

Kukuruzna zlica (*Diabrotica virgifera virgifera*, Le Conte) kao prijenosnik spora mikotoksigenih gljivica

Bronić, Lucija

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zadar / Sveučilište u Zadru**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:162:866748>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-04**



Sveučilište u Zadru
Universitas Studiorum
Jadertina | 1396 | 2002 |

Repository / Repozitorij:

[University of Zadar Institutional Repository](#)



Sveučilište u Zadru

Odjel za ekologiju, agronomiju i akvakulturu

Sveučilišni preddiplomski studij Primijenjena ekologija u poljoprivredi (jednopedmetni)

Lucija Bronić

**Kukuruzna zlatica (*Diabrotica virgifera virgifera*,
Le Conte) kao prijenosnik spora mikotoksigenih
gljivica**

Završni rad

Zadar, 2023.

Sveučilište u Zadru

Odjel za ekologiju, agronomiju i akvakulturu

Sveučilišni preddiplomski studij Primijenjena ekologija u poljoprivredi
(jednopedmetni)

Kukuruzna zlatica (*Diabrotica virgifera virgifera*, Le Conte) kao
prijenosnik spora mikotoksigenih gljivica

Završni rad

Student: Lucija Bronić

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Tomislav Kos

Komentor: Doc. dr. sc. Jelena Lončar

Zadar, 2023.



Izjava o akademskoj čestitosti

Ja, **Lucija Bronić**, ovime izjavljujem da je moj završni rad pod naslovom: **Kukuruzna zlatica (*Diabrotica virgifera virgifera*, Le Conte) kao prijenosnik spora mikotoksigenih gljivica** rezultat mojega vlastitog rada, da se temelji na mojim istraživanjima te da se oslanja na izvore i radove navedene u bilješkama i popisu literature. Ni jedan dio mojega rada nije napisan na nedopušten način, odnosno nije prepisan iz necitiranih radova i ne krši bilo čija autorska prava.

Izjavljujem da ni jedan dio ovoga rada nije iskorišten u kojem drugom radu pri bilo kojoj drugoj visokoškolskoj, znanstvenoj, obrazovnoj ili inoj ustanovi.

Sadržaj mojega rada u potpunosti odgovara sadržaju obranjenog i nakon obrane uređenog rada.

U Zadru, 2024.

Zahvala

Zahvaljujem se mentoru Tomislavu Kosu izv. prof. dr. sc. na stručnoj pomoći tijekom izrade ovoga rada, također se zahvaljujem doc. dr. sc. Jeleni Lončar i Ani Gašparović Pinto mag. ing. agr. na pomoći prilikom izrade ovog završnog rada. Rad je izrađen u sklopu projekta „KLIMA“- Proizvodnja hrane, biokompozita i biogoriva iz žitarica u kružnom biogospodarstvu *KK 1.1.02.0016*.

Sadržaj

Sažetak	1
1. Uvod	1
2. Pregled literature.....	5
3. Cilj i svrha rada.....	7
4. Materijali i metode.....	8
4.1. Prikupljanje odraslih jedinki kukca <i>D. virgifera virgifera</i>	8
4.2. Presađivanje na MEA podlogu.....	9
4.3. Morfološka determinacija	10
4.4. Nasađivanje potencijalno mikotoksigenih gljivica na tekuće podloge	12
4.5. Ekstrakcija okratoksina A	13
4.6. Ekstrakcija aflatoksina B1.....	14
4.7. Kromatografija	14
4.8. Determinacija mikotoksina pod UV lampom.....	15
5. Rezultati	17
6. Rasprava.....	19
7. Zaključak.....	22

Sažetak

Kukuruzna zlatica (*Diabrotica virgifera virgifera*, Le Conte) kao prijenosnik spora mikotoksigenih gljivica

Istraživanje je provedeno u cilju dokazivanja prijenosa mikotoksigenih gljivica od strane odraslih oblika kukuruzne zlatice (*Diabrotica virgifera virgifera*, Le Conte). Kukuruzna zlatica je uz kukuruznog moljca gospodarski najznačajniji štetnik kukuruza. Štete može nanositi i drugim žitaricama. Ličinke kukuruzne zlatice izjedaju korijen kukuruza uzrokujući njegovo povijanje ili potpuno polijeganje, nedovoljan razvitak klipova i otežanu mehaniziranu berbu. Uz štetu koju pravi ličinka, odrasli oblik kukuruzne zlatice mogući je vektor spora mikotoksigenih gljivica. Mikotoksini su sekundarni metaboliti gljivica koji se razvijaju u povoljnim uvjetima temperature i vlage, a mogu biti opasni za ljude i životinje. Neki od najznačajnijih mikotoksina su: aflatoksin B1 i okratoksin A. Stočarska i biljna proizvodnja su usko povezane jer ovise jedna o drugoj u proizvodnji hrane. Preko biljnih i stočarskih proizvoda mikotoksini ulaze u hranidbeni lanac i izazivaju različite, za zdravlje štetne posljedice. Istraživanje je provedeno na način da su spore gljivica koje su isprane sa ulovljenih odraslih primjeraka kukuruzne zlatice presađene na hranjivu podlogu MEA (Malt Extract Agar). Daljnjim metodama nasađivanja kultura na hranjive podloge koje induciraju proizvodnju mikotoksina, te ekstrakcije došli smo do utvrđivanja pojavnosti mikotoksigenih gljivica. Za dokazivanje pojavnosti mikotoksina koristila se metoda tankoslojne kromatografije. Uzorci koji su se pokazali pozitivnim na aflatoksin B1 i okratoksin A pripadaju u rodove *Aspergillus* i *Pencillium*. Istraživanje je potvrdilo da je odrasli oblik kukuruzne zlatice mogući prijenosnik spora mikotoksigenih gljivica.

Ključne riječi: aflatoksin B1, *Aspergillus* spp., kukuruzna zlatica, kukuruz, mikotoksini, okratoksin A, *Pencillium* spp.

Abstract

Western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*, Le Conte) as a carrier of the spores of mycotoxigenic fungi

The study was carried out to demonstrate the transmission of the spores of mycotoxin fungi by adult forms of the western corn rootworm (WCR) (*Diabrotica virgifera virgifera*, Le Conte). The corn rootworm is the most economically important pest of maize, along with the corn moth. It may also cause damage to other cereals. The WCR larvae feed on the corn root, causing it to swell or shrivel, underdeveloping the pits, and hampering mechanized harvesting. In addition to the damage done by the larva, the adult form of WCR is a possible vector of the spores of mycotoxin fungi. Mycotoxins are secondary metabolites of fungi that thrive in favorable conditions of temperature and, humidity, and could be hazardous to humans and animals. Some of the most important mycotoxins are aflatoxin B1 and ochratoxin A. Livestock and crop production are closely linked because they depend on each other for food production. Through plant and livestock products, mycotoxins enter the food chain and cause various adverse health effects. The research was conducted by transplanting the spores of the fungi washed from captured adult specimens of the WCR onto a nutrient medium MEA (Malt Extract Agar). Further methods of inoculating cultures on nutrient substrates that induce the production of mycotoxins, and extraction, have led to the determination of the occurrence of mycotoxigenic fungi. To prove the presence of mycotoxins, thin-layer chromatography was used. The samples tested positive for aflatoxin B1 and ochratoxin A belong to the genera *Aspergillus* and *Pencillium*. Research has confirmed that the adult form of WCR is a possible carrier of mycotoxigenic fungi.

Key words: aflatoxin B1, *Aspergillus* spp., corn, mycotoxins, ochratoxin A, *Pencillium* spp., western corn rootworm

