

**Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku**  
**Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij *Molekularne***  
***bioznanosti***

**Valentina Španić, dipl. ing.**

**VARIJABILNOST GENOTIPOVA PŠENICE**  
**(*TRITICUM AESTIVUM* L.)**  
**OBZIROM NA FHB OTPORNOST I GENETSKU**  
**DIVERGENTNOST**

**Doktorska disertacija predložena**  
**Sveučilišnome Vijeću za poslijediplomske interdisciplinarne**  
**doktorske studije**  
**zbog stjecanja akademskoga stupnja**  
**doktora molekularnih bioznanosti-modul biologija biljaka**

**Osijek, 2010**

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Sveučilište u Dubrovniku

Institut Ruder Bošković, Zagreb

Poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij Molekularne bioznanosti

Doktorski rad

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Poljoprivreda

## VARIJABILNOST GENOTIPOVA PŠENICE (*TRITICUM AESTIVUM* L.) OBZIROM NA FHB OTPORNOST I GENETSKU DIVERGENTNOST

Dipl. ing. Valentina Španić

**Rad je izrađen:** Poljoprivredni institut Osijek i IFA-Tulln (Austrija)

**Mentor:** Dr. sc. *Georg Drezner*, redoviti profesor i znanstveni savjetnik Poljoprivrednoga instituta Osijek

**Kratki sažetak Doktorskog rada ili disertacije:** Jedna od gospodarski najvažnijih bolesti pšenice je fuzarijska palež klasova (FHB). Umanjuje prinos i kvalitetu pšenice te stvara mikotoksine. PCR analizom potvrđena je točnost morfološke identifikacije vrsta *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum* i *F. poae*. Ovo je istraživanje potvrdilo horizontalnu narav FHB otpornosti. Najveću ukupnu otpornost u Osijeku i Tullnu imali su genotipovi Sirban Prolifik, Renan, Libellula, Divana, U1 i Soissons. Najveću Tip I otpornost (prema AUDPC-u) imali su genotipovi Divana, Sirban Prolifik, Renan, U1, Osječanka i Tena. Najveću Tip II otpornost (prema AUDPC-u) imali su genotipovi Libellula, Srpanjka, Seka, Sirban Prolifik, Felix, Lela, Tena, Katarina, Renan, Aida, Žitarka i Divana. Najveću Tip III otpornost (prema AUDPC-u) imali su genotipovi Renan, Divana, Osječanka, Alka, Lela, Aida i Tena. Gubitak u urodu zrna inokuliranoga tretmana u odnosu na kontrolni varirao je od -0,45 % (Libellula) do 63,82 % (Golubica). Gotovo kod svih genotipova ostvaren je veći sadržaj proteina, sedimentacijske vrijednosti i vlažnoga glutena u tretmanu koji je inficiran izolatom *F. culmorum*. Genetska divergentnost istraživana je između 30 genotipova. Informacije proizašle iz ovoga istraživanja pomoći će u izboru roditeljskih linija, da bi se povećala učinkovitost oplemenjivanja na FHB otpornost.

**Broj stranica:** 104

**Broj slika (grafikona):** 18

**Broj tablica:** 50

**Broj literaturnih navoda:** 161

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Ključne riječi:** *Fusarium* vrste/fuzarijska palež klasova/genetska divergentnost/pšenica/tipovi otpornosti

**Datum obrane:** 16. studenoga, 2010.

### Stručno povjerenstvo za obranu:

1. Prof. dr. sc. **Josip Kovačević**, znanstveni savjetnik Poljoprivrednog instituta u Osijeku, predsjednik;
2. Prof. dr. sc. **Georg Drezner**, znanstveni savjetnik Poljoprivrednog instituta u Osijeku, mentor;
3. Prof. dr. sc. **Vera Cesar**, izvanredna profesorica Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, član;
4. Doc. dr. sc. **Alojzije Lalić**, znanstveni savjetnik Poljoprivrednog instituta u Osijeku, član;
5. Prof. dr. sc. **Jasenka Čosić**, redovita profesorica Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku, član;
6. Dr. sc. **Dario Novoselović**, znanstveni savjetnik Poljoprivrednog instituta u Osijeku, zamjena člana.

**Rad je pohranjen u:** u Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu (Hrvatske bratske zajednice 4), Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici u Osijeku (Europske avenije 24) i Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku (Trg Sv. Trojstva 3).

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University Josip Juraj Strossmayer Osijek  
University in Dubrovnik  
Institute Ruder Bošković, Zagreb  
University postgraduate interdisciplinary study  
Molecular biosciences

PhD thesis

Scientific Area: Biotechnical Sciences  
Scientific Field: Agriculture

### VARIABILITY IN FUSARIUM RESISTANCE AND GENETIC DIVERGENCE IN WHEAT (*TRITICUM AESTIVUM* L.) GENOTYPES

Dipl. ing. Valentina Španić

Thesis performed at Agricultural Institute Osijek and IFA-Tulln (Austria)

Supervisor: *Georg Drezner*, PhD, Full Professor, Faculty of Agriculture in Osijek, and Scientific Advisor  
Agricultural institute Osijek

**Short abstract:** Fusarium head blight (FHB) is economically one of the most serious fungal diseases of wheat because the fungus contaminates the grain with harmful mycotoxins. In 2008 and 2009 we isolated mainly *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum* and *F. poae* from wheat kernels in east part of Croatia. A PCR assay was used to confirm their identity. The horizontal nature of FHB resistance was confirmed. The highest general resistance in Osijek and Tulln had Sirban Prolifik, Renan, Libellula, Divana, U1 and Soissons. The most resistant for Type I resistance (AUDPC) were the genotypes Divana, Sirban Prolifik, Renan, U1, Osjecanka and Tena. The highest Type II resistance (AUDPC) had Libellula, Srpanjka, Seka, Sirban Prolifik, Felix, Lela, Tena, Katarina, Renan, Aida, Zitarka and Divana. The genotypes with the highest Type III resistance (AUDPC) were Renan, Divana, Osjecanka, Alka, Lela, Aida and Tena. Yield losses in inoculation treatment varied from -0,45 % (Libellula) to 63,82 % (Golubica). In this study, almost all genotypes achieved a higher protein content, sedimentation value and wet gluten in the treatment of which is infected with *F. culmorum*. Genetic diversity was investigated among 30 genotypes. The information generated in this study will assist in the selection of parental line in order to increase the efficiency of breeding efforts.

Number of pages: 104

Number of figures: 18

Number of tables: 50

Number of references: 161

Original in: Croatian

Key words: *Fusarium* species/fusarium head blight/genetic divergence/wheat/types of resistance

Date of the thesis defense: 16 November, 2010

#### Reviewers:

1. **Josip Kovačević**, PhD, Scientific Advisor, Agricultural institute Osijek
2. **Georg Drezner**, PhD, Scientific Advisor, Agricultural institute Osijek
3. **Vera Cesar**, PhD, Associate Professor, Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
4. **Alojzije Lalić**, PhD, Scientific Advisor, Agricultural institute Osijek
5. **Jasenka Ćosić**, Full Professor, Faculty of Agriculture in Osijek
6. **Dario Novoselević**, PhD, Scientific Advisor, Agricultural institute Osijek

Thesis deposited in: National and University Library in Zagreb (Hrvatske bratske zajednice 4); City and University Library in Osijek (Europske avenije 24); Josip Juraj Strossmayer University of Osijek (Trg Sv. Trojstva 3).

# SADRŽAJ

SAŽETAK .....	ii
ABSTRACT .....	iii
PREDGOVOR .....	iv
ACKNOWLEDGEMENTS .....	v
<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2. LITERATURNI PREGLED .....</b>	<b>3</b>
2.1. Značaj i povijest roda <i>Fusarium</i> .....	3
2.2. Fuzarijska palež klasa (FHB) .....	4
2.3. Okolinski uvjeti .....	5
2.4. <i>Fusarium</i> vrste .....	6
2.5. Mikotoksini .....	8
2.6. Sastavnice otpornosti .....	10
2.7. Razvojni putevi patogena .....	11
2.8. Inokulacije i ocjenjivanje FHB otpornosti .....	12
2.9. Zaštita fungicidima .....	13
2.10. Oplemenjivanje na FHB otpornost .....	15
2.11. Genetska otpornost na bolest u pšenici .....	16
2.11.1. Genetski markeri .....	16
2.11.1.1. RFLP .....	17
2.11.1.2. RAPD .....	18
2.11.1.3. AFLP .....	19
2.11.1.4. Mikrosateliti ili SSR-ovi .....	19
2.11.1.5. SNP-ovi .....	20
2.11.2. Selekcija potpomognuta molekularnim markerima (MAS) .....	20
2.11.3. Genetska divergentnost i geni otpornosti na FHB .....	21
2.12. Međuodnosi visine genotipova i gena otpornosti na FHB .....	23
<b>3. MATERIJALI I METODE RADA .....</b>	<b>24</b>
3.1. Morfološka identifikacija <i>Fusarium</i> vrsta .....	24
3.2. Molekularna identifikacija <i>Fusarium</i> vrsta .....	25
3.2.1. Ekstrakcija DNA .....	26
3.2.2. PCR-reakcije .....	26
3.3. Biljni materijal .....	27
3.4. Poljski pokusi .....	29
3.4.1. Lokacija-Austrija, Tulln .....	29
3.4.1.1. Intezitet FHB i učestalost zaraze .....	29
3.4.1.2. Visina biljke, masa 50 klasova i ovršenih zrna, FCK .....	30
3.4.2. Lokacija-Hrvatska, Osijek .....	31
3.4.2.1. Intezitet FHB .....	31
3.4.2.2. Agronomska svojstva i kvaliteta, visina biljke, FCK .....	31
3.5. Pokus u stakleniku .....	32
3.5.1. Test na Tip II otpornost .....	33
3.5.2. Test na DON otpornost (Tip III otpornost) .....	34
3.6. Proizvodnja inokuluma .....	34
3.6.1. <i>F. graminearum</i> i <i>F. avenaceum</i> .....	34
3.6.2. <i>F. culmorum</i> .....	35

3.7. Pojednostavljena metoda za predviđanje količina DON-a-----	35
3.8. Molekularne analize genetske udaljenosti genotipova -----	36
3.8.1. Ekstrakcija DNA -----	36
3.8.2. Mikrosateliti (SSR-ovi) -----	37
3.9. Statističke analize -----	38
3.9.1. Poljski pokusi i pokusi u stakleniku -----	38
3.9.2. Marker analize-----	39
<b>4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA-----</b>	<b>40</b>
4.1. Morfološka i molekularna identifikacija <i>Fusarium</i> vrsta-----	40
4.2. Horizontalna otpornost -----	42
4.3. Opća (ukupna, kombinirana) otpornost na FHB-----	45
4.4. Tip I otpornost -----	47
4.5. Tip II otpornost -----	49
4.6. Tip III otpornost -----	51
4.7. Korelacije između promatranih tipova otpornosti-----	54
4.8. Agronomska svojstva-----	56
4.8.1. Urod zrna -----	56
4.8.2. Hektolitarska masa -----	58
4.8.3. Masa 1000 zrna -----	60
4.9. Kvaliteta istraživanih genotipova pšenice -----	62
4.9.1. Sadržaj proteina -----	62
4.9.2. Sedimentacijska vrijednost brašna -----	63
4.9.3. Vlažni gluten-----	65
4.10. Broj zrna zaraženih <i>Fusariumom</i> (FCK) -----	67
4.11. Procijenjena količina DON-a -----	69
4.12. Visina i datum cvjetanja genotipova ozime pšenice -----	70
4.13. Genetska divergentnost-----	72
<b>5. RASPRAVA -----</b>	<b>78</b>
5.1. Morfološka i molekularna identifikacija <i>Fusarium</i> vrsta-----	78
5.2. Horizontalna otpornost -----	79
5.3. Pristup FHB otpornosti -----	79
5.4. Međuovisnost između promatranih tipova otpornosti -----	82
5.5. Agronomska svojstva-----	82
5.6. Kvaliteta istraživanih genotipova pšenice -----	83
5.7. Broj zrna zaraženih <i>Fusariumom</i> (FCK)-----	84
5.8. Visina biljke i FHB otpornost-----	84
5.9. Datum cvjetanja i FHB otpornost-----	85
5.10. Genetska divergentnost-----	86
<b>6. ZAKLJUČAK -----</b>	<b>87</b>
<b>7. CITIRANA LITERATURA-----</b>	<b>89</b>
POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA -----	104
PRILOZI -----	vi
1. Dodatak -----	vi
2. Životopis-----	xiv

## PREDGOVOR

Posebnu zahvalnost upućujem svome mentoru prof. dr. sc. Georgu Drezneru, predstojniku Odjela za oplemenjivanje i genetiku strnih žitarica, na potpori i vođenju kroz znanstveni rad, kao i upoznavanju sa zanimljivim područjem - oplemenjivanjem pšenice.

Želim iskreno zahvaliti i odati priznanje prof. dr. sc. Marcu Lemmensu, na potpori, ohrabrivanju i vođenju kroz znanstveni rad tijekom moga istraživanja u Austriji.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Josipu Kovačeviću i doc. dr. sc. Alojziju Laliću, članovima komisije, na njihovom zanimanju i pažljivome čitanju doktorske disertacije. Njihovi komentari i osnovane primjedbe uvelike su poboljšale tekst.

Također zahvaljujem prof. dr. sc. Peteru Ruckenbaueru i prof. dr. sc. Hermannu Buerstmayru, predstojniku Odjela za biljnu biotehnologiju na IFA-Tulln, na njihovoj korisnoj pomoći tijekom moga boravka u Austriji, kao i na znanstvenoj podršci.

Zahvalnost upućujem i prof. dr. sc. Jasenki Ćosić i prof. dr. sc. Veri Cesar, članovima komisije, na korisnim savjetima i primjedbama.

Zahvaljujem Poljoprivrednom institutu Osijek, IFA-Tulln i CEEPUS organizaciji, što su mi omogućili financijsku pomoć i sredstva pri izvođenju ovoga istraživanja.

Hvala svim kolegicama i kolegama te poslovnim suradnicima na Poljoprivrednom institutu Osijek i IFA-Tulln na njihovoj pomoći, potpori i zanimanju.

Na kraju, posebne zahvale mojoj obitelji, čije mi je razumijevanje i ohrabrivanje omogućilo da završim doktorsku disertaciju.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

I am very grateful to Prof. Dr. Georg Drezner, my supervisor, head of the Department for Breeding & Genetics of Small Cereal Crops, for his support and for guiding me in scientific research, as well as for introducing me to the interesting world of wheat breeding.

I would like to express my deep gratitude and sincere appreciation to Prof. Dr. Marc Lemmens for his permanent support, kind encouragement and the scientific guidance through my study in Austria.

I want to extend my thanks to Prof. Dr. Josip Kovacevic and Dr. Alojzije Lalic, the official reviewers, for their interest and careful review of the final manuscript. Their valuable comments and constructive criticism greatly improved the text.

Also I would like to express my appreciation to Prof. Dr. Peter Ruckenbauer and Prof. Dr. Hermann Buerstmayr, head of the Department for Plant biotechnology at the IFA-Tulln, for valuable help during my stay in Austria, and for their scientific support.

My gratitude also goes to second official reviewers, to Prof. Dr. Jasenka Cosic and Prof. Dr. Vera Cesar for their valuable comments and advices.

I also thank to Agricultural Institute Osijek, IFA- Tulln and CEEPUS organisation for providing me with the facilities and financial support to carry out this study.

Moreover my thanks for my colleagues and co-workers at the Agricultural Institute Osijek and at the IFA-Tulln. I want to thank them for all their help, support and interest.

Lastly, I would like to give my special thanks to my family whose patient belief and encouragement has enabled me to complete this work.

## 1. UVOD

Pšenica (*Triticum aestivum* L.) je najznačajniji ratarski usjev u svijetu. Ima ogromno gospodarsko značenje, a manifestira se visokim genetskim potencijalom rodosti te se koristi u prehrambenoj industriji za proizvodnju kruha, tjestenine, grisa, ulja iz klica, škroba, alkohola itd. Upotrebljava se u pivarskoj i farmaceutskoj industriji te za ishranu stoke. Odlikuje se širokim arealom rasprostranjenosti zbog visokoga stupnja polimorfizma (velik broj varijeteta i kultivara) te se uzgaja u cijelome svijetu i zauzima vodeće mjesto po posijanim površinama. Prema **FAO (2006.)**, (<http://apps.fao.org/>), područje proizvodnje pšenice u svijetu je 216 000 018 ha, s prosječnim urodom od 2 804 kg/ha. U RH pšenica, nakon kukuruza, zauzima drugo mjesto, s 150-160 000 hektara i prosječnim prinosom od 4 t/ha. Prema **Ortizu i sur., (2007.)**, dvije milijarde ljudi još uvijek nema pristup zdravoj hrani, a od toga je 800 milijuna ljudi neishranjeno. Smatra se da bi u sljedećoj polovici stoljeća trebali porasti zahtjevi za žitaricama za 60 %. Tome doprinosi rast populacije, smanjenje resursa vode, nepredvidivi klimatski uvjeti i smanjena ulaganja u poljoprivredu. Prema **Oldrachu i sur., (2001.)**, ljudska populacija raste za oko 250 000 ljudi po danu, a obradivih površina sve je manje. Zbog toga je važno raditi na poboljšanju genetskoga potencijala pšenice, prvenstveno u pogledu poboljšanja prinosa i kvalitete, a važan preduvjet tome je oplemenjivanje na otpornost na različite uzročnike bolesti kojima je pšenica napadnuta. Osim zbog etičkoga gledišta, i zahtjevi tržišta nameću oplemenjivačima želju za podizanje genetskoga potencijala rodosti do maksimalnih granica.

Među gospodarski najvažnijim uzročnicima bolesti koji mogu prouzročiti velike štete na pšenici vrste su iz roda *Fusarium*. Najveće štete prave one vrste koje se javljaju na klasu, a bolest koju izazivaju je fuzarijska palež klasa (FHB). Ta bolest pšenice raširena je u cijelome svijetu pa je tako i kod nas detektirana kao najvažnija bolest pšenice. Osim što umanjuje prinos, ima negativnih učinaka i na svojstva kvalitete. Gubici u prinosu mogu varirati između 30 do 70 % u epidemičnim uvjetima.

Oplemenjivači pšenice nastoje stvoriti genotip koji bi bio nositelj otpornih gena na *Fusarium* vrste. U tom nastojanju želi se objediniti tradicionalno i moderno oplemenjivanje. Tradicionalni je oplemenjivački proces dugotrajan i oplemenjivači moraju uzgojiti velik broj biljaka u određenim uvjetima. Kod klasičnoga oplemenjivanja lociranje egzaktnoga gena, kojega se traži između ostalih 160 000 gena, može biti vrlo teško i dugotrajno. U modernom oplemenjivanju dvije su ključne tehnologije koje se koriste: molekularni markeri i genetički inženjering. Upotrebom molekularnih markera može se identificirati prisutnost gena u tkivu biljke i time skratiti proces selekcije.



Svojstva kao što su prinos, kvaliteta i otpornost na bolesti, kvantitativna su svojstva (poligena, multifaktorijalna ili kompleksna svojstva) i kontrolirana su s većim brojem gena, na čiju izražajnost u velikoj mjeri djeluju okolinski činitelji. Regije unutar genoma koje sadrže gene povezane s određenim kvantitativnim svojstvom poznate su kao QTL-ovi (lokusi za kvantitativno svojstvo).

Otpornost na FHB je kvantitativno nasljedna i kontrolirana s minor ili major QTL-ovima. Ta otpornost je kompleksna i podijeljena je na različite sastavnice:

Tip I - otpornost na inicijalnu infekciju (**Schroeder i Christensen, 1963.**)

Tip II - otpornost na širenje patogena unutar klasića (**Schroeder i Christensen, 1963.**)

Tip III - otpornost zbog reduciranja mikotoksina (**Miller i sur., 1986.**)

Tip IV - otpornost na infekciju u zrno (**Mesterhazy, 1995., Mesterhazy i sur., 1999.**)

Tip V - otpornost koja se očitava kao tolerantnost uroda (**Mesterhazy, 1995., Mesterhazy i sur., 1999.**)

Svaki od tih tipova otpornosti uvjetovan je multiplim genima aditivnih efekata. Ti mehanizmi otpornosti su aktivni. Pasivni mehanizmi otpornosti povezani s poligenom otpornosti mogu biti strukturalni (različite barijere za ulazak patogena) ili kemijski (ishrana biljke, pH, metaboliti i enzimi biljke) (**Parry, 1990.**). Danas je poznat veliki broj genotipova pšenice koji imaju gene za otpornost na fuzarijsku palež klasa i koji su dostupni oplemenjivačima, ali neodgovarajućih agronomskih svojstava. Identificirani geni na molekularnoj razini mogu ubrzati i učiniti učinkovitijim proces stvaranja novih genotipova koji će sadržavati nove kombinacije alela koje bi se teže mogle dobiti klasičnim oplemenjivanjem. Trenutno je pravi izazov za oplemenjivače pronaći i stvoriti genotipove u kojima će biti inkorporirani geni za FHB otpornost, a u kombinaciji s drugim korisnim agronomskim i gospodarskim svojstvima.

Cilj ovoga istraživanja je: 1.) Morfološka identifikacija najučestalijih *Fusarium* vrsta na području istočne Hrvatske koje inficiraju ozimu pšenicu, te potvrda istih molekularnim tehnikama; 2.) Utvrditi ukupnu otpornost na FHB na genotipovima koji se uzgajaju u Hrvatskoj od 1905. godine; 3.) Utvrditi Tip I, Tip II i Tip III otpornost na FHB na istraživanim genotipovima; 4.) Utvrditi razlike u urodu i kvaliteti zrna uspoređujući inokulirane i kontrolne parcele; 5.) Utvrditi korelacije između FHB svojstava i različitih morfoloških i agronomskih svojstava; 6.) Utvrditi genetsku divergentnost istraživanih genotipova.

Na temelju postavljenih ciljeva, očekuje se utvrditi varijabilnost u otpornosti na FHB (za sve tipove otpornosti), kao i genetsku divergentnost unutar promatranih genotipova te utvrditi najzastupljenije *Fusarium* vrste na području istočne Hrvatske.

## 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Značaj i povijest roda *Fusarium*

Krušna pšenica (*Tr. aestivum* L.) i durum pšenica (*Tr. turgidum* L.) izložene su napadu različitih patogena i insekata koji mogu biti rasprostranjeni globalno u cijelome svijetu ili zastupljeni samo lokalno. **McIntosh, (1998.) (cit. po Rajaram, 1994a. i Rajaram i van Ginkel, 1996.)** navodi širok spektar biotskih stresova (gljivična oboljenja, insekti, nematode, bakterije, virusi) koji se mogu pojaviti na pšenici (izostavljena je *Sclerotium rolfsii* Sacc.). Gljivični patogeni koji napadaju pšenicu mogu smanjiti prinos za 5-10 % u globalnoj proizvodnji, a procijenjeno je da godišnji gubici u urodu zrna variraju od 600 do 700 milijuna tona (**Pellegrineschi i sur., 2001.**). Između različitih bolesti, kao rasprostranjen problem u vlažnim područjima sjeverne Amerike, Kine, centralne i istočne Europe navode i fuzarijsku palež klasa. Autori smatraju da za moguće gubitke u prinosu, kvaliteti i drugim agronomskim svojstvima pšenice nisu potrebne visoke razine otpornosti genotipova kontrolirane pojedinačnim genima, jer bi se takvim pristupom samo mogli odgoditi potencijalni budući problemi. Kao alternativu predlažu upotrebu dugotrajnije otpornosti s manje učinkovitosti. Od uzročnika biljnih bolesti, gljive su od najveće važnosti, jer mogu prouzročiti gubitke u prinosu i do 30 %, a preko sekundarnih produkata mogu reducirati i kvalitetu, smatraju **Oldrach i sur., (2001.)**. Isti autori ukazuju na važnost korištenja genetičkog inženjeringa u rješavanju navedenih ciljeva oplemenjivanja, koji podrazumijeva sustav kulture *in vitro* i transfer DNA.

**Stack, (2003.)**, iznosi povijest roda *Fusarium*. Rod *Fusarium* prvi je imenovao njemački mikolog Link 1809. godine. Gljivu koju je otkrio nazvao je *Fusarium roseum*. Kasnije je otkriveno da je njegova kolekcija sadržavala *Fusarium graminearum* Schw. i *F. sambucinum* Fückel, što tada Link nije znao. Najstariji spolni oblik *Gibberella zeae* (Schw.) Petch, imenovan je prema Davidu von Schweinitzu 1822. godine, kada je on taj oblik nazvao *Sphaeria zea*. 1832. godine švedski mikolog Fries pronašao je sličnu gljivu na zobi i imenovao drugi rod *Fusisporium* i novu vrstu *avenaceum*. Schwabe je opisao *F. graminearum* 1838. godine. 1881. godine talijanski mikolog Saccardo, P.A. je zaključio da *Fusarium* i *Fusisporium* pripadaju istome rodu. Arthur je 1891. godine zaključio da je blijeđenje klasova posljedica cvjetne infekcije. Selby i Manns su 1909. godine prvi pokazali povezanost između izblijeđenih klasova i blijeđenih zrna u usjevima koji su zasijani iz izblijeđenih zrna. 1923. godine Dickson je istraživao blijeđenje klijanaca u ovisnosti o temperaturi, i najveća je oštećenja pronašao pri 20-24°C, a najmanja pri 8°C. Razvio je hipotezu o fiziološkim razlikama između pšenice i kukuruza i njihovim reakcijama na *Fusarium* vrste pri različitim temperaturama. Velik se broj

istraživanja između 1920. i 1930. godine bavio problemima u ishrani životinja izblijeđenim zrnima. 1937. godine Shands zaključuje da toksičnost nije isto što i sama gljiva. Forgacs i Carll (1962.) identificirali su aflatoksin kao kontaminant u hrani koji može prouzročiti bolesti kod ljudi. Schroeder i Christensen su 1963. godine utvrdili razlike u osjetljivosti genotipova ovisno o vremenu klasanja.

