

Oznaka poročila: ARRS-CRP-ZP-2018/38

ZAKLJUČNO POROČILO O REZULTATIH CILJNEGA RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

1. Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

Šifra projekta	V4-1403	
Naslov projekta	POJAVLJANJE NOVIH TOKSIČNIH SUBSTANC V SLOVENSKI KRMI EMERGING TOXIC SUBSTANCES IN THE SLOVENIAN FEED	
Vodja projekta	18592 Breda Jakovac Strajn	
Naziv težišča v okviru CRP	1.01.03 Pojavljanje novih toksičnih substanc v slovenski krmi	
Obseg učinkovitih ur raziskovalnega dela	1096	
Cenovna kategorija	C	
Obdobje trajanja projekta	07.2014 - 06.2017	
Nosilna raziskovalna organizacija	510	Univerza v Ljubljani
	406	Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta
Raziskovalne organizacije - soizvajalke	481	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta
	489	Emona, Razvojni center za prehrano, d.o.o.
Raziskovalno področje po šifrantu ARRS	4	BIOTEHNIKA
	4.03	Rastlinska produkcija in predelava
	4.03.01	Kmetijske rastline
Družbeno-ekonomski cilj	08.	Kmetijstvo
Raziskovalno področje po šifrantu FORD/FOS	4	Kmetijske vede in veterina
	4.01	Kmetijstvo, gozdarstvo in ribištvo

2. Sofinancerji

	Sofinancerji	
1.	Naziv	
	Naslov	

B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

3. Povzetek raziskovalnega projekta¹

SLO

V projektu smo proučevali ergot alkaloidne oziroma alkaloidne rženega rožička in mikotoksine, ki jih izločajo glive iz rodu *Alternaria*. V Sloveniji nismo imeli podatkov o njihovi razširjenosti. V letih od 2014 do 2016 smo na vsebnost ergot alkaloidov in alternarijskih toksinov preiskali 542 vzorcev. Analizirali smo vzorce žit (185 pšenica, 113 ječmen, 89 tritikala, 31 rž, 18 pira in 15 oves), obroke za govedo (19) in njihove posamezne sestavine (70) ter obroke za prašiče (2).

S 37 različnih lokacij po Sloveniji smo s samoniklih trav in žit pobrali 113 vzorcev rženega rožička.

Največ pozitivnih vzorcev na ergot alkaloidne je bilo v letu 2014 (47 %), najmanj pa leta 2016 (9 %). V vzorcih smo dokazali vseh 12 ergot alkaloidov. Največ vzorcev (19 %) je vsebovalo ergozinin (0,001–16,194 mg/kg), ergozin (17%; 0,001–0,625) in ergokristinin (17%; 0,01–0,856 mg/kg).

147 vzorcev oziroma 27 % je vsebovalo enega ali več alternarijskih toksinov. Največ pozitivnih vzorcev je bilo leta 2014 (35 %) in najmanj leta 2016 (20 %). Koncentracije celokupnih alternarijskih toksinov so bile od 0,015–3,205 mg/kg. Ugotovili smo, da ne obstaja povezava (korelacija) med stopnjo okuženosti zrnja in vsebnostjo alternarijskih mikotoksinov.

Vzorci, v katerih smo potrdili ergot alkaloidne smo preiskali na vsebnost sklerocijev. Sklerocije smo našli le pri 41,7 % vzorcev, ki so vsebovali ergot alkaloidne. Rezultat pripisujemo nehomogenosti vzorčenja in priprave vzorca ter ugotovitvi, da so sklerociji večinoma (razen pri rži) pripadali plevelnim travam. Povprečna masa sklerocijev v onesnaženih vzorcih je bila 0,25 g/kg.

Na kmetijah, kjer so imeli težave z gangrenami repov, smo vzorčili obroke in posamična krmila. Pregledali smo 8 kmetij in skupno odvzeli 17 obrokov. Skupaj s posameznimi sestavinami za obroke je bilo vseh vzorcev 85. Ugotovljene koncentracije so premajhne, da bi povzročale takšne klinične znake.

Pri molekularni identifikaciji predstavnikov rodu *Alternaria* smo uspešno pomnožili in sekvencirali 34 vzorcev, ki so bili izolirani iz tritikale, rži, pire, ovsa, ječmena in pšenice. Genetska raznolikost je bila sorazmerno nizka, saj je večina izolatov kazala veliko podobnost med seboj in z vrstama *Alternaria alternata* in *Alternaria tenuissima*. Molekularne analize sklerocijev iz samoniklih in gojenih vrst trav iz osmih različnih regij v Sloveniji so pokazale porazdelitev v tri genetske skupine z nekaj preferencami za specifične taksonomske skupine gostitelja. Na podlagi rezultatov se zdi, da *C. purpurea* kaže nizko preferenco do vrstno specifičnega gostitelja.

Preventivni ukrepi za zmanjšanje onesnaženja z alternarijskimi toksini so dobra kmetijska in skladiščna praksa, pri ergot alkaloidih pa se je potrebno zavedati tudi, da so okužene samonikle trave na robovih njiv pomemben vir okužb.

ANG

Within the project, ergot alkaloids and mycotoxins produced by fungi of the genus *Alternaria* were studied. So far, there were no data on their prevalence in Slovenia.

In the years 2014–2016, 542 samples were examined for ergot alkaloids and *Alternaria* toxins. The samples of cereals (185 wheat, 113 barley, 89 triticale, 31 rye, 18 spelt and 15 oat samples), rations for cattle (19) and their individual components (70), as well as rations for pigs (2) were analysed.

At 37 locations in Slovenia, 113 samples of rye ergot were collected from self-grown grass species and cereals.

Samples were most frequently contaminated with ergot alkaloids in 2014 (47%) and least frequently in 2016 (9%). All 12 ergot alkaloids were found in the samples. Most of the samples (19%) contained ergosinine (0.001–16.194 mg/kg), ergosine (17%; 0.001–0.625) and ergocristinine (17%; 0.01–0.856 mg/kg).

In total, 147 samples (27%) contained one or more *Alternaria* toxins. Most positive samples were found in 2014 (35%) and least in 2016 (20%). The concentrations of total *Alternaria* toxins were 0.015–3.205 mg/kg. No correlation between grain contamination rates and the content of *Alternaria* toxins was observed.

The samples in which ergot alkaloids were detected were examined for the sclerotium content. Sclerotia were found in only 41.7% of the samples containing ergot alkaloids. The result is attributed to the inhomogeneity of sampling and the preparation of the sample and to the fact that sclerotia belonged mainly to weeds (except in rye). The average content of sclerotia in contaminated samples was 0.25 g/kg.

On the farms where problems with tail tip necrosis appeared, meals and feed materials were sampled. Altogether, eight farms were examined and 17 meals were collected. Together with meal ingredients, in total 85 samples were inspected. However, the determined concentrations are too low to produce such clinical signs.

Within the molecular identification of the representatives of the genus *Alternaria*, 34 samples isolated from triticale, rye, spelt, oat, barley and wheat were amplified and sequenced. Genetic diversity was relatively low, as most isolates showed a high degree of similarity among themselves and towards *Alternaria alternata* and *Alternaria tenuissima*.

Molecular analysis of sclerotia from self-grown and cultivated grass species from eight different regions of Slovenia showed a distribution in three genetic groups. On the basis of the results, *C. purpurea* appears to show a low preference to a species-specific host.

Preventive measures for reducing the contamination with *Alternaria* toxins are good agricultural and storage practice, while with ergot alkaloids it should be also noted that the infected grass at the edges of fields is an important source of infection.

4. Poročilo o realizaciji predloženega programa dela oz. ciljev raziskovalnega projekta²

Planirali smo 5 ciljev, ki smo jih izpolnili.

Cilj 1/5: Uvesti laboratorijske kemijske metode za določanje glavnih ergot alkaloidov (ergometrin, ergotamin, ergozin, ergokristin, ergokriptin in ergokornin ter njihovi -inini) in toksinov, ki jih izločajo glive iz rodu *Alternaria* (tenuazojska kislina, TeA; alternariol monometil eter, AME, alternariol, ALT in tentoksin, TT)

- V skladu s planom dela smo na Veterinarski fakulteti Univerze v Ljubljani razvili metode za določanje ergot alkaloidov in alternarijskih toksinov s tehniko LC MS/MS.

- Usposobili smo se za določevanje 12 ergot alkaloidov (ergometrin, ergotamin, ergozin, ergokristin, ergokriptin in ergokornin ter njihovi -inini) in štirih alternarijskih toksinov (tenuazojska kislina, alternariol, alternariol monometil eter in tentoksin).

- Opisana tehnika LC MS/MS je primerna za določanje ergot alkaloidov in alternarijskih toksinov. Metodo za ergot alkaloido smo tudi validirali in akreditirali.

Cilj 2/5: Oceniti obseg pojavljanja alkaloidov in prisotnost ter razširjenost gliv *Claviceps purpurea* in *Alternaria* spp. v Sloveniji

- Planirali smo odvzem 50 vzorcev trav in žit na leto, skupaj torej 150 vzorcev, dejansko pa smo jih odvzeli 384; 217 vzorcev žit in 167 trav. Plan smo presegli za 156 %.

- Na travnikih oziroma pašnikih smo prvi v Sloveniji dokazali okužbo trav z rženim rožičkom.

- Po vizualnem pregledu vzorcev žit smo ugotovili, da večina rožičkov (razen pri rži) ne izvira iz okuženega žita, temveč od okuženih samoniklih trav, ki rastejo kot plevel med žitom. Iz tega sledi, da bomo morali v prihodnje več pozornosti posvetiti izboljšanju metod za učinkovito čiščenje žitnega zrnja po žetvi, tudi tistega namenjenega krmi za živali, kar pa do sedaj ni bila ustaljena praksa.

- Sklerocije smo našli le pri 41,7% vzorcev, ki so vsebovali ergot alkaloido. Rezultat

pripisujemo nehomogenosti vzorčenja in priprave vzorca ter ugotovitvi, da so sklerociji večinoma pripadali plevelnim travam. Povprečna masa ni presegala dovoljenih mejnih vrednosti 1g/kg.

- Z ergot alkaloidi je bila najbolj kontaminirana pšenica, sledi ji rž. Pšenica je vsebovala vse epimere ergot alkaloidov, rž pa večinoma ergokristin.

- V vseh letih sta bila z alternarijskimi toksini najbolj kontaminirana pira in oves, ki sta vsebovala največ alternariola in tenuazojske kisline. Najmanj je bila z alternarijskimi toksini kontaminirana pšenica.

Cilj 3/5: Ugotoviti povezave in vplive prisotnosti ergot alkaloidov in alternarijskih toksinov na težave v nekaterih intenzivnih rejah govejih pitancev

- v planu dela smo opisali tudi spremljanje zdravstvenega stanja živali, odvzem urina in krvi. Tega po enem letu nismo več opravljali, ker v obrokih nismo dokazali ergot alkaloidov.

- V planu smo imeli dve reji in skupno predvideno število vzorcev je v vsaki reji 20 na leto, se pravi končno 120. Analizirali smo 85 vzorcev.

V času prijave projekta smo bili prepričani, da bomo v rejah govejih pitancev, kjer se pojavljajo gangrene repov, v obrokih dokazali ergot alkaloidov. Po zaključku projekta menimo, da temu ni tako, čeprav smo v nekaj obrokih dokazali nizke koncentracije ergot alkaloidov. Ugotovljene koncentracije so premajhne, da bi povzročale takšne klinične znake, poleg tega pa naslednje leto kljub kliničnim znakom ergot alkaloidov nismo več našli. Mogoče so ergot alkaloidi eden od dejavnikov, ki samo pripomorejo k pojavljanju kliničnih znakov, glede na to, da smo pri rejcih, kjer imajo te težave, potrdili prisotnost sklerocijev na travnikih.

Cilj 4/5: Pridobiti podatke o prisotnosti alkaloidov rženih rožičkov v žitih in voluminozni krmi, pridelanih v Sloveniji ter ugotoviti njihovo povezanost s prisotnostjo sklerocija

- V planu smo imeli odvzem 210 vzorcev iz mešalnic, odvzeli smo jih 232

- Pšenica, ječmen in tritikala so bili najbolj kontaminirani z ergot alkaloidi leta 2014. Leta 2016 je bila kontaminirana samo pšenica, v ostalih vzorcih žit EA nismo ugotovili. Rž je bila najbolj kontaminirana leta 2015. Od vseh pregledanih žit je bil najmanj kontaminiran ječmen, saj je bilo kontaminiranih le 16,67% in sicer samo v letu 2014.

- V vseh treh letih je bilo največ ergozinina in sicer v rži (7,814 mg/kg). Rž je bila najbolj kontaminirano žito, sledi ji tritikala, nato pa pšenica. Najmanj kontaminiran je bil ječmen.

- Z alternarijskimi toksini je bila najbolj kontaminirana rž, ki je vsebovala največ tenuazojske kisline. Največ tenuazojske kisline je vsebovala tudi tritikala. Najmanj je bil z alternarijskimi toksini kontaminiran ječmen.

- Molekularne analize sklerocijev iz divjih in gojenih vrst trav iz osmih različnih regij v Sloveniji so pokazale porazdelitev v tri genetske skupine z nekaj preferencami za specifične taksonomske skupine gostitelja. Na podlagi rezultatov se zdi, da *C. purpurea* kaže nizko preferenco do gostitelja.

- Pri različnih genetskih skupinah smo ugotovili tudi nekaj razlik v sestavi EA. Različne genetske skupine kažejo določene preference za individualne gostiteljeve taksonomske tribuse, kar se kaže tudi v tem, da so določeni EA bolj značilni za določene skupine trav. Naši izsledki se skladajo s hipotezami drugih avtorjev, ki so ugotovili, da nastanek specifičnih EA ni pod vplivom gostiteljske vrste trave, temveč lahko gostitelj vpliva na razmerje med posameznimi alkaloidi. Kljub temu, se zdi, da so razlike v sestavi EA pri različnih gostiteljih bolj posledica kolonizacije s specifičnimi genetskimi skupinami glive *C. purpurea*. To podpirajo tudi rezultati statistične analize.

- Pri povezovanju rezultatov molekularnih analiz sklerocijev in vsebnosti ergot alkaloidov je včasih nastopila težava, ker so bili sklerociji trav majhni in jih ni bilo dovolj za kemijske analize.

Cilj 5/5: Oblikovati navodila in predloge za zmanjšanje tveganja pojavljanja ergot alkaloidov in toksinov, ki jih izločajo glive iz rodu *Alternaria*

Preventivni ukrepi in varstvo pred rženim rožičkom (*Claviceps purpurea* /Fr./ Tul)

Preventivni ukrepi in varstvo pred alternarijskimi toksini

5. Ocena stopnje realizacije programa dela na raziskovalnem projektu in zastavljenih raziskovalnih ciljev³

V projektu smo si zastavili štiri delovne hipoteze.

1. Tehnika LC MS/MS je primerna za določanje ergot alkaloidov in alternarijskih toksinov.
2. Vsebnosti ergot alkaloidov v sklerocijih bodo primerljive s podatki iz literature in različne glede na gostiteljsko rastlino.
3. Travniki oziroma pašniki v Sloveniji niso okuženi z glivo rženega rožička.
4. V rejah govejih pitancev, kjer se pojavljajo gangrene repov, bomo v obrokih dokazali ergot alkaloida.

Od štirih delovnih hipotez smo 2 potrdili in 2 ovrgli.

1. S tem projektom smo pridobili prve podatke o koncentraciji ergot alkaloidov in alternarijskih toksinov v žitih v Sloveniji.
2. Predvidevali smo, da na travnikih ali pašnikih v Sloveniji ne bomo našli sklerocijev (hipoteza 3). To trditev smo ovrgli in dokazali okužbo trav z rženim rožičkom.
3. Opisana tehnika LC MS/MS je primerna za določanje ergot alkaloidov in alternarijskih toksinov (potrditev hipoteze 1). Metodo za ergot alkaloida smo tudi validirali in akreditirali.
4. Vsebnosti ergot alkaloidov v sklerocijih so primerljive s podatki iz literature in različne glede na gostiteljsko rastlino (potrditev hipoteze 2).
5. Predvidevali smo, da bomo v rejah govejih pitancev, kjer se pojavljajo gangrene repov, v obrokih dokazali ergot alkaloida. Ugotovljene koncentracije so premajhne, da bi povzročale takšne klinične znake, poleg tega pa nismo ergot alkaloidov potrdili v vseh rejah. Mogoče so ergot alkaloidi eden od dejavnikov, ki samo pripomorejo k pojavljanju kliničnih znakov, glede na to, da smo pri rejcih, kjer imajo te težave, potrdili prisotnost sklerocijev na travnikih (delno smo ovrgli hipotezo 4).
6. Ugotovili smo, da ne obstaja nikakršna povezava (korelacija) med stopnjo okuženosti zrnja z vsebnostjo alternarijskih mikotoksinov. Pri enaki okuženosti zrnja je lahko vsebnost mikotoksinov zelo različna oziroma pri različni okuženosti enaka. To velja tako za posamezna žita kot za vsa žita skupaj.
7. Rezultati o onesnaženosti žit z ergot alkaloidi in alternarijskimi mikotoksini ter vsebnost ergot alkaloidov v sklerocijih se po letih razlikujejo. Po zaključku projekta ne moremo podati jasnih odgovorov, katero žito je v Sloveniji najbolj onesnaženo in s katerimi ergot alkaloidi ali alternarijskimi mikotoksini. V letu 2014 je bilo v sklerocijih ugotovljeno največ ergokristina, najmanj pa ergometrinina. V letu 2015 je bilo v rožičkih trav največ ergozina in ergokristina, najmanj pa ergometrinina.

6. Spremembe programa dela raziskovalnega projekta oziroma spremembe sestave projektne skupine⁴

V času izvedbe projekta ni bilo bistvenih odstopanj ali sprememb od predvidenega programa raziskovalnega projekta.

Člani projektne skupine so bili med projektom stalni, razen tehnične sodelavke, ki ji je delovno razmerje sporazumno prenehalo 31.12.2016.

7. Najpomembnejši dosežki projektne skupine na raziskovalnem področju⁵

	Dosežek		
1.	COBISS ID	3656328	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Pojavnost ergot alkaloidov v Sloveniji v letu 2014
		ANG	THE INCIDENCE OF ERGOT ALKALOIDS IN SLOVENIA 2014
			Raziskav o vsebnosti ergot alkaloidov na gojenih žitih in samoniklih travah v Sloveniji do sedaj ni bilo. Leta 2014 smo zato na 37 različnih lokacijah

	Dosežek		
	Opis	SLO	odvzeli 113 vzorcev različnih trav in 70 vzorcev žit na različnih odkupnih mestih po Sloveniji. Rženi rožiček smo dokazali na 22 samoniklih vrstah trav iz 15 rodov. Ugotovljena vsebnost skupnih ergot alkaloidov v sklerocijih je bila od 1059 do 4200 mg/kg. Vzorce smo analizirali na 12 različnih ergot alkaloidov: ergometrin, ergotamin, ergozin, ergokristin, ergokriptin, ergokornin in njihove -inine. V vzorcih žit smo ergot alkaloida dokazali v 26 % vzorcev (0,01 do 3,99 mg/kg).
		ANG	So far, there was no research on the presence of ergot alkaloids in cultivated cereals and wild grasses in Slovenia. Therefore, 113 samples of various grasses were taken at 37 different locations and 70 cereal samples at various purchase points in Slovenia. Sclerotia were found in 22 wild grass species from 15 different genera. The total alkaloid content in sclerotia was in the range from 1059 to 4200 mg/kg. Samples were analyzed on 12 different ergot alkaloids: ergometrine, ergotamine, ergosine, ergocristine, ergocryptine, ergocornine and their -inines. Regarding the cereal samples, ergot alkaloids were detected in 26% of the samples (0.01 to 3.99 mg/kg).
	Objavljeno v		Kmetijsko gozdarska zbornica Slovenije, Kmetijsko gozdarski zavod; Zbornik predavanj; 2015; Str. 53-58; Avtorji / Authors: Jakovac-Strajn Breda, Tavčar-Kalcher Gabrijela, Kos Katarina, Červak Matjaž, Celar Franci Aco
	Tipologija		1.08 Objavljeni znanstveni prispevek na konferenci
2.	COBISS ID		4361338 Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Pojavljanje ergot alkaloidov v pšenici iz Albanije
		ANG	Occurrence of ergot alkaloids in wheat from Albania
	Opis	SLO	The occurrence of ergot alkaloids in wheat harvested in Albania was investigated. A total of 71 samples of winter wheat collected in 2014 and 2015 were analysed for the 12 most important ergot alkaloids using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. In the harvesting year 2014, 48.6% of samples were contaminated with ergot alkaloids, whereas in 2015 only 19.4% of samples were contaminated.
		ANG	Raziskali smo pojavljanje alkaloidov ergot pri pšenici, pridelanih v Albaniji. Skupno smo na 12 najpomembnejših ergot alkaloidov analizirali 71 vzorcev zimske pšenice, zbranih v letih 2014 in 2015. Uporabili smo tehniko tekočinske kromatografije s tandemsko masno spektrometrijo. V letu 2014 je bilo 48,6% vzorcev onesnaženih z ergot alkaloidi, medtem ko je bilo v letu 2015 onesnaženih samo 19,4% vzorcev.
	Objavljeno v		Taylor & Francis; Food additives & contaminants. Part A., Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment; 2017; Vol. 34, no. 8; str. 1333-1343; Impact Factor: 2.047; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 1.703; WoS: DW, JY, YO; Avtorji / Authors: Topi Dritan, Jakovac-Strajn Breda, Pavšič Vrtač Katarina, Tavčar-Kalcher Gabrijela
	Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek
3.	COBISS ID		3896442 Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Nekroze repov pri govejih pitancih
		ANG	TAIL TIP NECROSIS IN FATTENING BULLS
	Opis	SLO	Nekroze repov se najpogosteje pojavljajo pri govejih pitancih težjih od 300 kg. Bolezensko stanje se začne z vnetjem in nekrozo na konici repa, ki postopno napreduje po repu navzgor. Prizadete živali imajo povišano temperaturo, postanejo neješčje, se težko gibljejo ter pogosto tudi obležijo. Bolezen lahko povzročijo različni dejavniki. Pogosteje se pojavlja v poletnih mesecih, predvsem v hlevih z veliko koncentracijo živali in rejah na rešetkah, ter v rejah kjer živali v večjem številu šepajo. K pojavu

Dosežek		
		bolezni prispevajo tudi mikotoksini ter pomanjkanje strukturne vlaknine v krmi. Zaradi predčasne izločitve živali, nižjih klavnih tež in stroškov zdravljenja bolezni povzroči v reji veliko gospodarsko škodo. Pred nekaj leti se je bolezen pojavila v nekaterih velikih rejah govejih pitancev v Sloveniji.
	ANG	Tail tip necrosis occurs most frequently in fattening bulls weighing more than 300 kg. A disease condition begins with inflammation and necrosis at the tip of the tail, which gradually progresses up the tail. Affected animals get fever, become inappetent, have difficulties to move and often get recumbent. The disease can be caused by various factors. Frequently occurs in the summer months, especially in the stables with a high concentration of animals and slatted floor, and the farms where the animals have a problem with lameness. The presence of mycotoxins in feed and the lack of structural fibre contribute to the disease. The disease can cause significant economic loss due to the premature culling of animals, lower carcass weights and the cost of treatment. A few years ago, the disease has occurred in some large farms of fattening bulls in Slovenia.
Objavljeno v		Kmetijsko gozdarska zbornica Slovenije, Kmetijsko gozdarski zavod; Zbornik predavanj; 2014; Str. 69-71; Avtorji / Authors: Ježek Jožica, Jakovac-Strajn Breda, Mis Matija, Puhan Jože, Matavž Jože, Starič Jože
Tipologija		1.08 Objavljeni znanstveni prispevek na konferenci

8. Najpomembnejši dosežek projektne skupine na področju gospodarstva, družbenih in kulturnih dejavnosti⁶

Dosežek		
1.	COBISS ID	4256890 Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO Koncentracije alkaloidov rožička v sklerocijih na travah
		ANG Ergot alkaloid content in sclerotia from grass
	Opis	SLO V naši raziskavi smo analizirali 23 vzorcev sklerocijev, izoliranih s trav, zbranih na različnih lokacijah po Sloveniji. V vseh sklerocijih so bili prisotni vsi omenjeni alkaloidi. Najnižje so bile koncentracije ergometrinina (0,90–43,5 mg/kg, povprečje 12,6 mg/kg) in ergokorninina (0,79–132 mg/kg, povprečje 37,2 mg/kg), najvišje pa koncentracije ergokristina (24,5–1495 mg/kg, povprečje 755 mg/kg), ergozina (30,2–942 mg/kg, povprečje 459 mg/kg) in ergozinina (16,0–906 mg/kg, povprečje 410 mg/kg). Koncentracija skupnih alkaloidov v sklerocijih je bila 1060–4200 mg/kg. Če bi bile te trave uporabljene za krmo (seno, silaža), bi v primeru, ko bi vsebovale 1 000 mg rženega rožička na kg, bila skupna koncentracija alkaloidov rožička med 1,06 mg/kg in 4,2 mg/kg.
		ANG In our study, 23 ergot samples, isolated from grass, collected in different locations in Slovenia were analysed. In all sclerotia, all examined alkaloids were present. The lowest concentrations were determined with ergometrinine (0.90–43.5 mg/kg, mean 12.6 mg/kg) and ergocorninine (0.79–132 mg/kg, mean 37.2 mg/kg) while the highest concentrations were determined with ergocristine (24.5–1495 mg/kg, mean 755 mg/kg), ergosine (30.2–942 mg/kg, mean 459 mg/kg) and ergosinine (16.0–906 mg/kg, mean 410 mg/kg). The total alkaloid content in sclerotia was in the range 1060–4200 mg/kg. If these grasses were used as feed (hay, silage) and contained 1 000 mg of rye ergot per kg, the total concentration of ergot alkaloids would be between 1.06 mg/kg and 4.2 mg/kg.
Šifra		B.03 Referat na mednarodni znanstveni konferenci
Veterinarska fakulteta; 6. Slovenski veterinarski kongres 2016; Slovenian veterinary research; 2016; Str. 270-271; Impact Factor: 0.250; Srednja		

	Dosežek		
	Objavljeno v	vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 1.047; WoS: ZC; Avtorji / Authors: Tavčar-Kalcher Gabrijela, Celar Franci Aco, Kos Katarina, Pavšič Vrtač Katarina, Grandič Marjana, Jakovac-Strajn Breda	
	Tipologija	1.12 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci	
2.	COBISS ID	8304249	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Pojavnost rženega rožička (<i>Claviceps purpurea</i> (Fr.) Tul.) v Sloveniji na vrstah iz družine trav (Poaceae) v letu 2014
		ANG	The incidence of ergot (<i>Claviceps purpurea</i> (Fr.) Tul.) in the species of the grass family (Poaceae) in Slovenia 2014
	Opis	SLO	Sklerociji rženega rožička vsebujejo strupene spojine, poznane kot ergot alkaloidi. Ti alkaloidi so strupeni za ljudi in živali. Namen naše raziskave je bil ugotoviti razširjenost rženega rožička na žitih in travah v Sloveniji. Leta 2014 smo na 37 različnih lokacijah z žit in trav pobrali 116 vzorcev rženega rožička. Prisoten je bil na 22 samoniklih vrstah trav iz 15 rodov (<i>Elyrtigia</i> , <i>Agrostis</i> , <i>Alopecurus</i> , <i>Arrhenatherum</i> , <i>Brachypodium</i> , <i>Bromus</i> , <i>Calamagrostis</i> , <i>Dactylis</i> , <i>Festuca</i> , <i>Holcus</i> , <i>Lolium</i> , <i>Molinia</i> , <i>Phalaris</i> , <i>Phleum</i> in <i>Sesleria</i>). V vzorcih zrnja krmnih žit pa smo našli rožičke tudi na rži, tritikali, pšenici in piri.
		ANG	The ergot sclerotia contain poisonous compounds known as ergot-alkaloids. These alkaloids are toxic to humans and animals. The aim of our research was to assess the prevalence of ergot in cereals and grasses in Slovenia. In year 2014, at 37 different locations, 116 samples of ergot sclerotia were collected in cereals and grasses. Ergot was present in 22 wild species from 15 genera of grasses (<i>Elyrtigia</i> , <i>Agrostis</i> , <i>Alopecurus</i> , <i>Arrhenatherum</i> , <i>Brachypodium</i> , <i>Bromus</i> , <i>Calamagrostis</i> , <i>Dactylis</i> , <i>Festuca</i> , <i>Holcus</i> , <i>Lolium</i> , <i>Molinia</i> , <i>Phalaris</i> , <i>Phleum</i> and <i>Sesleria</i>). In samples of feed grain, we find ergot in rye, triticale, wheat and spelt.
	Šifra	B.03 Referat na mednarodni znanstveni konferenci	
	Objavljeno v	Društvo za varstvo rastlin Slovenije = Plant Protection Society of Slovenia; Zbornik predavanj in referatov 12. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin z mednarodno udeležbo, Ptuj, 3.-4. marec 2015; 2015; Str. 206-210; Avtorji / Authors: Celar Franci Aco, Eler Klemen, Jakovac-Strajn Breda, Kos Katarina	
	Tipologija	1.08 Objavljeni znanstveni prispevek na konferenci	

9. Drugi pomembni rezultati projektne skupine⁷

Konec leta 2017 so nam sprejeli v objavo originalni znanstveni članek, ki še ni zaveden v COBISS.

Links between genetic groups, host specificity, and ergot-alkaloid profiles within *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. on Slovenian grasses

Dr. Matevž Likar, Dr. Marjana Grandič, Dr. Breda Jakovac Strajn, Dr. Katarina Kos, and Prof. Franci Celar

Plant Disease, Volume 0, Number ja

<https://doi.org/10.1094/PDIS-08-17-1179-RE>

The screening study explored the genetic relationships and ergot-alkaloid production of the fungus *C. purpurea* on grasses, in order to determine any associations between grass host specificity, ergot-alkaloid production, and geographic origin. Molecular analysis showed three *C. purpurea* genetic groups, with some associations with specific grass host. As, these show different ergot-alkaloid compositions, ergot-alkaloid composition in plant hosts can vary significantly.

V študiji smo preverili povezavo med genetsko diverziteto glive *C. purpurea* in njeno proizvodnjo ergot-alkaloidov. Naš namen je bil raziskati povezavo med rastlinskimi gostitelji,

proizvodnjo ergot-alkaloidov in geografsko razširjenostjo. Molekularne raziskave so pokazale obstoj različnih genetskih skupin *C. purpurea*, ki so kazale določeno preferenco do rastlinskih gostiteljev. Posamezne genetske skupine *C. purpurea* so se razlikovale tudi v sestavi ergot-alkaloidov, kar posledično pomeni, da lahko njihova sestava in koncentracijo močno variira med različnimi rastlinskimi gostitelji.

10. Pomen raziskovalnih rezultatov projektne skupine⁸

10.1. Pomen za razvoj znanosti⁹

SLO

Direktiva 2002/32/ES Evropskega parlamenta in Sveta z dne 7. maja 2002 o nezaželenih snoveh v živalski krmi prepoveduje uporabo proizvodov, namenjenih za živalsko krmo, pri katerih vrednosti nezaželenih snovi presegajo mejne vrednosti iz Priloge I k navedeni direktivi. Za krmo, ki vsebuje nezmleta žita, je bila za sklerocij rženega rožička (*Claviceps purpurea*) določena mejna vrednost 1000 mg/kg.

V zadnjih letih je postalo jasno, da je fizična določitev stopnje onesnaženosti žita z rženim rožičkom pogosto nenatančna, saj se velikost in teža posameznih sklerocijev lahko znatno razlikujeta. Poleg tega je stopnjo onesnaženosti nemogoče določiti v predelani krmi in hrani. Zato je predlagano, da se poleg nadzora potencialno onesnažene krme in hrane s fizičnimi metodami omogoči tudi nadzor s kemičnimi analizami, saj je na razpolago več kromatografskih metod za določanje alkaloidov rožičkov v krmi in hrani. Z namenom boljšega poznavanja razmerja med vsebnostjo sklerocija in ravni posameznega alkaloida rožička je smiselno njuno sočasno določevanje (EFSA, 2012).

Druga skupina toksinov, ki pridobiva na pomembnosti, so mikotoksini gliv iz rodu *Alternaria*. EFSA je za to skupino mikotoksinov leta 2011 izdelala mnenje, v katerem navaja, da so presnovki omenjenih gliv škodljivi za živali in ljudi, vendar je premalo podatkov, da bi lahko postavili varne meje.

Zaradi vsega navedenega smo v tem projektu najprej uvedli laboratorijsko kemijsko metodo s tehniko LC MS/MS za določanje glavnih ergot alkaloidov (ergometrin, ergotamin, ergozin, ergokristin, ergokriptin in ergokornin ter njihovi -inini) in toksinov, ki jih izločajo glive iz rodu *Alternaria* (tenuazajska kislina, tentoksin, alternariol in alternariol monometil eter). Metodo za določanje ergot alkaloidov smo tudi akreditirali.

V letih od 2014 do 2016 smo na vsebnost ergot alkaloidov in alternarijskih toksinov preiskali 542 vzorcev.

ANG

Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council of 7 May 2002 on undesirable substances in animal feed forbids the use of products intended for animal feed in which the levels of undesirable substances exceed the limits laid down in Annex I to the Directive. For feed containing unground cereals, a maximum content of rye ergot (*Claviceps purpurea*) in feed was set at 1000 mg/kg.

In recent years, it become clear that the physical determination of the degree of infection of grains is often imprecise, as the size and weight of individual sclerotia can vary significantly. In addition, the level of infection cannot be determined in processed feed and food. It is therefore proposed that in addition to the control of potentially contaminated feed and food by physical methods, chemical analysis shall be used. However, several chromatographic methods for determination of ergot alkaloids in feed and food are available. In order to understand the relationship between the content of sclerotia and the level of ergot alkaloids better, it is appropriate to determine both of them (EFSA, 2012).

