo krvne slike, kar vodi v multisistemski šok sindrom. Pri živalih, krmljenih z obremenjenim žitom z DON, prihaja do zavračanja krme, bljuvanja, driske, vnetja žlez v koži in do sprememb v imunskem sistemu. V dolgotrajni raziskavi na miših se je izkazalo, da prihaja ob privzemu DON do obremenitve ledvic, kar sčasoma vodi do njihove odpovedi. Prežvekovalci in perutnina tolerirajo višje vsebnosti DON kot svinje (slabo tudi za ljudi). Zaužitje že zelo majhnih količin, to je manj kot 0,3 mg kg<sup>-1</sup> telesne teže na dan zavira biosintezo beljakovin pri živih bitjih in lahko vodi k splošnim poškodbam celic, zaradi česar organizem reagira s spremembo imunskega sistema (DLG-Arbeitsgruppe »Mykotoxine«, 2000).

Pri živalih, ki so verjetneje izpostavljene višjim dozam trihotecenov kot ljudje, se učinki izpostavljenosti večinoma izražajo kot hudo hujšanje in zmanjšana odpornost zlasti na bakterijske infekcije. V zadnjem času navajajo, da obstaja možnost odklonov v strukturi kromosomov v prašičjih limfocitih v primeru zaužitja kombinacije trihotecenov in mikotoksina ZEA (Smith in sod., 1994).

DON deluje pri miškah teratogeno pri vsebnosti 500–2500 µg kg<sup>-1</sup> žive teže. Znano je, da je bila v preteklosti razširjena (zlasti v Rusiji) alimentarna toksična aleukija, bolezen, ki je posledica zaužitja kosmičev, okuženih s plesnijo *Fusarium sporotrichioides*, ki v največji meri proizvaja toksin T-2. Podobno je znana tudi bolezen rdeče plesni na pšenici in rižu, ki je bila v preteklosti posledica okužbe s *Fusarium graminearum* (proizvaja NIV, DON in ostale trihotecene). Danes se ti bolezni pojavljata le še redko (periodično). Pri ljudeh je najpogostejši odgovor telesa na zaužitje trihotecenov bruhanje, diareja in reakcije na koži, vnetje grla, pa tudi krvavo blato in alergične reakcije. Pri novorojenih miškah so ugotovili močno občutljivost na trihotecene, za faktor 60 so občutljivejše od odraslih mišk, tako naj bi bilo tudi pri ljudeh (Smith in sod., 1994).

Vloga trihotecenov pri razvoju bolezni ljudi še ni razjasnjena. Imunosupresivni učinki trihotecenov na ljudi lahko pripeljejo v razvoj etiološko neznanih bolezni (imunosupresivna sredstva večajo pojavnost tumorskih sprememb) (Smith in sod., 1994).

### 2.3.2 Toksičnost mikotoksina ZEA

ZEA je zelo razširjen nesteroiden estrogenski mikotoksin, povzroča uterotropične spremembe na živalih. Ima zelo nizko akutno toksičnost pri podganah in četudi je teratogen, nima mutagenske aktivnosti. Lahko se biotransformira v  $\alpha$ -zeralenol, v metabolit z močnejše izraženimi estrogenskimi lastnostmi. Glede na svojo nizko akutno toksičnost bi ZEA lahko klasificirali kot mikoestrogen oz. kot šibek, nesteroiden estrogen z anaboličnimi lastnostmi (Smith in sod., 1994).

Meritve na miših, podganah in na prašičih so pokazale, da je mikotoksin ZEA relativno slabo akutno toksičen (D'Mello in Macdonald, 1997).



Zinedine in sod. (2007) navajajo kronično toksičnost in karcinogenost ZEA. V miškah samicah so v odvisnosti od prejete količine ZEA opazili estrogensko odvisne učinke: fibrozo v maternici, kanalih cist in v mlečnih žlezah in v kostnem mozgu. Opazili so tudi vnetje prostate, atrofijo testisov, ciste v mlečnih žlezah, povečano vakuolo v citoplazmi jetrnih celic in večjo pojavnost kronične nefropatije, retinopatijo in očesno mreno.

Maaroufi in sod. (1996) poročajo, da deluje ZEA tudi hematotoksično (disfunkcije v koagulaciji krvi, sprememba krvne slike) in hepatotoksično, Yu in sod. (2005) pa navajajo, da ZEA pri ljudeh potencialno stimulira rast rakastih celic, ki vsebujejo receptorje za odgovor estrogena oz. da izpostavljenost ZEA lahko prispeva k povečanju pojavnosti raka na dojkah.

Delovanje ZEA je tudi genotoksično in imunotoksično (Zinedine in sod., 2007). ZEA povzroča reproduktivne disfunkcije (neplodnost, splav in druge zarodne probleme) in hiperestrogenski sindrom pri ljudeh in živalih (predvsem pri svinjah, pa tudi pri govedu in ovcah). Že zelo majhne količine lahko povzročijo zelo izrazite estrogenske učinke (npr. svinje se ne bukajo) in škodo na rodilih. Med nosečnostjo ZEA niža možnost preživetja zarodka. Na maternico vpliva z nižanjem hormona progesterona. Deluje 5 % tako učinkovito kot najbolj znana sintetična spojina estradiola, ki se uporablja kot kontracepcijska tabletko. V raziskavi firme Aventis leta 1980 so ugotovili povprečno vsebnost ZEA 0–3,8 mg kg<sup>-1</sup> zrnja; pri doseganju maksimalne vrednosti je estrogensko delovanje zelo verjetno (DLG-Arbeitsgruppe »Mykotoxine«, 2000).

V dvoletni študiji na miškah se je pokazalo rahlo povečanje karcinoma v hipofizi; ZEA se ocenjuje kot možen, a šibek genotoksin, ni pa trdnih dokazov za teratogenost (Smith in sod., 1994).

Največjo aktivnost je ZEA pokazal pri prašičih (zato možno tudi pri ljudeh). Mladi prašiči kažejo pri nizkih dozah ZEA (kot je npr. 0,02 mg kg<sup>-1</sup> telesne mase) vulvarno otekanje, pri višjih dozah (25–100 mg kg<sup>-1</sup> telesne mase) pa tipične simptome hiperestrogenije, podaljšan estrus in anestrus, spremembe v libidu, neplodnost, povečano pojavnost psevdonosečnosti, razvoj povečanih žlez vimen in nenormalno laktacijo (Smith in sod., 1994).

ZEA deluje kot ostali estrogeni z vezavo citosoličnih receptorskih proteinov in naknadno translokacijo receptorskega hormonskega kompleksa na jedro s kontrolirano genetsko ekspresijo. V primerjavi s 17β-estradiolom je ZEA približno 100- do 1000-krat manj estrogensko aktiven, zato so njegovim učinkom bolj podvržene mlade živali (Smith in sod., 1994).

## 2.4 VARNOST

Za ljudi in živali so mikotoksini izjemno strupene snovi, ki povzročajo mikotoksikoze z neposrednimi znamenji v obliki zastrupitev in kroničnimi znamenji v obliki obolenj jeter ali aktiviranja tumorjev (Kuiper Goodman, 1995).

Nevarnost, ki jo predstavljajo mikotoksini, in njihova neizogibna prisotnost v hrani sta pripeljali do stroge kontrolne politike. Četudi ima pomemben vpliv pri končni odločitvi ekonomski dejavnik, predstavljajo znanstvene informacije osnovo za določanje največje dovoljene vrednosti mikotoksinov v hrani. Celoten znanstveni pristop upošteva podatke izpostavljenosti posameznika ali populacije in jih kombinira s toksikološkimi podatki, ki jih dobijo z laboratorijskimi študijami na živalih. Za pridobitev in zagotovitev vrednosti ADI/TDI (Acceptable or Tolerable Daily Intake) je treba te podatke ekstrapolirati na ljudi, pri čemer se seveda upošteva še varnostni faktor negotovosti 10. Odbor zveze strokovnjakov JECFA (Joint Expert Committee on Food Additives) je v okviru svetovne zdravstvene organizacije WHO (World Health Organization) objavil ocene tveganja najpomembnejših mikotoksinov; ohratoksina A (OTA), fumonizinov, mikotoksina DON, toksina T-2, patulina in mikotoksina ZEA ter osnoval začasne maksimalne tolerančne tedenske vrednosti vnosa omenjenih mikotoksinov (PMTWI - Provisional Maximum Tolerable Weekly Intake) in začasne maksimalne tolerančne dnevne vrednosti vnosa mikotoksinov (PMTDI - Provisional Maximum Tolerable Daily Intake). Pri tem so v odboru upoštevali faktor 100 (10 zaradi ekstrapolacije z živali na ljudi in še 10 zaradi individualne raznolikosti posameznikov). Vrednosti še niso dokončne, potrebne so še nadaljnje ocene tveganja izpostavljenosti mikotoksinom, ki naj bi izhajala iz epidemioloških podatkov toksičnosti pri živali, podatkov o dejanskih vsebnostih mikotoksinov v hrani in stopnje izpostavljenosti ter iz ekstrapolacije podatkov močno izpostavljenih živali v podatke za malo izpostavljene ljudi (Kuiper Goodman, 1995). Pri oceni verjetne humane izpostavljenosti mikotoksinom je treba upoštevati vso potencialno kontaminirano hrano.

Žal v večini držav predpisi za mikotoksine niso sledili znanstvenim dognanjem. V več državah so pred dvema desetletjema pričeli z določanjem aflatoksinov, le redki (npr. Avstralija) pa so v svojih predpisih že v začetku vključevali tudi DON, toksin T-2, ZEA, patulin, ohratoksin idr. (Moss, 1992). Tudi v Sloveniji smo na osnovi Pravilnika o količinah pesticidov in drugih strupenih snovi, hormonov, antibiotikov in mikotoksinov, ki smejo biti v živilih (Pravilnik ..., 1983) pričeli z omejevanjem aflatoksinov B1 in G1 v pšenici, koruzi, rižu, ječmenu in drugem žitu (največja dovoljena količina B1 + G1:  $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), v žitni moki (maks.  $3 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) ter podobno v stročnicah, oreščkih, praženi kavi in kakavovcu, v čaju ter v začimbah (Trček, 1996). Največji dovoljeni dnevni vnos (TDI – tolerable daily intake) mikotoksinov DON in ZEA je določila SCF (Scientific Committee for Food); TDI za DON je tako  $1 \mu\text{g/kg}$  telesne teže in TDI za ZEA je  $0,2 \mu\text{g/kg}$  telesne teže (Uredba komisije (ES) ..., 2005).

V Uredbi komisije (ES) št. 1126/2007 z dne 28. septembra 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 je navedeno, da je treba mejne vrednosti določiti tako strogo, da jih je še mogoče doseči v razumnih mejah z uporabo dobrih

kmetijskih in proizvodnih praks ter ob upoštevanju tveganja, povezanega z uživanjem živil. Podnebne razmere med rastjo, zlasti med cvetenjem, imajo namreč velik vpliv na vsebnost toksina iz rodu *Fusarium*. Vseeno lahko dobre kmetijske prakse, pri katerih so dejavniki tveganja zmanjšani na najnižjo možno raven, do neke stopnje preprečijo onesnaženost z glivo rodu *Fusarium*. Priporočilo Komisije 2006/583/ES z dne 17. avgusta 2006 o preprečevanju in zmanjševanju prisotnosti toksinov iz rodu *Fusarium* v žitu in žitnih izdelkih, vključno s koruzo in koruznimi proizvodi (Priporočilo komisije ..., 2006), vsebuje splošna načela za preprečevanje in zmanjševanje onesnaženosti s toksini iz rodu *Fusarium* (zearalenon, fumonizini in trihoteceni) v žitih, ki jih je treba upoštevati pri varnosti (Uredba komisije (ES) ..., 2006a).

#### 2.4.1 Prehranski vnos DON

Na Nizozemskem so Pieters in sod. (2002) opravili študijo, s pomočjo katere so pridobili TDI za DON  $1,1 \mu\text{g kg}^{-1}$  telesne teže in predlagali mejno vrednost  $129 \mu\text{g kg}^{-1}$  pšenice, ki je osnovana upošteva omenjeno TDI in najvišjo porabo pri otrocih. Ugotovili so, da je bil od septembra 1998 do januarja 2000, ko so bile vrednosti DON v pšenici visoke, glede na začasno TDI, prehranski vnos DON prekoračen, še zlasti pri otrocih, kar je nedvoumno pustilo posledice na njihovem zdravju. Schothorst in van Egmond sta leta 2004 predstavila rezultate SCOOP-a (Scientific Cooperation on Questions related to Food) iz raziskav o trihoteceni. Kljub pomanjkljivim podatkom o porabi kontaminirane hrane v nekaterih deželah in o prehrani dojenčkov in otrok avtorja poudarjata, da je med žiti koruza med najbolj kontaminiranimi s trihoteceni, pšenica in pšenični izdelki (kruh, testenine itd.) pa predstavljajo glavni vir njihovega vnosa; skupna vnesena količina je pod mejo TDI, toda vnos trihotecenov pri otrocih je zelo blizu ali celo dosega TDI; vnos mikotoksina NIV je daleč od TDI, vnos toksina T-2 in toksina HT-2 pa v večini primerov TDI celo presega.

V Uredbi komisije (ES) št. 1126/2007 (Uredba komisije (ES) ..., 2007) in v spremembi Uredbe (ES) št. 1881/2006 (Uredba komisije (ES) ..., 2006a) je navedena mejna vrednost za DON ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) v žitih, namenjenih neposredni prehrani ljudi, v žitni moki (vključno s koruzno moko ter finim in grobim koruznim zdrobom), v suhih testeninah, v otrobih kot končnem proizvodu, ki se daje v promet za neposredno prehrano ljudi, ter kalčkih, razen v žitnih kašicah ter otroški hrani za dojenčke in majhne otroke, in znaša  $750 \mu\text{g kg}^{-1}$ . V nepredelani koruzi, trdi pšenici in ovsu je določena mejna vrednost  $1750 \mu\text{g DON kg}^{-1}$ , v ostalih nepredelanih žitih pa  $1250 \mu\text{g DON kg}^{-1}$ . Za kruh in druge pekavske izdelke znaša mejna vrednost  $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ , za otroke pa  $200 \mu\text{g kg}^{-1}$  (velja v suhi snovi).

#### 2.4.2 Prehranski vnos ZEA

Zaradi hitre transformacije in izločanja se ZEA pri živalih hitro transformira in izloči iz telesa, zato je verjetnost nevarnosti, da bi zaužili večje količine ZEA preko mesa, zelo majhna. Pri kravah, krmljenih s koruzo z visoko vsebostjo ZEA, pa se ta lahko izloča v njihovo mleko. Najvišja vsebnost ZEA v mleku krave, ki so ji 21 dni oralno dajali po  $6000 \text{ mg ZEA}$ , je bila  $6,1 \mu\text{g l}^{-1}$ . V mleku treh krav, ki so jim 21 dni dodajali  $50\text{--}165 \text{ mg ZEA}$ , pa niso našli niti ZEA niti njegovih presnovkov (Prelusky in sod., 1990).

ZEA se lahko prenese iz kontaminiranega žitnega zrnja tudi v pivo. Toda kljub kar 58-odstotni pojavnosti ZEA v afriških pivih, v visokih vsebnostih, pa niti ZEA niti alfa-niti beta-zearalenona niso našli v evropskih, kanadskih in korejskih pivih, z izjemo enega francoskega piva, ki je vsebovalo ZEA v vrednostih  $100 \mu\text{g l}^{-1}$  (Okoye, 1987).

Poglavitni vir toksifikacije z ZEA v Evropi so pšenica, oves in rž ter njihovi izdelki, v Kanadi in ZDA pa tudi koruza. Povprečni dnevni vnos ZEA pri odraslih ljudeh variira med  $0,8$  in  $29 \text{ ng kg}^{-1}$  telesne teže ter med  $6$  in  $55 \text{ ng kg}^{-1}$  telesne teže pri majhnih otrocih (Minervini in sod., 2005). Objavljenih je zelo malo raziskav o prehranskem vnosu ZEA pri ljudeh; kanadski in skandinavski podatki pa govorijo v prid minimalnemu tveganju za ljudi (Kuiper Goodman in sod., 1987).

Zveza FAO/WHO je izdala mejno vrednost prehranskega vnosa (PMTDI) ZEA, ki znaša  $0,5 \mu\text{g kg}^{-1}$  telesne teže (Codex Alimentarius Commission, 2000). Devet držav je določilo zgornjo še dovoljeno vrednost v hrani (predvsem v žitih), in sicer  $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$  (Leatherhead Food Research, 2010).

V Uredbi komisije (ES) št. 1126/2007 z dne 28. septembra 2007 o spremembi Uredbe (ES) št. 1881/2006 je navedena mejna vrednost za ZEA ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) v žitih, namenjenih neposredni prehrani ljudi (žitni moki, otrobih, kalčkih idr.), ki znaša  $75 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Za nepredelano koruzo, koruzno moko, koruzni zdrob, kalčke, koruzno olje velja mejna vrednost  $200 \mu\text{g kg}^{-1}$ , za ostala nepredelana žita pa  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ . V kruhu in pekovskih izdelkih je določena mejna vrednost  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ , za koruzne kosmiče in prigrizke, žitne kašice ter ostalo otroško hrano za dojenčke in majhne otroke pa velja mejna vrednost  $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ .

## 2.5 OBVLADOVANJE

Zaradi škodljivih in celo pogubnih učinkov, ki jih povzročajo mikotoksini, so strokovnjaki razvili že več strategij, ki preprečujejo rast mikotoksikogenih plesni in dekontaminirajo ali detoksificirajo hrano in živalsko krmo, okuženo z mikotoksini (Rustom, 1997): preprečevanje kontaminacije z mikotoksini, detoksifikacija mikotoksinov, prisotnih v hrani in krmi, ter inhibicija absorpcije mikotoksinov v gastrointestinalnem traktu. Vendar četudi so znanstveniki izumili veliko novih fungicidov ter so izvedli že več intenzivnih raziskav, s pomočjo katerih bi se lahko izognili kontaminaciji posevkov in bi lahko sejali na plesni odporne vrste rastlin, še vedno ni znana visoko učinkovita zaščitna metoda, s katero bi se izognili pojavnosti mikotoksinov v pridelkih (Jakovac Štrajn in sod., 2004).

### 2.5.1 Preprečevanje kontaminacije z mikotoksini

Do kontaminacije z mikotoksini lahko pride pred in med žetvijo, med skladiščenjem ter med samo predelavo. Na primer *Aspergillus* in *Penicillium* v splošnem kontaminirata hrano z mikotoksini med samim sušenjem in skladiščenjem, rodova *Fusarium* in *Alternaria* pa proizvajata mikotoksine še pred žetvijo ali pa takoj po njej (Sweeney in Dobson, 1999). Tako se tudi metode preprečevanja kontaminacije z mikotoksini delijo na

predžetvene metode, metode med samo žetvijo in na metode preprečevanja kontaminacije po žetvi. Priporočila za zmanjšanje mikotoksinov v žitih so sestavljena iz dveh delov; iz priporočil, osnovanih na GAP (Good Agricultural Practice) in na GMP (Good Manufacturing Practice) ter iz sistema analize tveganja kritičnih kontrolnih točk (HACCP - Hazard Analysis of Critical Control Point).

## 2.5.2 Strategije preprečevanja okužb pred žetvijo

Raziskovalci so v nedavnih študijah posvečali premalo pozornosti vplivu različnih metod pridelave na pojavnost mikotoksinov v pšeničnem zrnju; raziskovanje metod pridelave je potekalo v povezavi s padavinami, kolobarjenjem in s kultivarji ter je bilo redko ocenjeno v okviru diferenciranih in hkrati natančnih načinov pridelave. Namesto da bi raziskave preučevale posamezne načine pridelave, so bile usmerjene v preučevanje učinka drugih dejavnikov, kot so toplo in vlažno vreme, kolobarjenje posevkov žit ali žitnih kultivarjev z razlikami v odpornosti na nastanek mikotoksinov (Schachermayr in Fried, 2000). Nekateri znanstveniki v Sloveniji so že raziskovali vpliv okolja na pojavljanje mikotoksinov v pšeničnih posevkih. Zemljič in sod. (2008) so pokazali, da lokacija igra pomembno vlogo pri nastanku mikotoksina DON (ZEA ni bil ugotavljan). Gregorčič in sod. (2009) so preučevali kontaminacijo z mikotoksini v pšenici in odkrili DON v večini testiranih vzorcev, ZEA v polovici vseh vzorcev ter oba mikotoksina s prekomerno vrednostjo v eni petini vzorcev. Jakovac Štrajn in sod. (2010) so študirali kontaminacijo zrn s plesnijo in pojavnostjo mikotoksinov v žitih, ki jih gojijo kmetje za živalsko krmo. Večina (73 % vzorcev) pšenice je bilo okužene s plesnijo *Fusarium* spp., ki povzroča nastanek DON in v manjši meri ZEA ter tudi drugih mikotoksinov. Kalcher Tavčar je s sodelavci (2007) preučil kontaminacijo krme za živali in med drugim ugotovil povprečno vsebnost 178  $\mu\text{g}$  ZEA  $\text{kg}^{-1}$  zrnja v 42 % vseh vzorcev. Zgornje ugotovitve potrjujejo, da je nadzor mikotoksinov pri pridelavi zrnja potreben in upravičen tudi v Sloveniji. Sledenje načelom dobre proizvodne kmetijske prakse in optimizacija metod pridelovanja lahko zmanjšata pojavnost mikotoksinov v žitu in dejavnike tveganja za pojavnost mikotoksinov na najnižjo možno raven (Uredba komisije (EU) ..., 2007).

Okužbo rastline in poznejšo biosintezo mikotoksina precej pogojuje genom rastline (Trček, 1996). Ker so toksikogene plesni poglavitni rastlinski patogeni, predstavljata pridelava kultivarjev, odpornih na toksikogene plesni, in učinkovita uporaba fungicidov precejšen pomen za zmanjšanje kontaminacije žit z mikotoksini (D'Mello in Macdonald, 1997). Tudi Masterhazy (2002) za doseganje čim nižje stopnje okuženosti s plesnijo *Fusarium* pridelovalcem žit priporoča, naj v določenih območjih kultivirajo le tiste kultivarje različnih žit, ki se priporočajo točno za to določeno področje in naj v čim večji meri kultivirajo kultivarja, ki so odporne na napad plesni *Fusarium*, to dvoje pa naj še združijo z uporabo primernih fungicidov; takšen integriran ukrep predstavlja ključ do uspeha (Masterhazy, 2002). Kljub npr. identificiranemu rezistentnemu genu v koruznem hibridu, odpornem na okužbo s plesnijo *Giberella* (Dutoit in Pataky, 1999), pa se je pokazalo, da je visoke vrednosti naravne genetske odpornosti različnih žit na toksikogene plesni zelo težko doseči (Munkvold, 2003).



Delež vidno s *Fusarium* spp. okuženih zrn ob spravi še ne določa predvidevanja za pojav (prisotnost) mikotoksinov v zrnju brez tveganja. Izkazalo se je, da so ukrepi za zmanjšanje mikotoksina DON v zrnju povezani s krtačenjem zrnja s posebnimi ščetkami, ki odstranjujejo pleve. Ugotovili so tudi, da je v plevah mnogo več mikotoksina DON kot v notranjosti zrna (Simonin, 2008).

Obstajajo substance, ki lahko zmanjšajo sintezo mikotoksinov, manjši vpliv pa imajo na rast plesni. Kofein ( $0,5 \text{ mg ml}^{-1}$ ) npr. inhibira rast *Aspergillus parasiticus* le v 18 %, biosintezo aflatoksina pa inhibira v 86 %. Kljub temu kofein ne predstavlja popolne zaščite pred sintezo mikotoksinov, kar je dokazala izolacija seva vrste *A. ochraceus* iz zelenega kavnega zrna s sposobnostjo razgraditve kofeina in posledično tvorbo ohratoksina (Moss in sod., 1990).

Forrer je s sodelavci (2014) raziskoval učinkovitost kitajske šiške (*Galla chinensis*) in taninske kisline ter ugotovil inhibicijo rasti plesni *Fusarium graminearum* s suspenzijo 1 % raztopine kitajske šiške (*Galla chinensis*) in 1 % taninske kisline v 98–100 % oz. 75–80 % na pšenici, umetno inokulirani s plesnijo *Fusarium graminearum*.

Primerne agrotehnične metode, ki prav tako vplivajo na nastanek mikotoksinov med rastjo na polju, so kolobarjenje, podoravanje, namakanje in gnojenje. Izjemnega pomena je kolobarjenje, ki temelji na prekinitvi prenašanja okužbe iz letine v letino; tako se npr. zelo obnese rotacija pšenice in stročnic, koruza pa se v rotaciji s pšenico močno odsvetuje, saj je prav tako ali celo bolj dovzetna za okužbe s plesnijo *Fusarium* (Nicholson in sod., 2003).

### 2.5.3 Strategije za preprečevanje okužb med žetvijo

Vsebnost vlage je pomembna meritev, ki določa čas žetve in ki lahko pripomore k preprečitvi tvorbe mikotoksinov. Ker lahko vsebnost vlage znotraj pridelka na isti njivi precej variira, je nujno potrebna kontrola vsebnosti vlage na več mestih istega pridelka na njivi. Prav tako je izjemnega pomena dobra ocena obsega okužbe s plesnijo *Fusarium*, za učinkovito strategijo pa je potrebna tudi mehanična ločitev okuženih rastlin od zdravega zrnja. Dokazano je, da prihaja ob preprečitvi pred morebitnimi mehanskimi poškodbami zrnja in izogibanju kontakta z zemljo do močno zmanjšanih okužb s plesnijo iz rodu *Fusarium* (Codex Alimentarius Commission, 2014).

### 2.5.4 Strategije preprečevanja okužb po žetvi

Preprečevanje okužb po žetvi je pomemben korak pri preprečevanju kontaminacije z mikotoksini, vključuje pa izpopolnjene pogoje sušenja in skladiščenja skupaj z uporabo naravnih in kemičnih agensov ter namakanjem. Praksa pri preprečevanju kontaminacije z mikotoksini se razlikuje glede na klimatske razmere področja in glede na vrsto pridelka. V splošnem se mikotoksikogene plesni razraščajo v skladiščih kot posledica variabilnosti vlage znotraj zrnja ali kot posledica migracije vlage zaradi hlajenja zrnja na površini. Kontrola zadostnega zračenja in vsebnosti vlage je torej med skladiščenjem izjemnega



pomena (Heathcote in Hibbert, 1978). Vsebnost vlage je pri skladiščenju najmočnejši dejavnik rasti mikotoksikogenih plesni in nastanka mikotoksinov ter predstavlja enega od glavnih razlogov visoke kontaminacije z mikotoksini v deželah v razvoju (Hell in sod., 2000).

Zrnje je v skladiščih močno podvrženo kontaminaciji s plesnijo rodu *Aspergillus flavus* in *Aspergillus parasiticus* (obe proizvajata aflatoksine) ter *Penicillium verrucosum* (proizvaja ohratoksin A). Aflatoksini nastajajo pri  $a_w$ -vrednostih 0,95 do 0,99 z minimalno  $a_w$ -vrednostjo 0,82 pri *Aspergillus flavus*, minimalna  $a_w$ -vrednost za nastanek ohratoksina A pa je 0,80. Znano je, da *Aspergillus flavus* ne napade zrnja z vlažnostjo, ki je uravnotežena z relativno vlažnostjo 70 % ali manj. Vlažnost pšenice pri tolikšni relativni vlažnosti znaša 15 %, vlažnost koruze pa 14 % (Codex Alimentarius Commission, 2014). *Aspergillus parasiticum* proizvaja aflatoksine po treh mesecih skladiščenja tudi pri 14-odstotni vlažnosti pšeničnega zrnja (Atalla in sod., 2003).

Drugi kritični dejavnik, ki vpliva na rast plesni in nastanek mikotoksinov po žetvi, je temperatura. Tako *Aspergillus flavus* kot *Aspergillus parasiticus* uspevata v temperaturnem območju od 10–12 °C do 42–43 °C z optimalno temperaturo rasti pri 32–33 °C. Aflatoksini nastajajo pri temperaturi od 12 do 40 °C, ohratoksin A, ki ga proizvaja *Penicillium verrucosum*, pa pri temperaturi od 10 do 25 °C (Pineiro in sod., 2001). Temperaturni dvig za 2 do 3 °C v skladišču lahko povzroči napad plesni in insektov, zato je redno preverjanje temperature v določenih intervalih zelo priporočljivo (temperatura se ne sme spreminjati). Skladišča morajo biti suha in zgrajena tako, da so varna pred dežjem ali kakršnimkoli drugim vdorom vode ter zaščitena pred glodalci in ptiči (Codex Alimentarius Commission, 2014).

### 2.5.5 Preprečevanje okužb z uporabo naravnih in kemičnih agensov

Veliko različnih naravnih in kemičnih agensov se lahko uporablja za preprečevanje rasti mikotoksikogenih plesni in nastanka mikotoksinov. Npr. fosfin, zelo toksičen plin, ščiti žita pred insekti in napadom plesni, v koncentraciji od 1000 do 2000 ppm inhibira rast *A. flavus* in *Aspergillus parasiticus* (Antonacci in sod., 1999), pri inhibiranju tvorbe aflatoksina B<sub>1</sub> pa so učinkoviti tudi fungicidi diklor, landrin, malationin in diazinon. Učinek fungicida je odvisen od kemične sestave, uporabljenega razmerja, vrste žita, vrste plesni in pogojev pri skladiščenju (European Commission, 1999).

Na rast mikotoksikogenih plesni vpliva tudi uporaba herbicidov. Glufozinat amonij (GA) npr. učinkovito zavira rast *A. flavus* in tako zmanjša tvorbo mikotoksina AFB<sub>1</sub> kar za 90 % (Tubajika in Damann, 2002). Sintetični pesticidi uspešno zmanjšujejo vrednosti ohratoksina A (Lo Curto in sod., 2004). Sorbinska kislina, njene Na in K soli, Na benzoat ter propionska in citronska kislina inhibirajo tvorbo aflatoksinov, SO<sub>2</sub> pa npr. inhibira tvorbo patulina (Kabak in sod., 2006).

Zelo obetaven pristop, ki predstavlja alternativo fungicidom, zlasti po žetvi, je potencialna uporaba antagonističnih bakterij, plesni in kvasovk. Znano je, da antagonistične kvasovke zmanjšujejo rast kvarljivih plesni, tako npr. *Pichia anomala* in *Saccharomyces cerevisiae*

uspešno nižata akumulacijo ohratoksina A (Kabak in sod., 2006). Shanta (1999) je v drugi raziskavi pokazal, da lahko tudi mnoge plesni inhibirajo npr. sintezo AFB<sub>1</sub>. V zadnjih letih pa se posebno pozornost zaradi GRAS (Generally Regarded As Safe) posveča mlečno kislinskim bakterijam, ki kot naravna varovalna sredstva tudi inhibirajo rast toksikogenih plesni in kopičenje njihovih mikotoksinov. Čeprav je v številnih primerih protimikotoksikogena sposobnost mlečno kislinskih bakterij še neznan, pa v splošnem prevladuje mnenje, da je inhibicija sinteze mikotoksinov posledica mikrobne kompeticije, izčrpanosti hranilnih zalog, nizkega pH in pa temperaturno odpornih in nizko molekularnih metabolitov, ki jih proizvajajo mlečno kislinske bakterije (Batish in sod., 1997).

Npr. metabolit kaprilna kislina inhibira plesni rodu *Monilia*, *Aspergillus*, *Penicillium* in *Fusarium*. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* Si3 ima zelo širok spekter delovanja proti mikotoksikogenim plesnim, med drugimi tudi proti *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Penicillium roqueforti*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium sporotrichoides* in *Fusarium poae* (Magnusson in Schnürer, 2001).

Tudi naravni rastlinski ekstrakti so znani kot inhibitorji rasti mikotoksikogenih plesni. Učinkoviti zaviralci rasti *A. flavus* so rastlinski ekstrakti iz Egipta (*Lupinus albus*, *Ammi visnaga*, *Xanthium pungens*) ter eterična olja (npr. bazilike, timijana in nageljnovе žbice). Na inhibicijo plesni *A. parasiticus* in *Fusarium moniliforme* učinkujejo tudi olja cimeta, origana, muškata cveta in oreška ter janeža (Juglal in sod., 2002).

### 2.5.6 Žarčenje

Žarčenje je lahko bodisi ionizirajoče (IR) ali neionizirajoče (NIR), z vključenimi X-žarki ali  $\gamma$ -žarki pri IR ter UV-žarki, mikrovalovi, infrardečimi žarki in radijskimi valovi pri NIR. Kljub množičnim pomislekom glede varnosti obsevane hrane postaja obsevanje različnih vrst živil in hrane vedno pogostejše. JECFI (Joint of Expert Committee on Food Irradiation) je leta 1980 navedla, da obsevanje katerekoli vrste hrane do povprečne vrednosti 10 kGy ne povzroča tveganja s stališča toksičnosti, mikrobiologije in prehranske vrednosti. Za inhibicijo rasti mikotoksikogenih plesni se uporabljajo predvsem  $\gamma$ -žarki (El-Bazza Zeinab in sod., 2001).

### 2.5.7 Stabilnost in detoksifikacija mikotoksinov

Stabilnost mikotoksinov v krmi za živali in hrani za ljudi je odvisna od vsebnosti vode, pH-medija, vsebnosti vitamina C, bisulfitov in oksidantov. Npr. aflatoksini so v čisti obliki nestabilni, zlasti v tekočem mediju, v živilih kot bolj kompleksnem sistemu pa so bolj stabilni.

Preventivni posegi obvarovanja pred kontaminacijo pridelka z mikotoksini niso vedno mogoči in v takšnem primeru lahko pridelek detoksificirajo, tako da mikotoksine odstranijo delno ali v celoti ali pa jih inaktivirajo s fizikalnimi, kemičnimi ali biološkimi metodami. Npr. aflatoksin se delno ali popolnoma razgradi pri obsevanju z radioaktivnimi žarki, na visoki temperaturi, z močnimi kislinami ali bazami, oksidanti ali bisulfiti.

Vodikov peroksid v kombinaciji z riboflavini denaturira aflatoksin v mleku. Mikotoksine je možno razgraditi tudi z nekaterimi mikroorganizmi (aflatoksine razgrajujejo patulin fermentirajoče kvasovke in *Aspergillus parasiticus* s svojim peroksidaznim encimskim kompleksom). Fizikalna odstranitev aflatoksina in patulina je mogoča z adsorbenti (npr. bentonitom), ohratoksin A pa se razgradi z mikrovalovi. Aflatoksin odstranjujejo iz živalske krme z amoniakom, saj je tako obdelana krma še vedno zdravstveno neoporečna za prehrano živali (Doyle in sod., 1982).

V EU ni dovoljeno niti mešanje kontaminiranih pridelkov z dobrimi niti njihova detoksifikacija (Uredba komisije (ES) ..., 2001), prepovedana je uporaba živil, ki niso v skladu z določenimi mejnimi vrednostmi, prepovedano je mešanje živil, ki so v skladu z določenimi mejnimi vrednostmi, z živil, ki presegajo te mejne vrednosti, ter detoksifikacija z mikotoksini kontaminiranih živil (Uredba komisije (ES) ..., 2006a).

Raziskavo o vplivu mletja in kuhanja na vsebnost DON oziroma o postopkih njegovega odstranjevanja ali uničenja v pšenici je z namenom zmanjšanja izpostavljenosti mikotoksinu DON zlasti za ljudi, ki uživajo večje količine pšenice (kruh, testenine, zdrob, itd.), preučeval Kushiro (2008). Navaja, da čiščenje zrnja pred mletjem do neke mere zmanjša vsebnost mikotoksina DON v končnem izdelku. Ker je DON porazdeljen po vsem zrnju, z višjo vsebnostjo v zunanjih slojih, je pri zniževanju ravni mikotoksina DON učinkovito tudi mletje, če se otrobi pred nadaljnjo termično obdelavo odstranijo. Med pečenjem ali gretjem se DON delno razgradi v mikotoksinu DON sorodne kemijske spojine, katerih učinki pa še niso bili dovolj preučevani, zato so v zvezi s tem potrebne nadaljnje raziskave.

### 2.5.8 Inhibicija adsorpcije mikotoksinov v gastrointestinalnem traktu

Kot eden najsodobnejših ukrepov pri preprečevanju mikotoksikoz pri živini se je pojavilo dodajanje nehranilnih adsorbentov v krmo, kar povzroči vezavo adsorbenta na mikotoksin in s tem njegovo bionedostopnost v gastrointestinalnem traktu (Galvano in sod., 2001). Najpodrobneje so preučili adsorbente z visoko afiniteto za mikotoksine, kot so aktivirani ogljiki (AC), hidrirani natrijevi kalcijeви aluminijeви silikati (HSCAS), zeoliti, bentoniti in točno določena vrsta gline (Huwig in sod., 2001).

Pred nekaj leti se je pojavilo povečano zanimanje za hipotezo, da lahko mikroorganizmi v gastrointestinalnem traktu inhibirajo absorpcijo vnesene hrane. Številni avtorji so pokazali, da lahko mlečno kislinske bakterije in bifidobakterije v mlečnih izdelkih zelo učinkovito vežejo aflatoksine (Peltonen in sod., 2000). Čeprav mehanizem vezave še ni razjasnjen, vendarle domnevajo, da je vezava aflatoksina B<sub>1</sub> na mlečnokislinske bakterije fizikalen pojav, povezan z zgradbo bakterijske celične stene, natančneje s peptidoglikani in polisaharidi v celični steni (Haskard in sod., 2000). El-Nazami in sod. (1998) so pokazali, kako so 24 ur stare kulture *Lactoabacillus rhamnosus* linije GG Lb. *rhamnosus* seva LC-705 odstranile 80 % aflatoksina B<sub>1</sub> v 24 urah. Tudi drugi raziskovalci so pokazali sposobnost vezave aflatoksina z bakterijami rodu *Lactobacillus*, *Lactococcus* in *Bifidobacterium in vivo* (El-Nazami in sod., 2000).

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 OPIS LOKACIJ POSKUSA

Kot objekta za našo raziskavo smo izbrali dva statična trajna poljska poskusa v okviru mreže mednarodnih poljskih poskusov, IOSDV (Internationalen Organischen Stickstoff – Dauerdüngungsversuche) Jable in Rakičan, ki sta bila zasnovana leta 1992. Zasnova tega dolgotrajnega poljskega eksperimenta je bila podrobno opisana v prejšnjih opisih, skupaj z njihovimi okoljskimi parametri (Tajnshek, 2003; Tajnshek, L. in A., 2004; Tajnshek, 2004).

##### 3.1.1 IOSDV Jable

Poskus IOSDV Jable (46° 8' N, 14° 34' N, HAS 305 m) leži v območju predalpske klime, kjer le redko prihaja do daljših sušnih obdobij poleti, še manj pa jeseni in pozimi. Zaradi premestitve meteorološke postaje Ljubljana Bežigrad na Letališče Jožeta Pučnika Ljubljana (Brnik) leta 1990 dolgoletno povprečje temperatur in padavin 1961–1990 te lokacije ni primerljivo z vremenskimi pojavi na novonastali meteorološki postaji Letališče Jožeta Pučnika, zato smo za potrebe našega poskusa oblikovali dolgoletno povprečje temperatur in padavin na Brniku za obdobje 1993–2010 (Priloga A).

Na lokaciji IOSDV Jable je bila povprečna letna temperatura v obdobju poskusa (1993–2008) za 1 °C višja od dolgoletnega povprečja. V letih 1994, 2000, 2002, 2007 in 2008 je bil odklon letne temperature (8,33 °C) od dolgoletnega povprečja 1961–1990 enak ali večji od +1,53 °C (Priloga A).