Od 1809. godine brojni istraživači rade na problematici identifikacija *Fusarium* vrsta u svim dijelovima svijeta. Od te godine broj identificiranih vrsta rastao je postupno, te ih ima identificiranih više od 80. Upotrebom molekularnih analiza, broj identificiranih *Fusarium* vrsta u sljedećim godinama trebao bi i porasti. **Goswami i sur., (2004.)**, navode da je FHB prvi puta u Engleskoj opisana 1884. godine, a već se od ranih godina 20. stoljeća smatra najvećim problemom na pšenici i ječmu.

**Nelson i sur., (1983.)**, smatraju *Fusarium* kao društveni fenomen, odnosno različita oboljenja biljaka nastala *Fusarium* vrstama, koja su dovela do velikih ekonomskih gubitaka u svijetu. Godine 1960. pogođena je komercijalna industrija banana, a uzrok joj je bio *Fusarium oxysporum f. sp. cubense*, dok je u regiji srednjega zapada SAD-a zabilježen bankrot farmera zbog gubitaka nekoliko milijardi dolara zbog fuzarijske paleži klasa koja se pojavila na pšenici i ječmu. Od 2003. do 2007. godine zabilježene su epidemije FHB u proizvodnji pšenice u regiji SAD-a i Kanade, pri čemu su gubici bili procijenjeni na milijardu američkih dolara (**Anderson, 2007.**). Uzroci takvih epidemija koje su nastale napadima *Fusarium* vrsta najvjerovatnije su minimalna ili reducirana obrada, koje se prakticiraju u tim zemljama od 1993. godine, te izmjena u vlažnim razdobljima i niske razine otpornosti genotipova.

## 2.2. Fuzarijska palež klasa (FHB)

Fuzarijska palež klasa (*scab*) se prema mnogim autorima (**Dubin and Ginkel, 1990., Bai i sur., 1994., Buerstmayer i sur., 2003., Steiner i sur., 2004., Mesterhazy i sur., 2005., Mardi i sur., 2005., Klahr, A., 2007., Yu i sur., 2006., Toth i sur., 2008.**) smatra najštetnijom bolesti pšenice u cijelome svijetu. Osim što umanjuju prinos pšenice i negativno utječu na svojstva kvalitete, *Fusarium* vrste proizvode i mikotoksine koji su štetni za zdravlje ljudi i životinja. **Argyris i sur., (2003.)**, navode da FHB umanjuje prinos preko sterilnosti cvijeta i slaboga punjenja zrna što utječe na veličinu, masu i oblik zrna, pa su zaražena zrna često štura i nepravilnog oblika. Prinos je niži i neizravno zbog česte smanjene klijavosti sjemena te su i manje inficirana zrna često niže klijavosti. Kvaliteta je lošija zbog zaraze, pri čemu je manje nakupljanje proteina, celuloze i amiloze. Prema tim autorima, kvaliteta bi se mogla poboljšati, a u nastojanju smanjenja infekcije, pravovremenim obavljanjem žetve i tretmanom fungicidima.

Najčešće spominjani mikotoksini su: aflatoksini, okratoksini, trihoteceni, fumonizini, patulin i zearalenon. Najčešće nastaju na žitaricama (pšenica, ječam, kukuruz, zob, riža) i na soji, pa se mogu naći i u njihovim proizvodima. Trihotecene, fumonizine i zearalenon proizvode gljivice roda *Fusarium*. O štetnim utjecajima mikotoksina puno se istraživalo, a **Maiorano i sur., (2008.)**, navode da trihoteceni imaju citotičku aktivnost (inhibiraju sintezu proteina, utječu na DNA i RNA sintezu, inhibiraju mitohondrijske funkcije, utječu na stanične membrane i stanične diobe te na apoptozu) i mogu imati imunosupresorni efekt, koji reducira otpornost, te na kraju dovodi do različitih mikrobnih infekcija. Prema **Goswamiu i sur., (2004.)**, konkretni simptomi povezani s toksinima uključuju kod životinja: odbijanje hrane, proljev, probavnu hemoragiju i kontaktni dermatitis. Kod ljudi *F. graminearum* povezan je s probavnom toksičnom aleukijom (Ata) i akakabi toksikozama, povraćanjem, anoreksijom, a kronično izlaganje trihotecenima može izazvati neurološke poremećaje i imunosupresije.

Općenito, rizik od FHB epidemije je visok kada su povišene količine inokuluma (konidije ili askospore na biljnim ostacima na površini tla) tijekom toploga i vlažnoga vremena u vrijeme cvjetanja genotipova pšenice (**Parry i sur., 1995.**). Tipični simptomi FHB su smeđe izblijeđene lezije na glumama i rahisi, što rezultira blijeđenjem dijelova klasa. Prevlake crvene i ružičaste boje, koje potječu od micelija, pojavljuju se na rubovima gluma ili u bazi klasića. Inficirana zrna postaju štura i izblijeđena, siva, ponekad s ružičastim prevlakama, te imaju brašnjavu i bezbojnu unutrašnjost (**Bushnel i sur., 2003.**).

### 2.3. Okolinski uvjeti

*G. zeae* (seksualni, telemorfni stadij *F. graminearum*) stvara seksualne spore (askospore) i aseksualne spore (makrokonidije) koje služe za širenje inokuluma. Seksualni oblik spora je formiran u peritecijama i iz njih su makrokonidije izbačene u zrak, što omogućuje disperziju inokuluma od tla prema klasovima, dok širenje makrokonidija ovisi o kišnim kapljicama. **Beyer i sur., (2004.)**, su proučavali učinak različitih količina relativne vlage zraka na klijanje makrospora i askospora te na proizvodnju deoksinivalenola (DON-a). Utvrdili su da su pri 53-80 % vlage askospore klijale, dok makrokonidije nisu. Kod relativne vlage od 100 % makrokonidije su proizvodile više DON-a nego askospore. Askospore su proizvodile 65 % količine DON-a od onoga što su proizvele makrokonidije. Tu pojavu objašnjavaju time što su askospore manje od makrokonidija. No, već pri vlazi od 70 %, askospore su proizvodile više DON-a. Kako askospore isto mogu proizvesti makrokonidije, još ostaje nerazjašnjeno jesu li makrokonidije iste po kvaliteti proizvedene od micelija i askospora te koliko makrokonidija može biti proizvedeno po askospori.

**Xu, (2003.)**, smatra da su optimalne temperature za proizvodnju makrokonidija za *Fusarium culmorum* (W. G. Smith) Sacc. i *F. graminearum* pri 32°C, za *F. avenaceum* (Fr.) Sacc. 28°C i za *Microdochium nivale* (Fr.) Sam i Hall. 26°C. Minimalne temperature za proizvodnju askospora su 7-10°C, a optimalne 15-20°C. **Brennan i sur., (2005.)**, zabilježili su da se infekcija izolatima *F. graminearum* i *F. culmorum* povećavala pri 10-25°C, a smanjivala pri 25-30°C.

Osnovne uvjete za inicijalnu infekciju *Fusarium* vrstama navodi **Dill-Macky, (2003.)**. Smatra da na inicijalnu infekciju najveći utjecaj imaju inokulum, period izlaganja inokuliranih biljaka vlazi, temperatura zraka u vrijeme inokulacije i razvojni stadij domaćina. U poljskim uvjetima je za očekivati varijacije koje će dovesti do različitih razina infekcije i mogućeg izostanka infekcije. Zbog tih razloga potrebno je istraživanje provesti u nekoliko godina u pažljivo ponavljanim pokusima. Za pouzdanu infekciju su potrebne temperature iznad 15°C, a optimalne su 20-25°C. Vlaga će također utjecati na razvoj infekcije, kao i na ekspresiju i brzinu razvoja simptoma. Poželjna je vlaga nakon obavljenih inokulacija od 95 %. Pri optimalnim uvjetima kolonizacija klasova s *F. graminearum* može biti vrlo brza. Gljiva se može smjestiti u tkivu domaćina u roku 24-36 sati pri 25°C. Razdoblje domaćinove osjetljivosti na zarazu također je kritičan trenutak, a kod pšenice je to u razdoblju cvjetanja pa sve do rane mliječne zriobe.

**Lemmens i sur., (2004.)**, proučavali su učinak različitih tretmana prihrana dušikom na razvoj FHB i DON kontaminacije. Povećavanjem količina dušika povećavala se i razina FHB simptoma, dok se sadržaj DON-a povećavao samo do određene količine. Zaključili su da različite prihrane dušikom u praktičnoj primjeni ne predstavljaju mogućnost u borbi protiv FHB. Kako faktori koji utječu na sintezu i akumulaciju mikotoksina još nisu u potpunosti razjašnjeni, zaključuju da je koncentracija toksina u zrnu vjerojatno rezultat kompleksnih interakcija između domaćina, patogena i okoline. Isti autori navode da je najučinkovitija metoda u borbi protiv FHB stvaranje otpornih genotipova, s čime se slažu i mnogobrojni drugi autori (**Buerstmayr i sur., 1999., Buerstmayr i sur., 2000., Bai i sur., 2003., Bai i Shaner, 2004., Yang i sur., 2006., Anderson, 2007., Dvojkovic i sur., 2007.**). Osim toga, pišu i o korištenju plodoreda, obrade tla, kemijskoj kontroli, optimalnim i pravovremenim gnojdbama, kao nekim od mjera za snižavanje FHB zaraze.

#### 2.4. *Fusarium* vrste

Prema **Bottallicou i Perroneu, (2002.)**, nekoliko *Fusarium* vrsta pojavljuje se na strnim žitaricama (pšenica, ječam, zob, riža, tritikale). Simptomi bolesti mogu se pojaviti na korijenu, stabljici i klasu. Prema istim autorima, vrste koje dominiraju u svijetu na pšenici i ostalim strnim žitaricama su: *F. graminearum*, *F. culmorum* i *F. avenaceum*. U

manje zastupljene vrste ubrajaju se: *F. poae* (Peck) Wollenweber, *F. cerealis* Burgess, Nelson i Toussoun, *F. equiseti* (Corda) Saccardo, *F. sporotrichioides* Sporotrichioides Sherbakoff i *F. tricinctum* (Corda) Saccardo. *F. graminearum* je češći u vlažnim i toplijim područjima kontinentalnih klima (centralna, zapadna i istočna Europa), dok su *F. culmorum* i *F. avenaceum* više zastupljeni u hladnijim europskim zemljama (sjeverozapadna Francuska, Nizozemska, Belgija, Škotska). No, utjecaji koji pogoduju razvoju bolesti mogu dovesti do varijacija *Fusarium* vrsta u različitim regijama i godinama.

**Placinta i sur., (1999.)**, navode da mnoge vrste roda *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* i *Alternaria* nisu prepoznate samo kao patogeni koji napadaju biljno tkivo, već su i značajni izvori mikotoksina. Tradicionalno su gljive koje proizvode mikotoksine podijeljene u dvije grupe: patogeni koji napadaju biljku i skladišni patogeni. Isti autori navode mogućnosti otkrivanja i identifikacije patogena, pri čemu spominju ELISU, ali smatraju da je u sve većoj i poboljšanoj primjeni visokotlačna tekućinska kromatografija i plinska kromatografija s masenom spektrofotometrijom. Zaključuju da mikotoksini poput DON-a, NIV-a, zearalenona i fumonizina, predstavljaju glavnu brigu za zdravlje ljudi i životinja.

**Ćosić, (1997.)**, navodi da na području istočne Hrvatske pšenicu prema morfološkoj identifikaciji najčešće napadaju: *F. graminearum*, *F. verticillioides* (Sacc) Nirenberg, *F. avenaceum* i *M. nivale*. **Ćosić i sur., (2007.)**, navode da je FHB bolest koja se redovno pojavljuje na žitaricama, a značajno umanjuje prinos i kvalitetu napadnutih usjeva. U razdoblju od deset godina na sjemenu pšenice, ječma i kukuruza te korovnih vrsta (*Ambrosia artemisiifolia* L., *Abutilon theophrasti* Med., *Amarantus hybridus* L., *A. Retroflexus* L., *Sorghum halepense* (L.) Pers.) na području istočne Slavonije morfološkim identifikacijama utvrdili su devet različitih *Fusarium* vrsta: *F. graminearum*, *F. verticillioides*, *F. subglutinans* (Wollenweber i Reinking) Nelson, Toussoun i Marasas, *F. avenaceum*, *F. poae*, *F. culmorum*, *F. oxysporum*, *F. solani* (Martius) Appel i Wollenweber emend., Snyder i Hansen, *F. sporotrichioides*. Zaključili su da je *F. graminearum* bila najdominantnija vrsta u desetogodišnjom razdoblju na klasovima pšenice i ječma.

Upotreba molekularnih markera bazirana na PCR reakciji za identifikaciju vrsta i kao identifikacijski alat postaje vrlo popularna, zaključuju **Moller i sur., (1999.) (cit. po Schots i sur., 1994. i Miller, 1996.)**. Kada su dizajnirane početnice i uvjeti za PCR optimizirani, analize tada teku vrlo brzo, a i nisu teške za izvesti. Transformacija RAPD fragmenata u sekvence karakterizirane amplificiranim regijama (SCARs) korištena je i za identifikaciju izolata *F. culmorum* i *F. graminearum* od **Schillinga i sur., (1996.)**. Istraživanja su došla do te granice da jednu *Fusarium* vrstu dijele na više podvrsta, što se prije morfološkim tehnikama nije moglo otkriti. *F. graminearum* je monofiletski kompleksna vrsta koja se sastoji iz najmanje devet filogenetskih vrsta, od kojih su neke

lokalizirane u određenim geografskim regijama. **Toth i sur., (2005.)**, su proveli molekularnu analizu izolata *F. graminearum*. Izolati kemotipa I proizvode DON i/ili njegove acetilne derivate, a kemotipovi tipa II proizvode NIV i/ili fusarenonX. Zaključili su da izolati iz Mađarske pripadaju kemotipu I. **Saharan i Naef, (2008.)**, su proveli detekciju genetske varijacije između izolata *F. graminearum*, *F. verticillioides* i *F. oxysporum*, koji dominiraju u Indiji. Unutar jedne vrste utvrđene su genetske varijacije na temelju različitih amplificiranih baznih parova. Smatraju da su varijacije nastale zbog toga što izolati pripadaju različitim geografskim regijama Indije.

**Gale, (2003.)**, navodi zaključke za buduća istraživanja koje bi trebalo uzeti u obzir kod istraživanja *Fusarium* vrsta: 1. Morfološka identifikacija *Fusarium* vrsta trebala bi biti nadopunjena molekularnim markerima, naročito dijagnostičkim probama; 2. Idealno bi bilo da istraživači koji proučavaju agresivnost izolata koriste jedinstven set genotipova i jedinstvenu proceduru za inokulacijsku tehniku; 3. Testiranje nivoa mikotoksina proizvedenih od specifičnih izolata trebalo bi biti obavljeno *in planta*, jer je objavljeno da razina mikotoksina *in vitro* ne korelira s proizvodnjom mikotoksina *in planta*, ali razine mikotoksina proizvedene *in planta* korelirale su s agresivnošću izolata; 4. Kod proučavanja genetske divergentnosti potrebno je napraviti sustavno uzorkovanje izolata, kao i izabrati dovoljan broj izolata; 5. Rezultati istraživanja iz populacijske genetike trebaju biti integrirani s rezultatima iz drugih disciplina, pogotovo s istraživanjima iz epidemiologije i genomike, da bi se poboljšale strategije pri kontroliranju FHB; 6. Potrebno je još puno istraživanja za sve *Fusarium* vrste koje prouzrokuju palež klasa, jer i kod *F. graminearum*, iako je vrlo dobro proučena vrsta, još uvijek postoji puno neodgovorenih pitanja. Osnova za buduća istraživanja trebao bi biti opis različitih rasa *F. graminearum*-a. I drugim vrstama trebalo bi posvetiti pažnju.

## 2.5. Mikotoksini

Mikotoksini proizvedeni od *Fusarium* vrsta su kancerogeni ili promotori tumora (fumonizini ili moniliformin) ili inhibiraju sintezu proteina (DON-deoksinivalenol, NIV-nivalenol) i mnogi drugi koji su uključeni u estrogene akcije. Najučestaliji *Fusarium* mikotoksini u Europi su DON i zearalenon proizvedeni od vrsti *F. graminearum* i *F. culmorum*. Na području od centralnih prema sjevernim europskim zemljama pronađen je moniliformin, kao posljedica šire rasprostranjenosti *F. avenaceum*. **Hollins i sur., (2002.)**, navode najvažnije trihotecene koji su identificirani, a po tim autorima najviše se pažnje fokusira na tip A (T-2 toksin, Ht-2 toksin i dr.) i tip B (NIV, DON i njihovi derivati 3-ADON i 15-ADON). Unutar Europe FHB patogeni u principu proizvode DON i NIV. *M. nivale* ne proizvodi mikotoksine. Isti su autori proučavali reakcije 17 genotipova na pet različitih lokacija i došli do zaključka da većina genotipova reagira jednako na umjetne inokulacije na svim lokacijama, što govori o stabilnosti otpornosti genotipova.

Akumulacija DON-a u određenome genotipu je pod utjecajem genotipa, kemotipa, agresivnosti *Fusarium* izolata i okolinskih uvjeta (temperatura i vlaga) tijekom razvoja bolesti, smatra **Del Ponte, (2007.)**. **Mesterhazy i sur., (1999.)** zaključuju da akumulacija DON-a u pšenici nije samo posljedica zaraze, već može biti i sastavnica agresivnosti određenog izolata. Istraživanje tih autora nije u potpunosti potvrdilo visoku korelaciju između jakosti infekcije *Fusarium* vrstama i kontaminacije DON-om, pri čemu kontaminacija DON-om nije uvijek bila proporcionalna količini FHB, infekciji zrna ili gubitku u prinosu. Pokazalo se da genotipovi s visokom infekcijom zrna mogu sadržavati niže količine DON-a. Vjeruju da postoje dodatni mehanizmi koji reguliraju akumulaciju DON-a. No, zaključuju da se oplemenjivanje na FHB treba usmjeriti na vizualne simptome za otpornost, jer su niska infekcija zrna, i gubici u prinosu s niskom kontaminacijom DON-om više ili manje korelirajući parametri. **Mesterhazy, (2002.)**, je proučavao ulogu DON-a u agresivnosti kod izolata *F. graminearum* i *F. culmorum* i utjecaj DON-a na otpornost prema FHB. Došao je do zaključaka da kod osjetljivih i umjereno osjetljivih genotipova sposobnost širenja bolesti određenog izolata, kao i njegova agresivnost, ovisi o proizvodnji DON-a. Kod otpornijih genotipova ta sposobnost je inhibirana. Kako je DON snažan inhibitor proteina, što izaziva i inhibiciju enzimatskih aktivnosti kod osjetljivih domaćina, naglo rastu i simptomi bolesti. U istom istraživanju autor je promatrao i utjecaj oborina na razvoj DON-a te zaključio da je kontaminacija DON-om bila više pod utjecajem količine oborina netom nakon učinjenih inokulacija, nego u kasnijim razdobljima.

Kako se razvila molekularna tehnika za determinaciju *Fusarium* vrsta, tako su razvijeni i molekularni markeri, koji imaju sposobnost detektirati i prisutnost gena koji su sposobni proizvoditi mikotoksine. **Demeke i sur., (2005.)**, proveli su molekularnu analizu različitih *Fusarium* vrsta i trihotecena na zrnima pšenice, ječma, zobi, kukuruza i riže na području Kanade. Sve *Fusarium* vrste koje su sposobne stvarati mikotoksine imaju Tri-5 ili Tox-5 gene. U svojem istraživanju koristili su početnice za Tox-5. Smatraju da su tradicionalne metode za identifikaciju *Fusarium* vrsta temeljene na morfološkim karakteristikama dugotrajne i zahtijevaju iskustvo, a vrlo često su i neprecizne. Molekularnom metodom brzo su potvrdili prisutnost ispitivanih *Fusarium* spp., kao i toksina te zaključili da je ta metoda puno brža i pouzdanija od morfoloških ispitivanja. **Bai, (2001.)**, je proučavao mutantske *Fusarium* izolate s poremećenim Tri-5 genom. Visoke su korelacije potvrdile prijašnja istraživanja između sadržaja DON-a i postotka zaraženih zrna i klasića. Mutanski *Fusarium* izolati imali su značajno smanjenu virulenciju kod osjetljivih genotipova u poljskim uvjetima, što su potvrdili i u stakleniku, odnosno dokazali su da izolati *F. graminearum* bez funkcionalnoga Tri-5 gena mogu prouzročiti inicijalnu infekciju, ali ne i širenje simptoma bolesti. Kod osjetljivih genotipova naglo blijeđenje vrha inokuliranoga klasa tipični je FHB simptom. To može rezultirati zbog smanjenoga dotoka vode zbog infekcije u donjem dijelu klasa. U tom izbljeđenom dijelu klasa patogen ne može stvarati DON. Veća je akumulacija DON-a zabilježena



nakon sprejnih inokulacija, nego inokulacijama injekcijom. Kako se akumulacija DON-a pojavljuje u ranom razvoju zaraze, više DON-a se može akumulirati ako je više infekcijskih mjesta.

Da bi zaštitile potrošače od mikotoksina, mnoge zemlje, uključujući EU, odredile su maksimalne dopuštene granice za sadržaj DON-a u žitaricama i proizvodima od žitarica, utvrđuju **Buerstmayr i sur., (2009.)**. Prema EU regulaciji, maksimalno dopušteni sadržaj DON-a u pšeničnom integralnome kruhu je 1,25 ppm, u kruhu i pecivima 0,5 ppm i u dječjoj hrani 0,2 ppm. U SAD 1993. godine određena je gornja granica za količine DON-a u gotovim pšeničnim proizvodima od 1 ppm-a (<http://www.cfsan.fda.gov/~dms/graingui.html>). U Kanadi je dopuštena količina DON-a u mekim pšenicama 2 ppm, a u dječjoj hrani 1 ppm ([http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/securit/chem-chim/contaminants-guidelines-directives\\_e.html](http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/securit/chem-chim/contaminants-guidelines-directives_e.html)).

## 2.6. Sastavnice otpornosti

Otpornost na FHB je kompleksno svojstvo, što je u skladu s velikim brojem čimbenika koji utječu na to svojstvo, a proizlaze iz karakteristika klasića pa sve do obrambenih reakcija domaćina. Svaki od tih čimbenika još dolazi pod utjecaj okolinskih uvjeta, što dodatno komplicira istraživanje. Već **1963.** godine **Schroeder i Christensen** utvrdili su dvije sastavnice koje doprinose FHB otpornosti. Otpornost na inicijalnu infekciju (Tip I otpornost) i otpornost na širenje u klasiće (Tip II otpornost) mogu biti prisutni istovremeno u jednome genotipu. Introdukcija gena za otpornost na trihotecene trebala bi reducirati jakost FHB u pšenici. **Lemmens i sur., (1997.)**, uočili su korelaciju između vizualnih FHB simptoma na klasovima i konačnoga sadržaja DON-a ( $r=0,78-0,81$ ). Došli su do zaključka da selekcija bazirana na vizualnim FHB simptomima simultano vodi do redukcije koncentracije DON-a u zrnu pšenice. **Mesterhazy, (1995., 1999.)**, je predložio uvođenje još dvije sastavnice otpornosti na FHB (otpornost na infekciju u zrno i otpornost koja se očitava kao tolerantnost uroda).

**McCormick, (2003.)**, navodi da je još uvijek nejasno posjeduju li umjereno otporni genotipovi na FHB i Tip III otpornost. Trihoteceni su antibiotici i njihova biosinteza zahtijeva specijalne adaptacije koje proizvode organizmi da bi se samozaštitili. Mikroorganizmi mogu poslužiti kao donori gena kojima će stvoriti mehanizme za obranu od mikotoksina. Ti mehanizmi mogu biti promjene ciljanih proteina, metabolizam koji je sposoban reducirati toksičnost i redukcija interstaničnih koncentracija antibiotika pomoću pumpi. **Browne, (2009.)**, smatra da se korelacija promatrana između Tip I i Tip II otpornosti ne može objasniti nezavisnim efektima te sugerira da je kombinacija Tip I i Tip II efekata uobičajena pojava u ekspresiji gena koji utječu na FHB otpornost u pšenici. Tip III otpornost opisana je kao otpornost na akumulaciju toksina.