1. Uvod

Kukuruz (*Zea mays* L.) potječe iz Amerike i pripada u skupinu strnih žitarica. Najveća zastupljenost uzgoja kukuruza je u SAD, procjenjuje se? Je?na 130 milijuna ha godišnje, dok je u Hrvatskoj na prvom mjestu oko 40 do 45% sjetvenih površina (Hrgović, 2007.). Kukuruz se upotrebljava u ishrani domaćih životinja u obliku sirovine, kao što su: klip, silaža cijele biljke, zrno i dr. (Pospišil, 2010.). Za ljudsku prehranu, zbog kakvoće i sadržaja, od kukuruza upotrebljava se zrno. Zrno sadrži oko 70% ugljikohidrata, 15% mineralnih tvari, 10% bjelančevina te 5% ulja. U prehrambenoj i farmaceutskoj industriji od velike je važnosti prerada kukuruza, škrob je jedan od proizvoda u širokoj upotrebi. Osim navedenih važnosti, kukuruz je također važan za proizvodnju biogoriva (Zrakić i sur., 2017.). Kukuruz je jednogodišnja biljka koja pripada porodici *Poaceae*. Korijen kukuruza je žiličast, stabljika je visoka i nosi odvojene muške i ženske cvjetove, plod je klip sa zrnima kukuruza. Najveće štete u tehnološkoj proizvodnji kukuruza izazivaju korovi, dok štetnici i bolesti nanose manje štete. Štete se uglavnom preveniraju dobrim agrotehničkim mjerama, a ako nastupe suzbijaju se kemijskim, biološkim i agrotehničkim metodama (Hrgović, 2007.). Najznačajniji štetnici kukuruza su: kukuruzni moljac (*Ostrinia nubilalis*, Hübner), kukuruzna zlatica (*Diabrotica virgifera virgifera*, Le Conte), sovice (*Helicoverpa zea*), žičnjaci (*Elateridae*). Kukuruzna zlatica ističe se kao jedan od najvažnijih štetnika kukuruza u svijetu. Pretpostavlja se kako podrijetlo dolazi iz Meksika, odakle se proširuje na područja uzgoja kukuruza u Sjevernoj Americi (Loambert i sur., 2017.). Prvim nalazom kukuruzne zlatice u Europi, točnije u Srbiji 1992. Igrc Barčić i Maceljski (1997.) procijenili su njezin utjecaj na proizvodnju kukuruza u Hrvatskoj. Također je utvrđeno kako su klimatski uvjeti slični kao i u uzgojnom području kukuruza u SAD-u. Štetnici u kukuruzu rijetko se suzbijaju kemijski, često se koriste samo agrotehničke mjere suzbijanja. Najčešće bolesti kukuruza su gljivične bolesti, antraknoza (*Colletotrichum graminicola*), trulež klipa (*Fusarium spp.*) (Slika 1.), siva pjegavost lista (*Helminthosporium turcicum*), pjegavost lista (*Helminthosporium carbonum*) i dr. Suzbijanje bolesti se postiže uzgojem otpornih kultivara, dezinfekcijom sjemena te plodoredom (Kovačević i Rastija, 2014., Igrc Barčić i Maceljski, 1997.)



Slika 1: Simptom truleži klipa (Izvor: J. Lončar, T. Kos, 2021.)

Odrasli oblik kukuruzne zlatice kornjaš je uskog tijela, sličan je žitnom balcu (*Oulema melanopus*) zbog oblika tijela, veličine i štete koju nanosi (Maceljski, 1999.). Kukuruzna zlatica ima jednu generaciju godišnje. Prezimljava u formi jajeta u dijapauzi u tlu. Izlazak ličinki iz jaja je najčešće kad se postigne temperaturni minimum (Spencer i sur., 2009.). Izlazak ličinki može potrajati od 20 do 30 dana. Prilikom izlaska mlade ličinke se hrane sitnijim korjenčićima kukuruza, a kako rastu potrebno im je više hrane, pa se stoga počinju ubušivanje u korijen biljke. Ličinke najveće štete rade tijekom lipnja i srpnja. Osim ličinke, štete radi i odrasli oblik na način da se hrani s nadzemnim dijelovima biljke (Maceljski, 1999.). Odrasli stadij kukuruzne zlatice hrani se peludom na metlici i svili, istovremeno izgrizajući svilu (Slika 2). Osim svile, također izgriza list kukuruza, na kojem se jasno vide uzdužne pruge, (Maceljski, 1999.). Odrasli oblici čine manje štete, zapravo su pokazatelj visine populacije na nekom području, a velike štete čini ličinka kukuruzne zlatice koja se hrani na korijenu (Ivezić i sur., 2006; 2011.). Kukci kao vektori mogući su prijenosnici biljnih bolesti. Vektori su zasluženi za prijenos bakterija, virusa, gljivica te fitoplazmi (Eigenbrode i sur., 2018.). U vektore bolesti najčešće ubrajamo kukce iz redova Hemiptera i Coleoptera. U red Hemiptera pripadaju lisne uši (*Aphidoidea*, *Aphididae*), štitaste moljci (*Trialeurodes*, *Aleyrodidae*), tripsi (*Thysanoptera*, *Thripidae*), lisne buhe (*Psylloidea*, *Psyllidae*) i dr., dok u red Coleoptera pripadaju krijesnice (*Lampyridae*), božje ovčice (*Coccinella*, *Coccinellidae*), pipe

(*Curculionidae*), hruštevi (*Melolonthinae*, *Scarabaeidae*) i zlatice (*Chrysomelidae*) koje su u ovome istraživačkom radu jedni od glavnih štetnika koji su se pokazali kao prijenosnik mikotoksigenih gljivica (Cukrov i sur., 2020.).



Slika 2. Odrasli oblik kukuruzne zlatice (preuzeto sa: <https://www.agroklub.ba/ratarstvo/kako-suzbiti-kukuruznu-zlaticu/41213/>)

Mikotoksini su toksični spojevi koje proizvode gljivice. Prisutni su u hrani za životinje (Battilani i sur., 2020.). Mehanička oštećenja biljaka uzrokovana kukcima također mogu pogodovati kolonizaciji gljivicama, pa tako i onim mikotoksigenim. *Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium* su najznačajniji rodovi gljivica koje se razvijaju na kukuruzu. Neke vrste spomenutih gljivica imaju sposobnost proizvodnje mikotoksina. Klimatski uvjeti utječu na proizvodnju mikotoksina npr. razdoblje velike suše nakon kojeg slijede velike oborine koje mogu oštetiti zrna te omogućiti lakšu kontaminaciju gljivica (Domijan i sur., 2005.). Plijesni se mogu razvijati i proizvoditi mikotoksine na brojnim žitaricama u polju i za vrijeme skladištenja (Huwing i sur., 2001). U najopasnije mikotoksine koje predstavljaju prijetnju sigurnosti hrane ubrajamo: aflatoksine, okratoksine, te fusarium toksine.

Mikotoksikoze su otrovanja uzrokovana sekundarnim metabolitima (mikotoksinima) gljivica (Ožegović i Pepeljnjak, 1995.). Mikotoksini mogu negativno utjecati na organe u tijelu ljudi i životinja, kao što su: jetra, bubrezi, središnji živčani sustav i dr. (Peraica i Rašić, 2012.). Prvi

otkriveni mikotoksin bio je aflatoksin B1 1960. g. kada je u Velikoj Britaniji došlo do uginuća više od 100 000 purica i 20 000 fazana, jarebica. Bolest je nazvana „Turkey X disease“ a uzročnik pomora peradi bila je hrana kontaminirana gljivicom *Aspergillus flavus* (Varga i sur., 2020.). Aflatoksini kontaminiraju žitarice te su prisutni u hrani životinjskog podrijetla (Huwing i sur., 2001). Ljudi mogu biti izloženi mikotoksinima preko hrane biljnog podrijetla koja je kontaminirana toksinima, te putem prijenosa u životinjske proizvode poput mlijeka, jaja i mesa (Bryden, 2007.). Simptomi trovanja aflatoksinima su upale i propadanje jetre. Osim uzroka kvarenja hrane i hrane za životinje aflatoksin B1 se ubraja u skupinu 1 za kancerogenost (IARC 1993.). Zbog velikog utjecaja kancerogenog djelovanja na ljude i životinje, prisutnost aflatoksina u hrani je potrebno spriječiti ili ograničiti na najmanju moguću razinu. Aflatoksini su skupina mikotoksina koji onečišćuju hranu, preko nje ulaze u prehrambeni lanac, s toga mogu biti prisutni i u hrani koja je životinjskog podrijetla (Frece i Markov, 2014.). Kako je aflatoksin B1 jedan od najopasnijih mikotoksina potrebno je provoditi kontrole u hrani i hrani za životinje (Frece, 2015.).

Jedni od glavnih proizvođača OTA su gljivice *Aspergillus ochraceus* i *Penicillium verrucosum*. Najvažniji okratoksini su: okratoksin A, okratoksin B, okratoksin C, dok okratoksin A spada u skupinu potencijalnih kancerogena za ljude (IARC, 1993.). Okratoksine osim u žitaricama pronalazimo i u drugim namirnicama kao što su kava, orah, sušeno voće, te u hrani životinjskog podrijetla. Dokazano je da je kancerogen za životinje i potencijalno kancerogen za ljude (Kecerin i sur., 2018.). Okratoksin A najčešće djeluje na bubrege te je potrebno spomenuti balkansku endemsku nefropatiju, kao i pojavnost tumora mokraćnog sustava. IARC (1993.) svrstava okratoksin A u skupinu 2B prema karcinogenosti. Načini kojima se mogu prevenirati kontaminacije okratoksinom A su: provođenje pravilnih agrotehničkih mjera na način da se pravovremeno beru usjevi, sušenje na odgovarajućoj vlazi (13 -14 %), uklanjanje oštećenih zrna, te ako bi došlo do pregrijavanja kukuruzne mase poželjno je obaviti provjetranje (Pepeljnjak, 2005; 2008.). Odrasli oblik kukuruzne zlatice uzrokuje štetu tako što služi kao prijenosnik spora mikotoksigenih gljivica i na taj način pogoduje kontaminaciji kukuruza.