Another important group of emerging mycotoxins are toxins produced by fungi of the genus *Alternaria*. For this group of mycotoxins, the EFSA issued an opinion in 2011 stating that the metabolites of these fungi are harmful to animals and humans, but there are not enough data to set up safe limits.

For all these reasons, a chemical analytical method using LC-MS/MS for the determination of the main ergot alkaloids (ergometrine, ergotamine, ergosine, ergocristine, ergocriptine and ergocornine as well as their -inine epimers) and an LC-MS/MS method for the determination of *Alternaria* toxins (tenuazonic acid, tentoxin, alternariol and alternariol monomethyl ether) were introduced within the project. Further, the method for the determination of ergot alkaloids got accredited.

In the years 2014–2016, 542 samples were examined for ergot alkaloids and Alternaria toxins.

10.2. Pomen za razvoj Slovenije¹⁰

SLO

V projektu smo proučevali ergot alkaloidne oziroma alkaloidne rženega rožička in mikotoksine, ki jih izločajo glive iz rodu *Alternaria*. V Sloveniji nismo imeli podatkov o njihovi razširjenosti. V letih od 2014 do 2016 smo na vsebnost ergot alkaloidov in alternarijskih toksinov preiskali 542 vzorcev. Analizirali smo vzorce žit (185 pšenica, 113 ječmen, 89 tritikala, 31 rž, 18 pira in 15 oves), obroke za govedo (19) in njihove posamezne sestavine (70) ter obroke za prašiče (2). Vzorci žit so bili odvzeti na odkupnih mestih slovenskih mešalnic in pri slovenskih pridelovalcih žit.

S 37 različnih lokacij po Sloveniji smo s samoniklih trav in žit pobrali 113 vzorcev rženega rožička.

Iz rezultatov našega projekta se jasno vidi, da je bilo v letu 2014 največ mikotoksinov. Po vremenskih podatkih je to leto v količini povprečnih padavin odstopalo od povprečja. Padavin je bilo vsaj za desetino več kot v dolgoletnem povprečju.

Preventivni ukrepi za zmanjšanje onesnaženja z alternarijskimi toksini so dobra kmetijska in skladiščna praksa, pri ergot alkaloidih pa se je potrebno zavedati tudi, da so okužene samonikle trave na robovih njiv pomemben vir okužb. Pred cvetenjem žit jih je potrebno pokositi oziroma odstraniti. Travnike in pašnike v okolici pridelovalnih površin je potrebno pokositi oziroma popasti še pred cvetenjem. Do zdaj pri nas ni običajna praksa, da bi žita, ki so namenjena krmi, po žetvi dodatno prečistili v čistilnikih. Vendar bi s tem ukrepom močno zmanjšali potencialno nevarnost, ki jo predstavljajo morebitni rženi rožički v zrnju.

ANG

Within the project, ergot alkaloids and mycotoxins produced by fungi of the genus *Alternaria* were studied. So far, there were no data on their prevalence in Slovenia.

In the years 2014–2016, 542 samples were examined for ergot alkaloids and Alternaria toxins.

The samples of cereals (185 wheat, 113 barley, 89 triticale, 31 rye, 18 spelt and 15 oat samples), rations for cattle (19) and their individual components (70), as well as rations for pigs (2) were analysed. Cereal samples were taken at purchase points of Slovenian feed plants and at cereal producing farms.

At 37 locations in Slovenia, 113 samples of rye ergot were collected from self-grown grass species and cereals.

It is clear from the results of our project that in 2014 the mycotoxin occurrence rate was the highest. According to weather data, the 2014 average precipitation amount departed from the long-term average, i.e. it was at least for one tenth higher than the long-term average. Preventive measures for reducing the contamination with Alternaria toxins are good agricultural and storage practice, while with ergot alkaloids it should be also noted that the infected grass at the edges of fields is an important source of infection. They must be cut or removed before the flowering time of cereals. Also, meadows and pastures in the vicinity of cultivated areas should be cut or got pastured before flowering time. Until now, after-harvest cleaning of grains intended for feed was no common practice. However, this measure would significantly reduce the potential danger posed by the presence of rye ergot in grains.

11.Vpetost raziskovalnih rezultatov projektne skupine

11.1. Vpetost raziskave v domače okolje

Kje obstaja verjetnost, da bodo vaša znanstvena spoznanja deležna zaznavnega odziva?

☐ 1 v domačih znanstvenih krogih

☐ 2 pri domačih uporabnikih

Kdo (poleg sofinancerjev) že izraža interes po vaših spoznanjih oziroma rezultatih?¹¹

Svetovalne službe na terenu, rejci živali, veterinarji. Podatki so zanimiva tudi za EFSA.

11.2. Vpetost raziskave v tuje okolje

Kje obstaja verjetnost, da bodo vaša znanstvena spoznanja deležna zaznavnega odziva?

☐ 1 v mednarodnih znanstvenih krogih

☐ 2 pri mednarodnih uporabnikih

Navedite število in obliko formalnega raziskovalnega sodelovanja s tujini raziskovalnimi inštitucijami:^{1,2}

V času trajanja projekta je bil v našem laboratoriju na učiteljski izmenjavi ERAZMUS kolega iz Univerze v Tirani. Razvoj metode smo takoj prenesli v njegovo okolje in objavili članek o pojavljanju ergot alkaloidov v Albaniji.

Kateri so rezultati tovrstnega sodelovanja:^{1,3}

Skupni objavljeni članek.

12. Označite, katerega od navedenih ciljev ste si zastavili pri projektu, katere konkretne rezultate ste dosegli in v kakšni meri so doseženi rezultati uporabljeni

Cilj		
F.01	Pridobitev novih praktičnih znanj, informacij in veščin	
	Zastavljen cilj	DA ☐ DA ☐ NE ☐ NE ☐
	Rezultat	Dosežen ☐
	Uporaba rezultatov	V celoti ☐
F.02	Pridobitev novih znanstvenih spoznanj	
	Zastavljen cilj	DA ☐ DA ☐ NE ☐ NE ☐
	Rezultat	Dosežen ☐
	Uporaba rezultatov	V celoti ☐
F.03	Večja usposobljenost raziskovalno-razvojnega osebja	
	Zastavljen cilj	DA ☐ DA ☐ NE ☐ NE ☐
	Rezultat	Dosežen ☐
	Uporaba rezultatov	V celoti ☐
F.04	Dvig tehnološke ravni	
	Zastavljen cilj	DA ☐ DA ☐ NE ☐ NE ☐
	Rezultat	☐
	Uporaba rezultatov	☐
F.05	Sposobnost za začetek novega tehnološkega razvoja	
	Zastavljen cilj	DA ☐ DA ☐ NE ☐ NE ☐
	Rezultat	☐
	Uporaba rezultatov	☐
F.06	Razvoj novega izdelka	
	Zastavljen cilj	DA ☐ DA ☐ NE ☐ NE ☐
	Rezultat	☐

	Uporaba rezultatov	
F.07	Izboljšanje obstoječega izdelka	
	Zastavljen cilj	DA NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.08	Razvoj in izdelava prototipa	
	Zastavljen cilj	DA NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.09	Razvoj novega tehnološkega procesa oz. tehnologije	
	Zastavljen cilj	DA NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.10	Izboljšanje obstoječega tehnološkega procesa oz. tehnologije	
	Zastavljen cilj	DA NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.11	Razvoj nove storitve	
	Zastavljen cilj	DA NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	V celoti
F.12	Izboljšanje obstoječe storitve	
	Zastavljen cilj	DA NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	V celoti
F.13	Razvoj novih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov	
	Zastavljen cilj	DA NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	V celoti
F.14	Izboljšanje obstoječih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov	
	Zastavljen cilj	DA NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.15	Razvoj novega informacijskega sistema/podatkovnih baz	
	Zastavljen cilj	DA NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	

F.16	Izboljšanje obstoječega informacijskega sistema/podatkovnih baz	
	Zastavljen cilj	DA ☐ DA ☐ NE ☐ NE ☐
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.17	Prenos obstoječih tehnologij, znanj, metod in postopkov v prakso	
	Zastavljen cilj	DA ☐ DA ☐ NE ☐ NE ☐
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	V celoti
F.18	Posredovanje novih znanj neposrednim uporabnikom (seminarji, forumi, konference)	
	Zastavljen cilj	DA ☐ DA ☐ NE ☐ NE ☐
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	V celoti
F.19	Znanje, ki vodi k ustanovitvi novega podjetja ("spin off")	
	Zastavljen cilj	DA ☐ DA ☐ NE ☐ NE ☐
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.20	Ustanovitev novega podjetja ("spin off")	
	Zastavljen cilj	DA ☐ DA ☐ NE ☐ NE ☐
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.21	Razvoj novih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	
	Zastavljen cilj	DA ☐ DA ☐ NE ☐ NE ☐
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	V celoti
F.22	Izboljšanje obstoječih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	
	Zastavljen cilj	DA ☐ DA ☐ NE ☐ NE ☐
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.23	Razvoj novih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev	
	Zastavljen cilj	DA ☐ DA ☐ NE ☐ NE ☐
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.24	Izboljšanje obstoječih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev	
	Zastavljen cilj	DA ☐ DA ☐ NE ☐ NE ☐
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.25	Razvoj novih organizacijskih in upravljaljskih rešitev	

	Zastavljen cilj	DA DA NE NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.26	Izboljšanje obstoječih organizacijskih in upravljavskih rešitev	
	Zastavljen cilj	DA DA NE NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.27	Prispevek k ohranjanju/varovanju naravne in kulturne dediščine	
	Zastavljen cilj	DA DA NE NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	Delno
F.28	Priprava/organizacija razstave	
	Zastavljen cilj	DA DA NE NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.29	Prispevek k razvoju nacionalne kulturne identitete	
	Zastavljen cilj	DA DA NE NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.30	Strokovna ocena stanja	
	Zastavljen cilj	DA DA NE NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	V celoti
F.31	Razvoj standardov	
	Zastavljen cilj	DA DA NE NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.32	Mednarodni patent	
	Zastavljen cilj	DA DA NE NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.33	Patent v Sloveniji	
	Zastavljen cilj	DA DA NE NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.34	Svetovalna dejavnost	
	Zastavljen cilj	DA DA NE NE

	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	Delno
F.35	Drugo	
	Zastavljen cilj	DA DA NE NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	

Komentar

--

13. Označite potencialne vplive oziroma učinke vaših rezultatov na navedena področja

	Vpliv	Ni vpliva	Majhen vpliv	Srednji vpliv	Velik vpliv	
G.01	Razvoj visokošolskega izobraževanja					
G.01.01.	Razvoj dodiplomskega izobraževanja	1	2	3	4	
G.01.02.	Razvoj podiplomskega izobraževanja	1	2	3	4	
G.01.03.	Drugo:	1	2	3	4	
G.02	Gospodarski razvoj					
G.02.01	Razširitev ponudbe novih izdelkov/storitev na trgu	1	2	3	4	
G.02.02.	Širitev obstoječih trgov	1	2	3	4	
G.02.03.	Znižanje stroškov proizvodnje	1	2	3	4	
G.02.04.	Zmanjšanje porabe materialov in energije	1	2	3	4	
G.02.05.	Razširitev področja dejavnosti	1	2	3	4	
G.02.06.	Večja konkurenčna sposobnost	1	2	3	4	
G.02.07.	Večji delež izvoza	1	2	3	4	
G.02.08.	Povečanje dobička	1	2	3	4	
G.02.09.	Nova delovna mesta	1	2	3	4	
G.02.10.	Dvig izobrazbene strukture zaposlenih	1	2	3	4	
G.02.11.	Nov investicijski zagon	1	2	3	4	
G.02.12.	Drugo:	1	2	3	4	
G.03	Tehnološki razvoj					
G.03.01.	Tehnološka razširitev/posodobitev dejavnosti	1	2	3	4	
G.03.02.	Tehnološko prestrukturiranje dejavnosti	1	2	3	4	
G.03.03.	Uvajanje novih tehnologij	1	2	3	4	
G.03.04.	Drugo:	1	2	3	4	
G.04	Družbeni razvoj					
G.04.01	Dvig kvalitete življenja	1	2	3	4	
G.04.02.	Izboljšanje vodenja in upravljanja	1	2	3	4	
G.04.03.	Izboljšanje delovanja administracije in javne uprave	1	2	3	4	

G.04.04.	Razvoj socialnih dejavnosti	1	2	3	4	
G.04.05.	Razvoj civilne družbe	1	2	3	4	
G.04.06.	Drugo:	1	2	3	4	
G.05.	Ohranjanje in razvoj nacionalne naravne in kulturne dediščine in identitete	1	2	3	4	
G.06.	Varovanje okolja in trajnostni razvoj	1	2	3	4	
G.07	Razvoj družbene infrastrukture					
G.07.01.	Informacijsko-komunikacijska infrastruktura	1	2	3	4	
G.07.02.	Prometna infrastruktura	1	2	3	4	
G.07.03.	Energetska infrastruktura	1	2	3	4	
G.07.04.	Drugo:	1	2	3	4	
G.08.	Varovanje zdravja in razvoj zdravstvenega varstva	1	2	3	4	
G.09.	Drugo:	1	2	3	4	

Komentar**14. Naslov spletne strani za projekte, odobrene na podlagi javnih razpisov za sofinanciranje raziskovalnih projektov za leti 2015 in 2016¹⁴**

Projekt nima svoje spletne strani, ker je bil odobren leta 2014, trajal pa je do 2017.

C. IZJAVE

Podpisani izjavljam/o, da:

- so vsi podatki, ki jih navajamo v poročilu, resnični in točni;
- se strinjamo z obdelavo podatkov v skladu z zakonodajo o varstvu osebnih podatkov za potrebe ocenjevanja in obdelavo teh podatkov za evidence ARRS;
- so vsi podatki v obrazcu v elektronski obliki identični podatkom v obrazcu v pisni obliki (v primeru, da poročilo ne bo oddano z digitalnima podpisoma);
- so z vsebino zaključnega poročila seznanjeni in se strinjajo vsi soizvajalci projekta;
- bomo sofinancerjem istočasno z zaključnim poročilom predložili tudi elaborat na zgoščenki (CD), ki ga bomo posredovali po pošti, skladno z zahtevami sofinancerjev.

Podpisi:

*zastopnik oz. pooblaščen oseba
raziskovalne organizacije:*

in

vodja raziskovalnega projekta:

Univerza v Ljubljani, Veterinarska
fakulteta

Breda Jakovac Strajn

ŽIG

Datum:

13.3.2018

Oznaka poročila: ARRS-CRP-ZP-2018/38

- ¹ Napišite povzetek raziskovalnega projekta (največ 3.000 znakov v slovenskem in angleškem jeziku). [Nazaj](#)
- ² Navedite cilje iz prijave projekta in napišite, ali so bili cilji projekta doseženi. Navedite ključne ugotovitve, znanstvena spoznanja, rezultate in učinke raziskovalnega projekta in njihovo uporabo ter sodelovanje s tujimi partnerji. Največ 12.000 znakov vključno s presledki (približno dve strani, velikost pisave 11). [Nazaj](#)
- ³ Realizacija raziskovalne hipoteze. Največ 3.000 znakov vključno s presledki (približno pol strani, velikost pisave 11). [Nazaj](#)
- ⁴ Navedite morebitna bistvena odstopanja in spremembe od predvidenega programa dela raziskovalnega projekta, zapisanega v prijavi raziskovalnega projekta. Navedite in utemeljite tudi spremembe sestave projektne skupine v zadnjem letu izvajanja projekta (t. j. v letu 2016). Če sprememb ni bilo, navedite »Ni bilo sprememb«. Največ 6.000 znakov vključno s presledki (približno ena stran, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)
- ⁵ Navedite dosežke na raziskovalnem področju (največ deset), ki so nastali v okviru tega projekta.

Raziskovalni dosežek iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka – sistem nato sam izpolni naslov objave, naziv, IF in srednjo vrednost revije, naziv FOS področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A'' ali A'. [Nazaj](#)
- ⁶ Navedite dosežke na področju gospodarstva, družbenih in kulturnih dejavnosti (največ pet), ki so nastali v okviru tega projekta.

Dosežek iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka, sistem nato sam izpolni podatke, manjkajoče rubrike o dosežku pa izpolnite.

Dosežek na področju gospodarstva, družbenih in kulturnih dejavnosti je po svoji strukturi drugačen kot znanstveni dosežek. Povzetek znanstvenega dosežka je praviloma povzetek bibliografske enote (članka, knjige), v kateri je dosežek objavljen.

Povzetek dosežka na področju gospodarstva, družbenih in kulturnih dejavnosti praviloma ni povzetek bibliografske enote, ki ta dosežek dokumentira, ker je dosežek sklop več rezultatov raziskovanja, ki je lahko dokumentiran v različnih bibliografskih enotah. COBISS ID zato ni enoznačen izjemoma pa ga lahko tudi ni (npr. prehod mlajših sodelavcev v gospodarstvo na pomembnih raziskovalnih nalogah, ali ustanovitev podjetja kot rezultat projekta ... - v obeh primerih ni COBISS ID). [Nazaj](#)
- ⁷ Navedite rezultate raziskovalnega projekta iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) v primeru, da katerega od rezultatov ni mogoče navesti v točkah 7 in 8 (npr. v sistemu COBISS rezultat ni evidentiran). Največ 2.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)
- ⁸ Pomen raziskovalnih rezultatov za razvoj znanosti in za razvoj Slovenije bo objavljen na spletni strani: <http://sicris.izum.si/> za posamezen projekt, ki je predmet poročanja. [Nazaj](#)
- ⁹ Največ 4.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)
- ¹⁰ Največ 4.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)
- ¹¹ Največ 500 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)
- ¹² Največ 500 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)
- ¹³ Največ 1.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)
- ¹⁴ Izvajalec mora za projekte, odobrene na podlagi Javnega razpisa za izbiro raziskovalnih projektov Ciljnega raziskovalnega programa »CRP 2016« v letu 2016 in Javnega razpisa za izbiro raziskovalnih projektov Ciljnega raziskovalnega programa »Zagotovimo.si hrano za jutri« v letu 2016, na spletnem mestu svoje RO odpreti posebno spletno stran, ki je namenjena projektu. Obvezne vsebine spletne strani so: vsebinski opis projekta z osnovnimi podatki glede financiranja, sestava projektne skupine s povezavami na SICRIS, faze projekta in njihova realizacija, bibliografske reference, ki izhajajo neposredno iz izvajanja projekta ter logotip ARRS in drugih sofinancerjev. Spletna stran mora ostati aktivna še 5 let po zaključku projekta. [Nazaj](#)

Obrazec: ARRS-CRP-ZP/2018 v1.00

1B-7B-07-7C-34-C8-75-61-B5-F3-24-49-95-81-62-93-64-3D-37-41

POJAVLJANJE NOVIH TOKSIČNIH SUBSTANC V SLOVENSKI KRMI

EMERGING TOXIC SUBSTANCES IN THE SLOVENIAN FEED

Poročilo pripravili: ^{1*}Breda Jakovac Strajn, ¹Gabrijela Tavčar Kalcher, ¹Marjana Grandič,
²Franci Aco Celar, ²Katarina Kos, ²Matevž Likar, ³Matjaž Červek

¹Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, Gerbičeva 60, 1000 Ljubljana; ²Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva ulica 101, 1000 Ljubljana; ³Emona RCP, Kavčičeva ulica 72, 1000 Ljubljana.

*Odgovorna oseba: Breda.JakovacStrajn@vf.uni-lj.si

Povzetek

V projektu smo proučevali ergot alkaloidne oziroma alkaloidne rženega rožička in mikotoksine, ki jih izločajo glive iz rodu *Alternaria*. V Sloveniji nismo imeli podatkov o njihovi razširjenosti.

Ergot alkaloidne izločajo različne vrste gliv, ki pripadajo redovoma *Hypocreales* in *Eurotiales*. Iz redu *Hypocreales* so poznane vrste glive rodu *Claviceps*, med njimi pa je v Evropi najbolj razširjena gliva *Claviceps purpurea* ali rženi rožiček. Gliva najraje okužuje rž, sicer pa tudi druge gospodarsko pomembne vrste iz družine trav (*Poaceae*), npr. tritikalo, pšenico, ječmen in bolj poredko oves ter številne samonikle in sejane trave. Za okužbo so bolj dovzetne tujeprašne vrste in tiste, ki cvetijo bolj odprto in daljši čas.

Izraz rožiček se nanaša na glivno strukturo vrste *Claviceps*, ki se razvije namesto zrn na žitnem klasu/latu ali semen trav in je videti kot velik temno obarvani sklerocij. Navedeni sklerocij vsebuje različne razrede alkaloidov, med katerimi so najpomembnejši ergometrin, ergotamin, ergozin, ergokristin, ergokriptin in ergokornin ter njihovi -inini. Čeprav so epimerne oblike (-inini) biološko inaktivne, pa se lahko pod različnimi pogoji spremenijo v aktivne oblike. Opisanih je več kot 50 različnih ergot alkaloidov, vendar se pri kemijskih analizah večinoma osredotočamo na prej omenjene. Količina in vzorec toksina se razlikujeta glede na vrsto glive, poleg tega pa sta odvisna tudi od rastline gostiteljice in geografske regije. Zato je pri pridobivanju podatkov izredno pomembno, da povežemo prisotnost alkaloidov rožička s količino prisotnega sklerocija (EFSA, 2012). Veljavna zakonodaja za krmo se nanaša samo na vsebnost sklerocija.

Direktiva 2002/32/ES Evropskega parlamenta in Sveta z dne 7. maja 2002 o nezaželenih snoveh v živalski krmi prepoveduje uporabo proizvodov, namenjenih za živalsko krmo, pri katerih vrednosti nezaželenih snovi presegajo mejne vrednosti iz Priloge I k navedeni direktivi. Za krmo, ki vsebuje nezmlata žita, je bila za sklerocij rženega rožička (*Claviceps purpurea*) določena mejna vrednost 1000 mg/kg.

V zadnjih letih je postalo jasno, da je fizična določitev stopnje onesnaženosti žita z rženim rožičkom pogosto nenatančna, saj se velikost in teža posameznih sklerocijev lahko znatno razlikujeta. Poleg tega je stopnjo onesnaženosti nemogoče določiti v predelani krmi in hrani. Zato je predlagano, da se poleg nadzora potencialno onesnažene krme in hrane s fizičnimi

metodami omogoči tudi nadzor s kemičnimi analizami, saj je na razpolago več kromatografskih metod za določanje alkaloidov rožičkov v krmi in hrani. Z namenom boljšega poznavanja razmerja med vsebnostjo sklerocija in ravniyo posameznega alkaloida rožička je smiselno njuno sočasno določevanje (EFSA, 2012).

Druga skupina toksinov, ki pridobiva na pomembnosti, so mikotoksini gliv iz rodu *Alternaria*. EFSA je za to skupino mikotoksinov leta 2011 izdelala mnenje, v katerem navaja, da so presnovki omenjenih gliv škodljivi za živali in ljudi, vendar je premalo podatkov, da bi lahko postavili varne meje.

Glive tega rodu so glavni kontaminanti pšenice, ječmena in sirka (Deshpande, 2002), čeprav jih najdemo tudi na drugih žitih in koruzi. Razen na žitih najdemo *Alternaria* vrste tudi na semenih oljnic (sončnica, oljna repica), paradižniku, jabolkih, oljkah in številnih drugih vrstah sadja in zelenjave. Glive so sposobne rasti tudi pri nizkih temperaturah, zato lahko povzročajo kvarjenje pridelkov tudi med prevozom in skladiščenjem.

Vrste *Alternaria* spp. tvorijo več kot 70 sekundarnih metabolitov, ki so toksični za rastline, vendar je le majhen delež le teh strupen tudi za ljudi in živali. Gliva *Alternaria alternata* je najbolj pogosta vrsta, ki jo najdemo na skladiščnem sadju, zelenjavi in žitnem zrnju ter je hkrati najpomembnejša tvorka mikotoksinov. Nekateri gostiteljsko nespecifični toksini, kot so alternariol, alternariol monometil eter, tenuazajska kislina in alvertoksini so omenjeni kot povzročitelji škodljivih učinkov pri sesalcih (Barkai-Golan, 2008). Za nekatere gostiteljsko specifične toksine, kot so AAL-toksini, ki imajo odločilno vlogo pri povzročanju rastlinskih bolezni, toksičnost za živali še ni popolnoma raziskana. Tvorba toksinov pri *Alternaria* vrstah je odvisna od seva, rastnega substrata in okoljskih dejavnikov (Barkai-Golan, 2008). Ugotovljeno je bilo, da vrste *Alternaria* lahko tvorijo toksine na naravnih in umetnih substratih, če je vsebnost vode v njih nad 25-30 %, za rast micelija pa je optimalen pH med 4 in 6,6, medtem ko je celotni razpon pH od 2,7 do 8.

V Sloveniji smo v zadnjih petih letih v intenzivnih rejah govejih pitancev opazili klinična znamenja, ki jih do sedaj nismo poznali: gangrene repov, gangrene skrotuma, razpokane in odlomljene rogove, šepanje in v končni fazi, kljub zdravljenju, pogin živali. V takšnih rejah smo izločili možnost kužnih povzročiteljev bolezni ter dejavnikov okolja in se na koncu osredotočili na prehrano. Opisane spremembe bi lahko povzročali mikotoksini oziroma alkaloidi saprofitskih in endofitskih gliv, ki jih do sedaj v Sloveniji še nismo določali.

Zaradi vsega navedenega smo v tem projektu najprej uvedli laboratorijsko kemijsko metodo s tehniko LC MS/MS za določanje glavnih ergot alkaloidov (ergometrin, ergotamin, ergozin, ergokristin, ergokriptin in ergokornin ter njihovi -inini) in toksinov, ki jih izločajo glive iz rodu *Alternaria* (tenuazajska kislina, tentoksin, alternariol in alternariol monometil eter). Metodo za določanje ergot alkaloidov smo tudi akreditirali.

V letih od 2014 do 2016 smo na vsebnost ergot alkaloidov in alternarijskih toksinov preiskali 542 vzorcev.

Analizirali smo vzorce žit (185 pšenica, 113 ječmen, 89 tritikala, 31 rž, 18 pira in 15 oves), obroke za govedo (19) in njihove posamezne sestavine (70) ter obroke za prašiče (2). Vzorci žit so bili odvzeti na odkupnih mestih slovenskih mešalnic in pri slovenskih pridelovalcih žit.

S 37 različnih lokacij po Sloveniji smo s samoniklih trav in žit pobrali 113 vzorcev rženega rožička. Ker je bilo nekaterih sklerocijev premalo ali pa so bili tako majhni, da jih ni bilo dovolj za analizo, smo vsega skupaj lahko pripravili za končno analizo na ergot alkaloidne 48 vzorcev sklerocijev.

Največ pozitivnih vzorcev na ergot alkaloidne je bilo v letu 2014 (47 %), najmanj pa leta 2016 (9 %). V vseh treh letih je bilo 27 % pozitivnih vzorcev žit. V vzorcih smo dokazali vseh 12 ergot alkaloidov. Pojavljali so se v 9 do 19 % vzorcev. Največ vzorcev (19 %) je vsebovalo ergozinin (0,001–16,194 mg/kg), ergozin (17%; 0,001–0,625) in ergokristinin (17%; 0,01–0,856 mg/kg).

Leta 2014 je največ vzorcev vsebovalo ergozinin (0,001–16,194 mg/kg) in ergokristinin (0,001–10 mg/kg), v letu 2015 ergometrin (0,001–0,197 mg/kg) in ergozin (0,03–0,137 mg/kg) ter v letu 2016 ergokristin (0,011–0,187 mg/kg), ergokristinin (0,011–0,140 mg/kg), ergozin (0,015–0,590 mg/kg), ergozinin (0,012–0,950 mg/kg) in ergometrin (0,010–0,432 mg/kg). Število vzorcev posameznih vrst žit je bilo v vseh treh letih približno enako, zato lahko zaključimo, da se v naši žitih najpogosteje pojavljajo ergometrin, ergokristin, ergozin in ergozinin. Glede na določene koncentracije pa smo ugotovili, da je v žitih največ ergozinina, ergokristina in ergokristinina.

Na vsebnost alternarijskih toksinov smo preiskali vseh 527 vzorcev. 147 vzorcev oziroma 27 % je vsebovalo enega ali več alternarijskih toksinov. Največ pozitivnih vzorcev je bilo leta 2014 (35 %) in najmanj leta 2016 (20 %). Koncentracije celokupnih alternarijskih toksinov so bile od 0,015–3,205 mg/kg. V vseh letih so bili z alternarijskimi toksini najbolj kontaminirani vzorci pira in ovs, ki so vsebovali največ alternariola in tenuazoiske kisline. Najmanj so bili z alternarijskimi toksini kontaminirani vzorci pšenice.

Za vse vzorce žit, pri katerih smo ugotovili prisotnost alternarijskih mikotoksinov, smo naredili tudi fitopatološko analizo za prisotnost gliv *Alternaria* spp. na zrnju in to izrazili v odstotkih. Ugotovili smo, da ne obstaja povezava (korelacija) med stopnjo okuženosti zrnja in vsebnostjo alternarijskih mikotoksinov. Pri enaki okuženosti zrnja je lahko vsebnost mikotoksinov zelo različna oziroma pri različni okuženosti enaka. To velja tako za posamezna žita kot za vsa žita skupaj.

Vzorce, v katerih smo potrdili ergot alkaloidne smo preiskali na vsebnost sklerocijev. Po vizualnem pregledu vzorcev smo ugotovili, da večina rožičkov (razen pri rži) ne izvira iz okuženega žita, temveč od okuženih samoniklih trav, ki rastejo kot plevel med žitom. Iz tega sledi, da bomo morali v prihodnje več pozornosti posvetiti izboljšanju metod za učinkovito čiščenje žitnega zrnja po žetvi, tudi tistega namenjenega krmi za živali, kar pa do sedaj ni bila ustaljena praksa.

Sklerocije smo našli le pri 41,7 % vzorcev, ki so vsebovali ergot alkaloidne. Rezultat pripisujemo nehomogenosti vzorčenja in priprave vzorca ter ugotovitvi, da so sklerociji

večinoma (razen pri rži) pripadali plevelnim travam. Povprečna masa sklerocijev v onesnaženih vzorcih je bila 0,25 g/kg in ni presegala dovoljene mejne vrednosti 1g/kg.

Na kmetijah, kjer so imeli težave z gangrenami repov, smo vzorčili obroke in posamična krmila. Pregledali smo 8 kmetij in skupno odvzeli 17 obrokov. Skupaj s posameznimi sestavinami za obroke je bilo vseh vzorcev 85. Ergot alkaloida sta vsebovala 2 obroka s povprečno koncentracijo 0,03 mg/kg. Vsebnost ergot alkaloidov in alternarijskih toksinov se je razlikovala po letih in sicer je bilo največ toksinov leta 2014, v katerem je bilo tudi največ padavin. Ugotovljene koncentracije so premajhne, da bi povzročale takšne klinične znake, poleg tega pa naslednje leto kljub kliničnim znakom ergot alkaloidov nismo več našli. Verjetno so ergot alkaloidi eden od dejavnikov, ki samo pripomorejo k pojavljanju kliničnih znakov, glede na to, da smo pri rejcih, kjer imajo te težave, potrdili prisotnost sklerocijev na travnikih.

Pri molekularni identifikaciji predstavnikov rodu *Alternaria* smo uspešno pomnožili in sekvencirali 34 vzorcev, ki so bili izolirani iz tritikale, rži, pire, ovsa, ječmena in pšenice. Genetska raznolikost je bila sorazmerno nizka, saj je večina izolatov kazala veliko podobnost med seboj in z vrstama *Alternaria alternata* in *Alternaria tenuissima*. Na podlagi dobljenih rezultatov nismo opravljali nadaljnjih raziskav.

Molekularne analize sklerocijev iz samoniklih in gojenih vrst trav iz osmih različnih regij v Sloveniji so pokazale porazdelitev v tri genetske skupine z nekaj preferencami za specifične taksonomske skupine gostitelja. Na podlagi rezultatov se zdi, da *C. purpurea* kaže nizko preferenco do vrstno specifičnega gostitelja.

Pri različnih genetskih skupinah smo ugotovili tudi nekaj razlik v sestavi ergot alkaloidov. Različne genetske skupine kažejo določene preference za individualne gostiteljeve taksonomske tribuse (plemena), kar se kaže tudi v tem, da so določeni ergot alkaloidi bolj značilni za določene skupine trav.

Iz rezultatov našega projekta se jasno vidi, da je bilo v letu 2014 največ mikotoksinov. Po vremenskih podatkih je to leto v količini povprečnih padavin odstopalo od povprečja. Padavin je bilo vsaj za desetino več kot v dolgoletnem povprečju.

Preventivni ukrepi za zmanjšanje onesnaženja z alternarijskimi toksini so dobra kmetijska in skladiščna praksa, pri ergot alkaloidih pa se je potrebno zavedati tudi, da so okužene samonikle trave na robovih njiv pomemben vir okužb. Pred cvetenjem žit jih je potrebno pokositi oziroma odstraniti. Travnike in pašnike v okolici pridelovalnih površin je potrebno pokositi oziroma popasti še pred cvetenjem. Do zdaj pri nas ni običajna praksa, da bi žita, ki so namenjena krmi, po žetvi dodatno prečistili v čistilnikih. Vendar bi s tem ukrepom močno zmanjšali potencialno nevarnost, ki jo predstavljajo morebitni rženi rožički v zrnju.

Abstract

Within the project, ergot alkaloids and mycotoxins produced by fungi of the genus *Alternaria* were studied. So far, there were no data on their prevalence in Slovenia.

Ergot alkaloids are produced by various types of fungi belonging to the genera *Hypocreales* and *Eurotiales*. From the genus *Hypocreales*, *Claviceps* are known types of fungi. Among them, fungus *Claviceps purpurea* is most widespread in Europe. It infects preferably rye, but also other economically important species of grass family (*Poaceae*), e.g. triticale, wheat, barley and oat as well as many self-grown and cultivated grass species can be affected. Open pollinated species are more susceptible to infection because they flower more openly and longer.

