

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

Ivan Bakula

**ANTIOKSIDACIJSKI ODGOVOR GENOTIPA PŠENICE (*TRITICUM
AESTIVUM* L.) OTPORNOG NA FUZARIJSKU PALEŽ KLASA PŠENICE NA
STRES IZAZVAN VRSTAMA RODA *FUSARIUM* SPP.**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, rujan, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

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. *Marija Viljevac Vuletić*, znan. sur.

Antioksidacijski odgovor genotipa pšenice (*Triticum aestivum* L.) otpornog na fuzarijsku palež klasa pšenice na stres izazvan vrstama roda *Fusarium* spp.

Ivan Bakula, 402/DI

Sažetak:

Vrste roda *Fusarium* spp. uzročnici su biotičkog stresa na žitaricama koji uzrokuje zaraznu bolest pšenice poznatiju kao fuzarijska palež klasa (FHB). FHB ima negativni učinak na kvalitetu zrna i prinosa što utječe na proizvodni sektor. Cilj ovoga rada bio je istražiti fiziološki odgovor FHB-otpornog genotipa pšenice „Apache“ izloženog vrstama roda *Fusarium* spp. prateći aktivnost gvajakol peroksidaze (POD), katalaze (CAT), askorbat peroksidaze (APX), polifenol oksidaze (PPO), sadržaj malondialdehida (MDA), ukupne topljive proteine i koncentraciju H₂O₂. Cvjetovi biljke u fazi izbacivanja prašnika, umjetno su zaraženi suspenzijom spora i ostavljeni u uvjetima *in vivo*. Klasovi su uzorkovani nakon 2., 4., 7. i 14. dana infekcije. Inficirane biljke pokazale su smanjenu aktivnost POD (2. dan) i CAT (2. i 4. dan) te povećanu količinu MDA u odnosu na kontrolu što govori kako ovi enzimi nisu dio ranog odgovora na stres. Nadalje, u zaraženih biljaka, nakon 4. dana uočena je indukcija aktivnosti POD te pad sadržaja MDA u odnosu na 2., 7. i 14. dan, iz čega slijedi kako POD u ovom genotipa doprinosi FHB-otpornosti. Povećana aktivnost CAT i APX te porast sadržaja MDA nakon 14. dana infekcije govori da navedeni enzimi u „Apache“ ne doprinose razumijevanju FHB-otpornosti.

Ključne riječi: FHB-otporni genotip, antioksidacijski enzimi, MDA, H₂O₂, *Fusarium* spp.

Rad sadrži: 43 stranice
16 slika
2 tablice
48 literaturnih referenci

Jezik izvornika: Hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:

- | | |
|--|---------------|
| 1. doc. dr. sc. Kristina Mastanjević | predsjednik |
| 2. doc. dr. sc. Tihana Marček | član-mentor |
| 3. dr. sc. <i>Marija Viljevac Vuletić</i> , znan. sur. | član-komentor |
| 4. izv. prof. dr. sc. Natalija Velić | zamjena člana |

Datum obrane: 27. rujan 2018.

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
Franje Kuhača 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: *Marija Viljevac Vuletić*, PhD

Antioxidative response of FHB resistant wheat (*Triticum aestivum* L.) genotype under *Fusarium* spp. exposure

Ivan Bakula, 402/DI

Summary:

Fusarium spp. species as elicitors of biotic stress in crops are causers of serious wheat disease named Fusarium head blight (FHB). FHB has a negative impact on grain quality and yield affecting thus manufacturing sector. The goal of present study was to check the physiological response of FHB-resistant wheat genotype "Apache" under *Fusarium* spp. exposure by measuring the activities of guaiacol peroxidase (POD), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX) and polyphenol oxidase (PPO), MDA (malondialdehyde) content, total soluble protein content and H₂O₂ concentration. At the anthesis stage, flowers were artificially infected by the spore suspension and left under natural conditions. The ears were collected in several occasions (2, 4, 7 and 14 days after infection). Treated plants showed decreased POD (2. day) and CAT (2. and 4. day) as well as enlargement of MDA content compared to control suggesting that POD and CAT were not included in early response. After 4th day, *Fusarium* treated plants exhibited induction of POD activity, decline in MDA content compared to 2nd, 7th, and 14th day referring to its FHB-resistance. Higher CAT and APX activity, together with the increased MDA content after 14th day suggest that those enzymes in "Apache" do not contribute in understanding the FHB-resistance.

Key words: FHB-resistant genotype, antioxidative enzymes, MDA, H₂O₂ concentration, *Fusarium* spp.

Thesis contains: 43 pages
16 figures
2 tables
48 references

Original in: Croatian

Defense committee:

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

Defense date: September 27, 2018

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

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. sc. Tihani Marček koja je pokazala izrazitu stručnost i znanje, te iznad svega i strpljenje u pomoći oko pisanja ovog diplomskog rada. Hvala također svim prijateljima i kolegama koji su mi uljepšali dane studiranja.

Posebnu zahvalu želim uputiti svojoj obitelji koja me je podržavala i upućivala na pravi put

Za kraj, NAJVEĆU zahvalu želim izraziti svojim roditeljima, koji su bili uz mene unatoč svemu, te bez kojih sve dosad postignuto nebi bilo moguće.

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. MORFOLOŠKA SVOJSTVA PŠENICE	4
2.2. <i>FUSARIUM SPP.</i>	7
2.3. FUZARIJSKA PALEŽ KLASA	8
2.4. BIOTIČKI STRESNI ČIMBENICI	10
2.5. REAKTIVNE KISIKOVE ČESTICE	10
2.6. OŠTEĆENJE MEMBRANSKIH LIPIDA	11
2.7. OBRAMBENI SUSTAV BILJKE	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO	14
3.1. ZADATAK	15
3.2. MATERIJALI I METODE	15
3.2.1. <i>Modelna biljka</i>	15
3.2.2. <i>Poljski pokusi</i>	15
3.2.3. <i>Uzorkovanje tkiva</i>	15
3.2.4. <i>Ekstrakcija tkiva za određivanje aktivnosti antioksidacijskih enzima</i>	16
3.2.5. <i>Određivanje aktivnosti gvajakol peroksidaze (POD)</i>	16
3.2.6. <i>Određivanje aktivnosti askorbat peroksidaze (APX)</i>	17
3.2.7. <i>Određivanje aktivnosti katalaze (CAT)</i>	17
3.2.8. <i>Određivanje aktivnosti polifenol oksidaze (PPO)</i>	18
3.2.9. <i>Određivanje koncentracije proteina po Bradfordu (1976)</i>	18
3.3. EKSTRAKCIJA TKIVA ZA ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE VODIKOVOG PEROKSIDA (H ₂ O ₂) I SADRŽAJA MALONDIALDEHIDA (MDA)	20
3.4. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE H ₂ O ₂	20
3.5. ODREĐIVANJE SADRŽAJA MDA	21
3.6. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	21
4. REZULTATI	22
4.1. AKTIVNOST ANTIOKSIDACIJSKIH ENZIMA I KONCENTRACIJA TOPIVIH PROTEINA	23
4.1.1. <i>Aktivnost gvajakol peroksidaze (POD)</i>	23
4.1.2. <i>Aktivnost askorbat peroksidaze (APX)</i>	23
4.1.3. <i>Aktivnost katalaze (CAT)</i>	24
4.1.4. <i>Aktivnost polifenol oksidaze (PPO)</i>	25
4.1.5. <i>Koncentracija topivih proteina</i>	26
4.2. KONCENTRACIJA VODIKOVOG PEROKSIDA (H ₂ O ₂)	26
4.3. SADRŽAJ MALONDIALDEHIDA	28
5. RASPRAVA	29

6. ZAKLJUČAK.....	31
7. LITERATURA.....	33

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

Pšenica (*Triticum aestivum* L.) je jedna od najstarijih i najrasprostranjenijih poljoprivrednih kultura u svijetu uz rižu i kukuruz. Važna je namirnica u prehrani ljudi zbog svog visokog nutritivnog sadržaja i koristi se u mlinarstvu, farmaceutskoj i prehrambenoj industriji. Zbog velike rasprostranjenosti, provode se istraživanja u svrhu poboljšanja otpornosti, povećanja prinosa te podizanja same kvalitete sirovine i finalnih proizvoda nastalih iz sirovine. Bolesti koje direktno utječu na smanjenje prinosa i lošu kvalitetu zrna, u novije vrijeme su česti predmeti istraživanja. Štoviše, istraživanja su usmjerena na bolje razumijevanje same bolesti, kao i shvaćanje razloga otpornosti nekih genotipa te otkrivanje novih načina zaštite usjeva.

Fuzarijska palež klasa (*Fusarium head blight*, FHB) jedna je od najopasnijih bolesti pšenice. To je gljivično oboljenje koje umanjuje prinos preko sterilnosti cvijeta te uzrokuje slabije punjenje zrna što rezultira zrnima nepravilnog oblika i smanjene mase samog zrna. Najčešći uzročnici su gljivice vrsta roda *Fusarium*. Nadalje, pošto se radi o gljivici, bolest predstavlja opasnost za zdravlje ljudi i životinja zbog proizvodnje mikotoksina. U konačnici, širenje bolesti predstavlja problem jer se spore roda *Fusarium* šire zrakom, a posebnu opasnost za širenje bolesti predstavljaju više temperature i veći stupanj vlažnosti.