2. Pregled literature

Trave (*Poaceae*) su jedna od najznačajnijih skupina za poljoprivrednu bioraznolikost. Porodica *Poaceae* je treća po redu u Hrvatskoj po broju vrsta i podvrsta. U porodicu *Poaceae* ubrajamo i jednogodišnji kukuruz (Vitasović Kosić i sur., 2006.). Proizvodnja kukuruza temelji se na proizvodnji zrna, odnosno prinosu suhog zrna. Među žitaricama kukuruz ima najveći značaj rodosti (Kovačević i Rastija, 2014.). Hrgović (2007.) ističe karakteristike morfologije kukuruza, naglašava kako je korijen kukuruza žiličast te da se sastoji od primarnog i sekundarnog korijenja. Kod korijena kukuruza također razlikujemo podzemno i nadzemno korijenje. Uloga podzemnog korijena je da crpi vodu i otopljeni hranjiva, a nadzemno korijenje je poput oslonca. Stabljika se sastoji od nodija i internodija. Kukuruz je jednodomna biljka jer ima razdvojene muške i ženske cvjetove. Kovačević i Rastija (2014.) navode kako se kukuruz primjenjuje za ljudsku i životinjsku prehranu, te kao sirovinska osnova u industrijskim proizvodima. Najveće površine kukuruza ima SAD, kukuruz se sije na cca 130 milijuna ha godišnje, dok u Hrvatskoj zauzima 500 tisuća ha zasijanih površina. Iako je kukuruz vodeća biljka po zastupljenosti u Hrvatskoj. S obzirom da SAD ima najviše zasijanih površina kukuruza također ima i najviši prinos. Prinosi u SAD-u iznose do 26 t/ha, a u Hrvatskoj se kreće svega do 5 t/ha (Hrgović, 2007.). Uzgoj kukuruza očituje se na stočarsku proizvodnju, prehrambenu i kemijsku industriju te na izvoz (Parlov i sur., 1992.).

Spencer i sur. (2009.) istraživanjem su utvrdili pojavu kukuruzne zlatice prvi put u Sjevernoj Americi 1868., dok je tek 1909. priznata kao štetnik. U Hrvatskoj je prvi put uhvaćena 1995. g. (Spencer i sur., 2009.). Samom pojavom kukuruzna zlatica je postala novi i ekonomski najznačajniji štetnik kukuruza (Pospišil, 2010.). Kukuruzna zlatica se smatrala samo štetnikom kukuruza u monokulturi, pa se pretpostavljalo da je najbolje suzbijanje zabrana uzgoja kukuruza u monokulturi, no Edwards (1996.) je dokazao da u državi Indiana dominira uzgoj kukuruz – soja te je utvrdio da se većina odraslih kukuruznih zlatice hrane polenom i lišćem soje. Odrasli primjerci kukuruzne zlatice se hrane nadzemnim dijelovima, listovima ili zrnom, a naročito se peludom i svilom. Postoji podudarnost između populacije odraslih oblika kukuruzne zlatice na vrhu klipa kukuruza i i kontaminacije zrna. Ukazuje se na to da su odrasli oblici prijenosnici *Fusarium spp.*, naročito za zrna (Gilbertson 1985.). Sever i sur. (2014.) također dobivaju identične rezultate gdje

je osim *Fusarium spp.* moguća kontaminacija s još četiri roda. U Hrvatskoj 2002. zabilježen najveći pad prinosa kukuruza uslijed napada kukuruznom zlaticom do 85 % u Baranji, dok je u ostalim područjima od 20 do 40 % (Igrc Barčić i sur. 2003). Važne mjere za suzbijanje kukuruzne zlatice su u prvom redu plodored, zatim primjena insekticida. Također postoji i alternativna metoda suzbijanja ličinki, a to je biološka metoda upotrebom entomopatogenih nematoda (Jackson i Brooks, 1995.). Sprječavanje šteta u monokulturi može se provesti tako da se prati brojnost odraslih jedinki u godini pred ponovljenu sjetvu kukuruza. Jackson i Brooks (1995.) su zaključili da je za ljudsko zdravlje najbolje raditi na sprječavanju onečišćenja te preventivno suzbijati zlatice. U posljednje vrijeme Lović i sur. (2022.) istražuju brojnost odraslog oblika u različitim uzgojnim uvjetima. Rezultati istraživanja ukazuju da nije kritična prisutnost kukuruzne zlatice zbog koje bi trebalo eliminirati površinu iz daljnjeg uzgoja (Lović i sur., 2022.).

Pepeljnjak i sur. (2008.) su u posljednjih 30 godina istražili *Fusarium* i *Pencillium* vrste. *Pencillium* vrste prevladavaju u usjevima zbog čega su kukuruz i pšenica kontaminirane okratoksinom A. Godine, 1972. i 1976. provedeno je istraživanje za endemske regije. Istraživanje je također obuhvaćalo uzorke kukuruza. Prema Domijan i sur., (2005.) analizom prikupljenih uzoraka kukuruza utvrđena je prisutnost OTA, pozitivnih je bilo 8,3% uzoraka. Dok su uzorci kukuruza koji su prikupljeni 1975. koristili su se za prehranu, imali prisutnost OTA od 26% utvrđenih (Domijan i sur., 2005.). Klimatske promjene koje su uzrokovale porast prosječnih temperatura stvorile su povoljne uvjete za tvorbu aflatoksina u Hrvatskoj. Odstupanja od dozvoljenih količina za mikotoksine ustanovljena su u kukuruzu i krmnim smjesama. Od ukupno 663 ispitanih uzoraka kukuruza nesukladnosti su utvrđene u 262 uzorka (39, 52%). Svi uzorci sadržavali su aflatoksin B1 (Knežević i sur., 2014.). Prema Thathana i sur. (2017.) kukuruz u uzgoju u Keniji može biti zahvaćen s mnogim bolestima i štetnicima. Postoje razlike u pojavljivanju toksikogenih gljivica kao što su *Aspergillus flavus* u različitim područjima. U nekim regijama do zaraze dolazi samo u kombinaciji suše i visokih temperatura. U Makueni su sušniji uvjeti i visoke temperature, pa su s toga rezultati istraživanja i do 63% *Aspergillus flavus* u uzorcima kukuruza. Kako bi dobili što pouzdaniji rezultat u istraživanju su se koristile UV fluorescentni skrining i TLC za identifikaciju aflatoksina (Thathana i sur., 2017.). Postoji malo radova koji se bave istraživanjem potencijala kukuruzne zlatice da prenosi spore mikotoksigenih gljivica i treba novim ili postojećim metodama istražiti taj potencijalni prijenos. Za kukuruznu zlaticu nema puno pregleda literature te nas je to i potaklo na istraživanje.

3. Cilj i svrha rada

Cilj rada je istražiti prenosi li odrasli oblik kukuruzne zlatice (*Diabrotica virgifera virgifera*, Le Conte) spore mikotoksigenih gljivica, potencijalne proizvođače aflatoksina B1 i okratoksina A.

Svrha rada je procijeniti značaj mogućeg prijenosa spora te sugerira mjere kojima bi se spriječilo onečišćenje kukuruza od mikotoksina.

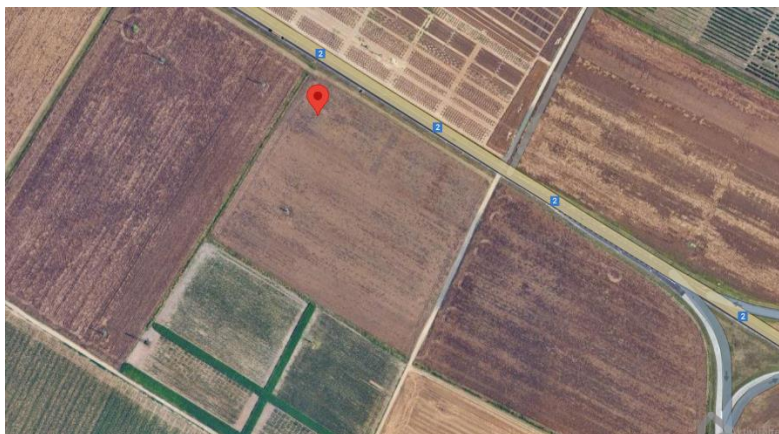
4. Materijali i metode

4.1. Prikupljanje odraslih jedinki kukca *D. virgifera virgifera*

Odrasli oblici kukuruzne zlatice su ručno sakupljeni s kukuruza na pokusnom polju (Poljoprivredni institut u Osijeku 2022. godine). Sakupljeni primjerci su bili odloženi u sterilne bočice (Slika 3.) koje su bile spremljene u hladnjak. Koordinate pokusnog polja su (45.533118, 18.736599), (Slika 4.).