The term ergot refers to fungal structures from *Claviceps* species developing instead of kernels on grain ears or seeds on grass heads, being visible as large dark coloured sclerotia. Sclerotia contain different classes of alkaloids, the most prominent being ergometrine, ergotamine, ergosine, ergocristine, ergocryptine and ergocornine as well as their related -inines. Although the epimeric forms (-inines) are biologically inactive, they can, under different conditions, be converted into active forms. More than 50 different ergot alkaloids have been described, but chemical analysis mostly focuses on those mentioned above. The amount and toxin pattern vary between fungal strains, depending on the host plant and the geographical region. Therefore, it is of the utmost importance to connect the presence of ergot alkaloids with the amount of sclerotia present (EFSA, 2012). Concerning feed, the legislation applies only to the content of sclerotia.

Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council of 7 May 2002 on undesirable substances in animal feed forbids the use of products intended for animal feed in which the levels of undesirable substances exceed the limits laid down in Annex I to the Directive. For feed containing unground cereals, a maximum content of rye ergot (*Claviceps purpurea*) in feed was set at 1000 mg/kg.

In recent years, it became clear that the physical determination of the degree of infection of grains is often imprecise, as the size and weight of individual sclerotia can vary significantly. In addition, the level of infection cannot be determined in processed feed and food. It is therefore proposed that in addition to the control of potentially contaminated feed and food by physical methods, chemical analysis shall be used. However, several chromatographic methods for determination of ergot alkaloids in feed and food are available. In order to understand the relationship between the content of sclerotia and the level of ergot alkaloids better, it is appropriate to determine both of them (EFSA, 2012).

Another important group of emerging mycotoxins are toxins produced by fungi of the genus *Alternaria*. For this group of mycotoxins, the EFSA issued an opinion in 2011 stating that the metabolites of these fungi are harmful to animals and humans, but there are not enough data to set up safe limits.

The fungi of this genus are the main contaminants of wheat, barley and sorghum (Deshpande, 2002), although they are also found on other cereals and maize. Apart from cereals, *Alternaria* species are also found on oil seeds (sunflower, rape), tomatoes, apples, olives and many other types of fruits and vegetables. Fungi are able to grow also at low temperatures, so they can spoil crops also during transport and storage.

Alternaria spp. produce more than 70 secondary metabolites that are toxic to plants, but only a small part of them are also toxic for humans and animals. *Alternaria alternata* is the most common and the most important mycotoxin producing species found on stored fruits, vegetables and cereals. Some host non-specific toxins, such as alternariol, alternariol monomethyl ether, tenuazonic acid, and alt toxins are mentioned to have adverse effects in mammals (Barkai-Golan, 2008). For some host-specific toxins, such as AAL-toxins, which play a decisive role in the production of plant diseases, the animal toxicity has not yet been fully explored. The formation of *Alternaria* toxins depends on strain, growth medium and environmental factors (Barkai-Golan, 2008). It has been found out that *Alternaria* species can form toxins on natural and artificial substrates if their water content is above 25–30%; the optimum pH for the mycelium growth is between 4 and 6.6 and the total pH range is from 2.7 to 8.

In the last five years, in intensively farmed fattening cattle in Slovenia, clinical signs have been observed, which were not known before: tail tip necrosis, scrotal necrosis, cracked and chipped horns, limping and ultimate death in spite of a treatment. In such breeding, a possibility of presence of infectious pathogens and environmental factors was eliminated and the attention was focused on the nutrition. The described changes could be caused by mycotoxins as well as alkaloids of saprophytic and endophytic fungi that have not been determined in Slovenia until now.

For all these reasons, a chemical analytical method using LC-MS/MS for the determination of the main ergot alkaloids (ergometrine, ergotamine, ergosine, ergocristine, ergocriptine and ergocornine as well as their –inine epimers) and an LC-MS/MS method for the determination of *Alternaria* toxins (tenuazonic acid, tentoxin, alternariol and alternariol monomethyl ether) were introduced within the project. Further, the method for the determination of ergot alkaloids got accredited.

In the years 2014–2016, 542 samples were examined for ergot alkaloids and *Alternaria* toxins.

The samples of cereals (185 wheat, 113 barley, 89 triticale, 31 rye, 18 spelt and 15 oat samples), rations for cattle (19) and their individual components (70), as well as rations for pigs (2) were analysed. Cereal samples were taken at purchase points of Slovenian feed plants and at cereal producing farms.

At 37 locations in Slovenia, 113 samples of rye ergot were collected from self-grown grass species and cereals. Since the quantity of some sclerotia was not enough or sclerotia were too small for analysis, altogether 48 samples of sclerotia were prepared for the determination of ergot alkaloids in them.

Samples were most frequently contaminated with ergot alkaloids in 2014 (47%) and least frequently in 2016 (9%). Altogether, in three years, 27% of cereal samples were positive. All 12 ergot alkaloids were found in the samples. Singular ergot alkaloids appeared in 9–19 % of samples. Most of the samples (19%) contained ergosinine (0.001–16.194 mg/kg), ergosine (17%; 0.001–0.625) and ergocristinine (17%; 0.01–0.856 mg/kg).

In 2014, most samples contained ergosinine (0.001–16.194 mg/kg) and ergocristinine (0.001–10 mg/kg), in the year 2015 ergometrine (0.001–0.197 mg/kg) and ergosine (0.03–0.137 mg/kg), and in the year 2016 ergocristine (0.011–0.187 mg / kg), ergocristinine (0.011–0.140 mg/kg), ergosine (0.015–0.590 mg/kg), ergosinine (0.012–0.950 mg/kg) and ergometrine (0.010–0.432 mg/kg). The number of samples of individual types of cereals was similar in all three years, so it can be concluded that ergometrine, ergocristine, ergosine and ergosinine are most frequently found in our cereals. Regarding the concentrations, the order was ergosinine, ergocristine and ergocristinine.

All 527 samples were examined for the content of *Alternaria* toxins. In total, 147 samples (27%) contained one or more *Alternaria* toxins. Most positive samples were found in 2014 (35%) and least in 2016 (20%). The concentrations of total *Alternaria* toxins were 0.015–3.205 mg/kg. In all three years, most contaminated were spelt and oat. Most frequently they contained alternariol and tenuazonic acid. Least contaminated were wheat samples.

In samples of cereals where *Alternaria* toxins were detected, also phytopathological analysis on the presence of *Alternaria* spp. on the grains was carried out and the results were expressed in percentage. No correlation between grain contamination rates and the content of *Alternaria* toxins was observed. In the case of the same grain infection, the content of mycotoxins may be very different or with different infection the content of mycotoxins may be similar. This applies both to individual cereals and to all cereals together.

The samples in which ergot alkaloids were detected were examined for the sclerotium content. After a visual inspection of the samples, it was concluded that most of sclerotia (except in rye) do not originate from infected grains, but from infected self-grown grasses that grow as weed among cereals. It means that in the future, more attention has to be paid to effective cleaning of grains after harvest, including those intended for animal feed which was not usual so far.

Sclerotia were found in only 41.7% of the samples containing ergot alkaloids. The result is attributed to the inhomogeneity of sampling and the preparation of the sample and to the fact that sclerotia belonged mainly to weeds (except in rye). The average content of sclerotia in contaminated samples was 0.25 g/kg and did not exceed the permitted maximum content of 1 g/kg.

On the farms where problems with tail tip necrosis appeared, meals and feed materials were sampled. Altogether, eight farms were examined and 17 meals were collected. Together with meal ingredients, in total 85 samples were inspected. Ergot alkaloids were present in two meals; the average concentration was 0.03 mg/kg. The content of ergot alkaloids and *Alternaria* toxins differed with years, with the highest occurrence rate in 2014, when most precipitation was present. However, the determined concentrations are too low to produce such clinical signs. Further, in the following year, in contrast to the persisting clinical signs no ergot alkaloids were detected. It is likely that ergot alkaloids are only one of the factors that contribute to the emergence of clinical signs, since sclerotia were found in the meadows of farms where the described problems occurred.

Within the molecular identification of the representatives of the genus *Alternaria*, 34 samples isolated from triticale, rye, spelt, oat, barley and wheat were amplified and sequenced. Genetic diversity was relatively low, as most isolates showed a high degree of similarity among themselves and towards *Alternaria alternata* and *Alternaria tenuissima*. Based on the obtained results, no further research was carried out.

Molecular analysis of sclerotia from self-grown and cultivated grass species from eight different regions of Slovenia showed a distribution in three genetic groups with some preferences for specific taxonomic groups of a host. On the basis of the results, *C. purpurea* appears to show a low preference to a species-specific host.

With different genetic groups, differences in the ergot alkaloid patterns were found. Different genetic groups show certain preferences for individual host taxonomic tribes, which is also reflected in the fact that certain ergot alkaloids are more characteristic for certain groups of grasses.

It is clear from the results of our project that in 2014 the mycotoxin occurrence rate was the highest. According to weather data, the 2014 average precipitation amount departed from the long-term average, i.e. it was at least for one tenth higher than the long-term average.

Preventive measures for reducing the contamination with *Alternaria* toxins are good agricultural and storage practice, while with ergot alkaloids it should be also noted that the infected grass at the edges of fields is an important source of infection. They must be cut or removed before the flowering time of cereals. Also, meadows and pastures in the vicinity of cultivated areas should be cut or got pastured before flowering time. Until now, after-harvest cleaning of grains intended for feed was no common practice. However, this measure would significantly reduce the potential danger posed by the presence of rye ergot in grains.

1 OPIS PROBLEMA IN CILJEV

V Sloveniji nismo imeli podatkov o razširjenosti in vsebnosti ergot alkaloidov v krmi, prav tako nismo imeli laboratorijskih metod za njihovo določanje. Za toksine, ki jih izločajo glive *Alternaria* spp., imamo nekaj podatkov o vsebnosti tenuazojske kisline v silaži.

1.1 Ergot alkaloidi

Ergot alkaloidi v glavnem izločajo glive iz rodov *Claviceps* in *Neotyphodium*. V Evropi je gliva *Claviceps purpurea* ali rženi rožiček najbolj razširjena vrsta iz rodu *Claviceps*. Poznano je, da lahko okuži več kot 400 različnih rastlinskih vrst, med katerimi so nekatere gospodarsko zelo pomembne: rž, pšenica, tritikala, ječmen, proso in oves. Gliva *Claviceps purpurea* okužuje preko 200 vrst trav. Med najpomembnejše rodove gostiteljskih samoniklih trav na njivah in robovih njiv sodijo ljuke (*Lolium*), piričice (*Agropyron*), stoklase (*Bromus*), bilnice (*Festuca*) in ovsike (*Avenochloa*). Na senčnih in mokrih travnatih površinah so najpogostejši rodovi samoniklih trav, ki gostijo rožičke, trsti (*Phragmites*), stožke (*Molinia*), šašulice (*Calamagrostis*) in medene trave (*Holcus*). V obeh habitatih pa so pomembni gostiteljski rodovi tudi latovke (*Poa*), lisičji repi (predvsem *Alopecurus myosuroides*), pahovke (*Arrhenotherum*), pasje trave (*Dactylis*) in mačji repi (*Phleum*). Ostali gostiteljski rodovi so še *Danthonia*, *Glyceria*, *Brachypodium*, *Elymus* in *Milium*. Zanimivo pa je, da je rožiček pogosto prisoten tudi na morskem metličju (*Spartina maritima*), ki je izrazit halofit in raste predvsem na solinah (Bové, 1970; Taber, 1985; Haarman et al., 2009).

Ergot alkaloidi lahko izloča tudi vrsta *Claviceps paspali*, ki pa je v Evropi redka. Prav tako lahko ergot alkaloidi izločajo endofitske glive rodu *Neotyphodium* spp., ki okužujejo trave rodu *Festuca*. Zastrupitve so opisane v ZDA, Avstraliji in Novi Zelandiji. V Južni Ameriki je več kot 90 % pašnikov okuženih z glivo *Neotyphodium coenophialum*. V Evropi so pašniki v glavnem sejani, pri čemer se uporablja seme, ki ne vsebuje endofitov, zato je izpostavljenost živali tem vrstam toksinov redka in v Evropi nima posebnega pomena (Hopkins in sod., 2010).

Ergot alkaloidi so triptofanski alkaloidi in njihovi učinki so poznani že zelo dolgo časa. V srednjem veku je uživanje žit, ki so vsebovala ergot alkaloidi povzročalo epidemije, ki so jih imenovali »ogenj Sv. Antona« oziroma žitna božjast. Razumevanje učinkov in izpopolnjevanje kmetijske prakse in tehnologij mletja (sejanje, sortiranje) je v zadnjem obdobju preprečilo pojavljanje izbruhov ergotizma. Poleg poznanih škodljivih učinkov pa imajo ergot alkaloidi vrsto zaželenih farmakoloških učinkov, ki jih v medicini uporabljamo že stotine let. Ergot alkaloidi in njihove derivate uporabljamo oziroma testiramo za inhibicijo prolaktina, zdravljenje Parkinsonove bolezni, cerebrovaskularne insuficience, venske insuficience, tromboze, embolije ter za stimulacijo cerebralnega in perifernega metabolizma. Prav tako jih raziskujejo in uporabljajo pri migrenah in za stimulacijo maternice (EFSA, 2012).

Gospodarsko pomembne živali in domači ljubljenci so ergot alkaloidom lahko izpostavljeni zaradi sestave obroka, v katerega redno vključujemo žita in stranske proizvode iz njih. Tu mislimo predvsem na rž, sirek, proso in njihove stranske proizvode. V EU omenjenih žit ne uporabljamo pogosto, čeprav jih gojimo in uporabljamo predvsem v ekstenzivnih pogojih reje. Na takšnih področjih je nevarnost okužbe z voluminozno krmo, ker se okužba prenaša iz žit na trave in obratno. Kontaminirana voluminozna krma predstavlja potencialno nevarnost za živali v tistih področjih, kjer podnebne razmere omogočajo razvoj sklerocijev. Pomembno je, da je tudi EU v svojem Priporočilu z dne 15.3.2012 o spremljanju prisotnosti alkaloidov rožička v krmi in hrani (2012/154/EU) pozvala članice, da naj z dejavno vključitvijo nosilcev krmne in živilske dejavnosti spremljajo prisotnost alkaloidov rožička v žitih in žitnih izdelkih, ki so namenjeni za prehrano ljudi ali živalsko krmo, na pašnih/krmnih travah za živalsko krmo ter v (nepredelanih) krmnih mešanicih in hrani.

Ergot alkaloidi se resorbirajo v prebavnem traktu in se s pomočjo citokromov, predvsem P450 3A4 v jetrih oksidativno biotransformirajo. Nekateri ergot alkaloidi (npr. ergometrin) se lahko kasneje konjugirajo z glukuronsko kislino. Do danes najpomembnejši opisan učinek ergot alkaloidov je vazokonstrikcija. Potrdili so jo s poskusom na podganah, 13 tednov hranjenih z obrokom, ki je vseboval ergotamin in objavili akuten referenčni odmerek 1 µg/kg telesne mase (t.m.) dnevno. Še sprejemljiv dnevni odmerek je 0,6 µg/kg t.m. dnevno. Ugotovljena BMDL₁₀ (Benchmark dose lower confidence limits) je bila v omenjenem poskusu na podganah 0,33 mg/kg t. m. dnevno in je povzročila atrofijo mišic na repu podgan.

Tudi pri govedu so kot klinični znak zastrupitve z ergot alkaloidi opisani vazokonstrikcija in gangrene, pri konjih pa nevrotoksičnost in podaljšan čas poroda. Pri svinjah so opazili manjšo mlečnost (EFSA, 2012).

Naslednje pomembno vprašanje je, ali se ergot alkaloidi akumulirajo v tkivih in zaradi tega pojavljajo v živilih živalskega izvora. Omejeni in nepopolni podatki o razporeditvi in vsebnosti ergot alkaloidov v različnih tkivih živali, mleku in jajcih, ki so nam danes dostopni ne omogočajo ocene prenosa iz krme v živila živalskega izvora, vendar pa je iz njih razvidno, da za akumulacijo ergot alkaloidov v tkivih ni dokazov (EFSA, 2012).

Mulder in sod. (2012) so analizirali 48 vzorcev sklerocijev, ki so jih zbrali v letih 2008-2010 od rži (n = 32), tritikala (n = 14), pšenice (n = 1) in ječmena (n = 1). Žita so bila pridelana na Nizozemskem. Vzorci so vsebovali enega do 17 sklerocijev iz ene serije. Določali so 24 različnih ergot alkaloidov, 16 jih je bilo zaznanih vsaj enkrat (12 poglavitnih ergot alkaloidov, poleg njih pa še drugi: β-ergokriptin, agroklavin). Koncentracije je bila od < LOD (1 µg/g) do 3258 µg/g (<0,0001 do 0,33 %) za rženi rožiček in od < LOD do 6003 µg/g (< 0,0001 do 0,60 %) za sklerocije iz tritikala. Povprečna koncentracija za sklerocije rži je bila 521 µg/g (0,052 %) in za sklerocije iz tritikale 959 µg/g (0,096 %). Povprečna koncentracija vseh 48. vzorcev je bila 659 µg/g (0,066 %). Povprečna koncentracija za 12 poglavitnih ergot alkaloidov je bila 642 µg/g (0,064 %).

Določili so ergometrin, ergokornin, ergotamin (vsakega po 12 %) in majhno vsebnost ergokristina (5,4 %). Osnovne oblike ergot alkaloidov so bile 79 % od celokupne vsebnosti, -inini pa so predstavljali 21%. Opazili so, da določeno število vzorcev sklerocijev (10 rž in 4

tritikala) ni vsebovalo merljivih koncentracij ergot alkaloidov, kar dodatno potrjuje nujnost uvedbe kemijskih analiznih metod in potrjuje dejstvo, da sedanja zakonodaja za krmo, ki dovoljuje 1000 mg sklerocija na kilogram nezmlatih žit, ni dovolj zanesljiva.

Za ugotavljanje prisotnosti alkaloidov rožička se uporabljajo različne analizne metode. Kot najprimernejše in najpogostejše uporabljene EFSA omenja metode, ki uporabljajo tekočinsko kromatografijo s fluorescenčno detekcijo ali tekočinsko kromatografijo s tandemsko masno spektrometrijo (LC-MS/MS). Z omenjenimi metodami bi bilo potrebno pridobiti podatke o razširjenosti in koncentraciji ergot alkaloidov v žitih in voluminozni krmi v državah članicah EU.

1.2 Mikotoksini, ki jih izločajo glive iz rodu *Alternaria*

Druga skupina toksinov, o katerih bi radi dobili podatke, so mikotoksini gliv iz rodu *Alternaria*. EFSA je za to skupino mikotoksinov leta 2011 izdelala mnenje, v katerem navaja, da so presnovki omenjenih gliv škodljivi za živali in ljudi, vendar je premalo podatkov, da bi lahko postavili varne meje.

Glive tega rodu so glavni kontaminanti pšenice, ječmena in sirka, čeprav jih najdemo tudi na drugih žitih in koruzi. Razen na žitih najdemo *Alternaria* vrste tudi na semenih oljnic (sončnica, oljna repica), paradižniku, jabolkih, oljkah in številnih drugih vrstah sadja in zelenjave. Po okužbi zahtevajo *Alternaria* vrste več kot 20 % vsebnost vode v tkivih, zato so bolj pogoste na plodovih in zelenjavi, manj pa v na zrnju, ki vsebuje manj vlage. Kljub temu se lahko *Alternaria* spp. razvijejo na zrnju žit, če je v času žetve mokro vreme in ga skladiščimo v vlažnih razmerah oz. z manj sušine (Bottalico in Logrieco, 1998). Več okužb zrnja žit so ugotovili, če je bilo v času med mlečno in zgodnjo voščeno zrelostjo zrnja več padavin. Glive se lahko širijo in okužujejo pridelke tudi med skladiščenjem (Rotem, 2004; Barkai-Golan, 2008). Brez prisotnosti kisika glive *Alternaria* spp. ne rastejo (Bottalico in Logrieco, 1992). Temperature, pri katerih se tvorijo toksini, so podobne tistim, ki so bile opisane za okužbo, rast micelija in sporulacijo. Kljub temu so bile signifikantne količine toksinov ugotovljene tudi pri suboptimalnih temperaturah (Ozcelik et al., 1990, Barkai-Golan, 2008). Glive iz tega rodu lahko dolgo časa preživijo kot saprofiti na ostankih rastlin in ne potrebujejo gostiteljske rastline. So tipičen primer fakultativnih parazitov.

Glive *Alternaria* spp. tvorijo več kot 70 sekundarnih metabolitov, ki so toksični za rastline, vendar je le majhen delež le-teh strupen tudi za ljudi in živali. Gliva *Alternaria alternata* je najbolj pogosta vrsta, ki jo najdemo na skladiščenem sadju, zelenjavi in žitnem zrnju ter je hkrati najpomembnejša tvorka mikotoksinov. Nekateri izmed njih imajo škodljive učinke tudi na živali. Gostiteljsko nespecifični toksini, kot so alternariol, alternariol monometil eter, tenuazojska kislina in alvertoksini so omenjeni kot povzročitelji škodljivih učinkov pri sesalcih. Tvorba toksinov pri *Alternaria* vrstah je odvisna od seva, rastnega substrata in okoljskih dejavnikov.

Za določanje toksinov, ki jih izločajo glive iz rodu *Alternaria*, so v literaturi navedene metode, ki vključujejo ekstrakcijo toksinov z mešanico organskih topil, čiščenje in koncentriranje ekstrakta ter določitev toksinov z LC-MS/MS. Z omenjenimi metodami bi bilo potrebno pridobiti podatke o razširjenosti in koncentraciji alternarijskih toksinov v žitih in voluminozni krmi v državah članicah EU.

1.3 Gangrene repov na farmah govejih pitancev

Ob začetku projekta, leta 2014, smo opozarjali tudi na klinična znamenja, ki smo jih opazili v intenzivnih rejah govejih pitancev in jih nismo znali pojasniti: gangrene repov, gangrene skrotuma, razpokane in odlomljene rogove, šepanje in v končni fazi, kljub zdravljenju, pogin živali. V takšnih rejah smo izločili možnost kužnih povzročiteljev bolezni ter dejavnikov okolja in se na koncu osredotočili na prehrano. Opisane spremembe bi lahko povzročali mikotoksini oziroma alkaloidi saprofitskih in endofitskih gliv, ki jih do takrat v Sloveniji še nismo določali. Na osnovi preliminarних rezultatov, ki smo jih v tistem času pridobili, smo sklepali, da v Sloveniji obstaja možnost pojavljanja gliv in njihovih mikotoksinov, ki jih do sedaj še nismo opisali: ergot alkaloidov (izloča jih gliva *Claviceps purpurea* ali rženi rožiček, lahko pa tudi druge glive) in toksini gliv iz rodu *Alternaria*.

1.4 Cilji projekta

Vse do sedaj navedeno pomeni, da je omenjena problematika zelo aktualna v drugih državah in tudi pri nas. Zato smo s to nalogo želeli razjasniti, kakšna je nevarnost pojavljanja omenjenih novih substanc, ergot alkaloidov in alternarijskih toksinov, v slovenski krmi. V ta namen smo si zastavili naslednje cilje:

1. Vpeljati laboratorijske kemijske metode za določanje glavnih ergot alkaloidov (ergometrin, ergotamin, ergozin, ergokristin, ergokriptin in ergokornin ter njihovi -inini) in toksinov, ki jih izločajo glive iz rodu *Alternaria* (tenuazojska kislina, alternariol, alternariol monometil eter, tentoksin).
2. Oceniti obseg pojavljanja alkaloidov in prisotnost ter razširjenost gliv *Claviceps purpurea* in *Alternaria* spp. v Sloveniji.
3. Ugotoviti povezave in vplive prisotnosti ergot alkaloidov in alternarijskih toksinov na težave v nekaterih intenzivnih rejah govejih pitancev.
4. Pridobiti podatke o prisotnosti alkaloidov rženih rožičkov v žitih in voluminozni krmi, pridelanih v Sloveniji, ter ugotoviti njihovo povezanost s prisotnostjo sklerocija.
5. Oblikovati navodila in predloge za zmanjšanje tveganja pojavljanja ergot alkaloidov in toksinov, ki jih izločajo glive iz rodu *Alternaria*.

2 PODATKI IZ LITERATURE

2.1 Rženi rožiček (*Claviceps purpurea* /Fr./ Tul.) in njegovi alkaloidi

Rženi rožiček je ena izmed redkih rastlinskih bolezni, ki lahko tudi pri človeku in živalih povzroča bolezenske spremembe. Zastrupitve, ki jih povzročajo alkaloidi iz rženega rožička (ergot alkaloidi) pri ljudeh so znane v Evropi že več stoletij. Ergot alkaloidi povzročajo toksične učinke tudi pri vseh živalskih vrstah.

Povzročiteljica rastlinske bolezni poimenovane rženi rožiček je gliva *Claviceps purpurea*. Gliva okužuje le klas/lat oziroma pestič. Po nekaj dneh, ko rž ali druga gostiteljska rastlina odcvete, se pojavijo na posameznih klasih/latih drobne kapljice lepljive in sladke tekočine, ki jo imenujemo medena rosa. To so prva bolezenska znamenja. Okužena plodnica naglo propade in na njej se razvije belkast micelij, ki izloča prej omenjeno medeno roso. V njej najdemo ovalne letne trose nespolnega stadija glive (*Sphacelia segetum*). Micelij se v plodnici preoblikuje v psevdoparenhim, iz katerega nastane sklerocij, ki postopoma raste, pomoli iz plev in plevic ter na rži doseže dolžino do 4 cm. Rožički – sklerociji so rahlo upognjeni, valjasti, v prerezu nepravilno okrogli ali trioglati. Dokler so mladi, so sivo vijoličasti, pozneje barva preide v vijoličasto črno. Notranje tkivo pa je belo ali blede rumeno (Maček, 1991; Tenberge, 1999). Sklerociji se lahko odstranijo iz žit s standardnimi tehnikami čiščenja.

Rožički že pred žetvijo ali med njo popadajo na zemljo ali pa s semenom, ki ni bilo očiščeno, dospejo v zemljo. Tu spomladi vzkale. Iz vsakega rožička zraste povprečno do deset rdeče rumenih strom, podobnih pecljem in na njihovih koncih oblikuje glavice. V slednjih najdemo vrčasta spolna trosišča (periteciji) v katerih se oblikujejo askusi z nitastimi spolnimi trosi (askospore). V ugodnih vremenskih razmerah askusi izbrizgajo askospore na plano in jih nato zračni tokovi prenesejo na odprte cvetove gostiteljskih rastlin, kjer izvršijo primarno okužbo. Sledi pojav medene rose, v kateri so nespolni trosi glive. Le to uživajo razne žuželke in s tem nehote prenašajo spore glive, ki so v njej. Prenos trosov v medeni rosi je možen tudi z dotikom sosednjih rastlin in dežnimi kapljicami. Nespolni trosi dospejo na še odprte zdrave cvetove in na njih povzročajo sekundarne okužbe. Razvoj v plodnici, okuženimi z letnimi trosi, poteka enako kot pri okužbi s spolnimi trosi, le rožički so običajno manjši (Maček, 1991).

Ruhland in Tischer (2008) sta dokazovala vsebnost ergot alkaloidov v 64 vzorcih žit in 64. krmnih mešanicah v Nemčiji. Vzorce sta analizirala na pet ergot alkaloidov: ergometrin, ergokornin, ergokristin, ergokriptin in ergotamin. LOD je bil 5 µg/kg. Ergot alkaloida sta dokazala v 91 % vzorcih. Večina vzorcev (66 %) je vsebovala koncentracijo 10 do 250 µg/kg.

Diana Di Mavungu in sod. (2011) so s tehniko HPLC-MS/MS analizirali 148 vzorcev rži, 137 vzorcev pšenice in 27 vzorcev tritikala, zbranih v mešalnicah krme v letih 2009 in 2010 iz desetih različnih evropskih držav. Ergot alkaloida so dokazali v 52 % vzorcev rži za krmo, 95 % rži za prehrano ljudi, 34 % vzorcev pšenice za krmo, 86 % pšenice za prehrano ljudi, 48 %

tritikala za krmo in 76 % v proizvodih iz različnih trgovin. Ugotovljena koncentracija skupnih ergot alkaloidov je bila 1 do 12340 µg/kg. Največjo koncentracijo je vsebovala rž iz Švedske, namenjena za krmo živali.

2.2 Glive *Alternaria* spp. in njihovi toksini

Glive rodu *Alternaria* iz debla zaprtotrošnic (Ascomycota) so splošno razširjene in jih najdemo v večini tal kot običajno komponento talne mikroflore. Nekatere vrste so obligatni saprofiti, druge fakultativni paraziti gojenih in samoniklih rastlin. Razširjene so tako v humidnih kot semi-aridnih območjih, kjer pogosto okužujejo liste, stebela, cvetove in plodove gostiteljskih rastlin (Agrios, 2005).

Opisanih je več kot 70 toksinov, ki jih izločajo *Alternaria* spp., njihovi učinki pa so slabo poznani. Toksine razvrščamo v 5 različnih razredov: (1) dibenzo- α -pironi (alternariol, AOH; alternariol monometil eter, AME in altenuen, ALT); (2) tenuazojska kislina (TeA); (3) perilenski kvinoni (altertoksini, ATX); (4) *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* toksini (AAL-toksini) in (5) različne strukture kot je tentoksin (TEN) (EFSA, 2011).

Analiz o vsebnosti alternarijskih toksinov v krmi je zelo malo. Med preiskanimi 300 vzorci krme iz EU, je bil alternariol ugotovljen v 31 % vzorcev v koncentraciji 6,3 do 1840 µg/kg. Največje vsebnosti so bile v vzorcih sončničnih semen. Alternariol monometil eter je bil ugotovljen v 6 % vzorcev v koncentraciji od 3 do 184 µg/kg, altenuen v 73 % vzorcev v koncentraciji 6,3 in 41 µg/kg. Tenuazojska kislina je bila ugotovljena v 15 % vzorcev (500 do 4310 µg/kg) (EFSA, 2011).

O obstojnosti alternarijskih toksinov je malo podatkov. Obstajajo dokazi, da se lahko koncentracija med skladiščenjem ali obdelavo še poveča (EFSA, 2011).

Podatki o občutljivosti gospodarsko pomembnih živali in domačih ljubljencev so zelo omejeni, zato še ne moremo določiti dopustnih mej. Akutno oralno toksičnost tenuazojske kisline so preučevali na različnih vrstah in določili LD₅₀, ki je 37,5 do 225 mg/kg t.m. Spodnja in zgornja meja izpostavljenosti je izračunana le za brojlerje in kokoši nesnice (3 µg/dan in 6 µg/dan) (EFSA, 2011).

2.3 Tehnike določanja ergot alkaloidov in alternarijskih toksinov

Za določanje alkaloidov rožička in alternarijskih toksinov se uporabljajo različne analize tehnike kot so tankoplastna kromatografija, kapilarna elektroforeza, plinska kromatografija z masno detekcijo, ELISA, vendar pa je najpogosteje uporabljena tekočinska kromatografija s fluorescenčno detekcijo ali s tandemsko masno spektrometrijo (LC-MS/MS) (Scott, 2007; Krska in sod., 2008). Treba je poudariti, da standardi oziroma referenčni materiali niso dostopni za vse, ampak samo za nekatere ergot alkaloidne in alternarijske toksine.

2.4 Molekularne metode določanja gliv

Poleg precej boljše raziskane glive *Claviceps purpurea* je v zadnjem času večja pozornost usmerjena tudi na glive iz rodu *Alternaria*. Vrste iz tega rodu so kozmopolitanska skupina gliv, ki vključuje številne saprofitske, patogene and endofitske predstavnike (Thomma, 2003). Značilnost endofitskih gliv je, da so večinoma prisotne v obliki micelijev brez opaznih značilnih morfoloških oblik, ki bi omogočale ustrezno identifikacijo. Zato so za njihovo ugotavljanje najbolj primerne molekularne metode, s katerimi lahko hitro in učinkovito identificiramo glivne endofite (Likar in sod., 2013). V večini primerov iz literature so molekularne metode za identifikacijo predstavnikov askomicet (zaprtotrosov) uporabljene na rDNA operonu jedrne DNA, kar omogoča identifikacijo do nivoja rodu in vrste (Pavon in sod., 2010).

2.5 Sumi ergotizma v rejah govejih pitancev v Sloveniji

V zadnjih petih letih so se v Sloveniji začele pojavljati gangrene repov. Gangrene repov lahko povzročajo ergot alkaloidi, prenaseljenost živali, salmoneloza, neprimerna tla in zastrupitve z nekaterimi drugimi mikotoksini (Drolia *et al.*, 1991). Največ kliničnih primerov se je pojavilo poleti pri masi živali okoli 300 kg.

Najprej smo z mikrobiološkimi preiskavami izključili salmonelo in preverili koncentracijo selena v obroku, ki je bila v dovoljenih mejah (0,23 mg/kg). Opravili smo patomorfološko preiskavo gangrenoznih repov, histološko preiskavo in mikrobiološko preiskavo nekrotičnega tkiva. Vse omenjene preiskave nam niso dale odgovora, zato smo diferencialno diagnostično posumili na ergot alkaloidne. Nekaj vzorcev posamičnih krmil iz omenjenih kmetij smo poslali v laboratorij na Nizozemskem (Wageningen), kjer so ugotovili naslednje:

- v koruzni silaži so ugotovili nizke koncentracije različnih ergot alkaloidov ter deoksinivalenola (DON) in zearalenona.
- V vzorcih sena je bil ugotovljen DON in tenuazojska kislina. Prav tako so bili dokazani ergot alkaloidi (ergokristin 32 µg/kg, ergokristinin 11 µg/kg, ergotamin 6 µg/kg, ergometrin 5 µg/kg, ergozin 5 µg/kg. Koncentracija preostalih ergot alkaloidov, vključno z ergovalinom je bila manj kot 5 µg/kg.
- V koruzni silaži v drugi reji je bila ugotovljena visoka koncentracija DON (7 mg/kg), 0,16 mg/kg 15-acetil DON. Zearalenon in fumonizin B₁ sta bila ugotovljena v koncentraciji 0,82 mg/kg in 0,16 mg/kg.
- Vzorec sena je vseboval penicilinsko kislino v koncentraciji 0,06 mg/kg.