U konačnici, od velikog je značaja razumjeti načine na koji biljka reagira na patogene te mehanizme obrane kao mjeru prevencije od zaraze. Cilj ovog istraživanja je ispitati utjecaj vrsta roda *Fusarium* na genotip pšenice otporan na FHB te zabilježiti antioksidacijski odgovor uslijed stresa uzrokovanog infekcijom. Rezultati ovog istraživanja mogli bi biti od koristi u razvijanju boljih mjera zaštite i možda u razvitku otpornijih genotipa pšenice u borbi protiv FHB.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. MORFOLOŠKA SVOJSTVA PŠENICE

Pšenica je prema sistematskoj klasifikaciji svrstana u porodicu *Poaceae*, rod *Triticum* L., subtribus *Triticinae*, tribus *Triticeae* Dumort (Španić, 2016). Dijeli se na ozimu i jaru, pri čemu se ističe ozima, jer daje veće prinose, te samim time zauzima veće površine i ima veći ekonomski značaj. Ona daje i stabilniji prinos od jare. Ozima se sije u jesen, otpornija je na niže temperature, ima dužu vegetaciju, busa jače, te ima znatno duži stadij jarovizacije. Jara pšenica se sije u proljeće, pokazuje veću otpornost na toplinu i sušu, te daje kvalitetnije zrno i brašno od ozime.

Osnovni dijelovi pšenice su korijen, stabljika, list, cvijet i cvat te plod.

Korijen pšenice (**Slika 1**) čine primarni i sekundarni korjenov sustav. Primarni korjenov sustav se sastoji od glavnog klicinog korijena, koji početkom klijanja prvi prodre u tlo, i od bočnih klicinih korjenčića. Sekundarni korjenov sustav nastaje iz čvora busanja, koji se formira 15ak dana nakon nicanja pri temperaturi od 15°C, te se nalazi iznad primarnog korjenova sustava. Razvoj korijena pšenice uvjetovan je kemijskim svojstvom tla, strukturom i vlažnosti tla, temperaturom tla i zraka te ostalim okolišnim uvjetima (Španić, 2016).



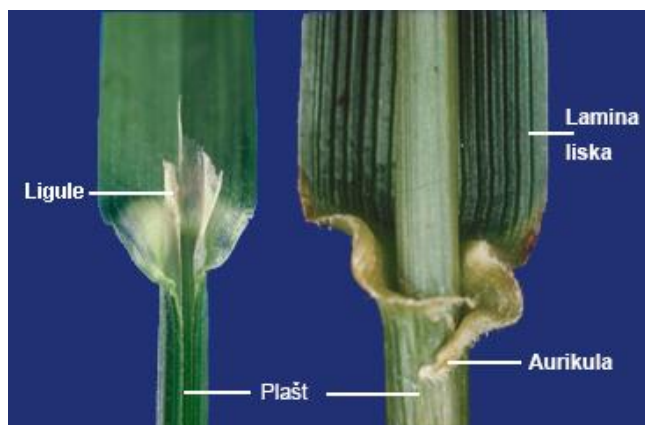
Slika 1 Korijen pšenice kroz stupnjeve razvoja [preuzeto sa stranica: <http://agropedia.iitk.ac.in/content/wheat-root-system> (2018)]

Uloga primarnog korjenova sustava je prodiranje u tlo i opskrba biljke vodom, dok sekundarni sustav nastaje u fazi busanja, te mu je razvoj uvjetovan višom temperaturom i vlažnosti tla na dubini čvora busanja (Mađarić, 1985).

Stabljika pšenice nastaje iz klicinog pupoljka (lat. *plumula*). Sastoji se od 4-5 članaka (lat. *nodium*) između kojih se nalaze koljenca (lat. *internodium*), cilindričnog je oblika, izvana je gola i glatka, a unutrašnjost stabljike je šuplja. Dužina stabljike je 50-120 cm, a na vrhu se nalazi klas. Stabljika se u

busanju podzemno grana iz čvora busanja. Tijekom busanja se počinje formirati klas. Zatim slijedi vlatanje (izduživanje stabljike) te se završava klasanjem. Površina stabljike je prekrivena jednoslojnom epidermom na čijoj površini se nalazi manji broj uzdužno postavljenih puči. Ispod epiderme, nalazi se primarna kora s mehaničkim tkivom, a unutrašnjost stabljike gradi središnji cilindar u kojemu se nalaze osnovno (parenhimsko) tkivo i provodno tkivo (provodni snopići). Busanje može biti više ili manje izraženo, ovisno o sorti pšenice, krupnoći zrna, hranjivima u tlu, te trajanju busanja koje ovisi o temperaturi (Španić, 2016).

List pšenice (**Slika 2**) sastoji se od lisne plojke i rukavca, jezička (lat. *ligulae*) i uški. Lisna plojka je duga i linearna sa dobro izraženom srednjom nervaturom, koja dijeli plojku na dva jednaka dijela, od kojih svaki ima niz paralelnih bočnih rebara. Rukavac je dio lista koji je donji dijelom priljubljen uz stabljiku, a jezičak je tanki, bezbojni dio koji obavija stabljiku. Sorte pšenice se mogu razlikovati po veličini, obliku i boji jezička i uški.



Slika 2 List pšenice [preuzeto sa stranica: <http://agronomija.rs/2014/psenica/> (2018)]

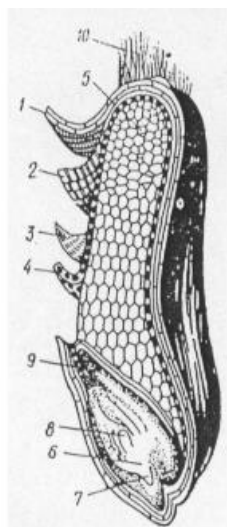
Anatomski gledano, list pšenice je diferenciran na gornju i donju epidermu, između kojih je mezofil s mehaničkim i provodnim tkivom. Gornja epiderma je građena od više tipova stanica, ali je karakteristično da postoje tzv. motorne stanice koje su većih dimenzija u odnosu na ostale epidermalne stanice te se osjetljive na promjene turgora te se u uvjetima visokih temperatura i suša skupe i uviju list. Donja epiderma je izgrađena od dugih cilindričnih stanica s valovitim stjenkama. Površinu epiderme prekriva epikutikularni vosak, koji u uvjetima visoke insolacije štiti list od pretjeranog gubitka vode te predstavlja fizičku barijeru za napad virusa, patogenih bakterija i spora gljiva.

Cvat pšenice naziva se sastavljeni klas (lat. *spica composita*) i najčešći je oblik cvata kod većine žitarica. Pšenica ima više tipova klasa: Četvrtasti, vretenasti i valjkasti. Klas nosi klasno vreteno koje je diferencirano na nodije i internodije, a na svakom nodiju se nalazi klasić. U svakom klasiću bude 2-5 cvjetova, a svaki cvijet sadržava tri prašnika, perastu njušku i plodnicu gdje se razvija zrno nakon oplodnje. Svaki od klasića je zaštićen sa dvije vanjske pljeve, a između obuvca i plodnice tučka nalaze

se dvije pljevčice koje tijekom cvjetanja primaju vodu te bubrenjem pritišću pljevice i uzrokuju otvaranje cvijeta. Pšenica je samoplodna biljka, a do oplodnje dolazi nakon što je oprašivanjem zrelo peludno zrnice dospjelo na njušku tučka. Optimalni uvjeti za oplodnju iznose: dnevna temperatura 20-25°C, noćna oko 11°C uz relativnu vlažnost zraka od 70%. Slijedi sazrijevanje zrna kroz četiri faze: mliječna zrioba, tjestasto stanje, voštana i puna zrioba.

Plod pšenice (**Slika 3**), ili pšeno, izvana obavija omotač koji čini usplođe i sjemena lupina (lat. *testa*), dok se u unutrašnjosti nalaze endosperm i klica. Omotač štiti plod i klicu od mehaničkog oštećenja, te preko njega sjeme dobiva vodu u vrijeme bubrenja i klijanja. Endosperm se sastoji od dva dijela: vanjski aleuronski sloj sagrađen od stanica ispunjenih aleuronskim zrcima (rezervne bjelančevine), te unutrašnjeg endosperma koji je bogat ugljikohidratima (Španić, 2016). Zrno je golo, sa izraženom bradicom i brazdicom, žutosmeđe ili crvenkaste boje, ovisno o sorti. Po presjeku, zrno može imati caklavu ili brašnastu građu što ovisi o veličini škrobnih zrnaca. Velika škrobna zrnca daju caklastu, dok sitna škrobna zrnca daju brašnastu građu sjemena.

Klica predstavlja zametak nove biljke te zauzima mali dio zrna (1,5-3,0%). Bogata je bjelančevinama, uz dobar aminokiselinski sastav u odnosu na ostatak zrna. Isto tako je bogata i sa nezasićenim masnim kiselinama u ulju klice, vitaminima, mineralima te sadrži i nešto šećera.

