

# Utjecaj biotičkog stresa uzrokovanog rodom *Fusarium* spp. na genotip pšenice (*Triticum aestivum* L.) osjetljiv na fuzarijsku palež klasa pšenice

---

Alivojvodić, Sara

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:109:422360>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-30**

REPOZITORIJ

PTFS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar  
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Sara Alivojvodić

UTJECAJ BIOTIČKOG STRESA UZROKOVANOG RODOM *Fusarium spp.*  
NA GENOTIP PŠENICE (*TRITICUM AESTIVUM* L.) OSJETLJIV NA  
FUZARIJSKU PALEŽ KLASA PŠENICE

DIPLOMSKI RAD

Osijek, listopad, 2017.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek  
Zavod za ispitivanje hrane i prehrane  
Katedra za biologiju i mikrobiologiju  
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

**Diplomski sveučilišni studij Prehrambeno inženjerstvo****Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija**Nastavni predmet:** Biologija**Tema rada** je prihvaćena na III. izvanrednoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2016./2017. održanoj 3. srpnja 2017. godine.**Mentor:** doc. dr. sc. *Tihana Marček***Komentor:** dr. sc. *Valentina Španić*, znan. savj.**Utjecaj biotičkog stresa uzrokovanog rodom *Fusarium spp.* na genotip pšenice (*Triticum aestivum* L.) osjetljiv na fuzarijsku palež klasa pšenice***Sara Alivojvodić, 402/DI***Sažetak:**

Fuzarijska palež klasa (FHB) je ozbiljna bolest pšenice (*Triticum aestivum* L.) koja uzrokuje smanjenje prinosa i kvalitete zrna, a uzrokuju je plijesni roda *Fusarium* spp. Plijesni proizvode mikotoksine koji mogu biti štetni za ljude i životinje. Na infekciju biljke odgovaraju povećanom aktivnošću enzimatskog i neenzimatskog antioksidacijskog obrambenog sustava. Cilj ovoga rada bio je istražiti utjecaj roda *Fusarium* spp. na genotip ozime pšenice osjetljiv na FHB („Super Žitarka“) prateći aktivnost antioksidacijskih enzima, stupanj lipidne peroksidacije, koncentraciju vodikovog peroksida ( $H_2O_2$ ) te ukupnu koncentraciju proteina nakon 2, 4, 7 i 14 dana tretmana *Fusariumom*. Tijekom cvjetanja uzorci su bili umjetno zaraženi suspenzijom spora *Fusarium* spp. i ostavljeni u uvjetima *in vivo*. U svim točkama uzorkovanja aktivnost askorbat peroksidaze (APX) i katalaze (CAT), kao i sadržaj proteina nisu pokazali značajne promjene nakon infekcije. Najveća aktivnost gvajakol peroksidaze (POD) bila je nakon 7 dana tretmana što upućuje da POD ima određenu ulogu u obrambenom odgovoru. Aktivnost polifenol oksidaze (PPO) pokazala je porast nakon 14 dana tretmana, što govori o kasnijem uključivanju PPO u odgovor na infekciju. Kasniji uključivanje antioksidativnih enzima u odgovor na *Fusarium* spp. karakterizira „Super Žitarku“ kao genotip osjetljiv na FHB. Ovo istraživanje napravljeno je u sklopu projekta financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost broj projekta: HRZZ-UIP-2014-9188.

**Ključne riječi:** *Fusarium spp.*, Super Žitarka, antioksidativni enzimi, lipidna peroksidacija, koncentracija vodikovog peroksida**Rad sadrži:** 40 stranica  
15 slika  
2 tablica  
52 literaturnih referenci**Jezik izvornika:** hrvatski**Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:**

- |  |               |
|--|---------------|
| 1. izv. prof. dr. sc. Natalija Velić     | predsjednik   |
| 2. doc. dr. sc. Tihana Marček            | član-mentor   |
| 3. dr. sc. Valentina Španić, znan. savj. | član-komentor |
| 4. doc. dr. sc. Kristina Mastanjević     | zamjena člana |

**Datum obrane:** 31. listopada 2017.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek  
Faculty of Food Technology Osijek  
Department of Food and Nutrition Analysis  
Subdepartment of Biology and Microbiology  
FranjeKuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

### Graduate program Food engineering

**Scientific area:** Biotechnical sciences

**Scientific field:** Food technology

**Course title:** Biology

**Thesis subject** was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. 3 held on July 3, 2017.

**Mentor:** *Tihana Marček*, PhD, assistant prof.

**Comentor:** *Valentina Španić*, PhD, scientific advisor

### Influence of biotic stress caused by genus *Fusarium spp.* on FHB sensitive wheat (*Triticum aestivum L.*) genotype

*Sara Alivojvodić, 402/DI*

#### Summary:

*Fusarium* head blight (FHB) caused by fungi *Fusarium spp.*, is a serious wheat (*Triticum aestivum L.*) disease that can reduce yield and quality of the grain. Fungi produces mycotoxins that can be harmful to humans and animals. As a result of infection, plants activate an antioxidative enzymatic and nonenzymatic defence systems. The aim of this work was to investigate the effect of *Fusarium spp.* in FHB susceptible genotype („Super Žitarka“) by measuring the activity of antioxidative enzymes, level of lipid peroxidation, hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) concentration and protein content after 2, 4, 7 and 14 days of treatment. During the flowering stage, ears were inoculated by the spore suspension of *Fusarium spp.* and left under *in vivo* conditions. In all sampling points the catalase (CAT) and ascorbat peroxidise (APX) activity and protein content did not show showed significantly changes after *Fusarium* attack. The highest guaiacol peroxidise (POD) activity was noticed after 7 days of treatment indicating that POD had a role in defence response. On the other hand, polyphenol oxidase (PPO) activity showed induction after 14 days of treatment suggesting that PPO is included in delay response to *Fusarium* stress. The later involvement of antioxidative enzyme in stress response caused by *Fusarium* characterised „Super Žitarka“ as FHB sensitive genotype. This research was carried out as part of a project funded by the Croatian Science Foundation project number: grant number HRZZ-UIP-2014-9188.

**Key words:** *Fusarium spp.*, wheat genotype, antioxidative enzymes, lipid peroxidation, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>concentration

**Thesis contains:** 40 pages  
15 figures  
2 tables  
52 references

**Original in:** Croatian

#### Defense committee:

- |   |               |
|---|---------------|
| 1. <i>Natalija Velić</i> , PhD, associate prof.       | chair person  |
| 2. <i>Tihana Marček</i> , PhD, assistant prof.        | supervisor    |
| 3. <i>Valentina Španić</i> , PhD, scientific advisor  | co-supervisor |
| 4. <i>Kristina Mastanjević</i> , PhD, assistant prof. | stand-in      |

**Defense date:** October 31, 2017.

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of the Faculty of Food Technology Osijek, FranjeKuhača 20, Osijek.

## Sadržaj

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	3
2.1. MORFOLOŠKA SVOJSTVA PŠENICE .....	4
2.2. <i>Fusarium</i> spp.....	7
2.3. FUZARIJSKA PALEŽ KLASA .....	9
2.4. BIOTIČKI STRESNI ČIMBENICI.....	11
2.5. REAKTIVNE KISIKOVE ČESTICE .....	11
2.6. LIPIDNA PEROKSIDACIJA.....	12
2.7. OBRAMBENI MEHANIZMI BILJKE .....	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	15
3.1. ZADATAK.....	16
3.2. MATERIJALI I METODE .....	16
3.2.2. Poljski pokusi.....	17
3.2.3. Uzorkovanje tkiva .....	17
3.2.4. Ekstrakcija tkiva za određivanje aktivnosti antioksidacijskih enzima .....	17
3.2.5. Određivanje aktivnosti gvajakol peroksidaze (POD).....	17
3.2.6. Određivanje aktivnosti askorbat peroksidaze (APX).....	18
3.2.7. Određivanje aktivnosti katalaze (CAT).....	19
3.2.8. Određivanje aktivnosti polifenol oksidaze (PPO) .....	19
3.2.9. Određivanje koncentracije proteina po Bradfordu (1976) .....	20
3.3. EKSTRAKCIJA TKIVA ZA ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE VODIKOVOG PEROKSIDA (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) I SADRŽAJA MALONDIALDEHIDA (MDA) .....	21
3.4. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	21
3.5. ODREĐIVANJE SADRŽAJA MDA.....	22
3.6. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA .....	22
4. REZULTATI.....	23
4.1. AKTIVNOST ANTIOKSIDACIJSKIH ENZIMA I KONCENTRACIJA TOPIVIH PROTEINA .....	24
4.1.1. Aktivnost gvajakol peroksidaze (POD).....	24
4.1.2. Aktivnost askorbat peroksidaze (APX).....	25
4.1.3. Aktivnost katalaze (CAT).....	26
4.1.4. Aktivnost polifenol oksidaze (PPO) .....	27
4.1.5. Koncentracija ukupnih proteina .....	28
4.2. KONCENTRACIJA VODIKOVOG PEROKSIDA (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .....	29
4.3. SADRŽAJ MALONDIALDEHIDA (MDA) .....	30
5. RASPRAVA.....	31
6. ZAKLJUČAK.....	34
7. LITERATURA .....	36

## Popis oznaka, kratica i simbola

FHB	Fuzarijska palež klasa
DON	Deoksinivalenol
ZEA	Zearlenon
ROS	Reaktivne kisikove čestice
CAT	Katalaza
POD	Peroksidaza
APX	Askorbat peroksidaza
SOD	Superoksid dismutaza
GR	Glutation reduktaza
PPO	Polifenol oksidaza
EDTA	Etilendiamintetraoctena kiselina
PVP	Polivinilpirolidon
TCA	Trikloroctena kiselina
TBA	Tiobarbiturna kiselina
BSA	Albumin goveđi serum
MDA	Malondialdehid



## **1.UVOD**



Pored riže i kukuruza, pšenica (*Triticum aestivum* L.) je jedna od najvažnijih poljoprivrednih kultura u svijetu za proizvodnju hrane (Španić, 2016). Koristi se u mlinarstvu, prehrambenoj i farmaceutskoj industriji te predstavlja osnovu ljudske prehrane. S obzirom na važnost pšenice u ljudskoj prehrani provode se različita istraživanja kojima je cilj povećanje prinosa te poboljšanje kvalitete same pšenice, ali i njezinih proizvoda. Posebnu pozornost privlače različite bolesti pšenice kao najčešći uzročnik umanjenih prinosa i lošije kvalitete zrna, te su u novije vrijeme istraživanja često usmjerena na bolje upoznavanje same bolesti, odgovor biljke na infekciju, te načine zaštite usjeva.

Fuzarijska palež klasa (*Fusarium head blight*, FHB) je gljivično oboljenje strnih žitarica i smatra se jednom od najopasnijih bolesti pšenice. Najčešći uzročnik FHB je *Fusarium graminearum*. Ova bolest uzrokuje značajno smanjenje prinosa i kvalitete zrna, ali i nepovoljno utječe na zdravlje ljudi i životinja zbog proizvodnje mikotoksina. FHB sve više privlači pozornost znanstvenika jer se uslijed sve izraženijih globalnih klimatskih promjena, infekcija ovom gljivicom sve više širi uzrokujući velik pad u prinosima pšenice diljem svijeta. Najveći utjecaj na širenje infekcije imaju sve više temperature kao i povećanje vlage koji predstavljaju optimalne uvjete za njezin rast i razvoj (Duraković, 2006).

Zbog svega navedenog neophodno je razumjeti obrambene mehanizme biljke kao mjeru prevencije zarazom od vrsta roda *Fusarium*. Cilj ovog istraživanja je temeljem fiziološkog i biokemijskog odgovora biljke provjeriti reakciju obrambenog mehanizma genotipa pšenice osjetljivog na FHB, odnosno raniju i/ili kasniju uključenost antioksidativnost sustava u uvjetima biotičkog stresa uzrokovanog vrstama roda *Fusarium*. Rezultati istraživanja mogli bi pomoći oplemenjivačima pšenice u bržem probiru genotipova otpornih na FHB i razvoju mjera zaštite u borbi protiv ove bolesti.