Slika 3. Prikupljanje odraslih *Diabrotica virgifera virgifera* sterilnom bočicom (Izvor: J. Lončar, T. Kos, 2021.)



Slika 4. Pokusno polje u Osijeku sa GPRS koordinatama (Izvor: Gmaps, 2024.)

4.2. Presađivanje na MEA podlogu

Za pripremu MEA(Malt Extract Agar, HiMedia, Indija) podloge korišteno je 500 ml destilirane vode i 17,8 g MEA. Zatim se podloga sterilizirala u autoklavu (Slika 5.) pri temperaturi od 121°C i tlakom od 1 atm tijekom 15 minuta. Pojedinačno ulovljeni primjerci kukuruzne zlatice su isprani u sterilnim uvjetima sa 1 mL sterilizirane destilirane vode (Slika 6.). Količina od 1 mL suspenzije je presađena na podlogu MEA (Slika 7.) i postavljena na inkubaciju 27°C i 95% RH kroz tri dana (Slika 8.).



Slika 5. Sterilizacija hranjive podloge u autoklavu (Izvor: J.Lončar, 2023.)



Slika 6. Ispiranje kukuruzne zlatice (Izvor: J.Lončar, 2023.)



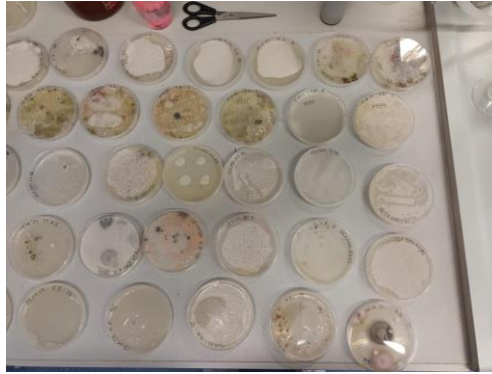
Slika 7. Inokulacija suspenzije na podlogu MEA (Izvor: J. Lončar, 2023.)



Slika 8. Inkubiranje suspenzije na podlozi MEA (Izvor: J. Lončar, 2023.)

4.3. Morfološka determinacija

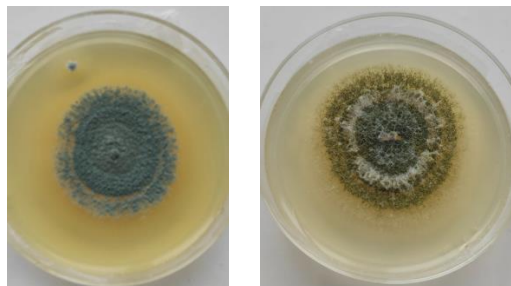
Nakon 3 dana inkubacije mješovite kulture (Slika 9.) presađene su u čiste kulture (Slika 10.) koje su inkubirane 7 dana pri istim uvjetima. Čiste kulture (Slika 11.) su korištene za morfološku determinaciju. Uz pomoć morfološke determinacije iz čistih kultura s podloge MEA utvrđeni su rodovi. Utvrđivanje rodova provedeno je uz pomoć priručnika za identifikaciju “Food and Indoor Fungi“ (Samson i sur., Nizozemska, 2019.). Morfološka determinacija je obavljena uz pomoć mikroskopa (Motic Panther C Light Microscope, Kina) i plavog laktofenola. Postupak se odvijao na način da je mali dio podloge s uzorkom stavljen na predmetno stakalce, zatim je dodano 2 do 3 kapi laktofenola, te preklopljeno s pokrovnim stakalcem. Uz pomoć laktofenola bolje se raspoznaje stjenka hifa i ostale gljivične strukture.



Slika 9. Razvijene mješovite kulture gljivica (Izvor : Lucija Bronić, 2023.)

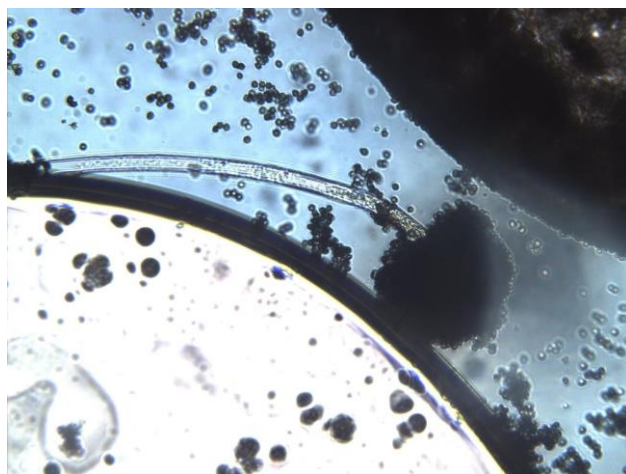


Slika 10. Presađivanje gljivica iz mješovitih u čiste kulture gljivica (Izvor: J. Lončar, 2023.)

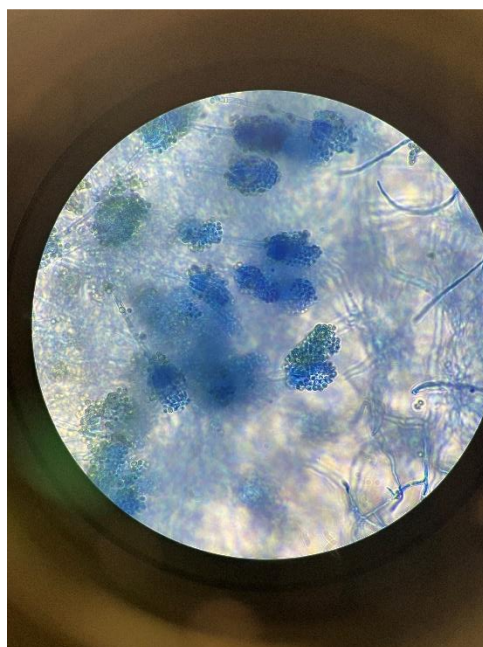


Slika 11. Čiste kulture gljivica (Izvor: J. Lončar, 2023.)

Uz pomoć mikroskopa i ključa za determinaciju gljivica Food and Indoor Fungi (Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Nizozemska) dobiveni su rezultati, te je utvrđeno šest različitih rodova: *Aspergillus spp.* (Slika 12.), *Penicillium spp.* (Slika 13.), *Rhizopus spp.*, *Trichoderma spp.*, *Alternaria spp.* i *Fusarium spp.*



Slika 12. *Aspergillus* spp. (Izvor: Lucija Bronić, 2023.)



Slika 13. *Penicillium* spp. (Izvor: Lucija Bronić, 2023.)

4.4. Nasađivanje potencijalno mikotoksigenih gljivica na tekuće podloge

Nakon morfološke determinacije uslijedilo je presađivanje uzoraka s MEA podloga na tekuće podloge Potatooe Dextrose Broth (PDB) koje induciraju proizvodnju mikotoksina. Na tekuće podloge presađene su samo potencijalni proizvođači OTA i AFLA. Tekuća podloga PDB (Potato Dextrose Broth, Biolife, Italija) pripremljena je u količinama od 13,5 g u 500 ml destilirane vode. Zatim je pripremljena podloga postavljena na kuhalo koje zagrijava podlogu, te nakon zagrijavanja

uzeto je po 5 ml podloge po svakoj konusnoj epruveti te je zatvoreno čepom. Tako pripremljene epruvete sterilizirane su u autoklavu pri temperaturi od 120°C na 15 minuta. U svaku epruvetu nasađene su konidije potencijalnih proizvođača proučavanih mikotoksina te su inkubirane 14 dana na 25°C i 90% vlage. Nakon inkubacije uz pomoć sterilne pipete uzeto je 2 ml tekuće podloge (Slika 14.) iz kojih se povela ekstrakcija mikotoksina.



Slika 14. Uzimanje tekuće podloge (Izvor: J. Lončar, 2023.)

4.5. Ekstrakcija okratoksina A

Nakon inkubiranja tekućih podloga proveden je postupak ekstrakcije. Za ekstrakciju je korišteno 2 ml uzorka iz tekuće podloge, također je uzeto 2 ml otopine za ekstrakciju (0.01M H_3PO_4 u kloroformu, VWR, Chemicals, USA). Nakon što je dodana otopina, uzorak je vorteksiran nekoliko sekundi te kad su se odvojile dvije faze uz pomoć Paeusterove pipete odvojena je samo donja faza. Donja faza je filtrirana preko staklenog lijevka koji sadrži natrijev sulfat (Na_2SO_4 , Merck, USA). Ekstrakcija je ponovljena tri puta (Slika 15.). Potom su epruvete stavljene u staklene posude s vodom gdje su isparavale strujanjem N_2 . Takve epruvete do analize su bile zatvorene s parafilmom i spremljene na 4°C.



Slika 15. Ekstrakcija (Izvor: Lucija Bronić i Bruno Martić, 2023.)