Agronomska i morfološka svojstva, kao što su datum cvjetanja, visina biljke i morfologija klasa, povezuju se s FHB otpornosti. Istražujući reakcije genotipova na FHB, **Mestrhazy, (1995.)**, je došao do zaključka da različita morfološka i agronomska svojstva mogu utjecati na razvoj FHB na biljkama u poljskim uvjetima. Ta je svojstva nazvao pasivnim mehanizmima otpornosti koja mogu rezultirati prividnom otpornošću povećavajući mogućnost da biljno tkivo izbjegne infekciju patogenom. Autor smatra da su genotipovi s patuljastim rastom i genotipovi s osjem više osjetljivi od viših genotipova, kao i od onih bez osja. **Parry i sur., (1995.)**, su to nadopunili tvrdnjom da i genotipovi koji imaju duže internodije ispod klasa bivaju manje inficirani. **Rudd i sur., (2001.)**, smatraju da kraći genotipovi s dužim nalijevanjem zrna, kao i oni s kompaktnim klasom, općenito bivaju više zaraženi, nego viši genotipovi, koji imaju brže nalijevanje zrna i rastresit klas. Ostala morfološka svojstva koja utječu na FHB otpornost mogu biti povezana s karakteristikama cvjetanja (vrijeme i period cvatnje, morfologija i retencija prašnika) (**Schroeder i Christensen, 1963.**).

## 2.7. Razvojni putevi patogena

Otpornost na FHB je horizontalnoga tipa (**Van Eeuwijk i sur., 1995.**). Ispitujući utjecaj sedam različitih *Fusarium* vrsta i *M. nivale* (prijašnji *F. nivale*) na reakcije genotipova **Mesterhazy i sur., (2005.)**, su željeli potvrditi hipotezu da je otpornost genotipova prema svim *Fusarium* vrstama slična. Promatrana svojstva bila su intezitet FHB, zrna sa simptomima paleži (FDK), smanjenje u prinosu i kontaminacija DON-om. Nakon proučavanja u razdoblju od pet godina došli su do zaključaka da je otpornost genotipova na sličnoj razini. To je istraživanje potvrdilo već prethodna koja su provedena s nešto manje izolata (**Mesterhazy i sur., 1999.**). Korelacije su se pokazale točnim za FHB podatke, nekada manje točnim za FDK i gubitak u prinosu, dok su podaci za kontaminaciju DON-om koristili samo kod vrsta koje proizvode DON. Mehanizmi interakcija domaćin-patogen još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni. Još uvijek postoje praznine u znanju razvoja bolesti pri kritičnoj točki u prva tri dana, a isključivo na staničnome i molekularnome nivou.

Infekciju unutar cvijeta i klasa objašnjavaju **Bushnell i sur., (2003.)**. Kada je spora unutar cvijeta, visoka je vjerojatnost unutarnje infekcije. Prvo bivaju kolonizirani prašnici, njuška tučka i lodikule i to već nakon dva dana nakon što su makorokonidije *F. graminearum* bile injektirane unutar cvijeta. Kasnije može biti napadnut zid jajnika. *Fusarium* vrste koje prouzročuju FHB stvaraju enzime koji razaraju kutikulu i stanične stijenke, a uključuju kutinaze, poligalakturonaze, endo-poligalaktouronat liaze, endo- $\beta$ -1,4-galaktanaze, arabinaze, endocelulaze, celulaze i ksilanaze. Još uvijek se istražuje mogu li FHB patogeni proizvesti lignolitičke enzime koji bi mogli biti umiješani u puteve penetracije unutar lignificiranih epidermi i hipodermi cvijeta. Osnovni princip širenja

FHB u klasu je preko žilnih snopova u rahili i rahisi. Od zaraženoga klasića gljiva širi se apikalno i bazalno. Floem i parenhim cvijeta bivaju izobličeni i urušeni, što ukazuje na to da floem i, vjerojatno, ksilem postaju disfunkcionalni u inficiranoj rahisi. **Argrys i sur., (2005.)**, pronašli su najveći broj infekcija u rahisi, što ukazuje na inicijalno pokretanje u vaskularnome tkivu. Jača je infekcija zabilježena u sjemenu i glumama, a manja u lemi i palei. Kod osjetljivih genotipova zabilježeno je kretanje od ubodne inokulacije prema gore i prema dolje, dok je kod otpornih i umjereno otpornih genotipova infekcija lokalizirana oko ubodne inokulacije. **Pritsch i sur., (2000.)**, otkrili su sličnosti u infekcijskome procesu patogena u klasićima kod osjetljivih i otpornih genotipova. No, razvoj zaraze bio je sporiji kod otpornih genotipova, koji mogu razviti i neke strukturalne obrane (debele uslojene naslage i velike papile), kao što je genotip Frontana.

Akumulacija lignina u inficiranim klasićima također može igrati ulogu u otpornosti na širenje patogena u tkivu domaćina. **Siranidou i sur., (2002.)** su istraživali utjecaj fenolnih komponenti kod genotipova koji posjeduju Tip I i Tip II otpornosti na FHB, jer fenolne komponente mogu imati značajnu ulogu u otpornosti biljaka. Lignin može stvarati mehaničke barijere pri ulasku patogena te stanični zid učiniti otpornijim prema degradirajućim enzimima. Lignifikacija može umanjiti i prolaz toksina koji otpuštaju hife gljiva u stanice domaćina, a istovremeno može spriječavati i prijenos hranjiva iz stanica domaćina u patogena. U ovom istraživanju u otpornome genotipu Frontani zabilježena je veća količina slobodnih fenolnih komponenti u glumama, lemama i paleama, u usporedbi s osjetljivijim genotipovima na FHB. Pomoću HPLC analiza najviše je zabilježeno p-kumarične i ferulične kiseline u genotipu Frontani, dok su u ostalim genotipovima zabilježene manje količine. Nije bilo razlika u sadržaju lignina u inficiranim tkivima, u usporedbi sa zdravim.

**Anand i sur., (2003.)**, utvrdili su da je FHB oštećenje odgođeno u genotipovima pšenice zbog ekspresije hitinaze i  $\beta$ -1,3-glukanaze i/ili rižinoga taumatina. Postoji snažan dokaz da DON faktor sudjeluje u agresivnosti patogena te pojačava jakost zaraze, ali nije esencijalan u inicijalnoj infekciji (**Bai, 2001., Mesterhazy, 2002.**).

## 2.8. Inokulacije i ocjenjivanje FHB otpornosti

**Xu, (2003.)**, smatra da tlo i sjeme mogu biti jedan od izvora inokuluma, ali kao glavni izvor inokuluma *F. graminearum* i *F. culmorum* navodi predkulturu, odnosno njihove ostatke, kao što su stabljike i zrna kukuruza, slama pšenice, ječma i drugih žitarica.

Inokulacijske tehnike izabiru se ovisno o ciljevima rada, potrebnoj razini preciznosti te broju linija koje se ocjenjuju. 1.) **Ubodna inokulacija:** Otpornost na širenje unutar klasića tipično se ocjenjuje inokulirajući jedan središnji klasić na klasu te se dalje bilježi širenje simptoma bolesti. Suspenzija s makrokonidijama može biti unesena u cvijet

pomoću štrcaljke ili maloga komadića pamuka koji se prethodno natopi inokulumom (**Van Ginkel i sur., 1996.**). Inokulum se može ubaciti i pomoću igle iz koje se ispipetira suspenzija (**Buerstmayr, 2002.**). 2.) **Sprejna inokulacija:** Najčešće je korištena u oplemenjivačkim programima da bi se ocijenile velike količine materijala u polju, nakon čega se bilježe učestalost (postotak klasova sa simptomima) i intezitet zaraze (postotak zaraženih klasića). 3.) **Širenje zrnima:** Ta metoda može, također, poslužiti pri ocjenjivanju velikih količina materijala u polju. Inokulum se širi preko zaraženih zrna pšenice ili kukuruza koje se razbacaju po tlu u razvojnome stadiju vlatanja strnih žitarica i u određenim intervalima i kasnije.

**Mesterhazy, (2003.)**, navodi nekoliko uvjeta koji bi trebali biti zadovoljeni kod testiranja genotipova na otpornost na FHB: 1. Inokulacije trebaju biti izvedene u istome razvojnome stadiju kod svakoga genotipa (u ovome slučaju je to cvjetanje); 2. Kod inokulacija rasprskivanjem bitne su uniformne parcele u cvjetanju; 3. 24 sata nakon inokulacija mora biti osigurana 100 % relativna vlaga (sustav za navodnjavanje ili polietilenske vrećice); 4. Trebalo bi biti korišteno više *Fusarium* izolata da bi se dobila ispravna informacija o otpornosti genotipova; 5. Treba održati istu razinu patogenosti izolata tijekom inokulacija (provjera testom agresivnosti); 6. Zbog različitosti u progresivnoj krivulji bolesti kod genotipova, potrebno je četiri ili pet bilježenja zaraze da bi se dobila slika o kapacitetu otpornosti. Zato se računa područje unutar progresivne krivulje bolesti (AUDPC); 7. Važno je izmjeriti različite faktore (utjecaj na prinos, vizualne ocjene, otpornost na infekciju na zrno), jer je otpornost na FHB kompleksno svojstvo; 8. Kod ocjene prinosa bitno je izabrati uniformne klasove, a izostaviti one koje nisu bili u pravo vrijeme inokulirani. Ako je riječ o inokulaciji cijele parcele tada je treba cijelu požeti; 9. Bolesti lista, kao što je pepelnica, mogu značajno utjecati na FHB reakcije genotipova te bi one trebale biti kontrolirane u što većoj mjeri.

Po **Tottmanu i Broadu, (1987.)**, genotipovi su najosjetljiviji u cvjetanju, razvojni stadij po Zadoksovoj skali 61-69 (**Zadoks i sur., 1974.**), te smatraju da je važno izvršiti inokulaciju *Fusarium* vrstama upravo u tome stadiju. **Mesterhazy, (2003.)**, se nadovezuje te navodi da 1-2 dana razlike u inokulaciji neće značajno utjecati na reakciju otpornosti genotipova. Iako vrste *F. graminearum* i *F. culmorum* nemaju vertikalne rase, izolati se razlikuju značajno u njihovoj agresivnosti te na taj način utječu na mjerenje otpornosti u genotipovima. Zbog toga je potrebno koristiti više različitih vrsta u umjetnim infekcijama.

## 2.9. Zaštita fungicidima

Tebukonazol je prepoznat kao najučinkovitija djelatna tvar u kontroli FHB zaraze, potvrđuju **Homdork i sur., (2000.)**, a cit. po **Diehlu i Fehrmannu, (1989.)**, **Mielkeu i**

**Meyeru, (1990.)** i **Mauler-Machniku i Zahnu, (1994.)**. Smatraju da inhibira biosintezu ergosterola gljive. Učinkovitost fungicida s tebukonazolom ovisi o vremenu i učestalosti primjene te količini primjenjenoga fungicida. Pratili su utjecaj tebukonazola na prinos i komponente prinosa te na proizvodnju DON-a. Promatran je utjecaj na zarazu *Fusarium* vrstama, ali i na gljive *Septoriu nodorum* (Berk.) Berk i *Erysiphe graminis* D.C.. Utvrdili su da ja fungicid Folicur podigao prinose za 31-80 %, pri čemu je primjena fungicida tri dana prije inokulacije bila učinkovitija nego nakon inokulacije. Tretiranje fungicidom u dva navrata nije imalo učinkovitost. Tretmani su smanjili simptome FHB za 57,3-91,8 %, simptome *S. nodorum* za 44,4-66,6 %, dok su razlike kod pepelnice bile manje naglašene. Tretman fungicidom tri dana prije inokulacije smanjio je sadržaj DON-a za 68,8 %, a pet dana poslije za 53,5 %. Kod dva puta tretiranih genotipova smanjen je za 79,8 %. Općenito, zaključuju da koncentracija mikotoksina u zrnima pšenice ne ovisi samo o intezitetu infekcije, već i o agresivnosti izolata *Fusariuma*, kao i osjetljivosti genotipova pšenice. Prema **Miedaneru i sur., (2009.)**, kod najbolje primjene fungicida (s obzirom na vrijeme i količinu primjene fungicida) može se kontrolirati jakost FHB do 50 %.

**Blandino i sur., (2006.)** su istraživali utjecaj fungicida na prinos, sadržaj mikotoksina i alveografske parametre u brašnu. Utvrdili su da tretiranje sjemena tebukonazolom nije imalo značajne efekte na zarazu u klasanju, dok je upotreba fungicida u klasanju smanjila pojavu i intezitet FHB, u usporedbi s netretiranim kontrolnim genotipovima. Kao najbolji fungicid pokazao se onaj koji je sadržavao azoksistrobin + tebukonazol, pri čemu se infekcija klasova smanjila za 57,9 %. U kišnoj godini fungicid je povisio prinos za 23,8 %, a u sušoj godini za 16,9 %. Mješavina prokloraz + tebukonazol primijenjena u klasanju smanjila je sadržaj DON-a od 16,2 do 24,9 %, a azoksistrobin+ tebukonazol za 57,4 %. Neki istraživači, poput **Chala i sur., (2003.)**, istraživali su utjecaj fungicida s djelatnom tvari na bazi strobilurina i azoloma. Najmanje prinose dobili su u kontrolnim parcelama gdje nisu korišteni fungicidi. Primjena fungicida podigla je prinose od 2,8 do 31,3 %. Korištenjem Caramba BBCH 65, dobili su signifikantno povećanje prinosa u usporedbi s kontrolnim parcelama.

**Perkowski i sur., (2007.)**, uspoređivali su koncentracije metabolita *Fusarium* spp. u sjemenu pšenice sakupljenoga s gospodarstava gdje je korištena konvencionalna obrada (s manje ili više intezivnom upotrebom kemijske zaštite) i s gospodarstava s održivom poljoprivredom koja nisu koristila kemijska sredstva. Zaključili su da korištenje plodoređa u održivoj poljoprivredi (kod dobre mehaničke kultivacije) smanjuje rizik od FHB zaraze do takvih granica da nedostatak kemijske zaštite nema značajne efekte na porast koncentracije toksina nastalih od *Fusarium* vrsta. Moguće da je viši sadržaj suhe tvari u tkivu biljaka na takvim gospodarstvima povezan s višom koncentracijom fitokemijskih tvari koje omogućavaju izbjegavanje gljivičnih napada. Kod konvencionalne obrade bez primjene fungicida dobiveni su rezultati drastičnoga

povećanja koncentracije toksina u zrnima pšenice. Takvi rezultati bitni su za proizvođače koji koriste održivu poljoprivredu, gdje je smanjena kemijska zaštita, te ukazuje da bi veću pažnju trebali posvetiti plodoredu i mehaničkoj obradi tla.

U provedenim poljskim istraživanjima na području istočne Slavonije, kada je 24 genotipa tretirano izolatom *F. culmorum*, pokazalo se da su gubici u prinosu varirali od 1,2 do 26,5 % u usporedbi sa kontrolnim parcelama koje su prepuštene prirodnim infekcijama (**Spanic i sur., 2008.**). U istom istraživanju fungicid je povećao prinose do 9,6 % u usporedbi s kontrolnim parcelama.

## 2.10. Oplemenjivanje na FHB otpornost

Prema **Buerstmayru i sur., (2002.)** oplemenjivanje na FHB vrlo je teško iz više razloga: 1. Najotporniji genotipovi su egzotičnoga porijekla i posjeduju agronomska svojstva nižih vrijednosti te su slabo prilagođeni na domaće uvjete; 2. Nasljednost gena za otpornost je oligena ili poligena; 3. Skringing za FHB okolinski je uvjetovan, spor i skup proces. Isti autori smatraju da se primjenom molekularnih markera može nadopuniti klasično oplemenjivanje pšenice. **Mesterhazy, (2008.)** smatra da vrlo dobra otpornost genotipova može biti identificirana, iako u manjem intezitetu, u genotipu koji nije egzotičnoga porijekla, te naglašava da je lakše otpornost tražiti u domaćem sortimentu koji ima dobra agronomska svojstva. Oplemenjivanje na FHB otpornost postaje jedna od glavnih strategija u oplemenjivačkim programima pšenice. Gene za otpornost na FHB potrebno je inkorporirati u oplemenjivačke materijale, jer, iako se epidemije u prirodnim uvjetima ne moraju pojaviti svake godine, moguća je prisutnost mikotoksina.

**Mackintosh i sur., (2006.)** navode alternativne strategije za poboljšanje FHB otpornosti kod genotipova pšenice koje će nadopuniti tradicionalno oplemenjivanje. Smatraju da je genetički inženjering jedan od obećavajućih pristupa. Do sada su mnoge grupe već radile na transgenoj pšenici. **Chen i sur., (1999.)** su koristili rižin taumatin i pomoću toga proteina odgodili razvoj FHB simptoma. **Anand i sur., (2003.)**, proizveli su transgene linije pšenice ekspresirajući hitinazu i  $\beta$ -1,3-glukanazne gene koji su omogućavali umjerenu otpornost na FHB.

Uz molekularne tehnike i genetički inženjering istraživanja su krenula i u nekim drugim smjerovima, kao što je pristup biološkoj kontroli. Biološka kontrola može biti dopunska strategija koja može igrati važnu ulogu u integriranom pristupu smanjenja FHB zaraze. Danas je poznato oko četrdesetak biokontrolnih produkata za kontrolu biljnih bolesti, navode **Corio da Luz i sur., (2003.)**. Isprobano je *in vitro* oko 300 bakterija i kvasaca izoliranih sa pšenice protiv vrste *F. graminearum*. Većina bakterijskih izolata koja je pokazala biozaštitnu aktivnost protiv *F. graminearum* pripada vrstama

*Pseudomonas* te gram-pozitivnim rodovima *Bacillus* i *Paenibacillus*. Od aktinomiceta, kao dobra biokontrola pokazale su se *Streptomyces* sp. Od kvasaca kao antagonisti zabilježeni su *Cryptococcus nodaensis* i crveni kvasac *Sporobolomyces roseus*. Isti autori navode da je malo poznato o mehanizmima koji upravljaju biokontrolom protiv FHB. Postoji jaka indikacija da su antibioza i kompeticija odgovorne za biokontrolu. Mikoparazitizam, indukcija otpornosti i metabolička inhibicija sinteze mikotoksina također igraju ulogu u biokontroli.

## 2.11. Genetska otpornost na bolest u pšenici

Krušna pšenica (*Tr. aestivum* L.) ima jedan od najvećih i najkompleksnijih genoma kod žitarica. Ona je aloheksaploid ( $2n=6X=42$ , AABBDD) s tri homeologna genoma (Sears, 1954.). Ukupna veličina haploidnoga genoma pšenice je 16 Mb, odnosno 16 milijardi baznih parova DNA (u usporedbi s ljudskim genomom 5x više, koji ima približno 3 Mb). Preko 80 % genoma sadrži ponavljajuće DNA sekvence. Velik dio gena nalazi se u sva tri genoma, a upravo zahvaljujući takvoj genetskoj konstituciji omogućen je visok genetski potencijal, izrazita adaptibilnost, time i visoka distribucija diljem cijeloga svijeta. Distribucija gena na kromosomima pšenice dobro je dokumentirana. **Dilbirligi i sur., (2005.)** navode da mape visoke genetske gustoće sadrže više od 4300 DNA markera i fizikalne mape koje sadrže oko 1700 DNA i oko 7000 EST markera. Komparativnim analizama lokalizirale su se regije bogate genima (GRRs) u pšenici. Više od 85 % gena nalazi se u 48 GRRs s različitim veličinama i gustoćom, a zauzimaju manje od 29 % genoma. Preostali dio genoma siromašan je genima i sastoji se od velikih blokova ponavljajuće DNA. Rekombinacije se pojavljuju upravo na GRRs regijama (**Dilbirligi i sur., 2006.**). Jedna od tih regija sadrži više od 40 najvažnijih gena za agronomska svojstva, a lokalizirana je na dugome kraku homeologne grupe 2 (2AL, 2BL i 2DL). Na kromosomu 3A prikazali su smještaj i gustoću glavnih QTL-ova za prinos, i njegovih komponenata (masa 1000 zrna, broj klasića po klasu, broj klasova po m<sup>2</sup>), ali i za visinu biljke, datum klasanja i hektolitarsku masu, koji, također, utječu na prinos.

Genetska divergentnost osnova je za poboljšanje određenih svojstava (**Huang i sur., 2002., Stepień i sur., 2007.**). Morfološka svojstva mogu biti korištena za karakterizaciju genetske divergentnosti, koja su često pod utjecajem okolinskih čimbenika. Danas se upotrebi molekularnih markera pridonosi velika pažnja.

### 2.11.1. Genetski markeri

Genetski markeri predstavljaju genetsku raznolikost između organizama ili vrsta, iako to nisu ciljani geni, ali služe kao naznake za određene gene i locirani su u blizini ili

povezani s genima od interesa. Zauzimaju određena mjesta na kromosomu, odnosno lokusna mjesta. Razlikuju se tri tipa genetskih markera: 1. Morfološki (klasični ili vidljivi) markeri, koji su, zapravo, fenotipska svojstva; 2. Biokemijski markeri koji uključuju alelne varijante enzima nazvanih izoenzimi. Glavni nedostatak morfoloških i biokemijskih markera je taj što mogu biti ograničeni u broju te su pod utjecajem okolinskih uvjeta ili razvojnoga stadija biljke; 3. DNA (molekularni) markeri, koji otkrivaju mjesta varijacije u DNA. Osim što služe za konstruiranje povezanih mapa, imaju primjenu i u oplemenjivanju bilja. Pomoću njih je moguće odrediti razinu genetske divergentnosti unutar germplazme ili identificirati genotipove, procijeniti genetsku udaljenost između populacija, detektirati QTL-ove, razviti selekciju potpomognutu markerima (MAS, identificirati sekvence korisnih gena (**Korzun, 2002.**)). DNA markeri osiguravaju dobru različitost, jer su, za razliku od nebaziranih DNA markera (morfoloških, bioloških i fizioloških), neograničeni u broju, neovisni o okolini, stadiju razvoja i kompleksnih genetskih interakcija, neovisni o dominantnosti i recesivnih efekata te ih je lako ocjenjivati, analizirati i objasniti (**Varshney i sur., 2006.**). Omogućuju mjerenje genetske raznolikosti direktno na DNA razini (**Stodart i sur., 2005.**). U oplemenjivačkim programima poželjno je imati što veću genetsku divergentnost za potrebe stvaranja novih genotipova kojima se želi poboljšati otpornost na abiotske i biotske stresove. U svrhu toga mjeri se genetska sličnost (GS) i genetska udaljenost (GD) između roditelja, što se kasnije može upotrijebiti za procjenu očekivanih genetskih varijacija u različitim kombinacijama potomstava. Općenito, proučavanje genetske divergentnosti ima dva glavna cilja: (1) analize razine polimorfizma između određenih individua i (2) istraživanja distribucije polimorfizma (**Kremer i sur., 1998.**).

DNA markeri koji su korišteni u konstrukciji molekularnih mapa pšenice klasificirani su u tri grupe: 1. Generacija markera RFLP (eng. *restriction fragment length polymorphisms*) i RAPDs (eng. *randomly amplified polymorphic DNAs*); 2. Generacija markera SSRs (eng. *simple sequence repeats* ili mikrosateliti) i AFLPs (eng. *amplified fragment length polymorphisms*) i 3. Generacija markera SNPs (eng. *single nucleotide polymorphisms*) i InDels (eng. *insertion-deletions*). Razvijeno je i mnogo drugih tipova markera u koje se ubrajaju STSs (eng. *sequence tagged sites*), SCARs (eng. *sequence characterized amplified regions*), ISSRs (eng. *inter simple sequence repeats*) i SAMPL (eng. *selective amplification of microsatellite polymorphic loci*).

#### 2.11.1.1. RFLP

RFLP (eng. *restriction fragment length polymorphism*) je metoda kojom se otkrivaju male razlike između dviju DNA fragmenta na temelju postojanja ili nepostojanja nekog restrikcijskoga mjesta. Od 1980. RFLP markeri su uspješno korišteni za različite biljne vrste (**Beckmann i sur., 1983.**). Prvotno su korišteni za mapiranje ljudskoga genoma, a



od 1989. adaptirani su za korištenje u pšenici. RFLP metoda je bazirana na dvije tehnike koje se koriste u širokome rasponu u modernoj molekularnoj biologiji: 1. Razdvajanje DNA pomoću restrikcijskih endonukleaza i 2. transfer fragmenata DNA na membranu. Veličina fragmenata provjerit će se gel-elektroforezom i nakon prebacivanja na membranu pomoću *Southern blottinga* fragmenti će od interesa biti identificirani. RFLP markeri se upotrebljavaju za identificiranje područja genoma koji sadrži određeni gen od interesa. RFLP analiza je dobro razvijena i dobro prihvaćena kod oplemenjivanja pšenice. Omogućava izolaciju gena koji može biti detektiran samo fenotipski i, primjerice, potvrđuje otpornost na određenu bolest kod pšenice. Osim toga, služi za selekciju agronomskih svojstava, testiranje kvalitete sjemena, procjeni raznolikosti u kolekcijama germplazme. Ograničavajući faktori su joj laboratorijski intezivan rad i skupoća same metode. Kod pšenice, koja ima složeni genom, moraju biti izolirane velike količine čiste DNA.

No, zbog male frekvencije RFLP-ova u pšenici, taj pristup je manje koristan u pšenici. Niska frekvencija RFLP-ova u pšenici se može pripisati poliploidnoj prirodi, velikom udjelu ponavljajuće DNA, velikoj veličini genoma i porijeklu određenoga genotipa pšenice. Ta je tehnika još uvijek preskupa i prespora za brzu procjenu velikoga broja potomstva upotrebljavanog u komercijalnoj proizvodnji (**Gale i sur., 1995.**). RFLP-ovi se najčešće koriste za identifikaciju vrste ili za mapiranje lokusa za rezervne bjelančevine (**Gupta i sur., 1999.**).