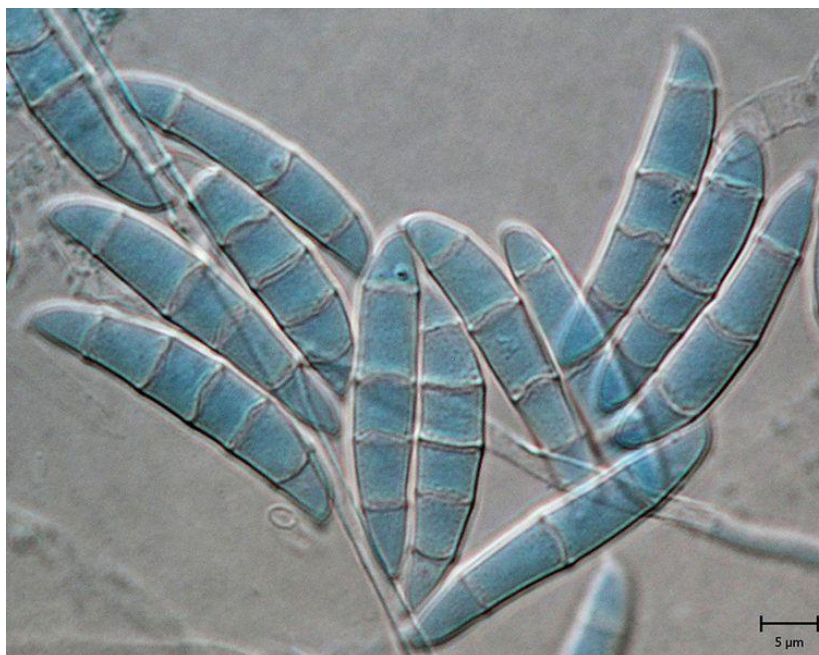


Slika 3 Prikaz uzdužnog presjeka zrna pšenice 1-3 Omotač ploda i sjemena, 4. Aleuronski sloj, 5. Endosperm, 6. Klica, 7. Začetak korjenčića, 8. Pupiljak, 9. Štitić, 10. Brazdica (Španić, 2016)

2.2. *Fusarium* spp.

Vrste roda *Fusarium* s obzirom na sistemsku pripadnost, pripadaju carstvu *Fungi* ili Gljiva. Gljive su pradavni oblik života, 400 milijuna godina i starije, eukarioti, nefotosintetski organizmi, sa stanicom obavijenom staničnom stjenkom, u pravilu sastavljenom od polisaharida hitina. Vrste roda *Fusarium* su plijesni, koje čine veliku skupinu gljiva. Mikroskopske su građe, tijelo im je građeno od gustog sustava cjevastih stanica bez klorofila, tzv. hife, koje su odgovorne za pahuljast ili paučinast izgled makroskopskih kolonija plijesni. One rastu kao isprepletana masa, koja se zajednički naziva micelij. Klasifikacija plijesni je moguća prema tome da li su hife septirane ili ne. Septirane hife imaju male pregrade koje tvore fizičku granicu, prema kojoj se unutar hife, razlikuju pojedinačne stanice sa jezgrom, dok je omogućeno strujanje citoplazme i ostalih organela. Najveći broj hifa je vegetativan, koje rastu i oblikuju tijelo plijesni u koloniju. Zračne hife na svojim krajevima nose strukture za razmnožavanje, tzv. *spore*, od kojih svaka može, u povoljnim uvjetima, stvoriti novu koloniju plijesni. Spore se proizvode u velikom broju, lagano se šire te su mnoge otporne na uvjete pri kojima se uništavaju vegetativne stanice. Plijesni mogu tvoriti i spolne i ne spolne spore. Spolne se stvaraju u spolnome ciklusu koji teče naizmjenično između diploidnog i haploidnog stadija. Nespolne se stvaraju u procesu jednostavnog dijeljenja stanice u odsutnosti fertilizacije i mejoze. Može se pretpostaviti da najveći broj spora pripada konidijama ili konidiosporama, koje se stvaraju na posebnim hifama, u grozdastim nakupinama. Konidije velikog broja plijesni mogu inficirati ljude te uzrokovati opasne infektivne bolesti. Plijesni se mogu razvijati i vegetativno, u tom slučaju hife jednolično i neprekidno rastu, tvoreći nove kolonije (Duraković, 2002).

Identifikacija *Fusarium* vrsta može se provesti na osnovu primarnih i sekundarnih karakteristika. Primarne karakteristike uključuju oblik makrokonidija koje su kratke, zdepaste, debelih stjenki 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* (Slika 4) 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 4 Izgled makrokonidija *F. culmorum* pod mikroskopom [preuzeto sa stranica:

<https://www.biomin.net/es/blog-posts/deoxynivalenol-in-feed-causes-growth-suppression/> (2018)]

Fusarium vrste se pojavljuju na strnim žitaricama (pšenica, ječam, zob, riža), od kojih najdominantnije u svijetu su *F. graminearum*, *F. culmorum* i *F. avenaceum*. U manje zastupljene vrste se ubrajaju: *F. poae*, *F. cerealis*, *F. tricinctum* i dr. *F. graminearum* je zastupljeniji u vlažnim i toplim područjima (zapadna, centralna i istočna Europa), dok su *F. culmorum* i *F. avenaceum* češći u hladnijim europskim zemljama (Španić, 2010).

Mikotoksini su sekundarni produkti metabolizma plijesni, a u organizam se mogu unijeti putem hrane, udisanjem ili pak preko kože. *Fusarium* vrste proizvode mikotoksine koji su štetni za zdravlje ljudi i životinja od kojih su najčešći fumonizini, deoksinivalenol (DON), nivalenol (NIV) i zearalenon (ZEA). 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).

2.3. FUZARIJSKA PALEŽ KLASA

Fuzarijska palež klasa (FHB) je bolest pšenice za koju se smatra da je ekonomski vrlo štetna za tu kulturu. Ona umanjuje prinos preko sterilnosti cvijeta te uzrokuje slabo punjenje zrna, što se odražava na veličinu, oblik i masu zrna. Najčešći uzročnici FHB-a su gljivice vrsta roda *Fusarium*, od kojih najčešće: *Fusarium graminearum*, *F. culmorum* i *F. avenaceum*. Može se vidjeti da su zaražena zrna često

nepravilnog oblika i štura. *Fusarium* plijesni razgrađuju proteine, celulozu i amilozu stoga je kvaliteta sjemena lošija zbog zaraze (Španić, 2010).

Optimalan period zaraze fuzarijskom paleži klasa je pri cvjetanju, ali može se pojaviti sve do kraja vegetacije. Pouzdana infekcija nastaje kod temperatura iznad 15°C, optimalno 20-25°C, te sadržaj vlage od 95% (Španić, 2010). Na sami intenzitet bolesti značajno utječe osjetljivost sorata, te agresivnost i patogenost uzročnika bolesti. Ovisno o vremenu zaraze u vegetaciji biljke ovisi i stupanj štete nastale na zrnu. Zrna zaražena nakon oplodnje su sitnija, smežurana i često gube klijavost, dok ukoliko je do zaraze došlo kasnije u vegetaciji zrna su dobro nalivena, imaju „normalnu“ masu i izgled te u pravilu ne dolazi do smanjene klijavosti (**Slika 5**). Zaraza može zahvatiti pojedine klasiće, dio klasa ili cijeli klas (**Slika 6**). Simptomi bolesti se lako uočavaju u mliječnoj zriobi kada bi zdravi klasovi trebali biti zelene boje i povinuti od težine zrna, dok su bolesni klasovi ili dijelovi klasa slamnato žute boje te stoje uspravno. Gubitci zarazom mogu biti značajni. Na masi od 1000 zrna, ukoliko su klasovi pšenice zaraženi u punoj cvatnji gljivicom *Fusarium graminearum*, zabilježen je gubitak od 55,10%, a klijavost smanjena između 54,00% i 66,75% (Ćosić i sur., 2006).



Slika 5 Prikaz zdravog zrna (desno) i FHB zaraženog (lijevo) [preuzeto sa stranica:

http://www.uky.edu/Ag/Wheat/wheat_breeding/FHB.htm#FHBdiseasecycle (2018)]



Slika 6 Fuzarijska palež klasa na klasu pšenice [preuzeto sa stranica:

<https://www.agroklub.com/ratarstvo/vaznost-fungicidnog-tretmana-zitarica/2991/> (2018)]

Otpornost pšenice na FHB je kompleksno svojstvo koje je pod utjecajem mnoštva čimbenika, od obrambenih reakcija domaćina, pa do karakteristika samog klasića. Istraživanje otpornosti je otežano, jer je svaki od tih čimbenika podložan utjecaju okolnih uvjeta. Svojstvo otpornosti na FHB je horizontalnog tipa, što bi značilo da ukoliko određeni genotip pšenice posjeduje tu otpornost na jednu od vrsta roda *Fusarium*, npr. *F. culmorum*, tada će isti taj genotip biti otporan i na drugu vrstu, npr. *F. avenaceum* (Španić, 2010).