Ugotovljene koncentracije ergot alkaloidov so bile nizke, vendar obstaja možnost, da takšno klinično sliko povzročajo nizke koncentracije več ugotovljenih mikotoksinov (Starič in sod., 2013).

Od leta 2005 je bilo objavljenih nekaj kliničnih primerov zastrupitve z ergot alkaloidi: pet pri prašičih, dva za govedo in eden za piščance (EFSA, 2012). Nadalje so bili opisani primeri ergotizma pri vodnih bivolih, losu in divjadi (Handeland in Vikøren, 2005; Uhlig in sod., 2007).

Z raziskavami na prašičih so ugotovili odmerek, ki še ne povzroča opaznih škodljivih učinkov (NOAEL; No-observed-adverse-effect level: 0,15 mg ergot alkaloidov/kg krme). Perutnina je na zastrupitev z ergot alkaloidi bolj odporna (NOAEL 1,4 mg ergot alkaloidov/kg krme) (EFSA, 2012).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 Material

V letih od 2014 do 2016 smo na vsebnost ergot alkaloidov in alternarijskih toksinov preiskali skupno 542 vzorcev. Analizirali smo vzorce žit (pšenica, ječmen, rž, tritikala, oves in pira), obroke za govedo in njihove posamezne sestavine, obroke za prašiče in vzorce samoniklih trav.

V letu 2014 smo skupno vzeli 206 vzorcev, leta 2015 199 vzorcev in leta 2016 137 vzorcev. Število vzorcev glede na vrsto vzorca je prikazano v spodnji tabeli (tabela 1).

Tabela 1. Število odvzetih vzorcev v letih 2014-2016.

Vrsta vzorca	2014	2015	2016	SKUPAJ
Pšenica	72	50	63	185
Ječmen	41	37	35	113
Tritikala	29	39	21	89
Rž	16	10	5	31
Pira	7	2	9	18
Oves	8	4	3	15
Koruza	1	1	0	2
Proso	0	0	1	1
Obrok	8	9	0	17
Koruzna silaža	6	8	0	14
Slama	3	10	0	13
Seno	4	8	0	12
Travna silaža	2	6	0	8
Koruzni šrot	3	5	0	8
Trava	3	2	0	5
Koruzni storži	1	2	0	3
Silirano koruzno zrnje	0	2	0	2
Pivske tropine	1	1	0	2
Krma za prašiče	0	2	0	2
Koncentrat za govedo	1	1	0	2
Skupaj	206	199	137	542

Poleg teh 542 vzorcev smo v letu 2014 in 2015 po travnikih vzorčili še sklerocije na samoniklih travah.

3.1.1 Vzorci žit

Vzorci žit smo odvzeli na odkupnih mestih slovenskih mešalnic in na terenu od slovenskih pridelovalcev. Na ekoloških kmetijah smo odvzeli 47 vzorcev. Vzorce smo ustrezno označili: vrsta žita, izvor in datum odvzema. V laboratoriju smo jih preiskali na vsebnost ergot alkaloidov in alternarijskih toksinov ter določili stopnjo okuženosti z glivami *Alternaria* spp.

Na odkupnih mestih slovenskih mešalnic smo skupno odvzeli 232 vzorcev (tabela 2).

Tabela 2. Število vzorcev žit iz slovenskih mešalnic v letih 2014-2016.

Vrsta vzorca	2014	2015	2016	SKUPAJ
Pšenica	28	27	38	93
Tritikala	20	29	16	65
Ječmen	24	17	18	59
Rž	10	4	0	14
Oves	0	0	1	1
Skupaj	82	77	73	232

Od slovenskih pridelovalcev žit smo preiskali 217 vzorcev (tabela 3). Pri terenskem delu smo najprej na kmetijah, kjer pridelujejo rž, sledili rasti rastlin in okužbi z rženim rožičkom. V sodelovanju z območnimi Kmetijsko gozdarskimi zavodi smo določili lokacije za vzorčenje rženega rožička; predvsem njive z ržjo in tritikalo ter njihovo okolico. Vzpostavljene smo imeli kontakte s Kmetijsko gozdarskimi zavodi na območjih Prekmurja, Štajerske, Koroške, Dolenjske, Gorenjske in Primorske.

Tabela 3. Število vzorcev žit od slovenskih pridelovalcev v letih 2014-2016.

Vrsta vzorca	2014	2015	2016	SKUPAJ
Pšenica	44	23	25	92
Ječmen	17	18	17	52
Tritikala	9	10	5	24
Pira	7	2	9	18
Rž	6	6	5	17
Oves	8	4	2	14
skupaj	91	63	63	217

Skupno število odvzetih vzorcev žit iz mešalnic in od slovenskih pridelovalcev v letih 2014-2016 je bilo 421 (tabela 4).

Tabela 4. Število vzorcev iz mešalnic in od slovenskih pridelovalcev v letih 2014-2016.

Vrsta vzorca	2014	2015	2016	SKUPAJ
Pšenica	62	50	63	175
Ječmen	41	35	35	111
Tritikala	29	39	21	89
Rž	16	10	5	31
Oves	8	4	3	15
Skupaj	156	138	127	421

Iz ekološke pridelave je bilo odvzetih 47 vzorcev (tabela 5).

Tabela 5. Število in vrsta vzorcev iz ekološke pridelave v letih 2014-2016.

Vrsta vzorca	2014	2015	2016	SKUPAJ
Pira	5	1	7	13
Pšenica	6	5	1	12
Ječmen	5	3	1	9
Rž	2	1	3	6
Oves	2	1	2	5
Tritikala	1	0	0	1
Proso	0	0	1	1
Skupaj	21	11	15	47

3.1.2 Vzorci obrokov in posamičnih krmil

V rejah govejih pitancev, kjer so se pojavljale gangrene repov, smo vzorčili obroke in posamezne komponente obrokov. Obiskali smo 9 kmetij in skupno odvzeli 87 vzorcev. Vzorčenje na kmetijah smo opravili v letu 2014 in 2015. Ker nismo potrdili povezave med vsebnostjo ergot alkaloidov v krmi in gangrenami repov, v letu 2016 na kmetijah nismo več vzorčili (tabela 6).

Tabela 6. Vzorci krme, odvzeti na kmetijah, kjer so se pojavljale gangrene repov.

Vrsta vzorca	2014	2015	SKUPAJ
Obrok	8	9	17
Koruzna silaža	6	8	14
Slama	3	10	13
Seno	4	8	12
Koruzni šrot	3	5	8
Travna silaža	2	6	8
Koruzni storži	1	2	3
Silirano koruzno zrnje	0	2	2
Koruza	1	1	2
Ječmen	0	2	2
Pivske tropine	1	1	2
Krmna mešanica za govedo	1	1	2
Krmna mešanica za prašiče	0	2	2
Skupaj	30	57	87

V letu 2015 so se gangrene repov začele pojavljati tudi na farmi prašičev, zato smo preiskali tudi dva vzorca krmne mešanice za prašiče.

3.1.3 Vzorčenje sklerocijev

V letu 2014 in 2015 smo vzorčili tudi sklerocije na samoniklih travah. Osredotočili smo se predvsem na samonikle trave v bližini njiv z ržjo in tritikalo. Vzorčili smo le na lokacijah, na katere so nas usmerili terenski svetovalci iz kmetijskih zavodov na območju Prekmurja in Koroške, kjer je največ rži in so preverjene lokacije s prisotnostjo rožička. Vzorčili smo v osmih regijah Slovenije: Dolenjska, Gorenjska, Koroška, Notranjska, Štajerska, Prekmurje, Primorska in Osrednja Slovenija. V sklerocijih smo v primeru, da je bilo dovolj vzorca (sklerociji na nekaterih travah so bili zelo majhni), določali vsebnost ergot alkaloidov. Na takšen način smo dobili vpogled, kateri ergot alkaloidi in v kakšnem razmerju se v Sloveniji pojavljajo.

V rejah govejih pitancev, kjer so se pojavljale gangrene repov, smo prav tako opravili pregled travnikov, ki so jih kosili za seno.

Leta 2014 smo na 37 različnih lokacijah z žit in trav pobrali 113 vzorcev rženega rožička. V letu 2015 smo pobrali 54 vzorcev rženega rožička, in sicer na 16 lokacijah po Sloveniji.

Glede na količino nabranih sklerocijev smo v letu 2014 za analizo lahko pripravili 28 vzorcev, v letu 2015 pa 20 vzorcev, skupaj torej 48 vzorcev.

V letu 2016 smo našli okužene posamezne trave. Rožička je bilo premalo, da bi lahko pripravili vzorce za analize.

3.2 Metode

3.2.1 Določanje ergot alkaloidov

Za določanje alkaloidov rožička smo uporabili postopek, sestavljen iz ekstrakcije toksinov iz vzorcev žit z mešanico acetonitrila in raztopine amonijevega karbonata in določitve s tekočinsko kromatografijo s tandemsko masno spektrometrijo (LC-MS/MS). Priprava vzorcev in določanje toksinov sta temeljila na analiznih postopkih, opisanih v literaturi (Krska in sod., 2008; Crews in sod., 2009; Kokkonen in Jestoi, 2010; Diana di Mavungu in sod., 2012; Mulder in sod., 2012). Vzorce smo zmleli z laboratorijskim mlinom Retsch ZM 100 (Haan, Nemčija) do velikosti delcev 1 mm. 20 g zmletega vzorca smo 0,5 ure stresali s 100 ml ekstrakcijske mešanice (acetonitril in raztopina 0.2 g amonijevega karbonata na liter deionizirane vode v razmerju 84:16) na stresalniku IKA HS (IKA Labortechnik, Staufen, Nemčija). 4 ml ekstrakta smo očistili na koloni MycoSep, 1 ml prečiščenega ekstrakta pa uparili pri 40 °C v vakuumu do suhega (s pomočjo sistema Syncore Polyvap, Büchi, Flawil, Švica). Suhi ostanek smo raztopili v 0,5 ml mešanice acetonitrila in raztopine amonijevega karbonata (50:50). 10 µl raztopine smo injicirali v sistem Acquity UPLC H Class sklopljen z

masnim spektrometrom s tremi kvadrupoli Xevo TK MS, opremljenim z vmesnik za ionizacijo z elektrosprejem (ESI) in programsko opremo MassLynx za zbiranje in obdelavo podatkov (Waters, Milford, MA, ZDA). Viale smo hranili v avtomatskem vzorčevalniku pri 15 °C. Kromatografsko ločevanje smo izvedli na koloni Ascentis Express fenil-heksil, 2,7 µm, 10 x 2,1 cm (Supelco). Dve komponenti mobilne faze smo mešali v gradientnem načinu. Komponenta A je bila deionizirana voda, ki je vsebovala 0,2 g amonijevega karbonata na liter, komponenta B pa acetonitril, ki je vseboval 1 ml mravljinčne kisline na liter. Začetna sestava eluenta je bila 95 % A in 5 % B. Delež komponente B smo linearno povečali na 25 % v 1 minuti in nadalje na 60 % v naslednjih 7 minutah. V naslednji 0,1 minute smo delež komponente B zmanjšali nazaj na 5 % in nato to razmerje vzdrževali 17 minut. Pretok mobilne faze je bil 100 µl/min, temperatura kolone pa 30 °C. Analiza MS/MS je bila izvedena v načinu ESI+, trojni kvadrupol je deloval v načinu MRM. Napetost na kapilari je bila 3,8 kV, temperatura odparevanja topila 500 °C in temperatura ionskega izvora 150 °C. Kvantifikacijo smo izvedli s kalibracijo na matriksu. Metodo smo validirali. Meja določanja (limit of quantification, LOQ) posameznih alkaloidov rožička je bila ocenjeni na 10 µg/kg. Izkoristek ter ponovljivost in obnovljivost analiznega postopka smo določili z analizo vzorcev, ki smo jim dodali alkaloide rožička v koncentracijah 10, 200 in 500 µg/kg.

Za določitev koncentracije alkaloidov v rožičkih smo rožičke zdrobili in jih nato analizirali na enak način kot vzorce žit. Zatehtali smo samo 0,1 g vzorca, po ekstrakciji pa smo ekstrakt še dodatno razredčili.

V skladu s Členom 3(2) Uredbe ES št. 273/2004 in Členom 6(1) Uredbe ES št. 111/20054 smo v zvezi z analitiko alkaloidov rožička pridobili posebno licenco za uporabo substanc ergometrina in ergotamina, ki sta uvrščeni na seznam predhodnih sestavin za prepovedane droge. Posebno licenco (št. 18700/17/2013/10) je izdalo Ministrstvo za zdravje RS, Urad za kemikalije RS, 12. 2. 2014.

3.2.2 Določanje alternarijskih toksinov

Za ekstrakcijo alternarijskih toksinov iz vzorcev žit smo uporabili mešanico acetonitrila in deionizirane vode, za določanje pa prav tako LC-MS/MS. Priprava vzorcev in določanje toksinov sta temeljila na analiznih postopkih, ki so jih opisali Driehuis in sod., 2008; Lattanzio in sod., 2011 ter Rasmussen in sod., 2010. 10 g vzorca smo 1 uro stresali na stresalniku s 100 ml mešanice acetonitril-deionizirana voda (84+16). 4 ml filtriranega ekstrakta smo uparili pod vakuumom do suhega in suhi ostanek raztopili v 0,5 ml mešanice metanola in deionizirane vode (20+80). 10 µl raztopine smo injicirali v že omenjeni sistem LC-MS/MS. Kromatografsko ločevanje smo izvedli na koloni Zorbax Eclipse Plus C18 Rapid Resolution HD, 2,1 x 100 mm, 1,8 µm (Agilent). Mobilna faza je bila sestavljena iz dveh komponent, ki smo ju gradientno mešali. Mobilna faza A je bila mešanica deionizirane vode, 5 mM amonijevega acetata in 0,5 % očetne kisline, mobilna faza B pa mešanica metanola, 5 mM amonijevega acetata in 0,5 % očetne kisline. Začetna sestava eluenta je bila 95 % A in 5

% B. Delež komponente B smo linearno povečali na 40 % v 4 minutah in nadalje na 70 % v naslednjih 8 minutah. To sestavo smo vzdrževali 4 minute, nato pa smo komponenta B v 1,5 minute povečali na 90 %. Delež komponente B smo vzdrževali pri 90 % 2,5 minute in ga nato zmanjšali nazaj na 5 % v 1 minuti. Končna zmes smo vzdrževali 4 min. Pretok mobilne faze je bil 300 µl/min, temperatura kolone 40 °C. Analiza MS/MS je bila izvedena v načinu ESI–, razen pri tentoksinu, kjer smo uporabili ESI+. Kvadrupolni masni spektrometer je deloval v načinu MRM. Napetost na kapilari je bila 3,4 kV, temperatura odparevanja topila 500 °C, temperatura ionskega izvora 150 °C in napetost kolizijske celice 20 V. LOQ za posamezne alternarijske toksine je bil 25 µg/kg.

3.2.3 Določanje sklerocijev v vzorcih žit

Vzorci, v katerih smo dokazali ergot alkaloidne smo pregledali po metodi, ki jo predpisuje *International Association of Feedstuff Analysis* (IAG-metoda A4) in določili utežni delež sklerocijev na kilogram vzorca. S takšnim pristopom smo povezali količino sklerocijev s pojavljanjem posameznih ergot alkaloidov.

3.2.4 Določanje okuženosti zrnja z glivami rodu *Alternaria*

Vzorci, v katerih smo ugotovili alternarijske mikotoksine je prevzel fitopatološki laboratorij, kjer so opravili analizo okuženosti zrnja z glivami rodu *Alternaria*. Okuženost zrnja so ugotavljali na podlagi standardov, ki jih predpisuje ISTA (*International Seed Testing Association*). Pridobljene glive *Alternaria* spp. so izolirali v čistih kulturah in jim s pomočjo molekularnih metod določili njihovo vrstno pripadnost.

3.2.5 Molekularna analiza endofitskih gliv

Vzorci, v katerih smo dokazali ergot alkaloidne in alternarijske toksine, smo obdelali tudi z molekularnimi metodami in s tem pridobili podatke o genetski diferenciaciji rženega rožička in *Alternaria* spp. glede na gostiteljsko rastlino in geografsko razširjenost v Sloveniji.

DNA je bila iz sklerocijev izolirana z uporabo GenElute Plant Genomic DNA miniprep kita, po navodilih proizvajalca (Sigma). Za identifikacijo je bil uporabljen del regije 5.8S-ITS2-28S, ki je bil pomnožen s primer-jii ITS1F-ITS4. PCR analiza je bila izvedena pri naslednjih pogojih: 1 min na 94 °C, nato 35 ciklov denaturacije za 35 s pri 94 °C, ločevanje verige pri 55 °C za 35 s, in podaljševanje pri temperaturi 72 °C za 30 s. Faza podaljševanja je bila podaljšana v vsakem ciklu za 5 s. Končna ekstenzija je bila pri 72 °C za 10 min. Reakcijska mešanica za PCR je vsebovala: 2,5 µl 10× PCR pufra, 2,5 mM MgCl₂, 200 µM vsakega

nukleotida, 500 nM vsakega primer-ja, 0,75 U DNA polimeraze in 12,5 µl stokrat razredčene predloge. Sekveniranje je bilo izvedeno s ITS1F in ITS4 primer-ji z uporabo BigDye terminator Ready Reaction Cycle Sequencing kitov na ABI 3730xl DNA analizatorju (Applied Biosystems).

Dobljene sekvence so bile preiskane z GenBank z uporabo privzete možnosti gapped-BLAST in usklajene s najbližjimi ujemanji in dodatnimi predstavniki skupin iz GenBank-e. Robustnost notranjih vej je bila analizirana z analizo bootstrap (500 potovanj). Funkcijski *modelTest* je bil uporabljen za primerjavo različnih nukleotidnih modelov in je podal najnižjo Aicikejevo merilo za informacije (AIC) za model HKY + G in najnižjo Bayesovsko merilo za informacije (BIC) za model JC + G. Primerjava med modeli, ki uporabljajo statistiko razmerja verjetnosti, ni pokazala nobenih statistično pomembnih razlik, zato je bil izbran enostavnejši model JC + G. Največja verjetnostna drevesa (ML) smo izračunali z uporabo knjižnice Phangorn, ki se izvaja v statističnem okviru R različice 3.3.2.

Minimalne mreže (haplotipa) so bile izdelane za podatkovni niz ITS rDNA z uporabo PopArt (Populacijska analiza z mrežnimi mrežami) s privzetimi nastavitvami. V teh analizah so bili vključeni vsi podatki sekvenc.

3.2.6 Statistične metode

Za dobljene podatke o vsebnosti ergot alkaloidov in alternarijskih toksinov smo izračunali število pozitivnih vzorcev, minimum, maksimum, povprečne vrednosti, mediano in standardno deviacijo.

Pri rezultatih molekularnih metod je bila kompozicijska neskladnost ergot alkaloidov med vzorci sklerocijev *C. purpurea* ocenjena z evklidskimi distancami in analizirana s hierarhično eksperimentalno zasnovo (z regijo, afiniteto gostiteljske plemenske skupine in genetsko skupino *C. purpurea* kot skupinski faktor) z uporabo permutacijske multivariatne analize variance (perMANOVA). Analize variance smo izvedli z adonisovo funkcijo R Vegan paketa z uporabo 999 permutacij. Možnost signifikantnih učinkov, ki so posledica razlik v multivariatni disperziji in ne spremembi kompozicije, smo testirali na podlagi multivariatnih disperzijskih meritev znotraj in med skupinami (z uporabo funkcije betadisperja paketa Vegan). Genetska skupina 3 je bila izpuščena iz analiz sestave ergot alkaloidov v različnih genetskih skupinah, saj je bila ugotovljena le enkrat.

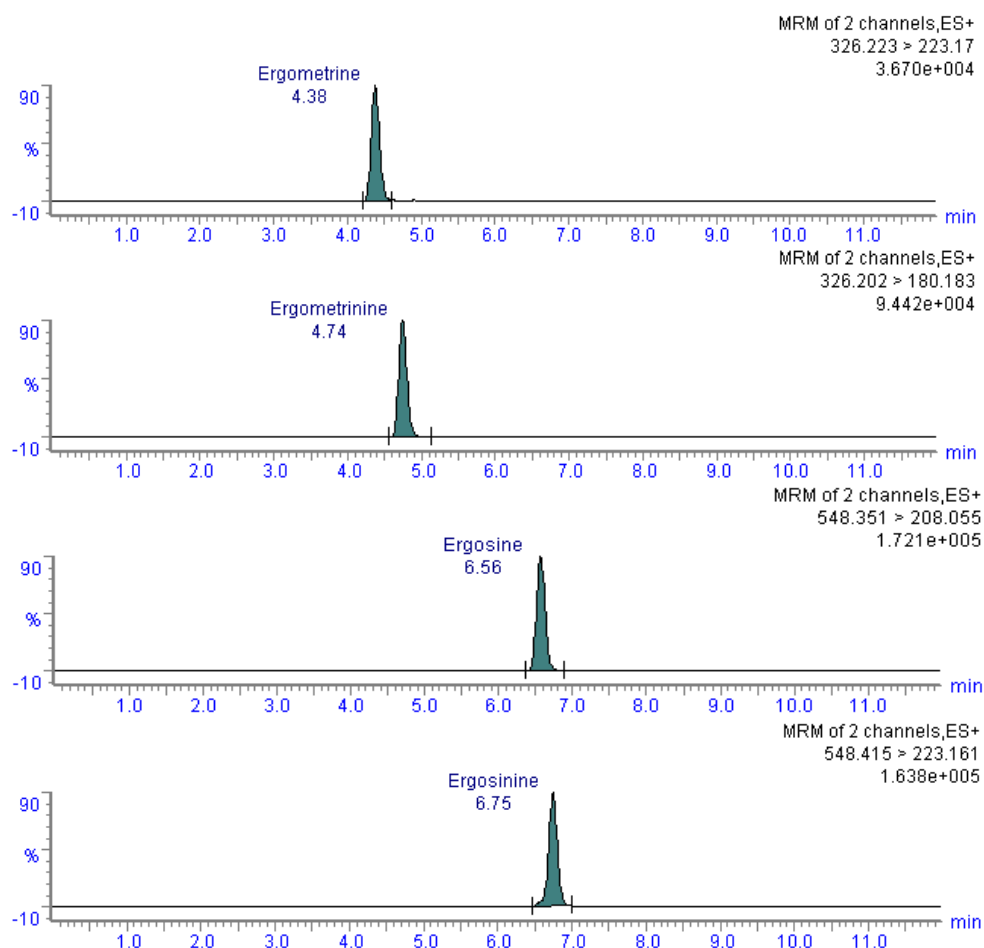
Evklidske matrike razdalj, dobljene iz podatkovnih nizov sestavin ergot alkaloidov smo analizirali z nemetričnim večdimenzionalnim skaliranjem (NMDS) z uporabo metaMDS funkcije paketa R Vegan. Statistična analiza skupne koncentracije ergot alkaloidov je bila izvedena v R z vgrajenimi funkcijami za ANOVA in Holm-Sidak post-hoc test (primerjava med geografskimi regijami in rastlinskimi gosti) in t-test (primerjava med genskimi skupinami 1 in 2) pri $p < 0,05$. Korelacije med posameznimi ergot alkaloidi in skupnimi ergot alkaloidi so bile opravljene s Pearsonovim korelacijskim testom z vgrajenimi funkcijami v R.

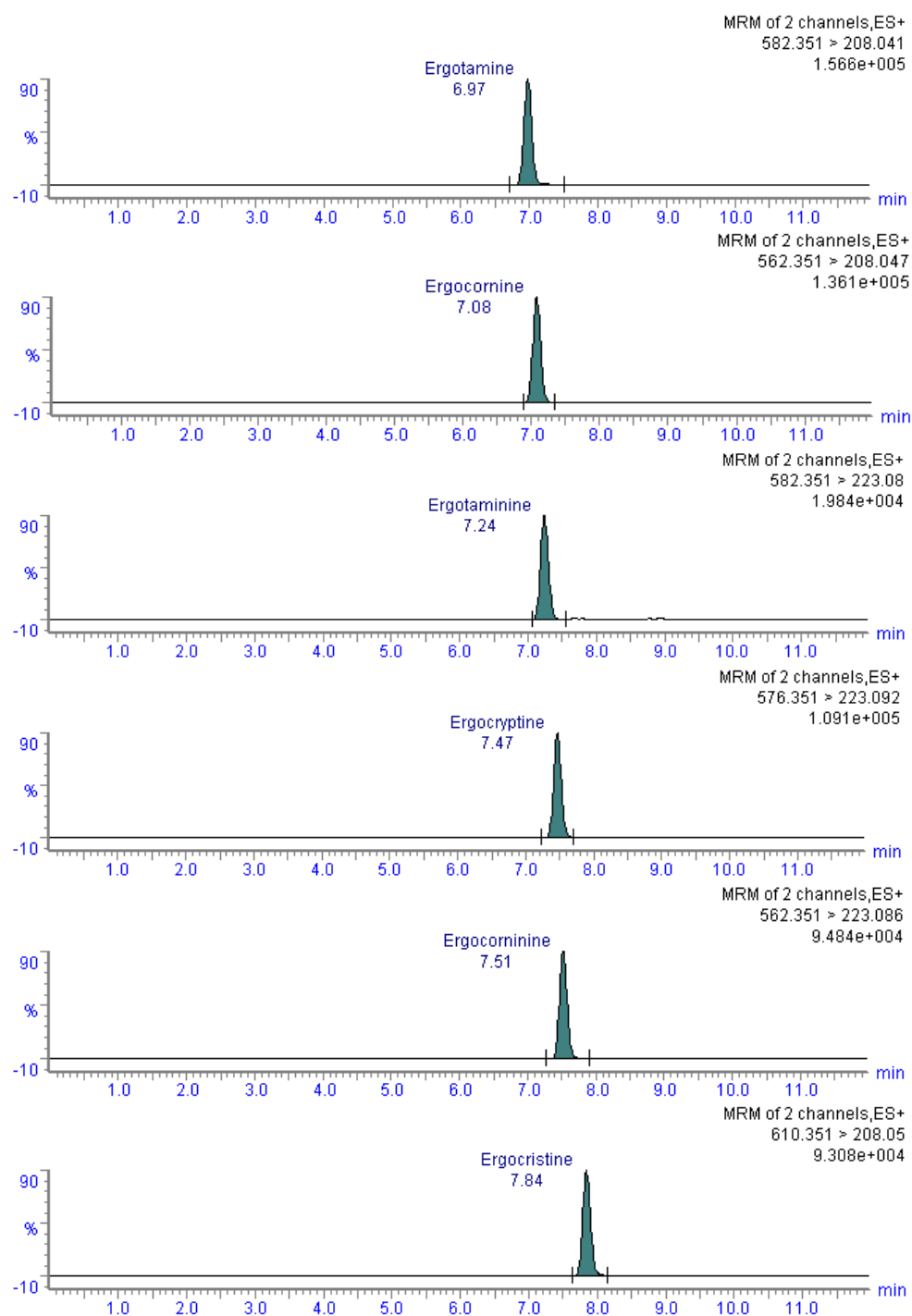
Za izračun edinstvenih in skupnih učinkov geografske lege, afinitete gostiteljev (tribus) in genetske skupine *C. purpurea* ter sestave ergot alkaloidov, je bila izvedena variacijska analiza particioniranja (delna RDA). Variacijska analiza particioniranja, z uporabo varpartove funkcije, in pomembnost vsake testne frakcije pri variacijski analizi particije, smo dobili iz funkcij rda in anova.cca. Funkcije varpart, rda in anova.cca so del paketa Vegan.

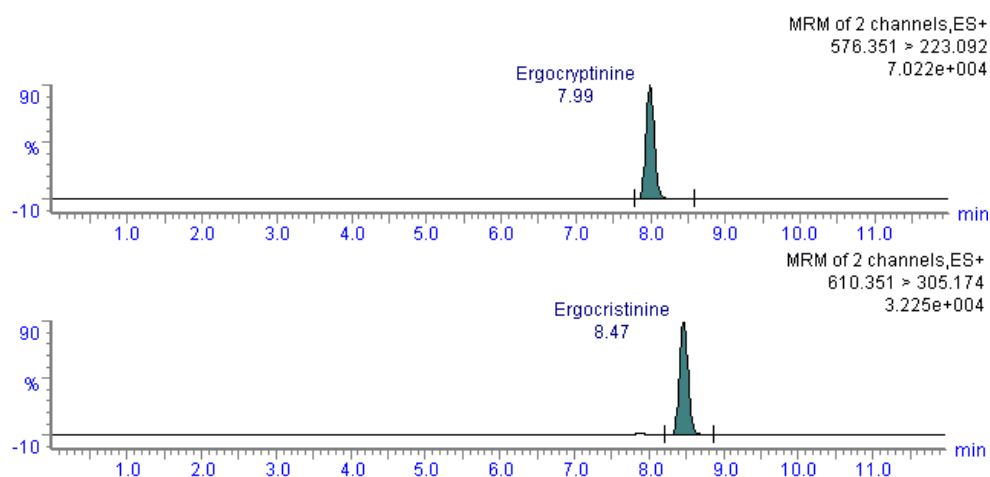
4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 Metoda za določanje ergot alkaloidov in alternarijskih toksinov

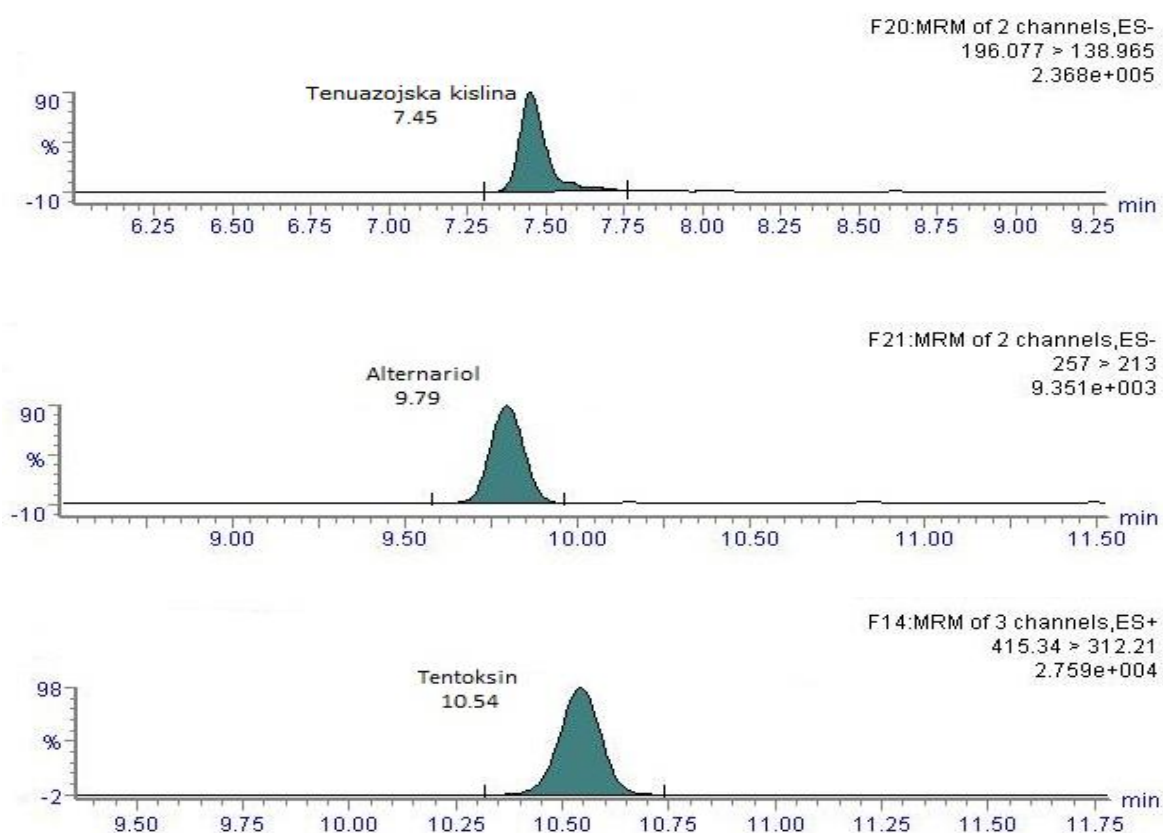
Vzorci smo preiskali na 12 ergot alkaloidov (ergometrin, ergotamin, ergozin, ergokristin, ergokriptin in ergokornin ter njihove -inine) in štiri alternarijske toksine (tenuazojska kislina, alternariol, alternariol monometil eter in tentoksin) (Sliki 1 in 2). Metodo za ergot alkaloidne smo tudi validirali in akreditirali.

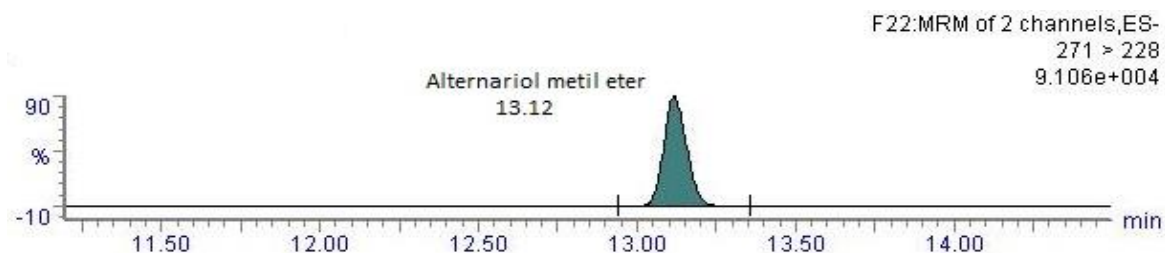






Slika 1. Kromatogrami LC-MS/MS MRM vzorca ječmena z dodatkom standardne raztopine ergot alkaloidov.