4.6. Ekstrakcija aflatoksina B1

Iz inokuliranih tekućih kultura potencijalnih proizvođača aflatoksina sterilno je otpipetirano 2 ml uzorka i prenešeno u epruvetu za ekstrakciju. U epruvete je dodana otopina s kloroformom; metilni alkohol (VWR, Chemicals, USA) u omjeru 2:1 (v/v). Nakon toga uzorak je vorteksiran i ostavljen par sekundi kako bi se dvije faze odvojili. Uz pomoć Pasteurove pipete uzeta je donja faza i prenijeta u čistu epruvetu. Postupak ekstrakcije ponovljen je tri puta. Potom su epruvete stavljene u staklene posude s vodom gdje su isparavale strujanjem N_2 . Epruvete su zatvorene s parafilmom i spremljene pri temperaturi od $4^{\circ}C$ do sljedeće analize.

4.7. Kromatografija

U postupku su korištene TLC pločice (TLC aluminium sheets, silica gel layer, ALUGRAM SIL G UV254, Macherey-Nagel Njemačka) na kojima je napravljena olovkom crta od donjeg ruba u visini od 1,5 cm. Na crti su također označena mjesta, na svakih 1 cm gdje se nanosi uzorak. U sredini pločice je naznačen standard odnosno koncentracija od $10 \mu g/ml$ aflatoksina B1 ili okratoksina A. Prisutnost mikotoksina u uzorcima određeni su prema visini standarda. Svaki estrahirani uzorak otopljen je metanolu ($50 \mu L$) (BDH prolabo, USA) i

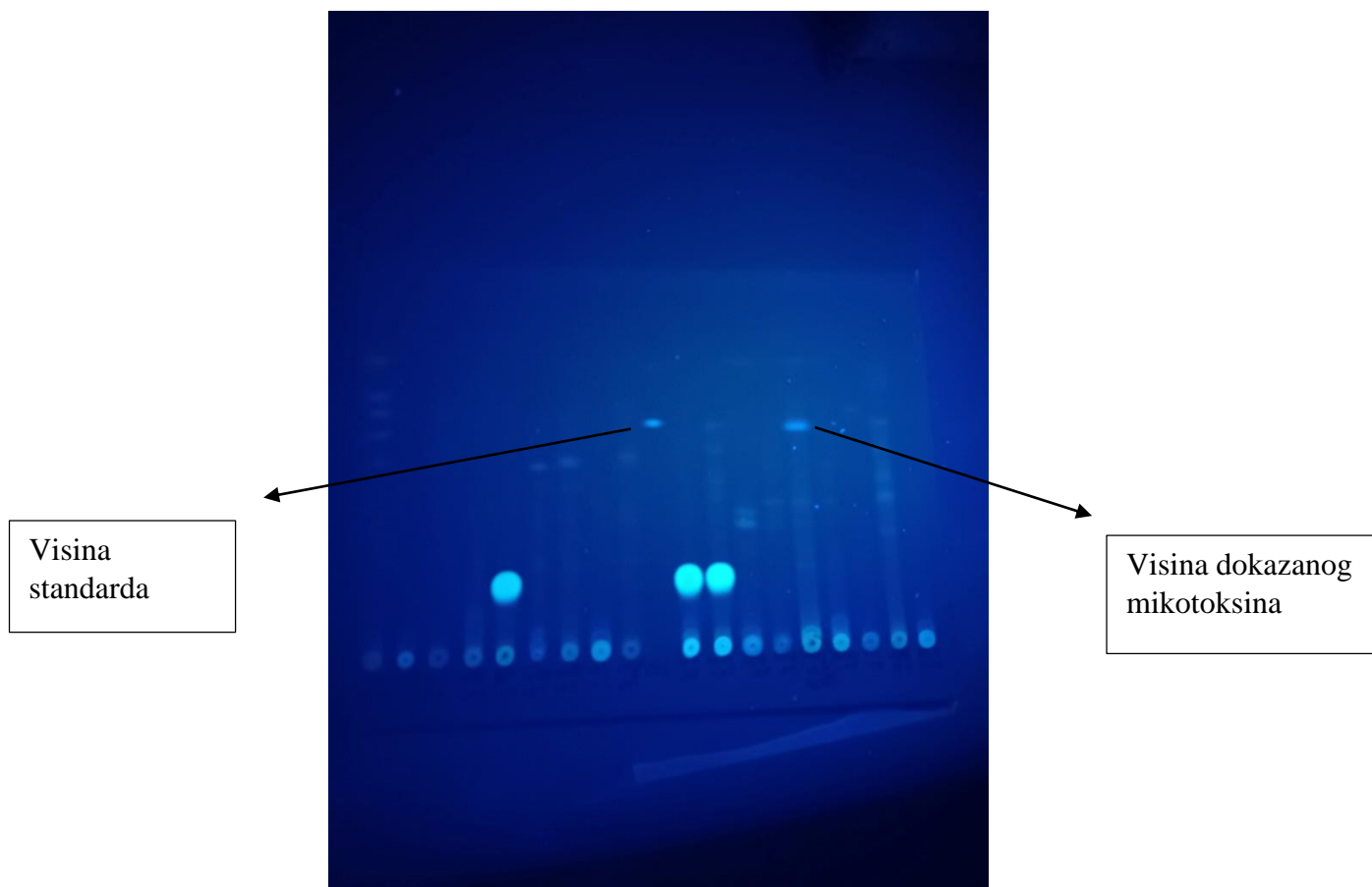
vorteksiran je 1 minutu. Zatim je s mikrosiringom uzeto 10 μ L uzorka te postavljeno na označena mjesta na TLC pločici. Nakon što je popunjena, pločica s uzorcima postavljena je u kupelj za razvoj tekućinske kromatografije. U postupku je kao mobilna faza korišteno 100 ml kloroform:metanol u omjeru 2:1 (v/v) za prisutnost aflatoksina B1 ,dok je kao mobilna faza za dokazivanje prisutnost okratoksina A korišteno 100 ml otopine kloroform:acetone u omjeru 44:6 (v/v). Nakon postavljanja pločica u kupelj, kupelj se zatvara poklopcem (Slika 16.) kako bi se omogućila kromatografska migracija. Vremensko trajanje migracije je 90 minuta, odnosno dok linija migracije ne postigne visinu do cca. 1,5 cm od gornjeg ruba pločice. Završetkom kromatografske migracije kupelj se otvara i uzima se TLC pločica, koja se stavlja u digestor da se osuši.



Slika 16. Kupelj sa mobilnom fazom za razvoj kromatografske migracije (Izvor: Lucija Bronić, 2023.)

4.8. Determinacija mikotoksina pod UV lampom

Poslije sušenja TLC pločica u digestoru, očitava se prisutnost aflatoksina B1 i okratoksina A pod UV svjetlom. Prisutnost se utvrđuje pod UV svjetlom valne dužine 330 nm, na način da se pločica postavlja vodoravno i osvjetljena je UV lampom. Rezultati su vidljivi poput zeleno-žućkaste mrlje, koje su dosegle visinu standarda (Slika 17.).

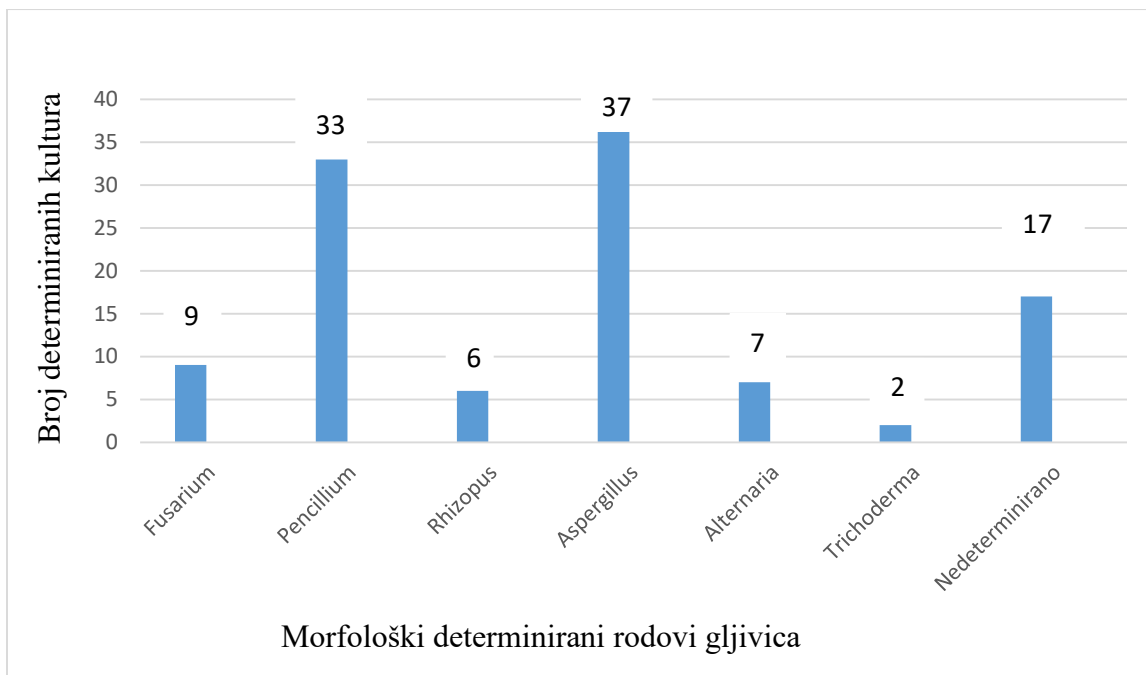


Slika 17. Rezultati pod UV svijetlom (Izvor : Lucija Bronić, 2023.)