2.4. BIOTIČKI STRESNI ČIMBENICI

Biotički čimbenici obuhvaćaju sve utjecaje koji dolaze od drugih organizama i koji imaju djelovanje na određenu vrstu. Biotički stresni čimbenici su izazvani od strane drugih živih bića, npr. virusi, gljivice, bakterije i kukci. Mogu djelovati direktno ili indirektno izazivajući jači ili slabiji odgovor kod određene vrste. Biotički stres utječe na rast i razvoj poljoprivrednih biljnih vrsta kao i na njihovu produktivnost. Stres prema Vukadinoviću i sur. (2014) može se definirati kao svako stanje biološkog sustava koje odstupa od optimuma, te kao djelovanje bilo kojeg čimbenika koji nepovoljno utječe na rast i razvoj biljke. Biljke se prilagođuju uvjetima stresa u dva stupnja: aklimatizacijom i adaptacijom. Aklimatizacijom biljka jača otpornost pri kratkotrajnom izlaganju nepovoljnom utjecaju, dok se adaptacija odnosi na genetski određeni stupanj otpornosti (Vukadinović i sur., 2014).

Osim biotičkog, postoji i abiotički stres. Abiotički stresni čimbenici su svi oni koji ne dolaze od živih bića, npr. izrazito visoke i niske temperature, suša, teški metali, salinitet i dr. (Redondo-Gomez, 2013).

2.5. REAKTIVNE KISIKOVE ČESTICE

Jedna od štetnih posljedica stresa na biljku je proizvodnja reaktivnih kisikovih vrsta (ROS). Mogu biti visoko toksični i uzrokuju lipidnu peroksidaciju, oštećenje DNA te denaturaciju proteina (Marček, 2013).

Reaktivne kisikove vrste su uglavnom slobodni radikali, odnosno, nestabilni atomi ili molekule koji u vanjskoj ljusci imaju jedan ili više nesparenih elektrona. Oni mogu nastati homolitičkim cijepanjem kovalentne veze, gdje svaki elektron ostaje vezan u susjednom atomu, zatim primanjem jednog elektrona ili oduzimanjem jednog elektrona atomu (Štefan i sur., 2007).

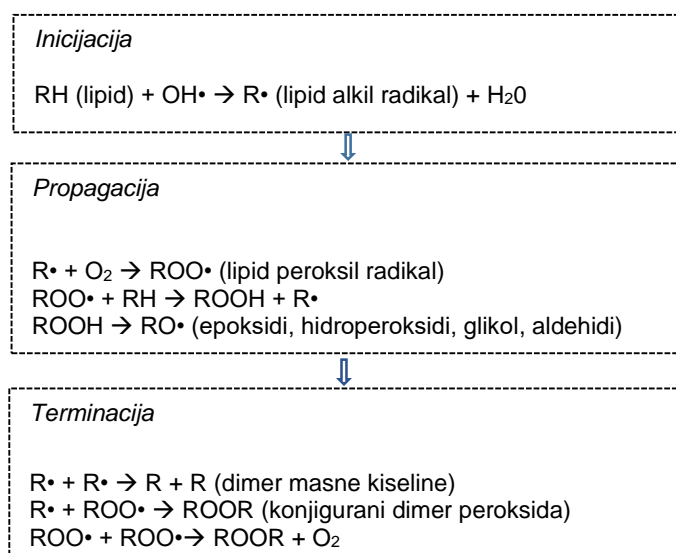
ROS su visoko reaktivne kisikove vrste koje uključuju kisikove radikale poput superoksida ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil (OH^{\cdot}) i peroksil radikala (RO_2^{\cdot}), uz određene neradikalne oksidirajuće molekule poput vodikovog peroksida (H_2O_2), hipoklorne kiseline ($HOCl$) i organske hidroperokside ($ROOH$) iz kojih lako nastanu radikali (Simon i sur, 2000). Tijekom metaboličkih i fizioloških reakcija poput disanja, fotorespiracije i fotosinteze ROS se stvaraju u mitohondrijima, u endoplazmatskom retikulumu, u peroksisomima i kloroplastima, na plazmatskoj membrani te u apoplastu. Uslijed infekcije biljke

patogenom na površini biljke dolazi do oksidativne eksplozije, odnosno prekomjernog nakupljanja ROS. Cilj oksidativne eksplozije je ograničiti ulazak patogena na način da stanice koje su zahvaćene infekcijom odumiru („programirana smrt stanice“) čime se smanjuje količina hranjivih tvari za rast, razvoj i širenje gljivice. Najvažnija molekula oksidativne eksplozije je H_2O_2 . Oksidativna eksplozija na površini biljke uzrokuje oksidaciju vodikovog peroksida s peroksidazama što dovodi do brzog, unakrsnog povezivanja strukturalnih proteina stanične stjenke i jačanja fizičke barijere za ulazak patogena. Osim što sprečava prodor patogena, H_2O_2 je i signalna molekula koja aktivira obrambeni odgovor biljke (Levine i sur., 1994; Nanda i sur., 2010).

2.6. OŠTEĆENJE MEMBRANSKIH LIPIDA

Osim strukturalnih proteina, lipidi su sastavni dio fosfolipidnog dvosloja bioloških membrana. Biološke membrane su visoko selektivne polupropusne barijere koje razdvajaju stanicu od okoline između kojih djeluju kao posrednici u izmjeni tvari i energije, te imaju važnu ulogu u primanju informacija.

Usljed stresa u biljci, izazvanog od npr. infekcije patogenom, dolazi do prekomjerne proizvodnje ROS koji reagiraju s membranskim lipidima na način da ih oštećuju te dolazi do lipidne peroksidacije. Lipidna peroksidacija je lančana reakcija u kojoj dolazi do degradacije višestruko nezasićenih masnih kiselina uslijed reakcije sa slobodnim radikalima. Reakcija se odvija kroz tri koraka: inicijacija, propagacija i terminacija (**Slika 7**). Kod inicijacije slobodni radikali napadaju ugljikovu dvostruku vezu u membranskim lipidima zamjenjujući vodik u vezi s kisikom, pri čemu nastaju slobodni lipidni radikali ($R\bullet$) koji pokreću stupanj propagacije, tj. lančanu reakciju. Kao konačni reaktivni produkti nastaju malondialdehid (MDA), 4-hidroksinonenal i akrolein. Membrana zahvaćena procesom lipidne peroksidacije gubi svojstvo fluidnosti, ne kontrolirano propušta molekule koje inače ne prolaze kroz membranu i oštećuju se membranski proteini (Gill i Tuteja, 2010). MDA se tijekom reakcije stvara u malim količinama, može izazivati mutagena oštećenja te služi kao pokazatelj lipidne peroksidacije (Štefan i sur., 2007). Ukoliko je došlo do slabije lipidne peroksidacije, stanica u cilju obrane aktivira antioksidacijski sustav, dok 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).



Slika 7 Mehanizam lipidne peroksidacije [modificirano prema Gill i Tuteja (2010)].

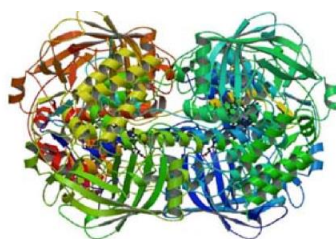
2.7. OBRAMBENI SUSTAV BILJKE

Često su biljke izložene napadu različitih patogenih organizama poput virusa, bakterija i gljivica te su primorane razviti određene mehanizme obrane od istih. Dvije su vrste obrambenih mehanizama: enzimski i neenzimski. Enzimski antioksidativni sustav obrane čine katalaza (CAT), askorbat peroksidaza (APX), gvajakol peroksidaza (POD), glutation reduktaza (GR) i superoksid dismutaza (SOD), dok se u neenzimski mehanizam obrane ubrajaju askorbinska kiselina, flavoni, karotenoidi, tokoferoli i antocijani (Djanaguiraman i Vara Prasad, 2013; Marček, 2013).

Enzimi su katalizatori biološkog porijekla, termolabilni i visoko specifični, a po kemijskom sastavu su jednostavne ili složene bjelančevine (Miholjčić, 1981). Ubrzavaju reakcije, smanjivanjem energije aktivacije kemijske reakcije, za faktor koji može premašiti milijun, a iz reakcije izlaze ne promijenjeni. Tvari koje ulaze u reakcije sa enzimima su supstrati, a tvari koje nastaju se nazivaju produkti. Aktivnost enzima se može inhibirati vezanjem malih molekula ili iona ili denaturacijom promjenom pH ili temperature. Enzimi su podijeljeni prema tipu reakcije koju kataliziraju (hidroliza, izomerizacija, prijenos skupina...) te se svrstavaju u šest skupina: oksidoreduktaze, transferaze, hidrolaze, liaze, izomeraze i ligaze (Berg i sur., 2013).

Peroksidaza (EC 1.11.1.7 – POD) je enzim koji je prisutan u biljnim i životinjskim tkivima, gdje ima ulogu u izgradnji stanične membrane. Osim toga, njegova funkcija je da katalizira oksidaciju raznih supstanci (fenola, aromatskih spojeva...) vodikovim peroksidom kojeg dalje razlaže na H_2O i O_2 (Miholjčić, 1981). Prema istraživanju Chittoor i sur (1999), POD sudjeluje u biosintezi lignina i suberina te na taj način potpomaže jačanju stanične stjenke čime se povećava otpornost biljke na patogen.