Povprečna letna količina padavin v obdobju od 1993 do 2008 je znašala 1262 mm, kar predstavlja za 9,4 % nižje vrednosti v primerjavi z dolgoletnim povprečjem (1393 mm) obdobja 1961–1990 (SURS, 2011). Povprečna letna količina padavin je presegla količino dolgoletnega povprečja samo v letih 1996, 2000, 2004, 2005 in 2008. Za rast in razvoj je bilo neugodno leto 2000, v katerem je bila prvih osem mesecev suša, jeseni pa so sledile obilnejše padavine, ki so prispevale k višjemu letnemu povprečju padavin, posevek pšenice (1. poljina) pa je v rastni dobi utrpel stres zaradi suše. Kar 27 % manj padavin glede na povprečje je bilo v letu 2003, ki velja za najbolj sušno leto v zadnjih 50 letih. Lokacija IOSDV na Jablah je eksperiment v podnebnem območju alpskega sveta, kjer redko pride do dolgega obdobja suše. Glede na teksturo tal je povprečna letna količina padavin pogosto previsoka (1343 mm a<sup>-1</sup>; s pozitivnim trendom) za zagotovitev stabilnega pridelka dobre kakovosti (Tajnshek in sod., 2013).

Tla na IOSDV Jable so globoka, srednje težka, meljasto ilovnata aluvijalna rečna naplavina silikatno apnenčastega izvora. So srednje humozna (2,4 %) (Eurofins AUA GmbH, 2008). Zaradi bližnjih hudourniških potokov Pšate (izvira pod Krvavcem) in Šumberk ob hujšem večdnevem deževju tla za dan ali dva poplavijo (enkrat na 5–10 let).

Po mednarodni klasifikaciji tal (FAO-UNESCO, 1988) so tla klasificirana kot Umbric Planosols. Talna matična podlaga so nanosi rek Pšate, Šumberka in Kamniške Bistrice (Tajnshek, 2003). Talni profil je bil določen do globine 140 cm (pedološka jama). Iz opisa je

razvidno, da segajo korenine poljščin do globine pod 120 cm in da je koristna poljska kapaciteta tal za vodo do te globine nad 250 mm, kar pomeni, da pšenica na teh tleh tudi v sušnih razmerah ni prizadeta. Založenost tal z glavnimi hranili je dobra (razred C), vsebnost humusa pa je 2,4 % (Eurofins AUA GmbH, 2008).

### 3.1.2 IOSDV Rakičan

Poskus IOSDV Rakičan (46 ° 38 ' N, 14 ° 11 ' N, HAS 184 m) se nahaja na jugozahodnem robu panonskega klimatskega območja. Referenčna meteorološka postaja je Rakičan. Dolgoletno povprečje temperatur (1961–1990) v Rakičanu znaša 9,2 °C na intervalu od 8,2 do 10,1 °C. Dolgoletna povprečna vsota padavin se nahaja na intervalu od 563 do 1064 mm in znaša 817 mm (SURS, 2011). Od 1993 do 2008 je bila povprečna letna temperatura 10,4 °C, kar je 1,2 °C več, kot znaša dolgoletno povprečje 1961–1990. Največji odklon letnih temperatur od povprečja 10,4 °C je bil v letu 1994 +0,7 °C, 2000 +0,8 °C, 2002 +0,5 °C, 2007 +0,8 °C in 2008 +0,6 °C. Povprečne letne padavine v omenjenem obdobju so znašale 783 mm, kar predstavlja 5 % nižjo vrednost od dolgoletnega povprečja. V letu 2003 je bilo le 515 mm padavin, kar je 37 % manj glede na povprečje padavin.

Na lokaciji IOSDV Rakičan se nahajajo plitva do srednje globoka izprana rjava tla, ki so se izoblikovala na aluvijalnih rečnih naplavinah rek Mure in Ledave. Takšna tla so torej nastala v postglacialnem obdobju na ilovnatem pesku iz mešanice karbonatnih in silikatnih kamenin teh dveh rek, z delnim nanosom kamenin iz centralnih Alp. Po FAO (FAO-UNESCO, 1988) so tla klasificirana kot Eutric Fluvisol (FLe), tekstura pa je peščena ilovica (Tajnšek, 2003). Do globine 135 cm, do kamor segajo posamezne redke korenine koroze, ne pa tudi pšenice, znaša koristna poljska kapaciteta za vodo 100 do 150 mm. Manjša koristna poljska kapaciteta tal na severovzhodnem delu poskusnega polja se odraža v večji dozvetnosti tega dela polja za sušo (Tajnšek in sod., 2010). Založenost tal z glavnimi hranili (P, K) je dobra (razred C), vsebnost humusa leta 2008 pa je bila 1,7–1,8 % (Eurofins AUA GmbH, 2008).

## 3.2 ZASNOVA POLJSKIH POSKUSOV

Poskusa IOSDV Jable in IOSDV Rakičan sta bila zasnovana v obliki trifaktorskega statičnega trajnega poljskega poskusa (long-term static field trial) s tremi poljinami (1, 2 in 3). Na vsaki poljini (900 m<sup>2</sup>) si v kolobarju sledijo koroza, pšenica in ječmen (v Rakičanu) oziroma oves (na Jablah), na ta način se posamezna poljščina vsako tretje leto vrne na isto poljino (sl. 4). Vsaka poljina je razdeljena na dve podpoljini (podpoljina: 450 m<sup>2</sup>, 5 m x 90 m), razdalja med njimi je 2 m, ena od obeh podparcel je vedno gnojena s hlevskim gnojem, druga pa s slamo. Parcele, ki so gnojene s hlevskim gnojem, so na sliki 4 označene s črko B, parcele, ki so gnojene s slamo, pa s črko C. Na vsaki od obeh podpoljin so tudi tri osnovne parcele, ki pa niso gnojene niti s hlevskim gnojem niti s slamo niti z N-min (AN0) vse obdobje trajanja poskusa (kontrolna parcele), in tri osnovne parcele brez gnojenja z organskimi gnojili, ki pa so bile vse obdobje trajanja poskusa gnojene z maksimalnimi odmerki N-min (AN3). Vsaka od skupno šestih podpoljin (90 x 5 m) je



razdeljena na 15 osnovnih parcel (30 m<sup>2</sup>; 5 x 6 m), ki so oblikovane v 3 ponovitve s po 10 variantami pridelovanja v celotnem času trajanja poskusa. Specifičnost takšnih trajnih poskusov, zasnovanih na opisan način, omogoča sistematične razlike v ravni in kakovosti pridelkov v vsaki od preučevanih let v odvisnosti od metodike pridelave. Tako je bil na vsaki lokaciji vsako leto pospravljen pridelek 30 osnovnih parcel vsake poljščine. Na obeh lokacijah je vsaka osnovna parcela vse obdobje poskusa obravnavana na enak način, v enem od treh različnih sistemov pridelovanja: sistem brez gnojenja z organskimi gnojili (sistem A), sistem s hlevskim gnojem (sistem B) in sistem z zaoravanjem stranskih pridelkov, kot so koruznica, slama in oljna redkev kot podorina po spravilu ječmena ali ovs (sistem C). Sistema B in C vključujeta po 4 intenzivnostne stopnje pridelovanja glede na gnojenje z N-min (v nadaljevanju N-min): 0 kg N ha<sup>-1</sup>; 65 kg N ha<sup>-1</sup>; 130 kg N ha<sup>-1</sup> in 195 kg N ha<sup>-1</sup>. Sistem A (kontrola) pa je obravnavan le v dveh stopnjah gnojenja z N-min, in sicer v 0 kg N ha<sup>-1</sup> in 195 kg N ha<sup>-1</sup>. Posebnost na ta način izvedenega poljskega poskusa je zasnovana na sistematskih razlikah v višini in kakovosti pridelka, ki izhajajo iz različne rodovitnosti tal kot učinka stopnjevanih intenzivnosti pridelovanja skozi dolgo časovno obdobje.

Preglednica 2: Metode pridelovanja v poskusih IOSDV Jable in Rakičan, 1993–2008  
Table 2: Methods of production at IOSDV Jable and IOSDV Rakičan, 1993–2008

Način gospodarjenja	Oznaka gospodarjenja	postopka	Letni odmerek N-min	Stopnja gnojenja z N-min
<b>Sistem A:</b>	<b>AN0**</b>		<b>0</b>	<b>Brez gnojenja z N-min**</b>
Brez organskega gnojenja	AN3		195	Najvišji odmerek N-min
<b>Sistem B:</b>	<b>BN0*</b>		<b>0</b>	<b>Brez gnojenja z N-min</b>
Gnojenje z gnojem (300 dt ha <sup>-1</sup> gnoja vsako tretje leto pred setvijo koruze)	BN1		65	Nižji odmerek N-min
	<b>BN2</b>		<b>130</b>	<b>Srednji odmerek N-min</b>
	BN3		195	Najvišji odmerek N-min
<b>Sistem C:</b>	<b>CN0*</b>		<b>0</b>	<b>Brez gnojenja z N-min</b>
Podor slame, koruznice in ovs ali ječmena, + 60 kg ha <sup>-1</sup> N-min pred setvijo oljne redkve, spomladi podor redkve pred setvijo koruze	CN1		65	Nižji odmerek N-min
	<b>CN2</b>		<b>130</b>	<b>Srednji odmerek N-min</b>
	CN3		195	Najvišji odmerek N-min

Dodatno gnojenje vseh parcel v poskusu letno: 100 kg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> ha<sup>-1</sup> in 180 kg K<sub>2</sub>O ha<sup>-1</sup>.

In addition to all parcels in the fertilization experiment year: 100 kg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> ha<sup>-1</sup> and 180 kg K<sub>2</sub>O ha<sup>-1</sup>.

\*Ležeče pisana postopka BN0 in CN0 sta simulacija načel sonaravnega kmetovanja.

\*Methods written in italics, BN0 in CN0, are the approximation of the principles of sustainable farming.

\*\*Krepko so označeni postopki pridelovanja, ki smo jih upoštevali pri analizi mikotoksinov DON in ZEA.

\*\*Production methods, which were taken into the analysis of mycotoxins DON and ZEA, are bold marked.



1. POLJINA		2. POLJINA		3. POLJINA	
SLAMA	HLEVSKI GNOJ	HLEVSKI GNOJ	SLAMA	HLEVSKI GNOJ	SLAMA
CN3	BN2	BN2	CN3	BN2	CN3
CN2	BN1	BN1	CN2	BN1	CN2
CN1	BN0	BN0	CN1	BN0	CN1
CN0	AN0	AN0	CN0	AN0	CN0
CN3	BN3	BN3	CN3	BN3	CN3
CN2	BN1	BN1	CN2	BN1	CN2
CN1	BN0	BN0	CN1	BN0	CN1
CN0	AN0	AN0	CN0	AN0	CN0
CN3	BN3	BN3	CN3	BN3	CN3
CN3	BN2	BN2	CN3	BN2	CN3
CN3	AN0	AN0	CN3	AN0	CN3
CN3	BN3	BN3	CN3	BN3	CN3
CN2	BN2	BN2	CN2	BN2	CN2
CN1	BN1	BN1	CN1	BN1	CN1
CN0	BN0	BN0	CN0	BN0	CN0

Legenda:

AN0	BN0	BN2	CN0	CN2
Brez N	Gnoj brez N-min	Gnoj + N-min	Slama brez N-min	Slama + N-min

Obarvane parcele so bile podrobneje obravnavane v raziskavi.

Colored pitches were discussed in more detail in the survey.

Kolobar 2005/06: 1. poljina pšenica, 2. poljina oves (ječmen v Rakičanu), 3. poljina koruza

Kolobar 2006/07: 1. poljina oves (ječmen v Rakičanu), 2. poljina koruza, 3. poljina pšenica

Kolobar 2007/08: 1. poljina koruza, 2. poljina pšenica, 3. poljina oves (ječmen v Rakičanu)

Slika 4: Shema trajnega poljskega eksperimenta IOSDV Jable

Figure 4: The scheme lasting experiment IOSDV Jable

Podrobnejši prikaz postopkov pridelovanja vseh poljščin v kolobarju prikazuje slika 4, in sicer parcelni položaj vsakega postopka za vse tri poljščine. V del raziskave, v katerem smo ugotavljali kontaminiranost pšeničnega zrnja s *Fusarium* spp., smo vključili vseh 10 postopkov pridelovanja vsa tri leta (2006–2008), za ugotavljanje kontaminiranosti zrnja z mikotoksinoma DON in ZEA pa smo izbrali 5 postopkov pridelave (pregl. 2).

Kot je razvidno (sl. 4), je bilo na obeh lokacijah poljskega poskusa za analizo mikotoksinov v pšeničnem zrnju v postopek preučevanja vključenih pet postopkov pridelovanja (pregl. 2): tri ekstenzivne (AN0, BN0, CN0) in dva srednje intenzivna postopka (BN2 in CN2). Postopka BN0 in CN0, pri katerih se zaorava hlevski gnoj (BN0) ali slama (CN0), sta naravnana ekološko prijazna; postopka BN2 in CN2, pri katerih se prav tako zaorava enaka količina gnoja oziroma slame kot v postopkih BN0 in CN0, vendar se v njih dodatno gnoji 130 kg N ha<sup>-1</sup> neposredno pšenici, pa spadata med zmerno intenzivne načine pridelovanja.

Glavne značilnosti raziskavi obravnavanih načinov pridelovanja za analizo mikotoksinov DON in ZEA so torej naslednje.

- AN0: brez organskega gnojenja, brez N-min (kontrola);
- BN0: gnojenje s hlevskim gnojem samo pred koruzo, brez N-min;
- BN2: gnojenje s hlevskim gnojem v triletnem kolobarju samo pred setvijo koruze; gnojenje pšenici z N-min v dveh obrokih, prvič: v fazi EC 21/22, drugič: v fazi EC 37/40), skupno 130 kg ha<sup>-1</sup>;
- CN0: po vsaki poljščini se zaorje stranski pridelek (koruznica, slama in dosevek oljne redkve za podor, po zaoravanju ovsene ali ječmenove slame), brez N-min;
- CN2: po vsaki poljščini se zaorje stranski pridelek (koruznica, slama in dosevek oljne redkve za podor, po zaoravanju ovsene/ječmenove slame, k slednji še 60 kg N ha<sup>-1</sup>), gnojenje pšenici z N-min v dveh obrokih (prvič v fazi EC 31, drugič v fazi EC 37/40), skupno 130 kg ha<sup>-1</sup>.

Tako se je na obeh lokacijah (IOSDV Jable in IOSDV Rakičan) pri zmerno intenzivnih postopkih pridelovanja (BN2 in CN2) v povprečju vseh treh poljščin v kolobarju letno gnojilo 167 kg ha<sup>-1</sup> N (organskega in N-min): v postopku BN2 je izhajalo iz hlevskega gnoja 20 kg ha<sup>-1</sup> N, pri CN2 pa 20 kg ha<sup>-1</sup> N-min iz kvote, ko je 60 kg ha<sup>-1</sup> N-min, ki se jo je pognojilo ob podoru slame ječmena ali ovsu pred setvijo oljne redkve poleti, pred setvijo koruze naslednjo pomlad, v povprečju pripadalo vsaki od treh poljščin v kolobarju.

Zasnova obeh trajnih poljskih poskusov IOSDV in njihovih okoljskih parametrov pridelovanja je podrobneje opisana že v predhodnih objavah (Tajnshek, 2004; Tajnshek, L. in Tajnshek, A., 2004).

Glede na zasnovo obeh trajnih poljskih poskusov statistično obravnavamo naslednje tri faktorje: sistem pridelovanja (sistem A, sistem B in sistem C), intenzivnost gnojenja z N-min in leto pridelave.

V vseh obravnavanih letih (2006–2008) sta bila na obeh lokacijah na osnovnih parcelah (5 x 6 m) sejana oba kultivarja pšenice, Reska in Savinja. Vsakemu je pripadla polovica

osnovne parcele (2,5 x 6 m), zato smo v raziskavo vključili oba kultivarja, kar omogoča primerjavo odpornosti kultivarjev pšenice na njihovo kontaminacijo zrnja z vrsto *Fusarium* spp. in z mikotoksinoma DON in ZEA. V obdobju 2006–2008 za namene te raziskave poskusa na obeh lokacijah nista bila škropljena z nobenim fungicidom, po potrebi pa z ustreznimi insekticidi in herbicidi.

### 3.3 KULTIVARJA RESKA IN SAVINJA

#### 3.3.1 Reska

Reska je kultivar pšenice, ki je bil vzgojen v Sloveniji (žlahtnitelj in lastnik prof. A. Tajnšek), potrjena je bila leta 1996 (Grižon in sod., 2011). Je srednje visoka resnica z debelo slamo, debelim zrnjem. Visoka je pribl. 90 cm. Absolutna masa zrnja je nad 44 g, sedimentacijska vrednost je 25–32 ml (Tajnšek in sod., 2010). Je odporna na poleganje (Cvetkov in Tajnšek, 2009). Velikost kalčka v zrnju je velika, zajema približno eno šestino do četrtno zrna. Ima visoko vsebnost beljakovin, 17,3 % (Tajnšek in sod., 2010). Kakovost zrnja za krušno moko je srednje dobra, primerjamo jo lahko s kultivarjem Marijo, ki je bil v tistem obdobju standardni kultivar za primerjavo kultivarjev v uradnih poskusih (Pavlič Nikolič, 2005). Zaradi izrazitih resastih klasov (resnica) je primerna zlasti za območja, kjer je večja nevarnost škode, ki jo povzročajo ptice in divjad. Zelo odporna je na temperaturne strese, tudi na zelo visoko temperaturo, proti *Fusarium* spp. je srednje odporna (Ristić in sod., 2008).

#### 3.3.2 Savinja

Savinja je domač kultivar pšenice (žlahtnitelj in lastnik prof. A. Tajnšek), uradno potrjen leta 2009. Doseže višino 90 do 95 cm (srednja velikost). Je zelo odporna na bolezni, tudi *Fusarium* spp. Ima visoko hektolitrsko maso (45–48 g) in je predvsem v predalpskih podnebnih razmerah rodovitni kultivar pri zmerno visokih odmerkih N-min (Čergan in Tajnšek, 2010). Odporna je proti pepelovki (*Blumeria graminis* (DC.) Speer; syn.: *Erysiphe graminis* DC.) in *Fusarium* spp. (*Fusarium* spp.) ter na dolgotrajen zimski mraz. Glede na pekarsko kakovost je tipična izboljševalka (razred A) do odlični krušni kultivar (razred B).

Za 48 kultivarjev, ki jih je imel Kmetijski center Jable v makro poskusu v letu 2010/11, je analizo njihovih pekarskih lastnosti opravila pooblaščenca agencija Bureau Veritas. Med njimi je bil tudi kultivar Savinja z vsebnostjo beljakovin 14,7 % (vsebnost beljakovin je sicer odvisna tudi od vremenskih razmer, gnojenja z dušikom ter genotipa kultivarja) in sedimentacijsko vrednostjo 56 ml (merilo kakovosti vsebovanih beljakovin; do 20 ml - neprimerno za peko kruha, nad 50 ml - elitna pšenica); padno število (Hagberg falling number) znaša 228,0 sekund (padno število daje s podatkom o vsebnosti  $\alpha$ -amilaze informacijo o kakovosti pšenične moke za večino namenov ter o poškodovanosti škrobnih zrn); minimalna zahtevana kakovost pri odkupu pšenice je v Sloveniji 180–200 s, srednja 200–220 s, boljša 220–280 s; nizka vrednost padnega števila pomeni visoko encimsko aktivnost, torej prekomerno encimatsko razgradnjo škroba še pred obdelavo pšenične moke

v procesu peke kruha. S takimi parametri je bila Savinja po kakovosti pridelka izrazito pred vsemi ostalimi 47 kultivarji v poskusu. Glede na pekarske lastnosti je kultivar Savinja tipična izboljševalka in dober kultivar za peko kruha (Tajnšek, A. in Tajnšek, L., 2011).

### 3.4 SETEV IN ŽETEV PŠENICE TER ODVZEM VZORCEV

Vsa tri leta (2006–2008) smo celotni pridelek pšeničnega zrnja posejali s parcelno sejalnico Wintersteiger in poželi s parcelnim kombajnom Wintersteiger, vsako od 120 parcel posebej (na vsaki lokaciji letno 60 podparcelic s po 15 m<sup>2</sup>, od skupno 30 osnovnih parcel s po 30 m<sup>2</sup>) in pridelek parcel posebej stehali, ugotovili vlago, zrnje posušili v sušilniku pri 55–60 °C in pridelek vsake parcele posebej za nekaj dni skladiščili pri sobni temperaturi. Na osnovni podparcelici (15 m<sup>2</sup>) je, v odvisnosti od intenzivnosti pridelave, pridelek zrnja tehtal 0,75–2 kg. Na obeh lokacijah smo v treh letih skladiščili pridelek s 360 podparcelic. Od vsake podparcelice (360 ločenih pridelkov zrnja) smo odvzeli vzorec 120 g zrnja za vizualno oceno prisotnosti rodu *Fusarium* v zrnju. Preostanek pridelka smo vsako leto takoj po sušenju zrnja do mletja shranili v zamrzovalnih skrinjah, pri T = –20 °C za kasnejše analize.

### 3.5 PRIPRAVA AGARJA IN TEST OKUŽENOSTI ZRNJA S *Fusarium* spp.

Za okvirno analizo okuženosti zrnja s *Fusarium* spp., v odvisnosti od vremenskih razmer na lokaciji in intenzivnosti pridelovanja, smo vsako leto iz vsake osnovne parcele naštel 4-krat po 50 semen in jih položili lepo razvrščene, da se medsebojno niso stikala, v petrijevke (premer: 9,4 cm), in sicer v sterilni agar iz krompirjeve dekstroze (PDA). Vzorce smo inkubirali 4–5 dni v klima komori pri temperaturi 21–23 °C. Po preteku tega časa smo pojav *Fusarium* spp. na zrnju observirali z optičnim mikroskopom (Reichert, Wien, 10–400-kratna povečava), ob uporabi ključa za identifikacijo plesni (Schmidt, 2002) in prešteli število okuženih zrn, petrijevke z zrnjem pa fotografirali. V celoti je bilo na ta način v treh letih observirano 72.000 pšeničnih zrn (4 x 50 x 360). Tako nismo uporabili kakšne metode, s katero bi lahko identificirali posamezne vrste *Fusarium*, npr. metodo CZID-agar (Abildgren in sod., 1987) in CLA (Fisher in sod., 1982), pri katerih gre za propagacijo posameznih kolonij vrst *Fusarium* spp. in njihovo identifikacijo glede na pripadnost vrsti (*species-u*), deleža posamezne vrste *Fusarium* v zrnju pridelka pa na ta način praktično ne moremo ugotoviti. V dilemi med natančno določitvijo vrst *Fusarium* spp. in vizualno oceno okuženosti zrn s fuzariozami smo se namreč odločili za slednjo, saj ta postopek sledi namenu te študije.

### 3.6 PRIPRAVA VZORCEV ZA UGOTAVLJANJE MIKOTOKSINOV DON IN ZEA

Po statističnem ovrednotenju vizualne okuženosti vseh vzorcev zrnja s *Fusarium* spp. vsa tri leta smo opravili podrobnejšo analizo vsebnosti mikotoksinov DON in ZEA v letih 2006 in 2008 na obeh lokacijah, v postopkih pridelave AN0, BN0, CN0, BN2 in CN2. V letu 2007 smo odkrili z rodom *Fusarium* manj okuženih zrn kot v letih 2006 in 2008, zlasti na lokaciji IOSDV Rakičan, kar prikazujemo v poglavju 4 (Rezultati, pregl. 16). Zato smo

leto 2007 izpustili iz nadaljnjih preučevanj o kontaminiranosti pšeničnega zrnja z mikotoksinoma DON in ZEA.

Zaradi visokih stroškov kemijskih analiz (analiza enega vzorca pšenice je za oba preučevana mikotoksina skupaj stala 62 EUR, skupno letno  $120 \times 62 = 7440$  EUR) smo analizo mikotoksinov opravili v postopkih ekološko prijazne in zmerno intenzivne konvencionalne pridelave, odrekli pa smo se analizam pšeničnega zrnja iz ekstenzivne konvencionalne pridelave (BN1 in CN1) in najbolj intenzivne pridelave (BN3 in CN3). Tako smo za mikotoksikološke analize na prisotnost DON in ZEA v obeh letih in obeh lokacijah izbrali skupno 120 vzorcev zrnja iz osnovnih parcel, polovica vzorcev je pripadala kultivarju Savinja (60 vzorcev), druga polovica pa kultivarju Reska (60 vzorcev).

Za mikotoksikološko analizo smo iz zmrzovalnih skrinj sproti jemali skladiščeni pridelek zrnja posameznih parcel, ki smo jih vključili v analizo mikotoksinov (postopki AN0, N0, CN0, BN2, CN2), od pridelka vsake osnovne parcele smo odvzeli vzorec približno 500 g zrnja in ga zmelili na mlinu znamke Brabender (MPI R. O. »Tehnične usluge« Tip: S – 150 M, Atest: TU 78/1), ki je prirejen za mletje manjših količin vzorcev (do 250 g). Z uporabo ustreznih sit, ki so bila nameščena na mlin, smo vsak vzorec pšenice iz posamezne parcele separirali po nemški standardizaciji (DIN 10355) v belo moko (tip 405) in črno moko (tip 1050) ter na otrobe, ki pa jih nismo analizirali. Zmleto belo in črno moko posamezne parcele (po 110–130 g bele in črne moke) smo dali v plastične vrečke, jih zaprli in ustrezno šifrirali.

Belo in črno moko tako namletih pšeničnih zrn vsake osnovne parcele, skupno 120 vzorcev bele in 120 vzorcev črne moke, torej 240 vzorcev moke za obe leti skupaj oziroma 120 vzorcev v posameznem letu iz obeh lokacij poskusa (60 vzorcev iz lokacije IOSDV Rakičan, od tega 30 vzorcev kultivarja Reska in 30 vzorcev kultivarja Savinja, in 60 vzorcev iz lokacije IOSDV Jable, od tega prav tako 30 vzorcev, pripadajočih kultivarju Reska in 30 vzorcev kultivarju Savinja) smo odpremili v analizo v laboratorij LUFA Speyer (Rheinland-Pfalz), v enega izmed referenčnih laboratorijev za analizo mikotoksinov DON in ZEA v Nemčiji, kjer so opravili 480 kemičnih analiz (240 za DON in 240 za ZEA).

### 3.7 ANALIZA MIKOTOKSINOV DON IN ZEA

Standardizirana metoda, uporabljena v referenčnem laboratoriju LUFA Speyer za ugotavljanje mikotoksina DON v pšenični moki, se imenuje ELISA LUFA SP 22005 (meja detekcije in kvantifikacije je 200 ppm / 200  $\mu\text{g}$  DON  $\text{kg}^{-1}$  pšenične moke), za ugotavljanje mikotoksina ZEA pa se imenuje ELISA LUFA SP 22006 (meja detekcije in kvantifikacije je 5 ppm / 5  $\mu\text{g}$  DON  $\text{kg}^{-1}$  pšenične moke). Določanje vsebnosti mikotoksinov je pri obeh analitskih metodah v osnovi kompetitivna ELISA (the enzyme-linked immunosorbent assay) metoda (temelji na reakciji antigena s protitelesi), pri kateri se za detekcijo prisotnosti mikotoksinov v vlažnih vzorcih uporablja encimski imunski test (enzyme immunoassay EIA), osnovan na barvni reakciji vzorca (Usleber in sod., 1991).

Kompetitivni encimski imunski test, ki so ga v laboratoriju LUFA Speyer uporabili za kvantitativno analizo mikotoksina DON v pšenici, je RIDASCREEN®FAST DON (Art. No.: R5901, 96 vdolbinic / R5902, 48 vdolbinic), za kvantitativno analizo mikotoksina ZEA v pšenici pa RIDASCREEN® Zearalenon (Art. No.: R1401).

Pri testu RIDASCREEN®FAST DON ne prihaja do reaktivnosti z drugimi sorodnimi snovmi, kot so nivalenol, 15-acetyl-DON ali Triacetyl-DON, ni pa mogoče razlikovati med mikotoksinom DON in 3-acetyl-DON (navzkrižna reaktivnost 213 %).

Specifičnost testa RIDASCREEN® Zearalenon so določili z analizo navzkrižne reaktivnosti na ustrezne mikotoksine (100 % za ZEA, 41,6 % za  $\alpha$ -zearalenol, 27,7 % za zearalenol in 13,8 % za  $\beta$ -zearalenol).

Vsi reagenti za oba encimska imunska testa (vključno s standardi) so zbrani v testnem kompletu v količini, ki omogoča 96 določitev, vključno s standardom. Kvantifikacija je mogoča z uporabo mikrotitrnega ploščnega spektrometra. Priprava vzorca vključuje ekstrakcijo in filtracijo (in redčenje pri pripravi vzorca za določanje ZEA). Čas, potreben za pripravo npr. 10 vzorcev, znaša 10 minut pri DON in 20 minut pri določanju ZEA.

Test deluje po principu reakcije antigena s protitelesom. V mikrotitrne vdolbinice se ujamejo protitelesa neposredno zoper proti-DON protitelesa in specifična protitelesa na ZEA. Nato se doda DON/ZEA standard ali raztopino vzorca, DON/ZEA encimski konjugat in proti-DON protitelesa. Prosti DON in konjugat DON-encim tekmujeta za DON protitelesa vezna mesta (kompetitivni encimski imunski test). Istočasno se proti-DON protitelesa vežejo tudi na imobilizirana (ujeta) protitelesa. S spiranjem se odstrani vse nevezane encimske konjugate. V vdolbinice se doda substrat/kromogen, posledično ga vezani encimski konjugat pretvori v moder produkt. Dodatek raztopine, ki ustavi reakcijo, privede do barvne spremembe iz modre v rumeno.

Fotometrična meritev poteka pri 450 nm. Absorbanca je obratno sorazmerna vsebnosti DON v vzorcu. Potrebni reagent za določitev DON in ZEA je destilirana ali deionizirana voda, za določitev ZEA pa metanol. Vsi ostali potrebni reagenti za določanje mikotoksinov DON in ZEA v pšenici so vsebovani v testnih kompletih encimsko imunskih testov RIDASCREEN®FAST DON in RIDASCREEN® Zearalenon (potrebna je hramba v temnem in hladnem prostoru, pri 2–8 °C).



Preglednica 3: Potrebni reagent pri določanju mikotoksinov DON in ZEA v pšenici z encimsko imunskima testoma RIDASCREEN®FAST DON in RIDASCREEN® Zearalenon za kvantitativno določanje DON in ZEA v pšenici

Table 3: Reagent required for the determination of mycotoxins DON and ZEA in wheat competitive enzyme immunoassay RIDASCREEN®FAST DON and RIDASCREEN® Zearalenon used for the quantitative analysis of DON and ZEA in wheat

Reagent	Za določanje DON	Za določanje ZEA
Mikrotitrna plošča	96 ali 48 vdolbinic (12, R5901 ali 6 trakov oziroma R5902, vsak trak z 8 vdolbinicami)	96 vdolbinic, prevlečenih s protitelesi proti ZEA (12 trakov z 8 vdolbinicami v vsakem)
Standardne raztopine	5 x standardne raztopine DON (1.3 ml vsake): 0 ppm – ničli standard, 0,222 ppm, 0,666 ppm, 2 ppm, 6 ppm DON v vodi, primerni za takojšnjo uporabo; faktor 20 je za vzorec že upoštevan, zato se lahko koncentracija vzorca odčita neposredno iz standardne krivulje.	6 x raztopin standarda (1,3 ml vsake): 0 ppt-ničli standard, 50 ppt, 150 ppt, 450 ppt, 1350 ppt, 4050 ppt ZEA v enakovredni raztopini
Konjugat	6 ml, R5901 in 3 ml, R5902; (rdeči pokrovček) DON konjugirana peroksidaza;	0,7 ml (rdeči pokrovček); koncentrat DON konjugirane peroksidaze
Protitelesa proti mikotoksinom	1 x proti-DON protitelo (6 ml, R5901 in 3 ml R5902)	/
Substrat / Kromogen	Substrat / kromogen (10 ml; obarvano rdeče, rjav pokrovček)	Substrat (7 ml; vsebuje peroksidazo uree, zelen pokrovček) Kromogen (7 ml) vsebuje tetrametil/benzidin (moder pokrovček)
Raztopina za ustavitev reakcije	14 ml; vsebuje 1 N žveplove kisline; rumen pokrovček	14 ml; vsebuje 1 N žveplove kisline; rumen pokrovček
Pufer	Puferna sol (spiranje) za pripravo 10 mM fosfatnega pufra (pH 7,4); Vsebuje 0,05 % Tween 20.	Pufer 1 (50 ml) vzorca in pufer raztopine konjugata (bel pokrovček)

Priprava vzorca poteka po korakih, navedenih v preglednici 4 (vzorci se shranjujejo na hladnem, zaščiteni pred svetlobo).

Preglednica 4: Postopki priprave vzorca za določanje mikotoksinov DON in ZEA v pšenici z encimsko imunskima testoma RIDASCREEN®FAST DON in RIDASCREEN®Zearalenon

Table 4: Steps of determination of mycotoxins DON and ZEA in wheat competitive enzyme immunoassay RIDASCREEN®FAST DON and RIDASCREEN®Zearalenon used for the quantitative analysis of DON and ZEA in wheat

Postopek	Določanje DON	Določanje ZEA
Odtehtanje 5 g zmletega vzorca v primerno posodo	Dodatek 100 ml destilirane vode (količina vzorca je lahko tudi večja, količino vode pa se temu ustrezno prilagodi: npr. 25 g vzorca je potrebno dodati 500 ml destilirane vode ali npr. 50 g se doda 1000 ml destilirane vode)	Dodatek 25 ml metanola/vode (70/30); količina vzorca je lahko tudi večja, količino vode pa se temu ustrezno prilagodi: npr. 10 g vzorca je potrebno dodati 50 ml metanola/vode (70/30)
Stresanje	Mešanje vzorca s stresalnikom ultra-turrax (enakovredno je tudi močno stresanje 3 minute (ročno ali z mešalnikom))	Močno stresanje 3 minute (ročno ali z mešalnikom)
Filtracija / centrifugiranje	Filtriranje ekstrakta skozi filter Whatman št.1 filter (ali skozi enakovredni filter)	Centrifugiranje ekstrakta: 10 min / 3500 g / pri sobni temperaturi (20–25 °C) ali filtracija ekstrakta skozi filter (Whatman No.1 filter)
Redčenje	Redčenje filtriranega ekstrakta vzorca 1 : 4 (1 + 3) z destilirano vodo (npr. 1 ml ekstrakta + 3 ml destilirane vode)	Redčenje supernatanta ali filtrata 1 : 7 (1 + 6) s pufrom redčenega vzorca (pufer 1)
Filtrat / supernatant	Uporaba 50 µl filtrata na vdolbinico v testu	Uporaba 50 µl razredčenega supernatanta ali filtrata na vdolbinico v testu

Izvajanje testa poteka po naslednjih postopkih:

- vključitev zadostnega števila vdolbinic v nosilec za vse standarde in vzorce; snemanje položajev standarda in vzorca;
- pipetiranje 50 µl standardne raztopine ali pripravljenega vzorca v posamične vdolbinice; potrebna je uporaba nove konice pipete za vsak vzorec oz. standard;
- pri določanju DON je potreben dodatek 50 µl encimskega konjugata (rdeči pokrovček) v vsako izmed vdolbinic;
- dodatek 50 µl raztopine protiteles proti mikotoksinu DON (črni pokrovček) v vsako izmed vdolbinic (50 µl razredčenega encima v vsako izmed vdolbinic pri določanju ZEA). Ročno stresanje (nežno mešanje) in inkubacija pri sobni temperaturi (20–25 °C); specifična reakcija se prične z dodatkom specifičnih protiteles;

- vlivanje tekočine iz vdolbinic v posodo. Nosilec vdolbinic je treba na hitro in močno obrniti z glavo navzdol nad vpojni papir/na čisto filtrno brisačo (trikrat zaporedoma, da se zagotovi popoln odtok tekočine iz vdolbinic);
- s pomočjo izpiralne steklenice ali večkanalne pipete je treba napolniti 250 µl izpiralne puferne soli iz testnega kompleta v vsako izmed vdolbinic (destilirano vodo pri določanju ZEA). Sledi izpraznitev vdolbinic in odstranitev vse preostale tekočine; postopek izpiranja se ponovi še dvakrat;
- dodatek 100 µl substrata/kromogena (rjavi pokrovček) v vsako izmed vdolbinic. Sledi nežno ročno mešanje oz. stresanje plošče in inkubacija pri sobni temperaturi (20–25 °C) v temi za 3 minute pri določanju DON oz. 30 minut pri določanju ZEA;
- v vsako izmed vdolbinic se doda 100 µl raztopine, ki zaustavi reakcijo (rumeni pokrovček); sledi ročno stresanje (nežno mešanje) plošče in merjenje absorbance pri 450 nm. Pri določanju DON se odčita rezultat po 10 minutah, pri določanju ZEA pa po 30 minutah od trenutka, ko se doda raztopino, ki zaustavi reakcijo.

Čas, ki je potreben za izvedbo testa na DON (z vključenim inkubacijskim časom), je 8 minut, čas, potreben za izvedbo testa na ZEA (inkubacijski čas prav tako vključen), pa znaša za primer 10 vzorcev 150 minut.

Za ovrednotenje encimskega imunskega testa RIDASCREEN® je na voljo specifična programska oprema, RIDA®SOFT Win (Art. No. Z9999). Razlaga standardne krivulje je prikazana v certifikatu zagotavljanja kakovosti (zaprt v testnem kompletu). Možna je tudi kalkulacija odstotka absorbance brez programske opreme po naslednji enačbi.

Odstotek (%) absorbance = (absorbanca vzorca (ali standarda) / absorbanca ničlega standarda) x 100.

Ničli standard je tako enakovreden 100 % in vrednosti absorbance so navedene v odstotkih. Vrednosti, izračunane za standarde, se vnesejo v sistem koordinat na pollogaritemskem grafu vsebnosti DON (mg kg<sup>-1</sup>) in ZEA (µg kg<sup>-1</sup>); vsebnost DON (mg kg<sup>-1</sup>) v vsakem vzorcu se le še prebere iz umeritvene krivulje, za vsebnost ZEA (µg kg<sup>-1</sup>) v vzorcu pa je treba vrednost iz umeritvene krivulje še pomnožiti z ustreznim faktorjem razredčitve, to je 35.

### 3.8 STATISTIČNO OVREDNOTENJE REZULTATOV

Meteorološki podatki za meteorološki postaji Brnik in Rakičan so izraženi v absolutnih vrednostih (mm, °C), s podmeno o normalni razporeditvi podatkov. Zato smo te rezultate statistično variacijsko analizirali s pomočjo regresijske analize, z uporabo statističnega programskega paketa Statistica 7.

Okuženost pšeničnih zrn s *Fusarium* spp. smo izrazili z deležem okuženih zrn v vzorcih. Gre za binomsko porazdelitev, v naši raziskavi so vrednosti praviloma sorazmerno nizke (le redko je okužba s *Fusarium* spp. več kot 30-odstotna, zato smo vrednosti odstotka okužb (p) transformirali, da dobi porazdelitev bolj normalno obliko (vrednosti odstotkov postanejo medsebojno statistično bolj primerljive). Zato smo uporabili transformacijo

(Hadživuković, 1991) po enačbi:

$$p = tv = \arcsin\sqrt{p} \quad \dots(2),$$

kjer 'tv' pomeni transformirana vrednost odstotka, 'p' pa pomeni odstotek okuženih zrn. Tako transformirane podatke o fuzafiozah na zrnju in kontaminaciji bele in črne moke smo analizirali variacijsko statistično po metodi trifaktorskega poskusa, kjer so bili: prvi faktor postopki pridelovanja, drugi faktor lokacija in tretji faktor leto. Po potrebi smo uporabili tudi statistične metode parov, in sicer v primeru primerjave kontaminacije z mikotoksinom med belo in črno moko pri določenem postopku pridelovanja na isti lokaciji

Večina meritev mitokosinov DON in ZEA v raziskavi je izražena v absolutnih vrednostih, ob tem pa so nekatere statistične vrednosti (statistični dogodki) nemerljive, ker so pod mejo določljivosti. To se dogaja s količinami mikotoksinov DON ali ZEA v beli in črni moki v raziskavi preučevanih pšeničnih kultivarjev Reska in Savinja. Obe sta bili analizirani v ustreznem referenčnem laboratoriju v Nemčiji (LUFA Speyer) s standardiziranimi metodami za ugotavljanje DON in ZEA, v pšenični moki v prometu. Meja detekcije po izbranih metodah za DON je 200 µg DON kg<sup>-1</sup> moke in za ZEA je meja detekcije 5 µg ZEA kg<sup>-1</sup> moke. Meja nedoločljivosti za DON je manj kot 1 mg DON na 5000 g moke (1 mg DON 5000 g moke) in meja nedoločljivosti za ZEA je manj kot 1 mg ZEA na 200.000 g moke. Metoda ELISA LUFA SP 22006 za določanje mikotoksina ZEA je torej 40-krat natančnejša od metode ELISA LUFA SP 22005 za DON. To pomeni, da je določljivost 1 mg DON na 100 kg moke.