## **2. TEORIJSKI DIO**

## 2.1. MORFOLOŠKA SVOJSTVA PŠENICE

Pšenica je biljka koja je prema sistematskoj klasifikaciji svrstana u porodicu *Poaceae*, rod *Triticum* L., subtribus *Triticinae*, tribus *Triticea* Dumort (Španić, 2016). Pšenicu možemo podijeliti na ozimu i jaru, pri čemu ozima pšenica zauzima veće površine, te daje veći i stabilniji prinos od jare. Ozima pšenica se sije u jesen, otpornija je na niske temperature, ima dužu vegetaciju i duži stadij jarovizacije, te jače busa od jare pšenice, dok je jara pšenica otpornija na visoke temperature i sušu i daje kvalitetnije zrno i brašno od ozime.

Osnovni dijelovi pšenice su korijen, stabljika, list, cvijet i cvat i plod (Španić, 2016).

Korijen pšenice sastoji se iz primarnog i sekundarnog korjenova sustava. Primarni korjenov sustav čine glavni klicin korijen i bočni klicini korjenčići koji se razvijaju početkom klijanja, dok korjenčići sekundarnog korjenovog sustava izlaze iz čvora busanja koji se nalazi iznad primarnog korjenova sustava tokom ranog razvoja. Na razvoj korijena utječe struktura i vlažnost tla, temperatura tla i zraka, kemijska svojstva tla te ostali okolišni uvjeti (Španić, 2016).

Primarni korjenov sustav raste okomito u tlo i glavni mu je zadatak opskrba biljke vodom, dok sekundarni sustav nastaje u fazi busanja dvadesetak dana nakon nicanja, a njegov razvoj je uvjetovan povećanom temperaturom i vlažnosti tla na dubini čvora busanja (Mađarić, 1985).

Stabljika pšenice je gola i glatka, iznutra šuplja, a izgrađena je od četiri do pet članaka ili međukoljenaca između kojih se nalaze koljenca. Razvija se tokom busanja gdje se stabljika podzemno grana iz čvora busanja, nakon čega slijedi vlatanje odnosno izduživanje stabljike koje završava u klasanju. Površina stabljike prekrivena je jednoslojnom epidermom, na čijoj se površini nalaze puči, a ispod epiderme se nalazi primarna kora s mehaničkim tkivom. U unutrašnjosti stabljike nalazi se središnji cilindar u kojem se nalazi osnovno (parenhimsko) tkivo i provodno tkivo (provodni snopići - ksilem i floem). S obzirom da je pšenica biljka koja busa (stvara vlati), broj vlati ovisi o sorti, datumu i normi sjetve te ishrani i primjeni regulatora rasta (Španić, 2016).

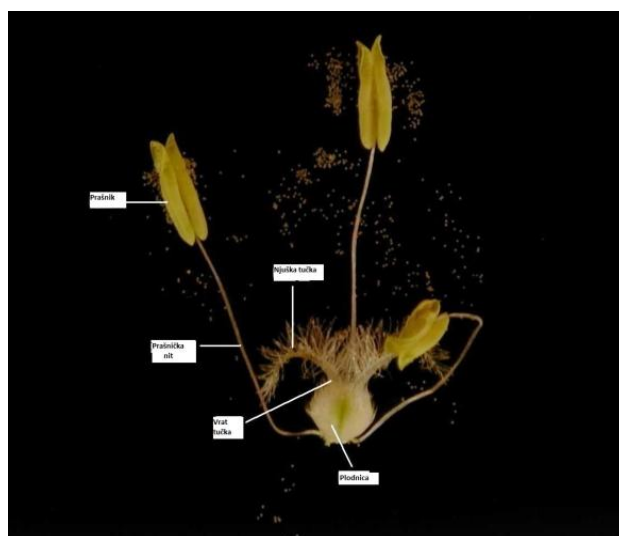
List pšenice se sastoji od lisne plojke, rukavca, uški i jezička. Središnja lisna žila dijeli list na dva jednaka dijela, a svaki dio sadrži niz paralelno postavljenih lisnih žila koja čine lisnu nervaturu. Rukavac je dio lista koji je donjim dijelom priljubljen uz stabljiku, a jezičak je tanki, bezbojni dio tkiva koji obavija stabljiku. Sorte pšenice se mogu razlikovati po veličini, obliku i boji jezičaka i uški.

Promatrajući anatomsku građu lista pšenice, na listu razlikujemo gornju i donju epidermu između kojih se nalazi mezofil s mehaničkim i provodnim tkivom. Na gornjoj epidermi se

nalaze velike, mjehuraste stanice osjetljive na promjenu turgora koje se u uvjetima visokih temperatura i nedostatka vode skupe, a posljedica toga je uvijanje lista u smjeru naličja. Na površini epiderme se nalaze puči preko kojih se vrši izmjena plinova (ugljični dioksid i kisik) i vode (transpiracija), a površinu epiderme prekriva epikutikularni vosak koji štiti list od pretjeranog gubitka vode transpiracijom, te predstavlja barijeru virusima, bakterijama i sporama gljiva.

Važno je održavati zdravlje lista zastavičara i drugog gornjeg lista jer imaju najznačajniju ulogu u formiranju prinosa (Španić, 2016).

Cvat pšenice naziva se sastavljeni klas koji se sastoji od klasnog vretena koje je podijeljeno na nodije i internodije, a na svakom nodiju se nalazi klasić u kojem može biti dva do pet cvjetova. Cvijet sadrži tri prašnika, perastu njušku i plodnicu u kojoj se nakon oplodnje razvija zрно (**Slika 1**). Klasići su sa vanjske strane zaštićeni s dvije vanjske pljeve, donja pljevica (obuvenca) i gornja pljevica (košuljica), a između obuvenca i plodnice tučka nalaze se dvije pljevičice. Te pljevičice tijekom cvjetanja primaju vodu te bubrenjem pritiskuju pljevice i uzrokuju otvaranje cvijeta (Španić, 2016).



**Slika 1** Građa muškog i ženskog dijela cvijeta pšenice (Španić, 2016)

Pšenica je samooplodna biljka, a do oplodnje dolazi oprašivanjem, odnosno nakon što zrelo peludno zrnce dospije na njušku tučka. Oplodnja započinje u cvjetovima središnjih klasića, koji najčešće i prvi cvjetaju. Za uspješno oprašivanje i oplodnju potrebna je optimalna dnevna temperatura od 20-25°C, noćne temperature oko 11°C te relativna vlažnost zraka oko 70%. Nakon cvjetanja i oplodnje i započinje oblikovanje zrna koje se odvija kroz četiri faze: mliječnu zriobu, tjestasto stanje, voštanu i punu zriobu (Španić, 2016).

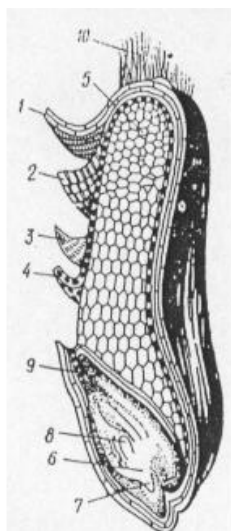
Plod pšenice naziva se pšeno koje izvana obavija sjemena lupina, a u unutrašnjosti se nalaze endosperm i klica koji su bogati hranjivim tvarima. Kod većine sorti sjemena lupina čini 14% ploda, endosperm 83%, a klica 3%.

Sjemena lupina štiti plod od mehaničkih oštećenja i vanjskih utjecaja te opskrbljuje sjeme vodom tokom bubrenja i klijanja (Španić, 2016).

Endosperm je izgrađen od vanjskog aleuronskog sloja i unutrašnjeg endosperma. Aleuronski sloj je ispunjen aleuronskim zrcima i predstavlja spremište zaliha bjelančevina za razliku od ostatka endosperma koji sadrži škrob. Unutrašnji dio endosperma predstavlja brašnasto tkivo čija je glavna zaliha škrob koji se pojavljuje u obliku zrnaca različite veličine (**Slika 2**). Krupna zrna škroba daju caklavost sjemena i visokokvalitetno brašno, dok sitna zrnca daju sjeme brašnog tipa. Caklave pšenice sadrže više bjelančevina nego brašnaste.

Iz endosperma se prilikom mljevenja dobije pšenično brašno. Mljevenjem pšeničnog zrna endosperm se odvaja od ljuske, te se mljevenjem ljuske dobiju posije, a mljevenjem endosperma pšenično brašno. O kakvoći pšenice ovisi i kakvoća pšeničnoga brašna. Kakvoća pšenice se ogleda kroz tri kriterija: botanički (ozima ili jara), fizikalni (hektolitarska masa, veličina, tvrdoća zrna, primjese itd.) te kemijski (udio vlage, proteina, mineralnih tvari, itd.). Kod kvalitete brašna bitna su i reološka svojstva koja se određuju putem ekstenzografa i farinografa. Farinografom se određuje upijanje vode, razvoj, stabilnost, rezistenciju i mekšanje tijesta, a ekstezografom energija, otpor, rastezljivost i maksimalni otpor tijesta. Pomoću podataka s farinografa se određuju broj i kvaliteta brašna (Španić, 2016). Mljevenjem pšeničnog zrna dobije se brašno različitih tipova ovisno o postotku izbrašnjavanja koji je definiran kao odnos između udjela brašna određene kakvoće i upotrebene pšenice. Brašno se sastoji u najvećoj mjeri od škroba, no sadrži i proteine, lipide, celulozu, pentozane, vodu, mineralne tvari, vitamine i enzime (Sabol, 2012).

Klica predstavlja najmanji dio sjemena i po svom kemijskom sastavu klica se znatno razlikuje od ostatka zrna. Klica se ističe visokim udjelom bjelančevina, šećera i masti te vitamina i minerala, dok škroba u klici nema (Mađarić, 1985).



**Slika 2** Prikaz uzdužnog presjeka zrna pšenice 1-3 Omotač ploda i sjemena, 4. Aleuronski sloj, 5. Endosperm, 6. Klica, 7. Začetak korijenčića, 8. Pupoljak, 9. Štitić, 10. Brazdica (Španić, 2016)

## 2.2. *Fusarium* spp.

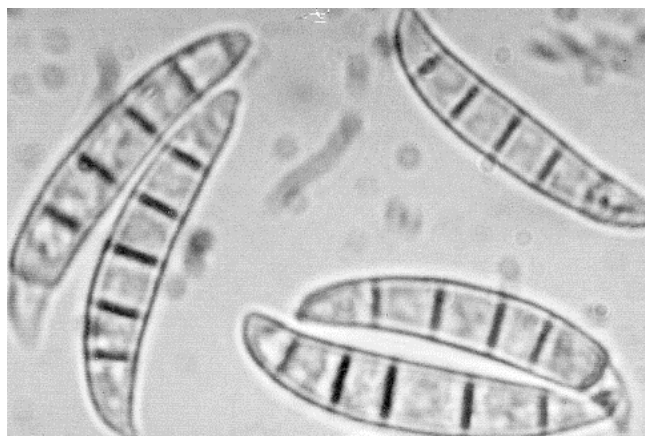
Vrste roda *Fusarium* su plijesni koje se obzirom na sistematsku pripadnost svrstavaju u carstvo Fungi. Gljive ili fungi su eukariotski organizmi s jasno određeno jezgrinom membranom, kemoheterotrofi, stanična stijenka im je građena od hitina, a razmnožavaju se pomoću spora. Gljive, za razliku od bakterija, rastu pri nižim pH vrijednostima, na tvarima s vrlo malim udjelom vode, u okolišu s velikom koncentracijom šećera ili soli, trebaju manje dušika za rast, te mogu iskorištavati složene ugljikohidrate. Njihove su pojedinačne stanice promjera od 1 do 30  $\mu\text{m}$ , pa tako u mikroskopske gljive spadaju kvasci i plijesni, a obuhvaćaju i makroskopske organizme nazvane mesnatim gljivama.