Katalaza (EC 1.11.1.6 - CAT) je enzim koji je zastupljen kod gotovo svih organizama (mikroorganizmi, biljke, životinje, čovjek). Katalaza je tetramerni protein, sastavljen od četiri polipeptidna lanca. Sudjeluje u antioksidativnoj zaštiti organizma. Funkcija mu je razlaganje H_2O_2 na H_2O i O_2 pomoću četiri feriprotoporfirinske grupe. Najveće količine katalaze kod biljaka se mogu naći u peroksisomima. Jedna molekula katalaze može razložiti milijune molekula vodikovog peroksida svake sekunde (Djanaguiraman i Vara Prasad, 2013).



Slika 8 Prikaz kvaterne strukture katalaze [preuzeto sa stranica:

<https://biology441.wordpress.com/2016/10/01/catalase-breaking-the-bad/> (2018)]

Askorbat peroksidaza (EC 1.11.1.11 - APX) je enzim koji se nalazi u mitohondrijima, peroksisomima, kloroplastima, i citosolu (Caverzan i sur., 2012). Uloga mu je razgradnja H_2O_2 korištenjem askorbata kao supstrata, koji služi kao elektron donor u askorbat-glutationskom ciklusu (ASH-GSH). APX u odnosu na POD i CAT ima veću kinetiku, stoga i veći afinitet za H_2O_2 (Marček, 2013).

Polifenol oksidaza (EC 1.14.18.1 - PPO) je enzim koji spada u skupinu enzima koji sadrže ione bakra kao prostetsku skupinu. Nalaze se u plastidima i koriste fenolne spojeve kao supstrate. Kataliziraju hidroksilaciju monofenola do o-difenola i oksidaciju o-difenola u o-kinone koji kasnije reagiraju sa aminima ili fenolima te dolazi do enzimskog posmeđivanja (Kruger i sur., 1987). PPO se pripisuje bitna uloga u obrani biljke od patogena jer sudjeluje u sintezi fenola, koji su dio neezimatskog antioksidativnog sustava (Sharma i Joshi, 2015).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Zadatak ovog diplomskog rada je ispitati utjecaj vrsta roda *Fusarium* na genotip pšenice „Apache“ koji je otporan na fuzarijsku palež klasa pšenice. Odgovor biljke na stres izazvan vrstama roda *Fusarium* praćen je nakon 2., 4., 7. i 14. dana od infekcije mjerenjem aktivnosti antioksidacijskih enzima (CAT, PPO, POD i APX), utvrđivanjem stupnja oštećenosti membrana (lipidna peroksidacija), mjerenjem koncentracije H₂O₂, te određivanjem sadržaja proteina.

3.2. MATERIJALI I METODE

3.2.1. Modelna biljka

U ovom istraživanju koristio se genotip pšenice „Apache“ otporan na fuzarijsku palež klasa (FHB) (Španić i Drezner 2011, Španić i sur. 2013) (**Slika 9**). To je ozima, srednje rana, stabilna sorta pšenice, visokog potencijala rodosti i dobre kvalitete krušarice (<http://www.ppkompleks.hr/hr/Page2.aspx>)



Slika 9 Apache [preuzeto sa stranica: <http://www.isterra-seeds.com/en/winter-wheat/apache> (2018)]

3.2.2. Poljski pokusi

Poljski pokusi su provedeni 2016. godine na Poljoprivrednom institutu Osijek. Klasovi pšenice su bili tretirani suspenzijom spora vrsta *F. graminearum* i *F. culmorum* u fazi cvatnje. Dio biljaka je predstavljao kontrolu te nije bio umjetno tretiran. Poljski pokusi su rađeni u dvije repeticije (Španić i sur., 2017)

3.2.3. Uzorkovanje tkiva

Uzorkovanje tretiranih i ne tretiranih klasova se vršilo 2., 4., 7. i 14. dana nakon inokulacije. Za istraživanje je uzorkovano po pet klasova za tretman te isti broj za kontrolu. Uzorci su pohranjeni na -80°C do analiza.

3.2.4. Ekstrakcija tkiva za određivanje aktivnosti antioksidacijskih enzima

Aktivnost antioksidacijskih enzima se određivala tako što su klasovi bili usitnjeni u tarioniku uz dodatak tekućeg dušika te polivinilpirolidona (PVP). Odvagano je 0.25 g uzorka, kojemu je dodano 1 mL ekstrakcijskog pufera koji je sadržavao 50 mM kalij-fosfatni pufer pH 7.0, 0.1 mM EDTA i 5 mM askorbinske kiseline. Uzorak je protresen na miješalici te ostavljen na ledu 15 minuta. Slijedi centrifuga 15 minuta pri 14000 rcf na 4°C. Supernatant je prenesen u čistu Eppendorf epruvetu, zatim su uzorci ponovno reekstrahirani dodatkom 1 mL ekstrakcijskog pufera. Nakon centrifugiranja, supernatanti su spojeni u jednu epruvetu. Iz tako dobivenih ekstrakata, određivana je aktivnost antioksidacijskih enzima i koncentracija ukupnih proteina. Sve aktivnosti enzima izražavane su kao količina nastalih produkata u mikromolima po minuti po miligramu proteina (U) [U mg⁻¹proteina]. Mjerenja aktivnosti antioksidacijskih enzima i koncentracije ukupnih proteina određivala su se spektrofotometrijski (Analytik Jena, EU-Njemačka) u pet repeticija.

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 H₂O₂ i 0.2 M kalij-fosfatnog pufera pH 5.8.

Reakciju smo započeli 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 kiveti, a korekcija je rađena s destiliranom H₂O.

Izračun aktivnosti POD:

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

ΔA -srednja vrijednost promjene apsorbancije

60-vrijeme mjerenja (s)

V_{uk} -ukupni volumen reakcijske smjese (1000 µL)

V_{uz} -volumen uzorka (10 µL)

26.6-ekstinkcijski koeficijent (mM⁻¹cm⁻¹)

m_p -masa proteina (g)

3.2.6. Određivanje aktivnosti askorbat peroksidaze (APX)

APX je određena prema metodi Nakano i Asada (1981). Reakciju smo započeli dodavanjem 10 μL 12 mM H_2O_2 (13.6 μL 30% H_2O_2 dodati u 10 mL dH_2O) u 955 μL reakcijske smjese. Reakcijska smjesa sastojala se od 955 μL 50 mM kalij fosfatnog pufera (pH 7.0) uz dodatak 0.1 mM EDTA, 10 μL 25 mM askorbinske kiseline (0.444g askorbata otopiti u 10 mL 50 mM kalij-fosfatnog pufera sa 0.1 mM EDTA) i 25 μL ekstrakta.

Aktivnost APX se mjerila na 290 nm (UV područje), svake sekunde tijekom 2 min u kiveti od kvarcnog stakla, a korekcija se provodi destiliranom H_2O . Aktivnost APX izrazili smo kao pad koncentracije supstrata (askorbinske kiseline).

Izračun aktivnosti APX:

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

ΔA -srednja vrijednost promjene apsorbancije

60-vrijeme mjerenja (s)

V_{uk} -ukupni volumen reakcijske smjese (1000 μL)

V_{uz} -volumen uzorka (25 μL)

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_2O_2 (76.5 μL 30% H_2O_2 se dodaje u 150 mL 50 mM kalij-fosfatnog pufera). Reakcija započinje dodatkom 50 μL uzorka u 950 μL reakcijske smjese. Aktivnost CAT se mjerila pri valnoj duljini 240 nm, svake sekunde tijekom 1 minute. Mjerenje se provodilo u kvarcnoj kiveti, a korekcija destiliranom H_2O .

Izračun aktivnosti CAT:

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

ΔA -srednja vrijednost promjene apsorbancije

60-vrijeme mjerenja (s)

V_{uk} -ukupni volumen reakcijske smjese (1000 μL)

V_{uz} -volumen uzorka (50 μ L)

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

m_p -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 μ L uzorka tj. enzimskog ekstrakta.

Reakciju smo započeli dodatkom 15 μ L uzorka u reakcijsku smjesu. Aktivnost enzima mjerena je pri valnoj duljini 430 nm, svake sekunde tijekom 2 minute. Mjerenje se provodilo u plastičnoj kiveri na 40°C, a korekcija je rađena s destiliranom H₂O.

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_{uk} -ukupni volumen reakcijske smjese (1000 μ L)

V_{uz} -volumen uzorka (25 μ L)

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

m_p -masa proteina (g)

3.2.9. Određivanje koncentracije proteina po Bradfordu (1976)

Za određivanje ukupnih proteina u klasu ekstrakta uzoraka razrijedili smo pet puta. U Eppendorf epruvete dodano je 50 μ L razrijeđenog uzorka ukupnog volumena i 1 mL radne otopine Bradforda (2.85% v/v etanol, 5,28% v/v H₃PO₄ 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 H₃PO₄. 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 μ L dH₂O i 1 mL radne otopine Bradforda.

Nakon mjerenja apsorbancije, izrađena je baždarna krivulja koju smo dobili pripremanjem 1 mg/mL matične otopine albumina goveđeg seruma (BSA) iz koje smo pripremili 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 (μL)matične otopine BSA	V (μL) dH ₂ 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 (H₂O₂) I SADRŽAJA MALONDIALDEHIDA (MDA)

Za određivanje sadržaja MDA i koncentracije H₂O₂ 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 H₂O₂ određena je spektrofotometrijski (Analytik Jena, EU-Njemačka) u pet ponavljanja.