Rezultati determinacije su prikazani u grafu koji je izrađen u excel programu. Za određivanje potencijalnih proizvođača mikotoksina upotrijebljena je deskriptivna statistička metoda.

5. Rezultati

Tijekom istraživanja u pokusnom polju prikupljeno je 100 uzoraka odraslih jedinki kukuruzne zlatice. Od 100 uzoraka koji su prikupljeni, pripremljeno je i determinirano 107 čistih kultura. Morfološki je determinirano 90 gljivica od 107 čistih kultura. (Graf 1.)

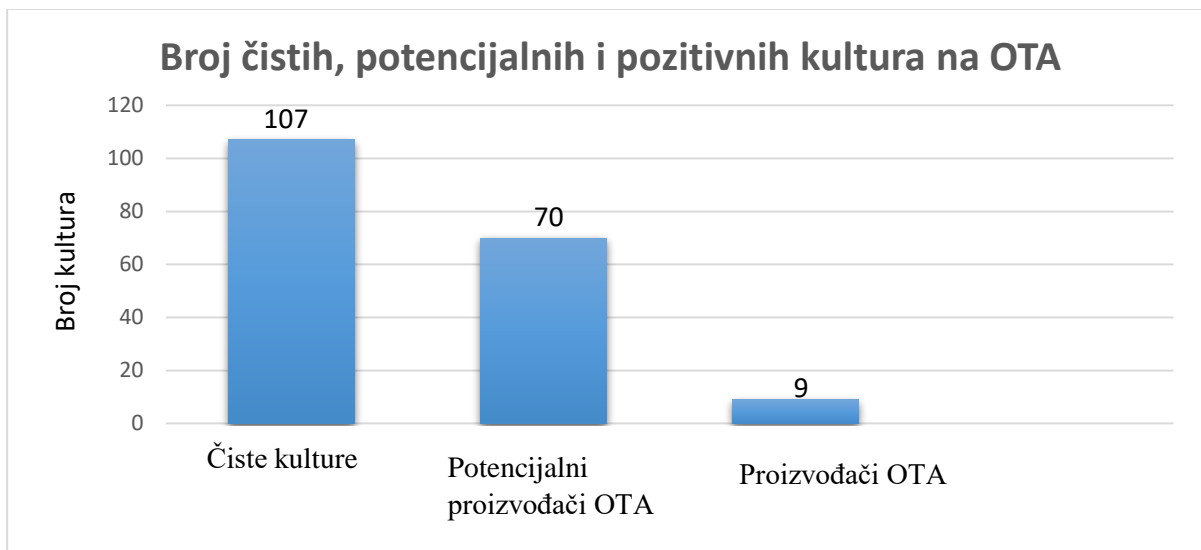


Graf 1. Morfološka determinacija čistih kultura.

Podatci u grafu prikazuju 6 rodova gljivica i 17 nedeterminiranih kultura 9 uzoraka roda *Fusarium spp.*, 33 uzoraka roda *Pencillium spp.*, 6 uzoraka roda *Rhizopus spp.*, 37 uzoraka roda *Aspergillus spp.*, 7 uzoraka roda *Alternaria spp.*, 2 uzoraka roda *Trichoderma spp.* i 17 uzoraka je nedeterminirano (Graf 1.).

Uz pomoć morfološke determinacije ustanovljeno je 70 potencijalnih proizvođača okratoksina A i 70 potencijalnih proizvođača aflatoksina B1.

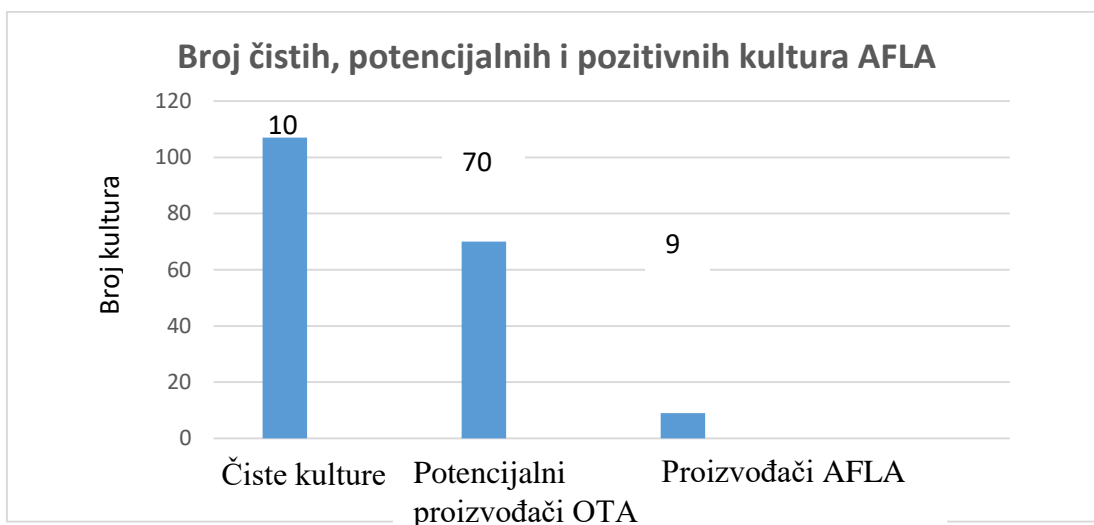
Graf 2. Prikazuje pozitivne i potencijlano pozitivne uzorke na OTA. Tekućinskom kromatografijom dobiveni su rezultati koji su prikazani u grafu.



Graf 2. Omjer čistih kultura, potencijalnih proizvođača i proizvođača OTA

Od 107 čistih kultura utvrđeno je 70 uzoraka koji su potencijalni proizvođači OTA. Od 70 potencijalnih proizvođača okratoksina A potvrđeno je 9 uzoraka (12,9%) koji su pozitivni na Okratoksin A.

Graf 3. Prikazuje pozitivne i potencijalne pozitivne uzorke na AFLA. Tekućinskom kromatografijom dobiveni su rezultati koji su prikazani u grafu.



Graf 3. Omjer čistih kultura, potencijalnih proizvođača i proizvođača AFLA

Od 107 čistih kultura utvrđeno je 70 uzoraka koji su potencijalni na AFLA. Od 70 potencijalnih proizvođača aflatoksina B1 potvrđeno je 9 uzoraka (12,8%) koji su pozitivni na Aflatoksin B1.

6. Rasprava

U posljednje vrijeme znanstvena istraživanja sve više upućuju na globalno zagrijavanje, povezivanjem klimatskih promjena s novim vrstama plijesni u novim područjima gdje ih nije bilo (Casu i sur., 2024.). Velike ekonomske štete u prehrambenoj industriji upućuju na nepovoljne vremenske događaje kao što je porast temperature i nedostatak vode, suše, poplave, te požari. Casu i sur., (2024.) tijekom 2022. navode kako porast temperatura može pogodovati širenju raznih štetnika i na taj način utjecati na učestalost bolesti. Đoić (2009.) u svom istraživačkom radu istražuje pojavu odraslih oblika kukuruzne zlatice u polju kukuruza. Istraživanje je provedeno u Slavoniji 2004. i 2005. godine. Pojava odraslog oblika kukuruzne zlatice prati se na temelju akumuliranih dnevnih jedinica za temperaturu zraka te vremenu praćenja. Štete na korijenu od ličinki se ne mogu procijeniti na osnovu brojnosti jaja u jesen i proljeće, već na temelju broja ličinki i štete na korijenu mogu se samo predvidjeti štete na usjevima. Brojnost populacije odraslih u polju u kojem su se razvili, kao i u poljima koja nastanjuju tijekom ljeta pod utjecajem je brojnih čimbenika (Kos, 2011.).