Plijesni su građene od hifa, cjevastih, bezbojnih stanica bez klorofila, koje su nitaste građe. Hife rastu kao isprepletena masa te čine micelij koji se rasprostire po podlozi i daje pahuljast ili paučinast izgled kolonijama plijesni. Veći broj hifa je vegetativan, aktivno raste i oblikuje tijelo, dok manji dio nazvan zračne hife nosi strukture za razmnožavanje na čijim krajevima nastaju spore. Spore se proizvode u velikom broju, lagano se šire te su mnoge otporne na nepovoljne okolišne uvjete. Plijesni mogu stvoriti i spolne i nespodne spore. Nespodne spore nastaju procesom dijeljenja stanice prilikom čega mogu nastati različite vrste spora (konidije, sporangije, klamidospore itd.), dok kod nekih gljiva spore mogu nastati pupanjem pa ih tada nazivamo blastospore. Nespodne spore se uglavnom šire zrakom dok spolne spore nastaju oplodnjom odnosno spajanjem dvije haploidne jezgre u oblik diploidne jezgre pri čemu nastaje zigota, no gljive tvore spolne spore najčešće u posebnim okolnostima. Primjerice

vrste roda *Ascomycetes* proizvode askospore samo kada su biljke domaćini u završnoj fazi razvoja. Plijesni se mogu razmnožavati i vegetativno, pomoću hifa, kada hife jednolično i neprekidno rastu, tvoreći nove kolonije (Duraković, 1996).

Plijesni proizvode mikotoksine koji su toksični za ljude i životinje, a u organizam mogu dospjeti putem hrane, udisanjem ili preko kože. Tijekom apsorpcije hranjivih tvari iz domaćina plijesni razgrađuju složene sastojke hranjive mase u jednostavne ispuštanjem enzima, pri čemu se probavljeni nutrijenti koriste za stvaranje primarnih i sekundarnih metabolita. Primarni metaboliti sadrže sastojke koje se koriste za rast i reprodukciju plijesni, dok se sekundarni metaboliti ili mikotoksini koriste za obranu od drugih mikroorganizama (Katalenić, 2004). Mikotoksini su stabilni spojevi, različite strukture i biološkog učinka, najčešće bez boje i mirisa, otporni na povišene temperature, a njihova pojava ovisi o više čimbenika - vrsta plijesni, kemijski sastav, temperatura (od - 5 do 60 °C), vlažnosti namirnice (iznad 13%), koncentraciji plinova u atmosferi, itd. Mikotoksikoze (bolesti uzrokovane mikotoksinima) mogu biti akutne i kronične, pri čemu akutne nastaju jednokratnim unosom namirnice s viskom koncentracijom mikotoksina, dok kronične nastaju dugotrajnim unošenjem namirnica s umjerenom ili niskom koncentracijom mikotoksina. Akutne mikotoksikoze su povezane sa unutarnjim krvarenjem, oštećenjem bubrega i drugih unutarnjih organa, dok se kronične povezuju s nastankom malignih oboljenja (Klapec i sur., 2017).

Identifikacija *Fusarium* vrsta može se provesti na osnovu primarnih i sekundarnih karakteristika. Primarne karakteristike uključuju oblik makrokonidija (**Slika 3**) koje su kratke, zdepaste, debelih stijenki te zaobljene površine s prednje i stražnje strane, dok sekundarne uključuju prisutnost klamidospora koje se stvaraju brzo i u izobilju, kao jedinke ili u lancima. *F. culmorum* producira nespolne spore (konidije) koje se vjetrom ili kišom šire na žitarice u cvatnji, a širenju kontaminacije pogoduju vlažni, kišni periodi te temperature iznad 25 °C (Habschied, 2015).



**Slika 3** Izgled makrokonidija pod mikroskopom, uvećano x500 (Habschied, 2015)

Rod *Fusarium* obuhvaća različite vrste koje se pojavljuju na žitaricama i čiji se simptomi mogu pojaviti na korijenu, stabljici i klasu. Najviše zastupljene vrste koje se pojavljuju na žitaricama su *F. graminearum*, *F. culmorum* i *F. avenaceum*, dok u manje zastupljene ubrajamo *F. poae*, *F. cerealis*, *F. tricinctum* i dr. *F. graminearum* je češći u vlažnijim i toplijim područjima, a *F. culmorum* i *F. avenaceum* su češći u hladnijim područjima (Španić, 2010).

Toksini vrsta roda *Fusarium* stvaraju se na usjevima prije žetve, ali i u silosima tokom skladištenja ukoliko postoje optimalni uvjeti za razvoj. Nastajanje toksina pogoduje vruće i suho vrijeme, uz periode visoke vlage te aktivnost kukaca koji oštećuju biljke. Toksini nastali vrstama roda *Fusarium* uključuju fuminozine, deoksinivalenol (DON), te zearalenon (ZEA) koje uglavnom sintetiziraju vrste *F. graminearum* i *F. culmorum* (Katalenić, 2004). Fuminozini su kancerogeni, kod životinja djeluju na smanjenje imuniteta, a povezuju se i s nastankom plućnog edema kod svinja. DON je inhibitor sinteze proteina, te može uzrokovati povraćanje zbog čega je dobio naziv vomitoksin. ZEA je estrogenski mikotoksin koji uzrokuje promjene na reproduktivnom sustavu životinja (smanjena plodnost, atrofija testisa, povećanje mliječnih žlijezda), a pronađeni su i teratogeni efekti kod svinja i ovaca (Surai i sur., 2008). Većina zemalja odredila je maksimalne dopuštene granice za sadržaj određenih mikotoksina kako bi zaštitile potrošače. Prema Pravilniku o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani (MZ, 2012) u Hrvatskoj je maksimalna dopuštena količina DON-a u kruhu 500 µg/kg, a ZEA 50 µg/kg .

### 2.3. FUZARIJSKA PALEŽ KLASA

Fuzarijska palež klasa je gljivična bolest strnih žitarica i smatra se jednom od najštetnijih bolesti pšenice u cijelom svijetu. FHB uzrokuje smanjenje prinosa pšenice, nepovoljno utječe na kvalitetu zrna, ali i na zdravlje ljudi i životinja jer različite *Fusarium* vrste proizvode mikotoksine (Španić, 2010).

Optimalan period za infekciju je vrijeme klasanja, ali zaraza je moguća od cvjetanja pa sve do kraja vegetacije. Uvjeti koja najviše doprinose širenju zaraze su visoka vlaga (iznad 85%) i visoka temperatura (iznad 22 °C) u cvjetanju i neposredno nakon njega. Također, značajan čimbenik predstavlja i uzak plodored u kojem se izmjenjuju kukuruz i pšenica jer se patogen može održati na tlu te zaraziti čitavu vegetaciju. Zbog toga se preporučuje izmjena pšenice i kulture koja ne pripada skupini žitarica ili zaoravanje žetvenih ostataka u cilju smanjenja mogućnosti zaraze. Osim navedenih čimbenika, na razvoj bolesti mogu utjecati i korovi i osjetljivost sorata, te agresivnost i patogenost uzročnika bolesti, a širenju unutar usjeva pomažu vjetar i kukci koji prenose konidije na susjedne klasove (Ćosić i sur., 2013).



Zaraženi mogu biti pojedini klasići, dio klasa ili cijeli klas. Simptomi bolesti se primjećuju u mliječnoj zriobi kada su, za razliku od zdravih klasova, zaraženi klasovi žute boje i uspravni te se mogu formirati narančaste ili žute sporodohije (**Slika 4**). Zaražena zrna su sitna, smežurana, sive boje s ružičastim prevlakama, te imaju bezbojnu i brašnjavu unutrašnjost (**Slika 5**) (Ćosić i sur., 2013).

Posljedica zaraze je smanjenje veličine, mase i oblika zrna, smanjenje klijavosti sjemena te manje nakupljanje proteina, celuloze i amiloze. Kod zaraženih klasova masa 1000 zrna može biti manja i do 55%, a klijavost zrna između 54 i 67% (Ćosić i sur., 2006). FHB uzrokuje velike ekonomske gubitke što potvrđuje i podatak da su Sjedinjene Američke države tokom 1990-ih izgubile oko 3 milijarde dolara uslijed zaraze s FHB, a Kanada 220 milijuna dolara (Windels, 2000).



**Slika 4** Fuzarijska palež klasa [preuzeto sa stranica: <http://agronomija.rs/2013/fuzarioze-fusarium-spp-fusarium-graminearum/>(2017)]



**Slika 5** Zrna pšenice zaražena vrstom *Fusarium graminearum* (Ćosić i sur., 2013)

Na otpornost pšenice na FHB utječe velik broj čimbenika, od karakteristika klasića pa do obrambenih reakcija domaćina, a svaki od tih čimbenika je podložan utjecaju okolnih uvjeta, čime je otežano istraživanje otpornosti. Otpornost na FHB je horizontalnog tipa što znači da ako je genotip pšenice otporan na jednu vrstu roda *Fusarium*, primjerice *F. graminearum*, biti će otporan i na drugu vrstu, primjerice *F. culmorum* (Španić, 2010).

### 2.4. BIOTIČKI STRESNI ČIMBENICI

Stres se prema različitim autorima može različito definirati. Buchanan i sur. (2000) definiraju stres kao vanjske uvjete koji negativno utječu na rast, razvoj i proizvodnju. Prema Smithu i sur. (2010) možemo ga definirati kao stresni okoliš, a prema Vukadinoviću i sur. (2014) može se definirati kao svako stanje biološkog sustava koje odstupa od optimuma, ali i kao djelovanje bilo kojeg čimbenika koji nepovoljno utječe na rast i razvoj biljke.

Biljke se mogu prilagoditi uvjetima stresa pri čemu razlikujemo dva procesa: aklimatizaciju i adaptaciju. Aklimatizacija je jačanje otpornosti na stres nakon kraćeg izlaganja, a adaptacija podrazumijeva genetski određen stupanj otpornosti na stres (Vukadinović i sur., 2014).

Stresni čimbenici mogu biti abiotički i biotički. Abiotički stresni čimbenici su UV-B zračenje, suša, salinitet, iznad prosječno visoke i niske temperature, teški metali i dr., te se smatra da su odgovorni za gubitke usjeva diljem svijeta, pri čemu se ukupni prinos može smanjiti i do 50% (Jensen i Potters, 2017). U biotičke stresne čimbenike ubrajamo viruse, gljivice, bakterije, kukce te alelopatiju. Alelopatija se odnosi na direktnu ili indirektnu štetu jedne biljke na rast i razvoj druge biljke, tijekom proizvodnje i otpuštanja kemikalija u okoliš (Redondo-Gomez, 2013).

### 2.5. REAKTIVNE KISIKOVE ČESTICE

Stres, biotički ili abiotički, uzrokuje povećanu produkciju reaktivnih kisikovih čestica (ROS) koje uzrokuju oštećenje staničnih membrana i nukleinskih kiselina, denaturaciju proteina te inhibiciju fotosinteze.

Slobodni radikali su atomi ili molekule koje u vanjskoj ljusci sadrže jedan ili više nesparenih elektrona visoko reaktivnim. Slobodni radikali mogu nastati ili primanjem jednog elektrona ili oduzimanjem jednog elektrona atomu, te homolitičkom disocijacijom kovalentne veze, pri čemu svakom atomu ostaje jedan nespareni elektron u vanjskoj ljusci (Halliwell i Gutterdige, 2015).

ROS su visoko reaktivne kisikove čestice koje uključuju i slobodne radikale i neradikalne molekule. Slobodni radikali su superoksid radikal ( $O_2^{\cdot-}$ ) i hidroksilni radikal ( $OH^{\cdot}$ ), a neradikalne molekule su singletni kisik ( $^1O_2$ ) i vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ). U normalnim uvjetima ROS nastaju u manjim količinama kao nusproizvodi raznih metaboličkih putova, dok u uvjetima stresa može doći do njihove prekomjerne proizvodnje (Corpasa i sur., 2015). ROS nastaju u mitohondrijima, peroksisomima i kloroplastima u endoplazmatskom retikulumu, u apoplastu te na plazmatskoj membrani tijekom različitih metaboličkih i fizioloških reakcija kao što su fotorespiracija, disanje i fotosinteza (Kar, 2015).