Ker je bil delež vzorcev, ki so bili kontaminirani z določljivo količino DON ali ZEA, nizek (okrog 16 %), smo za statistično vrednotenje najprej opravili potrebno transformacijo vrednosti (tv) za vse podatke (Weber, 1961):

$$tv = \sqrt{(x + 1/2)} \quad \dots(1),$$

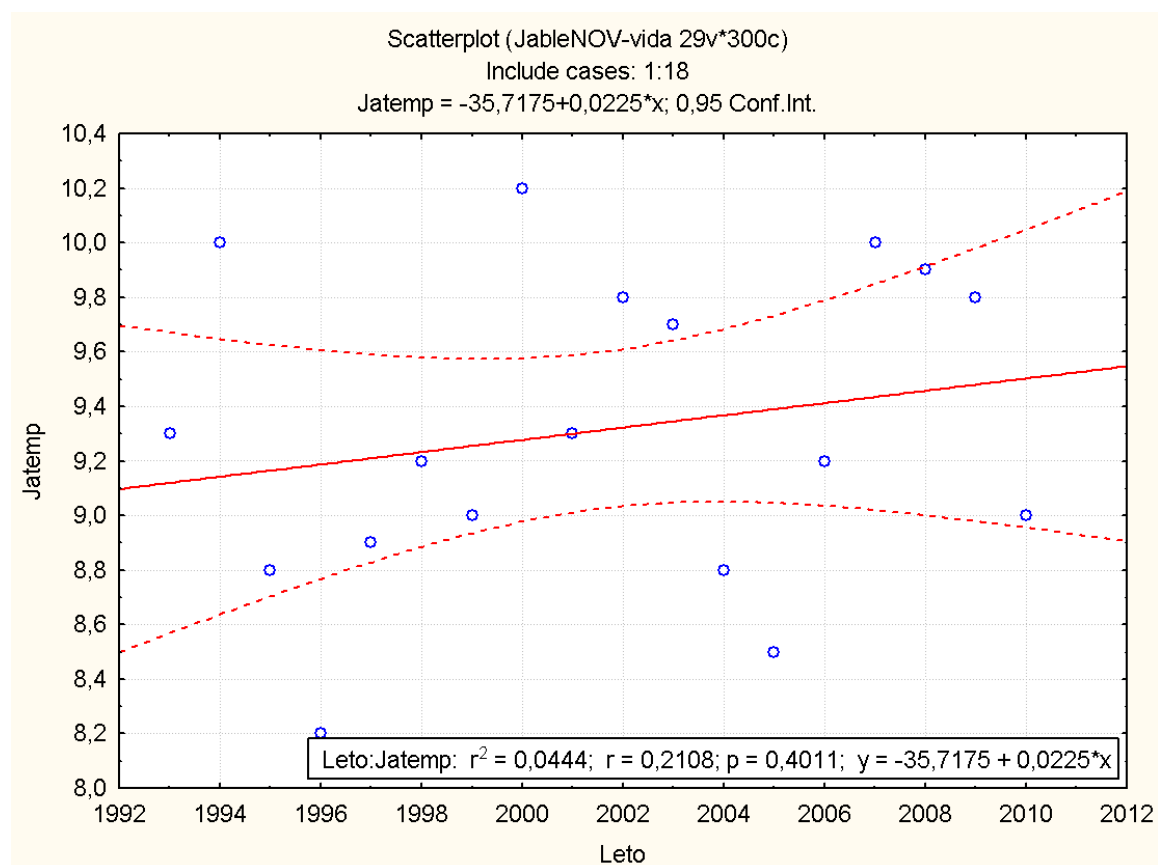
da smo lahko podatke ovrednotili z analizo variance za normalno razporeditev podatkov (Weber, 1961).

Z regresijsko in korelacijsko analizo (programski paket: Statistica 7) smo preverili vzročno-posledične povezave med nekaterimi najvažnejšimi parametri vplivov. Tako smo preverjali, ali obstaja kakšna povezava med padavinami in pojavom *Fusarium* spp., povezava med *Fusarium* spp. in pojavom mikotoksinov DON in ZEA.

## 4 REZULTATI

### 4.1 VPLIV VREMENA, POSTOPKOV PRIDELOVANJA IN KULTIVARJA NA POJAV *Fusarium* spp. PRI KULTIVARJIH PŠENICE RESKA IN SAVINJA NA LOKACIJI JABLE

Znano je, da temperature okoli 20 °C z vlažnim vremenom v jesenskih in spomladanskih mesecih, zlasti v aprilu, maju (klasenje in cvetenje pšenice) in juniju, pospešujejo pojav in razvoj *Fusarium* spp. v posevkih pšenice (McMullen in sod., 2008; Oadi, 2015). S sl. 5 in 11 ter pregl. 5 in 13 izhaja, da je bila v obdobju 1993–2010 povprečna letna temperatura na lokaciji Jable za 1,1 °C (za 10 %) nižja kot na lokaciji Rakičan (desetletno povprečje: Jable 9,4 °C, Rakičan 10,5 °C).



Slika 5: Gibanje letnih temperatur na lokaciji Jable od postavitve IOSDV poskusa, obdobje 1993–2010 (SURS, 2011). V enačbi trenda pomeni x leto, y pa povprečno letno temperaturo v danem letu.  
Figure 5: Trend of the annual temperature on the long-term field experiment at IOSDV Jable during the period of 1993 to 2010 (SURS, 2011). Parameters x and y mean year and average yearly temperature, respectively, at the given year.

Trend gibanja povprečnih letnih temperatur na lokaciji IOSDV Jable (1993–2010) kaže v obdobju po letu 1993, ko je bil poskus zasnovan, statistično neznačilno zviševanje povprečnih letnih temperatur ( $p = 0,40$ ), in sicer za 0,0225 °C letno, kar pa znaša 2,2 °C v 100 letih. Kljub naraščanju temperatur je njihov 18-letni trend neznačilen, ker na tej lokaciji povprečne letne temperature iz leta v leto močno nihajo in s tem prikrivajo jasnost

trenda. Temperature v maju, v obdobju cvetenja pšenice (v zadnji dekadi maja; gl. preglednico 5, temperature v maju), so okrog 20 °C. Reska cveti na Jablah okvirno od 19. do 26. maja, Savinja pa od 24. do 31. maja. Kot smo že omenili, so te temperature ugodne za okužbe pšenice z vrstami rodu *Fusarium*. Vendar pa igra pomembno vlogo tudi vlažnost zraka oziroma padavine. Slika 6 prikazuje trend padavin na Jablah v obdobju po zasnovi poskusa na tej lokaciji. Iz nje je razviden presenetljiv, značilno naraščajoč trend ( $p = 0,047$ ) višine padavin.

V obdobju 1993–2010 je bilo na Jablah v letnem povprečju 1345 mm padavin, z naraščajočo tendenco glede na zaporedna leta. Tla so globoka ( $\geq 1,8$  m) in srednje težka (ilovnato meljasta tla), zato znaša koristna poljska kapaciteta za vodo (nFK) do globine 1 m kar 220 mm, vendar pa segajo korenine še globlje (Tajnšek in sod., 2013). Za uravnotežen pridelek pšenice naj optimalna količina padavin v spomladansko-poletnih mesecih ne presega 400 mm (Gupta in Wang, 2002).

Tako je, upoštevajoč veliko sposobnost tal za zadrževanje vode, na IOSDV Jable povprečna letna količina padavin previsoka za stabilne in kakovostne pridelke pšenice. S slike 6 namreč izhaja, da se je od leta 1993 do 2010, v obdobju, ki ga zajema poskus IOSDV Jable, letna količina padavin statistično značilno povečala ( $p < 0,05$ ), in sicer letno za 19,1 mm.

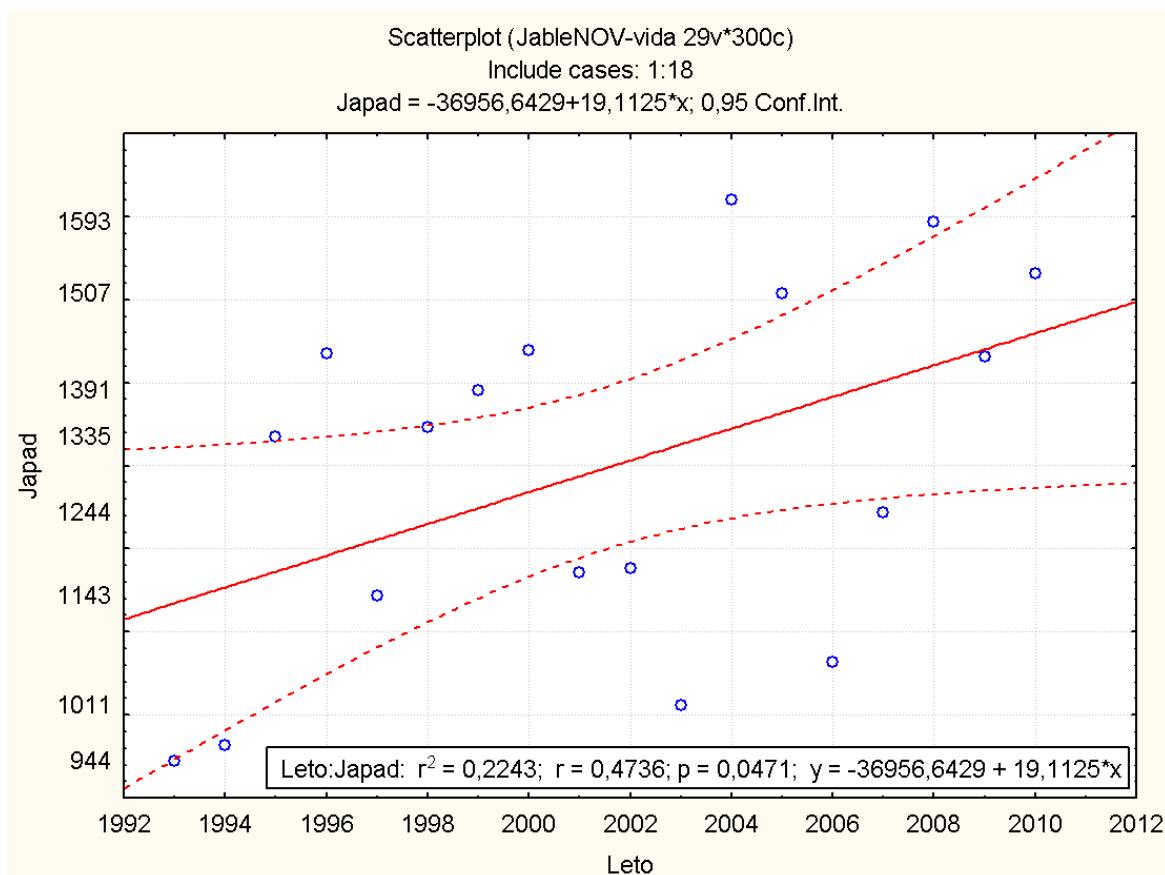
To so pomembni okoljski dejavniki, zaradi katerih postaja območje IOSDV Jable (pregl. 5) vse manj primerno za pridelovanje kakovostne krušne pšenice, saj sta vlažno vreme in sorazmerno visoka temperatura (če znaša okoli 20 °C) v obdobju cvetenja pšenice ugodna za razvoj povzročiteljev obolenj s *Fusarium* spp., ki povzročajo tudi (gl. pregl. 1) nevarne mikotoksikoze na tej in drugih kmetijskih rastlinah.

Preglednica 5: Desetletno povprečje temperatur zraka in količin padavin po mesecih v IOSDV Jable od leta 2001 do 2010 (SURs, 2011)

Table 5: Ten-year average air temperatures and rainfall by month at IOSDV Jable from year 2001 to 2010 (SURs, 2011)

Povprečje 2001–2010													
mesec	Jan	Feb	Mar	Apr	Maj	Jun	Jul	Avg	Sep	Okt	Nov	Dec	Leto
(°C)	−1,6	0,1	4,4	9,4	14,9	18,6	20,0	19,0	13,8	9,8	5,0	0,5	9,4
(mm)	73	67	96	100	102	120	127	153	156	114	111	126	1345





Slika 6: Gibanje letnih količin padavin na lokaciji Jable v obdobju od 1993 do 2010 (SURs, 2011). V enačbi trenda pomeni x leto, y pa povprečno letno količino padavin v danem letu.

Figure 6: Trend of the annual precipitation at Jable IOSDV during the period of 1993 to 2010 (SURs, 2011). Parameters x and y mean year and average precipitation per year, respectively, at the given year.

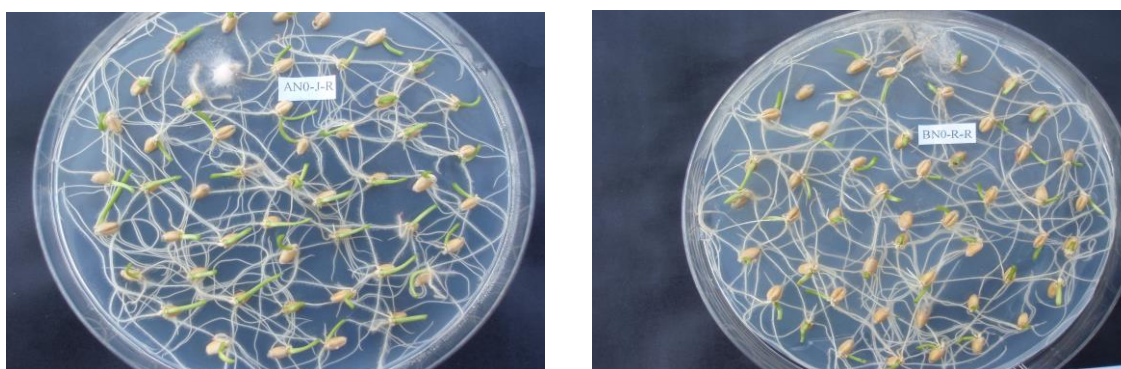
#### 4.1.1 Določanje pojavnosti *Fusarium* spp. na pšeničnem zrnju na lokaciji Jable

Za obdobje treh let, 2006–2008, v katerih smo z izbrano metodo (poglavje 3.5) ugotavljali vidno prisotnost rodu *Fusarium* na pridelku pšeničnih zrn, je prikazan za lokacijo IOSDV Jable podrobnejši pregled temperatur in padavin v preglednici 6. Leti 2006 in predvsem 2007 sta bili bolj suhi v obdobju cvetenja in zorenja pšenice kot leto 2008 (obdobje april–junij 2006: 338 mm padavin, povprečna temperatura 13,9 °C; obdobje april–junij 2007: 209 mm padavin, temperatura 15,7 °C; obdobje april–junij 2008: 400 mm padavin, povprečna temperatura 14,6 °C) (SURs, 2011). Iz tega je možno sklepati, da je bilo za okužbe s *Fusarium* spp. na pšenici najugodnejše leto 2006, in sicer zaradi deževnega aprila (122 mm) in predvsem maja (143 mm) ob cvetenju pšenice, na drugem mestu je bilo leto 2008, najmanj ugodno za okužbe s *Fusarium* spp. pa je bilo vreme leta 2007. V omenjenih letih (2006, 2007 in 2008) je bila na IOSDV Jable s potekom omenjenih vremenskih pojavov sorazmerna tudi stopnja okuženosti pšeničnega zrnja s *Fusarium* spp. (pregl. 7).

Preglednica 6: Mesečne temperature T (°C) in količine padavin (mm) IOSDV Jable v obdobju med leti 2005 in 2008 (SURS, 2011)

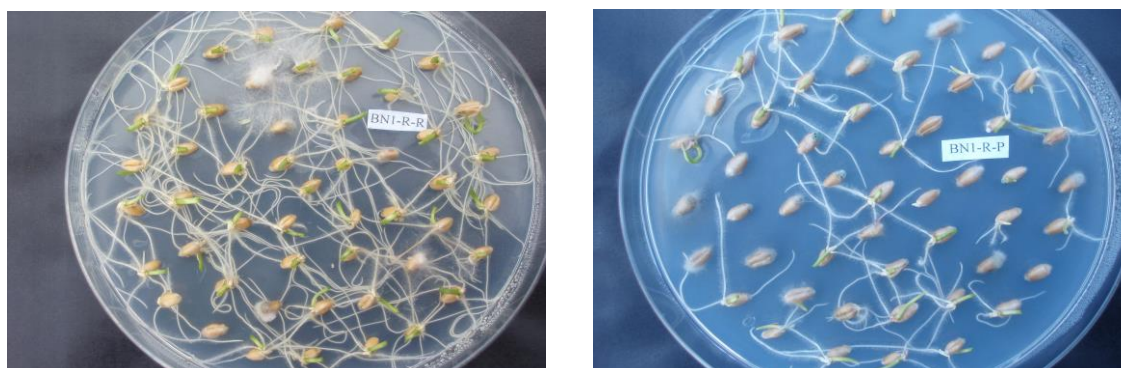
Table 6: Monthly temperature T (°C) and rainfall (mm) on IOSDV Jable in the period between 2005 and 2008 (SURS, 2011)

Leto	T/ pad.	Jan	Feb	Mar	Apr	Maj	Jun	Jul	Avg	Sep	Okt	Nov	Dec	Sum
2005	(°C)	-2,4	-3,2	2,7	8,8	14,8	18,3	19,3	17,1	15,0	10,3	3,9	2,6	8,5
	(mm)	1	49	62	135	84	92	224	282	183	107	147	141	1507
2006	(°C)	-4,5	-1,9	2,1	9,4	13,6	18,7	21,5	16,3	15,7	11,0	6,3	2,6	9,2
	(mm)	49	59	122	122	143	73	55	179	73	54	49	86	1064
2007	(°C)	2,2	3,9	4,4	12,3	15,5	19,2	19,8	18,9	13,0	9,0	3,4	1,1	10
	(mm)	74	74	95	3	104	102	115	137	360	96	36	48	1244
2008	(°C)	0,9	2,0	4,3	8,9	15,8	19,2	19,9	19,3	13,4	10,1	4,5	0,5	9,9
	(mm)	72	34	132	126	86	188	279	174	26	90	112	274	1593



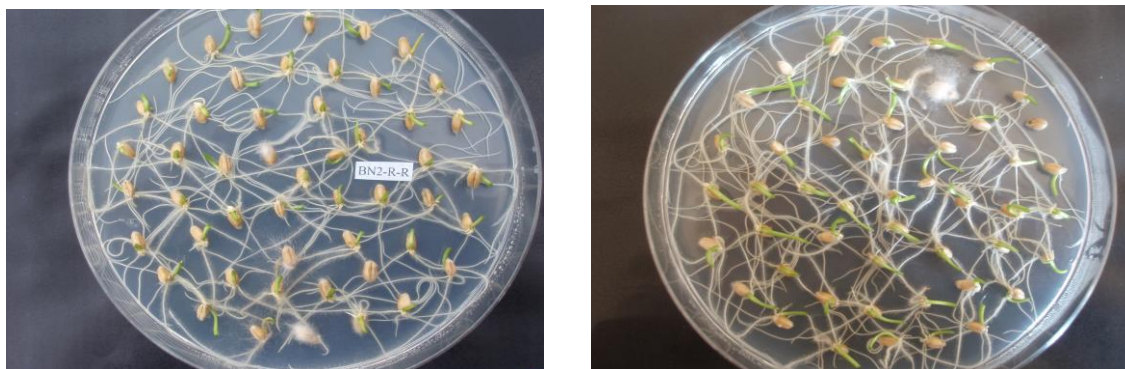
Slika 7: Okuženost pšeničnih zrn kultivarja Reska s *Fusarium* spp. v postopkih pridelovanja AN0 (levo) in BN0 (desno) na lokacijah IOSDV Jable (levo) in IOSDV Rakičan (desno) v letu 2006

Figure 7: Contamination with *Fusarium* spp. of wheat grain of cultivar Reska in production methods AN0 (left) and BN0 (right) on the locations IOSDV Jable (left) and IOSDV Rakičan (right) in the year 2006



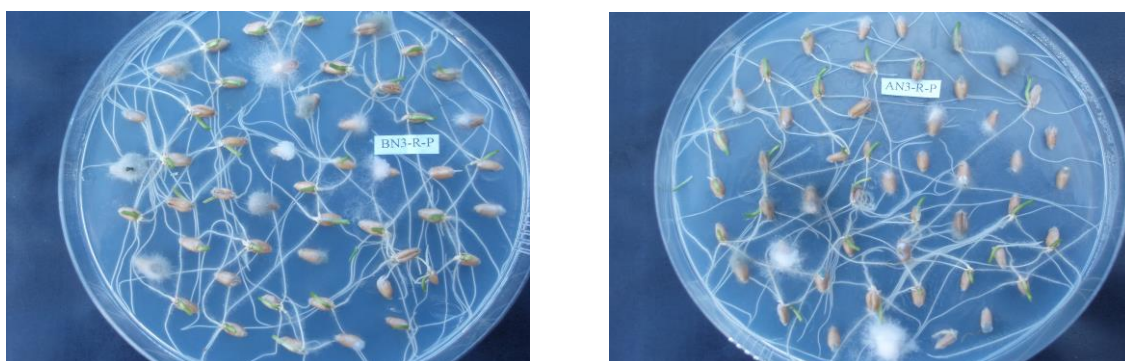
Slika 8: Okuženost pšeničnih zrn kultivarja Reska (levo) in Savinja (desno) s *Fusarium* spp. v postopkih pridelovanja BN1 na lokaciji IOSDV Rakičan v letu 2006

Figure 8: Contamination with *Fusarium* spp. of wheat grain cultivars Reska (left) and Savinja (right) in production variant BN1 on the location IOSDV Rakičan in year 2006



Slika 9: Okuženost pšeničnih zrn kultivarja Reska s *Fusarium* spp. v postopkih pridelovanja BN2 na lokaciji IOSDV Rakičan (levo) in IOSDV Jable (desno) v letu 2006

Figure 9: Contamination with *Fusarium* spp. of wheat grain cultivar of Reska in production method BN2 on the location IOSDV Rakičan (left) and IOSDV Jable (right) in the year 2006



Slika 10: Okuženost pšeničnih zrn kultivarja Savinja s *Fusarium* spp. v postopkih pridelovanja BN3 (levo) in AN3 (desno) na lokaciji IOSDV Rakičan v letu 2006.

Figure 10: Contamination with *Fusarium* of wheat grain cultivar Savinja in production methods BN3 (left) and AN3 (right) at the location IOSDV Rakičan in the year 2006

Leta 2007 je bila vizualno ugotovljena okuženost s *Fusarium* spp. v povprečju malo nižja (Reska 10,5 %, Savinja 10,3 %) kot prejšnje leto, prav tako leta 2008 (Reska 10,8 %, Savinja 10,2 %), v povprečju postopkov pridelovanja v obeh letih so bile med kultivarjema le majhne razlike (pregl. 8).

Za preučitev statistično značilnih razlik v okuženosti obeh kultivarjev s *Fusarium* spp. smo odstotke okuženosti zrn (tv) transformirali po enačbi  $tv = \arcsin\sqrt{p}$  (2).

Transformirane vrednosti so prikazane v pregl. 8 in statistični izračuni v pregl. 9 in 10. Razlika je ob tveganju  $p < 0,05$  (pregl. 30) značilna le v okviru faktorja 'postopki' ob malo višjem tveganju,  $p < 0,06$  pa je statistično značilna tudi interakcija 'kultivar x postopki'. Preučitev tega pojava (gl. tudi korelacijsko analizo v pregl. 39) pokaže, da je pri višjih odmerkih N-min kultivar Reska bolj dovzeten za okužbo s *Fusarium* spp. kot kultivar Savinja.



Preglednica 7: Okuženost pšeničnega zrnja s *Fusarium* spp. pri kultivarjih Savinja in Reska v odvisnosti od postopkov pridelovanja v IOSDV Jable v letih 2006–2008 (odstotki, %)

Table 7: Contamination with *Fusarium* spp. of wheat grain on cultivars Savinja and Reska, depending on the production method at the IOSDV Jable in the years 2006–2008 (percentage, %)

Postopki pridelovanja	Odstotek <i>Fusarium</i> spp. (%)								
	2006		2007		2008		Skupaj		Skupaj
	Savinja	Reska	Savinja	Reska	Savinja	Reska	Savinja	Reska	
AN0	6,3	13,0	10,7	7,7	8,7	4,7	8,6	8,5	8,5
AN3	11,0	16,3	11,7	12,3	13,7	20,0	12,1	16,3	14,2
BN0	16,0	14,7	7,3	7,7	9,3	6,7	10,9	9,7	10,3
BN1	10,7	9,3	13,3	9,7	9,7	7,3	11,2	8,8	10,0
BN2	8,7	24,0	11,3	11,3	11,7	13,0	10,6	16,1	13,3
BN3	4,0	13,3	16,0	11,7	11,7	10,0	10,6	11,7	11,1
CN0	20,0	10,3	8,3	2,7	7,3	4,3	11,9	5,8	8,8
CN1	10,0	6,0	9,7	12,0	12,0	8,3	10,6	8,8	9,7
CN2	12,0	18,3	7,7	14,0	7,3	16,7	9,0	16,1	12,7
CN3	12,0	17,3	6,7	16,0	10,3	17,0	9,7	16,8	13,2
Povprečje	11,1	14,3	10,3	10,5	10,2	10,8	10,5	11,9	11,2

Preglednica 8: Okuženost pšeničnega zrnja s *Fusarium* spp. pri kultivarjih Savinja in Reska v odvisnosti od postopkov pridelovanja na lokaciji IOSDV Jable v letih 2006–2008 (transformirane vrednosti  $tv = \arcsin\sqrt{p}$ )

Table 8: Contamination of wheat grains with *Fusarium* spp. on cultivars Savinja and Reska, depending on the production method at the location IOSDV Jable in the years 2006–2008 (transformed values  $tv = \arcsin\sqrt{p}$ )

Postopki pridelovanja	Transformirane vrednosti okuženega zrnja na lokaciji Jable						
	Savinja	2006		2007		2008	
		Reska	Savinja	Reska	Savinja	Reska	
AN0	0,250	0,223	0,330	0,268	0,299	0,202	
AN3	0,327	0,414	0,348	0,363	0,378	0,462	
BN0	0,371	0,390	0,270	0,344	0,308	0,257	
BN1	0,270	0,289	0,367	0,309	0,311	0,269	
BN2	0,292	0,509	0,343	0,381	0,339	0,363	
BN3	0,195	0,365	0,406	0,322	0,347	0,308	
CN0	0,354	0,238	0,292	0,295	0,268	0,205	
CN1	0,322	0,244	0,310	0,292	0,351	0,292	
CN2	0,346	0,431	0,278	0,351	0,272	0,415	
CN3	0,329	0,422	0,242	0,331	0,320	0,408	
Povprečje	0,305	0,352	0,319	0,325	0,319	0,318	

Iz pregl. 8 je razvidno, da je bila leta 2006 okuženost obeh v raziskavo vključenih kultivarjev pšenice s *Fusarium* spp. sorazmerno visoka. Determinirane okužbe po ključu (Schmidt, 2002) na tistih zrnjih, s katerih so se razraščali puhasti micelijii belih do svetlih odtenkov, smo našli na 14,3 % zrn kultivarja Reska in na 11,1 % zrn kultivarja Savinja. V tem letu (2006) izstopa pri kultivarju Savinja nepričakovano visok delež okuženih zrn v postopku pridelovanja CN0 (20 %) in BN0 (16 %), v primerjavi z drugimi leti; sicer pa je bila pri obeh kultivarjih v povprečju treh let okuženost zrn sorazmerna z odmerkom N-min (pregl. 10).

Iz pregl. 8 je razvidno, da so gnojenje z organskimi gnojili in višji odmerki N-min v primerjavi z negnojimi postopki prispevali k večji okuženosti zrnja s *Fusarium* spp. Med postopki pridelovanja je bila okuženost diferencirana in sorazmerna z intenzivnostjo pridelovanja. V letu 2007 je bila najvišja okuženost s *Fusarium* spp. v postopku BN3 pri Savinji (16 %) ter v postopku CN3 pri kultivarju Reska (16 %). V letu 2008 je bila v IOSDV Jable najvišja okuženost s *Fusarium* spp. v postopku pridelovanja AN3, in sicer je pri tem postopku pri kultivarju Savinja znašala 13,7 % in pri kultivarju Reska 20 %.

Preglednica 9: Analiza variance okuženosti s *Fusarium* spp. na zrnju pšeničnih kultivarjev Reska in Savinja v IOSDV Jable, leta 2006–2008

Table 9: Analysis of variance of contamination with *Fusarium* spp. of wheat grain at cultivars Reska and Savinja at IOSDV Jable, years 2006–2008

Vir variance	Vsota kvadratov odklonov	Stopinje prostosti (n – 1)	Povprečna varianca	F izr.	F tab. (p = 0,05)	Značilnost razlik
Celotna varianca	0,275	59				
Med postopki	0,097	9	0,011	5,253	2,46 *	da
Med leti	0,001	2	0,0001	0,342	3,55 ( )	ne
Med kultivarjema	0,003	1	0,003	1,690	4,45 ( )	ne
Kultivar x postopki	0,074	9	0,008	4,002	2,46 *	da
Kultivar x leta	0,008	2	0,004	1,838	3,55 ( )	ne
Postopki x leta	0,055	18	0,003	1,474	2,19 ( )	ne
Ostanek	0,037	18	0,002			

Standardna napaka srednje vrednosti  $S_x = \sqrt{(0,002/3)} = 0,026$

Legenda: \* značilnost razlik pri  $p < 0,05$ ; ( ) ni značilnih razlik pri  $p < 0,05$

Preglednica 9 prikazuje analizo variance vpliva posameznih faktorjev (dejavnikov) poskusa na Jablah na značilnost pojavljanja *Fusarium* spp. na zrnju kultivarjev Reska in Savinja. Iz preglednice 9 je razvidno, da so bili analizirani vplivi: postopkov, let, kultivarjev in interakcij 'kultivarji x postopki', 'kultivarji x leta' ter 'postopki x leta'. Razvidno je, da sta bila vpliv 'postopki' in interakcija 'kultivar x postopki' statistično značilna ( $p = 0,005$ ).

Iz preglednice 10 izhaja, da so bila pšenična zrna s parcel, ki z N-min niso bile gnojene ali so bile manj gnojene (AN0, BN0 in CN0, BN1, CN1), manj okužena kot zrna s parcel, ki so bile bolj pognojene (BN2, BN3, CN2, CN3).

Preglednica 10: Rang statističnih razlik v stopnji okuženosti zrnja s *Fusarium* spp. v povprečju dveh kultivarjev pšenice, v odvisnosti od postopka pridelovanja v IOSDV Jable, povprečje let 2006–2008 (transformiran odstotek okuženosti  $tv = \arcsin\sqrt{p}$ )

Table 10: Rang of statistical differences in the degree of contamination of grain with *Fusarium* spp. on average of two wheat cultivars, depending on the production methods at IOSDV Jable, average of the years 2006–2008 (transformed percentages of contamination  $tv = \arcsin\sqrt{p}$ )

Postopki gnojenja	r	q	Rp	Transformirana vrednost okužbe $\arcsin\sqrt{p}$
AN3				0,381 a*
BN2	2	2,971	0,077	0,364 a
CN2	3	3,118	0,081	0,354 a
CN3	4	3,210	0,083	0,353 a
BN3	5	3,274	0,085	0,327 a b
BN0	6	3,321	0,086	0,312 a b
CN1	7	3,356	0,087	0,087 a b
BN1	8	3,383	0,088	0,303 a b
AN0	9	3,405	0,089	0,263 b
CN0	10	3,421	0,090	0,252 b

\* Vrednosti, označene z isto črko, se med seboj ne razlikujejo statistično značilno pri  $p = 0,05$  (Duncanov test); r = rang; q = tabelarična vrednost; Rp ( $f = 10$ ) = Signifikantna studentizirana variacijska širina za mejno tveganje 5 %.

Preglednica 11: Statistične razlike v okuženosti zrnja s *Fusarium* spp. dveh kultivarjev pšenice, v odvisnosti od pridelovanja na lokaciji Jable, 2006–2008 (transformiran odstotek okuženosti:  $tv = \arcsin\sqrt{p}$ )

Table 11: Statistical differences in the contamination of two wheat cultivars with *Fusarium* spp., depending on production method at the location Jable, 2006–2008 (transformed percentage of infections:  $tv = \arcsin\sqrt{p}$ )

Postopki gnojenja	Savinja				Reska				
	r	q	Rp	Transf. vred. okužbe $\arcsin\sqrt{p}$	Postopki gnojenja	r	q	Rp	Transf. vred. okužbe $\arcsin\sqrt{p}$
AN3				0,351	BN2				0,418 a
CN1	2	2,971	0,077	0,328	AN3	2	2,971	0,077	0,413 a
BN2	3	3,118	0,081	0,325	CN2	3	3,118	0,081	0,399 ab
BN3	4	3,210	0,083	0,316	CN3	4	3,210	0,083	0,332 b
BN1	4	3,210	0,083	0,316	BN3	5	3,274	0,085	0,332 b
BN0	4	3,210	0,083	0,316	BN0	6	3,321	0,086	0,330 b
CN0	7	3,356	0,087	0,305	BN1	7	3,356	0,087	0,289 cd
CN2	8	3,383	0,088	0,299	CN1	7	3,356	0,087	0,276 cd
CN3	9	3,405	0,089	0,297	CN0	9	3,405	0,089	0,246 cd
AN0	10	3,421	0,090	0,293	AN0	10	3,421	0,090	0,231 d

\* Vrednosti, označene z isto črko, se med seboj ne razlikujejo statistično značilno pri  $p = 0,05$  (Duncanov test); r = rang; q = tabelarična vrednost; Rp ( $f = 10$ ) = Signifikantna studentizirana variacijska širina za mejno tveganje 5 %.

Pregl. 11 prikazuje razliko med kultivarjema v pogledu interakcije s postopki pridelovanja oziroma gnojenja. Izkaže se, da se pri kultivarju Savinja okuženost zrn s *Fusarium* spp. statistično neznačilno odziva na postopek gnojenja z dušikom (intenzivnost pridelave ne vpliva značilno na stopnjo okuženosti), kultivar Reska, ki je v negnojenih in skromno gnojenih parcelah manj okužen kot Savinja, pa postane pri bolj gnojenih metodah pridelovanja statistično bolj okužen – kontaminiran s *Fusarium* spp. kot v manj gnojenih ali negnojenih parcelah.



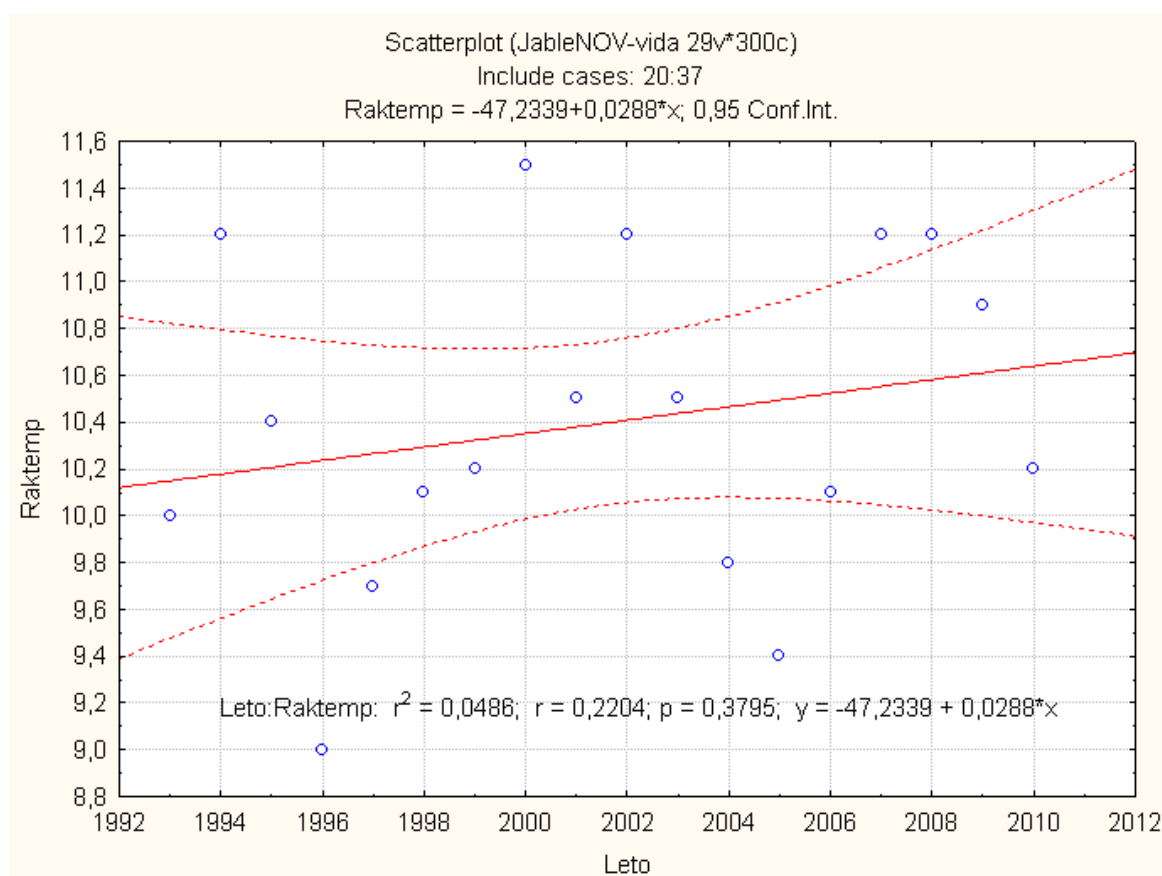
#### 4.2 VPLIV VREMENA, POSTOPKOV PRIDELOVANJA IN KULTIVARJA NA POJAV *Fusarium* spp. PRI KULTIVARJIH PŠENICE RESKA IN SAVINJA NA LOKACIJI IOSDV RAKIČAN

V Rakičanu znaša povprečna letna količina padavin 783 mm (pregl. 13). V svetovnih regijah z najvišjimi pridelki pšenice (nad 100 dt ha<sup>-1</sup>) je povprečna letna količina padavin enaka ali nižja kot v Rakičanu, le da so v teh regijah tla globlja in z boljšo teksturo kot na IOSDV Rakičan. Tako se lahko na tej lokaciji v jesensko-zimskem obdobju, ko pšenica potrebuje le malo vode in nastopi obdobje za njeno »skladiščenje«, akumulira kvečjemu do 112 mm padavinske vode do globine 1 m, do koder segajo korenine (Tajnšek, 2003). Na isti lokaciji je od leta 1993 do 2010 po letnem trendu povprečna letna količina padavin ostala skoraj nespremenjena, letno se je neznatno povečala za manj kot 1 mm (sl. 12).

Glede na dolgoletna povprečja (trende) padavin in temperatur so v Rakičanu sorazmerno ugodne klimatske razmere za pridelovanje kakovostne pšenice. Seveda pa so, tako kot na Jablah, nihanja med posameznimi leti mnogo večja kot v najugodnejših svetovnih regijah za pridelovanje pšenice. V kakšnem letu se namreč lahko pojavi tudi občutno manjša ali večja količina padavin kot v drugih letih (leta 2003 le 515 mm, 1996 pa 1046 mm padavin).