#### 2.11.1.2. RAPD

RAPD (eng. *randomly amplified polymorphic DNAs*) je molekularna tehnika razvijena 1990., bazirana na PCR-u. Brzo je postala omiljena kod biologa zbog svoje jednostavnosti i jasnoga protokola. Zahtijeva prisutnost jednoga nasumično izabranog oligonukleotida koji se ponaša kao početna i završna početnica. Ta RAPD početnica ima definiranu sekvencu, ali je ona obično izabrana nasumično. Najčešće se ti markeri koriste za utvrđivanje genetske divergentnosti između različitih kultivara pšenice. Koriste se zbog niže cijene ulaganja, moguće automatizacije i brzine analize. Upotrebom RAPD-ova kod pšenice dobiven je nizak nivo polimorfizma.

Iako su u Indiji u NCL Pure centru dobiveni dobri rezultati s obzirom na sadržaj proteina u zrnju korištenjem RAPD analiza (**Pujar i sur., 1999.**), ipak su **Devos i Gale, (1992.)**, zaključili da upotreba RAPD tehnike kod pšenice nije isplativa zbog više razloga:

- upotreba tih markera u različitim laboratorijima neće teći u istim uvjetima, što znači da reakcija za istu vrstu biljke ne mora biti ponovljiva zbog prisutnih varijacija u PCR uvjetima i različitim modelima temperaturnih ciklusa

- ako se RAPD analizom utvrdi da kromosomske lokacije sličnih bendova nisu iste, može ostati pitanje što je sa prisutnošću RAPD bendova slične molekularne težine, ali različitih sekvenci.

### 2.11.1.3. AFLP

AFLP (eng. *amplified fragment length polymorphism*) tehnologija je relativno nova metoda, razvijena u 1990-tim za detekciju i procjenu genetske varijabilnosti u germplazmatskoj lokaciji i praćenju biodiverziteta. Za razliku od RFLP, tehnike AFLP su brže, manje laboratorijski intenzivne i osiguravaju više informacija. Analize na temelju AFLP-ova imaju kapacitet detekcije tisuću nezavisnih lokusa s minimalnim ulaganjima i vremenom. AFLP-ovi se temelje na principima selektivno amplificirajućih restrikcijskih fragmenata iz kompleksnoga miksa DNA dobivenih nakon digestije genomske DNA s restrikcijskim endonukleazama. Polimorfizmi se detektiraju s razlikama u dužini amplificiranih fragmenata. AFLP su dominantni markeri. Visoka reproducibilnost, brze generacije, pokriva cijeloga genoma i visoki polimorfizam čine AFLP analize široko rasprostranjenim metodama u genotipiziranju pšenice.

### 2.11.1.4. Mikrosateliti ili SSR-ovi

Mikrosateliti su područja (lokusi) u genomskoj DNA u kojima dolazi do uzastopnih ponavljanja kratkih slijedova (2 do 6 parova baza) nukleotida (SSRs; eng. *simple sequence repeat*) i jedni su od najstabilnijih markera u pristupu kod genetskih varijacija i divergentnosti između genotipova pšenice, jer su multialelni, specifični za određeni kromosom i podjednako distribuirani na kromosomima (**Roeder i sur., 1998.**). Genotipizacija pomoću mikrosatelita koristi se za genetički biodiverzitet, kod populacijske genetike za razinu srodnosti, mapiranje genoma, kao biljezi za patogene itd. Njihove prednosti su što su učestali i nasumično raspoređeni u genomima, varijabilniji su od drugih markera, varijacije se kodominantno nasljeđuju kroz generacije, nisu pod utjecajem selekcije, može ih se lako umnožiti PCR reakcijom i može se precizno utvrditi dužina alela.

Osiguravaju visoku razinu polimorfizma kod heksaploidne pšenice. Oni su kodominantni markeri i dobiveni podaci slični su kao i kod aloenzima, ali je broj alela i heterozigotnost viša (**Ciofi i sur., 1998.**). Najgušće baziranu mikrosatelitnu mapu izradio je **Somers i sur., (2004.)** koja sadrži 1 238 lokusa koji prožimaju 2 569 cM, s prosječnim intervalima udaljenosti 2,2 cM.

Mikrosatelitni markeri sve su više korišteni markeri i za njihove analize dostupan je širok raspon softverskih paketa, a nekoliko njih radi na temelju neograničenoga modela alela (Biosys, Fstat, Genepop, GDA, Microsat, WinAnova, Popgene, Kinship) (Beaumont i sur., 1998.). Song i sur., (2005.) su radili na razvoju i mapiranju mikrosatelitnih markera kod pšenice. Smatraju da je razvoj informacija na temelju molekularnih markera kod pšenice težak posao jer oduzima puno vremena zbog velikoga genoma pšenice, poliploidije i visokoga nivoa ponavljajućih sekvenci. Navode da je 570 mikrosatelitnih sekvenci početnica utvrđeno za genom pšenice, ali i to je nedovoljno u usporedbi s veličinom genoma pšenice.

#### 2.11.1.5. SNP-ovi

U modernije vrijeme naglasak istraživanja je na SNP markerima, koji su bialelni i vrlo učestali. U posljednjih par godina SNP-ovi (eng. *single nucleotide polymorphism*) postali su važna klasa molekularnih markera. Riječ je o DNA sekvencijskoj varijaciji, koja se pojavljuje kada pojedini nukleotid A, T, C ili G u genomu varira kod različitih vrsta. Potencijalni broj SNP markera vrlo je velik, što znači da bi ih bilo moguće pronaći u svim dijelovima genoma.

#### 2.11.2. Selekcija potpomognuta molekularnim markerima (MAS)

Značaj genetskih markera u oplemenjivanju bilja i njihova povezanost s gospodarskim i agronomskim svojstvima poznata je više od 80 godina. Na učinkovitost selekcije potpomognute markerima (MAS) ukazivao je 1923. godine Sax, kada je kod kod graha prikazao povezanost između veličine sjemena i pigmentacije omotača sjemena (Varshney i sur., 2006.).

MAS je bazirana na konceptu da je moguće utvrditi prisutnost gena na temelju prisutnosti markera koji su u bliskoj vezi s genom od interesa. Takvim pristupom omogućena je veća učinkovitost u usporedbi s fenotipski utemeljenim metodama. Moguće primjene MAS su u: 1. Traženju nasljednosti QTL-ova i major gena, gdje su inokulacijske i ocjenjivačke procedure dugotrajne i/ili skupe; 2. Introdokciji gena iz neadaptirane germplazme u elitne linije (povratno križanje potpomognuto markerima); 3. Oplemenjivanju na patogena; 4. Selekciji gena za otpornost (Young, 1999., Korzun, 2002.). Osnovni zahtjevi kod MAS u oplemenjivanju bilja su: 1. Marker(i) trebaju biti usko povezani (1cM ili manje) sa željenim svojstvom; 2. Za skeniranje velikih populacija trebaju biti omogućeni učinkoviti prosjeci; 3. Tehnika koja se koristi za skeniranje treba biti ponavljajuća u različitim laboratorijima, kao i ekonomična i lako izvediva (Gupta i

sur., 1999.). Nove marker tehnologije i poboljšane metode učinit će MAS još više učinkovitim i jeftinijom.

### 2.11.3. Genetska divergentnost i geni otpornosti na FHB

Upotreba DNA markera u oplemenjivanju bilja i životinja stvorila je novi pravac u poljoprivredi nazvan molekularno oplemenjivanje, navode **Rafalski i Tingey, (1993.)**, **Korzun, (2002.)**, smatra da je u oplemenjivačkim programima potrebno imati što veću divergentnost za stvaranje novih genotipova kojima se želi poboljšati otpornost na abiotске i biotске stresove. U svrhu toga važno je izmjeriti genetsku udaljenost i genetsku sličnost između roditelja koji se koriste u križanju, što bi kasnije moglo poslužiti za procjenu očekivanih genetskih varijacija u potomstvu.

**Huttner i Debrand, (2001.)**, navode čimbenike zbog kojih bi genomiku trebalo uključiti i povezati s oplemenjivanjem bilja: 1. Identifikacija gena koji imaju glavnu ulogu u kontroli određenih svojstava od interesa; 2. Identifikacija germplazme s poželjnim alelima za svojstva; 3. Dostupnost molekularnih markera koji će biti korišteni u MAS; 4. Dostupnost funkcionalnih gena koji mogu biti transformirani do drugih linija ili čak drugih vrsta koristeći transgenezu.

**Collard i sur., (2005.)**, zaključuju o učinkovitosti DNA markera u otkrivanju razlika između određenih genotipova. Najčešće, za križanja će biti korišteni roditelji koji u potomstvu mogu dati dovoljnu količinu polimorfizma, a biti će selektirani na osnovi razine genetske divergentnosti. Da bismo otkrili genetsku divergentnost između određenih genotipova, potrebno je provesti genotipiziranje. Broj alela po SSR lokusu jedan je od najvažnijih parametara koji opisuju polimorfizam (**Peng i sur., 2009.**). Morfološka svojstva mogu biti korištena za karakterizaciju genetske divergentnosti, ali nedostatak im je što su često pod utjecajem okolinskih činitelja, navode **Huang i sur., (2002.)**. Prema njima, genetsku divergentnost istraživali su mnogi autori: RAPDs (Joshi i Nguyen, 1993.), RFLPs (Siedler i sur., 1994., Kim i Ward, 2000.), AFLPs (Barrett i Kidwell, 1998., Burkawer i sur., 1998.), STS (Chen i sur., 1994.) i SSRs (Nagaoka i Ogihara, 1997.).

Najpoznatiji major QTL za FHB otpornost je *Qfhs.ndsu-3BS*, koji je potvrđen od niza istraživačkih skupina (**Bai i sur., 1999., Waldron i sur., 1999., Buerstmayr i sur., 2002. i 2003., Liu i Anderson, 2003., Lin i sur., 2004., Mardi i sur., 2005., Somers i sur., 2005.**). Kasnije je taj QTL preimenovan u *Fhb1*. Prema **Andersonu, (2001.)**, pozicija *Qfhs.ndsu-3BS* je između Xgwm493 i Xgwm533.

Korištenjem 152 mikrosatelitna para početnica otkrivena su dva značajna lokusa povezana s QTL-ovima za otpornost na FHB (Xgwm533 i Xgwm274). Xgwm533 je

smješten na kromosomu 3BS (Roeder i sur., 1998.). Xgwm274 je smješten na kromosomu 7B i 1B. Na QTL regiju za otpornost na FHB na kromosomu 3B prvo su ukazali Waldron i sur., (1999.). Xgwm533 je preimenovan u *QFhs.ndsu-3B* i objašnjava 15,4 % varijacija otpornosti u Sumai 3/Stoa rekombinantne inbred populacije. Taj QTL je pronađen i u populaciji iz križanja ND2603/Butte86. Linija ND2603 je porijeklom iz Sumai 3 populacije. Major QTL za otpornost na FHB objašnjava 53 % varijacije i originalno je mapiran na kromosomu 7B (Bai i sur., 1999.) i pridružen je na kromosomu 3B (Kolb i sur., 2001.). Bai i sur., (1999.), upotrebom AFLP markera mapirao je glavne QTL-ove lokalizirane na 3BS upotrebom RIL-a deriviranih iz Ning7840 (rezistentni kultivar deriviran iz Sumai 3).

Navodi se da je 20 od 21 kromosoma kod krušne pšenice uključeno u FHB otpornost. 7D kromosom ne posjeduje gene otpornosti (Buerstmayr i sur, 2009.). U literaturi se razlikuju navodi za gene uključene u FHB otpornost, što Kolb i sur., (2001.), objašnjavaju: 1. FHB je kvantitativno svojstvo i očekuje se rekombinacija gena; 2. Broj gena koji se rekombiniraju u populacijama varira o roditeljima; 3. Ukoliko se koristi više osjetljivih genotipova u križanjima to može utjecati na detektirane gene; 4. Različite institucije koriste različite tipove otpornosti; 5. Upotreba različitih izolata može dovesti do različitih rezultata; 6. Većinom je proučavan Tip II otpornosti, ali se geni za druge tipove otpornosti mogu rekombinirati i zbunjavati u determinaciji gena; 7. Varijacije u tehnikama za fenotipska opažanja mogu dovesti do različitih rezultata.

Zwart i sur., (2008.), proveli su istraživanje na genotipovima pšenice iz raznih zemalja, da bi utvrdili genetsku divergentnost te povezanost s QTL-ovima od interesa, a povezanim s FHB otpornosti. Smatraju da se genotip koji je otporan na FHB, a nosi alternativne izvore FHB otpornosti, može koristiti kao potencijalan roditelj u oplemenjivačkim programima. Također ističu da je poznavanje distribucije genetske divergentnosti, naročito genetskih veza između egzotičnih materijala kao izvora otpornosti i adaptiranih domaćih genotipova, osnova za razvoj učinkovite strategije pri iskorištenju gena u oplemenjivanju bilja.

Provodeći križanja genotipova u osam različitih kombinacija, Bai i sur., (2000.), su utvrdili da aditivni efekt zauzima najviše genetske varijacije kod otpornosti na FHB, iako u nekim slučajevima važnu ulogu imaju i dominantnost i epistaza. Otporan genotip na FHB često može nastati transgresivnim razdvajanjima, kako je nastao i genotip Sumai 3, danas poznat kao izvor otpornosti na FHB. U istraživanju tih autora geni otpornosti kod genotipova Ning 7840 i Sumai 49 bili su djelomično dominantni, dok su geni otpornosti kod drugih roditelja bili uglavnom aditivni do djelomično recesivni. Zabilježena je i epistaza, što ukazuje na to da kombinacija gena otpornosti ne mora uvijek povećati razinu otpornosti, kako se to očekuje u nekim križanjima između roditelja koji nose gene otpornosti.

## 2.12. Međuodnosi visine genotipova i gena otpornosti na FHB

Oplemenjivači pšenice veliku pažnju posvećuju konačnoj visini pšenice, u svrhu da se ostvari ravnoteža između otpornosti na FHB i prihvatljivih razina prinosa. Prema **Cadalenu i sur., (1998.)**, koristili su se *Rht1* i *Rht2* geni (geni za patuljast rast) u tome procesu, da bi smanjivali visinu biljaka kod pšenice. Kako se ta dva gena nalaze na kromosomima 4B i 4D, dokazano je da su molekularni markeri povezani s njima. Riječ je o lokusima Xglk556-4B i Xfba211-4D. Isti autori smatraju da je još osam drugih lokusa također značajno povezano s visinom biljke: Xfba347-3D, Xfba213-3D, Xwg1026-5A, Xglk510-5B, Xfbb250-6B, Xglk547-6D, Xglk478-7A, XksuD2-7B.

Veza između visine biljke i otpornosti na FHB ima genetsku osnovu, navode **Hilton i sur., (1999.)**. Smatraju da su geni koji kontroliraju otpornost FHB i oni koji utječu na visinu biljke povezani, ili je riječ o plejotropiji, gdje geni za nižu stabljiku promoviraju i osjetljivost na FHB. Prisustvo gena za patuljast rast *Rht1* i *Rht2* u ovom istraživanju povećalo je osjetljivost na FHB. Kod genotipova koji imaju *Rht1*, pokazalo se da su više osjetljivi na *S. tritici*.

U UK većina ozimih genotipova pšenice posjeduje alele za polupatuljast rast *Rht-D1b* na kromosomu 4D i većinom su svi genotipovi osjetljivi na FHB. Kao najotporniji genotip prepoznat je Soissons koji posjeduje alele *Rht-B1b* (poznatiji kao *Rht1*), navode **Srinivasachary i sur., (2009.)**. Isti su autori proveli istraživanje na populaciji nastaloj iz križanja otpornoga genotipa na FHB-Soissons (posjeduje *Rht-B1b* i *Rht-D1a*) X Orvantis (posjeduje *Rht-B1a* i *Rht-D1b* tj. *Rht2*), genotip osjetljiv na FHB. U potomstvu je dobiven jedan stabilan major QTL povezan s *Rht-D1* lokusom, dok je *Rht-B1* imao negativne učinke na FHB otpornost.

Istražujući QTL-ove za FHB otpornost u populaciji Arina (visoki genotip) X Riband (genotip sa *Rht-D1b* alelom), **Draeger i sur., (2007.)** su došli do zaključka da je glavni QTL za FHB otpornost na 4DS kromosomu, koji je objasnio 23,9 % varijance fenotipa. Isti QTL je bio povezan s *Rht-D1* (poznatiji kao *Rht2*) lokusom koji potvrđuje fenotip za polupatuljast rast kod pšenice. Smatraju da su većina genotipova koja ima *Rht-D1b* alele za polupatuljast rast općenito visoko osjetljivi na FHB (**cit. po Gosman i sur., 2007.**). U populaciji je pronađen i QTL na 2B za FHB otpornost, a potiče od Arine. Ostali kromosomi za FHB otpornost (na temelju AUDPC-a) u populaciji su pronađeni na 6BL, 1BL, 7BL, 2B, 7DL, 7AL, dok su za otpornost na sadržaj DON-a pronađena tri QTL-a na kromosomima 4DS, 6BL i 7DL, za DNA patogena) na 3DL, 7BL, 4DS, 6BL i za relativnu masu klasova na 1BL, 4DS, 2AS, 6BL i 7DL.

### 3. MATERIJALI I METODE RADA

#### 3.1. Morfološka identifikacija *Fusarium* vrsta

Morfološke analize *Fusarium* vrsta provedene su u fitopatološkome laboratoriju Poljoprivrednog instituta Osijek. Nakon žetve sakupljeni su uzorci sjemena pšenice sa simptomima koje izazivaju *Fusarium* vrste s tri različite lokacije u 2008. godini (Tovarnik, Osijek, Požega) na području istočne Hrvatske, a 2009. godine uzeti su uzorci s još dvije lokacije (Nova Gradiška, Slavonski Brod). Izabrana su većinom blijeda i štura zrna, odnosno zrna s tipičnim simptomima koje izazivaju *Fusarium* vrste. Istraživanje je provedeno u dvije godine (2008. i 2009.), pri čemu je u 2008. godini izdvojeno 276 uzoraka, a u 2009. godini 222 uzoraka.

Prvi korak je bio površinska sterilizacija sjemena u 80 % etilenskom alkoholu u trajanju od 1-2 minute da bi se reducirao broj sekundarnih organizama koji bi se mogli razviti na hranjivoj podlozi. Prije stavljanja na hranjivu podlogu, zrna su osušena na filter papiru. Za izolaciju je korišten SNA (*Speziller Nährstoffarmer Agar*), koji spada u podloge siromašnije hranjivima. Za spravljanje SNA korištena je modificirana metoda po **Nirenberg, (1981.)**:

SNA modificirano (1 L) sastoji se iz slijedećeg:

1,0 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

1,0 g  $\text{KNO}_3$

0,5 g  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$

0,5 g KCl

0,2 g Glukoza

0,2 g Saharoza

1 L dva puta destilirane  $\text{H}_2\text{O}$

20,0 g Agar

0,5 ml 1 NaOH

Nakon autoklaviranja, u medij su dodani antibiotici streptomycin-sulfat (0,05 g) i klortetraciklin (0,01 g). Medij je izlivan u Petrijeve zdjelice ( $\varnothing$  60 mm). Na sredinu ohlađenih hranjivih podloga stavljeno je zaraženo sjeme pšenice. Petrijeve zdjelice su smještene u klima komore, gdje se pod optimalnim uvjetima (temperatura 25°C i vlaga 80 %) već nakon 2-3 dana počeo razvijati micelij, a nakon 7-14 dana, ovisno o vrsti, mogle su se uočiti sporodohije s konidijama. Slijedio je korak pročišćavanja kulture, pri čemu su pod lupom steriliziranom iglom konidije iz sporodohija prenesene na svježju hranjivu podlogu (SNA s antibioticima) „metodom tri poteza“.

Nakon 2-3 dana kvadrati agara (3x5 mm) s konidijama premješteni su na nove hranjive podloge (SNA bez antibiotika i PDA-*potato dextrose agar*). Uz kvadrate agara smještene su i 1-2 komada sterilnoga filter papira (izvor ugljikohidrata za patogena). Za potrebe ovog istraživanja korišten je komercijalni PDA (Difco, Detroit, MI). Na PDA je promatrana morfologija kolonija, pigmentacija i brzina rasta kulture, što je poslužilo kao sekundarni kriterij pri identifikaciji. SNA podloge poticale su sporulaciju, koja je pojačana i stavljanjem jednoga dijela podloga na razmak 40-45 cm ispod crne UV-lampe (36 W). Drugi dio SNA podloga smješten je u klima komore na temperaturu od 25°C i vlagu od 80 %. Nakon 7-14 dana opisani su izgledi kultura u PDA te evidentirane promjene na SNA vezane uz makrokonidije i mikrokonidije. Morfološke identifikacije učinjene su prema identifikacijskim ključevima **Nelsona i sur., (1983.)** i **Lesliea i sur., (2006)**.

### 3.2. Molekularna identifikacija *Fusarium* vrsta

Molekularna potvrda morfoloških identifikacija *Fusarium* vrsta obavljena je u IFA-Tulln (Austrija), na Odjelu za agrobiotehnologiju. Izabrano je 226 izolata, morfološki identificiranih kao *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum* i *F. poae*.

Prvi korak u molekularnoj analizi bio je ekstrakcija DNA iz gljive. Odabrani izolati stavljeni su na svježe SNA podloge. Da bi dobili određene količine micelija, bilo ga je potrebno proizvesti u tekućem mediju za rast. Koristio se Czapeck-doxov medij, za čiju je pripremu potrebno:

- 1 litra destilirane vode
- 3 g NaNO<sub>3</sub>
- 1 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 0,5 g MgSO<sub>4</sub>
- 0,5 g 1% FeSO<sub>4</sub>
- 20 g Glukoza
- 2 g Kvasac

Nakon autoklaviranja, u Erlenmeierove tikvice od 100 ml dodano je 25 ml Czapeck-doxovog medija te je unesen kvadrat agara (3x5 mm) s konidijama iz SNA podloge. Tikvice su smještene na tresilicu, pri sobnoj temperaturi, s brzinom trešnje od 150-200 okretaja minut<sup>-1</sup>. Nakon oko 72 sata dobivene su dovoljne količine micelija. Za procijeđivanje micelija iz tekućega medija korišten je filter za mlijeko (Calgonit). Zatim je još 3-4 puta uslijedilo ispiranje destiliranom vodom. Pincetom se micelij premjestio na papirnate ubruse, kojima se čvrsto pritisnuo, da bi se odstranila suvišna tekućina. U tarioniku, koristeći kvarcni pijesak (SiO<sub>2</sub>; M=60,06 g/mol) i tekući dušik, usitnjeno je i sastrugano oko 100-200 mg mase micelija te preneseno u Ependorf tube.



### 3.2.1. Ekstrakcija DNA

U Ependorf tube s micelijem dodano je 300  $\mu$ l SDS-ekstrakcijskog pufera te je homogenizirano u termotresilici na 65°C, 20-30 minuta. Zatim je dodano 150  $\mu$ l 3 M Na-Acetata (pH 5,2). Ostavljeno je 10-tak minuta na sobnoj temperaturi te centrifugirano na 13 000 okretaja minut<sup>-1</sup> u trajanju od pet minuta. Pažljivo su skinute tube s centrifuge. Supernatant je pažljivo prenesen u nove Ependorf tube, uz dodatak 600  $\mu$ l izopropanola. Ostavljeno je 20 minuta u hladnjaku (+4°C), uz lagano mućkanje 1-2 puta. Zatim je slijedilo centrifugiranje (13 000 okretaja minut<sup>-1</sup>), u trajanju od 10 minuta. Uklonjen je supernatant, a pelet je ispran s *Wash I* (76 % EtOH, 0,2 M NaOAc, destilirana H<sub>2</sub>O), nakon čega su uzorci kratko izvorteksirani i iscentrifugirani, a supernatant je uklonjen. Potom je uslijedilo ispiranje s *Wash II* (76 % EtOH, 10 mM NH<sub>4</sub>Ac, destilirana H<sub>2</sub>O) te kratko vorteksiranje i centrifugiranje i uklanjanje supernatanta. Ependorf tube ostale su otvorene da bi alkohol evaporirao, a pelet ostao suh, nakon čega je uslijedilo dodavanje 200  $\mu$ l TE-pufera. Količina DNA izmjerena je na UV-fotometru (Pharmacia Gene Quant photometer). Koncentracija DNA je podešena na 50 ng/ $\mu$ l. Kvaliteta DNA gljive provjerena je na 1 % agaroznom gelu u 1xTAE puferu (80-90 V, 60 mA, 100W, 30 minuta), uz korištenje  $\alpha$ -DNA kao markera za molekuranu težinu (5, 10, 20, 50 ng/ $\mu$ l).

### 3.2.2. PCR-reakcije

PCR uređaj je programiran za svaku vrstu kako slijedi:  
-za ***F. graminearum***- jedan ciklus od 1 minute na 95°C, 40 ciklusa od 30 sekundi na 95°C, 30 sekundi na 62°C, i 40 sekundi na 72°C, i jedan ciklus od 10 minuta na 72°C;  
-za ***F. culmorum***-1 ciklus od 2 minute na 96°C, 40 ciklusa od 30 sekundi na 94°C, 30 sekundi na 60°C i 45 sekundi na 72°C, i jedan ciklus od 10 minuta na 72°C;  
-za ***F. avenaceum* i *F. poae***- jedan ciklus od 2 minute na 95°C, 40 ciklusa od 30 sekundi na 95°C, 30 sekundi na 66°C, i 45 sekundi na 72°C, i jedan ciklus od 5 minuta na 72°C. PCR reakcije provedene su na PCR-u Primus96plus.