Slika 2. Kromatogrami LC-MS/MS MRM vzorca ječmena z dodatkom standardne raztopine alternarijskih toksinov.

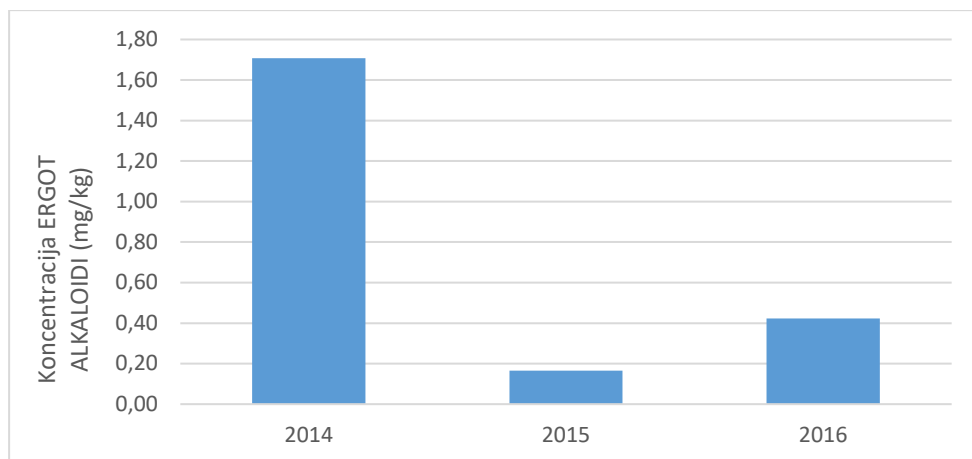
4.2 Rezultati analiz na ergot alkaloide

Med skupno 421. odvzetimi vzorci žit je bilo največ pozitivnih vzorcev na ergot alkaloide v letu 2014, najmanj pa leta 2016 (tabela 7). Vseh pozitivnih vzorcev je bilo 27 %.

Tabela 7. Vsebnost skupnih ergot alkaloidov v žitih (mg/kg).

	2014	2015	2016	SKUPAJ
Št.vzorcev	156	138	127	421
Št. pozitivnih vzorcev	74	28	12	114
% pozitivnih vzorcev	47	20	9	27
Povpr. konc. (mg/kg)	1,71	0,17	0,42	1,19
Minimum	0,01	0,01	0,02	0,01
Maksimum	55,00	0,94	2,19	55,00
Mediana	0,05	0,06	0,15	0,08

V letu 2014 je bila v primerjavi z naslednjimi dvema leti največja koncentracija skupnih ergot alkaloidov, najmanjša pa v letu 2015. Leta 2016 se je ponovno nekoliko povečala (slika 3).



Slika 3. Povprečne koncentracije ergot alkaloidov (mg/kg) v žitih po posameznih letih.

V vzorcih smo dokazali vseh 12 ergot alkaloidov (tabela 8). Pojavljali so se v 9-19 % vzorcev. Največ vzorcev (19 %) je vsebovalo ergozinin (0,001-16,194 mg/kg), ergozin (17 %; 0,001-0,625), ergokristinin (17 %; 0,01-0,856 mg/kg).

Leta 2014 je največ vzorcev vsebovalo ergozinin (0,001-16,194 mg/kg) in ergokristinin (0,001-10 mg/kg) (tabela 9), v letu 2015 ergometrin (0,001-0,197 mg/kg) in ergozin (0,03-0,137 mg/kg) (tabela 10) ter v letu 2016 ergokristin (0,011-0,187 mg/kg), ergokristinin (0,011-0,140 mg/kg), ergozin (0,015-0,590 mg/kg), ergozinin (0,012-0,950 mg/kg) in ergometrin (0,010-0,432 mg/kg) (tabela 11). Število vzorcev posameznih vrst žit je bilo v vseh treh letih približno enako, zato lahko rečemo, da se v naši žitih najpogosteje pojavljajo ergometrin, ergokristin, ergozin in ergozinin.

Tabela 8. Vsebnost ergot alkaloidov v vzorcih žit v letih 2014 – 2016 (mg/kg)

VSA ŽITA, 3 leta	Ergometrin	Ergometrinin	Ergozin	Ergozinin	Ergokornin	Ergokorninin	Ergokriptin	Ergokriptinin	Ergotamin	Ergotaminin	Ergokristin	Ergokristinin
Število vzorcev	421	421	421	421	421	421	421	421	421	421	421	421
Število pozitivnih vzorcev	66	42	71	81	40	44	51	59	47	45	64	70
% pozitivnih vzorcev	16	10	17	19	9	10	12	14	11	11	15	17
Povprečje (mg/kg)	0,034	0,012	0,055	0,679	0,029	0,019	0,063	0,048	0,047	0,040	0,072	0,055
Minimum	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
Maksimum	0,432	0,059	0,625	16,194	0,185	0,103	1,660	1,327	0,492	0,293	1,058	0,856
Mediana	0,014	0,006	0,014	0,014	0,010	0,009	0,017	0,012	0,011	0,012	0,017	0,014

Tabela 9. Koncentracije posameznih epimerov ergot alkaloidov v žitih leta 2014 (mg/kg).

VSA ŽITA 2014	Ergometrin	Ergometrinin	Ergozin	Ergozinin	Ergokornin	Ergokorninin	Ergokriptin	Ergokriptinin	Ergotamin	Ergotaminin	Ergokristin	Ergokristinin
Število vzorcev	156	156	156	156	156	156	156	156	156	156	1560	156
Število pozitivnih vzorcev	37	22	42	56	22	28	36	40	32	32	42	49
% pozitivnih vzorcev	24	14	27	36	14	18	23	26	21	21	27	31
Povprečje (mg/kg)	0,020	0,012	0,083	0,976	0,177	0,164	0,213	0,206	0,268	0,286	0,293	0,261
Minimum	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
Maksimum	0,199	0,059	1,000	16,194	3,000	4,000	5,000	6,000	7,000	8,000	9,000	10,000
Mediana	0,010	0,006	0,019	0,023	0,023	0,010	0,014	0,011	0,012	0,013	0,015	0,014

Tabela 10. Koncentracije posameznih epimerov ergot alkaloidov v žitih leta 2015 (mg/kg).

VSA ŽITA 2015	Ergometrin	Ergometrinin	Ergozin	Ergozinin	Ergokornin	Ergokorninin	Ergokriptin	Ergokriptinin	Ergotamin	Ergotaminin	Ergokristin	Ergokristinin
Število vzorcev	138	138	138	138	138	138	138	138	138	138	138	138
Število pozitivnih vzorcev	22	17	22	17	14	11	10	13	12	11	13	13
% pozitivnih vzorcev	16	12	16	12	10	8	7	9	9	8	9	9
Povprečje (mg/kg)	0,033	0,007	0,019	0,013	0,010	0,009	0,033	0,022	0,041	0,045	0,056	0,044
Minimum	0,001	0,001	0,003	0,002	0,001	0,002	0,005	0,002	0,002	0,002	0,005	0,001
Maksimum	0,197	0,021	0,137	0,052	0,043	0,026	0,086	0,094	0,213	0,293	0,208	0,197
Mediana	0,020	0,005	0,009	0,008	0,005	0,005	0,018	0,011	0,009	0,005	0,018	0,011

Tabela 11. Koncentracije posameznih epimerov ergot alkaloidov v žitih leta 2016 (mg/kg).

VSA ŽITA 2016	Ergometrin	Ergometrinin	Ergozin	Ergozinin	Ergokornin	Ergokorninin	Ergokriptin	Ergokriptinin	Ergotamin	Ergotaminin	Ergokristin	Ergokristinin
Število vzorcev	127	127	127	127	127	127	127	127	127	127	127	127
Število pozitivnih vzorcev	7	3	7	8	4	5	5	6	3	2	9	8
% pozitivnih vzorcev	6	2	6	6	3	4	4	4	2	2	7	6
Povprečje (mg/kg)	0,115	0,040	0,140	0,180	0,024	0,024	0,034	0,044	0,031	0,041	0,056	0,052
Minimum	0,010	0,034	0,015	0,012	0,016	0,010	0,011	0,018	0,011	0,030	0,011	0,011
Maksimum	0,432	0,050	0,590	0,950	0,037	0,037	0,075	0,126	0,043	0,051	0,187	0,140
Mediana	0,052	0,036	0,069	0,057	0,023	0,028	0,028	0,028	0,038	0,041	0,019	0,038

V pšenici smo dokazali vse ergot alkalode (tabela 12). Koncentracije so bile v vseh vzorcih manj kot 1 mg/kg. Največ vzorcev (21 in 20%) je vsebovalo ergokristinin in ergokornin. V letu 2014 je največ vzorcev vsebovalo ergozinin in ergokristinin (tabela 13), leta 2015 pa sta prevladovala ergometrin in ergozin (tabela 14). V letu 2016 je bilo največ vzorcev onesnaženih z ergokristinom in ergokristininom (tabela 15). Leta 2016 je bil delež pozitivnih vzorcev bistveno manjši, poleg tega vzorci niso vsebovali ergometrinina, ergotamina in ergotaminina.

V ječmenu smo prav tako kot v pšenici dokazali vse ergot alkaloidne (tabela 16). Koncentracije so bile v vseh vzorcih manj kot 1 mg/kg. Največ vzorcev (12 in 11 %) je vsebovalo ergozinin, ergozin in ergokriptin. Leta 2015 vzorci niso vsebovali ergokristinina. V letu 2014 je največ vzorcev vsebovalo ergokriptinin in ergokristinin (tabela 17), leta 2015 pa smo v enakem številu vzorcev dokazali ergometrin, ergozin, ergozinin in ergokornin (tabela 18). V letu 2016 je bilo največ vzorcev onesnaženih z ergometrinom, ergozin, ergozinin, ergokristin in ergokristinin (tabela 19).

Prav tako smo v rži dokazali vse ergot alkaloidne (tabela 20). Koncentracije so bile v vseh vzorcih manj kot 1 mg/kg, razen v letu 2014, ko je bila povprečna koncentracija ergozinina 0,045-16,194 mg/kg. Največ vzorcev (52 in 29%) je vsebovalo ergozinin, ergozin in ergokriptin. Leta 2015 vzorci niso vsebovali ergokristinina. V letu 2014 je največ vzorcev vsebovalo ergokriptinin in ergokristinin (tabela 21), leta 2015 pa smo v enakem številu vzorcev dokazali ergozin in ergozinin in ergokornin (tabela 22). V letu 2016 je bilo največ vzorcev onesnaženih z ergokorninom (tabela 23).

V vzorcih tritikale smo dokazali vse ergot alkalode (tabela 24). Koncentracije so bile manj kot 1 mg/kg, razen leta 2014 pri ergokristinu (0,017-1,058 mg/kg) in ergokriptinu (0,001-1,660 mg/kg) (tabela 25). V letu 2014 je največ vzorcev vsebovalo ergozin (24 %), ergozinin (24 %) in ergokriptin (24 %) (tabela 25). Leta 2015 so prevladovali ergozin (13 %), ergometrin in ergometrinin (13 %) (tabela 26). V letu 2016 je enako število vzorcev (5 %) vsebovalo ergozin, ergozinin, ergokornin, ergokriptin, ergokriptinin, ergotamin in ergokristin. Leta 2016 pa vzorci niso vsebovali ergometrina, ergometrinina, ergokorninina, ergotaminina in ergokristinina (tabela 27).

V ovsu smo dokazali vse ergot alkaloidne (tabela 28). Koncentracije v vzorcih so bile manj kot 1 mg/kg. Leta 2014 vzorci niso vsebovali ergometrinina in ergokornina. Vsako leto je bilo preiskanih manj kot 10 vzorcev, zato rezultatov nismo predstavili v posebnih tabelah.

Tabela 12. Koncentracije posameznih epimerov ergot alkaloidov v vzorcih pšenice v letih 2014-2016 (mg/kg).

PŠENICA, 3 leta	Ergometrin	Ergometrinin	Ergozin	Ergozinin	Ergokornin	Ergokorninin	Ergokriptin	Ergokriptinin	Ergotamin	Ergotaminin	Ergokristin	Ergokristinin
Število vzorcev	175	175	175	175	175	175	175	175	175	175	175	175
Število pozitivnih vzorcev	32	20	29	35	21	17	24	22	22	22	32	36
% pozitivnih vzorcev	18	11	17	20	12	10	14	13	13	13	18	21
Povprečje (mg/kg)	0,029	0,011	0,054	0,061	0,029	0,016	0,025	0,019	0,047	0,029	0,060	0,037
Minimum	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
Maksimum	0,199	0,059	0,625	0,913	0,185	0,057	0,164	0,079	0,492	0,231	0,810	0,413
Mediana	0,015	0,005	0,012	0,007	0,007	0,007	0,007	0,009	0,007	0,009	0,013	0,008

Tabela 13. Koncentracije posameznih epimerov ergot alkaloidov v vzorcih pšenice leta 2014 (mg/kg).

PŠENICA, 2014	Ergometrin	Ergometrinin	Ergozin	Ergozinin	Ergokornin	Ergokorninin	Ergokriptin	Ergokriptinin	Ergotamin	Ergotaminin	Ergokristin	Ergokristinin
Število vzorcev	62	62	62	62	62	62	62	62	62	62	62	62
Število pozitivnih vzorcev	19	13	19	27	14	12	20	18	18	18	23	27
% pozitivnih vzorcev	31	21	31	44	23	19	32	29	29	29	37	44
Povprečje (mg/kg)	0,024	0,014	0,068	0,073	0,041	0,019	0,027	0,021	0,054	0,033	0,072	0,040
Minimum	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
Maksimum	0,199	0,059	0,625	0,913	0,185	0,057	0,164	0,079	0,492	0,231	0,810	0,413
Mediana	0,007	0,007	0,012	0,011	0,009	0,014	0,006	0,009	0,008	0,012	0,009	0,004

Tabela 14. Koncentracije posameznih epimerov ergot alkaloidov v vzorcih pšenice leta 2015 (mg/kg).

PŠENICA, 2015	Ergometrin	Ergometrinin	Ergozin	Ergozinin	Ergokornin	Ergokorninin	Ergokriptin	Ergokriptinin	Ergotamin	Ergotaminin	Ergokristin	Ergokristinin
Število vzorcev	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Število pozitivnih vzorcev	10	7	8	5	6	4	3	3	4	4	5	5
% pozitivnih vzorcev	20	14	16	10	12	8	6	6	8	8	10	10
Povprečje (mg/kg)	0,037	0,005	0,024	0,004	0,004	0,004	0,016	0,006	0,014	0,011	0,040	0,025
Minimum	0,002	0,001	0,003	0,002	0,001	0,002	0,005	0,002	0,002	0,003	0,013	0,004
Maksimum	0,197	0,021	0,137	0,006	0,009	0,007	0,035	0,011	0,043	0,034	0,091	0,082
Mediana	0,018	0,003	0,008	0,004	0,002	0,004	0,007	0,004	0,006	0,004	0,022	0,010

Tabela 15. Koncentracije posameznih epimerov ergot alkaloidov v vzorcih pšenice leta 2016 (mg/kg).

PŠENICA, 2016	Ergometrin	Ergometrinin	Ergozin	Ergozinin	Ergokornin	Ergokorninin	Ergokriptin	Ergokriptinin	Ergotamin	Ergotaminin	Ergokristin	Ergokristinin
Število vzorcev	63	63	63	63	63	63	63	63	63	63	63	63
Število pozitivnih vzorcev	3	0	2	3	1	1	1	1	0	0	4	4
% pozitivnih vzorcev	5	0	3	5	2	2	2	2	0	0	6	6
Povprečje (mg/kg)	0,041	0,000	0,046	0,046	0,019	0,037	0,011	0,030	0,000	0,000	0,014	0,029
Minimum	0,017	0,000	0,022	0,024	0,019	0,037	0,011	0,030	0,000	0,000	0,011	0,011
Maksimum	0,083	0,000	0,069	0,075	0,019	0,037	0,011	0,030	0,000	0,000	0,016	0,075
Mediana	0,024	0,000	0,046	0,038	0,019	0,037	0,011	0,030	0,000	0,000	0,014	0,015

Tabela 16. Koncentracije posameznih epimerov ergot alkaloidov v vzorcih ječmena v letih 2014-2016 (mg/kg).

JEČMEN, 3 leta	Ergometrin	Ergometrinin	Ergozin	Ergozinin	Ergokornin	Ergokorninin	Ergokriptin	Ergokriptinin	Ergotamin	Ergotaminin	Ergokristin	Ergokristinin
Število vzorcev	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111
Število pozitivnih vzorcev	9	6	12	13	5	9	6	12	8	7	11	11
% pozitivnih vzorcev	8	5	11	12	5	8	5	11	7	6	10	10
Povprečje (mg/kg)	0,057	0,010	0,026	0,030	0,012	0,007	0,018	0,007	0,008	0,007	0,033	0,023
Minimum	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
Maksimum	0,432	0,036	0,137	0,229	0,026	0,026	0,075	0,048	0,043	0,030	0,187	0,140
Mediana	0,008	0,006	0,006	0,005	0,005	0,004	0,006	0,002	0,002	0,002	0,011	0,004

Tabela 17. Koncentracije posameznih epimerov ergot alkaloidov v vzorcih ječmena leta 2014 (mg/kg).

JEČMEN, 2014	Ergometrin	Ergometrinin	Ergozin	Ergozinin	Ergokornin	Ergokorninin	Ergokriptin	Ergokriptinin	Ergotamin	Ergotaminin	Ergokristin	Ergokristinin
Število vzorcev	41	41	41	41	41	41	41	41	41	41	41	41
Število pozitivnih vzorcev	4	3	7	8	1	6	3	9	6	5	8	9
% pozitivnih vzorcev	10	7	17	20	2	15	7	22	15	12	20	22
Povprečje (mg/kg)	0,003	0,003	0,003	0,004	0,001	0,003	0,003	0,002	0,003	0,003	0,012	0,007
Minimum	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
Maksimum	0,007	0,005	0,011	0,014	0,001	0,009	0,006	0,004	0,010	0,008	0,048	0,028
Mediana	0,003	0,002	0,001	0,001	0,001	0,002	0,001	0,001	0,002	0,002	0,003	0,002

Tabela 18. Koncentracije posameznih epimerov ergot alkaloidov v vzorcih ječmena leta 2015 (mg/kg).

JEČMEN, 2015	Ergometrin	Ergometrinin	Ergozin	Ergozinin	Ergokornin	Ergokorninin	Ergokriptin	Ergokriptinin	Ergotamin	Ergotaminin	Ergokristin	Ergokristinin
Število vzorcev	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35
Število pozitivnih vzorcev	3	2	3	3	3	2	2	2	1	1	1	0
% pozitivnih vzorcev	9	6	9	9	9	6	6	6	3	3	3	0
Povprečje (mg/kg)	0,018	0,007	0,009	0,011	0,010	0,016	0,011	0,010	0,003	0,004	0,011	0,000
Minimum	0,008	0,007	0,006	0,005	0,004	0,007	0,006	0,003	0,003	0,004	0,011	0,000
Maksimum	0,030	0,007	0,012	0,014	0,022	0,026	0,017	0,016	0,003	0,004	0,011	0,000
Mediana	0,016	0,007	0,009	0,014	0,005	0,016	0,011	0,010	0,003	0,004	0,011	0,000

Tabela 19. Koncentracije posameznih epimerov ergot alkaloidov v vzorcih ječmena leta 2016 (mg/kg).

JEČMEN, 2016	Ergometrin	Ergometrinin	Ergozin	Ergozinin	Ergokornin	Ergokorninin	Ergokriptin	Ergokriptinin	Ergotamin	Ergotaminin	Ergokristin	Ergokristinin
Število vzorcev	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35
Število pozitivnih vzorcev	2	1	2	2	1	1	1	1	1	1	2	2
% pozitivnih vzorcev	6	3	6	6	3	3	3	3	3	3	6	6
Povprečje (mg/kg)	0,221	0,036	0,128	0,164	0,026	0,013	0,075	0,048	0,043	0,030	0,132	0,096
Minimum	0,010	0,036	0,119	0,098	0,026	0,013	0,075	0,048	0,043	0,030	0,076	0,052
Maksimum	0,432	0,036	0,137	0,229	0,026	0,013	0,075	0,048	0,043	0,030	0,187	0,140
Mediana	0,221	0,036	0,128	0,164	0,026	0,013	0,075	0,048	0,043	0,030	0,132	0,096

Tabela 20. Koncentracije posameznih epimerov ergot alkaloidov v vzorcih rži v letih 2014 - 2016 (mg/kg).

RŽ, 3 leta	Ergometrin	Ergometrinin	Ergozin	Ergozinin	Ergokornin	Ergokorninin	Ergokriptin	Ergokriptinin	Ergotamin	Ergotaminin	Ergokristin	Ergokristinin
Število vzorcev	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31
Število pozitivnih vzorcev	9	8	11	16	5	9	7	11	6	7	7	10
% pozitivnih vzorcev	29	26	35	52	16	29	23	35	19	23	23	32
Povprečje (mg/kg)	0,030	0,014	0,029	3,115	0,018	0,024	0,034	0,041	0,100	0,100	0,043	0,066
Minimum	0,008	0,003	0,003	0,006	0,001	0,002	0,016	0,002	0,004	0,002	0,005	0,002
Maksimum	0,066	0,034	0,064	16,194	0,035	0,103	0,086	0,153	0,308	0,293	0,156	0,264
Mediana	0,021	0,009	0,017	0,220	0,024	0,010	0,024	0,025	0,036	0,059	0,014	0,028

Tabela 21. Koncentracije posameznih epimerov ergot alkaloidov v vzorcih rži leta 2014 (mg/kg).

RŽ, 2014	Ergometrin	Ergometrinin	Ergozin	Ergozinin	Ergokornin	Ergokorninin	Ergokriptin	Ergokriptinin	Ergotamin	Ergotaminin	Ergokristin	Ergokristinin
Število vzorcev	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
Število pozitivnih vzorcev	4	4	5	10	3	4	4	6	3	4	3	6
% pozitivnih vzorcev	25	25	31	63	19	25	25	38	19	25	19	38
Povprečje (mg/kg)	0,030	0,015	0,052	4,978	0,028	0,042	0,027	0,051	0,127	0,101	0,072	0,096
Minimum	0,010	0,003	0,027	0,045	0,024	0,004	0,016	0,002	0,031	0,011	0,014	0,018
Maksimum	0,066	0,029	0,064	16,194	0,035	0,103	0,045	0,153	0,308	0,215	0,156	0,264
Mediana	0,021	0,015	0,058	1,230	0,025	0,030	0,023	0,040	0,041	0,088	0,047	0,055

Tabela 22. Koncentracije posameznih epimerov ergot alkaloidov v vzorcih rži leta 2015 (mg/kg).

RŽ 2015	Ergometrin	Ergometrinin	Ergozin	Ergozinin	Ergokornin	Ergokorninin	Ergokriptin	Ergokriptinin	Ergotamin	Ergotaminin	Ergokristin	Ergokristinin
Število vzorcev	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Število pozitivnih vzorcev	4	3	5	5	2	3	2	4	3	3	4	4
% pozitivnih vzorcev	40	30	50	50	20	30	20	40	30	30	40	40
Povprečje (mg/kg)	0,025	0,006	0,009	0,010	0,003	0,003	0,051	0,031	0,074	0,100	0,021	0,023
Minimum	0,008	0,005	0,003	0,006	0,001	0,002	0,017	0,005	0,004	0,002	0,005	0,002
Maksimum	0,055	0,008	0,017	0,014	0,005	0,005	0,086	0,094	0,213	0,293	0,060	0,065
Mediana	0,018	0,006	0,009	0,009	0,003	0,003	0,051	0,012	0,005	0,005	0,010	0,012

Tabela 23. Koncentracije posameznih epimerov ergot alkaloidov v vzorcih rži leta 2016 (mg/kg).

RŽ 2016	Ergometrin	Ergometrinin	Ergozin	Ergozinin	Ergokornin	Ergokorninin	Ergokriptin	Ergokriptinin	Ergotamin	Ergotaminin	Ergokristin	Ergokristinin
Število vzorcev	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Število pozitivnih vzorcev	1	1	1	1	0	2	1	1	0	0	0	0
% pozitivnih vzorcev	20	20	20	20	0	40	20	20	0	0	0	0
Povprečje (mg/kg)	0,052	0,034	0,015	0,012	0,000	0,019	0,028	0,025	0,000	0,000	0,000	0,000
Minimum	0,052	0,034	0,015	0,012	0,000	0,010	0,028	0,025	0,000	0,000	0,000	0,000
Maksimum	0,052	0,034	0,015	0,012	0,000	0,028	0,028	0,025	0,000	0,000	0,000	0,000
Mediana	0,052	0,034	0,015	0,012	0,000	0,019	0,028	0,025	0,000	0,000	0,000	0,000

Tabela 24. Koncentracije posameznih epimerov ergot alkaloidov v vzorcih tritikale v letih 2014 - 2016 (mg/kg).

TRITIKALA 3 leta	Ergometrin	Ergometrinin	Ergozin	Ergozinin	Ergokornin	Ergokorninin	Ergokriptin	Ergokriptinin	Ergotamin	Ergotaminin	Ergokristin	Ergokristinin
Število vzorcev	89	89	89	89	89	89	89	89	89	89	89	89
Število pozitivnih vzorcev	10	6	13	11	6	5	9	9	5	3	6	5
% pozitivnih vzorcev	11	7	15	12	7	6	10	10	6	3	7	6
Povprečje (mg/kg)	0,020	0,007	0,067	0,075	0,051	0,038	0,233	0,180	0,045	0,054	0,225	0,207
Minimum	0,001	0,001	0,004	0,004	0,006	0,002	0,001	0,002	0,009	0,008	0,017	0,001
Maksimum	0,047	0,013	0,410	0,395	0,141	0,101	1,660	1,327	0,128	0,086	1,058	0,856
Mediana	0,012	0,007	0,023	0,017	0,029	0,023	0,057	0,041	0,013	0,069	0,024	0,015

Tabela 25. Koncentracije posameznih epimerov ergot alkaloidov v vzorcih tritikale leta 2014 (mg/kg).

TRITIKALA 2014	Ergometrin	Ergometrinin	Ergozin	Ergozinin	Ergokornin	Ergokorninin	Ergokriptin	Ergokriptinin	Ergotamin	Ergotaminin	Ergokristin	Ergokristinin
Število vzorcev	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29
Število pozitivnih vzorcev	6	2	7	7	3	4	7	5	1	1	3	2
% pozitivnih vzorcev	21	7	24	24	10	14	24	17	3	3	10	7
Povprečje (mg/kg)	0,013	0,007	0,109	0,106	0,081	0,041	0,286	0,309	0,065	0,069	0,369	0,436
Minimum	0,001	0,001	0,004	0,004	0,010	0,002	0,001	0,034	0,065	0,069	0,018	0,015
Maksimum	0,042	0,013	0,410	0,395	0,141	0,101	1,660	1,327	0,065	0,069	1,058	0,856
Mediana	0,010	0,007	0,053	0,054	0,093	0,031	0,073	0,052	0,065	0,069	0,030	0,436

Tabela 26. Koncentracije posameznih epimerov ergot alkaloidov v vzorcih tritikale leta 2015 (mg/kg).

TRITIKALA 2015	Ergometrin	Ergometrinin	Ergozin	Ergozinin	Ergokornin	Ergokorninin	Ergokriptin	Ergokriptinin	Ergotamin	Ergotaminin	Ergokristin	Ergokristinin
Število vzorcev	39	39	39	39	39	39	39	39	39	39	39	39
Število pozitivnih vzorcev	4	4	5	3	2	1	1	3	3	2	2	3
% pozitivnih vzorcev	10	10	13	8	5	3	3	8	8	5	5	8
Povprečje (mg/kg)	0,032	0,007	0,016	0,020	0,024	0,023	0,057	0,017	0,050	0,047	0,113	0,055
Minimum	0,001	0,003	0,005	0,007	0,006	0,023	0,057	0,002	0,009	0,008	0,017	0,001
Maksimum	0,047	0,012	0,037	0,037	0,043	0,023	0,057	0,041	0,128	0,086	0,208	0,157
Mediana	0,039	0,007	0,008	0,017	0,024	0,023	0,057	0,009	0,013	0,047	0,113	0,006

Tabela 27. Koncentracije posameznih epimerov ergot alkaloidov v vzorcih tritikale leta 2016 (mg/kg).

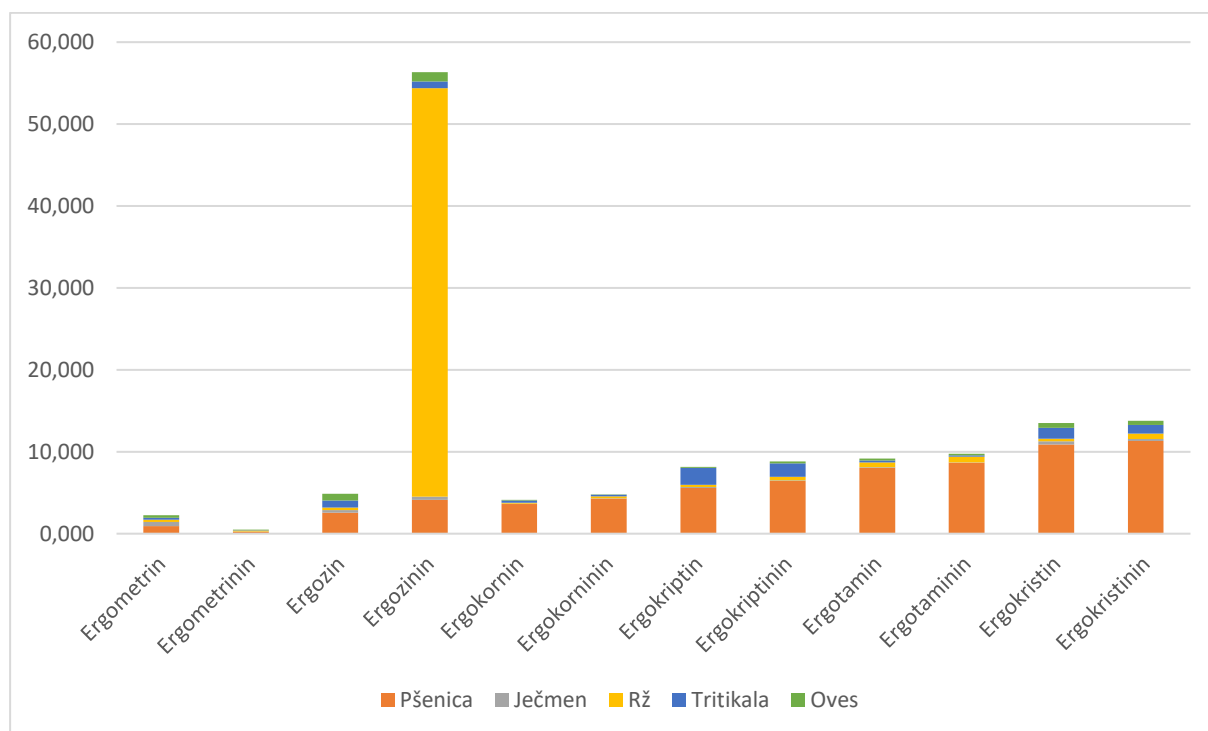
TRITIKALA 2016	Ergometrin	Ergometrinin	Ergozin	Ergozinin	Ergokornin	Ergokorninin	Ergokriptin	Ergokriptinin	Ergotamin	Ergotaminin	Ergokristin	Ergokristinin
Število vzorcev	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21
Število pozitivnih vzorcev	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0
% pozitivnih vzorcev	0	0	5	5	5	0	5	5	5	0	5	0
Povprečje (mg/kg)	0,000	0,000	0,028	0,013	0,016	0,000	0,033	0,018	0,011	0,000	0,019	0,000
Minimum	0,000	0,000	0,028	0,013	0,016	0,000	0,033	0,018	0,011	0,000	0,019	0,000
Maksimum	0,000	0,000	0,028	0,013	0,016	0,000	0,033	0,018	0,011	0,000	0,019	0,000
Mediana	0,000	0,000	0,028	0,013	0,016	0,000	0,033	0,018	0,011	0,000	0,019	0,000

Tabela 28. Koncentracije posameznih epimerov ergot alkaloidov v vzorcih ovsa v letih 2014 – 2016 (mg/kg).

OVES 3 leta	Ergometrin	Ergometrinin	Ergozin	Ergozinin	Ergokornin	Ergokorninin	Ergokriptin	Ergokriptinin	Ergotamin	Ergotaminin	Ergokristin	Ergokristinin
Število vzorcev	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Število pozitivnih vzorcev	6	2	5	5	2	3	3	4	5	5	7	7
% pozitivnih vzorcev	40	13	33	33	13	20	20	27	33	33	47	47
Povprečje (mg/kg)	0,058	0,032	0,158	0,226	0,030	0,022	0,038	0,058	0,045	0,036	0,085	0,072
Minimum	0,010	0,014	0,022	0,022	0,024	0,016	0,013	0,017	0,022	0,014	0,002	0,014
Maksimum	0,186	0,050	0,590	0,950	0,037	0,030	0,079	0,126	0,066	0,053	0,205	0,197
Mediana	0,031	0,032	0,061	0,053	0,030	0,021	0,021	0,045	0,044	0,044	0,078	0,058

Največja ugotovljena koncentracija je bila v vseh treh letih 41,993 mg/kg ergozinina in sicer leta 2014 v rži. V letu 2015 je bilo največ ergometrina (0,354 mg/kg), ugotovili pa smo ga v pšenici. V letu 2016 je bilo ponovno največ ergozinina, vendar je bil dokazan v manjši koncentraciji (0,950 mg/kg) in v drugem matriksu kot leta 2014 (oves) (slika 4).