Klimatske promjene utječu na povećanu pojavnost mikotoksigenih gljivica što predstavlja opasnost sigurnosti hrane (Casu i sur., 2024.). Pleadin i sur. (2020.) u svom istraživanju tvrde da bi zbog klimatskih uvjeta moglo doći do promjene i na interakciju domaćin-patogen. Visoke temperature i visoki stupanj vlažnosti može ubrzati pojavnost plijesni i produkciju mikotoksina. Mnoga istraživanja su usredotočena na nekoliko mikotoksigenih gljivica koje uzrokuju značajne ekonomske štete, a posebno na vrste *Fusarium*, *Aspergillus*, *Pencillium*, *Alternaria* (Pleadin i sur., 2020., Casu i sur., 2024.). Zbog klimatskih promjena na području Europe u budućnosti postoji mogućnost rasprostranjenja vrste *A. Flavus* s čime se povećava rizik od onečišćenja žitarica mikotoksinima osobito od strane aflatoksina. Rodovima gljivica *Aspergillus* i *Pencillium* odgovaraju visoke temperature te niska vlaga zraka od 13 do 18 %, dok je kod *Fusarium* rodova odgovaraju niže temperature te visoka vlaga zraka od 18 i više % (Furlan, 2016.).

Kukuruzna zlatica svojim kretanjem pridonosi širenju spora mikopatogenih gljiva. Najznačajnije vrste koje su pronađene na površini tijela kukca su *Aspergillus spp.* i *Pencillium spp.* (Nesci i sur. 2011.). Prema istraživanju prisutnost gljiva u skladištu gdje je skladišten klip kukuruza s "nezaštićenih" (mehanička zaštita koja ometa kukce prilikom kretanja) polja bila je sljedeća: rod

Fusarium (36,05%), *Penicillium* (23,50%), *Rhizoctonia* (5,65%) i *Aspergillus* (3,95%), dok kod „zaštićenih“ (mehanička zaštita koja nije dozvoljavala kretanje kukaca) zaraza bila: *Rhizoctonia spp.* (16,76%), *Fusarium spp.* (16,62%), *Penicillium spp.* (8,24%) i *Aspergillus spp.* (2,33%) (Lamboni i Hell 2009.). U našem istraživačkom radu prikazan je omjer čistih kultura, potencijalnih proizvođača i proizvođača okratoksin A od čega je 8% gljivica od ukupne mikroflore proizvelo okratoksin A, i 8% aflatoksin B1.

Autori Hengl i sur. (2014.) istraživali su kontaminaciju kukuruza s aflatoksinom B1 koji je iznosio 0,036 mg/kg dok je dozvoljena koncentracija 0,02 mg/kg. Pojava gljivica roda *Aspergillus* se razlikuje iz godine u godinu. Cvjetković 1996. i 1997. godine otkriva kontaminaciju s *Aspergillus spp.* od 0,3 do 2,3% (Cvjetković, 2014.). Dok Ćosić i sur. (2012.) su istraživali 6 genotipova kukuruza ukupno 24 uzorka, i utvrđuju kontaminaciju s *Aspergillus spp.* od 0,5% na 4 uzorka, i 1% na 1 uzorku. Cvjetković (2014.) navodi kontaminaciju s *Aspergillus spp.* tijekom godina: kroz 2011. bilo je 6,5% sjemena kontaminirano, u 2012. 2,6% kontaminirano, a u 2013. 10% kontaminirano. Od 53 uzorka utvrđena je kontaminacija gljivicama roda *Aspergillus* koja iznosi 60%. U Hrvatskoj je istraživanje mikotoksina rezultiralo da su ZEA i *Fusarium* puno češće u žitaricama nego OTA (Šegvić Klarić i sur., 2009.). Za prva dva mikotoksina pojavnost iznosi iznosi 80 do 100 %, dok je kod OTA 40% (Šegvić Klarić i sur., 2009.). Istraživanje mikotoksina metodom TLC potvrđeno je kod gljivica roda *Fusarium* u samo 10,8 % uzoraka, a aflatoksina je nešto više 24,3%.

S obzirom na velike promjene u klimatskim uvjetima potrebno je imati kvalitetnu strategiju prevencije kontaminacije mikotoksina u hrani i hrani za životinje. Mikotoksini mogu nastati u procesu proizvodnje hrane pa je s toga najbolja mjera za mikotoksine prevencija. Cvjetković (2014.) navodi kako se uz pomoć kvalitetnih agrotehničkih mjera mogu smanjiti pojave gljivičnih oboljenja kukuruza samim time i pojava mikotoksikogenih gljivica. Gospodarske mjere temelje se prvenstveno na prevenciji primjenom pravilnih agrotehničkih mjera, a to su: izbor sorti i staništa, sklop, sjeme, plodored, korovi, gnojidba, navodnjavanje, fungicidi, žetva i berba (Cvjetković, 2014.). Kako je ovim radom pokazano da odrasli oblici kukuruzne zlatice mogu biti prenosioci spora mikotoksigenih gljiva korisna mjera prevencije može biti i kasnija sjetva kukuruza. Ona smanjuje ili odgađa početnu i ukupnu brojnost odraslih jedinki kukuruzne zlatice koje izlaze iz tla jer je smanjena dostupnost korijena kao hrane (Kos, 2011.).

7. Zaključak

Kukuruzna zlatica je gospodarski značajan štetnik kukuruza u sjevernoj Americi i dijelovima Europe. Ličinka i odrasli oblik uzrokuju štete na korijenu i listu. Brojnost odraslih u polju može utjecati na pojavnost bolesti klipa. Ovim istraživačkim radom pokazano je da je odrasli oblik vektor, odnosno prijenosnik spora miktoksigenih gljivica.

S obzirom da mikotoksini mogu nastati u procesu proizvodnje hrane, najbolje mjere zaštite kukuruza od mikotoksina uz preventivne: plodored, odabir hibrida ili prostorna izolacija usjeva potrebno je pratiti i pojavu i visinu populacije kukuruzne zlatice.

Treba napomenuti kako se događaju velike globalne promjene te je potrebno imati kvalitetnu strategiju za prevenciju pojave mikotoksina. Klimatske promjene utječu na proširenost miktoksigenih gljivica koje predstavljaju opasnost za sigurnost hrane.

8. Literatura

1. Battilani, P., Palumbo, R., Giorni, P., Dall'asta, C., Dellafiora, L., Gkrillas, A., Toscano, P., Crisci, A., Brera, C., De Santis, B., Cammarano, R. R., Della seta, M., Campbell, K., Elliot, C., Venancio, A., Lima, N., Gonçalves, A., Terciolo, C., P Oswald, I. (2020.): Mycotoxin mixtures in food and feed: holistic, innovative, flexible risk assessment modelling approach: MYCHIF, European food safety authority.
2. Bryden, W. L. (2007.): Mycotoxins in the food chain: human health implications, School of animal studies, University of Queensland, Gatton, QLD 4343 Australia.
3. Casu, A., Camardo Leggieri, M., Toscano, P., Battilani, P. (2024.), Changing climate, Shifting mycotoxins : A comprehensive review of climate change impact on mycotoxin contamination, Comprehensive review in Food Science and Food Safety, 23 (2).
4. Cukrov, M., Lemić, D., Pasković, I. (2020.), Kukci vektori biljnih bolesti, Glasilo biljne zaštite, 20 (5), pp. 548 – 562.
5. Cvjetković, B., (2014.), Upravljanje rizikom od mikotoksina počinje u polju, Glasilo biljne zaštite, 14 (4), pp. 317 – 328.
6. Ćosić, J., Vrandečić, K., Jurković, D., Abramović, B., Jajić, I., Jakšić, S. (2012.), Mycopopulation of cereals in Croatia, U „Occurrence of fungi and mycotoxins in cereals and medicinal plants from Romania – Serbia – Croatia area “, Temišvar: EUROBIT, pp. 88 – 106.
7. Domijan, A., Peraica, M., Cvjetković, B., Turčin, S., Jurjević, Ž., Ivić, D. (2005.), Kontaminiranost kukuruza u Hrvatskoj plijesnima i nekim mikotoksinima. Acta Pharmaceutica, 55 (4), pp. 349 – 356.
8. Đoić, D. (2009.), Prognoza pojave kukuruzne zlatice (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte) na području Istočne Slavonije, Poljoprivreda, 15 (2), pp. 63 – 63.
9. Edwards, C.R. (1996.), The sudden and dramatic shift of the Western Corn Rootworm to Corn following soybeans. IWGO News letter, 14 (1), pp. 13 – 15.
10. Eigenbrode, S.D., Bosque – Perez, N.A., Davis, T.S. (2018.), Insect – borne plant Pathogens and their vectors : ecology, evolution, and complex interactions, Annual review of entomology, 63, pp. 169 – 191.