3.4. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE H₂O₂

Određivanje koncentracije H₂O₂ u biljnom tkivu provedeno je metodom Velikova i sur. (2000). U 500 µL uzorka dodano je 500 µL 10 mM 50 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 H₂O₂ u uzorcima izračunata je iz standardne krivulje pripremljene iz poznatih koncentracija H₂O₂. Nakon mjerenja apsorbancije, izrađena je baždarna krivulja koju smo dobili pripremanjem 1 mM 30% matične otopine H₂O₂ iz koje smo pripremili otopine različitih koncentracija H₂O₂ u rasponu od 20-200 µM prema priloženoj **Tablici 2**. Za svaku koncentraciju H₂O₂ pripremljene su dvije replike.

Tablica 2 Priprema otopina H₂O₂ različitih koncentracija

V osnovne otopine/ µL	20	40	60	80	100	200
V(dH₂O)/µL	980	960	940	920	900	800
c (H₂O₂)/µM	20	40	60	80	100	200
A₃₉₀	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 koristili smo 1.5 mL ekstrakcijske otopine. Nakon centrifugiranja sadržaj epruvete je prenesen u 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

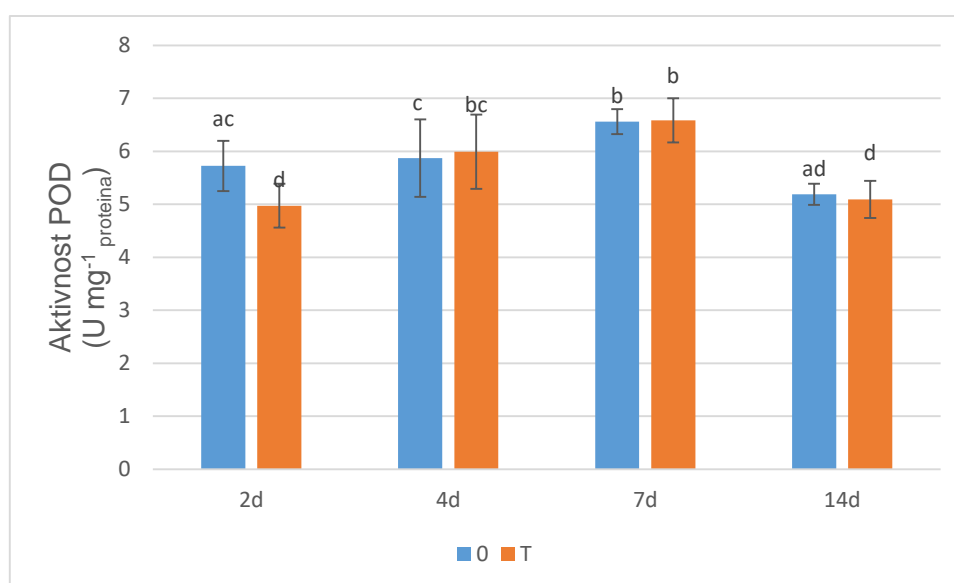
Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti pet replika (\pm standardna pogreška), a statistička značajnost rezultata uspoređena je pomoću Fisher-ovog LSD testa na razini značajnosti $p < 0.05$. Za statističku obradu podataka korišten je programski paket STATISTICA 13.0 (Stat Soft Inc., USA). Unutar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

4. REZULTATI

4.1. AKTIVNOST ANTIOKSIDACIJSKIH ENZIMA I KONCENTRACIJA TOPIVIH PROTEINA

4.1.1. Aktivnost gvajakol peroksidaze (POD)

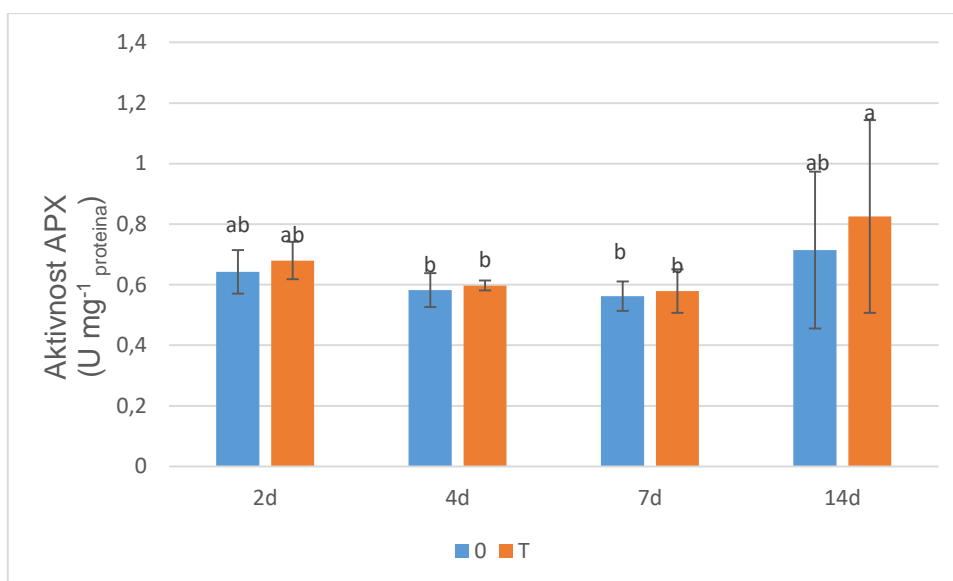
Na **Slici 10** vidimo da je, odmah nakon 2. dana izlaganja pšenice vrstama roda *Fusarium*, POD pokazao smanjenu aktivnost u odnosu na kontrolu. Nakon 4. i 7. dana tretmana POD pokazuje povećanje aktivnosti u odnosu na 2. i 14. dan. Uspoređujući aktivnost POD u netretiranih biljaka, 7. dan pokazao je najveće vrijednosti u odnosu na sve točke, a produljenjem eksperimenta (14. dan) aktivnost POD bila je značajno smanjena u odnosu na ostale točke uzorkovanja.



Slika 10 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)

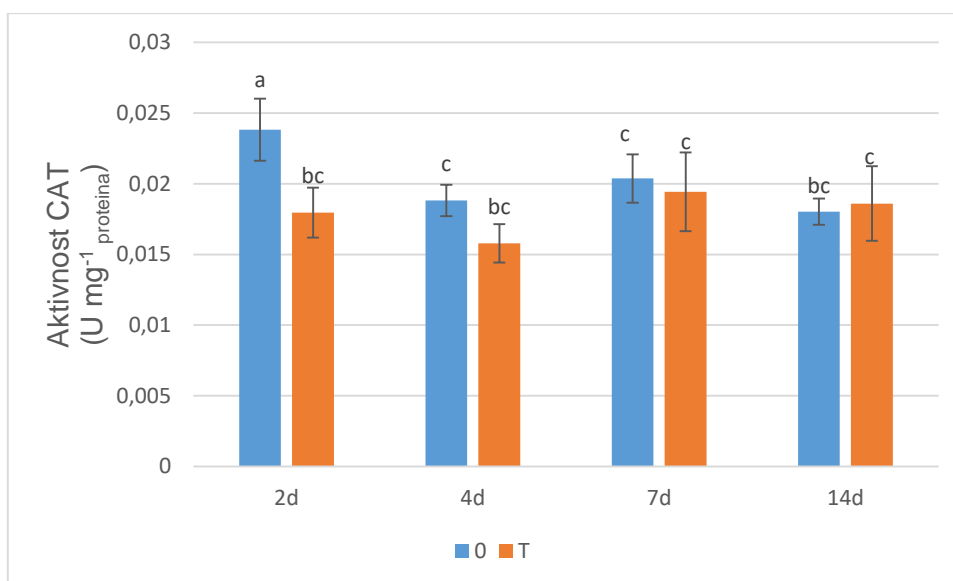
Iz **Slike 11** je vidljivo da nema statistički značajne razlike između kontrole i tretmana u svim točkama uzorkovanja. Značajno veću aktivnost APX pokazao je 14. dan u odnosu na 4. i 7. dan infekcije.