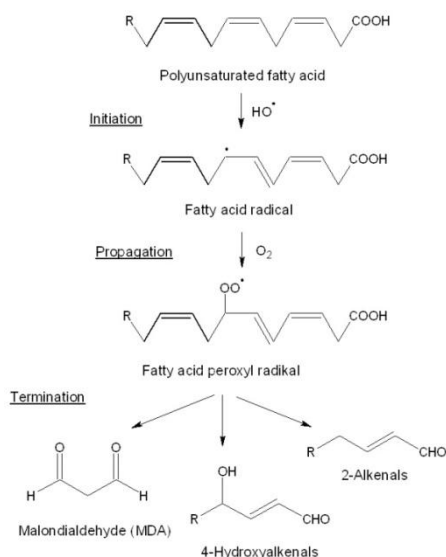
Prilikom infekcije biljke patogenom dolazi do prekomjernog nakupljanja ROS što nazivamo oksidativnom eksplozijom čija je primarna funkcija zaštititi biljku od širenja infekcije.  $H_2O_2$  nastao oksidativnom eksplozijom ima bitnu ulogu kao signalna molekula u zaštiti biljke izazivajući lokalizirani hipersenzitivni odgovor koji uključuje smrt promijenjenih stanica i aktiviranje zaštitnika stanice (Levine i sur., 1994).

### 2.6. LIPIDNA PEROKSIDACIJA

Lipidi su jedna od glavnih komponenti bioloških membrana koje su izgrađene od fosfolipidnog dvosloja u kojeg su inkorporirani strukturni proteini. Biološke membrane su visoko selektivno polupropusne barijere koje kontroliraju ulazak i izlazak molekula u stanicu odnosno stanični organel. Pojam 'bioloških membrana' označava stanične membrane ili membrane organela koje omogućuju izmjenu tvari, informacija i energije između stanica ili unutar stanice.

Povećanjem stresa u biljci, kao u slučaju infekcije patogenom, dolazi do proizvodnje ROS koji oštećuju membranske lipide te dovode do lipidne peroksidacije. Lipidna peroksidacija je proces u kojem oksidansi (slobodni radikali) napadaju dvostruku ugljikovu vezu u membranskim lipidima zamjenjujući vodik u vezi s kisikom pri čemu nastaju lipid peroksid radikal i vodikov peroksid (**Slika 6**). Radikali koji igraju ključnu ulogu u lipidnoj peroksidaciji su hidroksil radikal ( $OH^{\cdot}$ ) i hidroperoksil radikal ( $HO_2^{\cdot}$ ). Kod slabije lipidne peroksidacije, stanica u cilju obrane aktivira antioksidativni sustav, no kod izraženije peroksidacije dolazi do apoptoze. (Ayala i sur., 2014). Apoptoza je poseban oblik stanične smrti nužan za razvoj organizma i održavanje stanične homeostaze (Žlender, 2003).

Lipidna peroksidacija se najčešće odvija kod višestruko nezasićenih masnih kiselina, ali su joj podložni i fosfolipidi, glikolipidi i kolesterol (Ayala i sur., 2014).



**Slika 6** Mehanizam lipidne peroksidacije (Mimica-Dukić i sur., 2012)

## 2.7. OBRAMBENI MEHANIZMI BILJKE

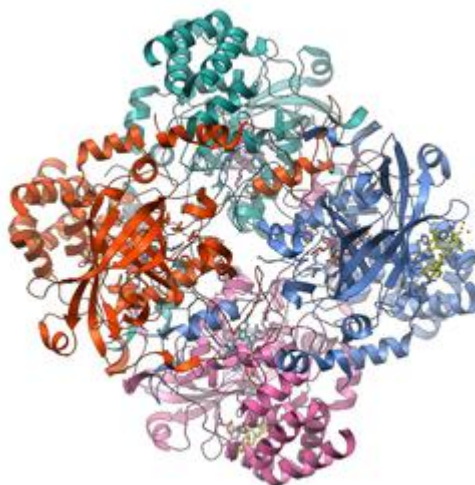
Biljke imaju enzimski i neenzimski antioksidativni sustav koji imaju ulogu eliminacije ROS, a ti mehanizmi uključuju aktivaciju enzimskih i neenzimskih komponenti. Enzimski antioksidacijski sustav obrane čine katalaza (CAT), gvajakol peroksidaza (POD) i aksoibat peroksidaza (APX), superoksid dismutaza (SOD), glutation reduktaza (GR) dok u neenzimski sustav obrane ubrajamo aksobinsku kiselinu, karotenoide, flavone, antocijane i tokoferole (Djanaguiraman i Vara Prasad, 2013; Marček, 2013).

Prilikom izlaganja biljke stresu dolazi do nakupljanja reaktivnih kisikovih čestica koje zbog svoje visoke reaktivnosti mogu reagirati s proteinima, lipidima i DNA pri čemu se oštećuje stanica i onemogućuju normalne funkcije stanice (Farooq i sur., 2013). Enzimi su biokatalizatori, te kao svi katalizatori ubrzavaju biokemijske reakcije, a da pritom ostaju nepromijenjeni. Enzimi se sastoje od L- $\alpha$ -aminokiselina povezanih peptidnim vezama između karboksilne skupine jedne aminokiseline i amino skupine druge aminokiseline. Enzimске reakcije se najbrže odvijaju pri određenim uvjetima (optimalna temperatura i pH), dok nepovoljni uvjeti mogu dovesti do denaturacije enzima (Whitehurst, 2002).

Prema prirodi reakcije koju kataliziraju (oksidacija, redukcija, hidroliza, itd.) te prema identitetu njihovih supstrata i proizvoda, enzimi se klasificiraju u šest glavnih skupina: oksidoreduktaze, transferaze, hidrolaze, liaze, izomeraze i ligaze (Hui, 2006).

POD (EC 1.11.1.7) je enzim koji se nalazi u stanici u velikim količinama gdje ima ključnu ulogu u izgradnji staničnih stijenki. POD pripada nespecifičnim peroksidazama koje kao supstrat koriste aromatske spojeve kao što je pirogalol ili gvajakol. Primijećeno je da se tokom infekcije biljke patogenom povećava količina i aktivnost peroksidaze. Naime, POD potpomaže jačanju stanične stijenke na način da sudjeluje u biosintezi lignina i suberina, a također i ima važnu ulogu u zacjeljivanju rana nastalih prodorom patogena čime povećava otpornost biljke (Chittoor i sur., 1999).

CAT (EC 1.11.1.6) je prvi pronađeni antioksidativni enzim i nalazi se u većini aerobnih organizama (**Slika 7**). To je tetramerni protein, a svaka podjedinica sadrži više od 500 aminokiselina. U podjedinicama se nalazi prostetička skupina koja čini aktivno mjesto – porfirinski prsten s Fe ionom. Kod biljaka se najveća količina katalaze može pronaći u peroksisomima. Tipična reakcija za katalazu je razgradnja  $H_2O_2$  na  $H_2O$  i  $O_2$ , a tijekom jedne sekunde može razgraditi milijune molekula  $H_2O_2$  u  $H_2O$  i  $O_2$ . Katalaza ima bitnu ulogu u izbacivanju  $H_2O_2$  nastalog tokom  $\beta$ -oksidacije masnih kiselina i fotorespiracije (Djanaguiraman i Vara Prasad, 2013).



**Slika 7** Kvarterna struktura katalaze [preuzeto sa stranica:

<https://hr.wikipedia.org/wiki/Katalaza>(2017)]

APX (EC 1.11.1.11) je enzim koji je sudjeluje u uklanjanju  $H_2O_2$  iz stanice korištenjem askorbata kao supstrata (elektron donora) u askorbat-glutationskom ciklusu (ASH-GSH). Za razliku od CAT i POD, kinetika APX je brža zbog većeg afiniteta APX za  $H_2O_2$  (Marček, 2013). Različite izoforme askorbat peroksidaze mogu se pronaći u svim dijelovima stanice, kao mitohodrijima, kloroplastima, peroksisomima i citosolu u kojima sudjeluju u uklanjanju ROS. Kao odgovor na stres, raste koncentracija APX, kao i ostalih antioksidativnih enzima (Caverzan i sur., 2012).

Polifenol oksidaza (PPO; EC 1.14.18.1) pod jednim imenom okuplja skupinu enzima koji sadrže bakar kao protetičku skupinu te u prisutnosti kisika kataliziraju o-hidroksilaciju monofenola u o-difenole kao i oksidaciju o-difenola u kinone. PPO se najčešće povezuje s procesima enzimskog posmeđivanja gdje mehaničkim oštećenjem tkiva, enzim dolazi u kontakt sa supstratom i s kisikom iz zraka, pri čemu dolazi do posmeđivanja (Araji i sur.,2014). No, s obzirom da PPO sudjeluje u sintezi fenola, koji spadaju u neenzimatski antioksidativni sustav, ima i bitnu ulogu u obrani biljke od patogena (Sharma i Joshi, 2015).

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1. ZADATAK

Zadatak ovog diplomskog rada bio je ispitati utjecaj vrsta roda *Fusarium* na genotip pšenice „Super Žitarka“ koji je osjetljiv na fuzarijsku palež klasa pšenice, a okarakteriziran kao takav u pokusima u prijašnjim godinama. Odgovor biljke na stres izazvan vrstama roda *Fusarium* praćen je nakon 2., 4., 7. i 14. dana mjerenjem aktivnosti antioksidacijskih enzima (CAT, PPO, POD i APX), utvrđivanjem stupnja oštećenosti membrana (lipidna peroksidacija), mjerenjem koncentracije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, te određivanjem sadržaja proteina.

### 3.2. MATERIJALI I METODE

#### 3.2.1. Modelna biljka

U ovom istraživanju koristio se genotip pšenice „Super Žitarka“ osjetljiv na fuzarijsku palež klasa (FHB) (Španić i Drezner 2011, Španić i sur. 2013). To je ozima, srednje rana, visokorodna i kvalitetna sorta. Posjeduje vrlo dobru tolerantnost na niske temperature te na osipanje zrna iz klasa (<https://www.poljinis.hr/proizvodi-usluge/psenica-jecam/psenica/super-zitarka-i55/>).



**Slika 8** Super Žitarka [preuzeto sa stranice: <https://www.poljinis.hr/proizvodi-usluge/psenica-jecam/psenica/super-zitarka-i55/> (2017)].



### 3.2.2. Poljski pokusi

U poljskim pokusima provedenim na Poljoprivrednom institutu Osijek tijekom 2016. godine, klasovi pšenice u fazi cvatnje bili su tretirani suspenzijom spora vrsta *Fusarium graminearum* i *F. culmorum*. Drugi dio biljaka nije bio umjetno tretiran i predstavljao je kontrolu. Poljski pokusi rađeni su u dvije repeticije (Španić i sur., 2017).

### 3.2.3. Uzorkovanje tkiva

Tretirani i netretirani klasovi bili su uzorkovani nakon 2., 4., 7. i 14. dana nakon infekcije i pohranjeni na -80 °C do analiza. Za analize je uzorkovano po pet klasova za tretman i isti broj za kontrolu.

### 3.2.4. Ekstrakcija tkiva za određivanje aktivnosti antioksidacijskih enzima

Za određivanje aktivnosti antioksidacijskih enzima klasovi su bili usitnjeni u tarioniku pomoću tekućeg dušika uz dodatak polivinilpirolidona (PVP). Zatim je odvagano 0.25 g uzorka kojemu je dodano 1 mL ekstrakcijskog pufera koji je sadržavao 50 mM kalij-fosfatni pufer pH vrijednosti 7.0, 0.1mM EDTA, i 5 mM askorbinsku kiselinu, protreseno na miješalici i ostavljeno 15 minuta na ledu. Homogenirano tkivo centrifugirano je 15 minuta pri 14 000 rcf na 4 °C, supernatant je prelijet u čistu Eppendorf epruvetu, te uzorci ponovno reekstrahirani uz dodatak 1 mL ekstrakcijskog pufera. Nakon centrifugiranja dobiveni supernatanti su spojeni. Iz dobivenih ekstrakata određena je aktivnost antioksidacijskih enzima i koncentraciju ukupnih proteina. Sve aktivnosti enzima izražene su kao količinu nastalih produkata u mikromolima po minuti po miligramu proteina (U) [U mg<sup>-1</sup><sub>proteina</sub>]. Sva mjerenja aktivnosti antioksidacijskih enzima kao i određivanje koncentracije proteina u uzorcima određena su se spektrofotometrijski (Analytik Jena, EU-Njemačka) u pet ponavljanja.