11. Frece, J., Markov, K. (2014.), Aflatoksini – Onečišćenje, učinci i metode redukcije. Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam, 9 (3 - 4), pp. 75 – 82 znanstveni članak.
12. Frece, J., Vasilj, V., Markov, k. (2015.), Fuzarijski mikotoksini u hrani i hrani za životinje. Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam, 10 (1 -2), pp. 6 – 13 Pregledni rad.
13. Furlan, I. (2016.), Određivanje mikotoksina u stočnoj hrani – kukuruz u zrnu, Završni rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet.
14. Gilbertson RL. (1985.): Ecology and epidemiology of corn stalk rot in colorado, PhD thesis, colorado State University, pp. 148.
15. Hengl, B., Gross Bošković, A., Šperanda, M. (2014.), Količina aflatoksina u hrani za mliječne krave i pojavnost AFM1 u mlijeku, Krmiva, Časopis o hranidbi životinja, proizvodnji i tehnologiji krme, 56 (4), pp. 169 – 177.
16. Hrgović, S. (2007.), Osnovne agrotehnike proizvodnje kukuruza (*Zea mays*), Glasnik Zaštite bilja, 30 (3), pp. 48 – 61.
17. Huwig, A., Freimund, S., O. Käppeli H. Dutler (2001.), Mycotoxin detoxification of animal feed by different adsorbents. *Toxicol. Lett.* 122, pp. 179 – 188.
18. IARC (1993.), some naturally occurring substances, food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins, Geneva, 56.
19. Igrc Barčić, J., Bažok, R., Maceljki, M. (2003.), Istraživanje kukuruzne zlatice (*Diabrotica virgifera virgifera* Le Conte) u Hrvatskoj (1994. – 2003.). *Entomologija Croatica*, 7 (1 - 2), pp. 63 – 83.
20. Igrc Barčić, J., Maceljki, M. (1997.), KUKURUZNA ZLATICA (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte – Col.: Chrysomelidae) – NOVI ŠTETNIK U HRVATSKOM PODUNAVLJU, *Agronomski glasnik : Glasnik Hrvatskog agronomskog društva*, 59 (5 – 6), pp. 429 – 443.
21. Ivezić, M., Majić, I., Raspudić, E., Brmež, M., Prakat, B. (2006.), The importance of Western corn rootworm in continuous maize. *Poljoprivreda*, 12 (1), pp. 35 – 40.
22. Ivezić, M., Raspudić, E., Majić, I., Tollefson, J., Brmež, M., Sarajlić, A., Brkić, A. (2011.), Root compensation of seven maize hybrids due to western corn rootworm (*Diabrotica*

- virgifera virgifera LeConte) larval injury. Bulgarian journal of agricultural science, 17 (1), pp. 107 – 115.
23. Jackson J. J., Brooks, M. A. (1995.), Parasitism of Western Corn Rootworm Larvae and Pupae by *Steinernema carpocapsae*. Journal of Nematology, 27 (1), pp. 15 – 20.
 24. Kececin, R., Petrović, M., Prskalo, I., Jagić, V., Lasić, D. (2018.), Kontrola okratoksina A u sušenom voću, Časopis za primjenjene zdravstvene znanosti, 4 (2), pp. 233. – 247.
 25. Knežević, D., Sokolić, D., Mikec, D., Miloš, S., Jurković, M. (2014.): Sigurnosti i kakvoća hrane za životinje u Republici Hrvatskoj u 2013. godini, Krmiva: Časopis o hranidbi životinja, proizvodnji i tehnologiji krme, 56 (3), pp. 125 – 136.
 26. Kos, T. (2011.), Prognoza šteta i procjena rizika od kukuruzne zlatice (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte, 1868.), Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, pp. 168.
 27. Kovačević, V., Rastija, M. (2014.), Žitarice, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek.
 28. Lamboni, Y., Hell, K. (2009.): Propagation of mycotoxigenic fungi in maize stores by post-harvest insects. *Int J Trop Insect Sci* 29, pp. 31–39.
 29. Loambert, E., Ciosi, M., Miller, N. J., Sappington, T. W., Blin, A., Guillemaud, T. (2017.), Colonization history of the western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*) in North America: insights from random forest ABC using microsatellite data. *Biological Invasions*, 20 (3), pp. 665 – 677.
 30. Lović, I., Sarajlić, A., Raspudić, E. (2022.), Štetnost kukuruzne zlatice (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte) u uvjetima višegodišnje ponovljene sjetve kukuruza, Poljoprivreda, 28 (2), pp. 44 – 50.
 31. Maceljčki, M. (1999.), Poljoprivredna entomologija, Zrinski d.d. Čakovec, 145 – 242.
 32. Nesci, A., Barra, P., Etcheverry, M. (2011.): Integrated management of insect vectors of *Aspergillus flavus* in stored maize, using synthetic antioxidants and natural phytochemicals, *Journal of Stored Products Research*, 47, (3), pp. 231-237.
 33. Ožegović, L., Pepeljnjak, S. (1995.), Mikotoksikoze, Školska knjiga, Zagreb.
 34. Parlov, D., Stastny, K., Vragolović, A., Tomičić, B. (1992.): Gospodarska svojstva komercijalnih selekcija hibridnog kukuruza instituta Zagreb, Glasilo Hrvatskog agronomskog društva, 54 (6), pp. 387 – 399.
 35. Pepeljnjak, S. (2005.), Toksinogene plijesni i mikotoksini u žitaricama i krmivima. Zbornik radova XII međunarodno savjetovanje «Krmiva 2005», str. 80-91.

36. Pepeljnjak, S., Cvetnić, Z., Šegvić Klarić, M. (2008.), Okratoksin A i Zearalenon: kontaminacija žitarica i krmiva u Hrvatskoj (1997. – 2007.) i utjecaj na zdravlje životinja i ljudi. Krmiva: Časopis o hranidbi životinja, proizvodnji i tehnologiji krme, 50 (3), pp. 147 – 159.
37. Peraica, M., Rašić, D. (2012.), Akutne i kronične mikotoksikoze u ljudi, Krmiva: Časopis o hranidbi životinja, proizvodnji i tehnologiji krme, 54 (3), pp. 81 – 87.
38. Pleadin, J., Lešić, T., Kmetič, I., Markov, K., Zadravec, M., Frece, J., Kiš, M., Šarkanj, B. (2020.), Toksični učinci mikotoksina: Mehanizam djelovanja i mikotoksikoze, Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam, 15 (1 -2), pp. 3 – 10.
39. Pleadin, J., Zadravec, M., Lešić, T., Frece, J., Vasilj, V., Markov, K. (2020.), Klimatske promjene – potencijalna prijetnja još znatnijoj pojavnosti mikotoksina, Veterinarska stanica, 51 (6), pp. 659 – 671.
40. Pospišil, A. (2010.), Ratarstvo I. dio, Čakovec, Zrinski d.d.
41. Samson, R. A., Houbraken, J., Thrane, U., Frisvad, J.C., Andersen, B. (2019.), Food and Indoor Frungi Second edition, Utrecht, Nizozemska, Westerdijk Fungal Biodiversity Institute.
42. Sever, Z., Kos, T., Miličević, T., Bažok, R. (2014.): Western Corn Rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte) as potential vector of phytopathogenic fungi on maize. Zbornik radova 49. hrvatskog i 9. međunarodnog simpozija agronoma (ur. Sonja Marić, Zdenko Lončarić), Dubrovnik, pp. 416-419.
43. Spencer J. L., Hibbard B. E., Moeser, J., Onstad D. W. (2009.), Behaviour and ecology of the western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* Le Conte), Agriculture and Forest Entomology: 11, 9 – 27.
44. Šegvić Klarić, M., Cvetnić, Z., Pepeljnjak, S., Kosalec, I. (2009.), Određivanje aflatoksina, okratoksina A, fumonizini i zearalenona u žitaricama i krmiva primjenom kompetitivnoga direktnog imunoenzimatskog testa (CD – ELISA) i tankoslojne kromatografije (TLC), Arhiv za higijenu rada i toksikologiju, 60 (4), pp. 427 – 433.
45. Thathana, M. G., Murage, H., King Abia, A. L., Pillay, M. (2017.), Morphological Characterization and Determination of Aflatoxin-Production Potentials of *Aspergillus flavus* Isolated from Maize and Soil in Kenya, Agriculture, 7 (10), 80.

46. Varga, I., Solumun Kolanović, B., Varenina, I., Božić Luburić, Đ., Bilandžić, N. (2020.), Kontaminacija mliječnih proizvoda aflatoksinom M1, Veterinarska stanica, 51 (5), pp. 547 – 556.
47. Vitasović Kosić, I., Britvec, M., Ljubičić, I. (2006.), Trave (*Poaceae*) na livadama i pašnjacima obiteljskih gospodarstava u Istri, Sjemenarstvo, 23 (4), pp. 391 – 398.
48. Zrakić, M., Hadelan, L., Prišenk, J., Levak, V., Grgić, I. (2017.), Tendencije proizvodnje kukuruza u svijetu, Hrvatskoj i Sloveniji, Glasnik zaštite bilja, 40 (6), pp. 78 – 85.