Slika 11 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)

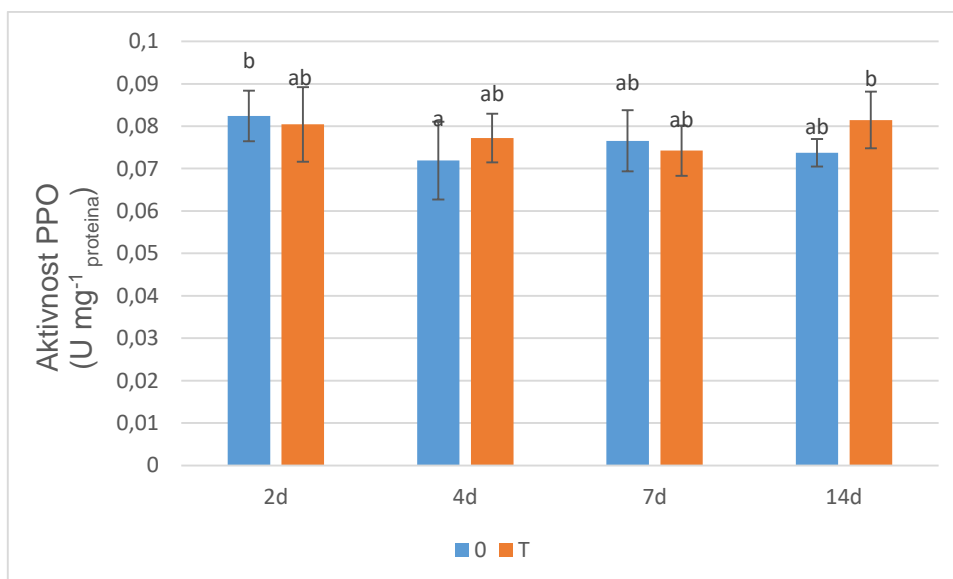
Iz **Slike 12** je vidljivo smanjenje aktivnosti CAT u tretiranih uzoraka u odnosu na kontrolu nakon 2. i 4. dana uzorkovanja. Uspoređujući aktivnost CAT unutar tretmana, 2. dan pokazao je značajan porast aktivnosti CAT u odnosu na 4., 7. i 14. dan na kontroli dok je porast aktivnosti CAT na tretmanu bio veći nakon 7. i 14. dana u odnosu na 4. dan.



Slika 12 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)

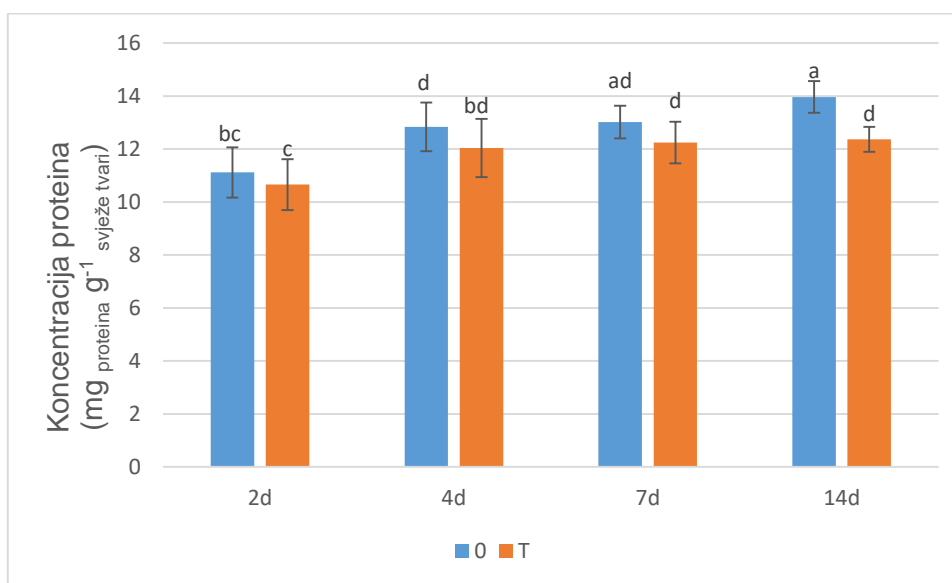
Iz **Slike 13** je vidljivo da na kontroli postoji inhibicija PPO aktivnosti nakon 4. dana u odnosu na 2. dan. Ostale promjene u PPO aktivnosti nisu zabilježene tijekom trajanja eksperimenta.



Slika 13 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 + standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima predstavljaju vrijednosti koje se međusobno značajno razlikuju ($P \leq 0.05$, Fisher LSD test).

4.1.5. Koncentracija topivih proteina

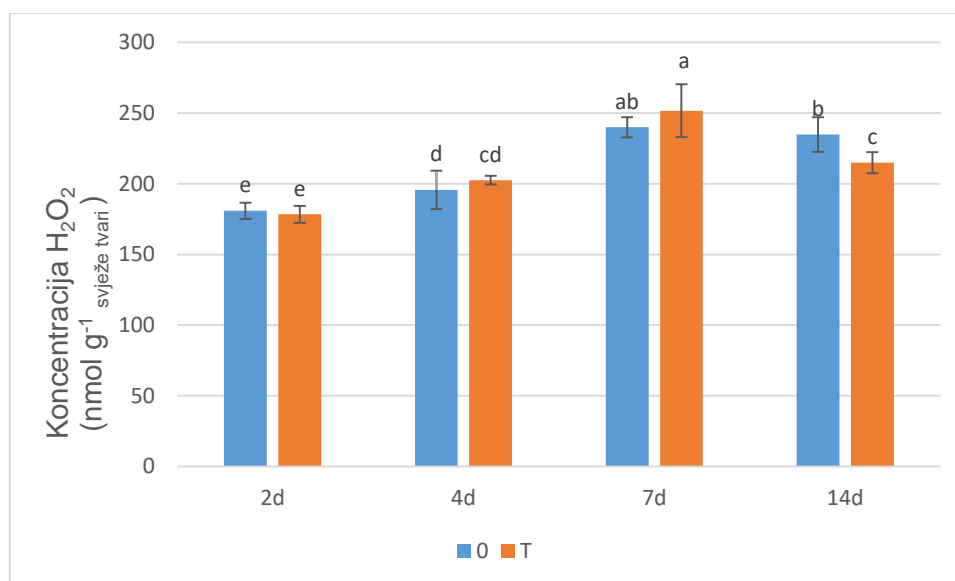
Slika 14 prikazuje značajan pad koncentracije proteina u inficiranih uzorcima u odnosu na kontrolu u zadnjoj točki uzorkovanja (14. dan). Nakon 14. dana bilo je značajno više proteina u odnosu na 2. i 4. dan u kontrolnim uzorcima. Nadalje, statistički značajno niska koncentracija topivih proteina na kontroli, uočena je na početku eksperimenta (2. dan) u odnosu na ostale točke uzorkovanja. U inficiranim uzorcima, koncentracija proteina značajno je porasla nakon 4., 7. i 14. dana tretmana u odnosu na 2. dan.



Slika 14 Sadržaj topivih 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 (H₂O₂)

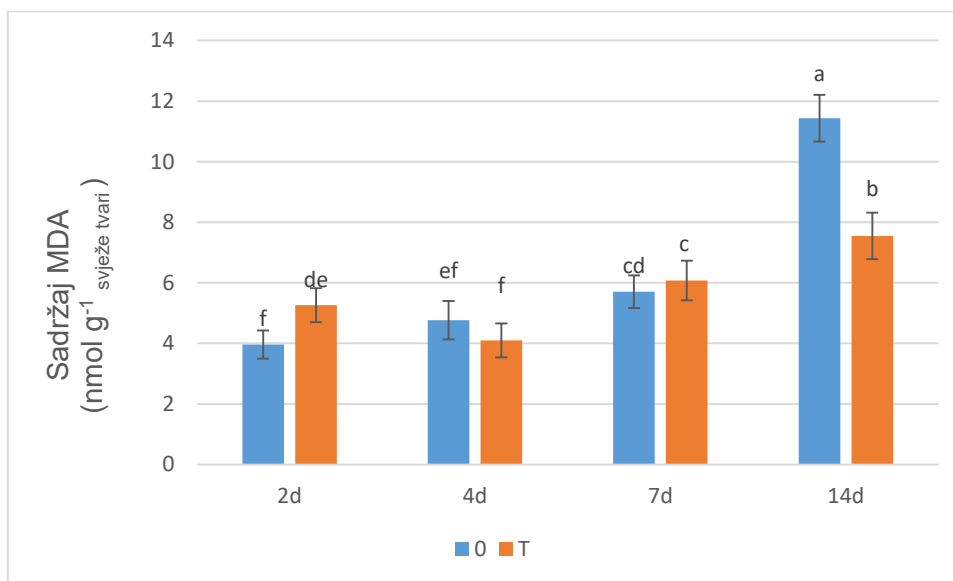
Kako je vidljivo iz **Slike 15**, u zadnjoj točki uzorkovanja (14. dan) došlo je do smanjenja ukupne koncentracije vodikovog peroksida nakon infekcije u odnosu na kontrolu. Uspoređujući koncentraciju vodikovog peroksida u netretiranih biljaka, vidljivo je kako je ona bila najmanja nakon 2. dana eksperimenta u odnosu na ostale točke te je značajno rasla trajanjem tretmana da bi nakon 7. i 14. dana dosegla najveću vrijednost. U inficiranih biljaka najveća koncentracija peroksida izmjerena je nakon 7. dana, a najmanja u prvoj točki uzorkovanja (2. dan).



Slika 15 Koncentracija H_2O_2 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).

4.3. SADRŽAJ MALONDIALDEHIDA

Iz **Slike 16** je vidljivo da je 2. dan sadržaj MDA kod zaraženog uzorka znatno veći u odnosu na kontrolu, dok je u zadnjoj točki uzorkovanja (14. dan) uočen pad sadržaja MDA u inficiranih biljaka u odnosu na nezaražene biljke. Uspoređujući sadržaj MDA unutar tretmana, vidi se da je najmanja akumulacija MDA bila nakon 4. dana a najveća nakon 14. dana izlaganja biljaka vrstama roda *Fusarium*. Također, 7. dan tretmana pokazao je veći sadržaja MDA u odnosu na 2. dan.