V obdobju, ki ga zajema ta raziskava, ni bilo izrazito ekstremnih vremenskih dogodkov (količina padavin je bila nekoliko nad dolgoletnim povprečjem), v kritičnem obdobju cvetenja, to je v maju in juniju, pa je bilo zlasti leta 2006 ugodno za pojav *Fusarium* spp. (2006: obdobje april–junij: 374 mm padavin; 2007: obdobje april–junij 138 mm padavin; 2008: obdobje april–junij: 165 mm padavin), manj ugodni za pojav teh plesni pa sta bili leti 2008 in še zlasti 2007 (pregl. 12). V letih 2006–2008 gibanje temperatur v kritičnem obdobju ni kazalo posebnosti.

V IOSDV Rakičan je 18-letni trend gibanja letnih temperatur pokazal statistično neznatno povečevanje povprečnih letnih temperatur ( $p = 0,37$ ), in sicer za 0,0288 °C letno. To povečanje pa bi v 100 letih nanese skoraj 3 °C (2,9 °C) oziroma za 27,6 % višjo temperaturo, kot je sedaj, ko znaša 10,5 °C (sl. 11).



Slika 11: Gibanje letnih temperatur na lokaciji Rakičan od postavitve poskusa IOSDV leta 1993 do leta 2010 (SURS, 2011). V enačbi trenda pomeni x leto, y pa povprečno letno temperaturo v danem letu.

Figure 11: Trend of the annual temperatures in the long-term field experiment at IOSDV Rakičan during the period of 1993 to 2010 (SURS, 2011). Parameters x and y mean year and average yearly temperature, respectively, at the given year.

V desetletnem povprečju (2001–2010) so temperature v mesecih april, maj in junij višje v Rakičanu kot na Jablah (pregl. 5 in 13) in se konec maja in v začetku junija gibljejo okoli vrednosti 20 °C, kar je idealna temperatura za razvoj nekaterih vrst rodu *Fusarium*.

V pregl. 14 je prikazan pojav *Fusarium* spp. v poskusu IOSDV Rakičan v letih 2006–2008. Iz nje je razvidno, da po nadpovprečni okuženosti obeh kultivarjev izstopa leto 2006, po sorazmerno nizki okuženosti zrn pa izstopa leto 2007.

V povprečju postopkov in let je bil na tej lokaciji kultivar Reska z vidnimi znaki okužbe s *Fusarium* spp. manj napaden kot Savinja. Pri obeh kultivarjih se okuženost s *Fusarium* spp. povečuje sorazmerno z višino mineralnega odmerka. Iz pregl. 14 pa izhaja, da je bila kontaminacija zrnja obeh kultivarjev izrazito višja kot na lokaciji Jable.

Preglednica 12: Mesečna temperatura in količina padavin v IOSDV Rakičan v letih 2005–2008 (SURs, 2011)

Table 12: Monthly temperature and rainfall on IOSDV Rakičan in years 2005–2008, (SURs, 2011)

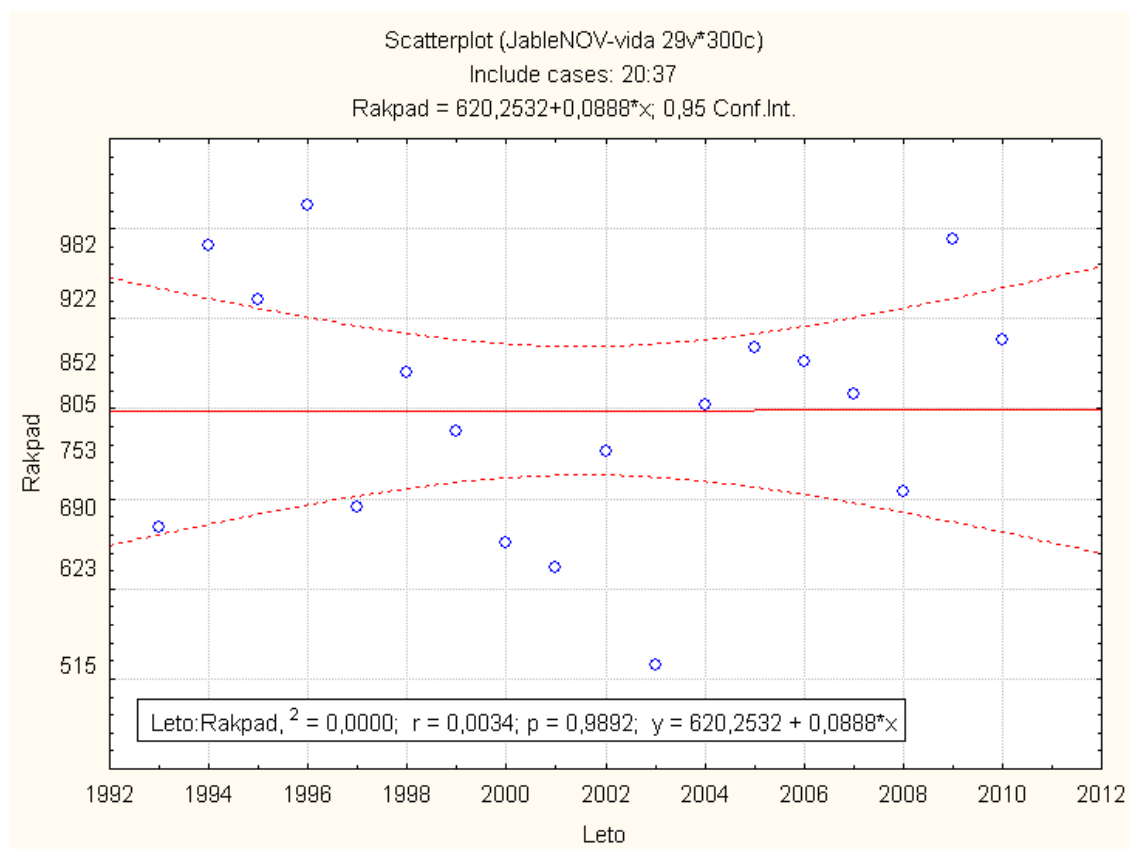
Leto	T/ pad.	Jan	Feb	Mar	Apr	Maj	Jun	Jul	Avg	Sep	Okt	Nov	Dec	Sum
2005	(°C)	-0,9	-3,3	3,1	10,9	15,9	19,0	20,3	18,0	15,9	10,7	3,6	-0,3	9,4
	(mm)	9	48	31	68	60	84	144	218	76	3	61	66	868
2006	(°C)	-5,1	-0,4	4,2	11,2	14,9	19,3	22,3	17,5	16,2	12,2	6,8	2,4	10,1
	(mm)	41	23	44	103	168	103	67	184	38	23	40	18	852
2007	(°C)	3,6	5,0	7,3	12,2	17,0	21,1	22,2	19,9	13,4	8,9	3,9	-0,5	11,2
	(mm)	27	42	87	3	61	74	99	112	181	56	35	40	817
2008	(°C)	1,8	3,9	6,2	10,8	16,7	20,2	20,7	20,1	14,7	10,9	6,2	2,1	11,2
	(mm)	5	11	58	34	64	67	168	79	69	46	47	59	707

Preglednica 13: Desetletno povprečje temperatur zraka in padavin po mesecih v IOSDV Rakičan, 2001–2010 (SURs, 2011)

Table 13: Ten-years average of temperature and of precipitation by month on IOSDV Rakičan, 2001–2010 (SURs, 2011)

mesec	Povprečje 2001–2010												Leto
	Jan	Feb	Mar	Apr	Maj	Jun	Jul	Avg	Sep	Okt	Nov	Dec	
(°C)	-0,9	1,5	5,8	10,9	16,3	19,7	21,3	20,1	14,8	10,5	5,7	0,2	10,5
(mm)		30	47	55	72	96	100	114	93	52	46	43	783

Da bi omogočili korektno statistično ovrednotenje značilnosti posameznih faktorjev v poskusu, smo odstotek okuženosti s *Fusarium* spp. transformirali na enak način kot za lokacijo Jable po formuli  $tv = \arcsin\sqrt{p}$  (2). Transformirane vrednosti odstotkov prikazuje preglednica 15, statistično analizo variance pa prikazuje preglednica 17. Iz nje je razvidno, da je bil vpliv faktorja 'letno' na okuženost zrnja statistično značilen ( $p < 0,05$ ), značilen pa je bil tudi vpliv faktorja 'postopki pridelovanja'. S statistično analizo (z uporabo Duncanovega testa) smo ugotovili ( $p < 0,05$ ), da je bila v obravnavanem obdobju v letu 2006 statistično značilna najvišja okuženost pšeničnega zrnja s *Fusarium* spp., statistično značilno manjša je bila kontaminiranost v letu 2008, s *Fusarium* spp. statistično najmanj okuženo zrnje pa je bilo v letu 2007 (pregl. 16).



Slika 12: Gibanje letne količine padavin na IOSDV Rakičan od zasnove poskusa, obdobje 1993–2010 (SURS, 2011). V enačbi trenda pomeni x leto, y pa povprečno letno količino padavin v danem letu.  
Figure 12: Trends of the annual amount of rainfall in the long-term field experiment at IOSDV Rakičan, 1993–2010. (SURS, 2011). Parameters x and y mean year and average yearly temperature, respectively, at the given year.

Preglednica 14: Okuženost zrnja s *Fusarium* spp. (odstotki, %) pri kultivarjih Savinja in Reska v odvisnosti od postopkov pridelovanja na lokaciji Rakičan v letih 2006–2008  
Table 14: Grain contamination with *Fusarium* spp. (percentage, %) depending on the production method at cultivars Savinja and Reska at IOSDV Rakičan in the years 2006–2008

Postopki pridelovanja	Odstotek <i>Fusarium</i> spp. zrn (%) v Rakičanu					
	2006		2007		2008	
	Savinja	Reska	Savinja	Reska	Savinja	Reska
AN0	24,0	32,7	7,7	4,0	21,3	18,3
AN3	50,0	42,0	11,0	5,7	29,7	11,0
BN0	36,3	31,7	8,3	9,0	16,7	11,3
BN1	23,7	25,0	5,0	9,3	29,0	21,7
BN2	42,3	50,3	11,3	10,3	22,7	37,0
BN3	69,3	35,7	15,0	10,0	35,7	20,0
CN0	40,7	45,0	15,3	7,0	15,0	8,3
CN1	50,7	45,7	12,3	7,0	16,7	20,0
CN2	54,7	69,0	9,0	6,7	28,7	18,3
CN3	63,0	56,3	11,7	10,3	37,3	19,3
Povprečje	45,5	43,3	10,7	7,9	25,3	18,5

Preglednica 15: Okuženost s *Fusarium* spp. zrnja pri kultivarjih Savinja in Reska v odvisnosti od postopkov pridelovanja na lokaciji Rakičan v letih 2006–2008 (transformirane vrednosti,  $tv = \arcsin\sqrt{p}$ )  
Table 15: Grain contamination of *Fusarium* spp. depending on the production methods in cultivars Savinja and Reska at IOSDV Rakičan in the years 2006–2008 (transformed values,  $tv = \arcsin\sqrt{p}$ )

Postopki pridelovanja	Transformirane vrednosti okuženega zrnja na lokaciji Rakičan					
	2006		2007		2008	
	Savinja	Reska	Savinja	Reska	Savinja	Reska
AN0	0,505	0,606	0,275	0,197	0,476	0,336
AN3	0,790	0,760	0,331	0,240	0,571	0,330
BN0	0,642	0,578	0,289	0,302	0,411	0,342
BN1	0,504	0,594	0,219	0,299	0,569	0,473
BN2	0,707	0,785	0,338	0,313	0,483	0,653
BN3	0,992	0,636	0,397	0,321	0,638	0,453
CN0	0,686	0,626	0,384	0,264	0,397	0,287
CN1	0,791	0,740	0,357	0,253	0,416	0,454
CN2	0,833	0,982	0,288	0,255	0,565	0,441
CN3	0,918	0,850	0,347	0,326	0,656	0,454
Povprečje	0,737	0,716	0,323	0,277	0,518	0,422

V nasprotju z Jablami se v Rakičanu kultivarja po okuženosti s *Fusarium* spp. nista statistično značilno razlikovala. V pregl. 18 je prikazan vpliv gnojenja z N-min in organskimi gnojili na pojav *Fusarium* spp. na pšeničnih zrnih tako Savinje kot Reske. Razvidno je, da je ta pojav pri obeh kultivarjih sorazmeren s stopnjo dušikovih odmerkov.

V preglednici 16 so prikazane povprečne transformirane vrednosti okuženosti s *Fusarium* spp. obeh kultivarjev. Skladno s statističnimi izvidi, ki jih prikazuje preglednica 17, je v preglednici 18 Duncanov test statističnih značilnosti razlik pokazal, da je na negnojnih parcelah in parcelah, ki niso bile gnojene (AN0, CN0, BN0) ali so dobile nizke odmerke dušikovih gnojil (BN1, CN1), okuženost s *Fusarium* spp. sorazmerno nižja kot na parcelah, ki so dobile višje in najvišje odmerke N-min.

Preglednica 16: Statistična značilnost vpliva dejavnika 'leto' na okuženost zrnja s *Fusarium* spp. pri pšeničnih kultivarjih Savinja in Reska v IOSDV Rakičan v letih 2006–2008

Table 16: Statistical significance of impact factor 'year' on wheat grain contamination with *Fusarium* spp. at cultivars Savinja and Reska at IOSDV Rakičan in years 2006–2008

Leto	r	q	Rp	Transformirana vrednost okužbe s <i>Fusarium</i> spp. ( $tv = \arcsin\sqrt{p}$ ) in značilnost razlik
2006				0,727 a*
2008	2	4,501	0,184	0,470 b
2007	3	4,516	0,185	0,300 c

\* Vrednosti, označene z isto črko, se med seboj ne razlikujejo statistično značilno pri  $p = 0,05$  (Duncanov test); r = rang; q = tabelarična vrednost; Rp ( $f = 3$ ) = Signifikantna studentizirana variacijska širina za mejno tveganje 5 %.

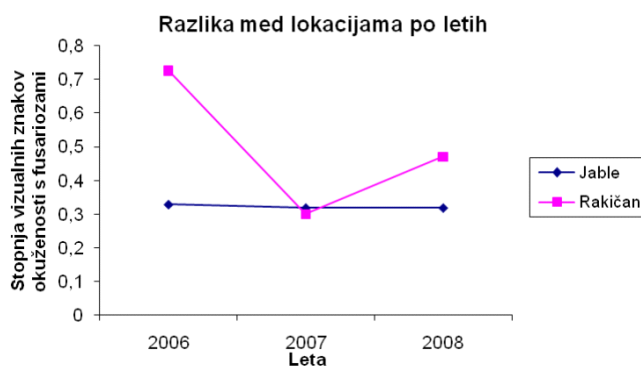
Preglednica 17: Analiza variance okuženosti zrnja pšeničnih kultivarjev Reska in Savinja s *Fusarium* spp. v IOSDV Rakičan v letih 2006–2008

Table 17: Analysis of variance of grain wheat contamination with *Fusarium* spp. in Reska and Savinja at IOSDV Rakičan in the years 2006–2008

Vir variance	Vsota kvadratov odklonov	Stopinje prostosti (n – 1)	Povprečna varianca	F izr.	F tab. (p = 0,05)	Značilnost razlik
Celotna varianca	2,514	59				
Med postopki	0,250	9	0,028	5,585	2,46 *	da
Med leti	1,842	2	0,921	184,656	3,55 *	da
Med kultivarjema	0,044	1	0,044	8,830	4,450 *	da
Kultivarja x postopki	0,086	9	0,010	1,907	2,46 ( )	ne
Kultivarja x leta	0,015	2	0,007	1,458	3,55 ( )	ne
Postopki x leta	0,187	18	0,010	2,077	2,19 ( )	ne
Ostanek	0,090	18	0,005			

Legenda: \*značilnost razlik pri  $p < 0,05$ ; ( ) neznačilnost razlik pri  $p < 0,05$

Standardna napaka srednje vrednosti =  $S_x = \sqrt{(0,005/3)} = 0,041$



Slika 13: Interakcija 'Lokacija x leto' glede okuženosti pšeničnih kultivarjev Savinja in Reska s *Fusarium* spp. na zrnju na lokacijah IOSDV Jable in IOSDV Rakičan v letih 2006–2008

Figure 13: Interaction of 'Location x year' for grain contamination with *Fusarium* spp. of wheat cultivars Savinja and Reska in IOSDV Jable and IOSDV Rakičan, in the years 2006–2008



Preglednica 18: Rang statističnih razlik v stopnji okuženosti zrnja s *Fusarium* spp. v odvisnosti od postopka pridelovanja na lokacijah IOSDV Rakičan in Jable v povprečjih kultivarjev in let 2006–2008 (transformirane vrednosti,  $tv = \arcsin\sqrt{p}$ )

Table 18: Rang of statistical differences in the degree of grain contamination with *Fusarium* spp. depending on the production process in locations IOSDV Rakičan and Jable in the averages of varieties and years 2006–2008 (transformed values,  $tv = \arcsin\sqrt{p}$ )

Postopki pridelovanja	r	q	Rp	Transformirana vrednost okužbe s <i>Fusarium</i> spp. ( $tv = \arcsin\sqrt{p}$ ) in značilnost razlik
CN3				0,473 a*
CN2	2	2,971	0,122	0,457 ab
BN2	3	3,118	0,185	0,455 ab
BN3	4	3,210	0,132	0,450 ab
AN3	5	3,274	0,134	0,442 ab
CN1	6	3,321	0,136	0,406 ab
BN1	7	3,356	0,138	0,373 ab
BN0	8	3,383	0,139	0,370 ab
CN0	9	3,405	0,140	0,346 b
AN0	10	3,421	0,140	0,331 b

\* Vrednosti, označene z isto črko, se med seboj ne razlikujejo statistično značilno pri  $p = 0,05$  (Duncanov test); r = rang; q = tabelarična vrednost; Rp ( $f = 3$ ) = Signifikantna studentizirana variacijska širina za mejno tveganje 5 %.

Preglednica 19: Analiza variance okuženosti pšenice kultivarjev Reska in Savinja s *Fusarium* spp. v IOSDV Jable in IOSDV Rakičan v letih 2006–2008

Table 19: Analysis of variance of grain contamination with *Fusarium* spp. in wheat cultivars Reska and Savinja at IOSDV Jable and IOSDV Rakičan in 2006–2008

Povprečje obeh kultivarjev	Vsota kvadratov odklonov	SP ( $n - 1$ )	Povprečna varianca	F izr.	F tab. ( $p = 0,05$ )	Značil. razlik
Celotna varianca	1,685	59				
Varianca med postopki	0,145	9	0,016	5,058	2,46 *	da
Varianca med leti	0,484	2	0,242	76,223	3,55 *	da
Varianca med lokacijama	0,469	1	0,469	147,53	4,41 *	da
Lokaciji x postopki	0,029	9	0,003	1,027	2,46 ( )	ne
Lokaciji x leta	0,438	2	0,219	68,872	3,55 *	da
Postopki x leta ( $(10 - 1) \times (3 - 2)$ )	0,063	18	0,004	1,107	2,22 ( )	ne
Ostane	0,057	18	0,003			

Legenda: \*Značilne razlike med variancami pri  $p < 0,05$ ;

( ) Ni značilnih razlik med variancami pri  $p < 0,05$

Zaradi rezultatov, prikazanih v preglednicah 7, 14, 15, 16, 17, 18 in 19, smo se odločili, da z metodama ELISA LUFA SP 22005 in ELISA LUFA SP 22006 le za leti 2006 in 2008, ko je bila močnejša okuženost pšeničnih zrn s *Fusarium* spp. kot v letu 2007, temeljiteje preučimo, kateri vzorci zrnja obeh pšeničnih kultivarjev so se kot posledica okužbe z glivo *Fusarium* spp. kontaminirali tudi z mikotoksinoma DON in ZEA. V letih 2007 in 2008 so

bile vremenske razmere na Jablah podobne, v Rakičanu pa je bila okuženost zrnja s *Fusarium* spp. največja leta 2006, najmanjša pa 2007, zato za leto 2007 nismo opravili dodatnih analiz kontaminacije pšeničnega zrnja s tema dvema mikotoksinoma.

Da obstaja velik vpliv vremenskih razmer v medletni primerjavi, dokazujejo tudi rezultati na sliki 13, ki prikazuje interakcijo med letom in okuženostjo pšeničnih zrn s *Fusarium* spp. Leta 2007 je bila na lokaciji Rakičan okuženost pšeničnega zrnja nižja kot v letih 2006 in 2008.

#### 4.3 KONTAMINIRANOST PŠENIČNEGA ZRNJA Z MIKOTOKSINOMA DON IN ZEA NA LOKACIJAH IOSDV JABLE IN IOSDV RAKIČAN V LETIH 2006 IN 2008

Kontaminiranost pšeničnega zrnja kultivarjev Reska in Savinja z mikotoksinoma DON in ZEA na lokacijah IOSDV Jable in Rakičan za leti 2006 in 2008, kot izhaja iz laboratorijskih analiz mok v LUFA Speyer, prikazujejo preglednice v Prilogi C.

##### 4.3.1 Mikotoksin DON v pšeničnem zrnju kultivarja Reska na lokacijah IOSDV Jable in IOSDV Rakičan

Kot smo že omenili, okuženost pšeničnih zrn s *Fusarium* spp. še ne pokaže dovolj natančne stopnje kontaminiranosti zrn oziroma moke s strupenimi metaboliti gliv, ki jih povzročajo te glive, saj nekatere vrste teh gliv, kot npr. vrste *Microdochium* sp, ne producirajo mikotoksina DON, je pa po študijah, ki so jih izvedli v Franciji (Siou, 2013), v tej državi v zadnjih letih *Microdochium* sp med ključnimi povzročitelji fuzarioz na žitih.

Kontaminiranost kultivarja Reska z mikotoksinom DON na lokacijah IOSDV Jable in IOSDV Rakičan leta 2006 prikazuje preglednica 20. Iz nje je razvidno, da na lokaciji IOSDV Jable niti v beli niti v črni moki nismo zaznali prisotnosti DON; če je sicer bila, je bila pod mejo detekcije. Tako beli kot črni kruh, pečen iz te moke, bi bil, po kriteriju varnosti pred mikotoksinom DON, povsem varen.

Drugačni so rezultati, ki jih je za isto leto (2006) dala analiza DON za lokacijo IOSDV Rakičan. Na tej lokaciji je bila bela moka kultivarja Reska prav tako brez zaznavne kontaminiranosti z DON. Kot prikazuje pregl. 20, pa je bila črna moka kontaminirana z mikotoksinom DON, in sicer v eni ponovitvi kontrole (AN0) in pri vseh treh ponovitvah stopenj gnojenja z N-min v sistemu s slamo in v sistemu z gnojem (BN2 in CN2; oba po 130 kg N-min ha<sup>-1</sup>).

Pričakovano je bila kontaminacija z DON višja na parcelah s srednjim odmerkom N-min (N2), ki smo jih vključili v raziskavo obenem s hlevskim gnojem (BN2) v kolobarju, ali z zaorom stranskih pridelkov (CN2: slama, koruznica, podorina).

Preglednica 20: Kontaminiranost bele in črne moke kultivarja Reska z mikotoksinom deoksinivalenol (DON) nad mejo detekcije ( $> 200 \mu\text{g DON kg}^{-1}$  moke) na lokacijah IOSDV Jable in Rakičan v letu 2006 ( $\mu\text{g DON kg}^{-1}$  moke)

Table 20: Contamination of both white and dark flour cultivary of Reska with the mycotoxin deoxynivalenol (DON) above the detection limit ( $> 200 \mu\text{g DON kg}^{-1}$  flour) in locations IOSDV Jable and Rakičan in year 2006 ( $\mu\text{g DON kg}^{-1}$  flour)

Vsebnost DON ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ moke)		RESKA 2006											
Lokacija		Jable						Rakičan					
Tip moke*		Bela moka			Črna moka			Bela moka			Črna moka		
Blok		I.	II.	III.	I.	II.	III.	I.	II.	III.	I.	II.	III.
AN0		-	-	-	-	-	-	-	-	-	250	-	-
BN0		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CN0		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BN2		-	-	-	-	-	-	-	-	-	360	670	290
CN2		-	-	-	-	-	-	-	-	-	300	350	300

\*Bela moka tip 405, črna moka tip 1050

- pod mejo detekcije (DON pod  $200 \mu\text{g kg}^{-1}$  moke)

Pregl. 21 prikazuje analizo variance kontaminiranosti črne moke kultivarja Reska na lokaciji Rakičan v letu 2006, v preglednici 22 pa je razvidna statistična značilnost razlik ( $p < 0,05$ ) med aritmetičnimi sredinami kontaminiranosti po Duncanovem testu v odvisnosti od gnojenja z N-min in organskimi gnojili v Rakičanu v letu 2006. Razvidno je (pregl. 21), da med ponovitvami (bloki) ni značilnih razlik, medtem ko med postopki so statistično značilne razlike.

Duncanov test razlik aritmetičnih sredin med posameznimi postopki gnojenja (pregl. 22) pa je pokazal, da se postopek, ki je imel funkcijo kontrole (AN0), ni značilno razlikoval od ostalih dveh negnojenih postopkov pridelovanja pšenice (BN0 in CN0). Od negnojenih postopkov pridelovanja pa sta bili z DON statistično značilno bolj kontaminirani stopnji BN2 in CN2, ki pa se medsebojno nista statistično razlikovali, čeprav je bila kontaminiranost variante BN2 večja kot kontaminiranost CN2.

Skladno z vremenskimi razmerami v letu 2008, ko je bila na Jablah nadpovprečna količina padavin (1593 mm), v Rakičanu pa podpovprečna (707 mm), je bila pri kultivarju Reska v tem letu prisotnost DON v moki v Rakičanu pod mejo detekcije, in sicer tako v črni kot beli moki (pregl. 23). V IOSDV Jable pa je bila pri tem kultivarju kontaminiranost z DON v ničelnih postopkih (AN0, BN0, CN0) pod mejo detekcije v obeh tipih moke, v postopku BN2 je bila pod mejo detekcije v eni ponovitvi pri beli moki, v postopku CN2 pa sta bili v vseh treh ponovitvah kontaminirani tako bela kot tudi črna moka.

Preglednica 21: Analiza variance kontaminiranosti pšenične črne moke (tip 1050) kultivarja Reska z DON v Rakičanu v letu 2006

Table 21: Analysis of variance of dark wheat flour (type 1000) variety of Reska contamination with DON in Rakičan in 2006

Vir variabilnosti	Vsota kvadratov odklonov	SP (n - 1)	Povprečna varianca	F izr.	F tab. (p = 0,05)	Značilnost razlik
Celotna varianca	1279,87532	14				
Med bloki	29,50184	2	14,75092	0,705	4,46	ni
Med postopki	1082,91364	4	270,72841	12,933	3,84	da
Ostanek	167,45984	8	20,93248			

Standardna napaka srednje vrednosti =  $S_x = \sqrt{(20,932/3)} = 2,64$

Preglednica 22: Statistična značilnost kontaminiranosti črne moke pšenice kultivarja Reska z DON v odvisnosti od gnojenja z N-min in hlevskim gnojem v IOSDV Rakičan v letu 2006

Table 22: Statistical significance of wheat (dark flour) contamination with DON depending on the fertilization with N-min and organic fertilizers in cultivar Reska on location IOSDV Rakičan, year 2006

Postopki gnojenja	r	q	Rp	Transformirana vrednost okužbe $\sqrt{(\frac{1}{2} + x)}$
BN2				20,747 a*
CN2	2	3,261	8,609	17,797 a
AN0	3	3,399	8,973	5,747 b
BN0	4	3,475	9,174	0,707 b
CN0	5	3,521	9,295	0,707 b

\* Vrednosti, označene z isto črko, se med seboj ne razlikujejo statistično značilno pri  $p = 0,05$  (Duncanov test); r = rang; q = tabelarična vrednost; Rp (f = 8) = Signifikantna studentizirana variacijska širina za mejno tveganje 5 %.

Preglednica 23: Kontaminiranost bele in črne moke kultivarja Reska z mikotoksinom DON nad mejo detekcije ( $< 200 \mu\text{g DON kg}^{-1}$  moka) na lokacijah IOSDV Jable in Rakičan v letu 2008 ( $\mu\text{g DON kg}^{-1}$  moka)  
Table 23: Both white and dark flour contamination with the mycotoxin DON above the detection limit ( $< 200 \mu\text{g DON kg}^{-1}$  flour) in variety of Reska in locations IOSDV Jable and IOSDV Rakičan in 2008 ( $\mu\text{g DON kg}^{-1}$  flour)

Vsebnost DON ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ moka)		RESKA 2008										
Lokacija		Jable					Rakičan					
*Tip moka	Bela moka	Črna moka			Bela moka			Črna moka				
Blok	I.	II.	III.	I.	II.	III.	I.	II.	III.	I.	II.	III.
AN0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BN0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CN0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BN2	250	-	670	630	260	1000	-	-	-	-	-	-
CN2	570	300	280	670	280	250	-	-	-	-	-	-

-  $< 200 \mu\text{g kg}^{-1}$  moka

\*Bela moka tip 405, črna moka tip 1050

Za lokacijo IOSDV Jable je bilo treba statistično preveriti:

- ali je bila v letu 2008 črna moka z mikotoksinom DON značilno bolj kontaminirana kot bela moka in
- ali je med variantama pridelovanja BN2 in CN2 statistično značilna razlika.

Iz pregl. 24 izhaja, da so pri beli moki, kultivar Reska, med postopki pridelovanja (gnojenja) glede kontaminiranosti z DON statistično značilne razlike, iz pregl. 25 pa je razvidno, da med variantama pridelovanja BN2 in CN2 ni statistično značilnih razlik pri  $p = 0,05$ . Navedeni varianti pridelovanja pa se značilno razlikujeta od postopkov pridelovanja, ki niso bila gnojena z N-min (AN0, BN0, CN0).

Preglednica 24: Statistična značilnost aritmetičnih sredin kontaminiranosti z mikotoksinom DON v beli moki kultivarja Reska v Jablah v letu 2008

Table 24: Statistical significance of arithmetic of contamination with mycotoxin DON in white flour variety of Reska in Jable in 2008

Vir variabilnosti	Vsota kvadratov odklonov	SP (n - 1)	Povprečna varianca	F izr.	F tab. (p = 0,05)	Značilnost razlik
Celotna varianca	1317,637	14				
Med bloki	72,223	2	36,112	1,030	4,46	ne
Med postopki	964,805	4	241,201	6,877	3,84	da
Ostane	280,609	8	35,076			

Standardna napaka srednje vrednosti =  $S_x = \sqrt{(35,076/3)} = 3,42$

Preglednica 25: Statistična razlika med kontaminiranostjo z DON pri različnih postopkih pridelovanja pri beli moki kultivarja Reska v Jablah leta 2008

Table 25: Statistical difference between contamination with DON in various production processes in white flour Reska in Jable in 2008

Postopki gnojenja	r	q	Rp	Transformirana vrednost okužbe $\sqrt{(\frac{1}{2} + x)}$
BN2				19,323 a*
CN2	2	3,261	11,153	14,143 a
AN0	3	3,399	11,625	0,707 b
BN0	4	3,475	11,884	0,707 b
CN0	5	3,521	12,042	0,707 b

\* Vrednosti, označene z isto črko, se med seboj ne razlikujejo statistično značilno pri  $p = 0,05$  (Duncanov test); r = rang; q = tabelarična vrednost;  $S_x = \sqrt{(35,076/3)} = 3,42$ ; Rp (f = 8) = Signifikantna studentizirana variacijska širina za mejno tveganje 5 %.

V pregl. 26 so za lokacijo IOSDV Jable za leto 2008 pri kultivarju Reska prikazani rezultati oziroma statistična analiza kontaminiranosti črne moke z mikotoksinom DON. Iz teh rezultatov izhaja, da so razlike med postopki pridelovanja značilne ( $p < 0,05$ ), pač pa med bloki ni značilnih razlik.

Preglednica 26: Statistična značilnost aritmetičnih sredin kontaminiranosti pšenične črne moke, kultivar Reska, z mikotoksinom DON v Jablah v letu 2008 (transformirana vrednost okužbe  $\sqrt{(\frac{1}{2} + x)}$ )

Table 26: Statistical significance of arithmetic contamination with mycotoxin DON of dark wheat flour, a variety of Reska in Jable in 2008 (transformed value of contamination  $\sqrt{(\frac{1}{2} + x)}$ )

Vir variabilnosti	Vsota kvadratov odklonov	SP (n - 1)	Povprečna varianca	F izr.	F tab. (p = 0,05)	Značilnost razlik
Celotna varianca	1833,161	14				
Med bloki	36,868	2	18,434	1,009	4,46	ni
Med postopki	1650,236	4	412,559	22,597	3,84	da
Ostane	146,057	8	18,257			

Standardna napaka srednje vrednosti =  $S_x = \sqrt{(18,257/3)} = 2,47$

Pregl. 27 prikazuje, da je bila na Jablah kontaminiranost črne moke, kultivar Reska, v postopkih pridelovanja brez gnojenja z N-min manjša (oziroma da je pod mejo detekcije) kot v postopkih, v katerih je bila pšenica gnojena s srednjim odmerkom N-min (BN2, CN2: 130 kg ha<sup>-1</sup> N-min).

Preglednica 27: Statistična razlika med kontaminiranostjo z DON pri različnih postopkih pridelovanja pri črni moki kultivarja Reska v Jablah v letu 2008

Table 27: Statistical difference between dark flour contamination with DON in various production processes in variety of Reska in Jable in 2008

Postopki gnojenja	r	q	Rp	Transformirana vrednost okužbe $\sqrt{(\frac{1}{2} + x)}$
BN2				24,293 a*
CN2	2	3,261	8,055	19,490 a
AN0	3	3,399	8,396	0,707 b
BN0	4	3,475	8,583	0,707 b
CN0	5	3,521	8,697	0,707 b

\* Vrednosti, označene z isto črko, se med seboj ne razlikujejo statistično značilno pri p = 0,05 (Duncanov test); r = rang; q = tabelarična vrednost;  $S_x = \sqrt{(18,257/3)} = 2,47$ ; Rp (f = 8) = Signifikantna studentizirana variacijska širina za mejno tveganje 5 %.

#### 4.3.2 DON v vzorcih pšeničnega zrnja kultivarja Savinja na lokacijah IOSDV Jable in IOSDV Rakičan

V nasprotju s kultivarjem Reska, pri katerem je, kot smo že prikazali (preglednice od št. 20 dalje), v črni moki (tip 1050) prišlo v letu 2006 do kontaminacije zrnja z mikotoksinom DON na lokaciji Rakičan, kultivar Savinja v tem letu s tem mikotoksinom (upoštevaje mejo detekcije) ni bil kontaminiran niti v beli moki (tip 405) niti v črni moki (tip 1050), in sicer ne na lokaciji IOSDV Jable ne na lokaciji IOSDV Rakičan, v nobeni varianti.

Skladno s potekom vremenskih pojavov v letu 2008, ko je bilo na Jablah obilo padavin (pregl. 5), v Rakičanu pa malo (pregl. 13), je bila v tem letu na Jablah pri kultivarju



Savinja ugotovljena kontaminiranost bele in črne moke z mikotoksinom DON v varianti pridelovanja BN2, in sicer z mikotoksinom DON pri beli in črni moki v varianti BN2, v IOSDV Rakičan pa pri tem kultivarju niti v črni niti v beli moki prisotnosti tega mikotoksina (pod mejo detekcije) nismo zaznali (pregl. 28).

Pri kultivarju Savinja smo na lokaciji IOSDV Jable ugotovili kontaminacijo bele in črne moke z DON v varianti pridelovanja (gnojenja) BN2 (pregl. 28). Izkazalo se je, da ugotovljene razlike v kontaminiranosti niso dovolj velike, da bi s statistično analizo variance lahko dokazali značilnost razlik med kontaminiranostjo bele in črne moke z DON v stopnji BN2 (pregl. 30). Tudi z metodo parov (Weber, 1961) ob uporabi t-testa smo ugotovili, da med njima ni bilo statistično značilnih razlik pri 5-odstotnem tveganju ( $p = 0,05$ ) (pregl. 31), z analizo variance na isti lokaciji (IOSDV Rakičan) pa smo ugotovili, da je bila pri beli moki značilna razlika v kontaminiranosti pšenice pri različnih stopnjah gnojenja, varianta BN2 je bila namreč statistično značilno kontaminirana z DON (pregl. 29) v primerjavi z variantami AN0, BN0, CN0 in CN2, pri katerih kontaminacije z DON v letu 2008 pri kultivarju Savinja nismo zaznali pri meji detekcije  $< 200 \mu\text{g DON kg}^{-1}$  moke. Glede na to dejstvo v tem okviru pri beli moki ni bilo potrebno opravljati nadaljnjih testov (Duncanov test) za ugotavljanje razlik med postopki pridelovanja glede na okuženost z DON.

Preglednica 28: Kontaminiranost bele in črne moke kultivarja Savinja z DON nad mejo detekcije ( $< 200 \mu\text{g DON kg}^{-1}$  moke) na lokacijah IOSDV Jable in IOSDV Rakičan v letu 2008 ( $\mu\text{g DON kg}^{-1}$  moke)

Table 28: White and dark flour contamination with DON above the detection limit ( $< 200 \mu\text{g DON kg}^{-1}$ ) in variety Savinja in locations IOSDV Jable and IOSDV Rakičan in 2008 ( $\mu\text{g DON kg}^{-1}$  flour)

Vsebnost DON ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ moke)	SAVINJA 2008												
	Lokacija	Jable						Rakičan					
		Bela moka			Črna moka			Bela moka			Črna moka		
Tip moke*													
Blok	I.	II.	III.	I.	II.	III.	I.	II.	III.	I.	II.	III.	
AN0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
BN0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
CN0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
BN2	330	270	530	220	-	500	-	-	-	-	-	-	
CN2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

\*Bela moka tip 405, črna moka tip 1050

- pod mejo detekcije ( $< 200 \mu\text{g DON kg}^{-1}$  moke)

Preglednica 29: Kontaminiranost bele moke kultivarja Savinja z DON v IOSDV Jable leta 2008 (transformirane vrednosti okužbe  $\sqrt{(\frac{1}{2} + x)}$ )

Table 29: White flour contamination with DON at the variety Savinja in the IOSDV Jable in 2008 (transformed values of contamination  $\sqrt{(\frac{1}{2} + x)}$ )

Vir variabilnosti	Vsota kvadratov	SP	Srednji kvadrat	F izr.	F tab. ( $p = 0,05$ )	Značilnost ( $p = 0,05$ )
Celotna varianca	845,828	14				
Varianca med bloki	4,662	2	2,330	1,000	4,46	ne
Varianca med postopki	822,520	4	205,629	88,222	3,84	da
Ostanek	18,647	8	2,330			

Preglednica 30: Testiranje razlik glede na DON med tremi vzorci bele (b) in tremi vzorci črne (č) moke kultivarja Savinja na IOSDV Jable za leto 2008 (transformirana vrednost okužbe  $\sqrt{(\frac{1}{2} + x)}$ )

Table 30: Testing differences by DON between the three samples of white (b) and three samples of dark (č) flour variety Savinja in IOSDV Jable in 2008 (transformed value of infection  $\sqrt{(\frac{1}{2} + x)}$ )

Postopek	1. blok	2. blok	3. blok	Arit. sr.	Varianca	$(x_1 - x_2)$	$T_{izr(0,05)}$	$T_{tab(0,05)}$	Znač.
bBN2	18,180	16,447	23,033	19,220	11,653	6,577	1,93	2,78	ne
čBN2	14,849	0,707	22,372	12,643	120,992				

Preglednica 31: Razlika v kontaminiranosti moke z DON med belo in črno moko pri kultivarju Savinja v IOSDV Jable v letu 2008 (transformirana vrednost okužbe  $\sqrt{(\frac{1}{2} + x)}$ )

Table 31: The difference between dark and white flour contamination with DON at variety Savinja in IOSDV Jable in 2008 (transformed value of contamination  $\sqrt{(\frac{1}{2} + x)}$ )

Vir variabilnosti	Vsota kvadratov odklonov	SP (n - 1)	Povprečna varianca	F izr.	F tab. (p = 0,05)	Značilnost razlik
Celotna varianca	690,470	11				
Varianca med postopki	154,704	3	51,568	1,121	4,46	ne
Varianca med bloki	259,798	2	129,899	2,824	3,84	ne
Ostanek	275,969	6	45,995			

Predhodno smo že omenili, da v letu 2008 na lokaciji IOSDV Jable pri kultivarju Savinja nismo mogli ugotoviti razlik v kontaminiranosti bele in črne moke z DON v varianti pridelovanja BN2, nadaljnja statistična analiza pa je pokazala, da se pri tem kultivarju v istem letu tudi pri črni moki ne da dokazati, da bi bila kontaminacija z DON v stopnji BN2 statistično značilno večja kot pri drugih pridelovalnih postopkih (pregl. 32).