### 3.2.5. Određivanje aktivnosti gvajakol peroksidaze (POD)

Aktivnost POD određena je prema metodi Siegel i Galston (1967). Reakcijska smjesa sastojala se od 5 mM gvajakola, 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i 0.2 M kalij-fosfatnog pufera pH 5.8.

Reakcija započinje dodatkom 25 µL uzorka u 975 µL reakcijske smjese. Aktivnost enzima mjerena je pri valnoj duljini 470 nm, svake sekunde tijekom 2 minute. Mjerenje se provodilo u plastičnoj kivetu, a korekcija je rađena s destiliranom H<sub>2</sub>O.

Izračun aktivnosti POD:

$$\text{POD} = \frac{\Delta A \times 60 \times V_{uk}}{V_{uz} \times 26.6 \times m_p} \quad (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}_{\text{proteina}})$$

$\Delta A$ -srednja vrijednost promjene apsorbancije

60-vrijeme mjerenja (s)

$V_{uk}$ -ukupni volumen reakcijske smjese (1000  $\mu\text{L}$ )

$V_{uz}$ -volumen uzorka (10  $\mu\text{L}$ )

26.6-ekstinkcijski koeficijent ( $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )

$m_p$ -masa proteina (g)

### 3.2.6. Određivanje aktivnosti askorbat peroksidaze (APX)

APX je određena prema metodi Nakano i Asada (1981). Reakcija započinje dodatkom 10  $\mu\text{L}$  12 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  (13.6  $\mu\text{L}$  30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  dodati u 10 mL  $\text{dH}_2\text{O}$ ) u 955  $\mu\text{L}$  reakcijske smjese. Reakcijska smjesa sastojala se od 955  $\mu\text{L}$  50 mM kalij fosfatnog pufera (pH 7.0) uz dodatak 0.1 mM EDTA, 10  $\mu\text{L}$  25 mM askorbinske kiseline (0.444 g askorbata otopiti u 10 mL 50 mM kalij-fosfatnog pufera sa 0.1 mM EDTA) i 25  $\mu\text{L}$  ekstrakta.

Aktivnost APX je mjerena na 290 nm (UV područje), svake sekunde tijekom 2 min u kiveti od kvarcnog stakla, a korekcija provedena destiliranom  $\text{H}_2\text{O}$ . Aktivnost APX izražena je kao pad koncentracije supstrata (askorbinske kiseline).

Izračun aktivnosti APX:

$$\text{APX} = \frac{\Delta A \times 60 \times V_{uk}}{V_{uz} \times 2.8 \times m_p} \quad (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}_{\text{proteina}})$$

$\Delta A$ -srednja vrijednost promjene apsorbancije

60-vrijeme mjerenja (s)

$V_{uk}$ -ukupni volumen reakcijske smjese (1000  $\mu\text{L}$ )

$V_{uz}$ -volumen uzorka (25  $\mu\text{L}$ )

2.8-ekstinkcijski koeficijent ( $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )

$m_p$ -masa proteina (g)

### 3.2.7. Određivanje aktivnosti katalaze (CAT)

Aktivnost CAT određena je prema Aebi (1984). Reakcijska smjesa sastojala se od 50 mM kalij-fosfatnog pufera pH vrijednosti 7.0 i 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (76.5 μL 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se dodaje u 150 mL 50 mM kalij-fosfatnog pufera). Reakcija započinje dodatkom 50 μL uzorka u 950 μL reakcijske smjese. Aktivnost CAT je mjerena pri valnoj duljini 240 nm, svake sekunde tijekom 1 minute. Mjerenje se provodilo u kvarcnoj kiveti, a korekcija destiliranom H<sub>2</sub>O.

Izračun aktivnosti CAT:

$$\text{CAT} = \frac{\Delta A \times 60 \times V_{uk}}{V_{uz} \times 40 \times m_p} \quad (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}_{\text{proteina}})$$

ΔA-srednja vrijednost promjene apsorbancije

60-vrijeme mjerenja (s)

V<sub>uk</sub>-ukupni volumen reakcijske smjese (1000 μL)

V<sub>uz</sub>-volumen uzorka (50 μL)

40-ekstinkcijski koeficijent (mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>)

m<sub>p</sub>-masa proteina (g)

### 3.2.8. Određivanje aktivnosti polifenol oksidaze (PPO)

Aktivnost PPO određena je prema metodi Raymond i sur. (1993). Reakcijska smjesa sastojala se od 2 mL 100 mM kalij fosfatnog pufera pH vrijednosti 7.0 (zagrijanog na 45 °C), 0.2 mL 100 mM pirogalola te 15 μL uzorka tj. enzimskog ekstrakta.

Reakciju započinje dodatkom 15 μL uzorka u reakcijsku smjesu. Aktivnost enzima mjerena je pri valnoj duljini 430 nm, svake sekunde tijekom 2 minute. Mjerenje se provodilo u plastičnoj kiveti na 40 °C, a korekcija je rađena s destiliranom H<sub>2</sub>O.

Izračun aktivnosti PPO:

$$\text{PPO} = \frac{\Delta A \times 60 \times V_{uk}}{V_{uz} \times 12 \times m_p} \quad (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}_{\text{proteina}})$$

ΔA-srednja vrijednost promjene apsorbancije

60-vrijeme mjerenja (s)

V<sub>uk</sub>-ukupni volumen reakcijske smjese (1000 μL)

V<sub>uz</sub>-volumen uzorka (25 μL)

12-ekstinkcijski koeficijent (mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>)

m<sub>p</sub>-masa proteina (g)

### 3.2.9. Određivanje koncentracije proteina po Bradfordu (1976)

Za određivanje ukupnih proteina u klasu ekstrakti uzoraka razrijeđeni su pet puta. U Eppendorf epruvete dodano je 50  $\mu\text{L}$  razrijeđenog uzorka ukupnog volumena i 1 mL radne otopine Bradforda (2.85% v/v etanol, 5,28% v/v  $\text{H}_3\text{PO}_4$  i 6% v/v Bradford matična otopina). Matična otopina Bradforda sastojala se od 0.01% boje Coomassie Brilliant Blue G250, 31.35% v/v etanola i 58.6% v/v  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . Sadržaj epruvete dobro je promiješan na miješalici te je nakon 7 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi mjerena apsorbancija pri 595 nm. Za slijepu probu korišteno je 50  $\mu\text{L}$   $\text{dH}_2\text{O}$  i 1 mL radne otopine Bradforda.

Nakon mjerenja apsorbancije, izrađena je baždarna krivulja dobivena pripremanjem 1 mg/mL matične otopine albumina goveđeg seruma (BSA) iz koje su pripremljene otopine različitih BSA koncentracija u rasponu od 0.1-0.7 mg/mL prema priloženoj **Tablici 1**. Za svaku koncentraciju BSA pripremljene su dvije replike.

**Tablica 1** Priprema otopina BSA različitih koncentracija

V ( $\mu\text{L}$ )matične otopine BSA	V ( $\mu\text{L}$ ) $\text{dH}_2\text{O}$	Konačna koncentracija otopine BSA (mg/mL)
200	1800	0.1
400	1600	0.2
600	1400	0.3
800	1200	0.4
1000	1000	0.5
1200	800	0.6
1400	600	0.7

### 3.3.EKSTRAKCIJA TKIVA ZA ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE VODIKOVOG PEROKSIDA (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) I SADRŽAJA MALONDIALDEHIDA (MDA)

Za određivanje sadržaja MDA i koncentracije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> način ekstrakcije je bio isti kao i za određivanje aktivnosti enzima. Iz maceriranog tkiva nakon homogeniranja u tekućem dušiku, uzeto je 0.4 g praha kojemu je dodano 2 mL 0.1% TCA. Sadržaj kivete je kratko promiješan („vortex“) i ostavljen na ledu 10 minuta da se ekstrahira, a potom je centrifugiran 15 minuta pri 12 000 rpm na 4 °C.

Nakon centrifugiranja odvojeno je 0.5 mL supernatanta u kivetu s čepom na navoj za mjerenje sadržaja MDA te 0.5 mL supernatanta u Eppendorf epruvetu volumena 2 mL za mjerenje vodikovog peroksida. Sadržaj MDA i koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> određena je spektrofotometrijski (Analytik Jena, EU-Njemačka) u pet ponavljanja.

### 3.4.ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Određivanje koncentracije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u biljnom tkivo provedeno je metodom Velikova i sur. (2000). U 500 µL uzorka dodano je 500 µL 10 mM kalij fosfatnog pufera pH 7.0 te 1 mL 1M otopine kalijevog jodida. Nakon pripreme smjesa je promiješana na miješalici te ostavljena stajati tijekom 20 minuta u mraku. Nakon 20 minuta izmjerena je apsorbancija pri 390 nm. Slijepa proba pripremljena je miješanjem 1 mL 10 mM kalij fosfatnog pufera pH vrijednosti 7.0 i 1 mL 1M otopinu kalijevog jodida.

Koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u uzorcima izračunata je iz standardne krivulje pripremljene iz poznatih koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Nakon mjerenja apsorbancije, izrađena je baždarna krivulja koja je dobivena pripremanjem 1 mM 30% matične otopine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> iz koje su pripremljene otopine različitih koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u rasponu od 20-200 µM prema priloženoj **Tablici 2**. Za svaku koncentraciju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pripremljene su dvije replike.

**Tablica 2** Priprema otopina H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> različitih koncentracija

<b>V osnovne otopine/ µL</b>	20	40	60	80	100	200
<b>V(dH<sub>2</sub>O)/µL</b>	980	960	940	920	900	800
<b>c (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)/µM</b>	20	40	60	80	100	200
<b>A<sub>390</sub></b>	0.0164	0.0921	0.1663	0.2401	0.32	0.7026

### 3.5. ODREĐIVANJE SADRŽAJA MDA

Sadržaj MDA, krajnji produkt lipidne peroksidacije, određen je prema metodi Verma i Dubey (2003). Supernatantu (0.5 mL) je dodano 1 mL ekstrakcijske otopine (0.5% otopine TBA u 20% TCA) nakon čega je sadržaj Eppendorf epruvete promiješan na miješalici i stavljen na zagrijavanje u termoblok pri 95 °C 30 minuta. Nakon zagrijavanja uzorci su stavljeni na led 10-15 minuta i centrifugirani 15 minuta pri 14 000 rpm na 4 °C. Kao slijepu probu koristilo se 1.5 mL ekstrakcijske otopine. Nakon centrifugiranja sadržaj epruvete je prenesenu plastičnu kivetu sa suženim dnom, a apsorbancija je mjerena na 532 i 600 nm. Ekstinkcijski koeficijent iznosio je  $\epsilon = 155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-2}$ .

### 3.6. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

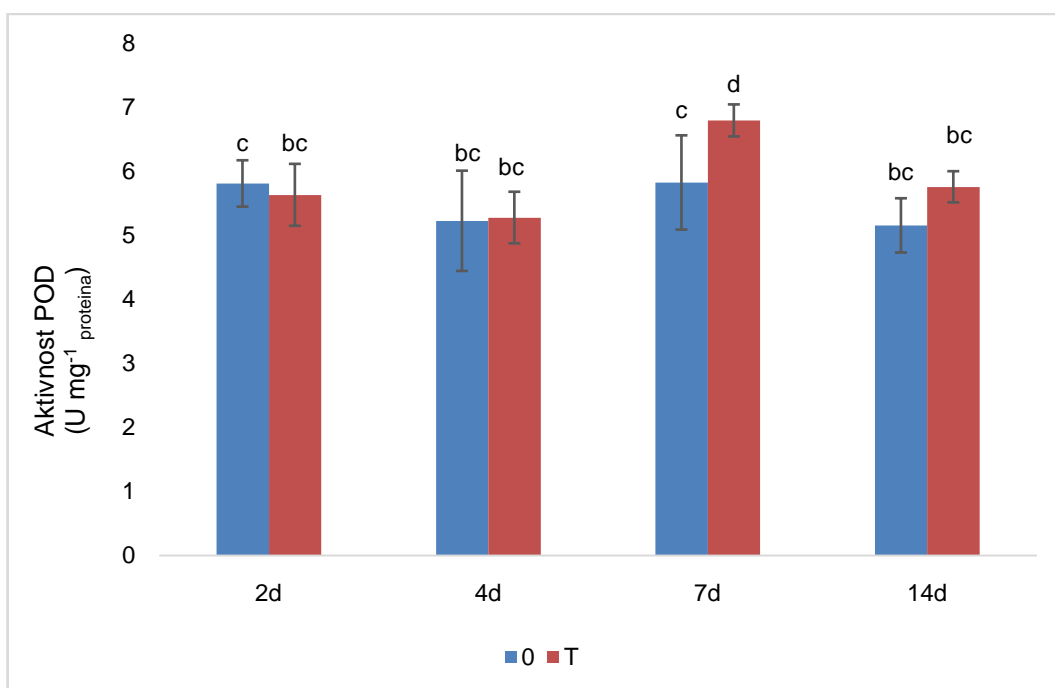
Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti pet replika ( $\pm$  standardna pogreška) a statistička značajnost rezultata uspoređena je pomoću Fisher-ovog LSD testa na razini značajnosti  $p < 0.05$ . Za statističku obradu podataka korišten je programski paket STATISTICA 13.0 (Stat Soft Inc., USA). Unutar statističke obrade međusobno se usporedile različite točke uzorkovanja na kontroli i tretmanima.