Za svaku reakciju korišteno je 3  $\mu$ l kalupa DNA (koncentracije 50 ng/ $\mu$ l) pomiješano s 17  $\mu$ l PCR mastermiksa (Tablica 1.). U mastermiks su dodane specifične početnice za svaku *Fusarium* vrstu (Tablica 2.). Korištene su početnice proizvođača MWG-Biotech AG.

Tablica 1. Reagensi u Mastermiksi

Reagensi	1x	10x	20x	100x
Prednja početnica(2,5 $\mu$ M)	2,0 $\mu$ l	20,0 $\mu$ l	40,0 $\mu$ l	200 $\mu$ l
Stražnja početnica(2,5 $\mu$ M)	2,0 $\mu$ l	20,0 $\mu$ l	40,0 $\mu$ l	200 $\mu$ l
10xpuffer	2,0 $\mu$ l	20,0 $\mu$ l	40,0 $\mu$ l	200 $\mu$ l
dNTP's 2mM	2,0 $\mu$ l	20,0 $\mu$ l	40,0 $\mu$ l	200 $\mu$ l
Taq	0,20 $\mu$ l	2,0 $\mu$ l	4,0 $\mu$ l	20 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	8,80 $\mu$ l	88,0 $\mu$ l	176,0 $\mu$ l	880 $\mu$ l

Tablica 2. Parovi početnica korišteni u PCR reakcijama

Vrsta	Prednja sekvenca(5'-3')	Stražnja sekvenca (5'-3')
<i>F. graminearum</i> <sup>a</sup>	CTCCGGATATGTTGCGTCAA	GGTAGGTATCCGACATGGCAA
<i>F. avenaceum</i> <sup>a</sup>	GCTAATTCTTA ACTTACTAGGGGCC	CTGTAATAGGTTATTTACATGGGCG
<i>F. culmorum</i> <sup>a</sup>	ATGGTGAACTCGTCGTGGC	CCCTTCTTACGCCAATCTCG
<i>F. poae</i> <sup>a</sup>	CAAGCAAACAGGCTCTTACC	TGTTCCACCTCAGTGACAGGT

Izvori početnica<sup>a</sup>: *F. graminearum* i *F. culmorum*-**Nicholson i sur., (1998.)**, *F. poae*-**Parry i Nicholson, (1996.)**, *F. avenaceum*-**Schilling i sur., (1996.)**

Pomiješane su kompletne probe s 3  $\mu$ l boje (6xLoading Dye, Fermentas). Ispipetirano je oko 10-20  $\mu$ l amplifikacijskih produkata u 1,5 % agarozni gel te je urađena horizontalna elektroforeza u trajanju od 30 minuta u 1xTAE puferu na 80-90 V, 60 mA, 100W. Gel je očitavan pomoću UV transluminatora (UV BIO-RAD) te analiziran s Quantity one-4.5.2; 1 D Analysis Software.

### 3.3. Biljni materijal

Izabrana su 24 genotipa pšenice, koji su bili zastupljeni u proizvodnji u Republici Hrvatskoj od 1905. godine do danas. 20 genotipova potječe iz Hrvatske, od kojih je 17 priznato Poljoprivrednom institutu Osijek (Srpanjka, Žitarka, Golubica, Super Žitarka, Janica, Lucija, Alka, Lela, Pipi, Katarina, Renata, Aida, Seka, Felix, U1, Tena, Osječanka), a tri genotipa (Zlatna Dolina, Divana, Sirban Prolifik) potječu iz drugih oplemenjivačkih kuća. Genotipovi Soissons i Renan potječu iz Francuske, a genotip Libellula iz Italije. Ti su genotipovi zasijani u poljskim pokusima u Tullnu (Austriji) i Osijeku (Hrvatskoj). U Tablici 3. Prikazana je zemlja porijekla i rodoslovlje ta 24 genotipa. Kao kontrolni genotipovi u molekularnim analizama uvršteni su genotipovi Courtot, Frontana, Sumai 3, Chinese Spring, Toras i Hermann, a za pokus u stakleniku pridodani su kao kontrole dva genotipa E1-86U i E2-1T.

Tablica 3. Porijeklo i rodoslovlje istraživanih genotipova

Genotip	Porijeklo	Rodoslovlje
Srpanjka	Hrvatska	Osk.4.50-1-77/Zg.2696
Žitarka	Hrvatska	Osk.6.30/2/Slavonka//Osk.6.78/1-73/Kavkaz
Golubica	Hrvatska	Slavonija/Gemini
Super Žitarka	Hrvatska	GO3135/Žitarka
Janica	Hrvatska	Osk.5.36-9-91/Srpanjka
Lucija	Hrvatska	Srpanjka/Kutjevčanka
Alka	Hrvatska	Osk.5.140-22-91/Sana
Divana	Hrvatska	Favorit/5/Cirpiz/4/Jang-Kwang/2/ Atlas--66/Comanche/3/Velvet
Lela	Hrvatska	Srpanjka/Super Žitarka
Pipi	Hrvatska	Soissons/Osk.6.83-5-91
Katarina	Hrvatska	Osk.5B.4-1-94/Osk.5.140-22-91
Renata	Hrvatska	Žitarka/Osk.7.5-4-82/Kom.Bg.160/86//Srpanjka
Aida	Hrvatska	Srpanjka/Rialto
Seka	Hrvatska	Srpanjka/Demetra
Felix	Hrvatska	Srpanjka/Kom.Bg.160-86
Soissons	Francuska	Iena/HN-35
Renan	Francuska	Mironovskaya 808/Maris Huntsman//VPM1/Moisson/3/Courtot
Sirban Prolifik	Mađarska	-
U1	Hrvatska	Marquis/Carlotta Strampelli
Libellula	Italija	Tevere/Guiliani//San Pastore
Bezostaja	Rusija	Skorospelka 2/Lutenscens 17
Zlatna Dolina	Hrvatska	Leonardo/ZG 414-57
Tena	Hrvatska	Libellula/Bezostaja 1
Osječanka	Hrvatska	Tena (EMS1,5%)
Courtot	Francuska	Mexique-50/B-21-Versailles
Frontana	Brazil	Frontiera/Mentana
Sumai 3	Kina	Funo/Taiwan
Chinese Spring	Kina	LV/Sichuan
Toras	Njemačka	Taras/Stamm//Herevard/3/Tarso
Hermann	Njemačka	Nic90-3390A/Xanthos
E1-86U	Austrija	CM-82036/Remus
E2-1T	Austrija	CM-82036/Remus

### 3.4. Poljski pokusi

24 genotipova pšenice testirano je na dvije lokacije, u Tullnu, Austrija, (2008. i 2009. godine) i u Osijeku, Hrvatska, (2009. godine).

#### 3.4.1. Lokacija-Tulln, Austrija

Eksperimentalno polje nalazilo se na IFA-Tulln (40°20' N, 16°4' E), 30 km zapadno od Beča, na 180 m nadmorske visine. Tip tla je livadni-černozem. Prosječne temperature tijekom vegetacijskoga razdoblja u 2007./2008. bile su 7,25°C i suma oborina 401,4 mm i 7,57°C i 579,3 mm u 2008./2009. godini. Za tretiranje sjemena u 2007. godini korištena je mješavina koju su sačinjavali Rovral TS (karbendazim 175 g/kg, iprodion 350 g/kg) u količini od 2,5 g/kg i Gaucho FS 600 rot (imidakloprid 600 g/l) u količini od 0,58 ml/kg sjemena. U 2008. godini za tretiranje sjemena korišteni su Celest Extra 050 FS (fludioksonil 25 g/l, difenokonazol 25 g/l) u količini od 2 ml/kg, pomiješano s Gaucho FS 600 rot (imidakloprid 600 g/l) u količini od 0,58 ml/kg sjemena. Vrijeme sjetve u 2007. godini bilo je u studenom, a u 2008. godini u listopadu. Parcele su bile veličine 1 m<sup>2</sup>. Sjetvena količina iznosila je 20 g/parcели. Pokus je posijan kao split-plot u dvije repeticije. U 2008. godini u ožujku primjenjena je gnojdba s Linzer Star 15:15:15+3S+Zn u količini od 300 kg/ha te u svibnju prihrana s Kalkammonsalpeter (27 % N) u količini od 185 kg/ha. Za tretiranje korova u travnju je primjenjen Biathlon (tritosulfuron 714 g/kg) u količini od 70 g/ha te u svibnju Puma Extra (fenoksaprop-P-etil 69 g/l, mefenpir-dietil 75 g/l). U 2009. godini u travnju obavljene su tri prihrane s Kalkammonsalpeter (27 % N) u količini od 160 kg/ha i 110 kg/ha te s DC FS 600rot u količini s 185 kg/ha, u svibnju je obavljena još jedna prihrana s Kalkammonasalpeterom (27 % N) u količini od 100 kg/ha. Za tretiranje protiv korova korištena je mješavina 25 g/ha Express-a SX (tribenuron-metil 500 g/kg) i 750 g/ha Platform S (karfentrazon-etil 15 g/kg, mekoprop-P 600, 3 g/kg) u svibnju. U svakoj godini, svaka parcela podijeljena je u četiri tretmana pomoću plastificiranog užeta te je svaki dio ručnom prskalicom inokuliran s *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum*, a četvrti dio poslužio je kao kontrola, u kojem je korištena zaštita s fungicidom (Folicur®, aktivni sastojak tebukonazol, 1,5 l/ha).

##### 3.4.1.1. Intezitet FHB i učestalost zaraze

Inokulacija ručnom prskalicom u Tullnu obavljena je kada je 50 % biljaka po parceli bilo u stadiju cvjetanja i ponovljena je dva dana poslije. Tri tretmana inokulirana su s 25 ml suspenzije izolata u kasno poslijepodne i četvrti s 25 ml fungicida nešto ranije.

Koristila se konidijska suspenzija od 5x10<sup>4</sup> ml<sup>-1</sup> za *F. graminearum*, 2,5x10<sup>4</sup> ml<sup>-1</sup> za *F. culmorum*, 2x10<sup>6</sup> ml<sup>-1</sup> za *F. avenaceum*, pri čemu je u 2009. godini za tu vrstu 10 puta

umanjena. Automatizirani sustav za navodnjavanje održavao je visoku vlažnost 20 sati nakon inokulacija. Simptomi bolesti bilježeni su 10., 14., 18., 22. i 26. dan nakon prve inokulacije. Promatrano je cijelo područje unutar parcele i vizualno ocijenjeno pomoću linearne skale od 0 (nema zaraze) do 100 (100 % zaraženost), kako je opisano u Tablici 4. Područje unutar progresivne krivulje zaraze (AUDPC) je izračunato, kao integrirano mjerenje za ukupni intezitet bolesti (odnosno, ukupnu otpornost na ulazak patogena, kao i njegovo širenje).

Tablica 4. Prikaz načina ocjenjivanja zaraze u polju za ukupnu otpornost

%	
25	4 zaražena klasića/1 klas
33	6-7 zaraženih klasića/1 klas
50	10 zaražeih klasića/1 klas
66	12-13 zaraženih klasića/1 klas
75	15 zaraženih klasića/1 klas
95	Gotovo svi klasići zaraženi
100	Potpuno zaraženo

Kod učestalosti zaraze ocjenjivan je postotak zaraženih klasova tako što je slučajno uzeto 30 klasova po  $\frac{1}{4}$  parcele i svrstano u zaražene ili zdrave. Klasovi su označavani kao zaraženi kada je barem jedan klasić imao simptome prouzročene *Fusarium* vrstama. Ocjena je izvršena 10., 14., 18., 22. i 26. dan nakon prve inokulacije. AUDPC je izračunat kao mjera za otpornost na ulazak patogena (Tip I otpornost).

#### 3.4.1.2. Visina biljke, masa 50 klasova i ovršenih zrna, broj zrna zaraženih *Fusariumom* (FCK)

U poljskim je pokusima izmjerena visina biljke u cm od površine tla do vrha klasova, ne uzimajući u obzir osje. Nakon žetve izvagano je u prosjeku 50 klasova i njihovih ovršenih zrna, te je izračunat postotak zrna zaraženih *Fusariumom* (FCK%). Kod određivanja FCK-a slučajno je uzeto 100 zrna od svakoga genotipa te isprano u 90 % etilenskom alkoholu u trajanju od 20 sekundi. Nakon toga, zrna su stavljena na vlažan filter papir u Petrijeve zdjelice te su smještene u klima komoru, gdje je održavana konstantna temperatura od 25°C i vlaga na 80 %. Šestoga dana izračunat je postotak zrna zaraženih *Fusariumom*.

### 3.4.2. Lokacija-Osijek, Hrvatska

Eksperimentalni pokus postavljen je u listopadu 2008. godine na pokušalištu Poljoprivrednog instituta Osijek (45°32"N, 18°44"E), na 94 m nadmorske visine, gdje je tip tla eutrični kambisol. U osnovnoj gnojidbi primjenjeno je 50 kg/ha Uree (46 % N) te 300 kg/ha NPK 7:20:30. Sjeme je tretirano fungicidom Vitavax (3 ml/kg). Pokus je prihranjen s 130 kg/ha KAN-a (27 % N) u veljači te s 200 kg/ha KAN-a (27 % N) u travnju. U ožujku je tretirano herbicidom Tena (triasulfuron 0,75 %; klortoluron 79 %) u količini 1,5 kg/ha, a u svibnju je tretirano herbicidom Granstar (tribenuron-metil 750+/-30 g/kg) u količini od 22g/ha. U travnju je korišten insekticid Karate protiv insekta *Lema melanope* (L.) (Lambda cihalotrin 50 g/l) u količini od 0,10 l/ha. Prosječne temperature u vegetacijskoj sezoni za 2008./09. iznosile su 10,76°C, a ukupna količina oborina u vegetacijskoj sezoni iznosila je 367,8 mm. Dužina parcele iznosila je 7 m, a širina 1,08 m, sa sjetvenom normom od 330 zrna/m<sup>2</sup>. Pokus je posijan kao kompletni randomizirani blok u četiri repeticije. Inokulacije su obavljene od 07. do 18. svibnja 2009. u vrijeme kada se 50 % biljaka po parceli nalazilo u fenofazi cvatnje. Parcele su inokulirane s *F. culmorum* te su ostavljene i kontrolne parcele koje nisu tretirane, već su prepuštene prirodnoj infekciji. Inokulacije su izvršene u kasno poslijepodne i ponovljene dva dana poslije. Za održavanje vlage na klasovima, traktorskom prskalicom rasprskivana je voda u nekoliko navrata tijekom dana.

#### 3.4.2.1. Intezitet FHB

Dva tjedna nakon učinjenih inokulacija vizualno je promatrano područje unutar parcele i ocijenjeno pomoću linearne skale od 0 (nema zaraze) do 100 (100 % zaraženost) kako je prikazano u Tablici 4. Taj je parametar uzet kao mjera za ukupan intezitet bolesti.

#### 3.4.2.2. Agronomska svojstva i kvaliteta, visina biljke, FCK

Izmjereni su urod zrna, hektolitarska masa, masa 1000 zrna i parametri kvalitete (sadržaj proteina, sedimentacijska vrijednost, vlažni gluten). Sadržaj proteina, sedimentacijska vrijednost i vlažni gluten određeni su pomoću uređaja *Infratec 1241 Grain Analyzer* (ICC standardna metoda Br. 105/2; Br. 116/1; Br. 155), koji istovremeno određuje nekoliko parametara u zrnu, na temelju bliske infracrvene transmisije. Na svim genotipovima izmjerena je visina, ne uzimajući u obzir osje. Nakon žetve promatran je FCK (%).



Slika 1. Poljski pokus u Tullnu (snimila V. Španić)

### 3.5. Pokus u stakleniku

Deset zrna svakoga genotipa zasijano je u multi-kontejnere. Klijanci su premješteni u hladne komore na 4°C, u trajanju od 4-6 tjedana. Zatim je pet klijanaca svakoga genotipa zasijano u kaliće (Ø15 cm), koji su prethodno bili ispunjeni smjesom 70 % komposta, 20 % treseta i 10 % pijeska. Postavljena su dva odvojena pokusa u siječnju 2009. godine kao kompletni randomizirani blok u dva tretmana u dvije repeticije. Prvi tretman postavljen je za primjenu DON-a, a drugi tretman za Fusarium inokulaciju, odnosno za mjerenje Tip II otpornosti. Tijekom prvih 30 dana temperatura u stakleniku podešena je na 14°C tijekom dana i 10°C tijekom noći s 12 sati fotoperioda na 15 000 lx pomoću dva tipa lampi, MF400BUH (38 000 lm/m<sup>2</sup>) i NH360FLX (47 800 lm/m<sup>2</sup>)(Iwasaki Electric Co.Ltd., Tokyo). U klasanju je temperatura povišena na 20-22°C tijekom dana i 18°C tijekom noći, sa 16 sati fotoperioda. Relativna vlaga održavana je na 69 %. Gnojidba s (0,5 g/kaliću) Blaukorn (14 % N; 7 % P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>; 17 % K<sub>2</sub>O; 2 % MgO; 1 % Na; 9 % S) obavljena je u veljači, 2009. U stakleniku (Slika 2.) fumigacija sumporom provođena je dva puta tjedno. U klasanju fumigacije se nisu provodile, kako ne bi utjecale na primjenu toksina i inokuluma.

### 3.5.1. Test na Tip II otpornost

Za testiranje na Tip II otpornost primjenjeno je ubodno ranjavanje u klasić na sredini klasa u fazi cvjetanja. Izabrano je pet klasova po kaliću. Za inokulaciju je korišten izolat IFA 104 (*F. culmorum*) u koncentraciji od  $5 \times 10^4$  ml<sup>-1</sup> spora. Vizualne ocjene zaraženosti izvršene su na 7., 10., 13., 16. i 19. dan nakon prve inokulacije, bilježeći broj inficiranih klasića u bazipetalnome smjeru. Izvršena je i ocjena izbljeđivanja vršnoga djela klasa s ocjenom 0, 0,5 ili 1. Izračunata je prosječna vrijednost pet tretiranih klasova, te je izračunat AUDPC za daljnje statističke analize. Metodu ubodnoga ranjavanja klasa pšenice inokulumom opisali su **Bai i Shaner, (1994.)**.



Slika 2. Pokus u stakleniku (snimila V. Španić)



### 3.5.2. Test na DON otpornost (Tip III otpornost)

DON (čistoća >95 %) je pročišćen u IFA-Tulln prema modificiranoj metodi **Altpetera i Posselta, (1994.)**. Za prvo tretiranje genotipova pšenice pomiješano je 100 mg DON-a sa 100 ml destilirane vode i dodana jedna kapljica Tweena. Za drugi tretman postupak spravljanja otopine DON-a učinjen je na isti način, ali uz korištenje manje količine DON-a (20 mg). Za testiranje na otpornost na DON slučajnim izborom odabrano je pet klasova po kaliću u fazi cvjetanja. Na izabranim klasovima označena su dva klasića u sredini klasa tako što je škarama odrezan vrh gluma. Unutrašnjost cvijeta, između leme i palee tretirana je s 20 µl otopine DON-a (10 g litra<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O, 0,1 % Tween 20) prvi dan i nakon 24 sata tretman je ponovljen s 20 µl otopine DON-a (2 g litra<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O, 0,1 % Tween 20). Dva sata nakon tretmana relativna vlaga zraka u kabinetu staklenika podignuta je na 80 %. Broj DON izblijeđenih klasova (NDBS) u bazipetalnom smjeru izbrojan je na 7., 10., 13., 16. i 19. dan nakon prvoga tretmana. Izvršena je i ocjena izbljeđivanja vršnoga dijela klasa s ocjenom 0, 0,5 ili 1. Izračunata je prosječna vrijednost NDBS za pet tretiranih klasova te je izračunat AUDPC, u cilju daljnjih statističkih analiza. Metodu su opisali **Lemmens i sur., (2005.)**.

### 3.6. Proizvodnja inokuluma

U Republici Hrvatskoj, na pokušalištu PIO, pokusi su inokulirani izolatom IFA 104 (*F. culmorum*), dobivenim iz IFA-Tulln, od Dr. Marca Lemmensa. Na lokaciji Tulln, u Austriji pokusi su inficirani s tri izolata: IFA 66 (*F. graminearum*), IFA 104 (*F. culmorum*), IFA 60 (*F. avenaceum*).

#### 3.6.1. *F. graminearum* i *F. avenaceum*

U kipućoj vodi kuhana su zrna *Vigna radiata* (L.) Wilczek (20 g/l vode), a tekuća faza prenesena je u staklene boce, te je izvršeno autoklaviranje na 121 °C u trajanju od 60 minuta. U ohlađenu staklenu bocu s medijem ubačen je kvadrat agara (1x1 cm) s konidijama iz SNA. Uvođen je u bocu sterilizirani zrak preko sterilizirane jedinice u trajanju od pet dana i pet noći, nakon čega su spore počele klijeti, a boca je prenesena u hladnu komoru (+4 °C) u trajanju od 24 sata. Nakon toga u boci složila su se tri sloja (donji-konidije, srednji-micelij, gornji-tekući). Pažljivo je usisan gornji tekući sloj. Konidije su izbrojane preko hemocitometra (Profounder 0,100 mm) te je razrijeđeno na 50 000 konidija/ml za *F. graminearum* i 2 milijuna konidija/ml za *F. avenaceum*. Tube s inokulumom su zamrznute na -80 °C do upotrebe. Tu je metodu opisao **Mesterhazy, (1987.)**.

### 3.6.2. *F. culmorum*

Mješavina zrna pšenice i zobi (3:1) ostavljena je preko noći u vodi, nakon čega je smjesa autoklavirana na 121°C u trajanju od 20 minuta. Kada se ohladilo, zrna su inokulirana konidijama *F. culmorum*. Bočice su ostavljene na difuznome danjem svjetlu, na sobnoj temperaturi, u trajanju od dva tjedna uz povremenu trešnju, sve dok se na zrnima nije pojavilo smeđe-narančasto obojenje. Bočice su smještene još 4 tjedna u hladnjak na -4°C. Zatim su bočice napunjene s deioniziranom vodom i podešavanje konidija po ml učinjeno je na isti način kao za prethodne vrste, pri čemu je koncentracija za poljske pokuse u Austriji podešena na 25 000 konidija/ml, a u Hrvatskoj u 2009. godini koncentracija je podignuta na 100 000 konidija/ml. Za inokulacije u stakleniku koncentracija je podešena na 25 000 konidija/ml. Inokulum je zamrznut na -80°C sve do upotrebe. Tu su metodu opisali **Snijders i Van Eeuwijk, (1991.)**.

### 3.7. Pojednostavljena metoda za predviđanje količina DON-a

Upotrijebljene su vizualne ocjene za jakost bolesti u poljskim pokusima da bismo izračunali procijenjene vrijednosti DON-a prema formuli koju je naveo **Chelkowski, (1989.)**:

$$\text{DONap} = \frac{P \times 10}{100} \text{ mg/kg}$$

DONap - procijenjena količina DON-a; P - prosječan postotak zaraženih klasova

Patogenost inokuluma provjerena je po metodi **Lemmensa i sur., (1993.)**. Podaci za provjeru patogenosti inokuluma nisu prikazani.

Inokulacije su učinjene u kasno poslijepodne rasprskivanjem inokuluma direktno na klasove kako su opisali **Lemmens i sur., (1993.)** i **Buerstmayr i sur., (2000.)**, u vrijeme punoga cvjetanja prema Zadoksovoj skali, u stadiju 65 (**Zadoks i sur., 1974.**).

### 3.8. Molekularne analize genetske udaljenosti genotipova

Varijacije istraživanih genotipova ozime pšenice na razini DNA ispitivane su korištenjem mikrosatelitnih markera u IFA-Tulln (Austrija), na Odjelu za agrobiotehnologiju. Za potrebe izolacije genomske DNA iz biljnoga materijala uzeti su mladi listovi pšenice dugački 1-2 cm. Nakon što su osušeni u liofilizatoru u trajanju od 72 sata, izmljeveni su u laboratorijskom oscilatornom mlinu 5-10 minuta (Tecator Cyclotec Sample Mill, Model 1093) do sitnoga praha.

#### 3.8.1. Ekstrakcija DNA

Ekstrakcija DNA izvršena je prema modificiranoj cetiltrimetilamonij bromid metodi (CTAB-metoda) koju su opisali **Saghai-Marroof i sur., (1984.)**. U Ependorf tube s izmljevenim biljnim prahom dodano je 900  $\mu$ l CTAB ekstrakcijskoga pufera (Tablica 5) prethodno zagrijanog na 65°C u vodenoj kupelji. Zatim su uzorci premješteni u vodenu kupelj na 65°C, uz lagano mućkanje, u trajanju od 45-90 minuta. Nakon dodavanja 400  $\mu$ l kloroform-izoamilnog (24:1) alkohola, Ependorf tube stavljene su u centrifugu na 12 000 okretaja minut<sup>-1</sup> u trajanju od 10 minuta. Uslijedilo je pažljivo otpipetiranje supernatanta u nove Ependorf tube te je dodano 600  $\mu$ l izopropanola, nakon čega su uzorci preneseni u hladnjak na temperaturu -20°C, u trajanju od 15 minuta. Da bismo spustili pelet DNA, uzorci su iscentrifugirani na 8 000 okretaja minut<sup>-1</sup> u trajanju od 5 minuta. Tekući dio je uklonjen te pelet ispran s *Wash II* (Tablica 6.). Otvorene Ependorf tube ostavljene su otvorene preko noći da bi se pelet osušio. Uz dodavanje 200  $\mu$ l 0,1XTE pufera pH 8 (10 mM Tris-pH 8,0, 1 mM EDTA-pH 8,0), ostavljeno je 2-3 sata da se pelet otopi, uz laganu trešnju.