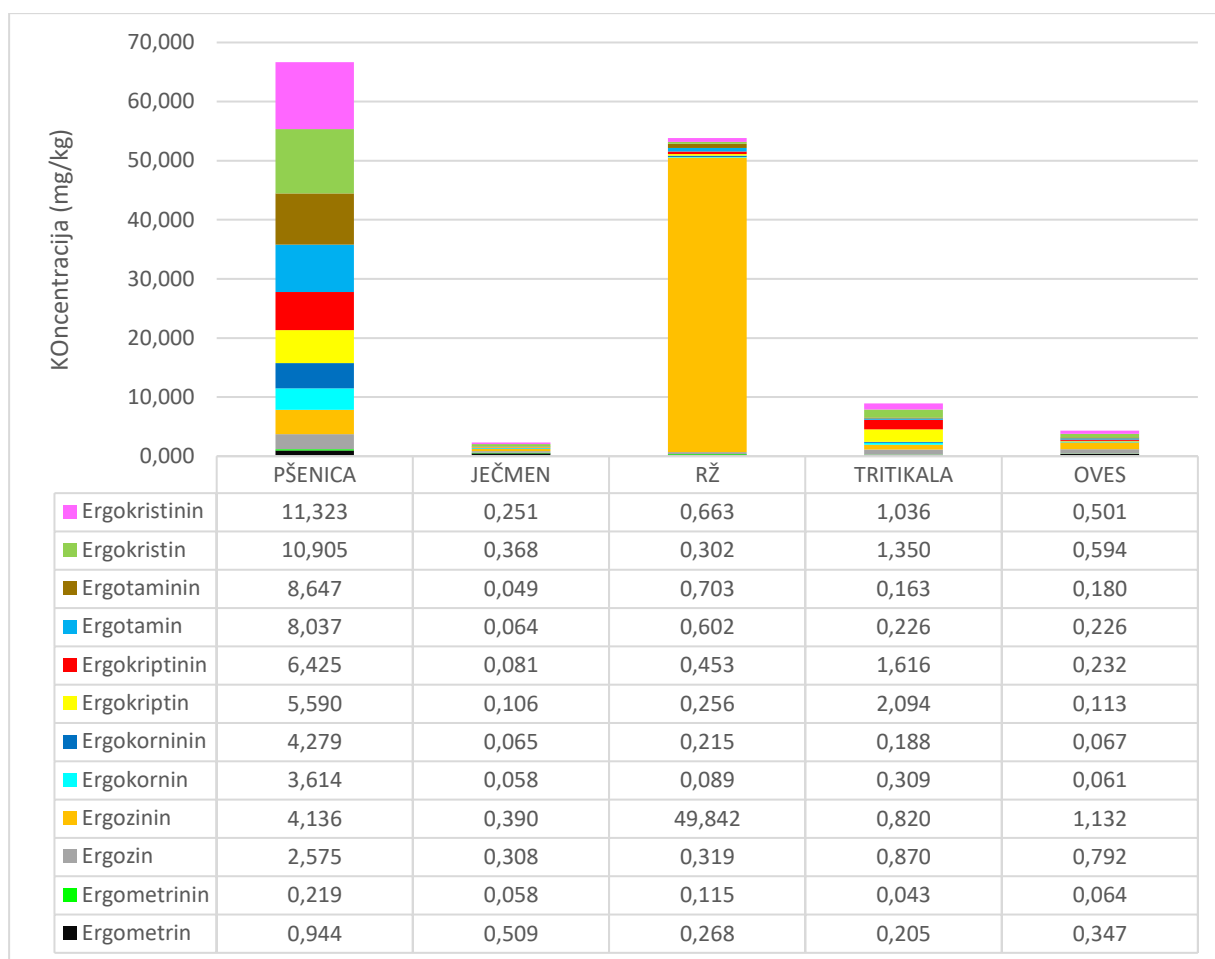
V vseh treh letih smo v vseh žitih dokazali največ ergozinina, sledita ergokristin in ergokristinin.



Slika 4. Vsota koncentracij posameznih epimerov ergot alkaloidov v vzorcih žit v letih 2014 do 2016.

Na sliki 5 so zbrani podatki o koncentraciji (vsoti) posameznih epimerov ergot alkaloidov po posameznih žitih v vseh treh letih. Vidimo, da je bila pšenica najbolj kontaminirano žito in da je vsebovala največ posameznih ergot alkaloidov, sledi ji rž. Ostala žita (ječmen, oves in pira) so bila kontaminirani z nizkimi koncentracijami ergot alkaloidov.

Vzorci žit iz ekloških kmetij so vsebovali ergot alkaloid v koncentraciji 0,01-0,746 mg/kg. Pozitivnih je bilo 30 % vzorcev. Alternarijske toksine je vsebovalo 53 % vzorcev v koncentraciji 0,049-0,389.



Slika 5. Vsota epimerov v vzorcih žit v letih 2014 – 2016.

Naši rezultati so primerljivi z rezultati drugih avtorjev tako glede števila pozitivnih vzorcev kot glede dobljenih koncentracij. Večina raziskav potrjuje, da so najvišje koncentracije ergot alkaloidov v žitih in izdelkih iz njih. O prisotnosti ergot alkaloidov v živilih in krmi iz različnih držav obstaja več poročil. Raziskava 66-ih izdelkov iz rži v Nemčiji (Bürk in sod., 2006) je pokazala prisotnost ergot alkaloidov pri 31,8 % analiziranih vzorcev. Ruhland in Tischler (2008) sta poročala o 86-100 % stopnji kontaminacije z ergot alkaloidi v različnih krmnih žitih in mešani krmi v Nemčiji. Mediana koncentracij v različnih proizvodih je bila 25-96 µg/kg, največje koncentracije pa so dosegale 149-4883 µg/kg (0,149 – 4,883 mg/kg). V rži in rženih izdelkih iz nemških supermarketov (Müller et al., 2009) so poročali o zelo podobni pogostnosti (100 % v rženi moki, 85,7 % v rži in rženih otrobih in 66,7 % v rženih kosmičih). Najvišja raven ergot alkaloidov je bila 739,7 µg/kg (0,739 mg/kg). Meister in Batt (2014) sta v letu 2013 poročala o pojavnosti ergot alkaloidov pri 67 % vzorcev pšenice in rži iz nemške zvezne države Brandenburg. Najvišja določena koncentracija je bila 4850 µg/kg (4,850 mg/kg). Zelo onesnaženi vzorci so vsebovali 10-12 različnih ergot alkaloidov (Meister & Batt 2014). V raziskavi izdelkov na osnovi rži je bila določena 89 % stopnja kontaminacije (Crews et al., 2009), vendar so bile koncentracije ergot alkaloidov sorazmerno nizke (do 340 µg/kg (0,340 mg/kg)). V znanstvenem poročilu za EFSO (Diana Di Mavungu in sod., 2011),

so objavili podatke o analizi 803 vzorcev žit in žitnih izdelkov iz 13 evropskih držav. Ergot alkaloidi so dokazali v 52 % rži, 95 % izdelkov iz rži, 34 % pšenične krme, 86 % izdelkov iz pšenice, 48 % tritikale in 76 % ostalih prehrabnih izdelkov iz trgovin. Čeprav je bila pojavnost ergot alkaloidov največja v vzorcih živil, pa so najvišje koncentracije ugotovili v vzorcih krme. V nizozemski raziskavi (Mulder et al., 2012) so analizirali 184 vzorcev žit in krmnih mešanic, od teh je 53 % vsebovalo ergot alkaloidi. Stopnja kontaminacije je bila 43 % v žitih, v krmnih mešanicah pa 83 %. Malysheva in sod. (2014) so izvedli raziskavo na 1065-ih vzorcih žit in žitnih proizvodov, zbranih v več evropskih državah v obdobju treh let. Ergot alkaloidi so bili prisotni v 84 % rženih izdelkov (zrna, moka in ostali rženi izdelki), 67 % pšeničnih izdelkov (žita, moka in pšenični izdelki), 48 % izdelkov iz več žit, 52 % krme iz rži (zrn), 27 % pšenice (zrnje) in 44 % tritikale (krmno žito). Skupna raven ergot alkaloidov je znašala od <1 do 12340 µg/kg (<0,001 – 12,340 mg/kg). Zachariasova in sod. (2014) so poročali o kontaminaciji z ergot alkaloidi v različnih vzorcih krme iz Češke, vključno z 21-imi vzorci pšenice in 16-imi vzorci ječmena. Dali so podatke o povprečni koncentraciji, srednji (mediani) in najvišji koncentraciji za štiri ergot alkaloidi: ergokornin, ergokriptin, ergokristin in ergokristinin. V vzorcih pšenice je bil glavni ergot alkaloid ergokriptin s povprečno, srednjo in najvišjo koncentracijo 6 µg/kg, 1,3 µg/kg in 118 µg/kg. V vzorcih pšenice so bile najvišje vrednosti ergokornin in ergokristin in sicer 54 µg/kg in 81 µg/kg. V ječmenu je bil prisoten samo ergokriptin. Povprečna, srednja in najvišja koncentracija so bile 2,5 µg/kg, 1,3 µg/kg in 33 µg/kg. Martos je s sodelavci (2010) izvedel študijo o pojavljanju različnih toksinov v različnih proizvodih žetve v sezoni 2008 - 2009 v Kanadi (2010). V 25 vzorcih zimske pšenice, 15 vzorcih spomladanske pšenice, 20 vzorcih ječmena in 15 vzorcih rži, so bile navedene koncentracije ergokornina in ergotamina. Ergokornin in ergotamin sta bila prisotna v 1. od 25. vzorcev zimske pšenice (4 %) in v 3. od 15. vzorcev spomladanske pšenice (20 %). Prisotnost rženega rožička v evropskih državah je bila v zadnjih nekaj letih poročana preko sistema hitrega obveščanja za živila in krmo (RASFF), vendar poročil o prisotnosti ergot alkaloidov ni bilo (RASFF 2016).

Evropska zakonodaja nima določenih najvišjih dovoljenih koncentracij za ergot alkaloidi, ne za krmo niti za živila. V krmi, ki vsebuje nezmleta zrna žit je najvišja dovoljena vsebnost rženega rožička 1000 mg/kg (Evropska komisija, 2012). Vsebnost rožička v žitu za prehrano ljudi je bila najprej določena za t.i. intervencijska žita (Bürk et al., 2006; Münzing 2006). V Uredbi Komisije o uvedbi postopkov za prevzem žit s strani intervencijskih agencij (Evropska komisija 2000, 2009b) je bila navedena najvišja dovoljena količina rožička (sklerocijev) pri pšenici in rži 500 mg/kg (0,05 %). Pozneje je bila v nepredelanih žitih, namenjenih za prehrano ljudi, določena ista najvišja dovoljena količina rženega rožička (0,5 g/kg), razen v koruzi in rižu (Evropska komisija, 2015). Glede na predpostavljeno povprečno vsebnost ergot alkaloidov v sklerocijih (0,2 %) v osrednji Evropi je bila predlagana še dovoljena koncentracija skupnih ergot alkaloidov v hrani 1000 µg/kg in 2000 µg/kg v krmi (Bürk in sod., 2006; Münzing (2006). Kljub temu, da zakonsko določenih mej za ergot alkaloidi še ni, je EFSA priporočila spremljanje in poročanje o koncentracijah ergot alkaloidov v žitih in žitnih proizvodih (Evropska komisija 2012; 2015).

4.3 Rezultati preiskav na alternarijske toksine

Na vsebnost alternarijskih toksinov smo preiskali vseh 527 vzorcev. 147 vzorcev oziroma 27 % je vsebovalo enega ali več alternarijskih toksinov (tabela 29). Največ pozitivnih vzorcev je bilo leta 2014 (35 %) in najmanj leta 2016 (20 %). Koncentracije celokupnih alternarijskih toksinov so bile od 0,015 – 3,205 mg/kg.

Tabela 29. Podatki o koncentraciji skupnih alternarijskih toksinov v letih 2014-2016 (mg/kg).

	2014	2015	2016	SKUPAJ
Št.vzorev	206	199	137	542
Št. pozitivnih vzorcev	73	46	28	147
% pozitivnih vzorcev	35	23	20	27
Povprečje (mg/kg)	0,211	0,304	0,450	0,288
Minimum	0,015	0,025	0,037	0,015
Maksimum	3,205	2,126	2,277	3,205
Mediana	0,083	0,104	0,229	0,104

Največ vzorcev (72 %) je vsebovalo tenuazojnsko kislino v koncentraciji 0,015 – 2,279 mg/kg. Alternariol metil eter je vsebovalo 67 % vzorcev. Najmanj vzorcev je vsebovalo tentoksin (tabela 30). Nobeden od vzorcev ni vseboval vseh štirih toksinov.

Tabela 30. Vsebnost pozameznih alternarijskih toksinov v žitih (mg/kg).

	tenuazojnska kislina	tentoksin	alternariol	alternariol metil eter
Št.vzorev	147	147	147	147
Št. pozitivnih vzorcev	106	15	54	67
% pozitivnih vzorcev	72	10	37	46
Povprečje (mg/kg)	0,193	0,038	0,341	0,185
Minimum	0,015	0,021	0,025	0,027
Maksimum	2,276	0,116	3,205	1,121
Mediana	0,088	0,035	0,079	0,069

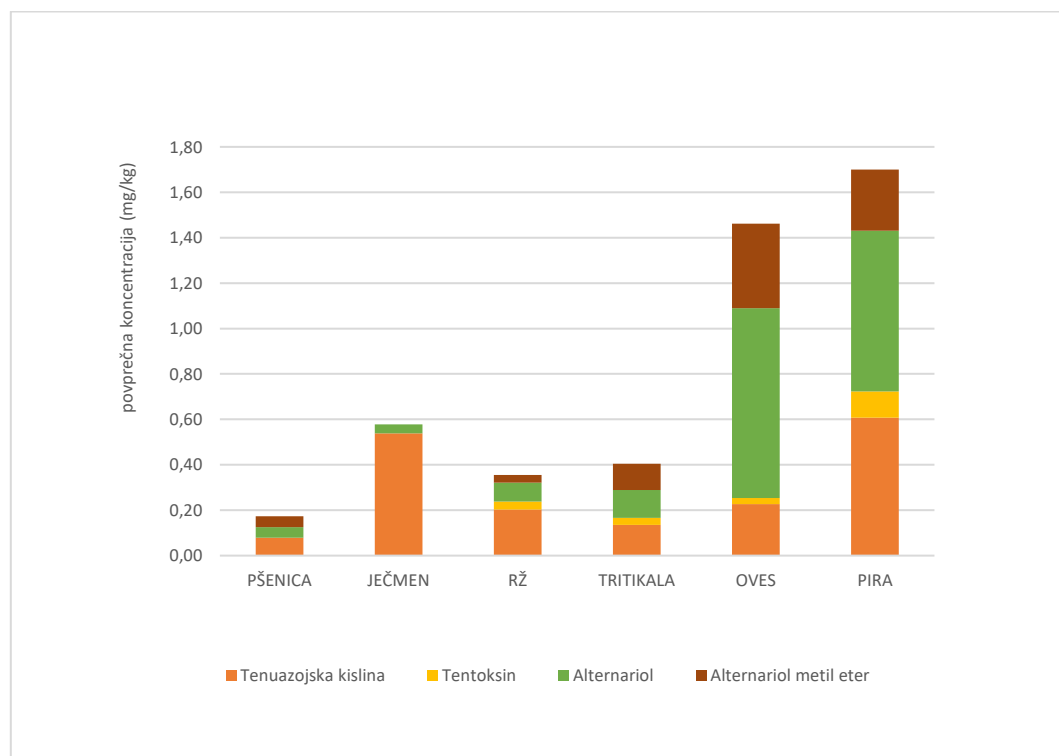
Alternarijskih toksinov nismo dokazali v koruzi (1 vzorec), koruznem šrotu (8 vzorcev) in siliranem koruznem zrnju (2 vzorca), nadalje v vzorcih trave (5 vzorcev), sena (12 vzorcev), pivskih tropin (2 vzorca) in krmnih mešanicah za govedo (2 vzorca) in prašiče (2 vzorca).

Najbolj onesnaženi so bili vzorci pira, kjer je bilo 89 % pozitivnih vzorcev, pri rži 87 % in pri ovsu 73 %. Najmanj onesnažena sta bila pšenica (8 %) in ječmen (9 %) (tabela 31).

Tabela 31. Število in vrsta vzorcev, ki so vsebovali alternarijske toksine.

Vrsta vzorca	Število vzorcev	Število pozitivnih vzorcev	% pozitivnih vzorcev
Pšenica	185	15	8
Ječmen	113	10	9
Tritikala	89	42	47
Rž	31	27	87
Pira	18	16	89
Obrok	17	10	59
Oves	15	11	73
Koruzna silaža	14	4	29
Slama	13	6	46
Travna silaža	8	1	13

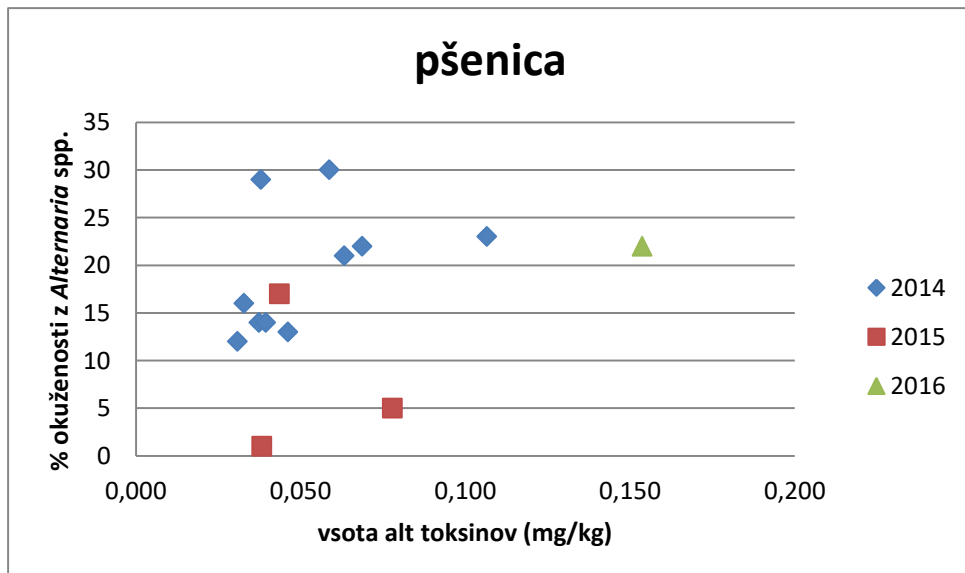
V vseh letih so bili z alternarijskimi toksini najbolj kontaminirani vzorci pira in ovs, ki so vsebovali največ alternariola in tenuazajske kisline. Najmanj so bili z alternarijskimi toksini kontaminirani vzorci pšenice (slika 6).



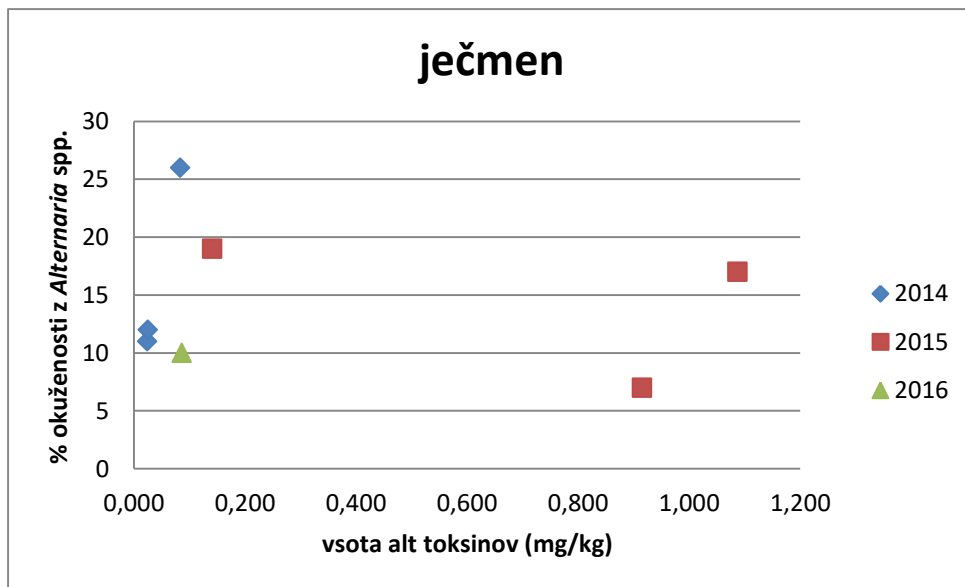
Slika 6. Kontaminacija posameznih žit z alternarijskimi toksini.

Za vse vzorce žit, pri katerih smo ugotovili prisotnost alternarijskih mikotoksinov, smo naredili tudi fitopatološko analizo za prisotnost gliv *Alternaria* spp. na zrnju in to izrazili v odstotkih. Na spodnjih slikah (slike 7-14) je prikazana ugotovljena okuženost zrnja z glivami *Alternaria* spp. in skupna vsebnost alternarijskih toksinov v posameznem vzorcu. Iz prikazanega se vidi, da ne obstaja povezava (korelacija) med stopnjo okuženosti zrnja z vsebnostjo alternarijskih mikotoksinov. Pri enaki okuženosti zrnja je lahko vsebnost mikotoksinov zelo različna oziroma pri različni okuženosti enaka. To velja tako za posamezna

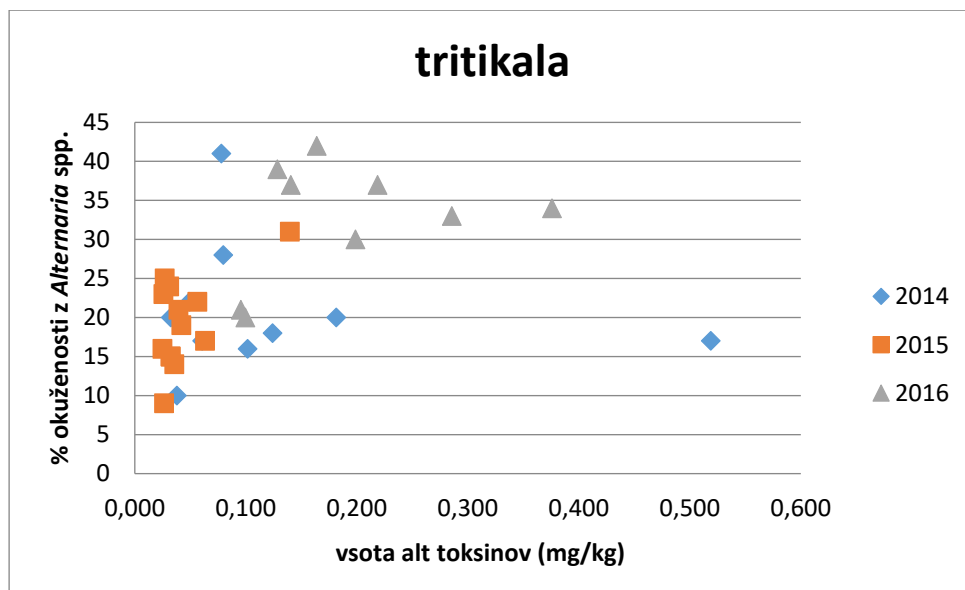
žita kot za vsa žita skupaj (slika 13). Ta ugotovitev je razvidna tudi iz slike 14. V prikaz smo vključili tudi okuženost zrnja z glivami *Epiccocum* spp., ker so tudi te potencialne tvorke alternarijskih mikotoksinov. Skratka, na podlagi okuženosti zrnja z glivami *Alternaria* spp. in *Epiccocum* spp. ne moremo sklepati kako kontaminirano je zrnje z alternarijskimi mikotoksini.



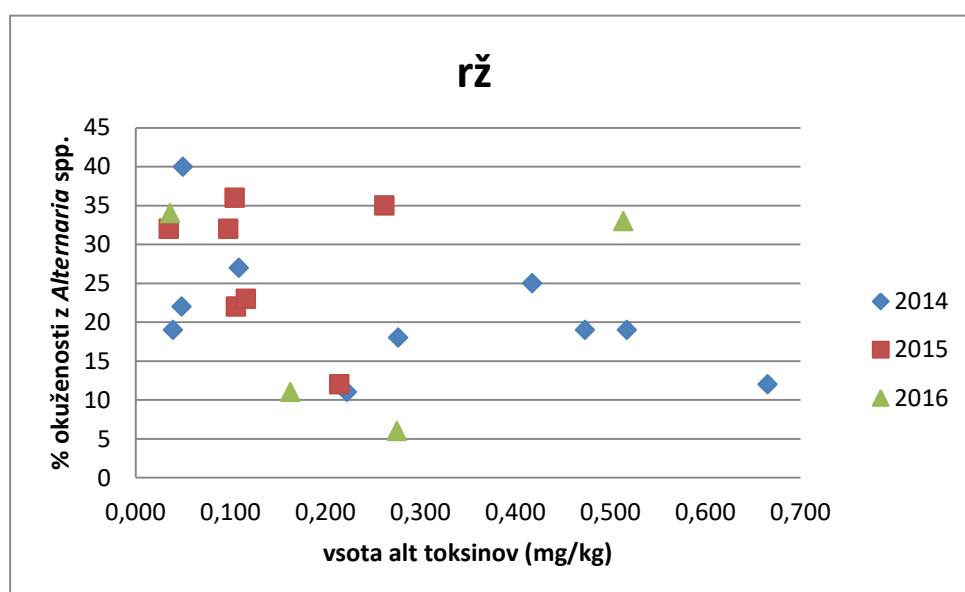
Slika 7. Prikaz okuženosti zrnja posameznih vzorcev pšenice in kontaminiranosti le teh z alternarijskimi mikotoksini.



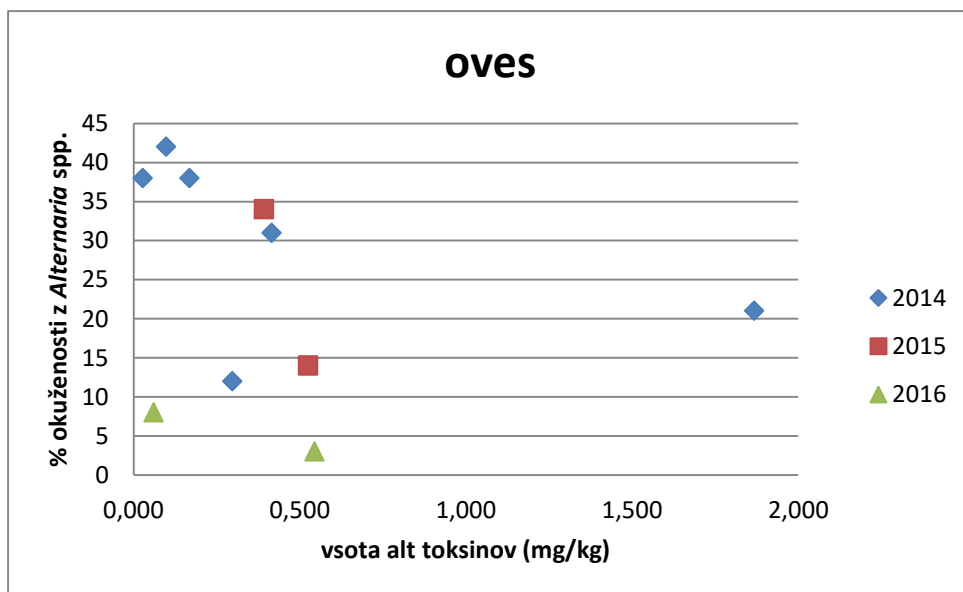
Slika 8. Prikaz okuženosti zrnja posameznih vzorcev ječmena in kontaminiranosti le teh z alternarijskimi mikotoksini.



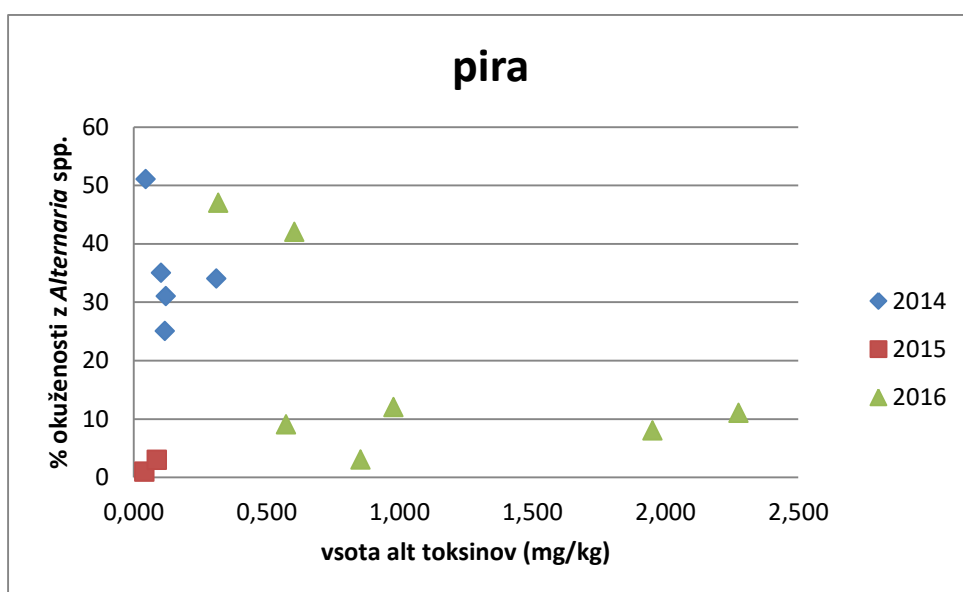
Slika 9. Prikaz okuženosti zrnja posameznih vzorcev tritikale in kontaminiranosti le teh z alternarijskimi mikotoksini.



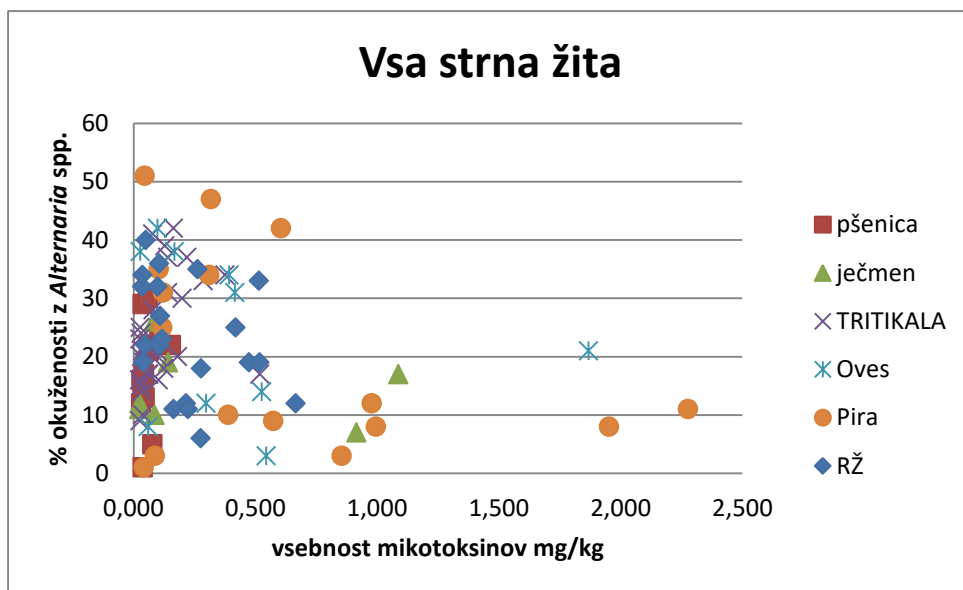
Slika 10. Prikaz okuženosti zrnja posameznih vzorcev rži in kontaminiranosti le teh z alternarijskimi mikotoksini.



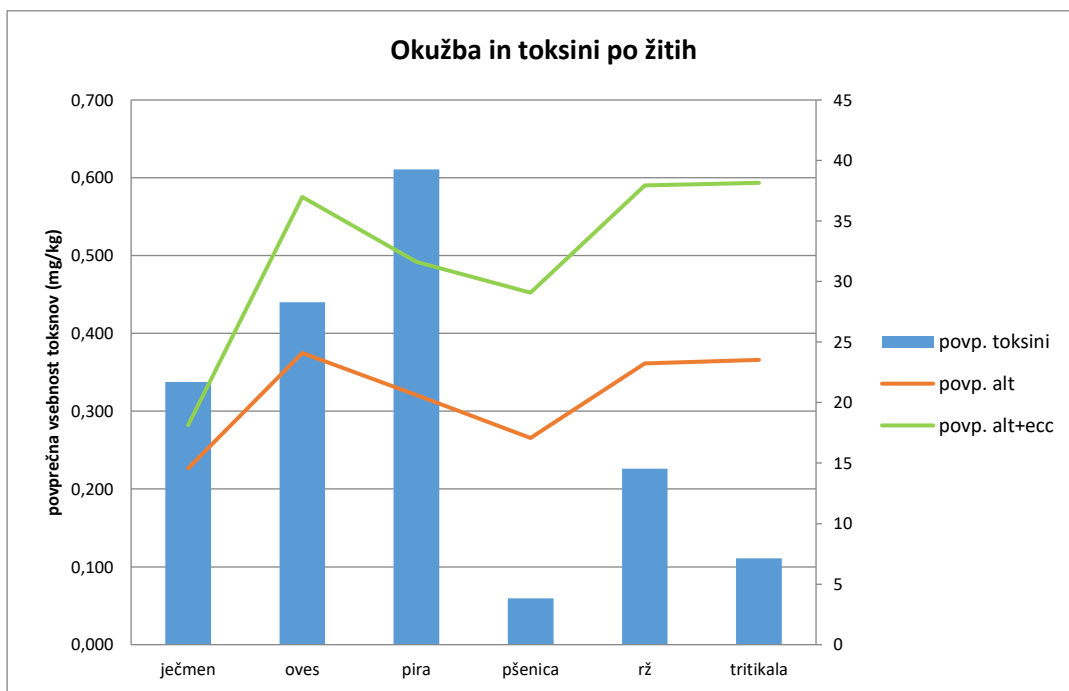
Slika 11. Prikaz okuženosti zrnja posameznih vzorcev ovsa in kontaminiranosti le teh z alternarijskimi mikotoksini.



Slika 12. Prikaz okuženosti zrnja posameznih vzorcev pire in kontaminiranosti le teh z alternarijskimi mikotoksini.