Preglednica 32: Kontaminiranost črne moke z DON pri kultivarju Savinja v IOSDV Jable v letu 2008 (transformirana vrednost okužbe  $\sqrt{(\frac{1}{2} + x)}$ )

Table 32: Dark flour contamination with DON at the cultivar Savinja in IOSDV Jable in 2008 (transformed value of contamination  $\sqrt{(\frac{1}{2} + x)}$ )

Vir variabilnosti	Vsota kvadratov	SP (n - 1)	Povprečna varianca	F iztr.	F tab (p = 0,05)	Značilnost (p = 0,05)
Celotna varianca	583,886	14				
Varianca med bloki	48,397	2	24,198	0,283	4,46	ne
Varianca med postopki	341,902	4	85,476	3,532	3,84	ne
Ostanek	193,587	8	24,198			

### 4.3.3 ZEA na vzorcih pšeničnega zrnja kultivarja Reska na lokacijah IOSDV Jable in IOSDV Rakičan

V območju meje določljivosti ( $< 5 \mu\text{g kg}^{-1}$  moke) se ZEA v letu 2006 na nobeni od obeh v poskus vključenih lokacij ni pojavljal, in sicer ga ni bilo niti na kultivarju Reska niti na kultivarju Savinja, zato prikaz preglednic v tem primeru ni smiselno. V nasprotju z letom 2006 pa so za leto 2008 rezultati pokazali, da je bila na meji določljivosti na lokaciji IOSDV Jable v tem letu kontaminiranost z mikotoksinom ZEA prisotna v črni moki kultivarja Reska v vseh treh ponovitvah variante BN2, v dveh ponovitvah variante CN2 in v eni ponovitvi variante BN0, v beli moki pa v nobeni stopnji pridelovanja nismo zaznali mikotoksina ZEA; medtem ko ga na lokaciji IOSDV Rakičan nismo zaznali v nobeni varianti pridelovanja, torej niti v črni niti v beli moki (pregl. 33).

Preglednica 33: Kontaminiranost bele in črne moke z ZEA nad mejo detekcije ( $< 5 \mu\text{g ZEA kg}^{-1}$  moke) pri kultivarju Reska na lokacijah IOSDV Jable in IOSDV Rakičan v letu 2008 ( $\mu\text{g kg}^{-1}$  moke)

Table 33: Contamination of both white and dark flour with ZEA above the detection limit ( $< 5 \mu\text{g ZEA kg}^{-1}$  flour) at the variety Reska at IOSDV Jable and IOSDV Rakičan in 2008 ( $\mu\text{g kg}^{-1}$  flour)

Vsebnost ZEA ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ moke)		Reska 2008											
Lokacija		Jable						Rakičan					
Tip moke*	Bela moka	Črna moka			Bela moka			Črna moka					
Blok	I. II. III.	I. II. III.	I. II. III.	I. II. III.	I. II. III.								
AN0	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -								
BN0	- - -	14 - -	- - -	- - -	- - -								
CN0	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -								
BN2	- - -	16 19 79	- - -	- - -	- - -								
CN2	- - -	22 13 12	- - -	- - -	- - -								

-  $< 5 \mu\text{g kg}^{-1}$  moke

\*Bela moka tip 405, črna moka tip 1050

Zastavili smo si še vprašanje o značilnosti razlik v kontaminiranosti črne moke na lokaciji IOSDV Jable v odvisnosti od stopnje gnojenja z dušikom in sistema gospodarjenja in glede na obliko gnojenj z organskimi gojili (pregl. 34).

Preglednica 34: Analiza variance kontaminiranosti pšenične črne moke z ZEA; IOSDV Jable 2008, kultivar Reska; transformirana vrednost okužbe  $\sqrt{(\frac{1}{2} + x)}$

Table 34: Analysis of variance of dark wheat flour contamination with ZEA; IOSDV Jable, 2008, a variety of Reska; transformed value of contamination  $\sqrt{(\frac{1}{2} + x)}$

Vir variabilnosti	Varianca	SP (n - 1)	Srednja varianca	F izr.	F tab. (p = 0,05)	Značilnost razlik
Celotna varianca	82,075	14				
Med bloki	2,259	2	0,738	0,459	4,46	ne
Med postopki	60,144	4	13,594	6,115	3,84	da
Ostane	19,672	8	2,459			

Statistična analiza razlik med aritmetičnimi sredinami variant pridelovanja (gnojenje z mineralnim N, uporaba različnih organskih gnojil) je pokazala, da so na lokaciji IOSDV Jable v letu 2008 pri kultivarju Reska razlike v kontaminiranosti z mikotoksinom ZEA med postopki pridelovanja značilne pri 5-odstotnem tveganju, vendar smo z Duncanovim testom značilnosti razlik med aritmetičnimi sredinami lahko dokazali le, da sta bila postopka BN2 in CN2 (BN2: gnoj + 130 kg N ha<sup>-1</sup>; CN2: slama + 130 kg N ha<sup>-1</sup>) značilno bolj kontaminirana z ZEA (pregl. 35) kot negnojene variante pridelovanja (AN0, CN0, BN0).

Preglednica 35: Statistična značilnost kontaminiranosti črne pšenične moke kultivarja Reska z mikotoksinom ZEA v odvisnosti od gnojenja z N-min in organskimi gnojili na lokaciji IOSDV Jable v letu 2008  
Table 35: Statistical significance of contamination of dark wheat flour with mycotoxin ZEA at the cultivar Reska depending on the fertilization with N-min and organic fertilizers on the location IOSDV Jable in 2008

Postopki gnojenja	Transformirana vrednost okužbe $\sqrt{(\frac{1}{2} + x)}$
BN2	5,798 <i>a</i> *
CN2	3,983 <i>a</i>
BN0	1,741 <i>b</i>
CN0	0,707 <i>b</i>
AN0	0,707 <i>b</i>

\* Vrednosti, označene z isto črko, se med seboj ne razlikujejo statistično značilno pri  $p < 0,05$  (Duncanov test); Rp ( $f = 4$ ) = Signifikantna studentizirana variacijska širina za mejno tveganje 5 %.

#### 4.3.4 ZEA na vzorcih pšeničnega zrnja kultivarja Savinja na lokacijah IOSDV Jable in IOSDV Rakičan

Na isti lokaciji (IOSDV Jable) je bil v letu 2008 z mikotoksinom ZEA kontaminiran tudi kultivar Savinja, in sicer bela moka v eni ponovitvi v postopku pridelovanja BN2, črna moka pa v eni ponovitvi postopkov pridelovanja CN0, v dveh ponovitvah postopka pridelovanja BN2 in v eni ponovitvi postopkov pridelovanja CN2 (pregl. 36). Tudi tu se zastavlja vprašanje o statistični značilnosti vpliva postopkov pridelovanja na pojav kontaminacije pšenične moke kultivarja Savinja z mikotoksinom ZEA. Analiza variance je pokazala, da v pogledu kontaminiranosti z ZEA razlike med postopki niso značilne pri  $p = 0,05$  (pregl. 37).

Nadalje smo tudi z metodo parov (Weber, 1961) analizirali razliko v kontaminiranosti bele in črne moke z ZEA pri postopku BN2. Statistični test razlike med povprečjema dveh aritmetičnih sredin (t-test) pa je pokazal, da po tej metodi razlika obstaja in da je črna moka z mikotoksinom ZEA značilno bolj kontaminirana kot bela moka (pregl. 38).

Preglednica 36: Kontaminiranost bele in črne moke kultivarja Savinja z mikotoksinom ZEA nad mejo detekcije ( $< 5 \mu\text{g ZEA kg}^{-1}$  moke) na lokacijah IOSDV Jable in IOSDV Rakičan v letu 2008 ( $\mu\text{g kg}^{-1}$  moke)  
Table 36: Both white and dark flour contamination with ZEA above the limit detection ( $< 5 \mu\text{g ZEA kg}^{-1}$  flour) at the cultivar at IOSDV Jable and IOSDV Rakičan in 2008 ( $\mu\text{g kg}^{-1}$  flour)

Vsebnost ZEA ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ moke)		SAVINJA 2008								
Lokacija		Jable			Rakičan					
Tip moke*	Bela moka	Črna moka			Bela moka			Črna moka		
Blok	I. II. III.	I. II. III.	I. II. III.	I. II. III.	I. II. III.	I. II. III.	I. II. III.	I. II. III.	I. II. III.	
AN0	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	
BN0	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	
CN0	- - -	22	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	
BN2	- 7 -	18 44 -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	
CN2	- - -	6	- -	- -	- -	- -	- -	- -	6 -	

- $< 5 \mu\text{g kg}^{-1}$  moke;

\*Bela moka tip 405, črna moka tip 1050

Preglednica 37: Statistična značilnost vpliva postopkov pridelovanja pšenice kultivarja Savinja na kontaminacijo njene črne moke z mikotoksinom ZEA (IOSDV Jable, 2008)

Table 37: Statistical significance of impact of production methods of cultivar Savinja to the contamination of its dark flour with mycotoxin ZEA at IOSDV Jable in 2008

Vir variabilnosti	Vsota kvadratov	SP (n - 1)	Srednji kvadrat	F izr.	F tab.	Značilnost (p = 0,05)
Celotna varianca	52,284	14				
Varianca med bloki	9,174	2	4,587	1,67	4,46	ne
Varianca med postopki	21,127	4	5,282	1,92	3,84	ne
Ostanek	21,983	8	2,748			

Preglednica 38: Razlika v kontaminiranosti z mikotoksinom ZEA med belo moko (b) variante BN2 in črno moko (č) variante BN2 pri kultivarju Savinja na lokaciji IOSDV Jable leta 2008 (t-test)

Table 38: The difference in contamination with mycotoxin ZEA between white (b) and dark (č) flour in the variant BN2 at the cultivary Savinja on IOSDV Jable in 2008 (t-test)

Postopek	1. blok	2. blok	3. blok	Arit. sr.	Varianca	( $x_1 - x_2$ )	$T_{izr}$	$T_{tab}$	Znač.
bBN2	0,707	2,74	0,707	1,723	3,095	8,814	3,952	2,78	Da
čBN2	4,301	6,670	0,707	5,493	32,162				

#### 4.3.5 Korelacija med gnojenjem z N-min, pojavom *Fusarium* spp. in med mikotoksinoma DON in ZEA v beli in črni moki kultivarjev Reska in Savinja

Vpliv gnojenja z N-min in organskimi gnojili na pojav *Fusarium* spp. ter medsebojno soodvisnost pojavljanja mikotoksinov glede na pojav *Fusarium* spp. na lokaciji IOSDV Jable je prikazan v analizi korelacije v pregl. 39 (podrobneje v prilogi D1). Iz nje je razvidno, da je v danem izračunu kritična vrednost korelacijskega koeficienta 0,5140. Vrednosti, ki so enake ali višje od 0,514, nakazujejo statistično značilno povezavo med dvema variablama. Tako je na IOSDV Jable korelacija med gnojenjem z N-min in *Fusarium* spp. na pšeničnem zrnju razvidna le pri kultivarju Reska v letu 2008 ( $r = 0,752$ ), pri kultivarju Savinja pa ta korelacija ni značilna.

Korelacija med N-min in mikotoksinom DON oziroma ZEA je večja kot med N-min in *Fusarium* spp., vendar je dokazana le v letu 2008, in sicer pri obeh kultivarjih. Tako pri kultivarju Reska kontaminacija bele in črne moke z DON značilno korelira z odmerkom N-min (s koeficientom 0,805 oziroma 0,932), mikotoksin ZEA pa značilno korelira z N-min v črni moki istega kultivarja ( $r = 0,835$ ). Pri kultivarju Savinja sta v statistično značilni korelaciji odmerek N in mikotoksin DON v beli in črni moki (0,662 oziroma 0,514).

Korelacija med pojavom *Fusarium* spp. značilno korelira in med mikotoksinoma DON in ZEA je značilna le pri kultivarju Reska v letu 2008, in sicer glede DON v beli in črni moki ( $r = 0,802$  oziroma 0,763), glede ZEA pa v črni moki (0,678).

Preglednica 39: Korelacijska analiza med gnojenjem z N-min in organskimi gnojili ter pojavom *Fusarium* spp. in mikotoksinov pri kultivarjih pšenice Reska in Savinja v IOSDV Jable  
Table 39: Analysis of correlation between fertilization with N-min and organic fertilization and the occurrence of fusariosis and mycotoxins in wheat cultivars Reska and Savinja in IOSDV Jable

N	Variabla											
	Rfus6	Sfus6	Rfus8	RbD8	RčD8	RčZ8	Sfus8	SbD8	SčD8	SbZ8	SčZ8	
1,00	0,470	-0,470	<b>0,752</b>	<b>0,805</b>	<b>0,932</b>	<b>0,835</b>	0,149	<b>0,662</b>	<b>0,514</b>	0,359	0,412	N
	1,000	-0,185	0,458	0,490	<b>0,544</b>	0,497	0,358	0,340	0,462	0,035	0,047	Rfus6
		1,000	-0,356	0,311	0,531	-0,524	0,342	-0,712	-0,595	-0,269	-0,443	Sfus6
			1,000	<b>0,802</b>	<b>0,763</b>	<b>0,678</b>	0,021	0,380	0,449	-0,051	0,092	Rfus8
				1,000	<b>0,918</b>	<b>0,806</b>	0,163	0,446	0,604	-0,183	-0,007	RbD8
					1,000	<b>0,892</b>	0,221	0,714	0,688	0,168	0,308	RčD8
						1,000	0,025	0,743	0,722	0,209	0,192	RčZ8
							1,000	0,332	0,438	-0,215	0,049	Sfus8
								1,000	<b>0,851</b>	0,428	0,473	SbD8
									1,000	-0,102	0,080	SčD8
										1,000	0,706	SbZ8
											1,000	SčZ8

Korelacijski koeficienti, uporabljene observacije 1–15, 5 % kritična vrednost (dvosmerna) < 0,514 za  $n = 15$   
Legenda: Rfus6 = *Fusarium* spp. na Reski v 2006; Sfus6 = *Fusarium* spp. v Savinji 2006; Rfus8 = *Fusarium* spp. na Reski 2008; RbD8 = DON v beli moki Reske v 2008; RčD8 = DON v črni moki Reske v 2008; RčZ8 = ZEA v črni moki Reske v 2008; Sfus8 = *Fusarium* spp. na Savinji v 2008; SbD8 = DON v beli moki Savinje v 2008; SčD8 = DON v črni moki Savinje v 2008; SbZ8 = ZEA v beli moki Savinje v 2008; SčZ8 = ZEA v črni moki Savinje v 2008; N = N-min



Pri kultivarju Savinja med *Fusarium* spp. in DON oziroma ZEA na Jablah ni bilo statistično značilne korelacije. Bila pa je korelacija med pojavom mikotoksina ZEA v črni in beli moki (0,706). Podobno obstaja pri Reski značilna visoka korelacija med DON v beli in črni moki (0,918), med DON v beli in ZEA v črni moki (0,806) in med DON v črni moki in ZEA v črni moki (0,892). Te korelacije kažejo prepletenost vsebnosti mikotoksinov DON in ZEA v beli in črni moki, čeprav pa ta korelacija ne pomeni, da so v absolutnih vrednostih vsebnosti DON in ZEA v beli in črni moki enake.

Iz rezultatov v pregl. 39 lahko izluščimo dejstvo, da je korelacijska povezava med gnojenjem z N-min in pojavom *Fusarium* spp. statistično značilna pri kultivarju Reska, ne pa tudi pri kultivarju Savinja; in ti rezultati so skladni z rezultati v preglednici 9, kjer je razvidno, da sta si kultivarja različna v pogledu interakcije 'kultivar x postopek'. Korelacija med odmerkom N-min in mikotoksinom DON v beli in črni moki je značilna pri obeh kultivarjih, korelacija med N-min in ZEA pa le pri Reski v črni moki. Zanimive so še korelacije med belo in črno moko za DON in ZEA, kjer so te povezave pri kultivarju Reska dokazane za DON in ZEA (korelacija DON v beli moki : DON v črni moki; DON v beli moki : ZEA v črni moki; DON v črni moki : ZEA v črni moki). Pri kultivarju Savinja smo dokazali le pozitivno korelacijo med vsebnostjo DON in ZEA v črni in beli moki.

Preglednica 40: Korelacijska analiza med gnojenjem z N-min in organskimi gnojili ter pojavom *Fusarium* spp. in mikotoksinov DON in ZEA pri kultivarjih pšenice Reska in Savinja na lokaciji IOSDV Rakičan  
Table 40: Analysis of correlation between fertilization with N-min and organic fertilizers as well as the occurrence of *Fusarium* spp. and mycotoxins DON in ZEA in wheat cultivars Reska and Savinja at IOSDV Rakičan

N-min	Variable						Variable
	Rfus6	RčD6	Sfus6	Rfus8	Sfus8	SčZ8	
1,0000	0,438	<b>0,825</b>	0,475	<b>0,661</b>	0,347	0,239	N-min
	1,000	0,415	0,322	0,153	0,496	0,225	Rfus6
		1,000	0,441	0,553	0,430	0,278	RčD6
			1,000	-0,023	-0,022	0,017	Sfus6
				1,000	0,132	0,039	Rfus8
					1,000	0,237	Sfus8
						1,000	SčZ8

Korelacijski koeficienti, uporabljene observacije 1–15; 5 % kritična vrednost (dvosmerna) < 0,514 za n = 15  
Legenda: Rfus6 = *Fusarium* spp. na Reski v 2006; RčD6 = DON v črni moki Reske v 2006; Sfus6 = *Fusarium* spp. na Savinji v 2006; Rfus8 = *Fusarium* spp. na Reski v 2008; Sfus8 = *Fusarium* spp. na Savinji v 2008; SčZ8 = ZEA v črni moki Savinje v 2008

Na lokaciji IOSDV Rakičan med obravnavanimi variantami nismo mogli dokazati tako številnih korelacij kot na Jablah (pregl. 40). Korelacija med gnojenjem z N-min in *Fusarium* spp. je na tej lokaciji značilna le pri kultivarju Reska v letu 2008 ( $r = 0,661$ ), pri Savinji pa v nobenem od obravnavanih let. Korelacija med gnojenjem z N-min in mikotoksinoma DON in ZEA je manj izrazita kot v IOSDV Jable, saj je statistično značilna le pri Reski v letu 2006 v pogledu DON v črni moki: N-min ( $r = 0,825$ ). Iz preglednice 40 izhaja tudi značilna korelacijska povezava med kontaminacijo z DON v črni moki v letu 2006 in kontaminacijo s *Fusarium* spp. pri istem kultivarju v letu 2008. Za to korelacijo pa ni realne znanstvene obrazložitve.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

V obdobju, ko postaja zaradi globalizacije trgovine prehranska varnost prebivalstva v vse večji meri odvisna od zaupanja potrošnika v varnost ponujene hrane, ki lahko pride iz katerega koli območja sveta, je zavedanje in znanje o možnostih za obvarovanje hrane pred škodljivimi vplivi okolja, v katerih je bila pridelana, vse pomembnejše. Pri prehranskih izdelkih, katerih osnova je pšenica, moramo biti pozorni predvsem na nevarnost, da bi bili kontaminirani z mikotoksini, metaboliti glivičnih obolenj, ki jih povzročajo glive iz rodu *Fusarium*. Te se razvijajo, kadar se pojavijo za njihov razvoj ugodne rastne razmere. Čeprav je ena od pomembnih posledic teh obolenj zmanjšanje pridelka, se v tej razpravi dotikamo le vpliva okoljskih razmer na pojav *Fusarium* spp. in mikotoksinov DON in ZEA, ki sta pomembna indikatorja varnosti hrane.

Pšenično zrno je energetsko bogato in sestavljeno sorazmerno harmonično, saj skladiščeno v primerno vzdrževanem skladišču vsebuje 9,5–17,0 % beljakovin, 60–75 % ogljikovih hidratov, 1,5–2,0 % maščob in 13–14 % vode (Tajnšek, 1988). Takšna sestava zrnja predstavlja v ustreznih rastnih razmerah, pri vlagi zrnja nad 15 % in temperaturi nad 10 °C, odličen substrat za razvoj *Fusarium* spp. in sekundarnih produktov njihovega metabolizma, mikotoksinov DON in ZEA. Pri nastanku in razvoju glivičnih bolezni med rastjo pšenice igrata pomembno vlogo temperatura in vlaga.

Od aprila do julija 2006 je bilo v Jablah povprečju 98,5 mm padavin in 15,9 °C, od aprila do julija 2007 je bilo v povprečju 81,5 mm padavin in 16,7 °C, od aprila do julija 2008 pa je bilo povprečno 168,7 mm padavin in 15,9 °C (SURS, 2011). Leta 2006 in 2007 je bilo torej na lokaciji Jable med cvetenjem in zorenjem več suhega obdobja kot v letu 2008. Ker pa je bilo na lokaciji Rakičan v letu 2007 občutno manj padavin kot v letih 2008 in 2006 in je bila na tej lokaciji v letu 2007 značilno manjša kontaminacija kultivarjev s *Fusarium* spp. kot v ostalih letih (pregl. 16), smo na obeh lokacijah leto 2007 izpustili iz obravnave mikotoksinov, saj tudi drugi raziskovalci poudarjajo, da imajo klimatske razmere pomemben vpliv na kontaminacijo z mikotoksini DON in ZEA (Whitlow and Hagler 2009, Prandini in sod., 2009).

V obeh preučevanih letih smo torej odvzeli pridelek vseh parcel (1,0–2,7 kg), ga posušili na 14-odstotno vlago ter ga do nadaljnjih analiz skladiščili na  $T = -20$  °C.

Rezultati, ki smo jih pridobili v raziskavi, kažejo, da je okuženost pšenične moke z mikotoksini odvisna od vseh v raziskavi obravnavanih dejavnikov: od vpliva postopkov pridelovanja, kultivarja in leta pridelave ter vremena. Leto je imelo velik vpliv na pojav DON in ZEA. Ker je eksperiment potekal na isti lokaciji v obeh letih pri istih kultivarjih in po enakih postopkih pridelovanja (glede na intenzivnosti gnojenja), so dopustni pomembni sklepi. Dejstvo, da je na eni lokaciji (IOSDV Jable) prišlo do kontaminacije zrnja z DON in ZEA šele leta 2008 in ne leta 2006, na drugi lokaciji (IOSDV Rakičan) pa je bilo obratno, dokazuje, da ima vreme pomemben vpliv na pojavljanje teh dveh mikotoksinov. Odgovor na to vprašanje brez zasnove tega poskusa na lokaciji dveh trajnih statičnih poskusov ne bi bil možen. Je pa dobljena ugotovitev skladna z neko drugo raziskavo, v

katero je bil vključen vpliv vremena na okužbo pšeničnega zrnja z mikotoksinoma DON in ZEA (Whitlow in Hagler, 2009, Prandini in sod., 2009). Nekateri drugi raziskovalci pa pišejo o vplivu lokacije (Zemljič in sod., 2008), toda njihove ugotovitve lahko obrazložimo tudi z vplivom vremena oziroma vremenskih razmer, ker druga lokacija lahko pomeni tudi druge vremenske razmere.

V naši raziskavi smo ugotovili, da imajo v naših klimatskih razmerah na pojav *Fusarium* spp. in mikotoksinov DON in ZEA večji vpliv padavine kot temperatura. Tako je bila okuženost s *Fusarium* spp. in mikotoksini na lokaciji IOSDV Jable večja v letu 2008 kot v letu 2006, ko okuženosti z DON in ZEA sploh ni bilo. V preglednici 39 so zgoščeni vsi glavni rezultati študije. V obeh letih je bila v ključnih mesecih za razvoj *Fusarium* spp., od aprila do julija, vsota mesečnih temperatur 63,2 °C oziroma 63,8 °C, padavin pa je bilo v istih mesecih leta 2008 za 73 % več kot leta 2006 (679 mm : 393 mm). Na lokaciji IOSDV Rakičan je v obravnavanih letih (2006 in 2008) temperaturna vsota mesecev april, maj, junij in julij znašala 67,7 °C oziroma 68,4 °C, kar predstavlja razliko le 1,0 %, medtem ko je bila količina padavin v istem letnem obdobju leta 2006 (ko je bila pojavnost *Fusarium* spp. značilno večja kot leta 2008; identificiran je bil pojav mikotoksina DON) za 32,4 % višja kot leta 2008 (441 mm : 333 mm), ko mikotoksinov DON in ZEA nismo zasledili, z izjemo mikotoksina ZEA v eni ponovitvi BN2 pri kultivarju Savinja.

Ob primerjavi obeh lokacij, IOSDV Jable in IOSDV Rakičan, lahko sklenemo, da je pojavljanje *Fusarium* spp. na obeh lokacijah pričakovano in možno, in da v tem pogledu nismo mogli zaznati razlike med lokacijama, ugotavljamo pa, da ima pomembno vlogo leto (pregl. 39). Iz številnih raziskav pa izhaja, da razmere, v katerih se lahko kot produkt metabolizma razvijejo mikotoksini, niso povsem razjasnjeni (Jakovac Štrajn, 2008; Spicher 1981).

Spodaj navedeni rezultati dokazujejo, da imajo v obeh danih okoljih pri pojavu *Fusarium* spp. očitno pomembno vlogo padavine in leto, ne pa lokacija. Ti rezultati so v nasprotju z ugotovitvami edine skupine raziskovalcev z območja Slovenije (Zemljič in sod., 2008), ki je doslej preučevala vpliv okolja na pojavljanje *Fusarium* spp. in mikotoksinov, in ki v svoji raziskavi trdi, da ima lokacija pri pojavljanju mikotoksina DON pomembno vlogo. Drugih mikotoksinov, med drugim ZEA, pa v posevkih pšenice, ki so jo analizirali, sploh niso zaznali. Rezultati iste študije so bolj soglasni z nekaterimi drugimi viri, v katerih avtorji ugotavljajo, da so pri pojavljanju mikotoksinov opazna močna nihanja, predvsem v odvisnosti od leta (Hesseltine, 1976). Seveda lahko take rezultate obrazložimo z variabilnostjo temperature in padavin med posameznimi leti na isti lokaciji; tudi če o njih avtorji eksplicitno ne govorijo. Dejstvo je, da je intenzivnost pojavljanja *Fusarium* spp., med drugimi dejavniki, odvisna tudi od padavin in temperatur. Tako upravičeno sklepamo, da sta v primeru, ko prihaja na isti lokaciji v različnih letih do različne kontaminiranosti pšenice s *Fusarium* spp., med pomembnejšimi vzroki za različnost tega pojavljanja različna količina padavin in različna temperatura.

Preglednica 41: Preglednica vplivov postopkov pridelovanja na pojav mikotoksinov DON in ZEA v pšenični moki na lokacijah IOSDV Jable in IOSDV Rakičan (2006 in 2008)

Table 41: Table of impacts of production method on occurrence of mycotoxins DON and ZEA in wheat flour on IOSDV Jable and IOSDV Rakičan (2006 and 2008)

<b>Kultivar</b>	<b>Jable, 2006, DON</b>	<b>Rakičan, 2006, DON</b>
<b>Reska</b>	DON pod mejo detekcije.	<b>Bela</b> moka: DON pod mejo detekcije. <b>Črna</b> moka je kontaminirana z DON: BN2, CN2 značilno višje kot AN0, BN0, CNO; značilna razlika med belo in črno moko.
<b>Savinja</b>	DON pod mejo detekcije.	DON pod mejo detekcije.
<b>Kultivar</b>	<b>Jable, 2006, ZEA</b>	<b>Rakičan, 2006, ZEA</b>
<b>Reska</b>	ZEA pod mejo detekcije.	ZEA pod mejo detekcije
<b>Savinja</b>	ZEA pod mejo detekcije.	ZEA pod mejo detekcije
<b>Kultivar</b>	<b>Jable, 2008, DON</b>	<b>Rakičan, 2008, DON</b>
<b>Reska</b>	<b>Bela</b> in <b>črna</b> moka pri BN2 in CN2 kontaminirana z DON. Med črno in belo moko ni značilne razlike. Razlika med postopki je značilna.	DON pod mejo detekcije.
<b>Savinja</b>	<b>Bela</b> in <b>črna</b> moka pri BN2 kontaminirana z DON; med njima ni značilne razlike. Razlika med postopki je značilna.	DON pod mejo detekcije.
<b>Kultivar</b>	<b>Jable, 2008, ZEA</b>	<b>Rakičan, 2008, ZEA</b>
<b>Reska</b>	<b>Črna</b> moka kontaminirana z ZEA v prvi repetitiji BN0 in vseh treh ponovitvah BN2 in CN2. Bela moka: ZEA pod mejo detekcije.	ZEA pod mejo detekcije.
<b>Savinja</b>	<b>Bela</b> in <b>črna</b> moka pri BN2 in CN2 kontaminirana z ZEA; med BN2 in CN2 stopnjami gnojenja pri črni moki ni razlik. Med belo in črno moko je <b>razlika</b> ; v BN2 je bila značilno manj kontaminirana bela kot črna moka.	<b>Črna</b> moka pri CN2 v eni ponovitvi kontaminirana z ZEA. Bela moka: ZEA pod mejo detekcije.

Kontaminiranost z DON v eni varianti kontrole, to je na eni izmed parcel, ki do leta 2006 že 13 let niso bile gnojene z mineralnim in organskim dušikom, je na prvi pogled presenetljiva, vendar pa so se zaradi osiromašenja tal z dušikom na teh parcelah med pšenico pojavili nekateri pleveli (predvsem njivska preslica – *Equisetum ramosissimum* Desf. in zebnat – *Galeopsis tetrahit* L.). Ti pleveli so zasedli prostor, ki bi sicer ostal prazen zaradi slabe rasti in nerazraščanja pšenice; na tako zasenčenem zemljišču pa se zaradi večje vlažnosti tal in nizke rasti pšenice posledično lahko pojavijo ugodne razmere za razvoj *Fusarium* spp. (Entrup in Oehmichen, 2000).

V raziskavi smo ugotovili, da obstaja med kultivarjema Reska in Savinja značilna razlika glede intenzivnosti in načina pojavljanja *Fusarium* spp. v zrnju. V tem pogledu pa ni samostojne statistično značilne razlike med njima, pač pa je bila na IOSDV Jable ugotovljena interakcija 'kultivar x postopki'. Izkazalo se je, da je bil kultivar Reska v postopkih pridelovanja z organskim gnojenjem A, brez gnojenja z N-min, in v stopnji N1 (postopka CN0 in CN1) manj okužen s *Fusarium* spp. kot Savinja, pri višjih odmerkih N-min pa je bil značilno bolj okužen kot Savinja. V povprečju postopkov, kjer ni upoštevana interakcija 'kultivar x postopki', med njima ni bilo statističnih razlik. Zemljič in sod. (2008), ki so v tem pogledu na Gorenjskem preučevali večje število kultivarjev, a le v enem letu in v enem postopku, ki je po višini pognojena N-min primerljiv z BN2 v obeh naših dolgotrajnih poljskih poskusih, so ugotovili različno okuženost s *Fusarium* spp. pri posameznih kultivarjih. Tudi Aufhammer in sod. (2000) so v svojih poskusih ugotovili statistično značilnost razlik med okuženostjo med posameznimi kultivarji.

Da so kultivarji genetsko različni glede odpornosti na *Fusarium* spp., je splošno znano, pogosto so visoki kultivarji na *Fusarium* spp. klasa (*Fusarium* head blight – HBF) in zrnja bolj odporni kot nizkorastli kultivarji. Vzrok je v biološkem ciklu vrst iz rodu *Fusarium*, katerega hitrejša širjenje je bolj ovirano pri visokorastnih pšeničnih kultivarjih (otežena sekundarna okužba) kot pri nizkih. Zato je eden od kriterijev žlahtnjenja kultivarjev na odpornost proti *Fusarium* spp. tudi žlahtnjenje na večjo višino pšeničnih rastlin. Ta način po drugi polovici 20. stoletja, ko so bili nekaj desetletij zaradi nekritičnega zavzemanja za obilno gnojenje z N-min, »moderni« nizkorastni kultivarji (večja odpornost na poleganje), uporablja vse več žlahtniteljskih hiš. Uvajajo pa tudi druge sodobne oblike žlahtnjenja, s katerimi povečujejo odpornost kultivarjev proti okužbam s *Fusarium* spp. (Bürstmayr, 2012). Preučevana kultivarja Reska in Savinja spadata med srednje visoke do visoke kultivarje pšenice in sta na okužbe s *Fusarium* spp., primerjalno z drugimi kultivarji, sorazmerno odporna.

V dosegljivi literaturi še nihče ni poročal o interakciji 'kultivar x gnojenje' v povezavi s kontaminacijo s *Fusarium* spp., kot jih obravnavamo v iz tej raziskavi. Verjetno je vzrok dejstvo, da je malo raziskav, v katerih raziskovalci za preučevanje odpornosti kultivarjev na *Fusarium* spp. koristijo dolgotrajne statične poljske poskuse (ko se ista parcela skozi dolgoletno obdobje obravnava na enak tehnološki način neodvisno od vrste poljščine oziroma kolobarja). V sorazmerno obširnem pregledu raziskav o trajnih poljskih poskusih (UFZ-Bericht, 1999) ni zaslediti vira, ki bi obravnaval preučevanje mikotoksinov DON in ZEA na takih poskusih.



Preučevanje kontaminiranosti pšenične moke na prisotnost DON in ZEA je omogočilo zanimive rezultate. ZEA je izkazal večjo divergentnost pojavljanja kot DON. Prisotnost mikotoksina ZEA je bila leta 2006 pod mejo zaznavnosti ( $< 5 \mu\text{g kg}^{-1}$  moke) v vseh vzorcih moke pri obeh kultivarjih (Reska in Savinja), tako na lokaciji IOSDV Jable kot IOSDV Rakičan, v letu 2008 pa je bil z ZEA kontaminiran kultivar Reska na lokaciji IOSDV Jable. Istega leta je bila na isti lokaciji z mikotoksinom ZEA kontaminirana tudi Savinja, poleg tega pa je bila Savinja v letu 2008 kontaminirana samo v eni ponovitvi enega postopka pridelovanja tudi na lokaciji IOSDV Rakičan. Na tej lokaciji pa v letu 2008 pri kultivarju Reska kontaminacij z mikotoksinom ZEA nismo zaznali. Zdi se, da je bilo za pojav mikotoksina ZEA ugodno le vreme na lokaciji IOSDV Jable, in sicer v letu 2008.

Med 240 različnimi vzorci pšenice (bela in črna moka s 120 parcel v dveh letih), na katerih smo opravili analizo na prisotnost DON in ZEA, smo lahko zaznali DON v 23 vzorcih (7 v letu 2006 in 16 v letu 2008) in ZEA le v 13 vzorcih (vse v letu 2008). Dokazljiva pogostost mikotoksina ZEA v zrnju in moki pšenice je očitno manjša kot pogostost mikotoksina DON in to kljub dejstvu, da je po uporabljenih metodah določanja mikotoksinov meja zaznavnosti za ZEA 40-krat občutljivejša ( $< 5 \mu\text{g ZEA kg}^{-1}$  moke) kot za DON ( $< 200 \mu\text{g DON kg}^{-1}$  moke).

Po prikazanih rezultatih lahko, skladno z nekaterimi drugimi raziskavami (Zemljič in sod., 2008; Jakovac Štrajn, 2008; Sokolović in Šimpraga, 2006), sklepamo, da je prisotnost mikotoksina ZEA pri zrnju, okuženem s *Fusarium* spp., redkejša kot prisotnost mikotoksina DON in da s pojavom mikotoksina DON ni nujno povezano tudi pojavljanje mikotoksina ZEA.

Doslej smo v razpravi o rezultatih raziskave obravnavali razlike v kontaminaciji z mikotoksini glede na lokacijo, leto in kultivar ter pri tem pregledali pojavljanje mikotoksinov DON in ZEA, nismo pa se posvetili vprašanju količine DON in ZEA v moki. Količina mikotoksinov ima pomembno vlogo pri opredelitvi o tem, ali so izdelki iz moke mikotoksikološko varni ali ne.

Podrobnejši pregled kontaminiranosti zrnja z mikotoksinoma DON in ZEA pokaže, da smo v obeh letih med skupno 240 analiziranimi vzorci pšenične moke našli v IOSDV Rakičan in Jable 36 dokazano kontaminiranih vzorcev: samo z DON 14 vzorcev, samo z ZEA 4 vzorci ter z DON in ZEA hkrati 9 vzorcev. Pri večini smo ugotovili sorazmerno nizko vsebnost DON in ZEA. Z mikotoksinoma DON in ZEA obenem ali s posameznim od njiju je bilo dokazano kontaminiranih 27 (11,5 %) vseh analiziranih osnovnih parcel pšenice. Lahko ocenimo, da je tolikšen delež kar visok. Če upoštevamo prag tolerance  $750 \mu\text{g DON kg}^{-1}$  moke ter  $75 \mu\text{g ZEA kg}^{-1}$  moke za odrasle (Uredba komisije (ES) ..., 2006a), lahko ugotovimo, da v letu 2006 kontaminacija z DON in ZEA v nobenem vzorcu pšenice na nobeni od obeh lokacij ni presegla tolerančnega praga za varno hrano za odrasle. Če pa upoštevamo zahteve oziroma standarde varne hrane za otroke, ki znašajo  $200 \mu\text{g DON kg}^{-1}$  moke in  $20 \mu\text{g ZEA kg}^{-1}$  moke (Uredba komisije (ES) ..., 2006a), pa so bili od 60 vzorcev pšenice, analiziranih v IOSDV Rakičan v tem letu (2006), za otroke primerni prav vsi vzorci, na IOSDV Jable pa je bilo od 60 vzorcev zaradi previsoke vsebnosti DON za otroke neprimernih 7 vzorcev oziroma 11,7 %. Ocenjujemo, da je bil pridelek pšenice leta



2006 v povprečju obeh lokacij (Jable in Rakičan) sorazmerno kakovosten glede na kontaminacijo z mikotoksinoma DON in ZEA, saj je bilo, upoštevaje belo in črno moko, kot varna hrana za otroke neprimernih 5,8 % vzorcev moke.

Leta 2008 je bilo od 120 vzorcev pšenice z lokacij Jable in Rakičan z DON in/ali ZEA okuženih 20 vzorcev oziroma 16,7 % vzorcev pšeničnega zrnja. Od tega je bilo 9 vzorcev kontaminiranih z DON in ZEA hkrati, 7 vzorcev je bilo kontaminiranih samo z DON, 4 vzorci pa so bili kontaminirani samo z ZEA. V letu 2008 je bilo torej precej več dokazanih kontaminacij z DON in ZEA kot leta 2006, ko sicer z ZEA ni bil kontaminiran noben pšenični vzorec. Toda prag dopustne tolerance za kontaminiranost moke za odrasle je bil presežen le v enem vzorcu pšenice, in sicer v letu 2008 v vzorcu, ki je bil preveč kontaminiran tako z DON ( $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$  moke) kot z ZEA ( $79 \mu\text{g kg}^{-1}$  moke) po toleranci za varno hrano, ki velja za odrasle. Ta vzorec je izviral iz pridelka kultivarja Reska, in sicer iz postopka pridelovanja BC2.

Meja dopustne tolerance za kontaminacijo za otroke ( $\geq 200 \mu\text{g DON kg}^{-1}$ ) je pa bila presežena še v 16 vzorcih z DON in v 3 vzorcih z ZEA. V celoti je bilo v letu 2008 z mikotoksinom DON ali ZEA na IOSDV Jable dokazano kontaminiranih 19 pšeničnih vzorcev oziroma 31,7 % vseh jabelskih vzorcev, od tega jih je bilo kot varna hrana za otroke neprimernih 17 vzorcev oziroma 28,3 %. Edini pšenični vzorec, ki je bil v IOSDV Rakičan leta 2008 kontaminiran z enim od preučevanih mikotoksinov, z ZEA, je bil vzorec z  $6 \mu\text{g ZEA kg}^{-1}$  moke, samo za  $1 \mu\text{g ZEA kg}^{-1}$  moke nad pragom detekcije, kar je še v okviru tolerance za varno hrano tudi za otroke.