Tablica 5. CTAB Ekstakcijski pufer<sup>1</sup>

Sastavnice	Završno	1 RXN	5 RXN	10 RXN	20 RXN	50 RXN
		10 ml	50 ml	100 ml	200 ml	500 ml
dH <sub>2</sub> O		6,5 ml	32,5 ml	65,0 ml	130,0 ml	325,0 ml
1 M Tris-7,5	100 mM	1,0 ml	5,0 ml	10,0 ml	20,0 ml	50,0 ml
5 M NaCl	700 mM	1,4 ml	7,0 ml	14,0 ml	28,0 ml	70,0 ml
0,5 M EDTA-8,0	50 mM	1,0 ml	5,0 ml	10,0 ml	20,0 ml	50,0 ml
CTAB <sup>2</sup>	1 %	0,1 g	0,5 g	1,0 g	2,0 g	5,0 g
14 M BME <sup>3</sup>	140 mM	0,1 ml	0,5 ml	1,0 ml	2,0 ml	5,0 ml

1 Koristiti svježe pripremljen i zagrijati kemikalije na 60-65°C prije dodavanja CTAB i BME

2 Alkiltrimetil-amonij bromid (Sigma M-7635)

3  $\beta$ -merkaptetanol

Tablica 6. Kemikalije u Wash II

Sastavnice	100 ml	200 ml	300 ml	400 ml	500 ml
Apsolutni EtOH	76 ml	152 ml	228 ml	304 ml	380 ml
1 M NH <sub>4</sub> OAc	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml
dH <sub>2</sub> O	23 ml	46 ml	69 ml	92 ml	115 ml

Kvantiteta DNA izmjerena je na fluorimetru (SpectraFluor Plus; Firmware V4.51-11/00; XFluor4 Version: V 4.20) i podešana na koncentraciju od 100 ng/ $\mu$ l. Kvaliteta DNA provjerena je na 0,7 % agaroznome gelu horizontalnom elektroforezom (60-80 V, 60 mA, 100W, 60-90 minuta), uz dodatak molekularnoga markera za težinu. Gel je očitán pomoću UV transluminatora (UV BIO-RAD) i analiziran s Quantity one-4.5.2; 1 D Analysis Software.

### 3.8.2. Mikrosateliti (SSR-ovi)

Korištene su 24 početnice koje su sintetizirane prema sekvencama objavljenim u Graingenes bazi podataka (<http://graingenes.org>). PCR komponente razlikovale su se ovisno o korištenim početnicama (M13-početnice ili direktno označene početnice), a glavne razlike bile su u korištenju M13-30 početnice i koncentraciji F-početnice. Za direktno označene početnice korišteni su različiti PCR programi, ovisno o temperaturi sljepljivanja početnica, a za M-13 početnice korišteni su *touch down* (postupno spuštanje temperature) programi.

Pomiješane su reakcijske komponente za PCR, pri čemu je za početnice s M13 završetkom korišteno: 0,02  $\mu$ M prednje početnice, 0,2  $\mu$ M završne početnice, 0,18  $\mu$ M M13-30 oligonukleotidi (IRD700- ili IRD800-oznakom), 0,2 mM svakog dNTP-a, 1xPCR puffer, 0,05 U/ $\mu$ l *Taq* polimeraze, 2,5 ng/ $\mu$ l kalupa DNA. PCR program za M13-tailed početnice bio je: 94°C na 2 minute, 30 ciklusa na 94°C u trajanju od 1 minute, 0,5°C s<sup>-1</sup> do 51°C, 51°C na 30 sekundi, 0,5°C s<sup>-1</sup> do 72°C, 72°C od 1 minute, i 72°C na 5 minuta. PCR za direktno označivanje učinjeno je prema **Roeder i sur., (1998.)**. Za direktno označivane početnice za PCR reakciju pomiješano je: 0,12  $\mu$ M prednje početnice, 0,2  $\mu$ M završne početnice, 0,2 mM svakog dNTP-a, 1xPCR puffer, 0,05 U/ $\mu$ l *Taq* polimeraze, 2 ng/ $\mu$ l kalupa DNA. PCR program za direktno označivane početnice bio je: 94°C na 3 minute, 35 ciklusa na 94°C u trajanju od 1 minute, 1 minuta 50/55/60°C-ovisno o temperaturi sljepljivanja za određenu početnicu, 72°C od 2 minute, i 72°C na 5 minuta. PCR reakcije provedene su na PCR-primus96plus .

Mikrosatelitne analize provedene su koristeći fluorescentnu fragmentnu detekciju na LICOR 4200 DNA sekvencijskome sustavu. Za taj sustav ili je direktno SSR marker označen fluorokromom (IRD700 ili IRD800) ili je imao M13 završetak. U slučaju M13 završetka, kao treća početnica u PCR reakciji korištena je M13-30 oligonukleotid (5' CCC AGT CAC GAC GTT G 3'), pri čemu je ta sekvenca označena s fluorescentnom bojom na 5' kraju (IRD700 ili IRD800).

PCR produkti su amplificirani na 0,7% poliakrilamidnome gelu. Prije toga razrijeđeni su s 1:5 ili 1:10  $\mu$ l formamid detektirajućom bojom (95 % deionizirani formamid, 0,5 mM EDTA, 0,1 mg/ml fuksina ružičaste boje), nakon čega su denaturirani 5 minuta na 95°C. Elektroforeza je provođena na konstantnoj snazi od 40 W i konstantnoj temperaturi od 48°C. Slike gelova prebačene su na računalo i vizualno ocjenjivane.

### 3.9. Statističke analize

#### 3.9.1. Poljski pokusi i pokusi u stakleniku

Izvorni i AUDPC podaci korišteni su za daljnje statističke analize. Analiza varijance i Lsd testovi (ANOVA i opći linearni model), kao i korelacijske analize izračunate su pomoću SAS/STAT-a, verzija 9.1.2. pomoću PROC GLM i PROC CORR Spearman procedure.

Izračun područja unutar progresivne krivulje bolesti (AUDPC-a) (modificirano prema **Shaner and Finney, 1977.**)

$$\text{AUDPC} = \sum_{i=1}^n \{[(Y_i + Y_{i-1})/2] * (X_i - X_{i-1})\}$$

gdje je

$Y_i$  - vizualna ocjena simptoma na  $i^{\text{ti}}$  dan

$X_i$  – dan  $i^{\text{to}}$ g promatranja

$n$  – ukupan broj promatranja

Za procjenu glavnih efekata i efekata prve i druge interakcijske osi u AMMI1 modelima te biplot analizu korišten je software IRRISTAT 5.0 (Irristat for Windows ©, 2005.).

### 3.9.2. Marker analize

Jedno od mjerila informativnosti markera je informacijski sadržaj polimorfizma (PIC). Informacijski sadržaj polimorfizma je mjera za broj alela ili bendova koje marker posjeduje, kao i frekvencija svakoga alela ili benda u datoj skupini. Za izračun PIC vrijednosti korištena je sljedeća formula:

$$PIC = 1 - \sum p_i^2$$

$p_i$  – frekvencija  $i^{\text{og}}$  alela za genotip p

Matrice sličnosti genotipova izračunate su korištenjem programa NTSYSpc.2.1 (Rohlf, 1998.) koristeći SANH-klasteriranje uz UPGMA (*Unweighted Paired Group Method using Arithmetic averages*) metodu. Korištena su dva različita koeficijenta: BAND (Lynch, 1990.) i DICE (Dice, 1945.; Nei i sur., 1979.).

BAND koeficijent

$$S_{xy} = \frac{N_{xy}}{N_x + N_y}$$

$N_{xy}$ - broj zajedničkih bendova kod dva genotipa;  $N_x$  i  $N_y$ -broj individua koje su uspoređivane kod dva genotipa

DICE koeficijent

$$D = 2a / (2a + b + c)$$

a- pozitivna podudarnost (1,1); b (1,0) i c (0,1)- nepodudarnost

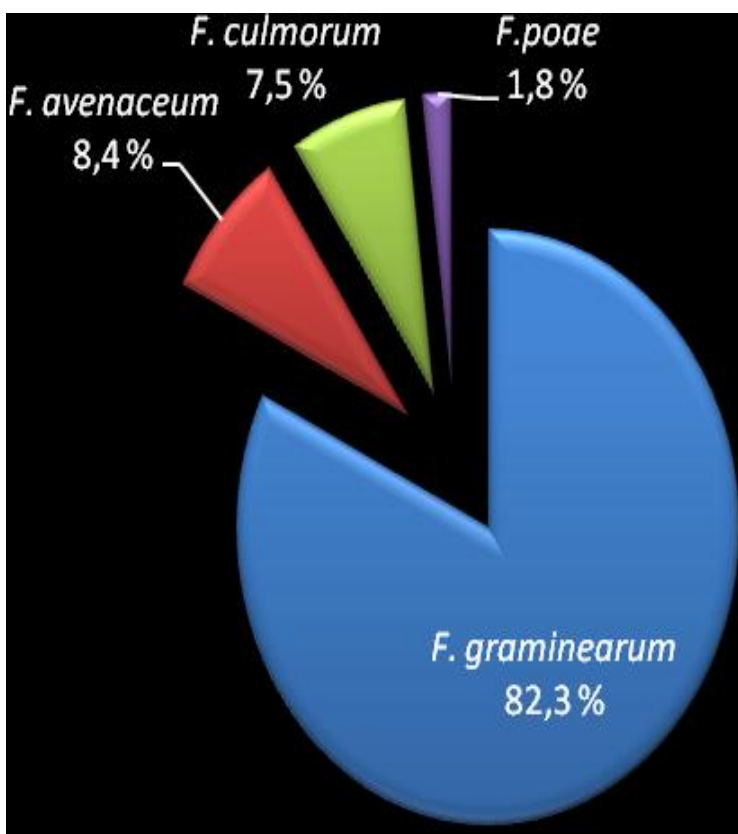
Rezultati su grafički prikazani dendrogramima.

## 4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

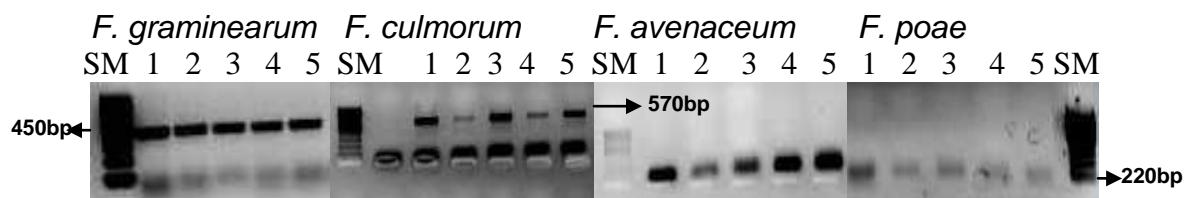
### 4.1. Morfološka i molekularna identifikacija *Fusarium* vrsta

Za morfološku identifikaciju *Fusarium* vrsta u 2008. godini na području istočne Hrvatske izolirano je 276 uzoraka. Dominantna vrsta bila je *F. graminearum* (186), a iza toga su slijedile *F. avenaceum* (19), *F. culmorum* (17), *F. poae* (4), *F. cerealis* (3) i *F. solani* (2). 45 izolata svrstano je u ostale *Fusarium* vrste zbog nemogućnosti identifikacije (Tablica 7). Molekularnim markerima potvrđene su prve četiri dominantne *Fusarium* vrste, pri čemu izraženo u postocima *F. graminearum* zauzima 82,3 %, *F. avenaceum* 8,4 %, *F. culmorum* 7,5 % i *F. poae* 1,8 % (Graf 1.).

Graf 1. Postotak najzastupljenijih *Fusarium* vrsta na području istočne Hrvatske potvrđenih molekularnom identifikacijom 2008. godine



Veličina očekivanih bendova za vrstu *F. graminearum* iznosila je 450 baznih parova, 570 bp za *F. culmorum* i 220 bp za *F. avenaceum* i *F. poae*. Slika 3 prikazuje potvrđene bendove za svaku izoliranu *Fusarium* vrstu.



Slika 3. Potvrda analiziranih izolata gdje se *F. graminearum* nalazi na 450 bp, *F. culmorum* na 570 bp, *F. avenaceum* na 220 bp i *F. poae* na 220 bp (snimila V. Španić)

Tablica 7. Broj i postotak izoliranih *Fusarium* vrsta u 2008. i 2009. godini morfološkom identifikacijom

<i>Fusarium</i> vrsta	2008. godina		2009. godina	
	Broj	Izraženo u %	Broj	Izraženo u %
Ukupno izoliranih uzoraka	276	100	222	100
<i>F. graminearum</i>	186	67,4	111	50,0
<i>F. avenaceum</i>	19	6,9	27	12,2
<i>F. culmorum</i>	17	6,2	29	13,1
<i>F. poae</i>	4	1,5	16	7,2
<i>F. cerealis</i>	3	1,1	2	0,9
<i>F. solani</i>	2	0,7	-	-
<i>F. equiseti</i>	-	-	3	1,4
<i>F. oxysporum</i>	-	-	1	0,5
Neidentificirane <i>Fusarium</i> vrste	45	16,3	33	14,9



Morfološkom identifikacijom u 2009. godini na uzorcima genotipova ozime pšenice s područja istočne Hrvatske identificirano je 222 uzorka. Najzastupljenija vrsta bila je *F. graminearum* (111), a iza toga su slijedile *F. culmorum* (29), *F. avenaceum* (27), *F. poae* (16), *F. equiseti* (3), *F. cerealis* (2) i *F. oxysporum* (1). 33 izolata svrstano je u ostale *Fusarium* vrste, jer najčešće zbog kontaminacija nisu mogli biti identificirani. (Tablica 7).

## 4.2. Horizontalna otpornost

Analizom varijance za Tip I otpornost utvrđena je statistički značajna razlika između genotipova, tretmana i godina. Interakcije nisu bile statistički značajne (Tablica 8).

Tablica 8. Analiza varijance za Tip I otpornost genotipova ozime pšenice po tretmanima (fungicid, *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum*) u dvije godine (2007./08. i 2008./09.) u Tullnu

Izvor varijabilnosti	Tip I otpornost (AUDPC)			
	Stupnjevi slobode	Sredina kvadrata	F-vrijednost	P
Genotip	23	185181,91	19,92***	<,0001
Tretman	3	10649643,89	350,67***	<,0001
Repeticija	1	1193,57	0,04ns	0,8430
Godina	1	14606280,38	480,96***	<,0001
Genotip*Tretman	69	26713,73	0,88ns	0,7320
Genotip*Godina	23	43325,74	1,43ns	0,0986
Genotip*Repeticija	23	9295,86	0,31ns	0,9993
Pogrješka	240	30369,07		

\*\*\*, \*\*, \* = značajnost na  $P < 0,001$ ,  $0,01$  i  $0,05$ ; ns = neznčajnost ( $P > 0,05$ )

Tablica 9. Spearmanov korelacijski koeficijent za srednje vrijednosti Tip I otpornosti (AUDPC) genotipova ozime pšenice između različitih tretmana (*Fusarium* izolati i fungicid) u dvije godine (2007./08. i 2008./09.) u Tullnu

Tretman	<i>F. avenaceum</i>	<i>F. culmorum</i>	Fungicid
<i>F. graminearum</i>	0,91**	0,93**	0,49*
<i>F. avenaceum</i>		0,84**	0,58**
<i>F. culmorum</i>			0,37

\*\* $p \leq 0,01$ ; \* $p \leq 0,05$

Korelacije između različitih izolata za Tip I otpornost genotipova bile su vrlo značajne, odnosno između izolata *F. graminearum* i *F. culmorum* ( $r=0,93$ ), kao i između *F. graminearum* i *F. avenaceum* ( $r=0,91$ ), te *F. avenaceum* i *F. culmorum* ( $r=0,84$ ).

Statistički opravdane korelacije utvrđene su između kontrolnoga tretmana koji je tretiran fungicidom i tretmana izolatima *F. graminearum* ( $r=0,49$ ) i *F. avenaceum* ( $r=0,58$ ). Korelacija između tretmana fungicidom i tretmana izolatom *F. culmorum* nije bila statistički opravdana (Tablica 9.).

Analizom varijance za ukupnu otpornost utvrđene su statistički značajne razlike između genotipova, tretmana i godina, a nije ih bilo za interakcije (Tablica 10.).

Tablica 10. Analiza varijance za ukupnu otpornost genotipova ozime pšenice po tretmanima (fungicid, *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum*) u dvije godine (2007./08. i 2008./09.) u Tullnu

Izvor varijabilnosti	Ukupna otpornost (AUDPC)			
	Stupnjevi slobode	Sredina kvadrata	F-vrijednost	P
Genotip	23	48003,36	14,84***	<,0001
Tretman	3	1687838,90	105,26***	<,0001
Repeticija	1	741,07	0,05ns	0,8300
Godina	1	6735890,46	420,08***	<,0001
Genotip*Tretman	69	8230,30	0,51ns	0,9993
Genotip*Godina	23	16717,40	1,04ns	0,4128
Genotip*Repeticija	23	3234,44	0,20ns	1,0000
Pogrješka	240	16034,91		

\*\*\*, \*\*, \* = značajnost na  $P < 0,001$ ,  $0,01$  i  $0,05$ ; ns = neznajnost ( $P > 0,05$ )

Za ukupnu otpornost utvrđene su statistički značajne korelacije između svih izolata, *F. graminearum* i *F. avenaceum* ( $r=0,87$ ), *F. graminearum* i *F. culmorum* ( $r=0,82$ ), *F. avenaceum* i *F. culmorum* ( $r=0,80$ ). Između tretmana fungicidom i tretmana izolatima nisu utvrđene statistički značajne korelacije (Tablica 11.).

Tablica 11. Spearmanov korelacijski koeficijent za srednje vrijednosti ukupne otpornosti (AUDPC) genotipova ozime pšenice između različitih tretmana (Fusarium izolati i fungicid) u dvije godine (2007./08. i 2008./09.) u Tullnu

Tretman	<i>F. avenaceum</i>	<i>F. culmorum</i>	Fungicid
<i>F. graminearum</i>	0,87**	0,82**	0,31
<i>F. avenaceum</i>		0,80**	0,24
<i>F. culmorum</i>			0,12

\*\* $p \leq 0,01$ ; \* $p \leq 0,05$

Analizom varijance za masu 50 klasova utvrđene su statistički značajne razlike između genotipova, godina, tretmana te za intrerakcije genotip\*godina i genotip\*repeticija (Tablica 12.).

Tablica 12. Analiza varijance za masu 50 klasova genotipova ozime pšenice po tretmanima (fungicid, *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum*) u dvije godine (2007./08. i 2008./09.) u Tullnu

Izvor varijabilnosti	Masa 50 klasova			
	Stupnjevi slobode	Sredina kvadrata	F-vrijednost	P
Genotip	23	1064,88	3,59***	0,0017
Tretman	3	9412,23	64,2***	<,0001
Repeticija	1	701,30	4,78*	0,0297
Godina	1	2270,88	15,49***	0,0001
Genotip*Tretman	69	121,45	0,83ns	0,8212
Genotip*Godina	23	312,68	2,13*	0,0026
Genotip*Repeticija	23	296,79	2,02*	0,0047
Pogrješka	240	146,61		

\*\*\*, \*\*, \* = značajnost na  $P < 0,001$ ,  $0,01$  i  $0,05$ ; ns = neznačajnost ( $P > 0,05$ )

Visoko značajne korelacije utvrđene su između izolata *F. graminearum* i *F. avenaceum* ( $r=0,64$ ), *F. graminearum* i *F. culmorum* ( $r=0,57$ ), *F. avenaceum* i *F. culmorum* ( $r=0,86$ ). Između tretmana fungicidom i tretmana izolatima utvrđene su visoko statistički značajne korelacije, pri čemu je koeficijent korelacije između tretmana fungicidom i tretmana izolatom *F. graminearum* iznosio 0,68, između fungicida i *F. avenaceum* 0,63, između tretmana fungicidom i *F. culmorum* 0,52 (Tablica 13.).

Tablica 13. Spearmanov korelacijski koeficijent za prosječne vrijednosti mase 50 klasova genotipova ozime pšenice između različitih tretmana (Fusarium izolati i fungicid) u dvije godine (2007./08. i 2008./09.) u Tullnu

Tretman	<i>F. avenaceum</i>	<i>F. culmorum</i>	Fungicid
<i>F. graminearum</i>	0,64**	0,57**	0,68**
<i>F. avenaceum</i>		0,86**	0,63**
<i>F. culmorum</i>			0,52**

\*\* $p \leq 0,01$ ; \* $p \leq 0,05$

Analizom varijance za masu zrna dobivenu od 50 klasova utvrđene su statistički značajne razlike između genotipova, tretmana, godina i interakcije genotip\*godina (Tablica 14).

Tablica 14. Analiza varijance za masu zrna dobivenu od 50 klasova genotipova ozime pšenice po tretmanima (fungicid, *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum*) u dvije godine (2007./08. i 2008./09.) u Tullnu

Izvor varijabilnosti	Masa zrna dobivena od 50 klasova			
	Stupnjevi slobode	Sredina kvadrata	F-vrijednost	P
Genotip	23	682,40	3,49**	0,0020
Tretman	3	11294,07	74,44***	<,0001
Repeticija	1	481,96	3,18ns	0,0760
Godina	1	772,14	5,09*	0,0250
Genotip*Tretman	69	114,76	0,76ns	0,9145
Genotip*Godina	23	257,57	1,70*	0,0272
Genotip*Repeticija	23	195,59	1,29ns	0,1751
Pogrješka	240	151,72		

\*\*\*, \*\*, \* = značajnost na  $P < 0,001$ ,  $0,01$  i  $0,05$ ; ns = neznajnost ( $P > 0,05$ )

Tablica 15. Spearmanov korelacijski koeficijent za prosječne vrijednosti mase zrna dobivene od 50 klasova genotipova ozime pšenice između različitih tretmana (*Fusarium* izolati i fungicid) u dvije godine (2007./08. i 2008./09.) u Tullnu

Tretman	<i>F. avenaceum</i>	<i>F. culmorum</i>	Fungicid
<i>F. graminearum</i>	0,63**	0,58**	0,55**
<i>F. avenaceum</i>		0,89**	0,30
<i>F. culmorum</i>			0,34

\*\* $p \leq 0,01$ ; \* $p \leq 0,05$

Statistički visoke značajne korelacije utvrđene su između izolata *F. graminearum* i *F. avenaceum* ( $r=0,63$ ), *F. graminearum* i *F. culmorum* ( $r=0,58$ ), *F. avenaceum* i *F. culmorum* ( $r=0,89$ ) te između *F. graminearum* i tretmana fungicidom ( $r=0,55$ ) (Tablica 15).

### 4.3. Opća (ukupna, kombinirana) otpornost na FHB

Analizom varijance za ukupnu otpornost utvrđene su statistički visoko značajne razlike između proučavanih genotipova i okolina te za interakciju genotip\*okolina (Tablica 16).