Slika 13. Prikaz okuženosti zrnja posameznih vseh vzorcev strnih žit in kontaminiranosti le teh z alternarijskimi mikotoksini.



Slika 14. Povprečna vsebnost skupnih alternarijskih mikotoksinov v posamezni vrsti žita in povprečna okuženost zrn z glivami *Alternaria* spp (alt). ter *Epicoccum* spp. (ecc).

Glive *Alternaria* spp. se naselijo na klase oziroma zrnje žit v času dozorevanja zrnja, ko začnejo deli klasa (pleve, klasno vreteno) počasi odmirati. Glive iz tega rodu so namreč fakultativni paraziti in se kot gniloživke večinoma prehranjujejo z odmrlim tkivom klasov. Tako običajno naseljujejo predvsem pleve, v seme oz. pod pleve (ječmen, oves) pa prodrejo

predvsem v razmerah, ko je v fenofazah BBCH 87-89-92 (voščena zrelost-polna zrelost-prezorevanje) deževno vreme. Le to namreč pospeši kolonizacijo zrn z glivami. Tudi kakršnekoli poškodbe zrn zaradi toče, insektov in ptičev povečujejo obseg okužb. Požeto zrnje je potrebno po spravi čimprej posušiti v sušilnikih do optimalne vlage za skladiščenje. Čim dalj s tem odlašamo, večja je verjetnost za nadaljnji razvoj gliv *Alternaria* spp in s tem tvorbe alternarijskih mikotoksinov.

Rezultati študij različnih avtorjev o vsebnosti alternarijskih toksinov v žitih in drugih proizvodih so precej različni. Nekateri tako kot mi ugotavljajo, da je najbolj pogosta tenuazojska kislina, spet drugi pa ne potrjujejo takšnih rezultatov. Müller in Korn (2013) poročata o pojavu alternarijskih toksinov v pšenici. Stopnja kontaminacije je bila naslednja: tenuazojska kislina (30,3 % vzorcev), alternariol (8,1 %), alternariol metil eter (3,1 %) in altenuen (2,6 %). V raziskavi, ki jo je izvedel Monbaliu in sod. (2010) je samo eden izmed 82. vzorcev krme vseboval alternariol metil eter, trije vzorci pa so vsebovali alternariol. Podatki o nizki stopnji pojavnosti so razvidni tudi iz podatkov EFSA (2011). Tenuazojska kislina, alternariol, alternariol metil eter (3,1%) in tentoksin so bili prisotni v 6%, 3%, 2% in 3% preiskovanih vzorcev v žitih in žitnih proizvodih iz Češke, Nemčije, Italije, Poljske, Španije in Evropske unije. V drugih študijah (Ostry, 2008; Ostry et al., 2012; López in sod., 2016; Häggblom in sod., 2007; Li in Yoshizawa, 2000) je bila stopnja kontaminacije precej večja - skoraj vsi vzorci so vsebovali vsaj en alternarijski toksin. Ostry (2008) in Ostry in sod. (2012) so ugotovili prisotnost altenuena v 91,5 % oziroma 88 % vzorcih pšenice. López in sod. (2016) so ugotovili, da so vsi vzorci žit vključenih v študijo vsebovali tentoksin. Häggblom in sod. (2007) so ugotovili prisotnost alternariola v 16 od 18 vzorcev (88,8 %) krmnih žit, medtem ko so v študiji Li in Yoshizawa (2000) vsi vzorci pšenice vsebovali tenuazojsko kislino, 90,9 % vzorcev je vsebovalo alternariol in 95,5 % vzorcev je vsebovalo alternariol metil eter.

Li in Yoshizawa (2000), Häggblom in sod. (2007), Noser in sod. (2011), Müller in Korn (2013) ter Janič Hajnal in sod. (2015) so izvedli raziskave in ugotovili, da je bila tenuazojska kislina najbolj pogosto najden alternarijski toksin. Li in Yoshizawa (2000) sta poročala, da se je tenuazojska kislina pojavila v vseh analiziranih vzorcih pšenice, alternariol in alternariol metil eter pa sta bila prisotna v 20 oziroma 21 od 22 vzorcev (90,9 % in 95,5 %). V raziskavi kontaminiranosti ječmena, pšenice in ovsa na Švedskem so leta 2006 ugotovili tenuazojsko kislino v vseh 18. analiziranih vzorcih (Häggblom in sod., 2007). Z alternariolom je bilo kontaminiranih 89 % vzorcev, z alternariol metil etrom pa je bilo kontaminiranih 39 % vzorcev. Müller in Korn (2013) sta poročala o prisotnosti tenuazojske kisline v 30,3 % vzorcev pšenice, medtem ko je z alternariolom bilo okuženih 8,1 % vzorcev, z alternariol metil etrom 3,1 % vzorcev in altenuenom 2,6 % vzorcev pšenice. Janič Hajnal in sod. (2015) so v 68,5 % vzorcev pšenice ugotovili kontaminacijo s tenuazojsko kislino, alternariol so našli le v 12 % vzorcev in alternariol metil eter le v 6,5 % vzorcev. Tudi v preiskovanih živilskih proizvodih na Nizozemskem (proizvodi iz predelanega paradižnika, suhe fige, sončnična semena in vina; López in sod., 2016) ter v paradižnikih in izdelkih iz paradižnikov s švicarskega trga (Noser in sod., 2011) je bila tenuazojska kislina najpogostejši alternarijski toksin. Našli so jo v vseh vzorcih suhih fig, sončničnih semen in paradižnikovih omak, v treh od petih vzorcev vina (López in sod., 2016), v vseh paradižnikovih izdelkih in v 25 %

paradižnika iz študije, ki so jo opravili Noser in sod. (2011). Kljub temu so nekateri avtorji objavili študije, kjer je bila tenuazojska kislina najmanj pogosto zastopan alternarijski toksin (Ostry, 2008; Ostry in sod., 2012; Patriarca in sod., 2007, Uhlig in sod., 2013). Ostry (2008) in Ostry in sod. (2012) do poročali o pojavnosti alternariola v pšenici na Češkem v 46,5-50 % vzorcev in alternuena v 88-91,5 % vzorcev, medtem ko se tenuazojska kislina ni pojavila v nobene vzorcu. V raziskavi norveških žit, gojenih v izrednih podnebnih razmerah (Uhlig in sod., 2013) je bila tenuazojska kislina prisotna le v 21 % vzorcev pšenice, alternariol in alternariol metil eter pa sta bila prisotna v vseh vzorcih pšenice. Do podobnih rezultatov so prišli raziskovalci iz Argentine, ki so v vzorcih argentinske pšenice ugotovili večjo kontaminacijo z alternariolom in alternariol metil etrom in manjšo kontaminacijo z tenuazojsko kislino (Patriarca in sod., 2007).

4.4 Vsebnost ergot alkaloidov v sklerocijih

4.4.1 Sklerociji v vzorcih žit

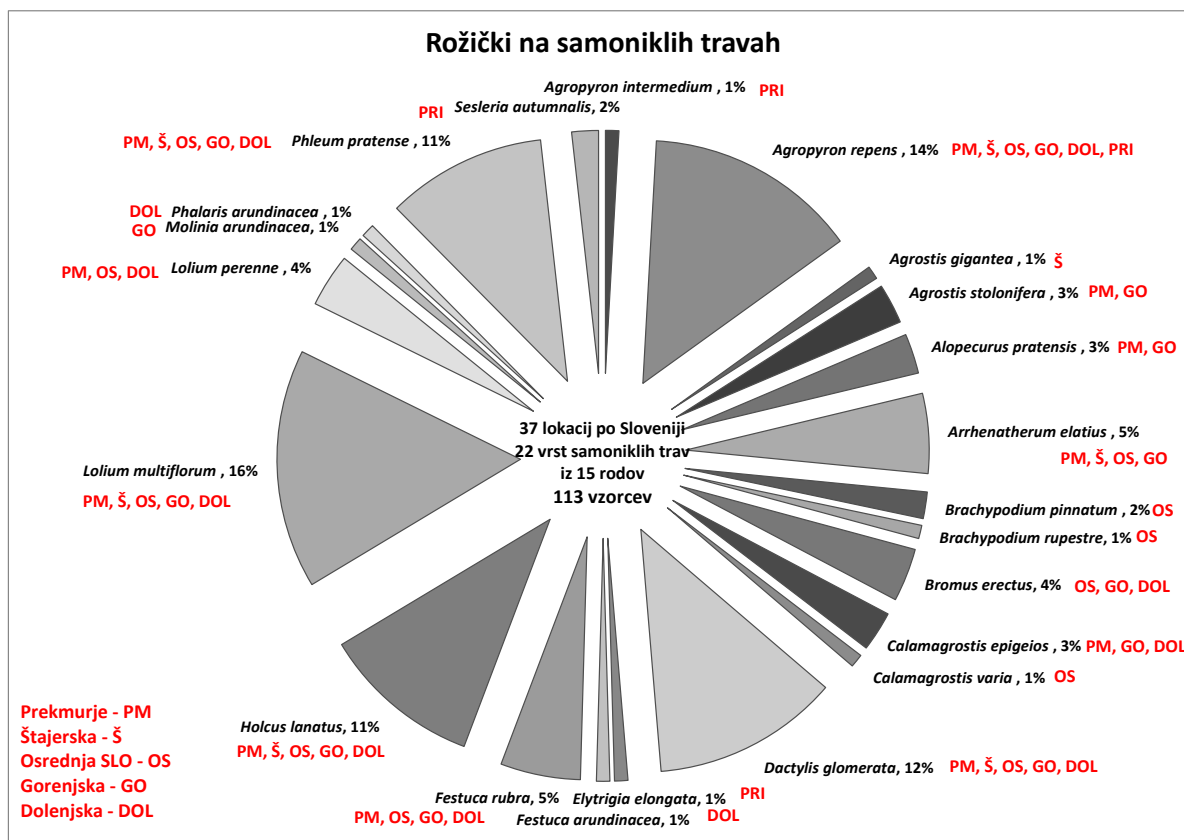
Vzorci, v katerih smo potrdili ergot alkaloide smo preiskali na vsebnost sklerocijev. Po vizualnem pregledu vzorcev smo ugotovili, da večina rožičkov (razen pri rži) ne izvira iz okuženega žita, temveč od okuženih samoniklih trav, ki rastejo kot plevel med žitom. Iz tega sledi, da bomo morali v prihodnje več pozornosti posvetiti izboljšanju metod za učinkovito čiščenje žitnega zrnja po žetvi, tudi tistega namenjenega krmi za živali, kar pa do sedaj ni bila ustaljena praksa.

Sklerocije smo našli le pri 41,7% vzorcev, ki so vsebovali ergot alkaloide. Rezultat pripisujemo nehomogenosti vzorčenja in priprave vzorca ter ugotovitvi, da so sklerociji večinoma (razen pri rži) pripadali plevelnim travam. Povprečna skupna masa sklerocijev v onesnaženih vzorcih je bila 0,25 g/kg in ni presegala dovoljene mejne vrednosti 1g/kg.

Povprečna koncentracija skupnih ergot alkaloidov je bila v sklerocijih z rži 2104,25 mg/kg. Največ je bilo ergotamina 644,55 mg/kg, ergokriptina 504,05 mg/kg, ergokornina 234,82 mg/kg in ergotaminina 194,10 mg/kg. Sledijo ergozin 189,23 mg/kg, ergokriptinin 148,32 mg/kg, ergozinin 122,20 mg/kg, ergokorninin 33,49 mg/kg, ergometrin 22,64 mg/kg, ergokristin 5,57 mg/kg, ergometrinin 4,11 mg/kg in ergokristinin 1,17 mg/kg.

4.4.2 Ergot alkaloidi v sklerocijih iz okuženih trav

Leta 2014 smo na 37 različnih lokacijah z žit in trav pobrali 113 vzorcev rženega rožička. Prisoten je bil na 22 samoniklih vrstah trav iz 15 rodov (*Elyrtigia (Agropyron)*, *Agrostis*, *Alopecurus*, *Arrhenatherum*, *Brachypodium*, *Bromus*, *Calamagrostis*, *Dactylis*, *Festuca*, *Holcus*, *Lolium*, *Molinia Phalaris*, *Phleum* in *Sesleria*) (slika 15).



Slika 15. Vrste trav na katerih so bili najdeni rženi rožički in njihov delež (%) ter območje najdbe v letu 2014.

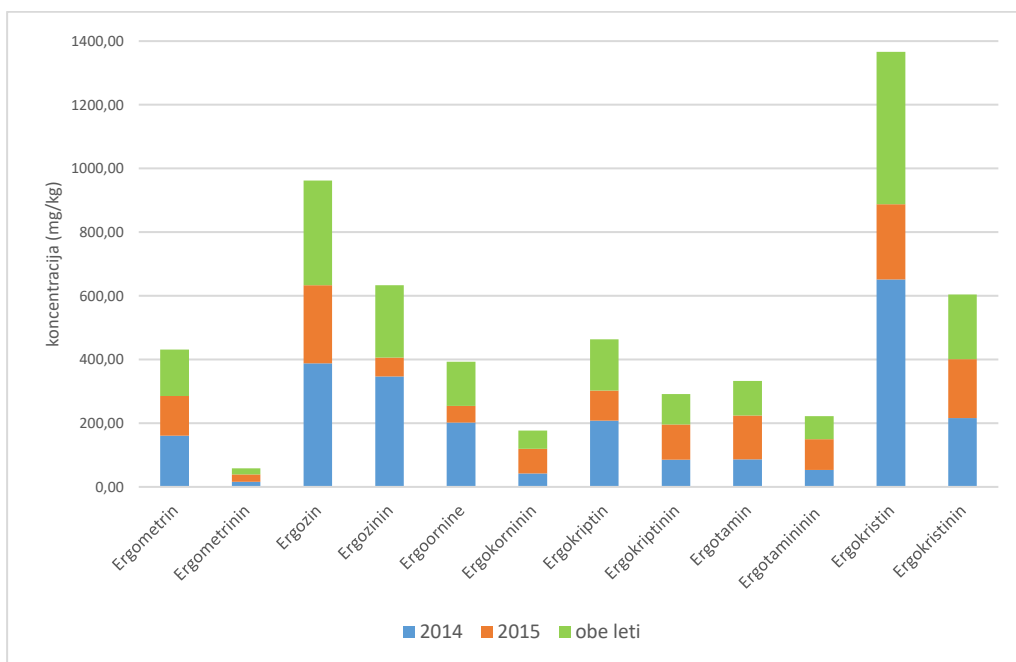
V letu 2015 smo pobrali 54 vzorcev rženega rožička, in sicer na 16 lokacijah po Sloveniji. Prisoten je bil na 15 vrstah samoniklih trav iz 11 rodov (*Agrostis*, *Alopecurus*, *Arrhenatherum*, *Calamagrostis*, *Dactylis*, *Elytrigia*, *Festuca*, *Glyceria*, *Holcus*, *Lolium*, in *Phleum*).

V letu 2016 smo našli okužene posamezne trave. Rožička je bilo premalo, da bi lahko pripravili vzorce za analize. Razlike v velikosti sklerocijev na posameznih travah se vidijo na sliki 16, dodatne fotografije pa so na koncu poročila.



Slika 16. Sklerociji, ki smo jih našli na različnih območjih Slovenije na travah in strnih žitih.

V letu 2014 je bilo v sklerocijih ugotovljeno največ ergokristina, najmanj pa ergometrinina. V letu 2015 je bilo v rožičkih trav največ ergozina in ergokristina, najmanj pa ergometrinina (slika 17).



Slika 17. Povprečne koncentracije posameznih ergot alkaloidov v sklerocijih.

Ržene rožičke na samoniklih travah smo v Sloveniji našli na vseh lokacijah, zato obstaja potencialna nevarnost okužbe živali in okoliških posevkov žit. Vsebnost ergot alkaloidov v sklerocijih je primerljiva s podatki iz literature. V zadnji študiji so Frazeman in sod. (2010) analizirali sklerocije iz različnih področij Nemčije (žetev 2005-2009). Koncentracija ergot alkaloidov je med vzorci variirala od 115 do 2362 µg/g (0,01-0,24 %), srednja vrednost je bila 757 µg/g (0,076 %). Količina ergotamina (22 %), ergokristina (20 %) in njunih izomer ergotaminina (9,5 %) in ergokristinina (6,5 %) je skupaj predstavljala 57 % celokupnih ergot alkaloidov.

4.5 Rezultati analiz krme v rejah, kjer so se pojavljale gangrene repov

Na kmetijah, kjer so imeli težave z gangrenami repov, smo vzorčili obroke in posamična krmila. Pregledali smo 8 kmetij in skupno odvzeli 17 obrokov. Skupaj s posameznimi sestavinami za obroke je bilo vseh vzorcev 85.

Ergot alkaloida sta vsebovala 2 obroka s povprečno koncentracijo 0,03 mg/kg. V enem primeru leta 2014, so bile poleg obroka odvzete tudi sestavine obroka (pivske tropine in koruzna silaža) vendar sta bila oba vzorca negativna na ergot alkaloida. Pri obeh lastnikih se je vzorčenje ponovilo leta 2015, vendar so bili rezultati negativni.

Pozitivni vzorci na ergot alkaloida so bili štirje od 85, to je 4,71%. Pozitivna sta bila dva vzorca sena in dva vzorca obrokov. V obrokih se je pojavil ergometrin, v senu pa ergometrinin. Vsi vzorci ob ponovnem odvzemu leta 2015 niso vsebovali ergot alkaloidov.

Vsebnost alternarijskih toksinov prikazuje tabela 32. Tabela prikazuje koncentracije posameznih alternarijskih toksinov v pozitivnih vzorcih. Največ pozitivnih vzorcev je bilo slame (n=6) in koruzne silaže (n=4). Največja je bila koncentracija alternariola, medtem ko tentoksina v analiziranih vzorcih nismo našli.

Vzorci ječmena, koncentratov, pivskih tropin, sena in siliranega koruznega zrnja so bili negativni na alternarijske toksine.

Tabela 32. Povprečne koncentracije alternarijskih toksinov v posamičnih krmilih iz rej, kjer se pojavljajo gangrene repov (mg/kg).

pozitivni vzorci	število vzorcev	št. pozitivnih na vsaj en alternarijski toksin	Tenuazojska kislina	Tentoksin	Alternariol	Alternariol metil eter
koruza	2	2	0,08	0,00	0,80	0,00
koruzna silaža	14	4	0,04	0,00	0,06	0,00
koruzni šrot	8	1	0,00	0,00	0,28	1,00
slama	13	6	0,10	0,00	1,07	0,26
storži	3	1	0,00	0,00	0,70	0,00
travna silaža	8	1	0,03	0,00	0,80	0,09

V času prijave projekta smo predvidevali, da bomo v rejah govejih pitancev, kjer se pojavljajo gangrene repov, v obrokih dokazali ergot alkaloide. Po zaključku projekta menimo, da temu ni tako, čeprav smo v nekaj obrokih dokazali nizke koncentracije ergot alkaloidov. Ugotovljene koncentracije so premajhne, da bi povzročale takšne klinične znake, poleg tega pa naslednje leto kljub kliničnim znakom ergot alkaloidov nismo več našli. Mogoče so ergot alkaloidi eden od dejavnikov, ki samo pripomorejo k pojavljanju kliničnih znakov, glede na to, da smo pri rejcih, kjer imajo te težave, potrdili prisotnost sklerocijev na travnikih.

Tudi vzorca krmne mešanice za prašiče nista vsebovala ergot alkaloidov, kar pomeni, da je potrebno vzrok za gangrene ušes in repov v reh rejah iskati nekje drugje.

4.6 Rezultati molekularnih analiz

4.6.1 Molekularna analiza endofitskih gliv

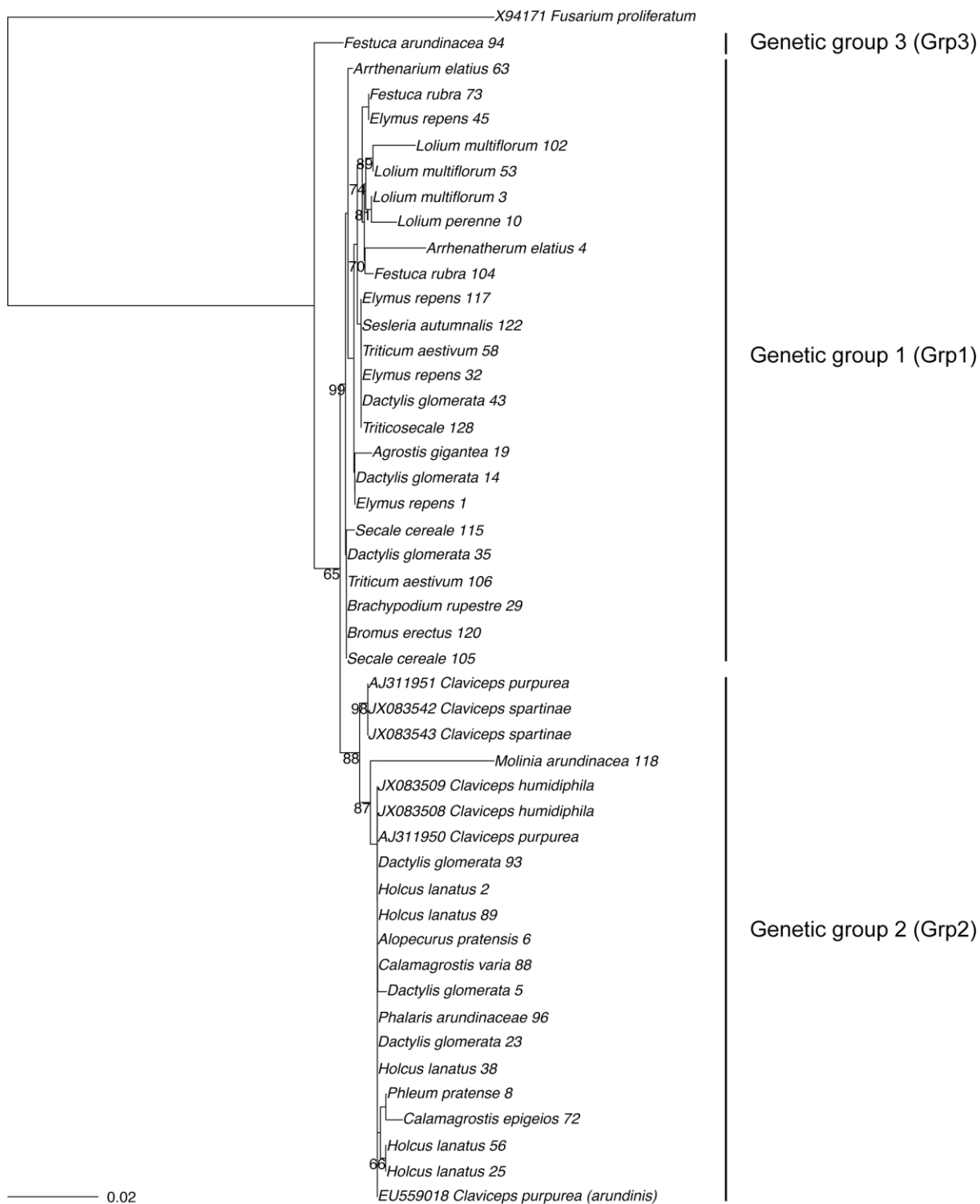
Pri molekularni identifikaciji predstavnikov rodu *Alternaria* smo uspešno pomnožili in sekvencirali 34 vzorcev, ki so bili izolirani iz tritikale, rži, pire, ovsa, ječmena in pšenice. Genetska raznolikost je bila sorazmerno nizka, saj je večina izolatov kazala veliko podobnost med seboj in z vrstama *Alternaria alternata* in *Alternaria tenuissima*. Na podlagi dobljenih rezultatov nismo opravljali nadaljnjih raziskav.

4.6.2 Molekularne analize sklerocijev

Z molekularnimi metodami (PCR in sekvencioniranje) smo leta 2014 identificirali glivne izolate iz 47 vzorcev. Uspešno smo pomnožili in sekvencirali 39 vzorcev.

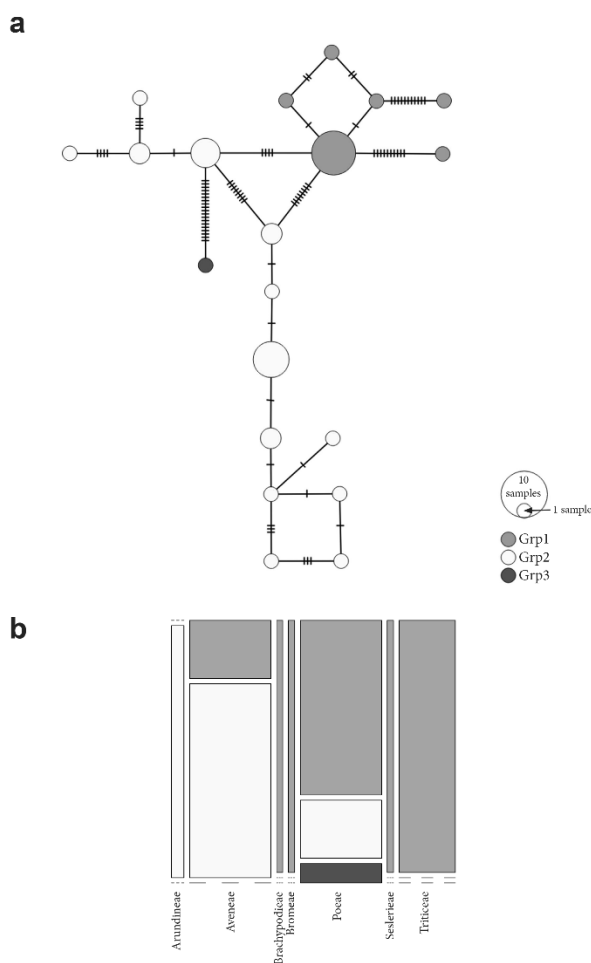
Med sklerociji, ki so bili nabrani na samoniklih travah travah v letu 2015, smo v molekularno analizo vključili sklerocije iz trav, ki so bile v prvi analizi slabše zastopane ali pa so kazale večjo molekularno variabilnost. Tako smo vključili 33 novih vzorcev, od katerih smo jih uspešno pomnožili in sekvencirali 23 vzorcev.

Z molekularno identifikacijo sklerocijev smo dobili 36 nukleotidnih zaporedij, ki ustrezajo glivi *Claviceps purpurea*. S filogenetsko analizo smo pridobljene sekvence kombinirali z znanimi sekvencami gliv iz skupine *C. purpurea* (nekateri avtorji delijo skupino na tri podskupine na nivoju vrste). Skupina Grp1 vključuje sekvence *C. purpurea s.str* in *C. humidiphila*, skupina Grp2 sekvence *C. purpurea s.str* in *C. spartinae*, in skupina Grp3 eno samo sekvenco, ki smo ji pomnožili iz sklerocija na gostitelju *Festuca arundinacea* (slika 18).



Slika 18. Molekularna filogenetska analiza (metoda maksimalne verjetnosti).

Na podlagi filogenetske analize smo dobljene podskupine (Gr1-3) znotraj kompleksa *C. purpurea* s. lato preverili na preferenco gostiteljev. Posamezne skupine so se izkazale kot bolj pogoste na različnih gostiteljih znotraj tribusov (plemen) družine trav (Poaceae). Vrste iz tribusa Triticeae so okuževale le glive iz skupine Gr1. Le-ta je najpogostejše okuževala vrste tribusa Poeae, medtem ko je bil tribus Aveneae okužen predvsem z glivami iz skupine Gr2. Skupino Gr3 pa smo identificirali kot že omenjeno le na vrsti *F. arundinaceae* (tribus Poeae). Vrste iz tribusov Arundineae, Brachypodieae, Bromeae in Seslerieae so kazale preferenco do posamezne skupine *C. purpurea*, vendar je bil nabor predstavnikov nizek, zaradi česar ne moremo s gotovostjo trditi, da gre za specifičnost interakcij (slika 19).

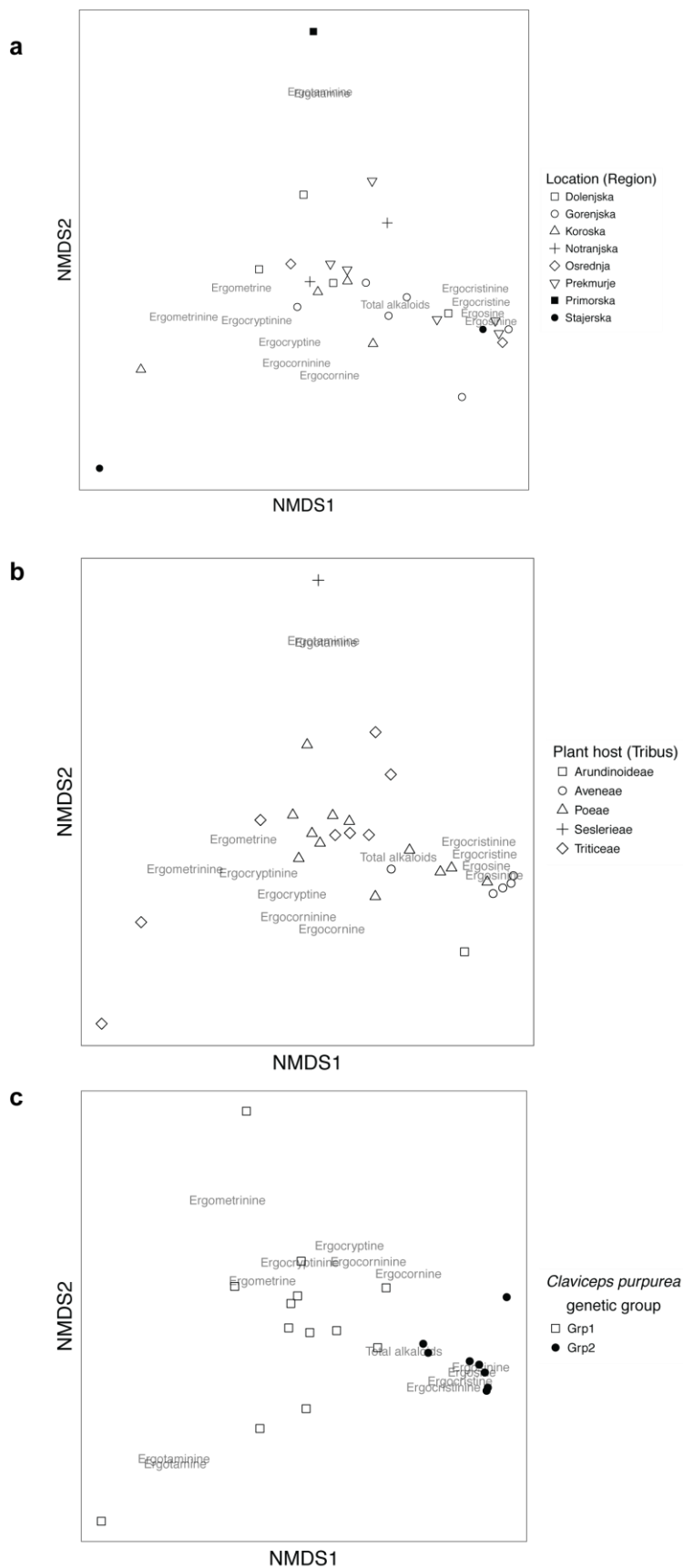


Slika 19. a) Haplotipske mreže specifičnih ITS sekvenc glive *Claviceps purpurea* sensu lato. Vsak krog predstavlja en haplotip. Med vsakim krogom in prečno črto je en mutacijski korak (predstavlja hipotetične haplotipe). Velikost kroga odraža količino haplotipa, odtенок sive pa predstavlja genetsko skupino glive *C. purpurea alkaloidi*. **b)** Mozaični prikaz afinitete gostitelja (t.i. tribe level) med genetskimi skupinami.

Filogenetske podatke smo preverili tudi v povezavi z geografsko razporeditvijo najdišč. Pri tem smo lokacije najdišč združili v posamezne geografske regije. Največjo genetsko diverziteto smo ugotovili za Prekmursko, Štajersko in Gorenjsko regijo, pri čemer so le-te zajemale 70 % vseh sekvenc. Čeprav posledično ne moremo izključiti, da ni za manjšo genetsko pestrost v preostalih regijah krivo manjše število najdb, se pri ostalih geografskih regijah nakazuje nekoliko manjša genetska pestrost.

Molekularne analize sklerocijev iz samoniklih in gojenih vrst trav iz osmih različnih regij v Sloveniji so, kot rečeno, pokazale porazdelitev v tri genetske skupine z nekaj preferencami za specifične taksonomske skupine gostitelja. Na podlagi rezultatov se zdi, da *C. purpurea* kaže nizko preferenco do specifičnega gostitelja. Ker specifičnost za gostitelja na nivoju vrste ni bila dovolj dobro izražena, smo raziskali taksonomske tribuse znotraj skupine Poaceae. Izkazalo se je, da je podatek o tribusu bolj informativen in pokaže jasnejšo sliko glede gostiteljske preference različnih genetskih skupin glive *C. purpurea*. Ta podatek lahko izboljša napoved katera specifična skupina glive *C. purpurea* in kateri ergot alkaloidi se bodo pojavili na travnikih in poljih.

Poleg naštetega, smo pri različnih genetskih skupinah ugotovili tudi nekaj razlik v sestavi ergot alkaloidov. Različne genetske skupine kažejo določene preference za individualne gostiteljeve taksonomske tribuse, kar se kaže tudi v tem, da so določeni ergot alkaloidi bolj značilni za določene skupine trav. Naši izsledki se skladajo s hipotezami drugih avtorjev, ki so ugotovili, da nastanek specifičnih ergot alkaloidov ni pod vplivom gostiteljske vrste trave, temveč lahko gostitelj vpliva na razmerje med posameznimi alkaloidi. Kljub temu se zdi, da so razlike v sestavi ergot alkaloidov pri različnih gostiteljih bolj posledica kolonizacije s specifičnimi genetskimi skupinami glive *C. purpurea* (slika 20). Pri povezovanju rezultatov molekularnih analiz sklerocijev in vsebnosti ergot alkaloidov je včasih nastopila težava, ker so bili sklerociji trav majhni in jih ni bilo dovolj za kemijske analize.