## **4. REZULTATI**

## 4.1. AKTIVNOST ANTIOKSIDACIJSKIH ENZIMA I KONCENTRACIJA TOPIVIHPROTEINA

### 4.1.1. Aktivnost gvajakol peroksidaze (POD)

Iz **Slike 9**, vidljivo je kako je nakon 7 dana izlaganja pšenice vrstama roda *Fusarium* aktivnost POD značajno povećana u odnosu na kontrolne biljke dok u ostalim točkama infekcije nije bilo promjene u aktivnosti POD u odnosu na kontrolu. Nadalje, nakon 7 dana uočena je povećana aktivnost POD u inficiranih biljaka u odnosu na ostale točke.

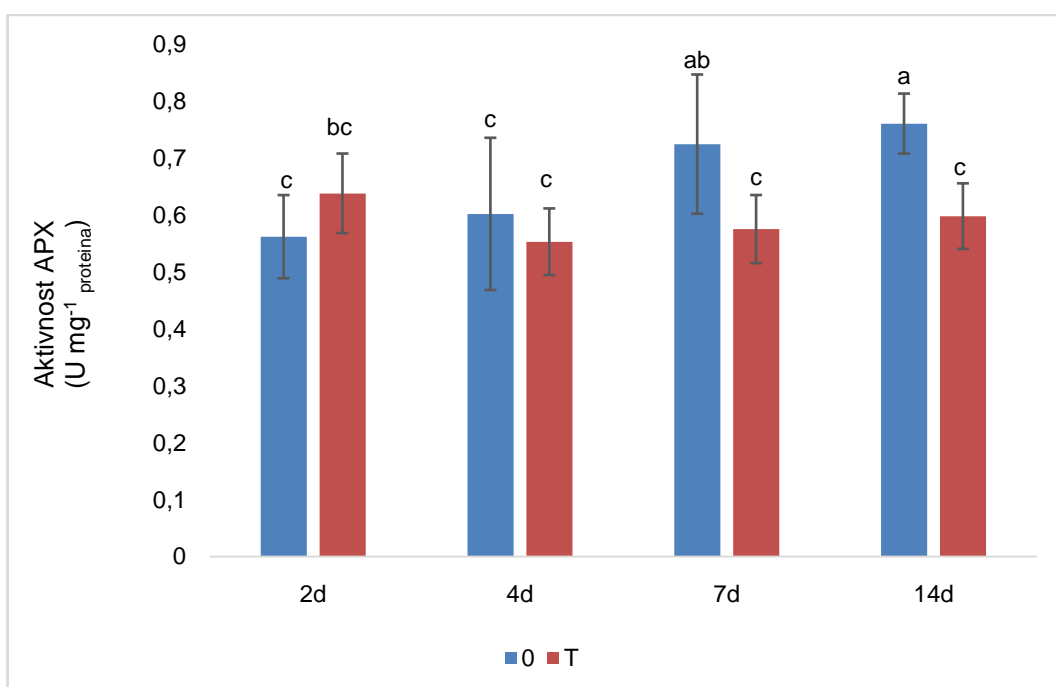


**Slika 9** Aktivnost gvajakol peroksidaze u uzorcima klasova nakon 2, 4, 7 i 14 dana uzorkovanja u netretiranim (0) i tretiranim(T) klasovima. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost 5 replika  $\pm$  standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima predstavljaju vrijednosti koje se međusobno značajno razlikuju ( $P \leq 0.05$ , Fisher LSD test).



### 4.1.2. Aktivnost askorbat peroksidaze (APX)

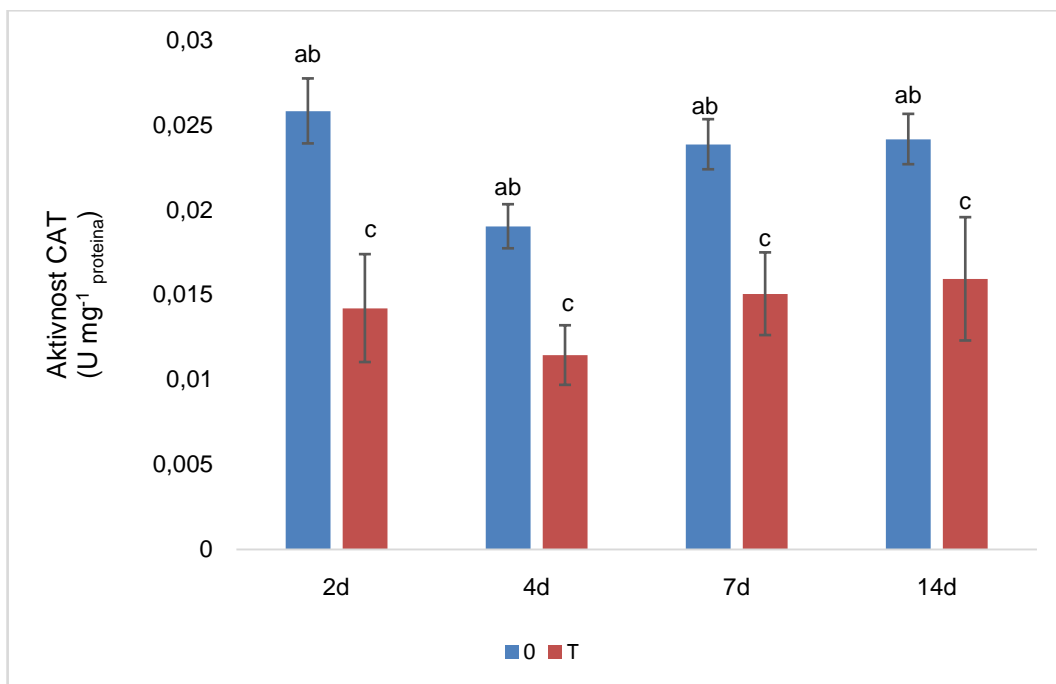
Iz **Slike 10**, vidljivo je kako je nakon 7 i 14 dana izlaganja pšenice vrstama roda *Fusarium* aktivnost APX značajno smanjena u odnosu na kontrolne biljke dok u ostalim točkama infekcije nije bilo promjene u aktivnosti APX u odnosu na kontrolu. Također, između različitih točaka uzorkovanja nije uočena statistički značajna promjena u klasovima koji su bili izloženi umjetnoj infekciji. Uspoređujući aktivnost APX između kontrolnih biljaka, vidljivo je da tijekom eksperimentalnog perioda (7. i 14. dan) aktivnost APX je bila veća za razliku od aktivnost APX u ranijim točkama uzorkovanja (2. i 4. dan).



**Slika 10** Aktivnost askorbat peroksidaze u uzorcima klasova nakon 2, 4, 7 i 14 dana uzorkovanja u netretiranim (0) i tretiranim (T) klasovima. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost 5 replika  $\pm$  standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima predstavljaju vrijednosti koje se međusobno značajno razlikuju ( $P \leq 0.05$ , Fisher LSD test).

### 4.1.3. Aktivnost katalaze (CAT)

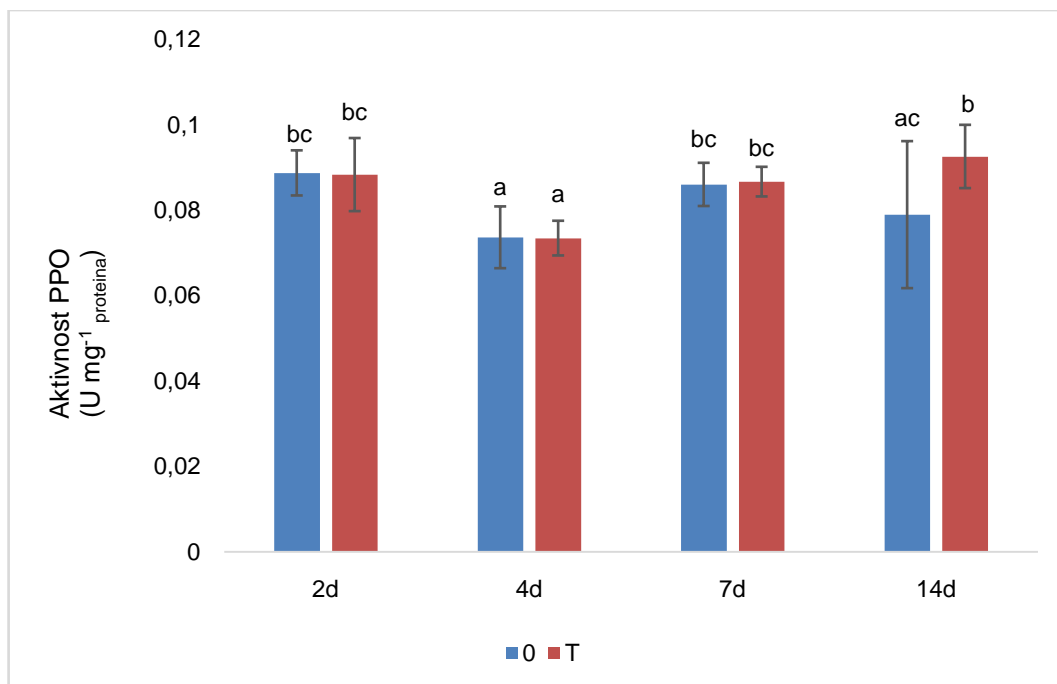
Iz **Slike 11**, vidljivo je kako je u svim točkama (2, 4, 7 i 14 dana) izlaganja pšenice vrstama roda *Fusarium* aktivnost CAT značajno smanjena u odnosu na kontrolne biljke.



**Slika 11** Aktivnost katalaze u uzorcima klasova nakon 2, 4, 7 i 14 dana uzorkovanja u netretiranim (0) i tretiranim(T) klasovima. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost 5 replika  $\pm$  standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima predstavljaju vrijednosti koje se međusobno značajno razlikuju ( $P \leq 0.05$ , Fisher LSD test).