Tablica 16. Analiza varijance za opću otpornost genotipova ozime pšenice u tri okoline (2007./08. i 2008./09. u Tullnu i 2008./09. u Osijeku)

Izvor varijabilnosti	Ocjena zaraze na 22. dan			
	Stupnjevi slobode	Sredina kvadrata	F-vrijednost	P
Genotip	23	685,74	9,43***	<,0001
Repeticija	1	0,00	0,00ns	0,9984
Okolina	2	22116,05	303,99***	<,0001
Genotip*Okolina	46	236,88	3,26***	<,0001
Pogrješka	71	72,75		

\*\*\*, \*\*, \* = značajnost na  $P < 0,001$ ,  $0,01$  i  $0,05$ ; ns = neznačajnost ( $P > 0,05$ )

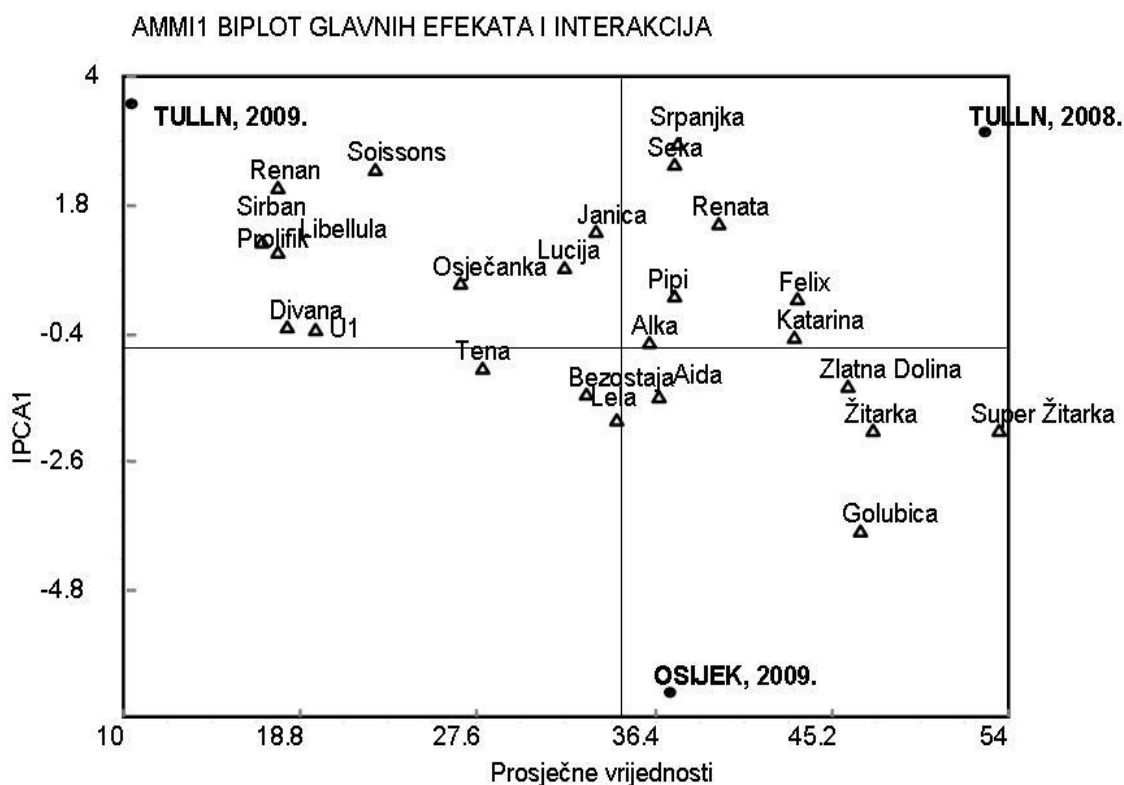
Tablica 17. Zaraza na genotipovima ozime pšenice u % na 22. dan nakon inokulacije izolatom *F. culmorum* u Osijeku u 2009. i Tullnu u 2008. i 2009. godini

Genotip	Osijek-2009.	Tulln-2008.	Tulln-2009.	Prosjek
Aida	49,8	55,0	5,0	36,6
Alka	43,5	55,0	10,0	36,2
Bezostaja	45,8	52,5	0,7	33,0
Divana	24,0	30,0	0,3	18,1
Felix	45,8	65,0	20,0	43,6
Golubica	75,0	55,0	10,0	46,7
Janica	27,8	65,0	7,5	33,4
Katarina	50,0	62,5	17,5	43,3
Lela	50,0	40,0	12,5	34,2
Libellula	15,0	35,0	3,0	17,7
Lucija	31,0	52,5	12,5	32,0
Osječanka	27,8	37,5	15,0	26,8
Pipi	39,3	62,5	10,5	37,4
Renan	7,5	45,0	0,3	17,6
Renata	34,0	55,0	30,0	39,7
Seka	24,5	67,5	20,0	37,3
Sirban Prolifik	13,0	37,5	0,1	16,9
Soissons	10,0	57,5	0,1	22,5
Srpanjka	22,5	65,0	25,0	37,5
Super Žitarka	70,5	70,0	20,0	53,5
Tena	38,3	40,0	5,5	27,9
U1	25,8	32,5	0,5	19,6
Zlatna Dolina	58,0	67,5	12,5	46,0
Žitarka	64,3	65,0	12,5	47,3
Prosjek	37,2	52,9	10,5	33,5
Lsd 0,05	15,95	20,31	11,82	9,74

Reakcije genotipova na lokaciji Tulln bile su različite ispitujući ukupnu otpornost. Postotak zaraženih klasića varirao je od 30,0 (Divana) do 70,0 (Super Žitarka), ocijenjeno na 22. dan nakon prvog tretmana u 2008. godini, te od 0,1 (Soissons i Sirban Prolifik) do 30,0 (Renata), na 22. dan u 2009. godini. U Osijeku je postotak zaraze varirao od 7,5 % (Renan) do 75,0 % (Golubica), ocijenjeno na 22. dan (Tablica 17.).

U provedenom istraživanju tijekom dvije godine u Tullnu i jedne godine u Osijeku, na 22. dan nakon inokulacije, najosjetljiviji na izolat *F. culmorum* bili su genotipovi Super Žitarka (53,5 %), Žitarka (47,3 %), Golubica (46,7 %) i Zlatna Dolina (46,0 %). Najmanji postotak zaraze na 22. dan imali su genotipovi Sirban Prolifik (16,9 %), Renan (17,6 %), Libellula (17,7 %), Divana (18,1 %), U1 (19,6 %) i Soissons (22,5 %) (Graf 2.).

Graf 2. AMMI model genotipova ozime pšenice za ocjenu zaraze na 22. dan nakon prve inokulacije (2007./08. i 2008./09. u Tullnu i 2008./09. u Osijeku)



#### 4.4. Tip I otpornost

Tablica 18. Analiza varijance za Tip I otpornost genotipova ozime pšenice izračunato pomoću AUDPC-a u dvije godine (2007./08. i 2008./09.) u Tullnu

Izvor varijabilnosti	Tip I otpornost (AUDPC)			
	Stupnjevi slobode	Sredina kvadrata	F-vrijednost	P
Genotip	23	91148,14	10,72***	<,0001
Godina	1	7694488,15	878,77***	<,0001
Repeticija	1	5214,13	0,60ns	0,0629
Genotip*Godina	23	16623,81	1,90ns	0,4478
Genotip*Repeticija	23	8503,82	0,97ns	0,5268
Pogrješka	24	8755,98		

\*\*\*, \*\*, \* = značajnost na  $P < 0,001$ ,  $0,01$  i  $0,05$ ; ns = neznačajnost ( $P > 0,05$ )

Tablica 19. FHB simptomi (%) na genotipovima ozime pšenice na 10., 14., 18., 22. i 26. dan nakon prvoga tretmana izolatom *F. culmorum* u dvije godine (2007./08. i 2008./09.) u Tullnu

Genotip	10. dan	14. dan	18. dan	22. dan	26. dan
Aida	32,8	49,5	60,5	69,3	77,3
Alka	37,0	51,3	63,5	70,5	77,0
Bezostaja	18,0	38,0	48,8	55,8	67,8
Divana	14,3	24,8	35,0	40,0	44,3
Felix	39,0	55,0	65,8	77,3	82,0
Golubica	35,8	45,0	61,8	72,3	81,0
Janica	36,5	44,8	55,3	69,3	80,5
Katarina	39,5	55,0	67,0	74,3	78,8
Lela	32,5	43,3	62,5	66,5	73,8
Libellula	25,5	36,5	50,3	61,5	79,0
Lucija	38,8	53,3	63,0	68,8	75,0
Osječanka	15,3	33,5	49,3	65,3	72,5
Pipi	29,3	49,8	61,8	68,3	79,8
Renan	17,0	26,5	43,0	55,3	60,3
Renata	41,0	71,3	77,8	82,8	84,8
Seka	36,0	58,5	67,5	76,0	80,5
Sirban Prolifik	17,5	26,5	37,3	47,0	48,0
Soissons	25,0	34,5	49,8	60,5	68,0
Srpanjka	46,0	64,0	69,3	75,5	80,8
Super Žitarka	57,0	62,5	75,0	82,0	85,0
Tena	19,3	35,0	42,5	61,5	72,3
U1	22,3	31,5	38,5	52,5	63,5
Žitarka	37,5	60,5	75,5	79,8	81,0
Zlatna Dolina	34,8	45,8	68,0	71,0	77,8
Prosjeak	31,2	45,7	57,9	66,8	73,8

Analizom varijance za Tip I otpornost genotipova utvrđene su statistički značajne razlike između genotipova i godina (Tablica 18.). Istražujući Tip I otpornost u Tullnu u dvije godine, reakcije genotipova bile su različite. Na temelju postotka zaraženih klasova kroz sve repeticije unutar dvije godine na 26. dan nakon prvoga tretmana, genotipovi Divana (44,3 %), Sirban Prolifik (48,0 %), Renan (60,3 %), U1 (63,5 %) i Bezostaja (67,8 %) imali su najmanji postotak zaraženih klasova. S najvišim postotkom zaraženih klasova bili su genotipovi Super Žitarka (85,0 %), Renata (84,8 %), Felix (82,0 %), Žitarka (81,0 %) i Golubica (81,0 %) (Tablica 19).

#### 4.5. Tip II otpornost

Analizom varijance za Tip II otpornost utvrđena je značajnost jedino između genotipova. Nije utvrđena značajnost za različite okoline (različiti odjeljci staklenika) niti za interakciju genotip\*okolina (Tablica 20.). Promatrajući analizu varijance za izbljeđivanje vršnoga dijela klasa utvrđene su statistički značajne razlike između istraživanih genotipova te za interakciju genotip\*okolina (Tablica 21.).

*Tablica 20.* Analiza varijance za Tip II otpornost genotipova ozime pšenice izračunato pomoću AUDPC-a.) u Tullnu (2009.) u dvije različite okoline (odjeljci staklenika)

Izvor varijabilnosti	Tip II otpornost (AUDPC)			
	Stupnjevi slobode	Sredina kvadrata	F-vrijednost	P
Genotip	25	1236,27	4,96***	<,0001
Okolina	1	295,21	1,18ns	0,2772
Klas	4	260,06	1,04ns	0,3848
Repeticija	1	0,07	0,00ns	0,9867
Genotip*Okolina	25	263,39	1,06ns	0,3916
Pogrješka	463	249,46		

\*\*\*, \*\*, \* = značajnost na  $P < 0,001$ ,  $0,01$  i  $0,05$ ; ns = neznačajnost ( $P > 0,05$ )

*Tablica 21.* Analiza varijance za izbljeđivanje vršnoga dijela klasa genotipova ozime pšenice izračunato pomoću AUDPC-a u Tullnu (2009.) u dvije različite okoline (odjeljci staklenika)

Izvor varijabilnosti	Izbljeđivanje vršnoga dijela klasa (AUDPC)			
	Stupnjevi slobode	Sredina kvadrata	F-vrijednost	P
Genotip	25	51,42	4,35***	<,0001
Okolina	1	20,39	1,73ns	0,1896
Klas	4	28,82	2,44ns	0,0463
Repeticija	1	21,46	1,82ns	0,1784
Genotip*Okolina	25	18,22	1,54*	0,0470
Pogrješka	463	11,82		

\*\*\*, \*\*, \* = značajnost na  $P < 0,001$ ,  $0,01$  i  $0,05$ ; ns = neznačajnost ( $P > 0,05$ )



Tablica 22. Spearmanov korelacijski koeficijent za Tip II otpornost i izbljeđivanja vršnoga dijela klasa genotipova ozime pšenice u različitim okolinama (odjeljci staklenika) u Tullnu (2009.)

Svojstvo	Izbljeđivanje vršnoga dijela klasa:	
	Okolina 1	Okolina 2
Tip II otpornost:		
Okolina 1	0,64**	
Okolina 2		0,43*

\*\* $p \leq 0,01$ ; \* $p \leq 0,05$

Tablica 23. FHB simptomi (zaraženi klasići) na genotipovima ozime pšenice na 7., 10., 13., 16. i 19. dan nakon prvoga tretmana izolatom *F. culmorum* u dvije okoline u stakleniku u Tullnu (2009.)

Genotip	7. dan	10. dan	13. dan	16. dan	19. dan
Aida	1,3	2,0	2,2	2,5	2,8
Alka	0,8	1,4	2,0	3,0	3,9
Bezostaja	0,8	1,8	2,6	3,6	4,2
Divana	0,7	1,6	2,2	4,4	5,4
E1-86U	1,0	2,0	2,6	4,1	5,4
E2-1T	0,3	0,8	1,0	1,1	1,1
Felix	0,4	1,8	2,2	3,4	4,0
Golubica	1,2	2,0	2,8	5,1	7,1
Janica	1,0	1,7	2,2	3,2	4,5
Katarina	0,8	1,3	1,9	3,3	4,5
Lela	1,3	1,6	2,0	2,3	2,7
Libellula	0,5	2,0	1,4	2,3	3,7
Lucija	0,7	1,6	2,0	3,8	5,7
Osječanka	0,9	2,0	2,7	5,1	7,0
Pipi	1,3	2,2	3,3	6,7	8,2
Renan	1,6	1,9	2,2	2,3	2,5
Renata	1,0	1,8	2,3	2,7	3,8
Seka	0,7	1,3	1,7	2,4	4,2
Sirban Prolifik	1,4	1,7	1,8	1,8	2,0
Soissons	1,1	1,9	2,6	4,3	4,9
Srpanjka	0,8	1,3	1,8	2,4	3,3
Super Žitarka	0,8	1,7	2,0	3,6	4,5
Tena	1,0	1,7	2,0	2,4	2,9
U1	1,5	2,0	2,4	2,7	2,8
Žitarka	1,3	1,7	2,0	2,6	3,0
Zlatna Dolina	1,2	1,7	2,1	3,5	4,1
Prosjek	1,0	1,7	2,2	3,3	4,2

Korelacije između Tip II otpornosti i izbljeđivanja vršnoga dijela klasa visoko su značajne u okolini 1 ( $r=0,64$ ) te značajne u okolini 2 ( $r=0,43$ ) (Tablica 22).

Najveći broj zaraženih klasića u dvije okoline (zadnja ocjena) imali su genotipovi Pipi (8,2), Golubica (7,1), Osječanka (7,1), Lucija (5,7) i E1-86U (5,4). Najmanje zaraženih klasića imali su genotipovi E2-1T (1,1), Sirban Prolifik (2,0), Renan (2,5) i Lela (2,7) (Tablica 23).

#### 4.6. Tip III otpornost

ANOVA je izračunata za klasiće koji su pokazivali DON simptome, promatranih u određenim danima i preračunato u AUDPC. Za tip III otpornost i izbljeđivanje vršnoga dijela klasa (Slika 4.) nakon tretmana DON-om varijance genotipa i interakcija genotip\*okolina su visoko značajne (Tablica 24. i 25.). Korelacije između Tip III otpornosti i izbljeđivanja klasa u okolini 1 i 2 bile su visoko značajne ( $r=0,83$ ;  $r=0,84$ ) (Tablica 26.).



Slika 4. Izbljeđenje vršnoga dijela klasa nakon tretmana DON-om (snimila V. Španić)

Najmanje širenje DON-a zabilježeno je kod kontrolnoga genotipa E2-1T te je i na 19. dan imao najmanje zaraženih klasića (0,1). S nešto višim vrijednostima DON zaraze uslijedili su genotipovi Sirban Prolifik (2,4), Renan (2,4), Divana (2,5) i U1 (2,6). Najveća DON zaraza na 19. dan zabilježena je kod genotipa Pipi (3,6), iza kojeg su uslijedili genotipovi Soissons (3,1), Renata (3,1), Srpanjka (3,1), Golubica (3,0) i Lucija (3,0) (Tablica 27).

Tablica 24. Analiza varijance za Tip III otpornost genotipova ozime pšenice izračunato pomoću AUDPC-a u Tullnu (2009.) u dvije različite okoline (odjeljci staklenika)

Izvor varijabilnosti	Tip III otpornost (AUDPC)			
	Stupnjevi slobode	Sredina kvadrata	F-vrijednost	P
Genotip	25	682,97	4,83***	<,0001
Okolina	1	184,81	1,31ns	0,2534
Klas	4	18,68	0,13ns	0,9706
Repeticija	1	8,27	0,06ns	0,8090
Genotip*Okolina	25	459,00	3,25***	<,0001
Pogrješka	463	141,29		

\*\*\*, \*\*, \* = značajnost na  $P < 0,001$ ,  $0,01$  i  $0,05$ ; ns = neznajčajnost ( $P > 0,05$ )

Tablica 25. Analiza varijance za izbljeđivanje vršnoga dijela klasa genotipova ozime pšenice izračunato pomoću AUDPC-a. u Tullnu (2009.) u dvije različite okoline (odjeljci staklenika)

Izvor varijabilnosti	Izbljeđivanje vršnoga dijela klasa (AUDPC)			
	Stupnjevi slobode	Sredina kvadrata	F-vrijednost	P
Genotip	25	71,44	2,99***	<,0001
Okolina	1	60,25	2,52ns	0,1131
Klas	4	20,53	0,86ns	0,4887
Repeticija	1	1,35	0,06ns	0,8120
Genotip*Okolina	25	78,66	3,29***	<,0001
Pogrješka	463	23,91		

\*\*\*, \*\*, \* = značajnost na  $P < 0,001$ ,  $0,01$  i  $0,05$ ; ns = neznajčajnost ( $P > 0,05$ )

Tablica 26. Spearmanov korelacijski koeficijent za Tip III otpornosti i izbljeđivanja vršnoga dijela klasa genotipova ozime pšenice u različitim okolinama (odjeljci staklenika) u Tullnu (2009.)

Svojstvo	Izbljeđivanje vršnoga dijela klasa:	
	Okolina 1	Okolina 2
Tip III otpornost:		
Okolina 1	0,83**	
Okolina 2		0,84**

\*\* $p \leq 0,01$ ; \* $p \leq 0,05$

Tablica 27. DON simptomi (izbljeđeni klasići) na genotipovima ozime pšenice na 7., 10., 13., 16. i 19. dan nakon prvoga tretmana DON-om u dvije okoline u stakleniku u Tullnu (2009.)

Genotip	7. dan	10. dan	13. dan	16. dan	19. dan
Aida	0,1	0,9	1,9	2,6	2,9
Alka	0,2	0,8	1,7	2,3	2,5
Bezostaja	0,5	1,3	1,8	2,3	2,6
Divana	0,2	1,1	1,6	2,1	2,5
E1-86U	0,1	0,6	1,5	2,2	2,8
E2-1T	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1
Felix	0,5	1,1	1,7	2,3	2,8
Golubica	0,7	1,7	2,4	2,8	3,0
Janica	0,3	1,6	2,4	2,7	2,8
Katarina	0,5	1,1	1,9	2,6	2,7
Lela	0,6	1,1	1,4	2,5	2,8
Libellula	0,5	1,6	2,2	2,5	2,7
Lucija	0,4	1,4	2,3	2,8	3,0
Osječanka	0,1	0,8	1,7	2,4	2,7
Pipi	0,6	1,4	2,3	3,1	3,6
Renan	0,3	0,8	1,3	1,9	2,4
Renata	0,2	1,0	1,9	2,5	3,1
Seka	0,4	1,3	1,7	2,6	2,8
Sirban Prolifik	0,7	1,2	1,8	2,0	2,4
Soissons	0,8	1,8	2,5	3,0	3,1
Srpanjka	0,5	1,4	2,4	2,9	3,1
Super Žitarka	0,5	1,1	1,7	2,5	2,8
Tena	0,3	1,0	1,8	2,5	2,8
U1	1,0	2,1	2,3	2,4	2,6
Žitarka	0,5	1,4	2,4	2,7	2,9
Zlatna Dolina	0,5	1,4	2,2	2,7	2,8
Prosjeak	0,5	1,2	1,9	2,4	2,7

#### 4.7. Korelacije između promatranih tipova otpornosti

U Tablici 28. prikazane su korelacije između istraživanih tipova otpornosti. Samo je korelacija između Tip I otpornosti i ukupne otpornosti bila visoko značajna ( $r=0,93$ ).

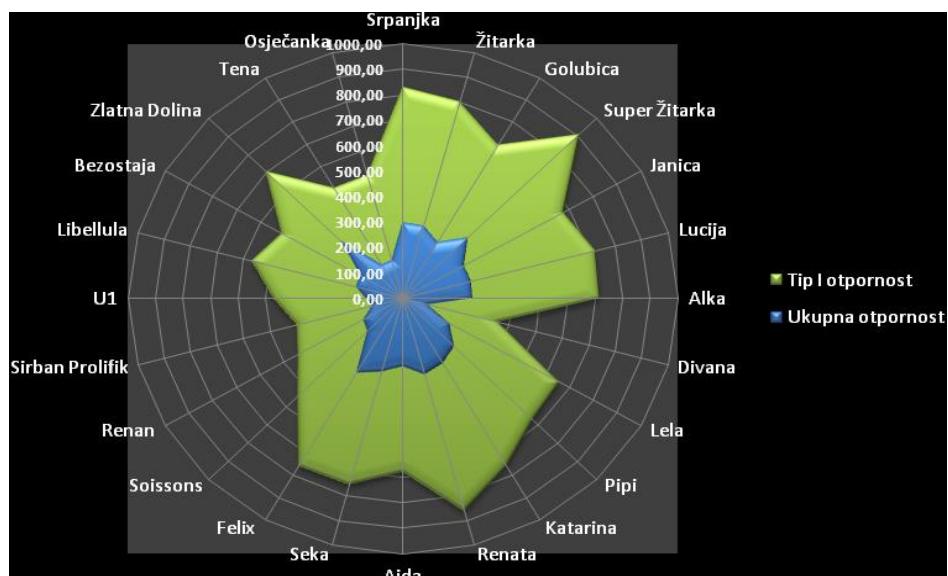
Tablica 28. Spearmanov korelacijski koeficijent za različite tipove otpornosti genotipova ozime pšenice

Svojstvo	Tip II otpornost	Tip III otpornost	Ukupna otpornost
Tip I otpornost	-0,10	0,24	0,93**
Tip II otpornost		0,34	-0,03
Tip III otpornost			0,20

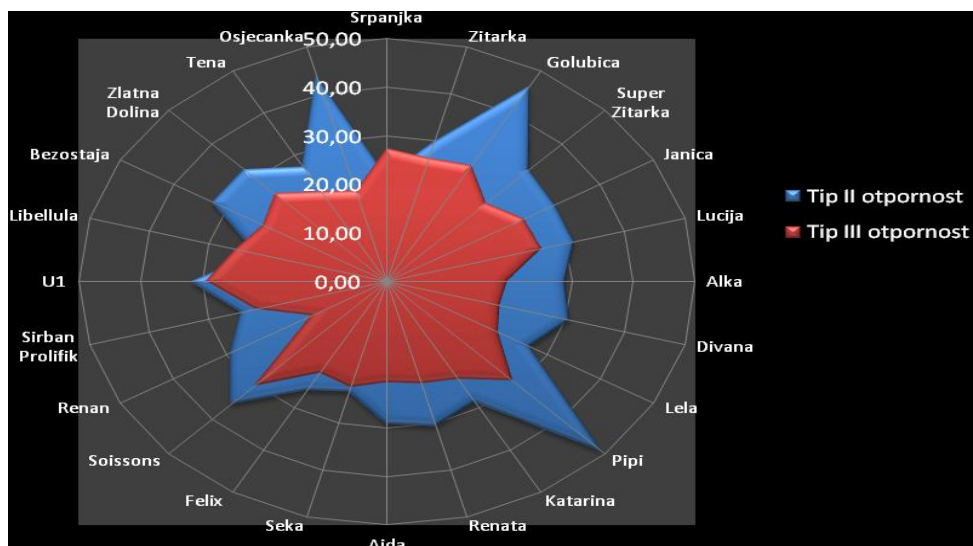
\*\* $p \leq 0,01$ ; \* $p \leq 0,05$

Kod ukupne otpornosti najmanji AUDPC u dvije godine u Tullnu, odnosno najmanje simptoma zaraze imali su genotipovi Divana (AUDPC=94,8), Sirban Prolifik (114,6), U1 (133,2), Tena (151,0), Osječanka (153,3), Renan (163,8), Bezostaja (174,1), Libellula (175,5), Soissons (180,0) i Lela (195,4). Najzaraženiji su bili genotipovi Felix (334,2), Super Žitarka (333,6), Zlatna Dolina (317,2), Renata (306,5), Seka (295,3), Srpanjka (294,6), Žitarka (291,8), Katarina (290,4), Aida (264,5), Pipi (263,3), Janica (255,6), Lucija (255,6), Alka (252,6) i Golubica (252,4) (Graf 3.; Dodatak 1.). Promatrajući Tip I otpornost u dvije godine u Tullnu, najzaraženijim su se pokazali genotipovi Super Žitarka (AUDPC=907,0), Renata (861,9), Srpanjka (826,4) i Žitarka (796,4), dok su najmanje simptoma imali genotipovi Divana (356,9), Sirban Prolifik (397,8), Renan (439,1), U1 (469,0), Osječanka (498,5) i Tena (498,6) (Graf 4.; Dodatak 1.). Kod Tip II otpornosti najveću zarazu u dvije godine u Tullnu imali su genotipovi Pipi (AUDPC=49,4), Golubica (46,4), Osječanka (44,0), a najmanje zaraženi bili su Libellula (21,7), Srpanjka (21,9), Seka (23,5), Sirban Prolifik (24,4), Felix (25,8), Lela (26,7), Tena (27,2), Katarina (28,6), Renan (29,1), Aida (29,3), Žitarka (29,7) i Divana (30,7) (Graf 4.; Dodatak 1.). Kao najotporniji genotipovi za Tip III otpornost u dvije godine u Tullnu bili su genotipovi Renan (AUDPC=14,1), Divana (18,9), Osječanka (19,2), Alka (19,5), Lela (20,8), Aida (20,8) i Tena (21,2). Najosjetljiviji genotipovi za Tip III otpornost bili su Soissons (30,4), U1 (29,2), Pipi (28,8), Srpanjka (27,2), Žitarka (26,1), Lucija (25,9), Janica (25,6), Zlatna Dolina (25,5), Libellula (25,4), Katarina (23,2) i Bezostaja (23,1) (Graf 4.; Dodatak 1.).

Graf 3. Prikaz Tip I i ukupne (kombinirane) otpornosti (AUDPC) genotipova ozime pšenice u 2007./08. i 2008./09. u Tullnu



Graf 4. Prikaz Tip II i Tip III otpornosti (AUDPC) genotipova ozime pšenice u 2007./08. i 2008./09. u Tullnu



## 4.8. Agronomska svojstva

### 4.8.1. Urod zrna

Analizom varijance utvrđene su vrlo značajne razlike za urod zrna između genotipova i tretmana te za interakciju genotip\*tretman (Tablica 29.).