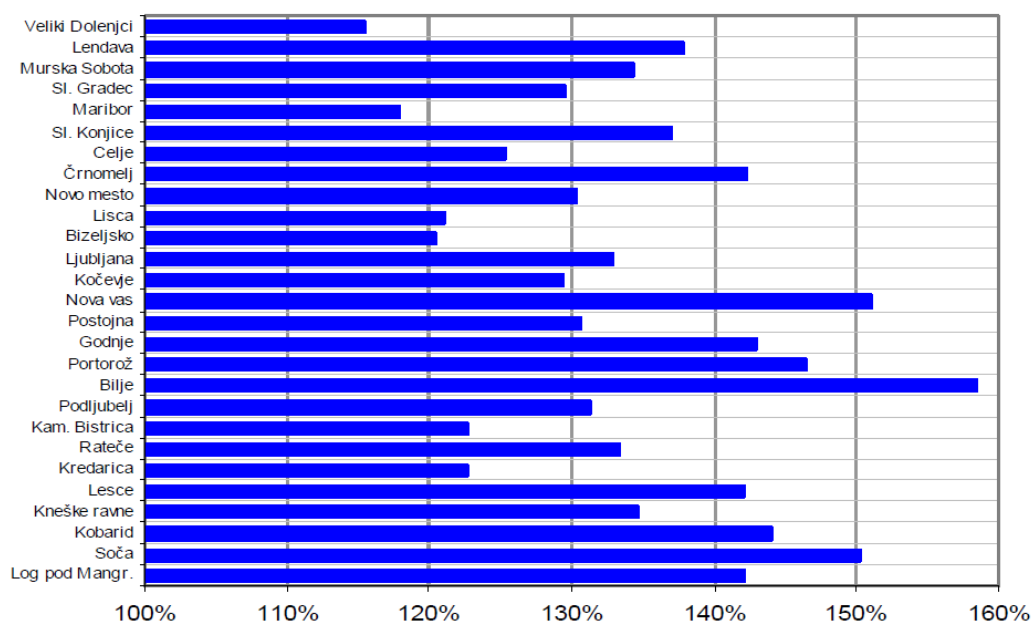
Slika 20. Ne-parametrična multidimenzionalna velikostna analiza profilov ergot alkaloidov. Različne oblike predstavljajo: **a)** lokacijo vzorčenja **b)** vrsto trave (tribus) in **c)** genetska skupina glive *Claviceps purpurea*.

4.7 Vremenski podatki za leta 2014 do 2016

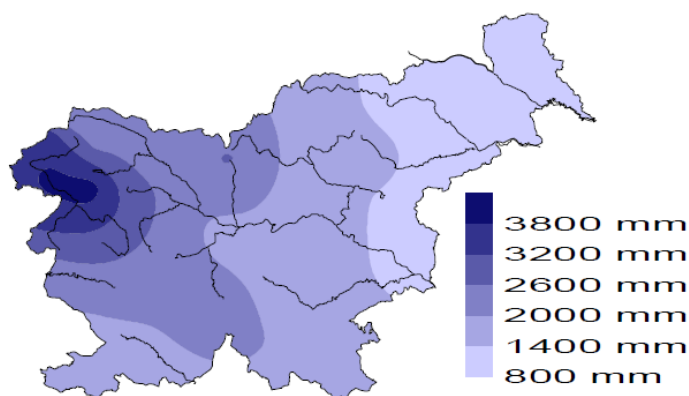
Iz rezultatov našega projekta se jasno vidi, da je bilo v letu 2014 največ mikotoksinov. Po vremenskih podatkih je to leto v količini povprečnih padavin odstopalo od povprečja. Padavin je bilo vsaj za desetino več kot v dolgoletnem povprečju.

Spodnje slike 22 – 27 predstavljajo količino padavin zabeleženih na posameznih meteoroloških postajah v letih 2014-2016 ter absolutno količino padavin po Sloveniji za leta 2014-2016.

Padavin je bilo v letu 2014 povsod vsaj za desetino več kot v dolgoletnem povprečju, v veliki večini je bil presežek nad petino, na Goriškem pa je presegel 50 %. Državno povprečje padavin je bilo najvišje po izjemno mokrem letu 1937. Podobno namočeno kot leto 2014 je bilo leto 1965. Na nekaterih merilnih mestih je bila količina padavin v letu 2014 najvišja od sredine minulega stoletja. V delu Posočja je padlo nad 3800 mm, v delu Dolenjske in na severovzhodu države pa od 800 do 1400 mm.



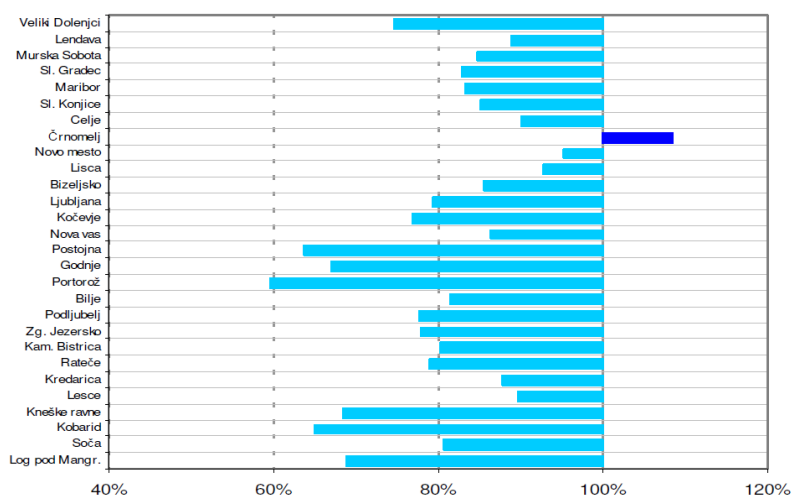
Slika 22. Padavine leta 2014 v primerjavi s povprečjem obdobja 1961-1990 (100 %) (vir: ARSO)



Slika 23. Porazdelitev padavin, leto 2014 (vir: ARSO)

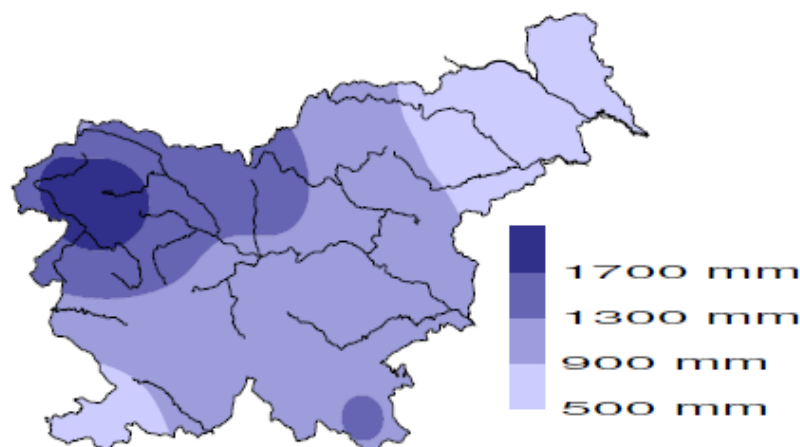
V Ljubljani so namerili 1851 mm, kar je 33 % več od dolgoletnega povprečja in največ na sedanjem merilnem mestu. Najbolj suho je bilo v Ljubljani leto 1949, ko je padlo 954 mm, leta 2011 pa je bilo 998 mm padavin, kar je 72 % dolgoletnega povprečja. Malo padavin so izmerili tudi leta 1953 (1041 mm), 2003 (1091 mm) in 1971 (1107). Pred letom 2014 je bilo največ padavin leta 1965 (1848 mm), sledita pa leti 1960 (1772 mm) in 2004 (1696 mm).

V Murski Soboti je padlo 1093 mm, dolgoletno povprečje so presegli za 34 %, kar je največ od sredine minulega stoletja. V Portorožu so namerili 1462 mm in dolgoletno povprečje presegli za 47 %, tudi v Portorožu je bilo to najbolj mokro leto od sredine minulega stoletja. Rekordno malo padavin od začetka meritev so v letu 2011 od prikazanih postaj namerili v Novem mestu, in sicer 834 mm, ter v Portorožu, kjer je padlo skromnih 614 mm.



Slika 24. Padavine leta 2015 v primerjavi s povprečjem obdobja 1961-1990 (vir: ARSO)

V Ljubljani so namerili 1106 mm, kar je 79 % dolgoletnega povprečja. Leto pred tem je padlo 1851 mm, kar je 33 % več od dolgoletnega povprečja in največ na sedanjem merilnem mestu. Najbolj suho je bilo v Ljubljani leto 1949, ko je padlo 954 mm, leta 2011 pa je bilo 998 mm padavin, kar je 72 % dolgoletnega povprečja. Malo padavin so izmerili tudi v letih 1953 (1041 mm), 2003 (1091 mm) in 1971 (1107). Pred letom 2014 je bilo največ padavin leta 1965 (1848 mm), sledita pa leti 1960 (1772 mm) in 2004 (1696 mm).

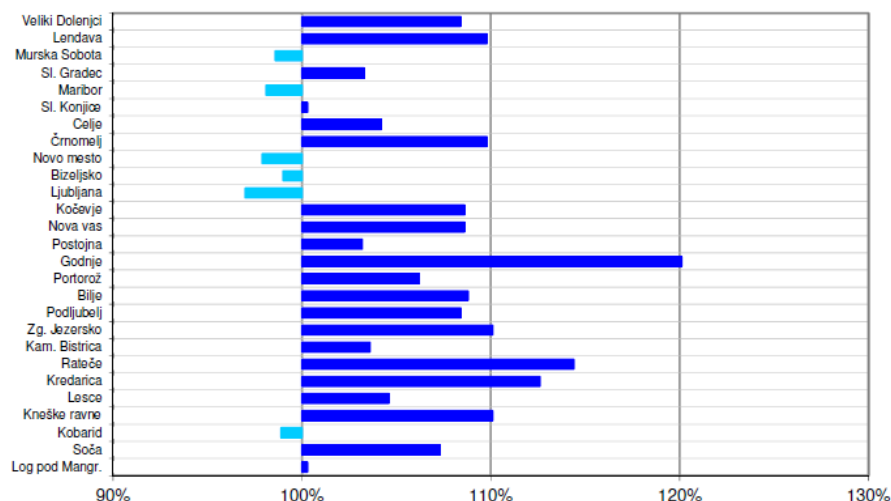


Slika 25. Porazdelitev padavin, leto 2015 (vir: ARSO)

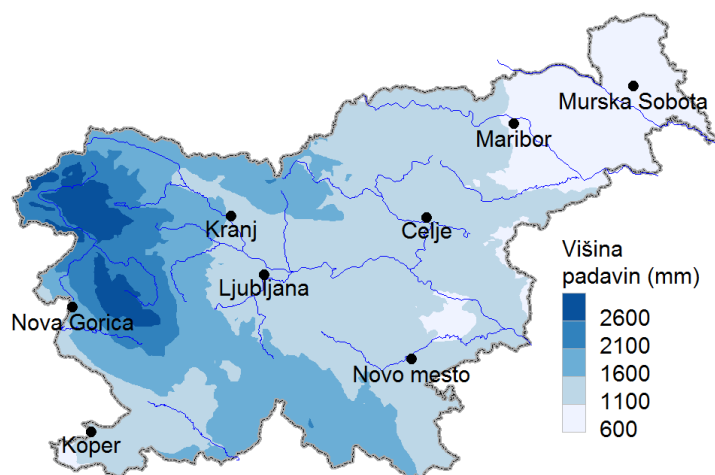
Največ padavin je leta 2015 padlo v Zgornjem Posočju in delu Julijcev, namerili so nad 1700 mm. Najmanj padavin je bilo v Slovenskem Primorju in na severovzhodu države, kjer je padlo od 500 do 900 mm. Približno polovica Slovenije je zabeležila od 900 do 1300 mm.

Po izrazito namočenem letu 2014 je leta 2015 večinoma opazno primanjkovalo padavin. Dolgoletno povprečje so presegli le v Beli krajini. V Črnomlju so namerili 1366 mm, kar je 8 % več od dolgoletnega povprečja. Drugod so za dolgoletnim povprečjem zaostajali. Največji relativni zaostanek je bil na Primorskem in v večjem delu Notranjske. Na Obali, na Letališču Portorož so namerili le 595 mm, kar je le 60 % dolgoletnega povprečja in najmanj v celotnem nizu podatkov za to lokacijo. 64 % so z 1010 mm dosegli v Postojni, v Godnjah pa 949 mm ustreza 67 % dolgoletnega povprečja. V Kobaridu so dosegli 65 %, v Kneških Ravnah 68 % in v logu Pod Mangartom 69 % dolgoletnega povprečja. Tudi na Kočevskem so precej zaostajali za povprečnimi padavinami, s 1175 mm so dosegli 77 %. V dobri polovici Slovenije so presegli tri četrtine dolgoletnega povprečja padavin.

Največ padavin je leta 2016 padlo v hribovitem svetu severozahodne Slovenije, ponekod so padavine presegle 2700 mm. Najmanj padavin, in sicer med 700 in 1200 mm je bilo na Obali in vzhodnem delu Dolenjske, večjem delu Štajerskem in v Prekmurju. V večjem delu Slovenije je bilo dolgoletno povprečje preseženo. Z redkimi pozitivnimi izjemami so bili odkloni med ± 10 %.



Slika 26. Padavine leta 2016 v primerjavi s povprečjem obdobja 1981-2010 (vir: ARSO)



Slika 27. Porazdelitev padavin, leto 2016 (vir: ARSO)

4.7 Preventivni ukrepi in varstvo pred rženim rožičkom (*Claviceps purpurea* /Fr./ Tul.)

- Zmožnost preživetja sklerocijev v (na) tleh je samo 1 do 3 leta. S primernim kolobarjem, ko nimamo na pridelovalni površini gostiteljskih rastlin, lahko prekinemo življenjski krog povzročitelja bolezni.
- Da ne bi prinesli na pridelovalno površino patogene glive uporabljamo za setev samo certificirano seme, brez rožičkov. Če je seme razkuženo s fungicidi na podlagi triazolov, le ti delno preprečujejo kalitev sklerocijev, ki izvirajo iz semena.
- Če zaorjemo sklerocije globlje od 4 cm, ti prej propadejo preden lahko kalijo.

- Sorte žit, ki cvetijo krajši čas in bolj zaprto, so manj dovzetne za okužbo v času cvetenja. Ko je cvet gostiteljske rastline oplojen do okužbe ne more več priti.
- Okužene samonikle trave na robovih njiv so pomemben vir okužb. Pred cvetenjem žit jih je potrebno pokositi oziroma odstraniti.
- Travnike in pašnike v okolici pridelovalnih površin je potrebno pokositi oziroma popasti še pred cvetenjem. Če je po paši ostalo na površini še kaj nedotaknjenih rastlin, jih je potrebno obvezno pokositi. Zgodaj in pozno cvetoče trave so manj občutljive za primarne okužbe z glivo.
- Travinja s travnikov, ki so močno kontaminirani s sklerociji, ne uporabljamo za silažo temveč ga posušimo; pri sušenju večina sklerocijev izpade in tako ne kontaminira krme.
- Na podlagi naših rezultatov večina sklerocijev v zrnju žit izvira od plevelnih trav, ki so rastle med žitom. Zaradi tega je potrebno le te karseda striktno zatirati le te s herbicidi. V žitih je nekatere zaradi neselektivnosti in nezadostne učinkovitosti herbicidov zelo težko popolnoma zatreti. Veliko lažje in bolj učinkovito pa jih je potem zatreti v gojenih rastlinah iz skupine dvokaličnic. Ravno zaradi tega je tako pomemben dovolj širok kolobar, da lahko tekom nekaj rastnih dob, z različnimi gojenimi rastlinami, iz pridelovalne površine »počistimo« trdovratne plevelne trave.
- Zelo pogosto pridelovalci robnih delov pridelovalnih površin ne škropijo s herbicidi (obstaja nevarnost zanosa herbicidnega škropiva na bližnje parcele in s tem do fitotoksičnosti na tam gojenih rastlinah). Posledica tega je, da so robni deli žitnih polj veliko bolj zapleveljeni s travami, ki so potencialni vir rožičkov v posevku in kasneje v zrnju. Eden izmed predlaganih ukrepov je, da se posebej požanjejo robni deli njiv (za širino kombajna) in nato preostali posevek. Zrnje požeto na robovih njiv naj se pred uporabo obvezno očisti v čistilniku.
- Do zdaj pri nas ni običajna praksa, da bi žita, ki so namenjena krmi, po žetvi dodatno prečistili v čistilnikih. Je pa dejstvo, da bi s tem ukrepom močno zmanjšali potencialno nevarnost, ki jo predstavljajo morebitni rženi rožički v zrnju. Seveda to posledično pomeni dodatno delo in stroške, pa tudi količinsko je tako očiščenega zrnja manj (poleg rožičkov se odstranijo tudi semena plevelov in zdrobljena zrna).

4.9 Preventivni ukrepi in varstvo pred alternarijskimi toksini

Glive *Alternaria* spp. se naselijo na klase oziroma zrnje žit v času dozorevanja zrnja, ko začnejo deli klasa (pleve, klasno vreteno) počasi odmirati. Glive iz tega rodu so namreč fakultativni paraziti in se kot gniloživke večinoma prehranjujejo z odmrlim tkivom klasov. Tako običajno naseljujejo predvsem pleve, v seme oz. pod pleve (ječmen, oves) pa prodrejo predvsem v razmerah, ko je v fenofazah BBCH 87-89-92 (voščena zrelost-polna zrelost-

prezorevanje) deževno vreme. Le to namreč pospeši kolonizacijo zrn z glivami. Tudi kakršnekoli poškodbe zrn zaradi toče, insektov in ptičev povečujejo obseg okužb. Požeto zrnje je potrebno po spravi čimprej posušiti v sušilnikih do optimalne vlage za skladiščenje. Čim dalj s tem odlašamo, večja je verjetnost za nadaljnji razvoj gliv *Alternaria* spp. in s tem tvorbe alternarijskih mikotoksinov.

5 ZAKLJUČKI

S tem projektom smo pridobili prve podatke o koncentraciji ergot alkaloidov in alternarijskih toksinov v žitih in travah v Sloveniji. Dosegli smo vse zastavljene cilje:

1. uvedli smo laboratorijsko kemijsko metodo za določanje glavnih ergot alkaloidov (ergometrin, ergotamin, ergozin, ergokristin, ergokriptin in ergokornin ter njihovi -inini) in laboratorijsko metodo za določanje toksinov, ki jih izločajo glive iz rodu *Alternaria* (tenuazojska kislina, alternariol monometil eter, alternariol in tentoksin).
2. Ocenili smo obseg pojavljanja ergot alkaloidov in prisotnost ter razširjenost gliv *Claviceps purpurea* in *Alternaria* spp. v Sloveniji. Ugotovili smo, da je v zadnjih treh letih 27 % vzorcev žit vsebovalo ergot alkaloide in alternarijske toksine. Dokazali smo vse ergot alkoide in alternarijske toksine. Največ pozitivnih vzorcev je bilo leta 2014, ki je po količini padavin odstopalo povprečja. Padavin je bilo vsaj za dobro desetino več kot v dolgoletnem povprečju. Po vizualnem pregledu vzorcev žit smo ugotovili, da večina rožičkov (razen pri rži) ne izvira iz okuženega žita, temveč od okuženih samoniklih trav, ki rastejo kot plevel med žitom. Iz tega sledi, da bomo morali v prihodnje več pozornosti posvetiti izboljšanju metod za učinkovito čiščenje žitnega zrnja po žetvi, tudi tistega namenjenega krmi za živali, kar pa do sedaj ni bila ustaljena praksa.
3. Predvidevali smo, da bomo v rejah govejih pitancev, kjer se pojavljajo gangrene repov, v obrokih dokazali ergot alkaloide. Ugotovljene koncentracije so premajhne, da bi povzročale takšne klinične znake, poleg tega pa nismo ergot alkaloidov potrdili v vseh rejah. Verjetno so ergot alkaloidi eden od dejavnikov, ki samo pripomorejo k pojavljanju kliničnih znakov, glede na to, da smo pri rejcih, kjer imajo te težave, potrdili prisotnost sklerocijev na travnikih.
4. Na vseh območjih Slovenije smo na samoniklih travah našli ržene rožičke ali sklerocije. To posledično pomeni, da je potrebno izvajati določene preventivne ukrepe, ki do sedaj niso bili ustaljeni. Travinja s travnikov, ki so močno kontaminirani s sklerociji, ne uporabljamo za silažo temveč ga posušimo; pri sušenju večina sklerocijev izpade in tako ne kontaminira krme. Travnike in pašnike v okolici pridelovalnih površin je potrebno pokositi oziroma popasti še pred cvetenjem.

5. Molekularne analize sklerocijev iz samoniklih in gojenih vrst trav iz osmih različnih regij v Sloveniji so pokazale porazdelitev v tri genetske skupine z nekaj preferencami za specifične taksonomske skupine gostitelja. Na podlagi rezultatov se zdi, da *C. purpurea* kaže nizko preferenco do vrstno specifičnega gostitelja.
6. Rezultati o onesnaženosti žit z ergot alkaloidi in alternarijskimi mikotoksini ter vsebnost ergot alkaloidov v sklerocijih se po letih razlikujejo. Po zaključku projekta ne moremo podati jasnih odgovorov, katero žito je v Sloveniji najbolj onesnaženo in s katerimi ergot alkaloidi ali alternarijskimi mikotoksini, kar kaže na smiselnost nadaljevanja raziskav. V letu 2014 je bilo v sklerocijih ugotovljeno največ ergokristina, najmanj pa ergometrinina. V letu 2015 je bilo v rožičkih trav največ ergozina in ergokristina, najmanj pa ergometrinin.
7. Smiselno bi bilo nadaljevati s pregledi travnikov in analizami sklerocijev na vsebnost ergot alkaloidov, ker bomo lahko samo na osnovi večletnih podatkov lahko spremenili predpise. Postaviti zgornje meje za ergot alkaloida namesto mase sklerocijev, kar je predlog EFSA, je izredno zahtevna naloga.
8. V prihodnosti bi bilo smiselno preveriti, če se pridelovalci krme in kmetje držijo priporočil za zmanjšanje ergot alkaloidov in alternarijskih toksinov.

6 LITERATURA

- Agrios GN, 2005. Plant pathology, 5th Edition. Elsevier Academic Press, Burlington, MA, USA. 952 str.
- ARSO. <http://www.arso.gov.si/o%20agenciji/knji%C5%BEnica/mese%C4%8Dni%20bilten/>
- Barkai-Golan R, 2008. Alternaria mycotoxins. In: Mycotoxins in fruits and vegetables. Eds Barkai-Golan R and Nachman P. Academic Press, San Diego, CA, USA, 185-203.
- Bové F.J., 1970. The story of ergot. Ed Karger S. Basel & New York, 297 str.
- Bottalico A in Logrieco A, 1992. Alternaria plant disease in Mediterranean countries and associated mycotoxins. In: Alternaria Biology, plant disergot alkaloidises and metabolites. Eds Chelkovski J and Visconti A. Topics in Secondary Metabolism, 3, 209-232.
- Bürk G, Höbel W, Richt A. 2006. Ergot alkaloids in cereal products. Results from the Bavarian Health and Food Safety Authority. Mol Nutr Food Res. 50:437–442.
- Crews C, Anderson WAC, Rees G, Krska R. 2009. Ergot alkaloids in some rye-based UK cereal based products. Food Addit Contam Part B. 2:79–85.
- Desphande SS, 2002. Chapter 11. Fungal Toxins. In: Handbook of food toxicology. Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, 387-456.
- Diana Di Mavungu JD, Larionova DA, Malysheva SV, Van Peteghem C and De Saeger S 2011. Survey on ergot alkaloids in cereals intended for human consumption and animal feeding. Scientific report submitted to EFSA. Available from <http://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/214e.htm>.

- Driehuis F, Spanjer MC, Scholten JM, & Te Geffel MC 2008. Occurrence of mycotoxins in maize, grass and whergot alkaloidit silage for dairy cattle in the Netherlands. *Food Additives and Contaminants, Part B*, 1, 41–50.
- Drolia H, Luescher UA, Meek AH, 1990. Tail-tip necrosis in Ontario feedlot cattle: two case-control studies, *Prev Vet Med*, 9: 195–205.
- EFSA, 2011: Scientific opinion on the risks for animal and public health related to the presence of *Alternaria* toxins in feed and food. *EFSA Journal*:10 (7).
- EFSA, 2012. Scientific opinion on Ergot alkaloids in food and Feed. *EFSA Journal*:10 (7).
- European Commission. 2000. Commission Regulation (EC) No 824/2000 of 19 April 2000 establishing procedures for the taking-over of cereal by intervention agencies and laying down methods of analysis for determining the quality of cereals. *Off J Eur Commun*. L100:31–50.
- European Commission. 2009b. Commission Regulation (EU) No 1272/2009 of 11 December 2009 laying down common detailed rules for the implementation of Council Regulation (EC) No 1234/2007 as regards buying-in and selling of agricultural products under public intervention. *Off J Eur Union*. L349:1–68
- European Commission. 2012. Commission Recommendation No 2012/154/EU of 15 March 2012 on the monitoring of the presence of ergot alkaloids in feed and food. *Off J Eur Union*. L77:20–21.
- European Commission. 2015. Regulation (EU) 2015/1940 of 28 October 2015 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of ergot sclerotia in certain unprocessed cereals and the provisions on monitoring and reporting.
- Hägglblom, P., Stepinska, A. and Solyakov, A., 2007. *Alternaria* mycotoxins in Swedish feed grain. In *Gesellschaft für Mykotoxin Forschung. Proceedings of the 29th Mycotoxin Workshop*. 14–16 May, 2007, Stuttgart-Fellbach, Germany, p. 35.
- Handeland K and Vikøren T, 2005. Presumptive gangrenous ergotism in free-living moose and a roe deer. *Journal of Wildlife Diserget alkaloidises*, 41, 636–642.
- Janić Hajnal, E., Orčić, D., Torbica, A., Kos, J., Mastilović, J. and Škrinjar, M., 2015. *Alternaria* toxins in wheat from the Autonomous Province of Vojvodina, Serbia: a preliminary survey. *Food Additives and Contaminants, Part A* 32: 361–370.
- Kokkonen M, Jestoi M. 2010. Determination of ergot alkaloids from grains with UPLC-MS/MS. *J. Sep. Sci*, 33, 2322–2327.
- Krska R, Stubbings G, Macarthur R, Crews C, 2008. Simultaneous determination of six major ergot alkaloids and their epimers in cereals and foodstuffs by LC-MS-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391, 563–576.
- Lattanzio VMT, Della Gatta S, Suman M, & Visconti A. 2011. Development and in-house validation of a robust and sensitive solid-phase extraction liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the quantitative determination of aflatoxins B1, B2, G1, G2, ochratoxin A, deoxynivalenol, zergot alkaloidiralenone, T-2 and HT-2 toxins in cerergot alkaloidil-based foods. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 25, 1869–1880.
- Likar M, Hančević K, Radić T, Regvar M (2013). Distribution and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in grapevines from production vineyards along the ergot alkaloidistern Adriatic coast. *Mycorrhiza* 23:209-219
- López, P., Venema, D., de Rijk, T., de Kok, A., Scholten J.S., Mol, H.G.J., de Nijs, M., 2016. Occurrence of *Alternaria* toxins in food products in The Netherlands. *Food Control* 60: 196–204.
- Maček J, 1991. Posebna fitopatologija, Patologija poljščin. 3. izd. Ljubljana: Biotehniška fakulteta, Agronomski oddelek, 285 str.
- Malysheva SV, Larionova DA, Diana Di Mavungu JD, De Saeger S. 2014. Pattern and distribution of ergot alkaloids in cereal and cereal products from European countries. *World Mycotoxin J*. 7:217–230.
- Martos PA, Thompson W, Diaz GJ. 2010. Multiresidue mycotoxin analysis in wheat, barley, oats, rye and maize grain by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *World Mycotoxin J*. 3:205–223.

- Meister U, Batt N. 2014. Fusarium toxins and ergot alkaloids in rye of the federal state Brandenburg harvested 2013. 36th Mycotoxin Workshop, 16–18 June 2014, Göttingen, Germany. p. 131.
- Monbaliu, S., Van Poucke, C., Detavernier, C., Dumoulin, F., Van De Velde, M., Schoeters, E., Van Dyck, S., Averkieva, O., Van Peteghem, C. and De Saeger, S., 2010. Occurrence of mycotoxins in feed as analyzed by a multi-mycotoxin LC-MS/MS method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 66–71.
- Mulder PPJ, Van Raamsdonk LWD, Van Egmond HJ, Voogt J, Van Brakel MW, Van der Horst GM, De Jong J. 2012. Dutch survey ergot alkaloids and sclerotia in animal feeds. Report 2012.005. RIKILT. <http://edepot.wur.nl/234699>
- Müller C, Kemmlein S, Klaffke H, Krauthaus W, Preiß-Weigert A, Wittkowski R. 2009. A basic tool for risk assessment: A new method for the analysis of ergot alkaloids in rye and selected rye products. *Mol Nutr Food Res.* 53:500–507.
- Müller, M.E.H. and Korn, U., 2013. Alternaria mycotoxins in wheat. A 10 y ergot alkaloids survey in the Northeast of Germany. *Food Control* 34: 191–197.
- Münzing K. 2006. Technical possibilities of minimizing of ergot alkaloids in cerergot alkaloids. *J Verbraucherschutz Lebensmittel (J Consum Prot Food Safety)*. 1:155–159.
- Noser, J., Schneider, P., Rother, M. and Schmutz, H., 2011. Determination of six Alternaria toxins with UPLC-MS/MS and their occurrence in tomatoes and tomato products from Swiss market. *Mycotoxin Reserch* 27(4): 265–71.
- Ostry, V., 2008. Alternaria mycotoxins: an overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs. *World Mycotoxin Journal* 1(2): 175–188.
- Ostry, V., Skarkova, J. and Ruprich, J., 2012. Densitometric high-performance thin-layer chromatography method for toxigenity testing of Alternaria alternata strains isolated from foodstuffs. *Journal of Planar Chromatography* 25(5): 388–393.
- Ozcelik S, Ozcelik N, Beuchat LR, 1990. Toxin production by Alternaria alternata in tomatoes and apples stored under various conditions and quantitation of the toxins by high-performance liquid chromatography. *International Journal of Food Microbiology*, 11, 187-194.
- Pavon MA, Gonzales I, Pegels N, Martin R, Garcia T (2010). PCR detection and identification of Alternaria species-groups in processed foods based on the genetic marker Alt a 1. *Food Control* 21:1745-1756.
- Patriarca, A., Azcarate, M.P., Terminiello, L. and Fernández Pinto, V., 2007. Mycotoxin production by Alternaria strains isolated from Argentinean wheat. *International Journal of Food Microbiology* 119: 219–222.
- RASFF (The Rapid Alert System for Food and Feed). 2016. RASFF Portal. http://ec.europa.eu/food/safety/rasff/portal/index_en.htm
- Rotem J, 1994. The genus Alternaria: biology, epidemiology and pathogenicity. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN, 326 pp
- Ruhland M, Tischler J. 2008. Determination of ergot alkaloids in feed by HPLC. *Mycotoxin Res.* 24:73–79.
- Scott P, 2007. Analysis of ergot alkaloids — a review. *Mycotoxin Resergot alkaloidirch*, 23, 113-121.
- Starič J, Ježek J, Švara T in sod. 2013. Tail tip necrosis in fattening bulls. V: 13th Middle Europe buiatrics congress, 5 - 8 june, 2013: 107-111
- Taber, W.A., 1985. Biology of Claviceps . In: Biotechnology Series ,Vol.6, Biology of Industrial Microorganisms (Demain, A.L. and Nadine, A.S., eds), New York: The Benjamin Cummings Publishing Co., Inc., 449–486.
- Tenberge KB., 1999. Biology and life strategy of the ergot fungi. In: Křen V, Cvak L, editors. Ergot, the Genus Claviceps. Medicinal and Aromatic Plants, Vol. 6. Amsterdam, The Netherlands: Harwood Academic Publishers; 25–50.
- Thomma, B.P.H.J. (2003) Alternaria spp.: From general saprophyte to specific parasite. *Mol. Plant Pathol.* 4:225–236.

Uhlig S, Vikøren T, Ivanova L, Handeland K. 2007. Ergot alkaloids in Norwegian wild grasses: a mass spectrometric approach. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 21, 1651-1660.

Uhlig, S., Sundstøl Eriksen, G., Skow Hofgaard, I., Krska, R., Beltrán, E. and Sulyok, M., 2013. Faces of a changing climate: Semi-quantitative multi-mycotoxin analysis of grain grown in exceptional climatic conditions in Norway. *Toxins* 5: 1682–1697.

Zachariasova M, Dzuman Z, Veprikova Z, Hajkova K, Jiru M, Vaclavikova M, Zachariasova A, Pospichalova M, Florian M, Hajslova J. 2014. Occurrence of multiple mycotoxins in Europe feeding stuffs, assessment of dietary intake by farm animals. *Anim Feed Sci Tech*. 193:124–140.

Dodatne fotografije



Rženi rožički (sklerociji) na okuženem klasu rži (foto: dr. Franci Aco Celar in dr. Katarina Kos)



Rožički na mačjem repu (foto: dr. Franci Aco Celar in dr. Katarina Kos)



Rožički na medeni travi (foto: dr. Franci Aco Celar in dr. Katarina Kos)



Na rži se oblikujejo največji sklerociji – slikani na milimetrskem papirju (foto: dr. Franci Aco Celar in dr. Katarina Kos)



Rožiček iz ovsa in pleve na zrnju ovsa okužene z glivo *Alternaria* sp. (viden črnkast poprh) (foto: dr. Franci Aco Celar in dr. Katarina Kos).



Dobro vidni sklerociji na rži (dr. Katarina Kos).



Dr. Katarina Kos je iz sklerocijev naredila pravo umetnino.