#### 4.1.4. Aktivnost polifenol oksidaze (PPO)

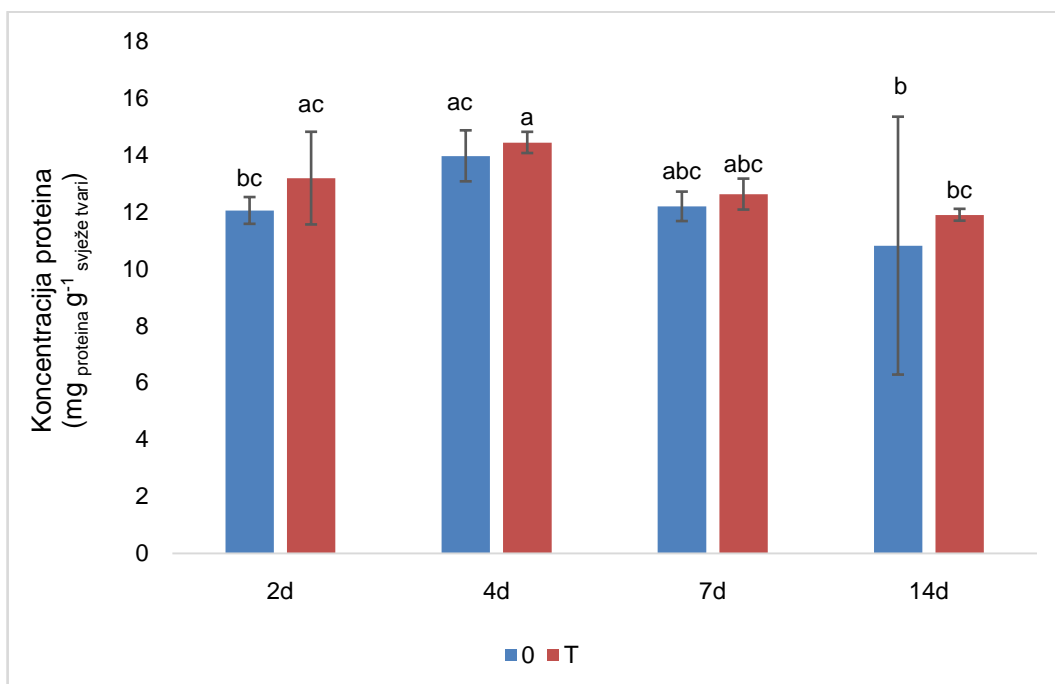
Iz **Slike 12**, vidljivo je kako je nakon 14 dana izlaganja pšenice vrstama roda *Fusarium* aktivnost PPO bila značajno povećana u odnosu na kontrolne biljke dok u ostalim točkama infekcije nije bilo promjene u aktivnosti PPO u odnosu na kontrolu. Nadalje, nakon 4 dana uočena je smanjena aktivnost PPO u inficiranih biljaka u odnosu na ostale točke.



**Slika 12** Aktivnost polifenol oksidaze u uzorcima klasova nakon 2, 4, 7 i 14 dana uzorkovanja u netretiranim (0) i tretiranim (T) klasovima. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost 5 replika  $\pm$  standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima predstavljaju vrijednosti koje se međusobno značajno razlikuju ( $P \leq 0.05$ , Fisher LSD test).

#### 4.1.5. Koncentracija ukupnih proteina

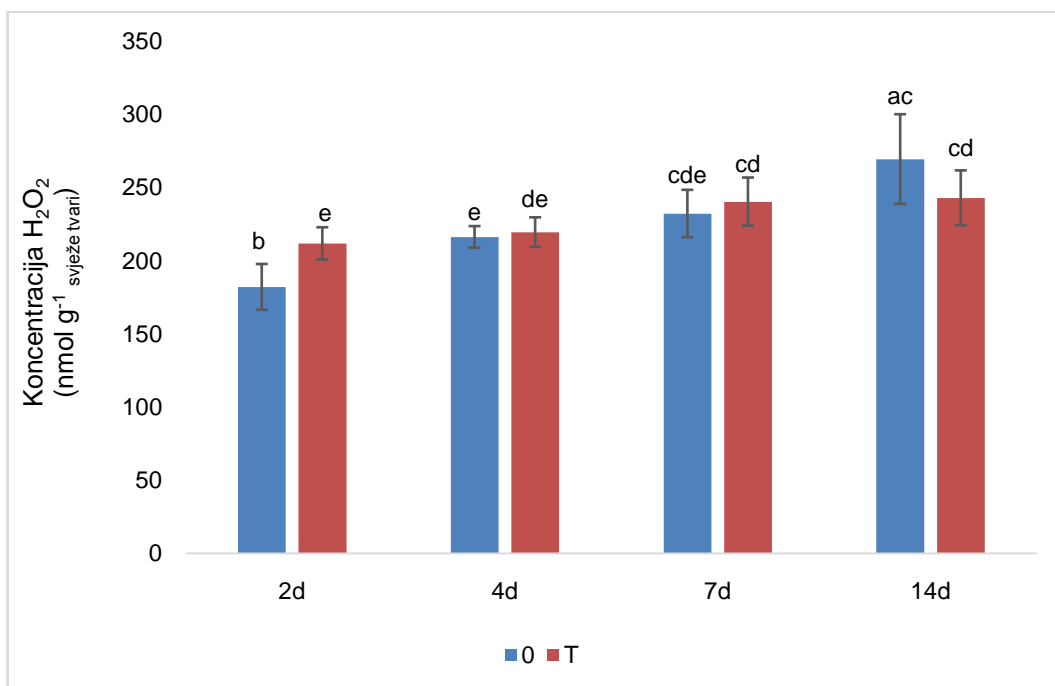
**Slika 13** prikazuje koncentraciju ukupnih proteina u nezaraženim i zaraženim biljkama nakon 2, 4, 7 i 14 dana nakon cvatnje. U ostalim točkama uzorkovanja nije uočena statistički značajna razlika u tretiranih biljka u odnosu na kontrole, ali niti između različitih vremena uzorkovanja na stresu izazvanog vrstama roda *Fusarium*. Izuzetak je bio 4. dan tretmana koji je pokazao značajan porast koncentracije proteina u odnosu na 14. dan.



**Slika 13** Sadržaj ukupnih proteina u uzorcima klasova nakon 2, 4, 7 i 14 dana uzorkovanja u netretiranim (0) i tretiranim (T) klasovima. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost 5 replika  $\pm$  standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima predstavljaju vrijednosti koje se međusobno značajno razlikuju ( $P \leq 0.05$ , Fisher LSD test).

## 4.2. KONCENTRACIJA VODIKOVOG PEROKSIDA (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

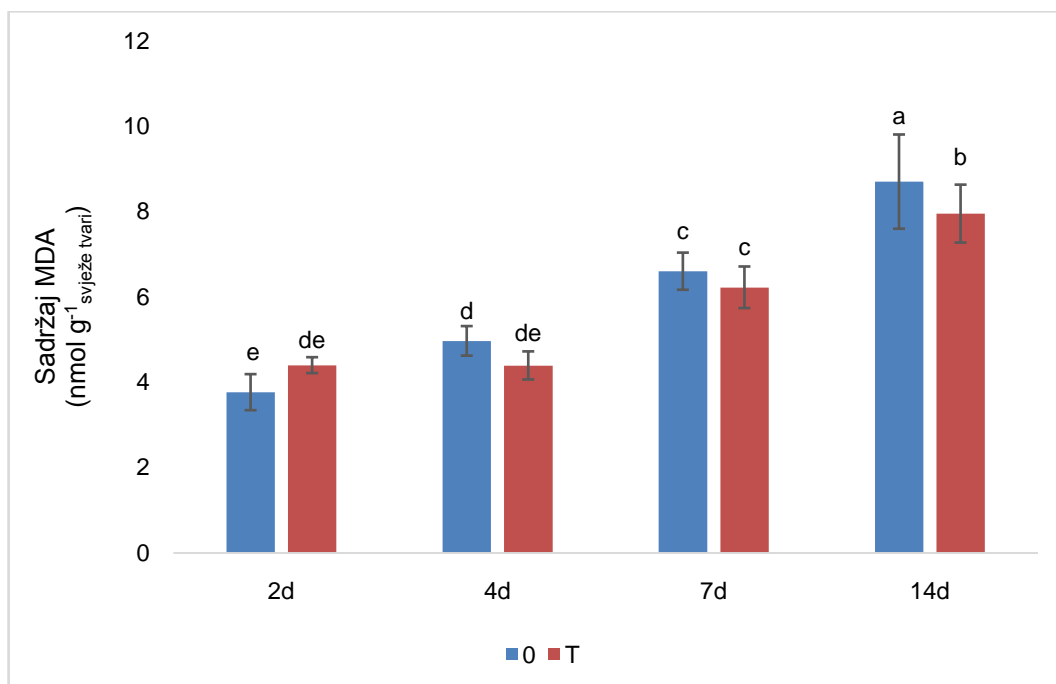
Iz **Slike 14** vidljivo je kako su zaražene biljke pokazale značajno veću koncentraciju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nakon 2. dana u odnosu na netretirane biljke. Nadalje, koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u inficiranim biljkama bila je veća nakon 7 i 14 dana u odnosu na 2. dan. Uspoređujući koncentraciju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u kontrolnih biljaka između različitih točaka uzorkovanja, može se primijetiti kako je ona bila najmanja u najranijoj točki (2. dan), a najveća u zadnjoj točki uzorkovanja (14. dan).



**Slika 14** Koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u uzorcima klasova nakon 2, 4, 7 i 14 dana uzorkovanja u netretiranim (0) i tretiranim (T) klasovima. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost 5 replika ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima predstavljaju vrijednosti koje se međusobno značajno razlikuju ( $P \leq 0.05$ , Fisher LSD test).

### 4.3. SADRŽAJ MALONDIALDEHIDA (MDA)

Iz **Slike 15**, vidljivo je kako je nakon 14 dana izlaganja pšenice vrstama roda *Fusarium* sadržaj MDA značajno smanjen u odnosu na kontrolne biljke dok u ostalim točkama infekcije nije bilo promjene u sadržaju MDA u odnosu na kontrolu. Također, vidljiv je porast sadržaja MDA u inficiranim biljkama nakon 7 i 14 dana u odnosu na ranije točke uzorkovanja (2. i 4. dan). Statistički najmanji sadržaj MDA na kontroli, bio je nakon 2 dana a najveća akumulacija konačnog produkta lipidne peroksidacije 14. dana eksperimenta.



**Slika 15** Sadržaj MDA u uzorcima klasova nakon 2, 4, 7 i 14 dana uzorkovanja u netretiranim (0) i tretiranim (T) klasovima. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost 5 replika  $\pm$  standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima predstavljaju vrijednosti koje se međusobno značajno razlikuju ( $P \leq 0.05$ , Fisher LSD test).

## **5. RASPRAVA**

Prilikom istraživanja uočeno je kako je aktivnost POD nakon 7 dana izlaganja patogenu bila je značajno veća u odnosu na kontrolne biljke. Povećana aktivnost POD nakon izlaganja biljke FHB može biti posljedica ulaska patogena u biljku na način da jača fizičku barijeru i tako ograničava prodor i širenje hifa što upućuje na pretpostavku da POD u ovog genotipa sudjeluje u obrambenom odgovoru. Povećana aktivnost POD u uvjetima infekcije vrstama roda *Fusarium* nakon 7 dana je uočena i u „Golubice“, genotipa osjetljivog na FHB (Španić i sur., 2017). Također, u zaraženim klasovima nakon 7 dana izlaganja vrstama roda *Fusarium* je uočena značajno povećana aktivnost POD u odnosu na ostale točke uzorkovanja. Suprotno, u prethodnom istraživanju u osjetljivog FHB genotipa „Golubica“ uočena je povećana aktivnost POD i CAT tek nakon 14 dana infekcije (Španić i sur., 2017) iz čega se može pretpostaviti kako „Super Žitarka“na FHB za razliku od Golubice odgovara brže, ali ipak nedovoljno brzo da bi obranila biljku od patogena.

U biljkama izloženim infekciji uočena je statistički značajno manja aktivnost APX nakon 7 i 14 dana stresa u odnosu na kontrolne biljke što upućuje na zaključak da APX u ovog genotipa vjerojatno nije uključen u detoksifikaciju ROS (Marček i sur., 2016). Suprotno, „Golubica“-osjetljiv FHB genotip je nakon 7 dana infekcije imala veću aktivnost APX u odnosu na kontrolu što može biti posljedica razlike među genotipovima (Španić i sur., 2017).

Aktivnost CAT je u tretiranim biljkama u svim točkama uzorkovanja bila značajno manja u odnosu na kontrolu što je vjerojatno posljedica inhibicije enzima. Slične rezultate prikazali su Kuźniak i Skłodowska (2005). Naime, u listovima rajčice (*Lycopersicon esculentum* Mill.) uslijed dužeg izlaganja gljivici *Botrytis cinerea* Pers., došlo je do inhibicije superoksid dismutaze (SOD), CAT i glutation peroksidaze (GSH-P<sub>x</sub>).