Razvidno je, da za standardno rabo pšenične moke večina pšeničnih vzorcev obeh kultivarjev izpolnjuje varnostne pogoje moke za krušno rabo, vendar pa to ne velja za otroško hrano. Od 120 analiziranih parcel, ki smo jih opravili v obeh letih, pogojev za varno hrano odraslih ni izpolnjeval le en vzorec kultivarja Reska v Jablah, in sicer v letu 2008, kar je že navedeno. V zvezi z varnostimi zahtevami za otroško hrano pa kar precej vzorcev zahtev za varno hrano s stališča prisotnosti DON in ZEA ni izpolnjevalo. Seveda si tudi odrasli želimo čim bolj zdravo pšenično moko in pekovske izdelke, torej take, ki so kar najbolj brez mikotoksinov, predvsem DON in ZEA, da bi bila njihova škodljivost za človeški metabolizem in organizem kar se da neznatna. V povprečju obeh let pogojev za otroško hrano ni izpolnjevalo pšenično zrnje 24 posejanih parcel, kar predstavlja 10 % vseh vzorcev.

Iz rezultatov raziskave izhaja, da ima pri pridelovanju pšenice pomembno vlogo zavzemanje za mikotoksikološko varno hrano, to v našem primeru pomeni zavzemanje za pridelovanje pšenice s čim nižjo kontaminacijo z DON in ZEA. Tu ima, poleg kolobarja in izbire na *Fusarium* spp. odpornih kultivarjev, ključno vlogo izbor ustreznih postopkov pridelovanja te poljščine. Zato smo v študijo vključili različne postopke pridelovanja pšenice, od takih, ki so po načinu pridelovanja zelo blizu ekološki pridelavi (BN0, CN0) ali pa so kot ničelna kontrola AN0 za primerjavo z ostalimi načini pridelave (AN0 = brez vsakega gnojenja in z odstranjevanjem slame s parcele), saj v te postopke nismo vključili ukrepov intenzivnega pridelovanja poljščin, kot so: škropljenje proti povzročiteljem *Fusarium* spp., gnojenje z N-min in intenzivno varstvo proti plevelom. Z dvema izbranimi postopkoma pridelave (BN2 in CN2), ki smo ju, izmed skupno 10 variant pridelovanja v

obeh trajnih statičnih poljskih poskusih, na Jablah in v Rakičanu, vključili v to raziskavo, smo se skušali približati postopkom srednje intenzivne pridelave, kot jo izvajajo v praksi. Tako diferenciran pristop je omogočil oceno pojavljanja *Fusarium* spp. in mikotoksinov DON in ZEA med različnimi pridelovalnimi postopki.

Rezultati so pokazali, da je v razmerah ekološko primerljivih načinov pridelovanja pšenice že sam napad *Fusarium* spp. na pšenično zrnje pomembno manjši kot v intenzivni pridelavi (preglednici 10 in 17). Med postopki so še izrazitejše razlike v napadu mikotoksinov DON in ZEA (preglednice 22, 25, 27, 35 itd.) na pšenično zrnje. Na drugi strani smo s postopki srednje intenzivne pridelave, s 130 kg ha<sup>-1</sup> N (CN2) oziroma 150 kg ha<sup>-1</sup> N, ki je blizu praksi, dobili statistično značilno višjo kontaminacijo pšenice s *Fusarium* spp. (preglednice 10, 17, 22, 25, 27, 35 itd.) in z eno samo izjemo značilno višjo kontaminacijo moke z mikotoksinoma DON in ZEA. Takih rezultatov v dosegljivi znanstveni literaturi nismo zasledili.

Ker smo pričakovali, da *Fusarium* spp. pri okužbi pšeničnega zrnja ne kontaminirajo v globino enako, ampak se, vsaj pri milejši obliki okužbe, v večji meri zadržujejo na perifernem delu zrna, v perikarpu, alevronskem sloju in embriju, manj pa v meljaku (endospermu), smo pri mletju pšenično moko z ustreznima sitoma separirali v belo moko (tip 405), črno moko (tip 1050) in v otrobe. Slednjih nismo analizirali. Tako smo za vsako od 10 variant pridelovanja (ki smo jih analizirali v treh ponovitvah poljskega poskusa) dobili mikotoksikološke rezultate na DON in ZEA za belo in črno moko.

Na ta način pridobljeni mikotoksikološki rezultati pšeničnega zrnja povedo, da so vzorci moke, ki so bili zmlati iz zrnja parcel, ki že vrsto let niso bile gnojene z N-min, statistično značilno manj kontaminirani s *Fusarium* spp. in pa predvsem z mikotoksinoma DON in ZEA kot parcele, ki so bile gnojene s srednjimi odmerki N-min oziroma v pridelavi po metodah konvencionalnega poljedelstva. Ti rezultati obenem sporočajo, da je lahko na ekološki način pridelana pšenica v smislu kontaminiranosti moke z DON in ZEA prehransko mnogo varnejša kot srednje intenzivni konvencionalni način pridelave pšenice. Ob tem bi bilo zanimivo zvedeti, kakšna bi bila kontaminiranost moke še bolj intenzivne konvencionalne pridelave pšenice, torej AN3, BN3 in CN3 (vsaka od njih z odmerkom 195 kg ha<sup>-1</sup> N-min), ki so tudi obravnavane v obeh trajnih poljskih poskusih, a jih v tej študiji nismo obravnavali, da bi se izognili možnim ekstremnim vrednostim.

Dobljene ugotovitve niso skladne z rezultati npr. Zemljiča in sod. (2008), ki so ugotovili, da gnojenje z dušikom ni vplivalo na stopnjo kontaminacije pšeničnega zrnja z DON ali ZEA. Med vzrokoma, da Zemljičeva skupina ni ugotovila vpliva gnojenja pšenice z dušikom na kontaminacijo zrnja z mikotoksinoma DON in ZEA, sta lahko naslednji dejstvi.

Prvič, v njihovi raziskavi sta bila poljska poskusa enoletna. Pred tem se je na obeh njivah gospodarilo konvencionalno, enovito na intenzivni način. V takem primeru diversificirano (intenzivno, ekstenzivno; v omenjenih poskusih je razlika le 30 kg ha<sup>-1</sup>) gnojenje ne more imeti dovolj velikega vpliva na pojav DON ali ZEA.

Drugič, tudi če bi poskusa trajala dve ali tri leta, je povednost tako zasnovanih poskusov

za preučevanje vpliva intenzivnosti gnojenja z dušikom majhna. Na hektaru njive se pri nas v sloju ornice (25 cm) nahaja 3900–5500 kg N (približno tretjina te substance je v zaprtem naravnem sistemu razgradljive), pretežno vezanega na talno organsko substanco (Tajnšek, 2003). Letno se z mineralizacijo te substance sprosti 50–100 kg ha<sup>-1</sup> N, ki je na razpolago poljščini, tudi če nič ne gnojimo z dušikom. Brez gnojenja z dušikom se šele z leti mineralizacija organske snovi tako zmanjša, da pride gnojenje z dušikom bolj do izraza. Zato dajejo daleč boljše možnosti statični trajni poljski poskusi z diverzificiranimi dušikovimi odmerki, ki vključujejo tudi variante brez gnojenja z dušikom (Smith in sod., 2001).

Mikotoksikološki izvid na belo in črno moko frakcionirane moke je potrdil domnevo, da je bela pšenična moka glede na možno kontaminacijo z DON in ZEA prehransko praviloma varnejša kot črna moka.

Dobljeni rezultati kažejo, da je med proizvajalci kruha in potrošniki splošno razširjeno prepričanje o tem, da so pekovski izdelki iz črne moke bolj zdravi kot izdelki iz bele moke, vsaj v pogledu varnosti pred možno kontaminacijo z mikotoksinoma DON in ZEA, vprašljivo. Utegne biti ravno nasprotno: črna moka je lahko, zaradi večje pogostosti kontaminiranosti s tema mikotoksinoma, prehransko manj varna kot bela. Vsekakor bi bilo smotrno raziskavo s tega stališča nadaljevati in razširiti na več kultivarjev.

Za bolj vsestransko osvetlitev kakovosti pšenične bele, črne in polnozrnate moke iz ekološke pridelave, kar ni bil cilj te naloge, bi bilo smiselno nadaljnje študije razširiti tudi v tej smeri.

## 5.2 SKLEPI

Na temelju dobljenih rezultatov in razprave lahko podamo naslednje zaključke in sklepe.

Na pojav *Fusarium* spp. na pšeničnem zrnju pomembno vpliva kultivar v interakciji z intenzivnostjo pridelave. Kultivar Reska je v razmerah ekstenzivne pridelave (ekološko prijazna pridelava) manj kontaminiran s *Fusarium* spp. kot kultivar Savinja, v razmerah intenzivne pridelave (konvencionalna pridelava) pa je, v primerjavi s kultivarjem Savinja, bolj kontaminiran.

V raziskavi nismo mogli ugotoviti vpliva lokacije na pojav *Fusarium* spp., pač pa je bil ugotovljen vpliv vremenskih razmer, predvsem vpliv količine padavin v rastni dobi pšenice, na pojav *Fusarium* spp.

Lokaciji IOSDV Jable in IOSDV Rakičan sta se glede pojavljanja mikotoksinov DON in ZEA ter vrst rodu *Fusarium* enakovredni, s tem da se je, v odvisnosti od vremenskih razmer na lokaciji, v letu 2006 pojavljala večja kontaminiranost pšeničnega zrnja v IOSDV Rakičan, v letu 2008 pa v IOSDV Jable.

Na pojav *Fusarium* spp. in mikotoksinov v zrnju vpliva, poleg postopkov pridelovanja, predvsem količina padavin v času pomladanske rasti pšenice, to je od aprila do julija, v

danih razmerah pa nismo mogli ugotoviti, kako na pojav mikotoksinov vpliva temperatura. Večja količina padavin v tem obdobju (april–julij) pospešuje pojav *Fusarium* spp., v primerjavi z manjšo količino padavin. V letih 2006 in 2008, ko sta potekala poskusa in smo analizirali vpliv pojavljanja *Fusarium* spp. in DON in ZEA v zrnju v različnih postopkih pridelovanja, je bila temperatura na vsaki od obeh lokacij skoraj identična, količina padavin pa zelo različna. Na Jablah, kjer v letu 2006 ni bilo pojava DON in ZEA, je bila količina padavin za 73 % nižja kot v letu 2008, v Rakičanu pa je bilo obratno: v letu 2006 je bilo v obdobju od aprila do julija za 32,4 % več padavin, pojavljal se je tudi mikotoksin DON, medtem ko ga v letu 2008, ko je bilo manj padavin, nismo zaznali.

Intenzivnost v obravnavo vključenih postopkov pridelave, ki jih lahko opredelimo kot ekstenzivne (ekološko prijazne) in srednje intenzivne (konvencionalne) sisteme, je pomembno vplivala na pojav *Fusarium* spp., zlasti mikotoksinov v pšeničnem zrnju oziroma v moki. V pridelavi brez gnojenja z N-min, v ekološko prijazni pridelavi (BN0, CN0) in v kontroli (AN0) je bila okuženost zrna z mikotoksina DON in ZEA pomembno manjša kot v srednje intenzivnih sistemih konvencionalne pridelave (BN2 in CN2).

Pojavnost mikotoksina DON je bila pogostejša kot pojavnost mikotoksina ZEA, oba pa sta se, z eno izjemo (v eni ponovitvi kontrole AN0 v IOSDV Jable) pojavljala le v intenzivnih postopkih pridelave (BN2, CN2). Pri tem je bilo pojavljanje mikotoksina DON pogostejše kot pojavljanje mikotoksina ZEA. Pojavljanje mikotoksina ZEA v pšeničnem zrnju je sorazmerno neodvisno od pojavljanja mikotoksina DON.

Mletje moke v belo in črno je pomembno vplivalo na različno okuženost moke z mikotoksina DON in ZEA v vzorcu. V nobenem primeru bela moka z mikotoksina DON in ZEA ni bila značilno bolj okužena kot črna moka, nasprotno pa je bila v večini postopkov pridelave črna moka značilno bolj okužena z DON in ZEA kot bela moka. Takšni rezultati dopuščajo sklep, da črna moka v mikotoksikološkem pogledu, zlasti glede okuženosti z DON in ZEA, ni bolj zdrava kot bela moka, temveč je v tem pogledu celo manj varna. Ker pa v dosegljivih virih ni ustreznih podatkov oziroma raziskav o tem pojavu, bi bilo treba pred dokončnimi sklepi navedena dejstva še dodatno preučiti.

Pri priporočilu o najprimernejšem načinu pridelave je treba poleg varstva pred *Fusarium* spp. in mikotoksini upoštevati še mnoge druge vidike, ki jih v raziskavi nismo obravnavali. S stališča odpornosti kultivarjev na pojav *Fusarium* spp. in mikotoksinov DON in ZEA sklepamo, da sta oba obravnavana kultivarja precej resistantna, vendar dajemo zaradi večje odpornosti kultivarja Savinja na *Fusarium* spp. pri višjih odmerkih N-min in nekaj manjše kontaminacije z DON in ZEA, v primerjavi s kultivarjem Reska (Reska: 25 kontaminiranih vzorcev, 18 z DON in 7 z ZEA; Savinja: 11 kontaminiranih vzorcev, 5 z DON in 6 z ZEA), prednost kultivarju Savinja. Za oba kultivarja bi priporočali tudi gnojenje z nizkimi odmerki N-min in organsko gnojenje (slama ali gnoj), kar pride v poštev zlasti pri okolju prijazni pridelavi pšenice.

Z raziskavo smo ugotovili korelacijsko povezavo med gnojenjem z N-min in pojavom *Fusarium* spp., DON in ZEA pri pšenici. Korelacija med N-min in *Fusarium* spp. oziroma DON in ZEA je pogojena z vremenom (leto!) in kultivarjem, saj se je izraziteje pojavila le

v IOSDV Jable v enem letu (2008), in sicer tako pri kultivarju Reska kot Savinja.

Korelacija med N-min in mikotoksinoma DON in ZEA je tesnejša kot med N-min in *Fusarium* spp., saj se pojavlja pri obeh kultivarjih, vendar v IOSDV Rakičan le pri kultivarju Reska v letu 2006. V letu 2008 pa obstaja pri obeh kultivarjih statistično značilna pozitivna korelacija med odmerkom N-min in pojavom DON in ZEA v IOSDV Jable ne pa tudi v IOSDV Rakičan, kar pa je pričakovano, ker je bila v tem letu na tej lokaciji le ena zaznavna kontaminacija z mikotoksinom (ZEA).

## 6 POVZETEK (SUMMARY)

### 6.1 POVZETEK

Odkar so Morooka in sod. leta 1972 odkrili mikotoksina deoksinivalenol (DON) in zearalenon (ZEA) kot produkta metabolizma gliv iz rodu *Fusarium* spp. (*F. graminearum*, *F. culmorum* itd.), sta navedena mikotoksina deležna velike pozornosti v tehnologiji pridelovanja hrane in krme. Pod določenimi pogoji se DON in ZEA pojavljata v žitnem zrnju, predvsem pri pšenici, ječmenu in koruzi. Ob preveliki vsebnosti v žitnih proizvodih navedena mikotoksina povzročata pri živalih, zlasti pri prašičih, motnje v presnovi in pri reprodukciji. Podobne težave so opazili pri prehrani ljudi, zato je Evropska unija leta 2006 uvedla uredbo o najvišjih dovoljenih vsebnostih navedenih mikotoksinov v živilskih proizvodih. Od takrat poteka tudi monitoring kontaminiranosti žitnega zrnja in izdelkov iz žita. V pšeničnem zrnju je dopustna vsebnost DON v prehrani odraslih ljudi  $750 \mu\text{g kg}^{-1}$ , za ZEA pa je najvišja dopustna vsebnost  $75 \mu\text{g kg}^{-1}$  proizvoda. Za prehrano otrok so merila strožja, dopustnih je manj kot  $200 \mu\text{g kg}^{-1}$  za DON in  $20 \mu\text{g kg}^{-1}$  za ZEA (Uredba komisije (EU) ..., 2006a). Opravljene so bile številne raziskave, ki obravnavajo pojavljanje mikotoksinov v žitnem zrnju, otrobih in moki, v odvisnosti od količine padavin, kolobarjenja in kultivarja pšenice. V literaturi ne najdemo relevantnih raziskav, ki bi obravnavale vpliv obdelovalnih postopkov na pojavljanje *Fusarium* spp. in mikotoksinov v različnih frakcijah pšenične moke.

Cilj te raziskave je bil preučiti pojav mikotoksinov DON in ZEA v različnih obdelovalnih postopkih, na različnih lokacijah in pri različnih kultivarjih. V ta namen sta bila uporabljena objekta dveh trajnih poljskih eksperimentov, in sicer IOSDV Jable pri Ljubljani in IOSDV Rakičan pri Murski Soboti. Oba eksperimenta se izvajata od leta 1992 in potekata na zelo različnih tleh (na Jablah na globokih meljasto ilovnatih tleh; težja izprana tla, v Rakičanu pa na ilovnato meljastih tleh; lažja tla). Različne so tudi klimatske razmere: za IOSDV Jable je značilna predalpska klima s povprečno letno temperaturo  $9,4 \text{ }^\circ\text{C}$  in letno količino padavin  $1345 \text{ mm}$ , a s tendenco naraščanja; v Rakičanu je povprečna letna temperatura višja, in sicer  $10,5 \text{ }^\circ\text{C}$ , letna količina padavin pa nižja,  $783 \text{ mm}$ , v obdobju 1993–2010 je bila v povprečju konstantna. Oba poljska poskusa se izvajata v kolobarju koruza / ozimna pšenica / ozimni ječmen (Rakičan) oziroma oves (Jable). Vse tri poljščine se obravnavajo vsako leto v 10 različnih pridelovalnih postopkih, vsak od njih v treh ponovitvah. Vsaka osnovna parcela ( $30 \text{ m}^2$ ) je ves čas izvajanja eksperimenta, od leta 1992 dalje, obdelovana na enak način. Za namene naše raziskave smo izbrali obdobje 2006 do 2008, ko parcele v obeh poskusih za namene te raziskave niso bile tretirane z nobenim fungicidom. Pojav *Fusarium* spp. smo ugotavljali vsa tri leta v vseh 10 postopkih pridelave na obeh lokacijah, in to z dvema kultivarjema pšenice, Resko in Savinjo. Kontaminiranost zrnja z mikotoksinoma DON in ZEA smo preučevali v izbranih 5 postopkih, z vsemi tremi ponovitvami v vsakem posameznem postopku in z obema kultivarjema pšenice. Kontrolni postopek A0 je postopek brez vsakega dodajanja N-min (tako organskega kot anorganskega), postopek B0 vsebuje samo organsko gnojenje s hlevskim gnojem ( $100 \text{ dt}^{-1}$ ), postopek C0 pa izključno podoravanje slame in koruznice, ki je zrasla na teh parcelah in s podsevkom oljne redkve pred setvijo koruze. Ta dva postopka sta blizu ekološki pridelavi, zadnja dva izbrana postopka, BN2 in CN2, pa sta srednje



intenzivna postopka konvencionalne pridelave. Količina organskih gnojil v teh dveh postopkih je enaka kot v postopkih B0 in C0, vendar so pri njih parcele v teh postopkih dodatno pognojene s 147 kg N-min ha<sup>-1</sup> v povprečju kolobarja, medtem ko je sami pšenici pognojeno s 130 kg N-min ha<sup>-1</sup>.

Pri pridelkih pšenice z vseh parcel smo izmerili vlago, zrnje smo posušili v sušilniku pri 55–60 °C do 13-odstotne vlažnosti in ga nato uskladiščili pri –20 °C do uporabe.

V prvi fazi smo ugotavljali delež zrn s *Fusarium* spp., tako da smo po 50 zrn iz vsake ponovitve inkubirali na sterilnem agarju iz krompirjeve dekstroze (PDA) pri 21 °C v kalilni v omari, 12 ur na svetlobi, 12 ur v temi. Po 4–5 dnevih smo ugotavljali odstotek razvitih fuzarioz na zrnju. Pojav *Fusarium* spp. smo s pomočjo statistične analize primerjali z vremenskimi pojavi, kultivarjema in postopki pridelave v obdobju 3 let. Glede na intenzivnost gnojenja se je pokazala statistična interakcija med kultivarjema Reska in Savinja. Pri postopkih brez gnojenja ali z nižjimi odmerki gnojenja z N-min je bila manj kot Savinja okužena Reska, pri višjih odmerkih N-min pa je bila bolj kot Savinja okužena Reska. V letih 2006 in 2008 je bilo več okuženih zrn kot v letu 2007, zato smo za nadaljnjo analizo mikotoksinov DON in ZEA izbrali leti 2006 in 2008. Odločili smo se, da bomo ugotavljali vsebnost mikotoksinov v beli in v črni moki, zato smo vsak vzorec pridelka v posameznem postopku moko zmleli na mlinu Brabender.

Namleli smo po 120–130 g bele moke tipa 405 in črne moke tipa 1050 ter otrobe, ki pa jih nismo analizirali. Tako smo dobili 240 vzorcev za laboratorijsko analizo vsebnosti mikotoksinov DON in ZEA. Vzorce moke smo poslali v analizo v referenčni laboratorij nemške zvezne dežele Reinland-Pfalz v Speyerju (LUFAS Speyer, vodja inštituta je prof. dr. Franz Wiesler, predsednik Zveze nemških kmetijskih raziskovalnih in preskuševalnih ustanov VDLUFA). Za ugotavljanje vsebnosti mikotoksina DON so uporabili metodo ELISA LUFAS SP 22005, za ZEA pa metodo ELISA LUFAS SP 22006. Obe metodi temeljita na kompetitivnem imunološkem postopku, kjer določen antigen reagira z na trdnem nosilcu vezanimi znanimi protitelesi ter po dodatku vzorca s vsebovanim preiskovanim antigenom po odstranitvi antigenov in dodatku specifičnih protiteles ob prisotnosti encima vzorec razvije barvo, katere intenziteta je sorazmerna z vsebnostjo preiskovanega mikotoksina.

Za analizo variance smo dobljene podatke ustrezno transformirali, da smo jih približali naravni distribuciji, na podlagi katere je možna statistična analitična obdelava podatkov.

Rezultati so pokazali, da na pojav in vsebnost mikotoksinov lokacija ni imela vpliva, pač pa so nanj vplivale vremenske razmere, predvsem količina padavin v času pomladanske rasti pšenice, to je od aprila do julija. V danih razmerah nismo mogli ugotoviti, kako na pojav mikotoksinov vpliva temperatura, ker je bila v obeh obravnavanih letih v obdobju od aprila do julija temperaturna vsota na vsaki od obeh lokacij praktično enaka (67,7 °C oziroma 68,4 °C v Rakičanu in 63,2 °C oziroma 63,8 °C na Jablah). Pač pa je bila v tem obdobju na vsaki od obeh lokacij v obeh letih zelo različna količina padavin. Tako jih je bilo na lokaciji Rakičan leta 2006 za 32,4 % več kot leta 2008, na Jablah pa jih je bilo leta 2008 v obdobju april–julij za 73 % več kot leta 2006. Sorazmerno s takšnim vremenskim potekom se je pojavila v Rakičanu leta 2006 kontaminacija z mikotoksinom DON, in sicer

v črni moki kultivarja Reska, kjer je bila v konvencionalnih postopkih pridelovanja (BN2, CN2) značilno višja kot v beli moki in v ekološko prijaznih postopkih (BN0, CN0) ter kontroli (AN0).

Skladno z manjšo količino padavin na lokaciji Jable leta 2006, v primerjavi z letom 2008, ni bilo v tem letu pri nobenem kultivarju kontaminacije z mikotoksinoma DON in ZEA, leta 2008 pa je bila pri obeh kultivarjih kontaminacija z DON in ZEA. Pri kultivarju Reska se je DON pojavljal v postopkih pridelovanja BN2 in CN2. Med belo in črno moko ni bilo značilnih razlik, je pa bila kontaminacija z DON značilno nižja (oziroma je bila pod mejo zaznavnosti) pri BN0, CN0 in AN0 kot pri BN2 in CN2. Pri istem kultivarju se je na Jablah pojavljal mikotoksin ZEA v črni moki v postopkih pridelovanja BN2 in CN2 in v eni ponovitvi AN0. V beli moki pojava ZEA nismo zaznali.

Pri kultivarju Savinja je bilo z mikotoksinom ZEA kontaminirana moka v postopku BN2 in CN2, in sicer bela in črna moka. Bela moka pa je bila značilno manj kontaminirana kot črna moka.

V Rakičanu v letu 2008 ni bil z mikotoksinom DON kontaminiran noben kultivar, z mikotoksinom ZEA pa le ena ponovitev, in sicer črna moka postopka CN2.

Iz rezultatov raziskave še razberemo, da so ekstenzivni postopki pridelave pšenice v kolobarju (BN0 in CN0) prehransko varnejši kot intenzivni postopki, saj pri njih mikotoksinov DON in ZEA skoraj nismo zaznali; in da lahko domnevamo, da je bela moka v pogledu možnosti za kontaminacijo z mikotoksinoma DON in ZEA prehransko varnejša kot črna moka. Ta trditev pa ni skladna s splošno razširjenim prepričanjem, da je črna moka po vseh kriterijih bolj zdrava kot bela moka.

Na koncu lahko tudi sklenemo, da je bila moka obeh kultivarjev na obeh lokacijah v pogledu kontaminiranosti z mikotoksinoma DON in ZEA sorazmerno varna, saj je bilo od skupno 240 analiziranih vzorcev pšenice z obema, enim ali drugim mikotoksinom kontaminiranih 27 (11,25 %) osnovnih parcel pšenice, od tega je en vzorec glede na vsebnost mikotoksinov DON in ZEA v moki presegel mejo varne hrane za odrasle (črna moka kultivarja Reska na lokaciji Jable; prekoračitev dopustne meje s kontaminacijo 1000  $\mu\text{g DON kg}^{-1}$  in 79  $\mu\text{g ZEA kg}^{-1}$ ).

Meja dopustne tolerance za kontaminacijo moke za otroke ( $\geq 200 \mu\text{g DON kg}^{-1}$  ali  $\geq 20 \mu\text{g ZEA kg}^{-1}$  pšenične moke) je bila v obeh letih presežena še v 16 vzorcih samo z mikotoksinom DON, v 2 vzorcih z DON in ZEA hkrati ter v enem vzorcu samo z mikotoksinom ZEA.

V celoti je bilo v letu 2008 z mikotoksinom DON ali ZEA na IOSDV Jable dokazano kontaminiranih 19 oziroma 31,7 % od vseh jabelskih vzorcev pšenice v tem letu. Edini pšenični vzorec, ki je bil v IOSDV Rakičan leta 2008 kontaminiran z enim od preučevanih mikotoksinov, ZEA, je bil vzorec s 6  $\mu\text{g ZEA kg}^{-1}$  moke, samo za 1  $\mu\text{g ZEA kg}^{-1}$  moke nad pragom detekcije, kar je še v okviru tolerance za varno hrano tudi za otroke.

Multipla korelacijska analiza je za IOSDV Jable pokazala značilno pozitivno povezavo med gnojenjem z N-min oziroma intenzivnostjo pridelave in pojavom gliv rodu *Fusarium* (pri kultivarju Reska v letu 2008) in mikotoksinov DON in ZEA (v letu 2008 pri Reski in Savinji) ter med pojavom *Fusarium* spp. in prisotnostjo DON in ZEA v moki (Reska). Korelacije so znatno izrazitejše v IOSDV Jable kot v IOSDV Rakičan, kjer je zaznana značilna korelacija le med gnojenjem z N-min in *Fusarium* spp. pri kultivarju Reska (2008) ter gnojenjem z N-min in DON v črni moki kultivarja Reska.

## 6.2 SUMMARY

Since mycotoxin deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZEA) as a product of secondary metabolism of *Fusarium* spp. (*F. graminearum*, *F. culmorum*, etc.) were discovered in 1972 by Morooka et al., they received a lot of attention in the technology of food and feed production. Under certain conditions those mycotoxins are occurring in cereal grains, especially in wheat, barley and maize. Too high content of these mycotoxins in cereal products lead to a serious disturbance in the nutrition and reproduction in animals, especially in pigs. Similar problems have been observed in human consumption, accordingly in 2006 the European Union introduced a maximum allowed content of these mycotoxins in food products. From then on, monitoring the degree of contamination with mycotoxins ZEA and DON in cereal grains and cereal products has been carried out. Permissible concentration of DON in the wheat grain and meal in the diet of adults is 750 g DON kg<sup>-1</sup>, and for ZEA, the maximum permissible concentration of 75 µg ZEA kg<sup>-1</sup> of meal. For children there are more stringent criteria, less than 200 µg DON kg<sup>-1</sup> and less than 20 µg ZEA kg<sup>-1</sup> is allowed. There were many studies addressing occurrence of mycotoxins in cereal grains, bran and flour, depending on the rainfall, crop rotation and cultivar. The literature does not find relevant research to address the impact of treatments on the occurrence of *Fusarium* spp. mycotoxins in wheat grain and flour of different fractions.

The aim of our study was to investigate the emergence of the mycotoxin DON and ZEA using differing methods of wheat production, in different locations and with different cultivars. For this purpose we used two existing long term field experiments, namely IOSDV Jable near Ljubljana and IOSDV Rakičan near Murska Sobota. Both trials have been operating since 1992 and take place on a very different ground (in Jable on deep silt loam soils which is heavy washed ground; in Rakičan on silty loam soil; lighter soil). Both locations have different climatic conditions: for IOSDV Jable the climate is typically Alpine, with an average annual temperature of 9.4 °C and annual rainfall of 1345 mm and showing an upward trend; Rakičan has a higher average annual temperature of 10.5°C and a lower annual rainfall of 783 mm. Both field trials were carried out in rotation maize - winter wheat - winter barley (Rakičan) and oats (Jable). All three crops are produced each year in 10 different production methods, each in triplicate. Each plot is cultivated in the same way for the entire period of the trial since 1992. For the purposes of our research we chose the period 2006 to 2008. The emergence of *Fusarium* spp. was found in each experimental year for all 10 production procedures at both locations, and for the two cultivars of wheat, Reska and Savinja. The contamination of grain with mycotoxins DON and ZEA were studied with five selected method, three replications in each case and two

cultivars of wheat. The control procedure A0 is without any addition of nitrogen (both organic and inorganic), while B0 is the only procedure with organic fertilization with manure (100 dt ha<sup>-1</sup>), and C0 is the only method where straw and maize bark, that previously grew on these plots, were ploughed in together with the undergrowth of oil radish which was sown before the maize. These methods are close to an organic production, while the last two selected methods, BN2 and CN2, are medium-intensive conventional production methods. The quantity of organic fertilizer in these two methods is the same as the methods B0 and C0, but the plots in these methods were further fertilized with 147 kg N-min ha<sup>-1</sup> in the average rotation, while the wheat itself was fertilized with 147 kg N-min ha<sup>-1</sup>.

The wheat crops from all plots underwent measurement of moisture, the grain was dried in an oven at 55-60 °C at 13 % humidity, and then placed in storage at -20 °C until use.

In the first phase, we determined the proportion of grains with *Fusarium* spp. by placing 50 grains from each replication onto a PDA in an incubator at 21-23 °C, 12 hours light, 12 hours dark. After 4-5 days we determined by the use of an optical microscope the percentage of kernels with developed *Fusarium* spp. The emergence of *Fusarium* spp. was reported using statistical analysis to compare the weather conditions, cultivars and production methods. The intensity of fertilization reveals a statistical interaction between the cultivars of Reska and Savinja at IOSDV Jable. In the method without fertilization or with lower doses of N-min, Savinja was less infected than Reska, at higher doses of N-min Reska was more infected than Savinja. In 2006 and 2008 there were more infected kernels than in 2007, so we selected years 2006 and 2008 for further analysis of DON and ZEA determination. We decided to analyse the mycotoxin content in white and dark flour, and to grind a sample from each crop in a Brabender mill.

We ground 120-130 g white flour (type 405), dark flour (type 1050), and bran which was not analyzed. We had 240 samples of wheat grains for laboratory analysis containing mycotoxins DON and ZEA. Flour samples were sent for analysis to the reference laboratory of Speyer (Reinland – Palatinate, Germany). For the determination of the presence of mycotoxin DON the method ELISA LUFA SP 22005 was used, and for ZEA the method ELISA LUFA SP 22006. Both methods are based on the competitive immunological process, where specific antigen reacts with the known solid phase bound antibodies, and after adding the sample it reacts with the investigated antigen. After the removal of unbound antigens and the addition of specific antibodies the presence of the enzyme pattern develops colour the intensity of which is proportional to the content of the investigated mycotoxins.

For the analysis of variance the data were transformed, so as to bring data closer to the natural distribution on which analysis of variance is possible. The results showed that for the appearance and content of mycotoxins location had no effect, but that the influence came from weather conditions, especially rainfall during the growth of spring wheat, from April to July. In the given circumstances we were not able to determine the impact of temperature to the occurrence of mycotoxins, as in these two years in the period from April to July the average temperature in each of the two locations was practically the same (67.7 °C and 68.4 °C in Rakičan and 63.2 °C and 63.8 °C in Jable). During this period of

two years the rainfall was varied on both locations. On IOSDV Rakičan in 2006 the rainfall was 32.4 % higher than in 2008, and on IOSDV Jable in 2008 during April - July it was 73 % higher than in 2006. On the location Rakičan, such weather pattern had an impact on the occurrence of contamination with mycotoxin DON in dark flour variety of Reska, and the contamination was significantly higher in conventional production methods (BN2, CN2) than in white flour and ecologically friendly methods (BN0, CN0) and control (AN0).

In accordance with the small amount of precipitation at IOSDV Jable in 2006, and compared to 2008, there was no contamination with mycotoxins DON and ZEA in this year in any variety, whereas in 2008 both cultivars were contaminated with DON and ZEA. In the variety of Reska DON appeared in the production method BN2 and CN2. There was no significant difference between dark and white flour, whereas contamination with DON was significantly lower (or was below the limit of detection) in BN0, CN0 and AN0 than in BN2 and CN2. Mycotoxin ZEA has also appeared in the same cultivar at Jable in dark flour production methods BN2 and CN2, and in one sample AN0. In white flour we did not detect the occurrence of ZEA.

In cultivar Savinja mycotoxin ZEA contaminated the methods BN2 and CN2 in dark and white flour. White flour was significantly less contaminated than dark flour.

At Rakičan in 2008 mycotoxin DON did not contaminate any cultivar, whereas with ZEA only one sample was contaminated, namely dark flour method CN2.

The results of the research reports that the extensive production method of wheat in rotation (BN0 and CN0) is safer for food supply than intensive methods as evidence of mycotoxins DON and ZEA are almost undetected; white flour is less contaminated with mycotoxin DON and ZEA and safer for food supply than dark flour. This finding is not consistent with the widespread belief that the dark flour is healthier than white flour.

Finally, we can also conclude that the flour of both cultivars at both locations in respect of contamination with mycotoxin DON and ZEA is relatively safe. From a total of 240 wheat samples analyzed with both, one or the other, mycotoxin contaminated 27 (11.25%) basic parcels of wheat. There was only one sample (dark flour of cultivar Reska on IOSDV Jable, exceeding the allowable limits of the contamination 1000  $\mu\text{g}$  DON  $\text{kg}^{-1}$  and 79  $\mu\text{g}$  ZEA  $\text{kg}^{-1}$  flour), which depended on the content of mycotoxins DON and ZEA together that exceeded the limit of safe food for adults.

The permissible limit of tolerance for contamination for children (more than 200  $\mu\text{g}$  DON  $\text{kg}^{-1}$  or more than 20  $\mu\text{g}$  ZEA  $\text{kg}^{-1}$  wheat flour) was exceeded in the two years in 16 samples with mycotoxin DON, in 2 samples with DON and ZEA together, and in one sample of mycotoxin ZEA.

Overall, in 2008 at IOSDV Jable for mycotoxin DON or ZEA it was proven that there were 19 contaminated wheat samples, or 31.7 % of all samples taken that year. The only wheat sample contaminated at IOSDV Rakičan in 2008 was contaminated with mycotoxins ZEA,

the sample had 6  $\mu\text{g ZEA kg}^{-1}$  flour, which is only 1  $\mu\text{g ZEA kg}^{-1}$  flour above the threshold of detection, and is still within the tolerance of food safety for children.

Multiple correlation analysis showed statistically significant link on IOSDV Jable between fertilisation with N-min and the occurrence of *Fusarium* spp. (at cultivar Reska in the year 2008) and mycotoxins DON and ZEA (in the year 2008 at both cultivars, Reska and Savinja). The correlation was also found between the occurrence of *Fusarium* spp. and the contamination of flour with mycotoxins DON and ZEA (at Reska cultivar). Correlations were stronger at the location IOSDV Jable than at the location IOSDV Rakičan, where only the correlation between N-min fertilisation and *Fusarium* spp. at cultivar Reska (2008) and fertilization with N-min and the occurrence of mycotoxin DON in dark flour was found.



## 7 VIRI

- Abildgren M. P., Lund F., Thrane U., Elmholt SW. 1987. Czapek-Dox agar containing iprodione and dichloran as a selective medium for the isolation of *Fusarium* species. *Letters in Applied Microbiology*, 5: 83–86
- Aldred D., Magan N. 2004. Prevention strategies for trichothecenes. *Toxicology Letters*, 153: 165–171
- Antonacci L., Salvat A. E., Faifer C., Godoy J. M. 1999. Suppression of spore germination and aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus* during and after exposure to high levels of phosphine. *Mycopathologia*, 147: 83–87
- Atalla M. M., Hassaneim N. M., El-Beith A. A., Youssef Y. A. 2003. Mycotoxin production in wheat grains by different *Aspergilli* in relation to different relative humidities and storage periods. *Nahrung*, 47: 6–10
- Atroshi F., Rizzo A., Westermack T., Ali-Vehmas T. 2002. Antioxidant nutrients and mycotoxins. *Journal of Toxicology*, 180: 151–167
- Aufhammer W., Köbler E., Kaul H. P., Hermann W., Höhn D., Cuilin Y-I. 2000. Ehrenbefall mit *Fusarium* (*F. greaminearum*, *F. culmorum*) und Deoxynivalenolgehalt im Korngut von Winterweizen in Abhängigkeit von der N-düngung. *Pflanzenwissenschaften*, 4, 2: 72–78
- Aziz N. H., Attia E. S., Farag S. A. 1997. Effect of gamma-irradiation on the natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins in wheat, flour and bread. *Nahrung*, 41: 34–37
- Aziz N. H., Moussa L. A. A. 2002. Influence of gamma-radiation on mycotoxin producing moulds and mycotoxins in fruits. *Food Control*, 13: 281–288
- Backhouse D., Burgess L. W., Summerell B. A. 2001. Biogeography of *Fusarium*. V: *Fusarium* – Paul E. Nelson memorial symposium. Summerell B. A., Leslie J. F., Backhouse D., Burgess W. L. (eds.). St. Paul Minnesota, American Phytopathological Society Press: 124–139
- Batish V. K., Roy U., Grover S. 1997. Antifungal attributes of lactic acid bacteria: A review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 17, 3: 209–225
- Bauer J., Böhm J., Dänicke S., Van Egmond H. P. 2003. Mycotoxins. V: Opinion of the Scientific Committee on animal nutrition on undesirable substances in feed. Brussels, European Commission, Health & Consumer Protection Directorate: 25–38  
[http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scan/out126\\_bis\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scan/out126_bis_en.pdf) (September 2011)
- Benford B., Boyle C., Dekant W., Fuchs R., Gaylor D.W., Hard G., McGregor D. B., Pitt J. I., Plestina R., Shephard G., Solfrizzo M., Verger M. J. P., Walker R. 2001. Ochratoxin A: Safety evaluation of certain mycotoxins in food. WHO Food Additives

Series, 47. Geneva, World Health Organisation: 147 str.