Slika 16 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

Rezultati istraživanja pokazali su značajno smanjenu aktivnost POD (**Slika 10**) i CAT (**Slika 12**) u inficiranih biljaka u odnosu na kontrolu nakon 2. dana te inhibiciju aktivnosti CAT nakon 4. dana. Također, u istoj točki uzorkovanja (2. dan) uočena je značajno povećan sadržaj MDA u tretiranih biljaka (**Slika 16**) u odnosu na kontrolu iz čega možemo pretpostaviti kako POD i CAT nisu doprinijeli očuvanju integriteta membrana te nisu dio ranog odgovora u obrani od patogena. Sličan pad aktivnosti CAT i PPO tijekom FHB infekcije uočen je u istog genotipa pšenice nakon 3, 15, i 24h infekcije (Marček i sur., 2018a). Inhibicija aktivnosti CAT uočena je i u FHB-otpornog genotipa pšenice „Sumai3“ nakon inokulacije sporama vrste *F. graminearum* (Soranhinobar i sur., 2017).

U ovom istraživanju nije bilo značajne promjene aktivnosti APX između netretiranih i tretiranih biljaka tijekom vremena (**Slika 11**). Suprotno tome, isti genotip pokazao je povećanu indukciju ovog enzima u ranijim točkama uzorkovanja (Španić i sur., 2017). Iz ovoga se može pretpostaviti kako duža izloženost biljke patogenu suprimira enzimski antioksidativni sustav. Uspoređujući odgovor enzima antioksidacijskog sustava u zaraženih biljaka kroz tri točke uzorkovanja, vidljivo je kako aktivnost POD (**Slika 10**) raste tijekom 4. dana tretmana dok se istovremeno sadržaj MDA (**Slika 16**) za razliku od 7. dana tretmana kod kojega bilježimo porast koncentracije H₂O₂, sadržaja MDA i porast CAT i POD aktivnosti. Iz ovog slijedi da i nakon 4. dana stresa POD igra važnu ulogu u očuvanju integriteta membranskih lipida. 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 doprinoseći njegovoj otpornosti. Ovo je u skladu sa istraživanjem Zhang i sur. (2013), gdje je uslijed izlaganja pšenice vrstama roda *Fusarium* uočena pojačana aktivnost POD u otpornog genotipa pšenice u odnosu na osjetljivi. Slična veza o ulozi POD u zaštiti biomembrana nakon izlaganja genotipa „Apache“ FHB infekciji uočena je u istraživanju Marček i sur. (2018b). S druge strane, iako je zabilježena povećana aktivnost CAT i POD nakon 7. dana tretmana, koncentracija H₂O₂ u zaraženih biljaka je porasla što je za posljedicu imalo povećanje lipidne peroksidacije (**Slika 15**). Prema nekim istraživanjima, uslijed izlaganja stresu biljka može pojačati proizvodnju H₂O₂ u cilju adaptacije (Vranova i sur., 2002) te da bi se aktivirali regulatorni geni zaslužni za otpornost (Mittler i sur., 2004). Stoga je moguće da je prekomjerno nakupljanje H₂O₂ nakon 7. dana posljedica aktivacije obrambenog odgovora. Međutim, nakon 14. dana stresa unatoč povećanoj aktivnosti APX i CAT, sadržaj MDA je značajno porastao što je vjerojatno posljedica inhibicije enzima. Isti odgovor nakon 14 dana infekcije pronađen je i u FHB-otpornog genotipa pšenice „Vulkan“ (Španić i sur., 2017).

6. ZAKLJUČAK

Iz istraživanja mogu se donijeti slijedeći zaključci:

- U odnosu na kontrolu, FHB-otporni genotip pšenice „Apache“ pokazao je inhibiciju aktivnosti POD (2. dan) i CAT (2. i 4. dan) nakon aplikacije stresa što je za posljedicu imalo povećane sadržaja MDA (2. dan) iz čega slijedi da POD i CAT nisu dio ranog odgovora.
- Nakon 4. dana izloženosti patogenu, uočena je povećana aktivnost POD te smanjen sadržaj MDA u odnosu na ostale točke uzorkovanja iz čega se može zaključiti kako POD u genotipa „Apache“ ima važnu ulogu u zaštiti membrana što pridonosi njegovoj otpornosti na fuzarijsku palež klasa pšenice.
- Tijekom infekcije PPO nije pokazao značajne promjene u aktivnosti iz čega slijedi kako nije specifičan pokazatelj FHB otpornosti.
- Akumulacija H_2O_2 značajno je porasla nakon 7. dana infekcije u odnosu na ostala vremena uzorkovanja što može biti posljedica uključivanja drugih obrambenih mehanizama.
- Unatoč povećanoj aktivnosti APX i CAT u zadnjoj točki uzorkovanja, sadržaj MDA je značajno porastao iz čega se može zaključiti da ovi enzimi nisu dio obrambenog odgovora.

7. LITERATURA

- Aebi H: Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* 105:121-126, 1984.
- Apel K, Hirt H: Reactive oxygen species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55:373–99, 2004.
- 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* 1-31,2014.
- Berg JM, Tymoczko J, Stryer L: *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 2013.
- 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.
- 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, *Pathogenesis - related proteins in plants*, str. 171-193, CRC Press Boca Raton, 1999.
- 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, 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, Redžepović S: *Uvod u opću mikrobiologiju*, Udžbenici sveučilišta u zagrebu, Zagreb, 2002.
- 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. *Biochem. Cell Biol.* 85, 1225–1230, 1995.
- Gill SS, Tuteja N: Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 909-930, 2010

- Habschied K: Utjecaj plijesni iz roda *Fusarium* na mikotoksikološku kakvoću pšenice, pšeničnog slada i piva. *Doktorska disertacija*. Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, 2015.
- Kar RK: ROS signaling: Relevance with site of production and metabolisam 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.
- Kruger JE, Lineback D, Stauffer CE: Enzymes and their role in cereal technology. U: *American Association of Cereal Chemists*, St. Paul, Minnesota, 39(9):97-102, 245-249, 281-311, 325-328, 1987.
- Levine A, Tenhaken R, Dixon R, Lamb C: H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79(4):583-593, 1994.
- Mađarić Z: *Suvremena proizvodnja pšenice*. Osijek, 1985.
- Marček T, Viljevac-Vuletić M, Španić V: Biochemical changes in ears of wheat genotypes subjected to *Fusarium* spp. attack. *Acta Biologica Hungarica* 69(4), 2018a. (prihvaćen za objavljivanje)
- Marček T, Viljevac Vuletić M, Bakula I, Alivojvodić S, Španić V: Time-course experiment of *Fusarium* infestation of wheat genotypes with the emphasis on the physiological response. // *Croatian Journal of Food Science and Technology*. 10, 1; 58-63, 2018b.
- Marček T: Učinak solnoga stresa na dihaploidne linije duhana (*Nicotiana tabacum* L.) otporne na Y-virus krumpira. *Doktorska disertacija*. Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, 2013.
- Miholjčić M: *Enzimi*. Svjetlost, Sarajevo, 1981.
- Miljević I: Utjecaj vremenskih prilika na proizvodnju ozime pšenice na PO Miljević, *Završni rad*, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek, 2015.
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F: The reactive oxygen gene network in plants. *Trends Plant Sci* 9: 490–498, 2004.
- Nakano Y, Asada K: Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* 22:867-880, 1981.
- Nanda AK, Andrio E, Marino D, Pauly N, Dunand C: Reactive oxygen species during plant-microorganism early interactions. *Journal of Integrative Plant Biology* 52 (2): 195–204, 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.

- 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.
- Simon UH, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F: Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis* 5: 415-418, 2000.
- Soranhinobar, M, Soltanloo, H, Niknam, V, Ebrahimzadeh, H, Moradi, B, Safaie, N, Behmanesh, M, Bahram, M: Physiological and molecular responses of resistant and susceptible wheat cultivars to *Fusarium graminearum* mycotoxin extract. *Can. J. Plant Pathol.* 39(4), 444–453, 2017.
- 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, 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.
- Španić V: *Pšenica*, Poljoprivredni institut u Osijeku, 2016.
- Španić V: Varijabilnost genotipova pšenice s obzirom na FHB otpornost i genetsku i divergentnost. *Doktorska disertacija*, Poljoprivredni institut Osijek, Osijek, 2010.
- Štefan L, Tepšić T, Zavidčić T: Lipidna peroksidacija – uzroci i posljedice. *Medicina*, 43:84-93, 2007.
- 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: Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science* 164:645-655, 2003.
- Vranova, E., Inze, D., Van Breugsegem, F.: Signal transduction during oxidative stress. *J. Exp. Bot.* 53, 1227–1236. 2002.
- Vukadinović V, Jug I, Đurđević B: *Ekofiziologija bilja*, NSS, Osijek, 2014.
- Whitehurst RJ, Law BA: *Enzymes in food technology*. *Sheffield Academic Press*, Sheffield, 2002.
- Zhang, P., Zhou, M. P., Zhang, X., Huo, Y., Ma, H. X. : Change of defensive-related enzyme in wheat crown rot seedlings infected by *Fusarium graminearum*. *Cereal Res. Commun.* 41, 431–439, 2013.
- Žlender V: Apoptosis - programmed cell death. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* 54:267-274, 2003.