Jedan od parametara oksidacijskog stresa je lipidna peroksidacija čiji je krajnji produkt MDA. Nakon 14 dana izlaganja patogenu, genotip „Super Žitarka“ je pokazao manji sadržaj MDA i pad koncentracije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u odnosu na netretirane biljke što može biti rezultat povećane aktivnosti PPO i uključivanja neenzimatskog antioksidativnog sustava u obrambeni odgovor. Uključivanje neenzimatskih antioksidativnih komponenti u odgovor biljke na biotički stres uočeno je u istraživanju Fodor i sur. (1997) pri čemu je infekcija duhana mozaičnim virusom duhana aktivirala i enzimatski i neenzimatski sustav.

Naši rezultati pokazuju značajno povećanje sadržaja MDA nakon 14 dana u odnosu na ostale točke uzorkovanja pa se može pretpostaviti kako je povećanje sadržaja MDA posljedica inhibicije antioksidacijskih enzima CAT, POD i APX tijekom duljeg vremenskog perioda izloženosti patogenu. Povećan sadržaj MDA pronađen je također u listovima graha (*Vicia faba* L.) inficiranog mozaičnim virusom graha („yellow mosaic virus“) (Radwan i sur., 2010) i u genotipa ječma inficiranog gljivicom *Blumeria graminis* (El-Zahaby i sur., 1995).



U uvjetima infekcije patogenom  $H_2O_2$  ima važnu ulogu u obrambenim mehanizmima biljke na način da sudjeluje u učvršćivanju stanične stijenke i indukciji gena zaduženih za odgovor što ima za cilj ograničiti ulazak i širenje patogena (Torres, 2010). Nakon 2 dana tretmana zaraženi klasovi pokazali su povećanu akumulaciju  $H_2O_2$  u odnosu na neinficirane biljke što može biti rezultat hipersenzitivnog odgovora biljke. Također, povećana koncentracija  $H_2O_2$  nakon 3 dana infekcije vrstom *F. graminearum* uočena je kod FHB-osjetljivog genotipa pšenice (Sorahinobar i sur., 2015).

## **6. ZAKLJUČAK**

Na temelju rezultata ovog istraživanja, možemo zaključiti:

- Genotip „Super Žitarka“ nakon 7 dana pokazao je značajno veću indukciju aktivnosti PODu biljaka izloženih vrstama roda *Fusarium* spp. u odnosu na netretirane biljke, ali i u odnosu na 2, 4 i 14 dan infekcije. Povećana aktivnost POD ukazuje kako osjetljiv FHB genotip na bolest odgovara indukcijom POD nešto kasnije nego li je to nužno za obranu biljke.
- Nakon 7 i 14 dana infekciji aktivnost APX bila je značajno manja nego u kontrolnih biljaka. Smanjena aktivnost APX upućuje na zaključak kako ovaj enzim nije uključen u detoksifikaciju ROS kod osjetljivog genotipa na FHB.
- Tretirane biljke pokazale su inhibiciju aktivnosti CAT u odnosu na kontrole u svim točkama uzorkovanja što govori kako ovaj enzim nije uključen u obrambenu reakciju kod osjetljivog genotipa na FHB.
- Nakon 14 dana izloženosti patogenu, uočena je povećana aktivnost PPO što govori u prilog činjenici da ovaj genotip kasnije uključuje neenzimatski antioksidativni sustav u obrani od patogena.
- Kao odgovor na infekciju u najranijoj točki uzorkovanja (2. dan) uočena je hiperprodukcija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Sadržaj MDA se značajno povećao s vremenom izloženosti patogenu (nakon 7 i 14 dana) što je posljedica neučinkovitog antioksidativnog enzimatskog sustava obrane.

## **7. LITERATURA**

- Aebi H: Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* 105:121-126, 1984.
- Araji S, Grammer T, Gertzen R, Anderson S, Mikulic-Petkovsek M, Veberic R, Phu M, Solar A, Leslie C, Dandekar A, Escobar M: Novel roles for the polyphenol oxidase enzyme in secondary metabolism and the regulation of cell death in walnut. *Plant Physiology* 164(3): 1191-1203, 2014.
- Ayala A, Muñoz M, Argüelles S: Lipid Peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2014:1-31, 2014.
- Bradford MM: A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254, 1976.
- Buchanan BB, Gruissem W, Jones, RL: *Biochemistry and molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologist, Rockville, Maryland, 2000.
- Caverzan A, Passaia G, Barcellos Rosa S, Werner Ribeiro C, Lazzarotto F, Margis-Pinheiro M: Plant responses to stresses: Role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection, *Genetics and Molecular Biology* 35(4):1011-1019, 2012.
- Chittoor JM, Leach JE, White FF: Induction of peroxidase during defense against pathogens, U *Pathogenesis - related proteins in plants*, str. 171-193, CRC Press Boca Raton, 1999.
- Corpasa FJ, Gupta DK, Palma JM: Production sites of reactive oxygen species in organelles from plant cells, U *Reactive Oxygen Species and Oxidative Damage in Plants Under Stress*, str. 1-23, Springer, London, 2015.
- Ćosić J, Jurković D, Vrandečić K: Fuzarijska palež klasa. *Glasnik zaštite bilja* 4:64-67, 2013.
- Ćosić J, Jurković D, Vrandečić K: Influence of environmental factors on deoxynivalenol content in wheat flour. *Cereal Research Communications* 34(1):17-20, 2006.
- Ćosić J: *Fusarium spp. na pšenici i otpornost nekih genotipova na palež klasova*. Poljoprivredni fakultet Osijek, 1997.
- Djanaguiraman M, Vara Prasad PV: Effects of salinity on ion transport, water relations and oxidative damage, U *Ecophysiology and Responses of Plants under Salt Stress*, str. 89-115, Springer, London, 2013.
- Duraković S: *Opća mikrobiologija*. Prehrambeno-tehnološki inženjering, Zagreb, 1996.
- El-Zahaby HM, Gullner G, Kiraly Z: Effects of powdery mildew infection of barley on the ascorbate-glutathione cycle and other antioxidants in different host-pathogen interactions. *Biochemistry and Cell Biology* 85:1225-1230, 1995.

- Farooq M, Siddique K, Schubert S: Role of nitric oxide in improving plant resistance against salt stress, U *Ecophysiology and Responses of Plants under Salt Stress*, str. 413-425, Springer, London, 2013.
- Fodor J, Gullner G, Ádám A, Barna B, Komives T, Király Z: Local and systemic responses of antioxidants to tobacco mosaic virus infection and to salicylic acid in tobacco. *Plant Physiology* 114:1443-1451, 1997.
- Habschied K: Utjecaj plijesni iz roda *Fusarium* na mikotoksikološku kakvoću pšenice, pšeničnog slada i piva. *Doktorska disertacija*. Prehrambeno - biotehnološki fakultet, Zagreb, 2015.
- Halliwell B, Gutteridge J: *Free Radical in Biology and Medicine*. Oxford, UK, 2015.
- Hui YH, Nip WK, Nollet LM, Paliyath G, Simpson BK: *Food biochemistry and food processing*. Blackwell Publishing, Iowa, 2006.
- Jensen MAK, Potters G: Stress: The way of life. U *Plant Stress Physiology*, str. 9-14, CABI, Boston, 2017.
- Kar RK: ROS signaling: Relevance with site of production and metabolizam of ROS U *Reactive Oxygen Species and Oxidative Damage in Plants Under Stress*, str. 115-127, Springer, London, 2015.
- Katalenić M: Toksini *Fusarium* plijesni i drugi toksini (I.dio). *Meso* 4(5):31-35, 2004.
- Klapec T, Šarkanj B, Marček T: *Opasnosti vezane uz hranu*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2017.
- Kuźniak E, Skłodowska M: Fungal pathogen-induced changes in the antioxidant systems of leaf peroxisomes from infected tomato plants. *Planta* 222(1):192-200, 2005.
- Levine A, Tenhaken R, Dixon R, Lamb C: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79(4):583-593, 1994.
- Mađarić Z: *Pšenica*. Grupa izdavača, Osijek, 1985.
- Marček T: Učinak solnoga stresa na dihaploidne linije duhana (*Nicotiana tabacum* L.) otporne na Y virus krumpira. *Doktorska disertacija*. Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, 2013.
- Marček T, Viljevac - Vuletić M, Alivojvodić S, Bakula I, Španić V: Antioxidative response of wheat genotypes under *Fusarium* spp. infestation. U *Proceedings of International Conference 16th Ružička days „Today Science – Tomorrow Industry“*, str. 21-23. Croatian Society of Chemical Engineers, Faculty of Food Technology, University of Josip Juraj Strossmayer in Osijek, Vukovar, 2016.

- Mimica-Dukić N, Simin N, Svirčev E, Orčić D, Beara I, Lesjak M, Božin B: The effect of plant secondary metabolites on lipid peroxidation and eicosanoid pathway. *InTech*, DOI: 10.5772/48193, 2012.
- MZ, Ministarstvo zdravlja RH: *Pravilnik o najvećim dopuštenim količinama određenih kontaminanata u hrani*. Narodne novine 146/2012, 2012.
- Nakano Y, Asada K: Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate -specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* 22:867-880, 1981.
- Radwan DEM, Fayez KA, Mahmoud SY, Lu G: Modifications of antioxidant activity and protein composition of bean leaf due to Bean yellow mosaic virus infection and salicylic acid treatments. *Acta Physiologiae Plantarum* 32:891-904, 2010.
- Raymond J, Rakariyatham N, Azanza J: Purification and some properties of polyphenoloxidase from sunflower seeds. *Phytochemistry* 34:927-931, 1993.
- Redondo-Gomez S: Abiotic and biotic stress tolerance in plants. U *Molecular Stress Physiology of Plants*, str. 1-21, Springer, London, 2013.
- Sabol N: Kakvoća pojedinih sorti pšenice s područja Međimurske županije. *Diplomski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2012.
- Sharma A, Joshi N: Active changes in lignification related enzymes in Cluster bean after the attack of *Macrophomina phaseolina*. *Vegetos- An International Journal of Plant Research* 28(1):134-140, 2015.
- Siegel BZ, Galston W: The iso peroxidases of *Pisum sativum*, *Plant Physiology* 42:221-226, 1967.
- Smith AM, Coupland G, Dolan L, Harberd N, Jones J, Martin C, Sablowski R, Amey A: *Plant biology*. Garland Science, New York/Abingdon, UK, 2010.
- Sorahinobar M, Niknam V, Ebrahimzadeh H, Soltanloo H: Differential antioxidative responses of susceptible and resistant wheat cultivars against *Fusarium* head blight. *International Journal of Farming and Allied Sciences* 4(3): 239-243, 2015.
- Surai PF, Mezes M, Melnichuk SD, Fotina T: Mycotoxins and animal health: From oxidative stress to gene expression. *Krmiva* 50(1):35-43, 2008.
- Španić V: *Varijabilnost genotipova pšenice s obzirom na FHB otpornost i genetsku i divergentnost*, Poljoprivredni institut Osijek, Osijek, 2010.
- Španić V, Drezner G: Influence of *Fusarium* artificial infection on agronomic traits. *Glasnik zaštite bilja* 4:60-64, 2011.

- Španić V, Lemmens M, Drezner G: Variability of components of fusarium head blight resistance among wheat genotypes. *Cereal Research Communications* 41:420-430, 2013.
- Španić V: *Pšenica*, Poljoprivredni institut u Osijeku, 2016.
- Španić V, Viljevac-Vuletić M, Abičić I, Marček T: Early response of wheat antioxidant system with special reference to Fusarium head blight stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 115:34-43, 2017.
- Torres MA: ROS in biotic interactions. *Physiologia Plantarum* 138:414–429, 2010.
- Velikova V, Yordanov I, Edreva A: Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. *Plant Science* 151:59-66, 2000.
- Verma S, Dubey RS: Leads toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science* 164:645-655, 2003.
- Vukadinović V, Jug I, Đurđević B: *Ekofiziologija bilja*, NSS, Osijek, 2014.
- Whitehurst RJ, Law BA: *Enzymes in food technology*. Sheffield Academic Press, Sheffield, 2002.
- Windels C: Economic and social impacts of fusarium head blight: Changing farms and rural communities in the northern great plains. *Phytopathology* 90(1):17-21, 2000.
- Žlender V: Apoptosis - programmed cell death. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* 54:267-274, 2003.