Binder E. M., Tan L. M., Chin L. J., Handl J., Richard J. 2007. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities feeds and feed ingredients. *Animal Feed Science and Technology*, 137: 265–282

Bočarov Stančić A. 1996. The influence of ecological and other factors on distribution of molds and mycotoxins in cereals and possibility of their decontamination. Ph. D. Thesis. Novi Sad, University of Novi Sad, Faculty of Agriculture: 137 str.

Boenisch M. J., Schäfer W. 2011. *Fusarium graminearum* forms mycotoxin producing infection structures on wheat. *BMC Plant Biology*, 11:110, doi:10.1186/471-2229-11-110: 13 str.

Bottalico A. 1998. *Fusarium* diseases of cereals: Species complex and related mycotoxin profiles in Europe. *Journal of Plant Pathology*, 80: 85–103

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

Bullerman L. B. 2003. Mycotoxins. V: *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. Vol. 6. 2<sup>nd</sup> ed. Caballero B., Trugo L. C., Finglas P. M. (eds.). Amsterdam, Academic Press: 4080–4108

Bürstmayr H. 2012. *Fusarium* head blight resistance in modern winter wheat: association of plant morphological traits with resistance and relation of resistance to *F. graminearum* with resistance to *F. sporotrichioides*. V: 63. Pflanzenzüchertagung in Gumpenstein, 19.–21. november 2012. Druck, Verlag und C.: 12 str.

Candlish A. A. G., Smith J. E., Stimson W. H. 1989. Monoclonal antibody technology for mycotoxins. *Biotechnology Advances*, 7: 401–418

Casteel S.W., Rottinghaus G.E. 2000. Mycotoxicoses. V: *Encyclopedia of microbiology*. Vol. 3. 2<sup>nd</sup> ed. Lenderberg J. (ed.). San Diego, Academic Press: 337–348

Chatterjee D., Mukherjee S. K. 1994. Contamination of Indian maize with fumonisin B<sub>1</sub> and its effects on chicken macrophage. *Letters of Applied Microbiology*, 18: 251–253

Chelkowski J. 1989. *Fusarium*: mycotoxins, taxonomy, and pathogenicity. Amsterdam, Elsevier: 492 str.

Codex Alimentarius Commission. 2000. Position paper on zearalenone. CX/FAC 00/19. Joint FAO/WHO Food Standards Programme. Thirty-second Session Beijing, People's Republic of China, 20–24 March 2000. Rome, Codex Committee on Food Additives and Contaminants: 5 str.

[https://apps.who.int/fsf/Chemicalcontaminants/zearalenonePP00\\_19.pdf](https://apps.who.int/fsf/Chemicalcontaminants/zearalenonePP00_19.pdf) (junij 2011)

- Codex Alimentarius Commission. 2000. Position paper on zearalenone. CX/FAC 00/19. Joint FAO/WHO Food Standards Programme. Thirty-second Session Beijing, People's Republic of China, 20–24 March 2000. Rome, Codex Committee on Food Additives and Contaminants: 5 str.  
[https://apps.who.int/fsf/Chemicalcontaminants/zearalenonePP00\\_19.pdf](https://apps.who.int/fsf/Chemicalcontaminants/zearalenonePP00_19.pdf) (junij, 2011)
- Codex Alimentarius Commission. 2014. Proposed draft revision on the code of practice for the prevention and reduction of mycotoxin contamination in cereals. CX/CF 15/9/10. Joint FAO/WHO Food Standards Programme. Ninth Session New Delhi, India, 16–20 March 2015. Rome, Codex Committee on Food Additives and Contaminants: 26 str.  
[ftp://ftp.fao.org/codex/meetings/cccf/cccf9/cf09\\_10e.pdf](ftp://ftp.fao.org/codex/meetings/cccf/cccf9/cf09_10e.pdf) (maj, 2015)
- Cvetkov M., Tajnsšek A. 2009. Soil organic matter changes according to the application of organic and mineral fertilizers within long-term experiments. *Acta agriculturae Slovenica*, 93, 3: 311–320
- Čergan Z., Tajnsšek A. 2010. Dolgoročni učinek (1993–2009) diferenciranega gnojenja z organskimi gnojili in N-min na pridelek in gospodarnost treh poljščin v kolobarju na dveh lokacijah. V: Novi izzivi v poljedelstvu 2010. Zbornik simpozija. Rogaska Slatina, 2010. Kocjan Ačko D., Čeh B. (ur.). Ljubljana, Slovensko agronomsko društvo: 42–48
- Dalcero A., Magnoli C., Chiacchiera S., Palacios G., Reynoso M. 1997. Mycoflora and incidence of aflatoxin B<sub>1</sub>, zearalenone and deoxynivalenol in poultry feeds in Argentina. *Mycopathologia*, 137: 179–184
- De Boevre M., Di Mavungu J. D., Maene P., K., Deforce D., Haesaert G., Eeckhout M., Callebaut A., Berthiller F., Van Peteghem C. De Saeger S. 2012. Development and validation of an LC-MS/MS method for the simultaneous determination of deoxynivalenol, zearalenone, T-2 toxin and some masked metabolites in different cereals and cereal derived food. *Food Additives and Contaminants, Part A. Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 29, 5: 819–835
- De la Pena R. C., Smith K. P., Capettini F., Muelbauer G. J., Gallo-Meagher M., Dill-Macky R., Sommers D. A., Rasmusson D.C. 1999. Quantitative trait loci associated with resistance to *Fusarium* head blight and kernel discoloration in barley. *Theoretical and Applied Genetics*, 99: 561–569
- Diana F., Persic L., Paleologo M. 2007. Celer ZEA: A rapid enzyme immunoassay for the quantitative determination of zearalenone in cereals. Trieste, Tecna S.r.l: 1 str.  
<http://check-food.de/app/download/5783887169/poster+Celer+ZEA+.pdf>  
(september 2012)
- diMenna M. E., Lauren D. R., Hardacre A. 1997. Fusaria and *Fusarium* toxins in New Zealand maize plants. *Mycopathologia*, 139: 165–173
- DLG-Arbeitsgruppe »Mykotoxine«. 2000. Mykotoxine Vermeiden statt »Bekämpfen«.

DLG-Mitteilungen, 115, 8: 12–16

D'Mello J. P. F., Macdonald A. M. C. 1997. Mycotoxins. *Animal Feed Science Technology*, 69: 155–166

Doko M. B., Cane C., Brown N., Sydenham E. W., Mpuchane S., Siame B. A. 1996. Natural co-occurrence of fumonisins and zearalenone in cereals and cereal based foods from eastern and southern Afrika. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44: 3240–3243

Doyle M. P., Applebaum R. S., Brackett R. E., Marth E. H. 1982. Physical, chemical and biological degradation of mycotoxins in food and agriculture commodities. *Journal of Food Protection*, 45, 10: 964–971

Dutoit L. J., Pataky J. K. 1999. Reactions of processing sweet corn hybrids to *Giberella* ear rot. *Plant Diseases*, 83: 76–80

Edwards S. G. 2004. Influence of agricultural practices on *Fusarium* infection of cereals and subsequent contamination of grain by trichothecene mycotoxins. *Toxicology Letters*, 153: 29–35

El-Bazza Zeinab E. M., Hala A. F., El-Fouly Mohie E. D. Z., El-Tblawy Seham Y. M. 2001. Inhibitory effect of gamma radiation and *Nigella sativa* seeds oil on growth, spore germination and toxin production of fungi. *Radiation Physics and Chemistry*, 60: 181–189

El-Nazami H., Kankaanpää P., Salminen S., Ahokas J. 1998. Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B<sub>1</sub>. *Food and Chemical Toxicology*, 36: 321–326

El-Nazami H., Mykkänen H., Kankaanpää P., Salminen S., Ahokas J. 2000. Ability of *Lactobacillus* and *Propionibacterium* strains to remove aflatoxin B<sub>1</sub> from the chicken duodenum. *Journal of Food Protection*, 63: 549–552

Engvall E., Perlman P. 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8, 9: 871–874

Entrup N. L., Oehmichen J. 2000. *Lehrbuch des Pflanzenbaues. Band 2: Kulturpflanzen.* Gelsenkirchen, Verlag Th. Mann: 856 str.

Eurofins AUA GmbH. 2008. Prüfbericht Nr. AUA 7052/1.1-08. Untersuchungsergebnisse. Makkleeburg, Eurofins Agrar- und Umweltanalytik GmbH: 3 str.

European Commission. 1999. Opinion on the relationship between the use of plant protection products on food plants and the occurrence of mycotoxins in foods. SCP/RESI/063. Brussels, European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-general, Scientific Committee on Plants: 24 str.

[http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scp/out56\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scp/out56_en.pdf) (oktober 2012)

FAO-UNESCO. 1988. Soil map of the world: Revised legends. Rome, Food and Agriculture Organisation: 119 str.

FDA. 2007. Food allergen partnership. Washington, Food and Drug Administration: 18 str.  
<http://web.archive.org/web/20080325193553/www.cfsan.fda.gov/~dms/alrgpart.html>  
(november 2012)

Fisher N. L., Burgess L. W., Toussoun T. A., Nelson P. E. 1982. Carnation leaves as a substrate and for preserving cultures of *Fusarium* species. *Phytopathology*, 72: 151–153

Forrer H.R., Musa T., Schwab F., Jenny E., Bucheli T.D., Wettstein F.E., Vogelgsang S. 2014. *Fusarium* head blight control and prevention of mycotoxin contamination in wheat with botanicals and tannic acid. *Toxins*, 6, 3: 830–849.

Frisvad J. C., Filtenborg O., Thrane U., Nielsen P. V. 1992. Collaborative study on media for detection and enumeration toxigenic *Penicillium* and *Aspergillus* species. V: Modern methods in food mycology. Samson R. A., Hockin A. D., Pitt J. I., King A. D. (eds.). Amsterdam, Elsevier: 263–273

Galvano F., Piva A., Ritieni A., Galvano G. 2001. Dietary strategies to counteract the effects of mycotoxins: A review. *Journal of Food Protection*, 64: 120–131

Gregorčič A., Velkonja Bolta Š., Verbič J., Kmecl V., Žnidaršič Pongrac V., Sušin J. 2009. Analiza prisotnosti onesnaževal v živilih rastlinskega izvora v primarni proizvodnji. Naročnik Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano. Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije: 34 str.

Grižon P., Per M., Pečnik M. 2011. Sortna lista poljščin, zelenjadnic, sadnih rastlin in trte za leto 2011. Ljubljana, Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano - Fitosanitarna uprava RS: 26 str.

Gupta S.C., Wang D. 2002. Water retention in soil. V: Encyclopedia of soil science. Lal R. (ed.). New York, Marcel Dekker, cop: 1393–1398

Hadživuković S. 1991. Statistički metodi. 2. izd. Novi Sad, Poljoprivredni fakultet, Institut za ekonomiku poljoprivrede i sociologiju sela: 584 str.

Haskard C., Binnion C., Ahokas J. 2000. Factors affecting the sequestration of aflatoxin by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Chemico-Biological Interactions*, 128: 39–49

Hawksworth D.L., 1983. Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi (including the lichens). 7<sup>th</sup> ed. Kew Surrey, Commonwealth Mycological Institute: 445 str.

Heathcote J. G., Hibbert J. R. 1978. Aflatoxin: Chemical and biological aspects. Amsterdam, Elsevier Scientific Publishing Company: 212 str.

- Hell K., Cardwell K. F., Setamou M., Poehling H-M. 2000. The influence of storage practices on aflatoxin contamination in maize in four agroecological zearalenones in Benin, West Africa. *Journal of Stored Product Research*, 36: 365–382
- Hesseltine C. W. 1976. Mycotoxin research in India. *Mycopathologia*, 58, 3:157–163
- Horstmann F. 2008. Mikotoksini v koruznem zrnju. *Kmetovalec*, 76, 10: 6–7
- Hueza I.M., Raspantini P.C.F., Raspantini L.E.R., Latorre A.O., Gornjak S.L. 2014. Zearalenone, an estrogenic mycotoxin, is an immunotoxic compound. *Toxins*, 6, 3: 1080–1095
- Hussein H.S, Brasel J.M. 2001. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, 167, 2: 101-134
- Huwig A., Freimund S., Kappeli O., Dutler H. 2001. Mycotoxin detoxification of animal feed by different adsorbents. *Toxicology Letters*, 122: 179–188
- ISTA. 2013. Seed health testing methods. V: International rules for seed testing. Vol. 2013. Basserdorf, ISTA- International Seed Testing Association: 1–8  
[www.seedtest.org](http://www.seedtest.org) (oktober, 2014)
- Jakovac Štrajn B., Kotnik V., Vengušt A., Pestevšek U., Malovrh T. 2004. Učinek mikotoksina deoksinivalenola na imunski odziv prašičev. *Medicinski razgledi*, 43, Suppl. 5: 167–171
- Jakovac Štrajn B. 2008. Imunosupresivni učinek krme, naravno kontaminirane z mikotoksinom deoksinivalenolom (DON) na mlade plemenske svinje v obporodnem obdobju. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta: 148 str.
- Jakovac Štrajn B., Vengušt A., Ujčič Vrhovnik I., Pavšič Vrtač K., Kalcher Tavčar G. 2010. Mikrobiološke in mikotoksikološke preiskave žitaric v Sloveniji. *Acta agriculturae Slovenica*, 95, 2: 121– 28
- Jakovac Štrajn B., Vengušt A., Malovrh T. 2011. Učinki toksinov, ki jih izločajo plesni *Fusarium* na imunski odziv svinj. *Slovenski veterinarski zbornik*, 48, Suppl. 13: 87–89
- Jeršek B., Poklar Ulrich N., Dekleva N., Sever D. 2004. Kemijski dejavniki tveganja v živilih in njihov nadzor. V: Varnost živil. 22. Bitenčevi živilski dnevi 2004, Radenci, 18.–19. marec 2004. Gašperlin L., Žlender B. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 45–64
- Jugljal S., Govinden R., Odhav B. 2002. Spice oils for the control of co-occurring mycotoxin producing fungi. *Journal of Food Protection*, 65: 683–687



- Kabak B., Dobson A. D., Var I. 2006. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46: 593–619
- Kahne Juriševič B. 2005. Ohratoksin A v živilih rastlinskega izvora. Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 120 str.
- Kalcher Tavčar G., Pavšič-Vrtač K., Ujčič Vrhovnik I., Jakovac Štrajn B., Vengušt A. 2011. Kontaminacija žit v primarni proizvodnji s trihoteceni v Sloveniji. *Slovenski veterinarski zbornik*, 48, Suppl.13: 106–108
- Kalcher Tavčar G., Pavšič Vrtač K., Pestevšek U., Jakovac Štrajn B., Ujčič I., Vengušt A. 2007. Kontaminacija krme z nekaterimi mikotoksini v Sloveniji. V: Zbornik predavanj – 16. mednarodno znanstveno posvetovanje o prehrani domačih živali, Radenci, 8.-9.11.2007. Kapun S., Krambereger B., Čeh T. (ur.). Murska Sobota, Kmetijsko gozdarska zbornica Slovenije, Kmetijsko gozdarski zavod: 52–60
- Kanisawa M., Hsieh D. P. H. 1984. Toxicology of mycotoxins. V: *Toxigenic fungi*. Kurata H., Ueno Y. E. (eds.). Amsterdam, Elsevier: 233–244
- Kocić Tanackov S.D., Dimić G.R. 2013. Glive in mikotoksini - kontaminanti hrane. *Hemijska Industrija*, 67, 4: 639–653
- Kovač B. 2009. Kemijska tveganja izdelkov iz žit, ostanki fitofarmacevtskih sredstev in mikotoksini. V: Zbornik predavanj in referatov 9. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin. Nova Gorica, 4.–5. marec 2009. Maček J. (ur.). Ljubljana, Društvo za varstvo rastlin Slovenije: 25–30
- Kuiper Goodman T. 1995. Mycotoxins: risk assessment and legislation. *Toxicology Letters*, 82–83: 853–859
- Kuiper Goodman T., Scott P. M., Watanabe H. 1987. Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 7: 253–306
- Kumar V., Basu M. S., Rajendran T. P. 2008. Mycotoxin research and mycoflora in some commercially important agricultural commodities. *Crop Protection*, 27, 6: 891–905
- Kushiro M. 2008. Effects of milling and cooking processes on the deoxynivalenol content in wheat. *International Journal of Molecular Sciences*, 9, 11: 2127–45
- Langesth W., Rudberget T. 1999. The occurrence of HT-2 toxin and other trichothecenes in Norwegian cereals. *Mycopathologia*, 147: 157–165
- Leatherhead Food Research. 2010. Zearalenon. Leatherhead, Surrey, European Mycotoxins Awareness Network: 1 str.  
<http://services.leatherheadfood.com/mycotoxins/display.asp?factsheetid=12&noback=yes&strFiltera=ralenon> (november 2012)

- Lequin R. 2005. Enzyme immunoassay (EIA) / enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clinical Chemistry*, 51, 12: 2415–2418
- Lević J., Stanković S., Bočarov Stančić A., Škrinjar M., Mašić Z. 2004. An overview on toxigenic fungi and mycotoxins in Serbia and Montenegro. V: An overview on toxigenic fungi and mycotoxins in Europe. Logrieco A., Visconti A. (eds.). Netherlands, Kluwer Academic Publishers: 201–218
- Lo Curto R., Pellicanò Vilasi F., Munafò P., Dugo G. 2004. Ochratoxin A occurrence in experimental wines in relationship with different pesticide treatments on grapes. *Food Chemistry*, 84: 71–75
- Logrieco A., Bailey J. A., Corazza L., Cooke B. M. 2002. Mycotoxins in plant disease: under the aegis of COST Action 835 "Agriculturally important toxigenic fungi 1998-2003", EU project (QLK 1-CT-1998-01380), and ISPP "*Fusarium* Committee". Logrieco A., Bailey J. A., Corazza L., Cooke B. M. (eds.). Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 138 str.
- Maaroufi K., Chekir L., Creppy E. E., Ellouz F., Bacha H. 1996. Zearalenone induces modifications in haematological and biochemical parameters in rats. *Toxicon*, 34: 534–540
- Magnusson J., Schnürer J. 2001. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous compound. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 1–5
- Marx H., Gedek B., Kollarczik B. 1995. Comparative investigations in mycotoxicological status of alternatively and conventionally grown crops. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung A*, 201: 83–86
- Masterhazy A. 2002. Role of deoxynivalenol in aggressiveness of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* and in resistance to *Fusarium* head blight. *European Journal of Plant Pathology*, 108: 675–684
- McMullen M., Zhong S., Neate S. 2008. *Fusarium* head blight (scab) of small grains. North Dakota, North Dakota State University Extension Service: 6 str.  
<http://www.sdwheat2.org/files/FusariumHeadBlightNDSU.pdf> (september 2011)
- MEBAK. 1997. Mitteleuropäische Brautechnische Analysenkommission. Brautechnische Analysemethoden. Band I. 3. Auf. Freising, Weihenstephan: 89–90
- Merbach W., Koerschens M. 1999. Dauerdüngungsversuche als Grundlage für nachhaltige Landnutzung und Quantifizierung von Stoffkreisläufen. UFZ-Bericht 24/1999. Leipzig, Verlag und Wirtschaftswerbung Halle GmbH: 331 str.
- Morooka N., Uratsuji N., Yamamoto H. 1972. Studies on the toxic substances in barley infected with *Fusarium* spp. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, 1: 268–375

- Moss M. O. 1992. Secondary metabolism and food intoxication-moulds. *Journal of Applied Bacteriology*, 73, Suppl. S: 80–88
- Moss M. O., Badii F., Clifford M. N. 1990. Reduced aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* after growth on a caffeine - containing medium. *Letters in Applied Microbiology*, 10: 205–207
- Minervini F., Giannoccaro A., Cavallini A., Visconti A. 2005. Investigations on cellular proliferation induced by zearalenone and its derivatives in relation to the estrogenic parameters. *Toxicology Letters*, 159: 272–283
- Müller H. M., Reimann J., Schumacher U., Schwadorf K. 1997a. Natural occurrence of *Fusarium* toxins in barley harvested during five years in an area in southwest Germany. *Mycopathologia*, 137: 185–192
- Müller H. M., Reimann J., Schumacher U., Schwadorf K. 1997b. *Fusarium* toxins in wheat harvested during six years in an area of southwest Germany. *Journal of Natural Toxins*, 5: 24–30
- Munkvold G. P. 2003. Cultural and genetic approaches to managing mycotoxins in maize. *Annual Review of Phytopathology*, 41: 99–116
- Muri S. D., van der Voet H., Boon P. E., van Klaveren J. D., Brüschweiler B. J. 2009. Comparison of human risks resulting from exposure to fungicides and mycotoxins via food. *Food and Chemical Toxicology*, 47: 2963–2974
- NCBI. 2012. PubChem compound: Deoxynivalenol – compound summary. Bethesda, NCBI – National Center for Biotechnology Information: database.  
[http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?sid = 103621696 & viewopt = PubChem \(november 2012\)](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?sid = 103621696 & viewopt = PubChem (november 2012))
- Nelson P. E., 1991. History of *Fusarium* systematics. *Phytopathology*, 81, 9: 1045–1048
- Nelson P. E., Toussoun T. A., Marasas W. F. O. 1983. *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. Pennsylvania, State University Press, University Park: 193 str.
- Nemanič A. 1989. Uvod u problematiko mikotoksina. V: Sekcija prehrabeno-sanitarnih kemičara – zbornik znanstvenog skupa. Zagreb, 24. svibnja 1989. Zagreb, Farmaceutsko društvo Hrvatske: 1–9
- Nicholson P., Turner J. A., Jenkinson P., Jennings P., Stonehouse J., Nuttall M., Dring D., Weston G., Thomsett M. 2003. Maximising control with fungicides of *Fusarium* ear blight (FEB) in order to reduce toxin contamination of wheat. Project Report No. 297. London, HGCA (Home-Grown Cereals Authority): 84 str.
- Nogueira da Costa A., Mijal R. S., Keen J. N., Findlay J.B., Wild C. F. 2011. Proteomic

- analysis of the effects of the immunomodulatory mycotoxin deoxynivalenol. *Proteomics*, 11, 10: 1903-1914
- Northolt M. D., Frisvald J. C., Samson R. A. 1996. Occurrence of food-borne fungi and factors for growth. V: Introduction to food-borne fungi. Samson R. A., Hoekstra E. S., Frisvald J. C., Filtenborg O. (eds.). Baarn, Centraalbureau voor Schimmelcultures: 243–250
- Oadi M. 2015. *Fusarium* head blight and crown rot on wheat & barley: Losses and health risks. *Advances in Plants & Agriculture Research*, 2, 1: 00039, doi: 10.15406/apar.2015.02.00039: 6 str.
- Okoye Z. S. 1987. Stability of ralenone in naturally contaminated corn during Nigerian traditional brewing. *Food Additives and Contaminants*, 4: 57–59
- Ouanes Z., Ayed-Boussema I., Baati T., Creppy E. E., Bacha H. 2005. Zearalenone induces chromosome aberrations in mouse bone marrow: preventive effect of 17 $\beta$ -estradiol, progesterone and vitamin E. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 565, 2: 139–149
- Ožegović L., Pepeljnjak S. 1995. Mikotoksikoze. Zagreb, Školska knjiga: 279 str.
- Parry D. W., Jenkinson P., McLeod L. 1995. *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals – A review. *Plant Pathology*, 44: 207–391
- Pavlič Nikolič E. 2005. Vpliv gnojenja pšenice (*Triticum aestivum* L.) cv. 'Reska' v različnih ekoloških območjih na kakovost zrnja. Magistrsko delo., Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 81 str.
- Peltonen K., El-Nezami H., Pierides M., Salminen S., Ahokas J. T. 2000. Binding of aflatoxin B1 by probiotic bacteria. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 1942–1945
- Pestka J. J., Zhou H. R., Moon Y., Chung Y.L. 2004. Cellular and molecular mechanisms for immune modulation by deoxynivalenol and other trichothecenes: unraveling a paradox. *Toxicology Letters*, 53: 61–73
- Pestka J. J., Yike I., Dearborn D. G., Ward M. D. W., Harkema J. R. 2008. *Stachybotrys chartarum*, trichothecene mycotoxins, and damp building - related illness: new insights into a public health enigma. *Toxicological Science*, 104, 1: 4–26
- Pieters M.N., Freijer J., Baars B. J., Fiolet D. C., van Klaveren J., Slob W. 2002. Risk assessment of deoxynivalenol in food: concentration limits, exposure and effects. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 504: 235–248
- Pineiro M., Nagler M., Coker R., Nicolaidis L., Wareing P., Myhara R. 2001. Manual on the application of the HACCP system in mycotoxin prevention and control. Rome, Food

and Agriculture Organization of the United Nations: 114 str.

Prandini A, Sigolo S, Filippi L, Battilani P, Piva G. 2009. Review of predictive models for *Fusarium* head blight and related mycotoxin contamination in wheat. *Food and Chemical Toxicology*, 47: 927-931

Pravilnik o količinah pesticidov in drugih strupenih snovi, hormonov, antibiotikov in mikotoksinov, ki smejo biti v živilih. 1983. Uradni list SFRJ, 59: 1634–1642

Prelusky D. B., Scott P. M., Trenholm H., Lawrence G.A. 1990. Minimal transmission of zearalenone to milk of dairy cows. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 25: 87–103

Priporočilo komisije z dne 17. avgusta 2006 o preprečevanju in zmanjševanju prisotnosti toksinov iz rodu *Fusarium* v žitu in žitnih izdelkih (2006/583/ES). 2006. Uradni list Evropske unije, 49, L 234: 35–40

Pussa T. 2008. *Principles of food toxicology*. Boca Raton, Taylor and Francis Group: 195-209

Raad F., Nasreddine L., Hilan C., Bartosik M., Parent-Massin D. 2014. Dietary exposure to aflatoxins, ochratoxin A and deoxynivalenol from a total diet study in an adult urban Lebanese population. *Food and Chemical Toxicology*, 73: 35-43

Resnik S., Neira S., Pacin A., Martinez E., Apro N., Latreite S. 1996. A survey of the natural occurrence of aflatoxins and ralenone in Argentine field maize: 1983-1994. *Food Additives and Contaminants*, 13: 115–120

RIDASCREEN® Zearalenon. Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Zearalenon (Art. No.: R1401). R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany: 10-18

RIDASCREEN®FAST DON. Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Deoxynivalenol (Art. No.: R5901, R5902). R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany: 12-21

Ristić Z., Bukovnik U., Vara Prasad P.V., Westc M. 2008. A model for prediction of heat stability of photosynthetic membranes. *Crop Science*, 48, 4: 1513–1522

Rotter B. A, Prelusky D. B., Pestka J. J. 1996. Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). *Journal of Toxicological and Environmental Health*, 48: 1–34

Rustom I. Y. S. 1997. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. *Food Chemistry*, 59: 57–67

Schachermayr G., Fried P. M. 2000. Problemkreis Fusarien und ihre Mykotoxine. *Agrarforschung*, 7: 252–257

- Schmale III D. G., Bergstrom G. C. 2003. Fusarium head blight in wheat. The Plant Health Instructor, doi:10.1094/PHI-I-2003-0612-01: 8 str.
- Schmidt H.L. 2002. Eine Mykothek: Zum Schimmelpilzvorkommen in Futtermitteln und Nahrungsgrundstoffen. Speyer, Landwirtschaftliche Untersuchungs-und Forschungsanstalt (LUFÄ), Speyer: 205 str.
- Schothorst R. C., van Egmond H.P. 2004. Collection of occurrence data of *Fusarium* toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU member states. Report from SCOOP task 3.2.10; Subtask: trichothecenes. Toxicology Letters, 153: 133-143
- Schwarz P. B., Beattie S., Casper H. H. 1996. Relationship between *Fusarium* infestation of barley and the gushing potential of malt. Journal of the Institute of Brewing, 102: 93-96
- Scott P. M. 1989. The natural occurrence of trichothecenes. V: Trichothecene mycotoxicosis pathophysiologic effect. Vol. 1. Beasley V. D. (ed.). Boca Raton, CRC Press: 1-26
- Shanta T. 1999. Fungal degradation of aflatoxin B<sub>1</sub>. Journal of Natural Toxins, 7: 175-178
- Simonin S. 2008. Mycotoxines, des avancees prometteuses. Cultivar, 618: IV-IV
- Siou D. 2013. Développement épidémique de la fusariose des épis de blé et conséquences des interactions entre espèces du complexe fusarien. Thèse docteur. Paris, Université Paris Sud - Paris XI: 129 str.
- Smith J. E., Lewis C. W., Anderson J. G., Solomons G. L. 1994. Mycotoxins in human nutrition and health. Luxembourg, Science Research Development, European Commission: 300 str.
- Smith P., Falloon P., Smith J. U., Powlson D. S. 2001. GCTE Report series: Report 7, 2<sup>nd</sup> ed. Soil Organic Matter Network (SOMNET): 2001 Model and Experimental Metadata. Walingford, UK, GC&TE Global change and terrestrial ecosystems. : 221 str.
- Snijders C. H. A. 1990. Genetic variation for resistance to *Fusarium* head blight in bread wheat. Euphytica, 50: 171-179
- Sokolović M., Šimpraga B. 2006. Survey of trichothecene mycotoxins in grain and animal food in Croatia by thin layer chromatography. Food Control, 17: 733-740
- Sommerfeld G., Gabel B. 2002. Studies on the sample weight for ochratoxin A determination in raw coffee. European Food Research and Technology, 215, 6: 520-522
- Spicher G. 1981. Schimmelpilze als Ursache der Kontamination der Cerealien durch



Mykotoxine. Schweizerische Zeitschrift für die Nahrungsmittelindustrie, 9a: 31-38

Srey C., Kimanya M.E., Routledge M.N., Shirima C.P., Gong Y.Y. 2014. Deoxynivalenol, exposure assessment in young children in Tanzania. *Molecular Nutrition and Food Research*, 58, 7: 1574-1580

Steyn P. S. 1980. The biosynthesis of mycotoxins: a study in secondary metabolism. New York, Academic Press: 432 str.

SURS. 2011. Povprečne letne in mesečne temperature zraka po meteoroloških postajah Slovenije. Ljubljana, Statistični urad RS: 1 str.

[http://pxweb.stat.si/pxweb/Dialog/varval.asp?ma=0156101S&ti=&path=../Database/Oko\\_lje/01\\_ozemlje\\_podnebje/10\\_01561\\_podnebni\\_kazalniki/&lang=2](http://pxweb.stat.si/pxweb/Dialog/varval.asp?ma=0156101S&ti=&path=../Database/Oko_lje/01_ozemlje_podnebje/10_01561_podnebni_kazalniki/&lang=2) (november 2011)

Sweeney M. J., Dobson A. D. W. 1999. Molecular biology of mycotoxin biosynthesis. *FEMS Microbiology Letters*, 175: 149–163

Škrinjar M. 2008. Fungal and mycotoxin contamination of some food industry byproducts. V: *Stranski proizvodi in odpadki v živilstvu - uporabnost in ekologija*. 25. Bitenčevi živilski dnevi, Ljubljana, 17. in 18. april 2008. Gašperlin L., Žlender B. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 73–84

Škrinjar M., Kocić Tanackov S. 2004. Fungal infection and occurrence of zearalenone in barley harvested in 2003 in Serbia. *Acta agriculturae Slovenica*, 84, Suppl. 1: 233–238

Tajnšek A. 1988. Pšenica. Ljubljana, ČZP Kmečki glas: 162 str.

Tajnšek A. 2003. Vsebnost humusa in nekatere fizikalne lastnosti tal v odvisnosti od gnojenja z organskimi gnojili in dušikom v IOSDV Jable in IOSDV Rakičan. V: *Deset let trajnih poskusov IOSDV v Sloveniji, Jable in Rakičan 1993–2003*. Zbornik posveta. Žalec, 12. december 2013. Tajnšek A., Čeh Brežnik B., Kocjan Ačko D. (ur.). Ljubljana, Slovensko agronomsko društvo: 25–34

Tajnšek A., Nikolič Pavlič E., Čeh B., Tajnšek L. 2010. Baking quality of wheat grain with regard to agrotechnical arrangements and location. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 56, 5: 589–603

Tajnšek A., Tajnšek L. 2011. Gorolka in Savinja, dve novi slovenski kultivarja pšenice. *Hmeljarski bilten*, 18: 65–71

Tajnšek A., Čergan Z., Čeh B. 2013. Results of the long-term field experiment IOSDV Jable at the beginning of 21 st century. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 59, 8: 1099–1108

Tajnšek L. 2004. Vpliv gnojenja pšenice cv. Soissons in cv. Eko v kolobarju na nekatere pekarske lastnosti pšenice. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 43 str.

- Tajnšek L., Tajnšek A. 2004. Vpliv gnojenja pšenice na nekatere pekarske lastnosti pšenice in odkupno ceno pri interventnem odkupu. V: Novi izzivi v poljedelstvu 2004. Zbornik simpozija. Čatež ob Savi, 13. in 14. december 2004. Tajnšek A. (ur.). Ljubljana, Slovensko agronomsko društvo: 240–245
- Teich W. 1989. Zur Dynamik optisch gesteuert multistabiler Quantensysteme. Stuttgart, Universität Stuttgart: 135 str.
- Thrane U. 2000. Mycotoxin producing *Fusarium* species occurring in danish cereals. Proceedings of the 17<sup>th</sup> Danish Plant Protection Conference II. DJF-rapport, 24: 165-169
- Trček J. 1996. Kontaminacija hrane z mikotoksini. Sodobno kmetijstvo, 29, 3: 115–119
- Tubajika K. M., Damann K. E. 2002. Glufosinate-amonium reduces growth and aflatoxin B<sub>1</sub> production by *Aspergillus flavus*. Journal of Food Protection, 65: 1483–1487
- Ueno Y., Lee U. S., Tanaka T., Hasegawa A., Matsuki Y. 1986. Examination of Chinese and USSR cereals for the *Fusarium* mycotoxins, nivalenol, deoxynivalenol and zearalenone. Toxicon, 24: 618–621
- Uredba komisije (ES) št. 466/2001 z dne 8. marca 2001 o določitvi mejnih vrednosti nekaterih kontaminatov v živilih. 2001. Uradni list Evropske unije, 44, L 77: 1–13
- Uredba komisije (ES) št. 856/2005, z dne 6. junija 2005 o spremembi Uredbe (ES) št. 446/2001 glede toksinov iz rodu *Fusarium*. 2005. Uradni list Evropske unije, 48, L 143: 3–8
- Uredba komisije (ES) št. 1881/2006, z dne 19. decembra 2006 o določitvi mejnih vrednosti nekaterih onesnaževal v živilih. 2006a. Uradni list Evropske unije, 49, L 364: 5–24
- Uredba komisije (ES) št. 401/2006, z dne 23. februarja 2006 o določitvi metod vzorčenja in analiz za uradni nadzor vsebnosti mikotoksinov v živilih. 2006b. Uradni list Evropske unije, 49, L 70: 12–34
- Uredba komisije (ES) št. 1126/2007 z dne 28. septembra 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 proizvodi. 2007. Uradni list Evropske unije, 50, L 255: 14–17
- Usleber E., Maertlbauer E., Dietrich R., Terplan G. 1991. Direct enzyme - linked immunosorbent assays for the detection of the 8-ketotrichothecene mycotoxins deoxynivalenol, 3-acetyldeoxynivalenol, and 15-acetyldeoxynivalenol in buffer. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 39: 2091–2095
- Van der Voet H., Slob W. 2007. Integration of probabilistic exposure assessment and probabilistic hazard characterizatio. Risk Analytics, 27: 351–371

- Van Egmond H. P. 1996. Mycotoxin in food: analysis, detection and legislation. V: Introduction to food-borne fungi. Samson R. A., Hoekstra E. S. Frisvald J. C., Filtenborg O. (eds.). Baarn, Centraalbureau voor Schimmelcultures: 261–269
- Van Nierop S., Rautenbach M., Axcell B. C., Cantrell I. C. 2006. The impact of microorganisms on barley and malt quality – a review. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 64, 2: 69–78
- Vesonder R. F., Golinski P., Plattner R., Zietkiewicz D. L. 1991. Mycotoxin formation by different geographic isolates of *Fusarium crookwellense*. *Mycopathologia*, 113: 11–14
- Vrabcheva T., Gessler R., Usleber E., Märtilbauer E. 1996. First survey on the natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins in Bulgarian wheat. *Mycopathologia*, 136: 47–52
- Waśkiewicz A., Beszterda M., Kostecki M., Zielonka Ł, Goliński P., Gajęcki M. 2014. Deoxynivalenol in the gastrointestinal tract of immature gilts under per os toxin application. *Toxins*, 6: 973–987
- Watson D. H. 1985. Toxic fungal metabolites in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 22, 3: 177–198
- Weber E. 1961. *Grundriss der biologischen Statistik*. Jena, VEB Gustav Fischer Verlag: 235–236
- Weidenböerner M. 2011. Mycotoxins and their metabolites in humans and animals. *World Mycotoxin Journal*, 4, 3: 339–341
- Whitaker T. B. 2003. Standardisation of mycotoxin sampling procedures: an urgent necessity. *Food Control*, 14, 4: 233–237
- Whitlow L. W., Hagler J. R. 2009. Mycotoxins in feeds. *Feedstuffs*, September 16:70–78
- Williams P. R., Hammitt J. K. 2001. Perceived risks of conventional and organic produce. Pesticides; pathogens and natural toxins. *Risk Analytics*, 21: 319–330
- Wollenweber H. W., Reinking O. A. 1935. *Die Fusarien, ihre Beschreibung, Schadwirkung und Bekämpfung*. Berlin, Paul Parey: 335 str.
- Zemljič A., Rutar R., Žerjav M., Verbič J. 2008. Vpliv kultivarja, gnojenja z dušikom in razkuževanja semena na okuženost zrnja pšenice s *Fusarium* sp. in onesnaženost z mikotoksini. V: *Novi izzivi v poljedelstvu 2008*. Rogaška Slatina, 4. in 5. december 2008. Tajnšek A. (ur.). Ljubljana, Slovensko agronomsko društvo: 257–262
- Zinedine A., Soriano J. M., Moltó J. C., Mañes J. 2007. Review on toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. *Food and Chemical Toxicology*, 45: 1–18

Žust J., Vengušt A., Pestevšek U. 2004. Izbrana poglavja iz higiene in patologije prehrane živali. Del 1, Kontaminacija krme z mikroorganizmi in njihovimi toksičnimi presnovki. Ljubljana, Veterinarska fakulteta: 11–45

Yamashita A., Yoshizawa T., Aiura Y., Sanchez P. C., DiZEA E. I., Arim R. H., Sardjono. 1995. *Fusarium* mycotoxins (fumonisins, nivalenol and ralenone) and aflatoxins in corn from Southeast Asia. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 59: 1804–1807

Yu Z., Zhang L., Wu D., Liu F. 2005. Anti-apoptotic action of ralenone in MCF-7 cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 62: 441–446

## ZAHVALA

Disertacija je nastajala v razmerah, ki znanstvenoraziskovalnemu delu doktorantom, ki niso mladi raziskovalci, niso naklonjene. Pri svojem poklicnem delu se ukvarjam z drugačnimi nalogami, s problematiko varstva hrane pred mikotoksini se srečujem le obrobno. Vse delo pri pripravi in pisanju disertacije je moralo biti opravljeno izven delovnega časa, zaradi tega je bila prikrajšana družina, ki se je v teh letih povečala še za dva člana. Ne nazadnje pa je treba omeniti tudi to, da so za podiplomske študente, ki nimajo statusa mladega raziskovalca, lahko komaj rešljiv problem tudi stroški laboratorijskih in drugih analiz, ki jih brez pomoči širše družine preprosto ne zmore. Da sem lahko kljub vsemu razširila in poglobila znanje o varstvu prehranskih izdelkov iz žita in končala podiplomski študij z doktorsko disertacijo, gre zahvala vsem tistim, ki so mi pri tem delu kakorkoli pomagali in me vsestransko podpirali.

Zahvaljujem se predvsem mentorju izr. prof. ddr. Marjanu Simčiču, predsednici komisije za oceno in zagovor disertacije, red. prof. dr. Veroniki Abram, in članici komisije, izr. prof. dr. Mireli Kopjar, za njihove nasvete in pripombe, ki so prispevali k izboljšanju in končni podobi doktorskega dela. Veliko mi je pomenila tudi njihova podpora in razumevanje pri ovirah, ki so spremljale nastajanje končnega izdelka.

Za pomoč pri laboratorijskih analizah pšeničnih zrn s fuzariozami se zahvaljujem vodstvu in sodelavcem tedanje Katedre za poljedelstvo in pridelovanje krme Oddelka za agronomijo Biotehniške fakultete v Ljubljani, še posebej strokovni sodelavki Marjeti Žabnikar za njeno skrbno analitsko delo. Pri pripravi analitičnega materiala so deloma pomagali tudi sodelavci Katedre za fitomedicino Oddelka za agronomijo.

Red. prof. dr. Lovrenc Pfajfar, zaslužni profesor Ekonomske fakultete Univerze v Ljubljani, je pomembno prispeval k statističnemu ovrednotenju rezultatov.

Zahvaljujem se vodji knjižnice, Lini Burkan Maković, za vso pomoč, zlasti pri navajanju in urejanju virov.

Zahvala gre tudi direktorju LUFÄ Speyer (Landwirtschaftliche Untersuchungs- und Forschungsanstalt) red. prof. dr. Franzu Wieslerju in njegovima sodelavcema v oddelku za mikrobiologijo dr. Gerhardu Straussu ter še zlasti dr. Christianu Schulteju, ki mi je prijazno posredoval interno gradivo o postopkih analize mikotoksinov DON in ZEA.

Preučevanje vpliva različnih postopkov pridelovanja pšenice na kontaminacijo zrnja s fuzariozami in z mikotoksini ne bi bilo mogoče brez rezultatov dolgotrajnih poljskih poskusov, ki jih je v Sloveniji zasnoval in dolga leta vodil moj oče, prof. dr. Anton Tajnšek. Ko sem mu kot dijakinja in študentka občasno pomagala na polju, nisem mislila, da bosta omenjena trajna poljska poskusa nekoč osnova za mojo interdisciplinarno usmerjeno doktorsko disertacijo. Očetu se zahvaljujem za strokovne usmeritve in nasvete pri odkrivanju pomembnih vidikov varstva pšenice v povezavi s postopki pridelave, za pomoč pri laboratorijskih in statističnih analizah, za vsestransko podporo pri študiju in pripravi disertacije, zlasti tudi za finančno pomoč.

Zahvaliti se želim mami, ki je opravila večino dela pri dolgotrajnem mletju pšeničnih vzorcev, in ki me je spodbujala in podpirala v vseh obdobjih nastajanja disertacije. Dragocena je bila njena pomoč pri varstvu otrok v nešteti urah, ki sem jih pri pripravi in izdelavi disertacije preživela ob računalniku.

Za vse razumevanje, potrpljenje in oporo se zahvaljujem Boštjanu ter otrokom Zali, Andražu in Jaku. Predvsem njim je bilo težko sprejeti dejstvo, da si je njihova mamica po prihodu iz službe in ob koncih tedna vzela čas tudi za znanost.



## PRILOGE

**Priloga A:** Povprečne letne temperature in letne vsote padavin, dolgoletna povprečna temperatura in dolgoletna povprečna vsota padavin v obdobju od začetka postavitve poskusa IOSDV (1993–2010) v Jablah in Rakičanu (SURS, 2011)

---

Leto	IOSDV Jable (Metereološka postaja Letališče Jožeta Pučnika)		IOSDV Rakičan (Metereološka postaja Murska Sobota)	
	Temperatura (°C)	Padavine (mm)	Temperatura (°C)	Padavine (mm)
1993	9,3	951	9,9	677
1994	10,0	1022	11,2	989
1995	8,8	1022	10,1	924
1996	8,1	1440	9,0	1026
1997	8,9	1144	9,7	692
1998	9,2	1348	10,1	839
1999	9,0	1391	10,2	772
2000	10,1	1439	11,5	651
2001	9,4	1171	10,5	644
2002	9,8	1177	11,2	753
2003	9,5	1011	10,5	515
2004	8,8	1620	9,8	805
2005	8,5	1518	9,4	868
2006	9,2	1100	10,1	852
2007	10,1	1257	11,2	817
2008	9,9	1593	11,2	707
2009	9,8	1431	10,9	989
2010	9,0	1579	10,2	877
Povprečje	9,3	1290	10,4	800

---

**Priloga B1:** Vlažnost in okuženost pšeničnega zrnja s *Fusarium* spp. pri kultivarjih Savinja in Reska v odvisnosti od postopkov pridelovanja na lokaciji Jable v letu 2006 (odstotki, %)

Obravnavanje	Blok	Sistem	Stopnje	Reska		Savinja	
				Vlaga (%)	<i>Fusarium</i> spp. (%)	Vlaga (%)	<i>Fusarium</i> spp. (%)
BN0	1	B	0	13,45	12	13,65	26
BN1	1	B	1	13,35	20	13,40	21
BN2	1	B	2	13,25	26	13,10	7
BN3	1	B	3	13,15	20	13,15	7
AN0	1	A	0	13,55	4	13,47	5
BN2	2	B	2	13,35	16	13,50	14
BN3	2	B	3	13,15	14	13,25	2
AN0	2	A	0	13,65	4	13,90	4
BN0	2	B	0	13,70	12	13,80	13
BN1	2	B	1	13,65	4	13,75	5
BN3	3	B	3	13,35	6	13,30	3
AN0	3	A	0	13,45	31	13,90	10
BN0	3	B	0	13,85	20	14,20	9
BN1	3	B	1	13,40	4	13,80	6
BN2	3	B	2	13,40	30	13,50	5
CN0	1	C	0	13,15	5	13,95	18
CN1	1	C	1	13,00	4	13,80	10
CN2	1	C	2	12,85	25	13,80	11
CN3	1	C	3	13,00	26	13,55	5
AN3	1	A	3	12,85	14	13,65	16
CN3	2	C	3	12,80	9	13,60	5
AN3	2	A	3	12,80	13	13,75	4
CN0	2	C	0	13,20	4	14,05	5
CN1	2	C	1	12,75	9	13,85	9
CN2	2	C	2	13,00	23	13,90	6
AN3	3	A	3	12,90	22	13,90	13
CN0	3	C	0	13,65	22	14,20	37
CN1	3	C	1	12,75	5	13,90	11
CN2	3	C	2	12,80	7	14,00	19
CN3	3	C	3	12,90	17	13,90	26

**Priloga B2:** Vlažnost in okuženost pšeničnega zrnja s *Fusarium* spp. pri kultivarjih Savinja in Reska v odvisnosti od postopkov pridelovanja na lokaciji Rakičan v letu 2006 (odstotki, %)

Obravna -vanje	Blok	Sistem	Stopnje	Reska		Savinja	
				Vlaga (%)	<i>Fusarium</i> spp. (%)	Vlaga (%)	<i>Fusarium</i> spp. (%)
BN0	1	B	0	13,40	46	13,60	25
BN1	1	B	1	13,40	25	13,25	23
BN2	1	B	2	12,85	61	13,15	32
BN3	1	B	3	12,75	38	12,85	81
AN0	1	A	0	12,80	44	13,00	38
BN2	2	B	2	12,80	23	12,95	46
BN3	2	B	3	12,65	22	12,80	50
AN0	2	A	0	13,00	24	13,10	18
BN0	2	B	0	13,20	9	13,35	28
BN1	2	B	1	13,25	24	12,80	16
BN3	3	B	3	12,65	47	12,45	77
AN0	3	A	0	12,85	30	13,05	16
BN0	3	B	0	12,95	40	12,90	56
BN1	3	B	1	13,05	26	12,90	32
BN2	3	B	2	13,15	67	12,60	49
CN0	1	C	0	12,90	72	13,15	21
CN1	1	C	1	13,00	50	12,85	23
CN2	1	C	2	13,00	76	12,35	60
CN3	1	C	3	12,60	66	12,25	67
AN3	1	A	3	12,45	13	12,25	43
CN3	2	C	3	12,55	36	12,30	68
AN3	2	A	3	12,60	53	12,35	26
CN0	2	C	0	12,90	15	13,00	47
CN1	2	C	1	12,90	29	12,95	75
CN2	2	C	2	12,70	64	12,30	40
AN3	3	A	3	12,40	60	12,30	81
CN0	3	C	0	12,65	48	12,95	54
CN1	3	C	1	12,95	58	12,65	54
CN2	3	C	2	12,60	67	12,45	64
CN3	3	C	3	12,55	67	12,60	54

**Priloga B3:** Vlažnost in okuženost pšeničnega zrnja s *Fusarium* spp. pri kultivarjih Savinja in Reska v odvisnosti od postopkov pridelovanja na lokaciji Jable v letu 2007; žetev 14. 7. 2007 (odstotki, %)

Obravnavanje	Blok	Sistem	Stopnje	Reska		Savinja	
				Vlaga (%)	<i>Fusarium</i> spp. (%)	Vlaga (%)	<i>Fusarium</i> spp. (%)
BN0	1	B	0	13,70	6	14,25	6
BN1	1	B	1	13,70	5	14,15	21
BN2	1	B	2	13,50	6	14,45	12
BN3	1	B	3	13,05	6	13,65	14
AN0	1	A	0	13,40	6	13,80	13
BN2	2	B	2	13,15	12	13,75	12
BN3	2	B	3	13,15	14	13,45	24
AN0	2	A	0	13,25	5	14,30	7
BN0	2	B	0	13,50	7	14,30	11
BN1	2	B	1	13,00	10	14,05	10
BN3	3	B	3	13,00	15	13,75	10
AN0	3	A	0	13,50	12	14,15	12
BN0	3	B	0	13,65	10	14,75	5
BN1	3	B	1	13,05	14	14,40	9
BN2	3	B	2	13,35	16	14,20	10
CN0	1	C	0	14,60	5	14,10	7
CN1	1	C	1	13,85	20	13,55	10
CN2	1	C	2	13,60	15	13,35	8
CN3	1	C	3	13,70	28	13,25	1
AN3	1	A	3	13,50	9	13,30	14
CN3	2	C	3	13,60	8	13,25	10
AN3	2	A	3	13,55	13	13,15	10
CN0	2	C	0	13,70	2	13,65	8
CN1	2	C	1	13,45	6	13,60	5
CN2	2	C	2	13,55	14	13,40	5
AN3	3	A	3	13,55	15	13,35	11
CN0	3	C	0	13,85	1	13,80	10
CN1	3	C	1	13,55	10	13,50	14
CN2	3	C	2	13,50	13	13,50	10
CN3	3	C	3	13,40	12	13,05	9

**Priloga B4:** Vlažnost in okuženost pšeničnega zrnja s *Fusarium* spp. pri kultivarjih Savinja in Reska v odvisnosti od postopkov pridelovanja na lokaciji Rakičan v letu 2007; žetev 9. 7. 2007 (odstotki, %)

Obravnavanje	Blok	Sistem	Stopnje	Reska		Savinja	
				vlaga (%)	<i>Fusarium</i> spp. (%)	vlaga (%)	<i>Fusarium</i> spp. (%)
BN0	1	B	0	11,95	12	11,80	9
BN1	1	B	1	11,50	5	11,80	7
BN2	1	B	2	11,75	8	11,85	13
BN3	1	B	3	11,55	10	10,65	17
AN0	1	A	0	12,25	2	11,75	11
BN2	2	B	2	11,90	19	11,75	6
BN3	2	B	3	11,95	12	10,90	15
AN0	2	A	0	11,80	6	11,80	4
BN0	2	B	0	12,25	9	12,00	5
BN1	2	B	1	11,70	6	12,20	2
BN3	3	B	3	11,75	8	11,70	13
AN0	3	A	0	12,05	4	11,70	8
BN0	3	B	0	11,70	6	11,95	11
BN1	3	B	1	11,80	17	12,00	6
BN2	3	B	2	11,80	4	12,00	15
CN0	1	C	0	12,35	9	12,15	18
CN1	1	C	1	12,00	3	12,05	10
CN2	1	C	2	11,80	3	11,85	2
CN3	1	C	3	11,95	8	11,30	12
AN3	1	A	3	12,05	6	11,60	8
CN3	2	C	3	11,75	13	11,65	9
AN3	2	A	3	11,85	5	11,55	18
CN0	2	C	0	11,85	4	11,65	24
CN1	2	C	1	11,95	4	11,75	16
CN2	2	C	2	11,90	9	11,85	13
AN3	3	A	3	11,95	6	11,75	7
CN0	3	C	0	11,75	8	11,60	4
CN1	3	C	1	11,95	14	11,70	11
CN2	3	C	2	12,10	8	11,45	12
CN3	3	C	3	11,90	10	11,55	14

**Priloga B5:** Vlažnost in okuženost pšeničnega zrnja s *Fusarium* spp. pri kultivarjih Savinja in Reska v odvisnosti od postopkov pridelovanja na lokaciji Jable v letu 2008; žetev 26. 7. 2008 (odstotki, %)

Obravnavanje	Blok	Sistem	Stopnje	Reska		Savinja	
				Vlaga (%)	<i>Fusarium</i> spp. (%)	Vlaga (%)	<i>Fusarium</i> spp. (%)
BN0	1	B	0	14,85	6	15,15	6
BN1	1	B	1	14,80	11	14,75	8
BN2	1	B	2	14,45	14	14,30	20
BN3	1	B	3	14,25	5	14,25	11
AN0	1	A	0	14,45	9	14,40	9
BN2	2	B	2	14,20	7	14,60	6
BN3	2	B	3	14,30	19	14,35	9
AN0	2	A	0	14,60	1	14,65	9
BN0	2	B	0	14,50	4	14,90	10
BN1	2	B	1	14,15	4	14,35	15
BN3	3	B	3	14,35	6	13,80	15
AN0	3	A	0	14,60	4	14,65	8
BN0	3	B	0	14,60	10	14,75	12
BN1	3	B	1	14,50	7	14,75	6
BN2	3	B	2	14,45	18	13,55	9
CN0	1	C	0	14,50	6	15,00	6
CN1	1	C	1	14,40	8	14,80	14
CN2	1	C	2	12,75	16	13,95	8
CN3	1	C	3	12,45	27	14,30	11
AN3	1	A	3	13,05	16	14,50	11
CN3	2	C	3	12,30	19	14,05	15
AN3	2	A	3	13,15	26	13,90	16
CN0	2	C	0	14,60	5	14,70	4
CN1	2	C	1	14,35	10	14,70	14
CN2	2	C	2	13,45	24	14,40	5
AN3	3	A	3	13,50	18	14,00	14
CN0	3	C	0	14,40	2	14,65	12
CN1	3	C	1	14,35	7	14,60	8
CN2	3	C	2	13,30	10	14,10	9
CN3	3	C	3	13,05	5	14,00	5



**Priloga B6:** Vlažnost in okuženost pšeničnega zrnja s *Fusarium* spp. pri kultivarjih Savinja in Reska v odvisnosti od postopkov pridelovanja na lokaciji Rakičan v letu 2008; žetev 16. 7. 2008 (odstotki, %)

Obravnavanje	Blok	Sistem	Stopnje	Reska		Savinja	
				Vlaga (%)	<i>Fusarium</i> spp. (%)	Vlaga (%)	<i>Fusarium</i> spp. (%)
BN0	1	B	0	17,05	9	17,45	21
BN1	1	B	1	17,90	9	17,50	29
BN2	1	B	2	17,75	36	18,05	35
BN3	1	B	3	17,95	34	17,05	45
AN0	1	A	0	16,90	8	17,30	28
BN2	2	B	2	17,70	32	17,10	9
BN3	2	B	3	16,15	13	16,85	35
AN0	2	A	0	16,90	35	17,50	14
BN0	2	B	0	17,55	12	16,95	22
BN1	2	B	1	17,10	24	17,50	30
BN3	3	B	3	15,90	13	16,45	27
AN0	3	A	0	16,65	12	16,95	22
BN0	3	B	0	16,90	13	17,10	7
BN1	3	B	1	16,75	32	17,15	28
BN2	3	B	2	17,05	43	17,05	24
CN0	1	C	0	16,85	11	17,15	17
CN1	1	C	1	16,45	33	17,75	22
CN2	1	C	2	16,80	22	17,55	26
CN3	1	C	3	14,70	15	18,95	46
AN3	1	A	3	15,25	17	17,00	39
CN3	2	C	3	15,45	23	15,85	33
AN3	2	A	3	15,05	5	17,75	32
CN0	2	C	0	17,00	10	17,45	14
CN1	2	C	1	16,55	15	18,05	18
CN2	2	C	2	16,10	19	18,30	28
AN3	3	A	3	15,70	11	17,60	18
CN0	3	C	0	16,80	4	17,45	14
CN1	3	C	1	16,95	12	17,60	10
CN2	3	C	2	15,35	14	17,20	32
CN3	3	C	3	14,25	20	17,25	33

**Priloga B7:** Okuženost pšeničnega zrnja s *Fusarium* spp. (v odstotkih, %) na lokaciji IOSDV Jable v letih 2006, 2007 in 2008 (po blokkih, s povprečji)

JABLE 2006

Obnavljanje	Reska				Savinja			
	blok I.	blok II.	blok III.	povpr.	blok I.	blok II.	blok III.	povpr.
AN0	4	4	7	5	5	4	10	6
AN3	14	13	22	16	16	4	13	11
BN0	12	12	20	15	18	13	9	13
BN1	20	4	4	9	11	5	6	7
BN2	26	16	30	24	7	14	5	9
BN3	20	14	6	13	7	2	3	4
CN0	5	4	8	6	18	5	15	13
CN1	4	9	5	6	10	9	11	10
CN2	25	23	7	18	11	6	19	12
CN3	26	9	17	17	5	5	26	12
povpr.	16	11	13	13	11	7	12	10

JABLE 2007

Obnavljanje	Reska				Savinja			
	blok I.	blok II.	blok III.	povpr.	blok I.	blok II.	blok III.	povpr.
AN0	6	5	12	8	13	7	12	11
AN3	9	13	15	12	14	10	11	12
BN0	6	7	10	8	6	11	5	7
BN1	5	10	14	10	21	10	9	13
BN2	6	12	16	11	12	12	10	11
BN3	6	14	15	12	14	24	10	16
CN0	5	2	1	3	7	8	10	8
CN1	20	6	10	12	10	5	14	10
CN2	15	14	13	14	8	5	10	8
CN3	28	8	12	16	1	10	9	7
povpr.	11	9	12	11	11	10	10	10

»se nadaljuje«

»nadaljevanje Priloge B7: Okuženost pšeničnega zrnja s *Fusarium* spp. (v odstotkih, %) na lokaciji IOSDV Jable v letih 2006, 2007 in 2008 (po blokih, s povprečji)«

JABLE 2007

Obravnavanje	Reska				Savinja			
	blok I.	blok II.	blok III.	povpr.	blok I.	blok II.	blok III.	povpr.
AN0	6	5	12	8	13	7	12	11
AN3	9	13	15	12	14	10	11	12
BN0	6	7	10	8	6	11	5	7
BN1	5	10	14	10	21	10	9	13
BN2	6	12	16	11	12	12	10	11
BN3	6	14	15	12	14	24	10	16
CN0	5	2	1	3	7	8	10	8
CN1	20	6	10	12	10	5	14	10
CN2	15	14	13	14	8	5	10	8
CN3	28	8	12	16	1	10	9	7
povpr.	11	9	12	11	11	10	10	10

**Priloga B8:** Okuženost pšeničnega zrnja s *Fusarium* spp. (v odstotkih, %) na lokaciji IOSDV Rakičan v letih 2006, 2007 in 2008 (po blokih, s povprečji)

RAKIČAN 2006

Obravnavanje	Reska				Savinja			
	blok I.	blok II.	blok III.	povpr.	blok I.	blok II.	blok III.	povpr.
AN0	44	24	30	33	38	18	16	24
AN3	30	53	60	48	43	26	81	50
BN0	46	9	40	32	25	28	56	36
BN1	25	24	46	32	23	16	32	24
BN2	61	23	67	50	32	46	49	42
BN3	38	22	47	36	81	50	77	69
CN0	43	15	48	35	21	47	54	41
CN1	50	29	58	46	23	75	54	51
CN2	76	64	67	69	60	40	64	55
CN3	66	36	67	56	67	68	54	63
povpr.	48	30	53	44	41	41	54	45

»se nadaljuje«

»nadaljevanje Priloge B8: Okuženost pšeničnega zrnja s *Fusarium* spp. (v odstotkih, %) na lokaciji IOSDV Rakičan v letih 2006, 2007 in 2008 (po blokiih, s povprečji)«

---

RAKIČAN 2007

Obravnavanje	Reska				Savinja			
	blok I.	blok II.	blok III.	povpr.	blok I.	blok II.	blok III.	povpr.
AN0	2	6	4	4	11	4	8	8
AN3	6	5	6	6	8	18	7	11
BN0	12	9	6	9	9	5	11	8
BN1	5	6	17	9	7	2	6	5
BN2	8	19	4	10	13	6	15	11
BN3	10	12	8	10	17	15	13	15
CN0	9	4	8	7	18	24	4	15
CN1	3	4	14	7	10	16	11	12
CN2	3	9	8	7	2	13	12	9
CN3	8	13	10	10	12	9	14	12
povpr.	7	9	9	8	11	11	10	11

RAKIČAN 2008

Obravnavanje	Reska				Savinja			
	blok I.	blok II.	blok III.	povpr.	blok I.	blok II.	blok III.	povpr.
AN0	8	13	12	11	28	14	22	21
AN3	17	5	11	11	39	32	18	30
BN0	9	12	13	11	21	22	7	17
BN1	9	24	32	22	29	30	28	29
BN2	36	32	43	37	35	9	24	23
BN3	34	13	13	20	45	35	27	36
CN0	11	10	4	8	17	14	14	15
CN1	33	15	12	20	22	18	10	17
CN2	22	19	14	18	26	28	32	29
CN3	15	23	20	19	46	33	33	37
povpr.	19	17	17	18	31	24	22	25

**Priloga B9:** Okuženost pšeničnega zrnja s *Fusarium* spp. (transformirane vrednosti) na lokaciji IOSDV Jable v letih 2006, 2007 in 2008 (po blokih, s povprečji)

JABLE 2006									Povprečje kultivarjev Reska in Savinja
Obrav- navanje	Reska				Savinja				Jable 2006
	blok I.	blok II.	blok III.	povpr.	blok I.	blok II.	blok III.	povpr.	
AN0	0,201	0,201	0,268	0,223	0,226	0,201	0,322	0,250	0,237
AN3	0,383	0,369	0,488	0,414	0,412	0,201	0,369	0,327	0,370
BN0	0,354	0,354	0,464	0,390	0,438	0,369	0,305	0,371	0,380
BN1	0,464	0,201	0,201	0,289	0,338	0,226	0,247	0,270	0,280
BN2	0,535	0,412	0,580	0,509	0,268	0,383	0,226	0,292	0,401
BN3	0,464	0,383	0,247	0,365	0,268	0,142	0,174	0,195	0,280
CN0	0,226	0,201	0,287	0,238	0,438	0,226	0,398	0,354	0,296
CN1	0,201	0,305	0,226	0,244	0,322	0,305	0,338	0,322	0,283
CN2	0,524	0,500	0,268	0,431	0,338	0,247	0,451	0,346	0,388
CN3	0,535	0,305	0,425	0,422	0,226	0,226	0,535	0,329	0,375
povpr.	0,389	0,323	0,345	0,352	0,327	0,253	0,336	0,305	0,329

JABLE 2007									Povprečje kultivarjev Reska in Savinja
Obrav- navanje	Reska				Savinja				Jable 2007
	blok I.	blok II.	blok III.	povpr.	blok I.	blok II.	blok III.	povpr.	
AN0	0,247	0,226	0,354	0,276	0,369	0,268	0,354	0,330	0,303
AN3	0,305	0,369	0,398	0,357	0,383	0,322	0,338	0,348	0,352
BN0	0,247	0,268	0,322	0,279	0,247	0,338	0,226	0,270	0,275
BN1	0,226	0,322	0,383	0,310	0,476	0,322	0,305	0,367	0,339
BN2	0,247	0,354	0,412	0,338	0,354	0,354	0,322	0,343	0,340
BN3	0,247	0,383	0,398	0,343	0,383	0,512	0,322	0,406	0,374
CN0	0,226	0,142	0,100	0,156	0,268	0,287	0,322	0,292	0,224
CN1	0,464	0,247	0,322	0,344	0,322	0,226	0,383	0,310	0,327
CN2	0,398	0,383	0,369	0,383	0,287	0,226	0,322	0,278	0,331
CN3	0,558	0,287	0,354	0,399	0,100	0,322	0,305	0,242	0,321
povpr.	0,316	0,298	0,341	0,319	0,319	0,317	0,320	0,319	0,319

»se nadaljuje«

»nadaljevanje Priloge B9: Okuženost pšeničnega zrnja s *Fusarium* spp. (transformirane vrednosti) na lokaciji IOSDV Jable v letih 2006, 2007 in 2008 (po blokkih, s povprečji)

Obrav- navanje	JABLE 2008								Povprečje kultivarjev Reska in Savinja
	Reska				Savinja				Jable 2008
	blok I.	blok II.	blok III.	povpr.	blok I.	blok II.	blok III.	povpr.	
AN0	0,305	0,100	0,201	0,202	0,305	0,305	0,287	0,299	0,250
AN3	0,412	0,535	0,438	0,462	0,338	0,412	0,383	0,378	0,420
BN0	0,247	0,201	0,322	0,257	0,247	0,322	0,354	0,308	0,282
BN1	0,338	0,201	0,268	0,269	0,287	0,398	0,247	0,311	0,290
BN2	0,383	0,268	0,438	0,363	0,464	0,247	0,305	0,339	0,351
BN3	0,226	0,451	0,247	0,308	0,338	0,305	0,398	0,347	0,327
CN0	0,247	0,226	0,142	0,205	0,247	0,201	0,354	0,268	0,236
CN1	0,287	0,322	0,268	0,292	0,383	0,383	0,287	0,351	0,322
CN2	0,412	0,512	0,322	0,415	0,287	0,226	0,305	0,272	0,344
CN3	0,546	0,451	0,226	0,408	0,338	0,398	0,226	0,320	0,364
povpr.	0,340	0,327	0,287	0,318	0,323	0,320	0,314	0,319	0,319

Priloga B10: Okuženost pšeničnega zrnja s *Fusarium* spp. (transformirane vrednosti) na lokaciji IOSDV Rakičan v letih 2006, 2007 in 2008 (po blokkih, s povprečji)

Obrav- navanje	RAKIČAN 2006								Povprečje kultivarjev Reska in Savinja
	Reska				Savinja				Rakičan 2006
	blok I.	blok II.	blok III.	povpr.	blok I.	blok II.	blok III.	povpr.	
AN0	0,725	0,512	0,580	0,606	0,664	0,438	0,412	0,505	0,555
AN3	0,580	0,815	0,886	0,760	0,715	0,535	1,120	0,790	0,775
BN0	0,745	0,305	0,685	0,578	0,524	0,558	0,846	0,642	0,610
BN1	0,524	0,512	0,745	0,594	0,500	0,412	0,601	0,504	0,549
BN2	0,896	0,500	0,959	0,785	0,601	0,745	0,775	0,707	0,746
BN3	0,664	0,488	0,755	0,636	1,120	0,785	1,071	0,992	0,814
CN0	0,715	0,398	0,765	0,626	0,476	0,755	0,825	0,686	0,656
CN1	0,785	0,569	0,866	0,740	0,500	1,047	0,825	0,791	0,765
CN2	1,059	0,927	0,959	0,982	0,886	0,685	0,927	0,833	0,907
CN3	0,948	0,644	0,959	0,850	0,959	0,970	0,825	0,918	0,884
povpr.	0,764	0,567	0,816	0,716	0,695	0,693	0,823	0,737	0,726

»se nadaljuje»



»nadaljevanje Priloge B10: Okuženost pšeničnega zrnja s *Fusarium* spp. (transformirane vrednosti) na lokaciji IOSDV Rakičan v letih 2006, 2007 in 2008 (po blokkih, s povprečji)

Obrav- nvanje	RAKIČAN 2007								Povprečje kultivarjev Reska in Savinja
	Reska				Savinja				Rakičan 2007
	blok I.	blok II.	blok III.	povpr.	blok I.	blok II.	blok III.	povpr.	
AN0	0,142	0,247	0,201	0,197	0,338	0,201	0,287	0,275	0,236
AN3	0,247	0,226	0,247	0,240	0,287	0,438	0,268	0,331	0,286
BN0	0,354	0,305	0,247	0,302	0,305	0,226	0,338	0,289	0,296
BN1	0,226	0,247	0,425	0,299	0,268	0,142	0,247	0,219	0,259
BN2	0,287	0,451	0,201	0,313	0,369	0,247	0,398	0,338	0,326
BN3	0,322	0,354	0,287	0,321	0,425	0,398	0,369	0,397	0,359
CN0	0,305	0,201	0,287	0,264	0,438	0,512	0,201	0,384	0,324
CN1	0,174	0,201	0,383	0,253	0,322	0,412	0,338	0,357	0,305
CN2	0,174	0,305	0,287	0,255	0,142	0,369	0,354	0,288	0,272
CN3	0,287	0,369	0,322	0,326	0,354	0,305	0,383	0,347	0,337
povpr.	0,252	0,291	0,289	0,277	0,325	0,325	0,318	0,323	0,300

Obrav- nvanje	RAKIČAN 2008								Povprečje kultivarjev Reska in Savinja
	Reska				Savinja				Rakičan 2008
	blok I.	blok II.	blok III.	povpr.	blok I.	blok II.	blok III.	povpr.	
AN0	0,287	0,369	0,354	0,336	0,558	0,383	0,488	0,476	0,406
AN3	0,425	0,226	0,338	0,330	0,674	0,601	0,438	0,571	0,450
BN0	0,305	0,354	0,369	0,342	0,476	0,488	0,268	0,411	0,377
BN1	0,305	0,512	0,601	0,473	0,569	0,580	0,558	0,569	0,521
BN2	0,644	0,601	0,715	0,653	0,633	0,305	0,512	0,483	0,568
BN3	0,623	0,369	0,369	0,453	0,735	0,633	0,546	0,638	0,546
CN0	0,338	0,322	0,201	0,287	0,425	0,383	0,383	0,397	0,342
CN1	0,612	0,398	0,354	0,454	0,488	0,438	0,322	0,416	0,435
CN2	0,488	0,451	0,383	0,441	0,535	0,558	0,601	0,565	0,503
CN3	0,398	0,500	0,464	0,454	0,745	0,612	0,612	0,656	0,555
povpr.	0,442	0,410	0,415	0,422	0,584	0,498	0,473	0,518	0,470

**Priloga C1:** Kontaminiranost pšenične moke kultivarjev Reska in Savinja z mikotoksinoma deoksinivalenol in (DON) in zearalenon (ZEA) na lokaciji IOSDV Jable v letu 2006 ( $\mu\text{g kg}^{-1}$  moke)\*

Jable 2006	Bela moka Reska			Bela moka Savinja			Črna moka Reska			Črna moka Savinja		
Obnavanje	Številka parcele (vzorca)	Vsebnost DON	Vsebnost ZEA	Številka parcele (vzorca)	Vsebnost DON	Vsebnost ZEA	Številka parcele (vzorca)	Vsebnost DON	Vsebnost ZEA	Številka parcele (vzorca)	Vsebnost DON	Vsebnost ZEA
BN 0	1	-	-	31	-	-	61	-	-	91	-	-
BN 2	3	-	-	33	-	-	63	-	-	93	-	-
AN 0	5	-	-	35	-	-	65	-	-	95	-	-
BN 2	6	-	-	36	-	-	66	-	-	96	-	-
AN 0	8	-	-	38	-	-	68	-	-	98	-	-
BN 0	9	-	-	39	-	-	69	-	-	99	-	-
AN 0	12	-	-	42	-	-	72	-	-	102	-	-
BN 0	13	-	-	43	-	-	73	-	-	103	-	-
BN 2	15	-	-	45	-	-	75	-	-	105	-	-
CN 0	16	-	-	46	-	-	76	-	-	106	-	-
CN 2	18	-	-	48	-	-	78	-	-	108	-	-
AN 3	20	-	-	50	-	-	80	-	-	110	-	-
AN 3	22	-	-	52	-	-	82	-	-	112	-	-
CN 0	23	-	-	53	-	-	83	-	-	113	-	-
CN 2	25	-	-	55	-	-	85	-	-	115	-	-
AN 3	26	-	-	56	-	-	86	-	-	116	-	-
CN 0	27	-	-	57	-	-	87	-	-	117	-	-
CN 2	29	-	-	59	-	-	89	-	-	119	-	-

\*prikazane so vrednosti, višje od meje detekcije: za DON vrednosti višje od  $200 \mu\text{g kg}^{-1}$  moke ter za ZEA vrednosti višje od  $5 \mu\text{g kg}^{-1}$  moke; nižje vrednosti so označene z -, kar pomeni manj kot  $5 \mu\text{g kg}^{-1}$  moke za ZEA in manj kot  $200 \mu\text{g kg}^{-1}$  moke za DON

**Priloga C2:** Kontaminiranost pšeničnega zrnja kultivarjev Reska in Savinja z mikotoksinoma deoksinivalenol (DON) in zearalenon (ZEA) na lokaciji IOSDV Rakičan v letu 2006 ( $\mu\text{g kg}^{-1}$  moke)\*

Rakičan 2006	Bela moka Reska			Bela moka Savinja			Črna moka Reska			Črna moka Savinja		
	Obravnavanje	Številka parcele (vzorca)	Vsebnost DON	Vsebnost ZEA	Številka parcele (vzorca)	Vsebnost DON	Vsebnost ZEA	Številka parcele (vzorca)	Vsebnost DON	Vsebnost ZEA	Številka parcele (vzorca)	Vsebnost DON
BN 0	121	250	-	151	-	-	181	-	-	211	-	-
BN 2	123	-	-	153	-	-	183	360	-	213	-	-
AN 0	125	-	-	155	-	-	185	-	-	215	-	-
BN 2	126	-	-	156	-	-	186	670	-	216	-	-
AN 0	128	-	-	158	-	-	188	-	-	218	-	-
BN 0	129	-	-	159	-	-	189	-	-	219	-	-
AN 0	132	-	-	162	-	-	192	-	-	222	-	-
BN 0	133	-	-	163	-	-	193	-	-	223	-	-
BN 2	135	-	-	165	-	-	195	290	-	225	-	-
CN 0	136	-	-	166	-	-	196	-	-	226	-	-
CN 2	138	-	-	168	-	-	198	300	-	228	-	-
AN 3	140	-	-	170	-	-	200	-	-	230	-	-
AN 3	142	-	-	172	-	-	202	-	-	232	-	-
CN 0	143	-	-	173	-	-	203	-	-	233	-	-
CN 2	145	-	-	175	-	-	205	350	-	235	-	-
AN 3	146	-	-	176	-	-	206	-	-	236	-	-
CN 0	147	-	-	177	-	-	207	-	-	237	-	-
CN 2	149	-	-	179	-	-	209	300	-	239	-	-

\*prikazane so vrednosti, višje od meje detekcije: za DON vrednosti višje od  $200 \mu\text{g kg}^{-1}$  moke ter za ZEA vrednosti višje od  $5 \mu\text{g kg}^{-1}$  moke; nižje vrednosti so označene z -, kar pomeni manj kot  $5 \mu\text{g kg}^{-1}$  moke za ZEA in manj kot  $200 \mu\text{g kg}^{-1}$  moke za DON

**Priloga C3:** Kontaminiranost pšeničnega zrnja kultivarjev Reska in Savinja z mikotoksinoma deoksinivalenol (DON) in zearalenon (ZEA) na lokaciji IOSDV Jable v letu 2008 ( $\mu\text{g kg}^{-1}$  moke)\*

Jable 2008	Bela moka Reska			Bela moka Savinja			Črna moka Reska			Črna moka Savinja		
Obravnavanje	Številka parcele (vzorca)	Vsebnost DON	Vsebnost ZEA	Številka parcele (vzorca)	Vsebnost DON	Vsebnost ZEA	Številka parcele (vzorca)	Vsebnost DON	Vsebnost ZEA	Številka parcele (vzorca)	Vsebnost DON	Vsebnost ZEA
BN 0	1	-	-	31	-	-	61	-	14	91	-	-
BN 2	3	250	-	33	330	-	63	630	16	93	220	18
AN 0	5	-	-	35	-	-	65	-	-	95	-	-
BN 2	6	-	-	36	270	-	66	260	19	96	-	-
AN 0	8	-	-	38	-	-	68	-	-	98	-	-
BN 0	9	-	-	39	-	-	69	-	-	99	-	-
AN 0	12	-	-	42	-	-	72	-	-	102	-	-
BN 0	13	-	-	43	-	-	73	-	-	103	-	-
BN 2	15	670	-	45	530	7	75	1000	79	105	500	44
CN 0	16	-	-	46	-	-	76	-	-	106	-	22
CN 2	18	570	-	48	-	-	78	670	22	108	-	6
AN 3	20	-	-	50	-	-	80	-	-	110	-	-
AN 3	22	-	-	52	-	-	82	-	-	112	-	-
CN 0	23	-	-	53	-	-	83	-	-	113	-	-
CN 2	25	300	-	55	-	-	85	280	13	115	-	-
AN 3	26	-	-	56	-	-	86	-	-	116	-	-
CN 0	27	-	-	57	-	-	87	-	-	117	-	-
CN 2	29	280	-	59	-	-	89	250	-	119	-	-

\*prikazane so vrednosti, višje od meje detekcije: za DON vrednosti višje od  $200 \mu\text{g kg}^{-1}$  moke ter za ZEA vrednosti, višje od  $5 \mu\text{g kg}^{-1}$  moke; nižje vrednosti so označene z -, kar pomeni manj kot  $5 \mu\text{g kg}^{-1}$  moke za ZEA in manj kot  $200 \mu\text{g kg}^{-1}$  moke za DON

**Priloga C4:** Kontaminiranost pšeničnega zrnja kultivarjev Reska in Savinja z mikotoksinoma deoksinivalenol (DON) in zearalenon (ZEA) na lokaciji IOSDV Rakičan v letu 2008 ( $\mu\text{g kg}^{-1}$  moke)\*

Rakičan 2008	Bela moka Reska			Bela moka Savinja			Črna moka Reska			Črna moka Savinja		
	Številka parcele (vzorca)	Vsebnost DON	Vsebnost	Številka parcele (vzorca)	Vsebnost DON	Vsebnost	Številka parcele (vzorca)	Vsebnost DON	Vsebnost	Številka parcele (vzorca)	Vsebnost DON	Vsebnost
BN 0	121	-	-	151	-	-	181	-	-	211	-	-
BN 2	123	-	-	153	-	-	183	-	-	213	-	-
AN 0	125	-	-	155	-	-	185	-	-	215	-	-
BN 2	126	-	-	156	-	-	186	-	-	216	-	-
AN 0	128	-	-	158	-	-	188	-	-	218	-	-
BN 0	129	-	-	159	-	-	189	-	-	219	-	-
AN 0	132	-	-	162	-	-	192	-	-	222	-	-
BN 0	133	-	-	163	-	-	193	-	-	223	-	-
BN 2	135	-	-	165	-	-	195	-	-	225	-	-
CN 0	136	-	-	166	-	-	196	-	-	226	-	-
CN 2	138	-	-	168	-	-	198	-	-	228	-	6
AN 3	140	-	-	170	-	-	200	-	-	230	-	-
AN 3	142	-	-	172	-	-	202	-	-	232	-	-
CN 0	143	-	-	173	-	-	203	-	-	233	-	-
CN 2	145	-	-	175	-	-	205	-	-	235	-	-
AN 3	146	-	-	176	-	-	206	-	-	236	-	-
CN 0	147	-	-	177	-	-	207	-	-	237	-	-
CN 2	149	-	-	179	-	-	209	-	-	239	-	-

\*prikazane so vrednosti, višje od meje detekcije: za DON vrednosti višje od  $200 \mu\text{g kg}^{-1}$  moke ter za ZEA vrednosti višje od  $5 \mu\text{g kg}^{-1}$  moke; nižje vrednosti so označene z -, kar pomeni manj kot  $5 \mu\text{g kg}^{-1}$  moke za ZEA in manj kot  $200 \mu\text{g kg}^{-1}$  moke za DON