Tablica 29. Analiza varijance za urod zrna genotipova ozime pšenice u dva tretmana (kontrolni i inokulirani) u Osijeku u 2009. godini

Izvor varijabilnosti	Urod zrna			
	Stupnjevi slobode	Sredina kvadrata	F-vrijednost	P
Genotip	23	672,95	10,55***	<,0001
Repeticija	3	100,87	1,58ns	0,1966
Tretman	1	13808,57	216,46***	<,0001
Genotip*Tretman	23	287,13	4,50***	<,0001
Pogrješka	141	63,79		

\*\*\*, \*\*, \* = značajnost na  $P < 0,001$ ,  $0,01$  i  $0,05$ ; ns = neznačajnost ( $P > 0,05$ )

Prosječne vrijednosti uroda zrna 24 genotipa u kontrolnome tretmanu (prirodni uvjeti) u 2009. godini na lokaciji Osijek varirale su od 59,90 dt/ha (U1) do 94,22 dt/ha (Renan), a u tretmanu inokulacijom od 26,83 dt/ha (Golubica) do 81,93 dt/ha (Renan). Veći urod zrna, u prosjeku, ostvaren je na uzorcima genotipova ozime pšenice u kontrolnome tretmanu (79,98 dt/ha) te možemo govoriti o gubitku uroda zrna (20,97 %) koji nastaje zbog zaraze *Fusarium* izolatom. Najveće razlike uroda zrna između ta dva tretmana utvrđene su za genotipove Golubica (63,82 %), Super Žitarka (48,72 %) i Aida (38,32 %), dok su najmanje razlike utvrđene kod genotipova Libellula (0,45 %), Divana (2,40 %), U1 (3,26 %), Sirban Prolifik (6,88 %), Lucija (7,91 %), Soissons (8,21 %), Srpanjka (8,32 %), Bezostaja (11,82 %), Renan (13,04 %) i Osječanka (15,96 %) (Tablica 30.).

Razlika uroda zrna pokazala je visoko značajnu korelaciju sa simptomima zaraze na 22. dan ( $r=0,82$ ). Nisu utvrđene značajne korelacije simptoma zaraze na 22. dan s parametrima kvalitete (Tablica 31).

Tablica 30. Urod zrna istraživanih genotipova ozime pšenice u dva tretmana (kontrolni i inokulirani) i njihova razlika u Osijeku 2009. godine

Genotip	Kontrola dt/ha	Inokulacija dt/ha	Prosjek dt/ha	Razlika	
				dt/ha	%
Renan	94,22	81,93	88,08	12,29	13,04
Katarina	92,18	61,82	77,00	30,36	32,94
Soissons	89,23	81,90	85,57	7,42	8,21
Aida	88,73	54,73	71,73	34,00	38,32
Srpanjka	87,95	80,63	84,29	7,32	8,32
Alka	87,85	66,97	77,41	20,88	23,77
Seka	86,44	70,04	78,24	16,40	18,97
Felix	86,36	70,81	78,59	15,55	18,01
Renata	85,92	71,82	78,87	14,10	16,41
Pipi	85,25	59,35	72,30	25,90	30,38
Žitarka	81,64	54,66	68,15	26,98	33,05
Osječanka	80,82	67,92	74,37	12,90	15,96
Janica	78,25	58,89	68,57	19,36	24,74
Bezostaja	76,42	67,39	71,91	9,03	11,82
Lucija	76,28	70,25	73,27	6,03	7,91
Divana	75,51	73,70	74,61	1,81	2,40
Super Žitarka	75,15	38,54	56,85	36,61	48,72
Lela	74,23	56,64	65,44	17,59	23,70
Golubica	74,15	26,83	50,49	47,32	63,82
Tena	73,90	58,08	65,99	15,82	21,41
Zlatna Dolina	72,29	50,01	61,15	22,28	30,82
Sirban Prolifik	72,19	67,22	69,71	4,97	6,88
Libellula	64,56	64,27	64,42	0,29	0,45
U1	59,90	57,95	58,93	1,95	3,26
Prosjek	79,98	63,01	71,50	16,96	20,97
Lsd 0,05	12,63	8,72	9,04	12,78	

Tablica 31. Spearmanov korelacijski koeficijent između simptoma zaraze ocijenjene na 22. dan i razlike u tretmanima za urod zrna te pokazatelja kvalitete

Svojstvo	RUZ	RP	RVG	RSV
Simptomi, 22. dan	0,82**	0,07	-0,01	-0,08

\*\* $p \leq 0,01$ ; \* $p \leq 0,05$

RUZ- Razlika uroda zrna; RP- Razlika proteina; RVG- Razlika vlažnog glutena; RSV- Razlika sedimentacijske vrijednosti



#### 4.8.2. Hektolitarska masa

Analizom varijance za hektolitarsku masu zrna utvrđene su statistički visoko značajne razlike između genotipova i tretmana te za interakciju genotip\*tretman (Tablica 32.).

Tablica 32. Analiza varijance za hektolitarsku masu zrna genotipova ozime pšenice u dva tretmana (kontrolni i inokulirani) u Osijeku u 2009. godini

Izvor varijabilnosti	Hektolitarska masa			
	Stupnjevi slobode	Sredina kvadrata	F-vrijednost	P
Genotip	23	19,52	15,70***	<,0001
Repeticija	3	3,37	2,71*	0,0473
Tretman	1	1512,57	1216,46***	<,0001
Genotip*Tretman	23	25,44	20,46***	<,0001
Pogrješka	141	1,24		

\*\*\*, \*\*, \* = značajnost na  $P < 0,001$ ,  $0,01$  i  $0,05$ ; ns = neznčajnost ( $P > 0,05$ )

Hektolitarska masa zrna u kontrolnome tretmanu varirala je od 78,43 kg/hl (Zlatna Dolina) do 83,80 kg/hl (Lela), a u tretmanu gdje je izvršena umjetna zaraza od 65,90 kg/hl (Golubica) do 78,88 kg/hl (Srpanjka). Veća hektolitarska masa u prosjeku je ostvarena na uzorcima genotipova ozime pšenice u kontrolnome tretmanu (80,88 kg/hl), nego u inokuliranome tretmanu (75,27 kg/hl). Najveće razlike između tretmana u hektolitarskoj masi imao je genotip Golubica (20,25 %), dok su najmanje razlike imali genotipovi U1 (1,65 %), Libellula (1,69 %) i Sirban Prolifik (2,10 %) (Tablica 33.).

Tablica 33. Hektolitarska masa zrna genotipova ozime pšenice u dva tretmana (kontrolni i inokulirani) i njihova razlika u Osijeku 2009. godine

Genotip	Kontrola	Inokulacija	Prosjek	Razlika	
	kg/hl	kg/hl	kg/hl	kg/hl	%
Lela	83,80	77,05	80,43	6,75	8,05
Super Žitarka	83,13	70,60	76,87	12,53	15,07
Felix	82,80	77,40	80,10	5,40	6,52
Golubica	82,63	65,90	74,27	16,73	20,25
Žitarka	82,10	74,68	78,39	7,42	9,04
Pipi	81,78	72,35	77,07	9,43	11,53
Renata	81,68	77,55	79,62	4,13	5,06
Aida	81,58	74,38	77,98	7,20	8,83
Divana	81,43	78,78	80,11	2,65	3,25
Osječanka	81,38	76,60	78,99	4,78	5,87
Soissons	81,18	76,33	78,76	4,85	5,97
Renan	81,15	76,43	78,79	4,72	5,82
Srpanjka	81,08	78,88	79,98	2,20	2,71
Janica	80,73	76,15	78,44	4,58	5,67
Alka	80,58	74,48	77,53	6,10	7,57
Katarina	80,50	74,18	77,34	6,32	7,85
Bezostaja	80,40	75,93	78,17	4,47	5,56
Tena	80,13	75,80	77,97	4,33	5,40
Lucija	79,55	75,93	77,74	3,62	4,55
Seka	79,23	75,65	77,44	3,58	4,52
Sirban prolifik	78,73	77,08	77,91	1,65	2,10
U1	78,65	77,35	78,00	1,30	1,65
Libellula	78,58	77,25	77,92	1,33	1,69
Zlatna dolina	78,43	69,75	74,09	8,68	11,07
Prosjek	80,88	75,27	78,08	5,61	6,90
Lsd 0,05	0,99	1,98	1,26	1,78	

### 4.8.3. Masa 1000 zrna

U Tablici 34. analizom varijance za masu 1000 zrna utvrđene su statistički visoko značajne razlike između genotipova i tretmana te interakcije genotip\*tretman.

Tablica 34. Analiza varijance za masu 1000 zrna genotipova ozime pšenice u dva tretmana (kontrolni i inokulirani) u Osijeku u 2009. godini

Izvor varijabilnosti	Masa 1000 zrna			
	Stupnjevi slobode	Sredina kvadrata	F-vrijednost	P
Genotip	23	87,00	10,54***	<,0001
Repeticija	3	41,62	5,04**	0,0024
Tretman	1	2771,72	335,76***	<,0001
Genotip*Tretman	23	38,55	4,67***	<,0001
Pogrješka	141	8,26		

\*\*\*, \*\*, \* = značajnost na  $P < 0,001$ ,  $0,01$  i  $0,05$ ; ns = neznačajnost ( $P > 0,05$ )

U kontrolnome tretmanu masa 1000 zrna varirala je od 38,08 g (Srpanjka) do 49,60 g (Super Žitarka), a u inokuliranome tretmanu od 26,83 g (Golubica) do 45,30 g (U1). Veća masa 1000 zrna u prosjeku je ostvarena na uzorcima genotipova ozime pšenice u kontrolnome tretmanu (45,33 g), nego u inokuliranome tretmanu (37,98 g). Najveće razlike u masi 1000 zrna između tretmana imali su genotipovi Golubica (39,95 %) i Super Žitarka (34,38 %), dok su najmanje razlike ostvarili genotipovi Srpanjka (-2,81 %) i Sirban Prolifik (4,17 %) (Tablica 35.).

Tablica 35. Masa 1000 zrna istraživanih genotipova ozime pšenice u dva tretmana (kontrolni i inokulirani) i njihova razlika u Osijeku 2009. godine

Genotip	Kontrola	Inokulacija	Prosjek	Razlika	
	g	g	g	g	%
Super Žitarka	49,60	32,55	41,08	17,05	34,38
Renata	49,35	43,80	46,58	5,55	11,25
Renan	49,33	44,90	47,12	4,43	8,98
Bezostaja	48,68	41,28	44,98	7,40	15,20
Felix	48,35	37,90	43,13	10,45	21,61
Divana	48,23	42,88	45,56	5,35	11,09
U1	47,95	45,30	46,63	2,65	5,53
Žitarka	47,20	35,83	41,52	11,37	24,09
Osječanka	47,15	41,75	44,45	5,40	11,45
Seka	45,68	38,88	42,28	6,80	14,89
Lela	45,50	35,35	40,43	10,15	22,31
Libellula	45,45	40,38	42,92	5,07	11,16
Aida	44,68	34,88	39,78	9,80	21,93
Alka	44,68	36,08	40,38	8,60	19,25
Golubica	44,68	26,83	35,76	17,85	39,95
Pipi	44,45	32,58	38,52	11,87	26,70
Sirban Prolifik	44,33	42,48	43,41	1,85	4,17
Tena	43,93	41,90	42,92	2,03	4,62
Katarina	43,33	35,83	39,58	7,50	17,31
Lucija	43,28	38,03	40,66	5,25	12,13
Zlatna Dolina	42,05	30,98	36,52	11,07	26,33
Janica	41,03	36,45	38,74	4,58	11,16
Soissons	41,00	35,63	38,32	5,37	13,10
Srpanjka	38,08	39,15	38,62	-1,07	-2,81
Prosjek	45,33	37,98	41,66	7,35	16,07
Lsd 0,05	4,32	3,34	3,25	4,60	

## 4.9. Kvaliteta istraživanih genotipova pšenice

### 4.9.1. Sadržaj proteina

Analizom varijance za sadržaj proteina dobivene su statistički značajne razlike između genotipova i tretmana. (Tablica 36.).

Tablica 36. Analiza varijance za sadržaj proteina genotipova ozime pšenice u dva tretmana (kontrolni i inokulirani) u Osijeku u 2009. godini

Izvor varijabilnosti	Sadržaj proteina			
	Stupnjevi slobode	Sredina kvadrata	F-vrijednost	P
Genotip	23	9,76	19,48***	<,0001
Repeticija	3	2,92	5,83***	0,0009
Tretman	1	67,10	133,95***	<,0001
Genotip*Tretman	23	0,71	1,42ns	0,1092
Pogrješka	141	0,50		

\*\*\*, \*\*, \* = značajnost na  $P < 0,001$ ,  $0,01$  i  $0,05$ ; ns = neznačajnost ( $P > 0,05$ )

Veći sadržaj proteina u prosjeku je ostvaren na uzorcima genotipova ozime pšenice u tretmanu koji je umjetno zaražen izolatom *F. culmorum* (14,1 %) nego u kontrolnome tretmanu (13,0 %). U kontrolnome tretmanu najveći sadržaj proteina je varirao od 11,4 % (Soissons) do 16,2 % (Sirban prolifik). Sadržaj proteina kod genotipova u inokuliranome tretmanu kretao se od 12,3 % (Alka) do 16,6 % (U1). Najveće razlike u postotku proteina između dva tretmana imali su genotipovi Divana (3,1 %), Aida (1,9 %) i Golubica (1,9 %), a najmanje razlike imali su Sirban Prolifik (0,3 %) i Osječanka (0,5 %) (Tablica 37.).

Tablica 37. Sadržaj proteina (%) genotipova ozime pšenice u dva tretmana (kontrolni i inokulirani) i njihova razlika u Osijeku 2009. godine

Genotip	Kontrola %	Inokulacija %	Prosjek %	Razlika %
Sirban Prolifik	16,2	16,5	16,4	0,3
U1	15,6	16,6	16,1	1,0
Tena	14,6	15,4	15,0	0,8
Osječanka	13,5	14,0	13,8	0,5
Žitarka	13,4	14,9	14,2	1,5
Super Žitarka	13,2	13,8	13,5	0,6
Renan	13,2	14,2	13,7	1,0
Divana	13,0	16,1	14,6	3,1
Golubica	13,0	14,9	14,0	1,9
Libellula	13,0	14,1	13,6	1,1
Felix	13,0	14,2	13,6	1,2
Bezostaja	12,9	14,5	13,7	1,6
Pipi	12,7	13,3	13,0	0,6
Janica	12,7	13,5	13,1	0,8
Lela	12,7	14,1	13,4	1,4
Renata	12,6	14,1	13,4	1,5
Zlatna Dolina	12,4	13,1	12,8	0,7
Seka	12,3	13,5	12,9	1,2
Katarina	12,2	13,4	12,8	1,2
Lucija	12,0	12,7	12,4	0,7
Srpanjka	12,0	13,5	12,8	1,5
Aida	11,8	13,7	12,8	1,9
Alka	11,5	12,3	11,9	0,8
Soissons	11,4	12,4	11,9	1,0
Prosjek	13,0	14,1	13,5	1,2
Lsd 0,05	1,13	0,63	0,80	1,13

#### 4.9.2. Sedimentacijska vrijednost brašna

Analizom varijance za sedimentacijsku vrijednost brašna utvrđene su statistički visoko značajne razlike između genotipova i tretmana (Tablica 38.).

Tablica 38. Analiza varijance za sedimentacijsku vrijednost brašna genotipova ozime pšenice u dva tretmana (kontrolni i inokulirani) u Osijeku u 2009. godini

Izvor varijabilnosti	Sedimentacijska vrijednost brašna			
	Stupnjevi slobode	Sredina kvadrata	F-vrijednost	P
Genotip	23	528,64	17,30***	<,0001
Repeticija	3	88,69	2,90*	0,0371
Tretman	1	1996,28	65,33***	<,0001
Genotip*Tretman	23	45,37	1,48ns	0,0849
Pogrješka	141	30,56		

\*\*\*, \*\*, \* = značajnost na  $P < 0,001$ ,  $0,01$  i  $0,05$ ; ns = neznačajnost ( $P > 0,05$ )

Tablica 39. Sedimentacijska vrijednost genotipova ozime pšenice u dva tretmana (kontrolni i inokulirani) i njihova razlika u Osijeku 2009. godine

Genotip	Kontrola cm <sup>3</sup>	Inokulacija cm <sup>3</sup>	Prosjek cm <sup>3</sup>	Razlika	
				cm <sup>3</sup>	%
Sirban Prolifik	59	59	59	0	0
Tena	58	61	60	3	5
U1	57	58	58	1	2
Golubica	48	56	52	8	14
Osječanka	48	50	49	2	4
Super Žitarka	46	44	45	-2	-5
Žitarka	45	56	51	11	20
Divana	43	61	52	18	30
Libellula	42	49	46	7	14
Renan	41	51	46	10	20
Bezostaja	41	51	46	10	20
Lela	38	48	43	9	21
Felix	38	49	44	11	22
Janica	38	42	40	4	10
Pipi	37	37	37	0	0
Katarina	37	42	40	5	12
Renata	36	49	43	13	27
Zlatna Dolina	36	38	37	2	5
Lucija	35	37	36	2	5
Aida	34	45	40	11	24
Seka	32	41	37	9	22
Srpanjka	31	38	35	7	18
Alka	31	34	33	3	9
Soissons	29	35	32	6	17
Prosjek	41	47	44	6	14
Lsd 0,05	8,54	5,20	6,26	8,85	

Veća sedimentacijska vrijednost brašna u prosjeku je utvrđena na genotipovima ozime pšenice u tretmanu u kojem je izvršena umjetna infekcija izolatom *F. culmorum* (47 cm<sup>3</sup>), nego u kontrolnome tretmanu (41 cm<sup>3</sup>). U kontrolnome tretmanu sedimentacijska vrijednost brašna varirala je od 29 cm<sup>3</sup> (Soissons) do 59 cm<sup>3</sup> (Sirban Prolifik), a u inokuliranome tretmanu od 34 cm<sup>3</sup> (Alka) do 61 cm<sup>3</sup> (Tena i Divana). Najveće razlike između dva tretmana imali su genotipovi Divana (30 %), Renata (27 %), Aida (24 %), Felix (22 %), Žitarka (20 %), Bezostaja (20 %), Renan (20 %) i Lela (21 %), a najmanje razlike imali su Super Žitarka (-5 %), Sirban Prolifik (0 %), Pipi (0 %), U1 (2 %), Osječanka (4 %), Zlatna Dolina (5 %) i Lucija (5 %) (Tablica 39.).

#### 4.9.3. Vlažni gluten

Analizom varijance utvrđene su statistički visoko značajne razlike između istraživanih genotipova i tretmana (Tablica 40.).

Tablica 40. Analiza varijance za vlažni gluten genotipova ozime pšenice u dva tretmana (kontrolni i inokulirani) u Osijeku u 2009. godini

Izvor varijabilnosti	Vlažni gluten			
	Stupnjevi slobode	Sredina kvadrata	F-vrijednost	P
Genotip	23	87,51	17,21***	<,0001
Repeticija	3	26,47	5,21**	0,0019
Tretman	1	515,81	101,45***	<,0001
Genotip*Tretman	23	7,20	1,42ns	0,1132
Pogrješka	141	5,08		

\*\*\*, \*\*, \* = značajnost na  $P < 0,001$ ,  $0,01$  i  $0,05$ ; ns = neznačajnost ( $P > 0,05$ )

U prosjeku je veći sadržaj vlažnoga glutena izmjeren na uzorcima genotipova pšenice u tretmanu koji je bio umjetno zaražen izolatom *F. culmorum* (33,9 %) nego na kontrolnim uzorcima (30,6 %). U kontrolnome tretmanu vrijednosti vlažnoga glutena varirale su od 24,5 % (Aida) do 40,3 % (Sirban Prolifik), dok se u inokuliranome tretmanu sadržaj vlažnoga glutena kretao od 28,5 % (Alka) do 40,1 % (U1). Najveće razlike između dva tretmana imao je genotip Divana (8,7 %), a najmanje razlike imali su Sirban Prolifik (-0,3 %) i Pipi (0,5 %). (Tablica 41.).



Tablica 41. Vlažni gluten genotipova ozime pšenice u dva tretmana (kontrolni i inokulirani) i njihova razlika u Osijeku 2009. godine

Genotip	Kontrola %	Inokulacija %	Prosjek %	Razlika %
Sirban Prolifik	40,3	40,0	40,2	-0,3
U1	38,4	40,1	39,2	1,7
Tena	35,6	37,8	36,7	2,3
Osječanka	33,0	34,9	33,9	1,9
Super Žitarka	32,3	33,4	32,8	1,1
Libellula	32,0	35,4	33,7	3,4
Žitarka	31,8	36,1	34,0	4,3
Golubica	31,5	35,7	33,6	4,2
Renan	31,1	34,0	32,5	2,8
Divana	30,9	39,6	35,2	8,7
Pipi	30,0	30,5	30,3	0,5
Felix	29,9	34,1	32,0	4,2
Zlatna Dolina	29,8	31,1	30,4	1,3
Janica	29,8	32,3	31,0	2,5
Seka	29,6	33,4	31,5	3,9
Bezostaja	29,5	34,4	31,9	4,9
Renata	29,4	34,2	31,8	4,7
Lela	29,2	33,8	31,5	4,7
Srpanjka	28,8	33,2	31,0	4,4
Katarina	28,1	31,8	30,0	3,7
Lucija	27,1	30,2	28,6	3,2
Soissons	26,4	28,7	27,6	2,3
Alka	25,8	28,5	27,1	2,8
Aida	24,5	30,3	27,4	5,7
Prosjek	30,6	33,9	32,2	3,3
Lsd 0,05	3,55	2,04	2,55	3,61

#### 4.10. Broj zrna zaraženih Fusariumom (FCK)

Analizom varijance utvrđene su statistički visoko značajne razlike između genotipova i okolina te značajnost za interakciju genotip\*okolina (Tablica 42.).

Tablica 42. Analiza varijance za broj zrna zaraženih Fusariumom na genotipovima ozime pšenice u tri okoline (2007./08. i 2008./09. u Tullnu i 2008./09. u Osijeku)

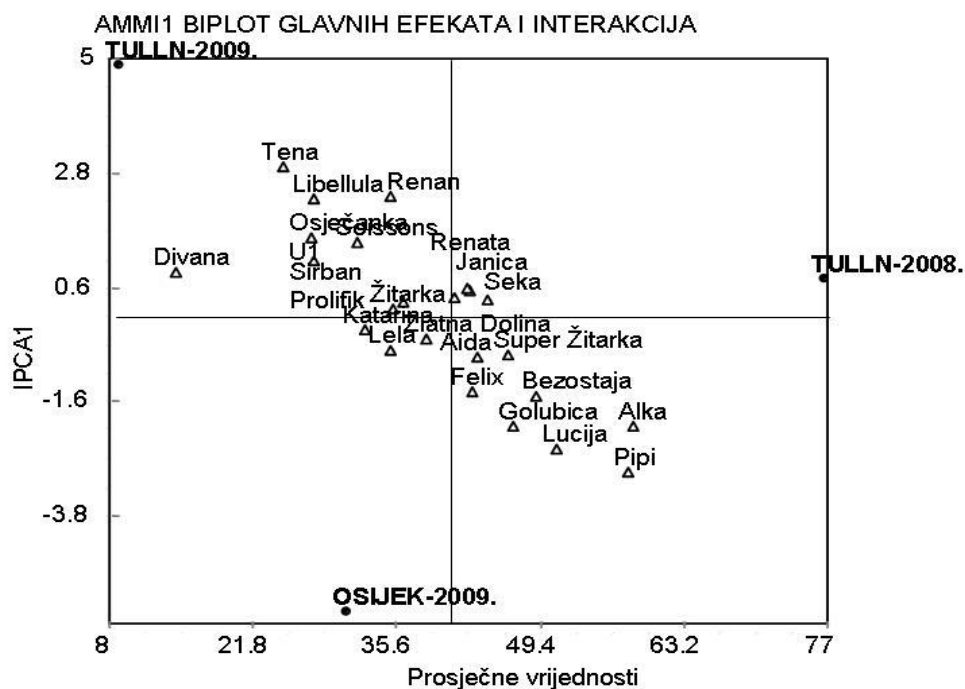
Izvor varijabilnosti	FCK			
	Stupnjevi slobode	Sredina kvadrata	F-vrijednost	P
Genotip	23	568,85	4,07***	<,0001
Repeticija	1	58,14	0,42ns	0,5210
Okolina	2	56075,69	401,33***	<,0001
Genotip*Okolina	46	277,36	1,99*	0,0046
Pogrješka	71	139,73		

\*\*\*, \*\*, \*=značajnost na  $P < 0,001$ ,  $0,01$  i  $0,05$ ; ns=neznačajnost ( $P > 0,05$ )

Najviše zaraženih zrna Fusariumom (%) u Tullnu (2007./08. i 2008./09.) i Osijeku (2008./09.) imali su genotipovi Alka (58,3 %), Pipi (57,8 %), Lucija (51,1 %) i Bezostaja (49,1 %). Najmanje zaraženih zrna imali su genotipovi Divana (18,8 %), Tena (24,8 %), Libellula (27,6 %) i Osječanka (30,4 %) (Graf 5.).

Visoko značajna korelacija utvrđena je samo između lokacije u Osijeku 2009. godine i Tullnu 2008. godine (Tablica 43.).

Graf 5. AMMI model genotipova ozime pšenice za broj zrna zaraženih Fusariumom (2007./08. i 2008./09. u Tullnu i 2008./09. u Osijeku)



Tablica 43. Spearmanov korelacijski koeficijent za FCK na različitim lokacijama i godinama

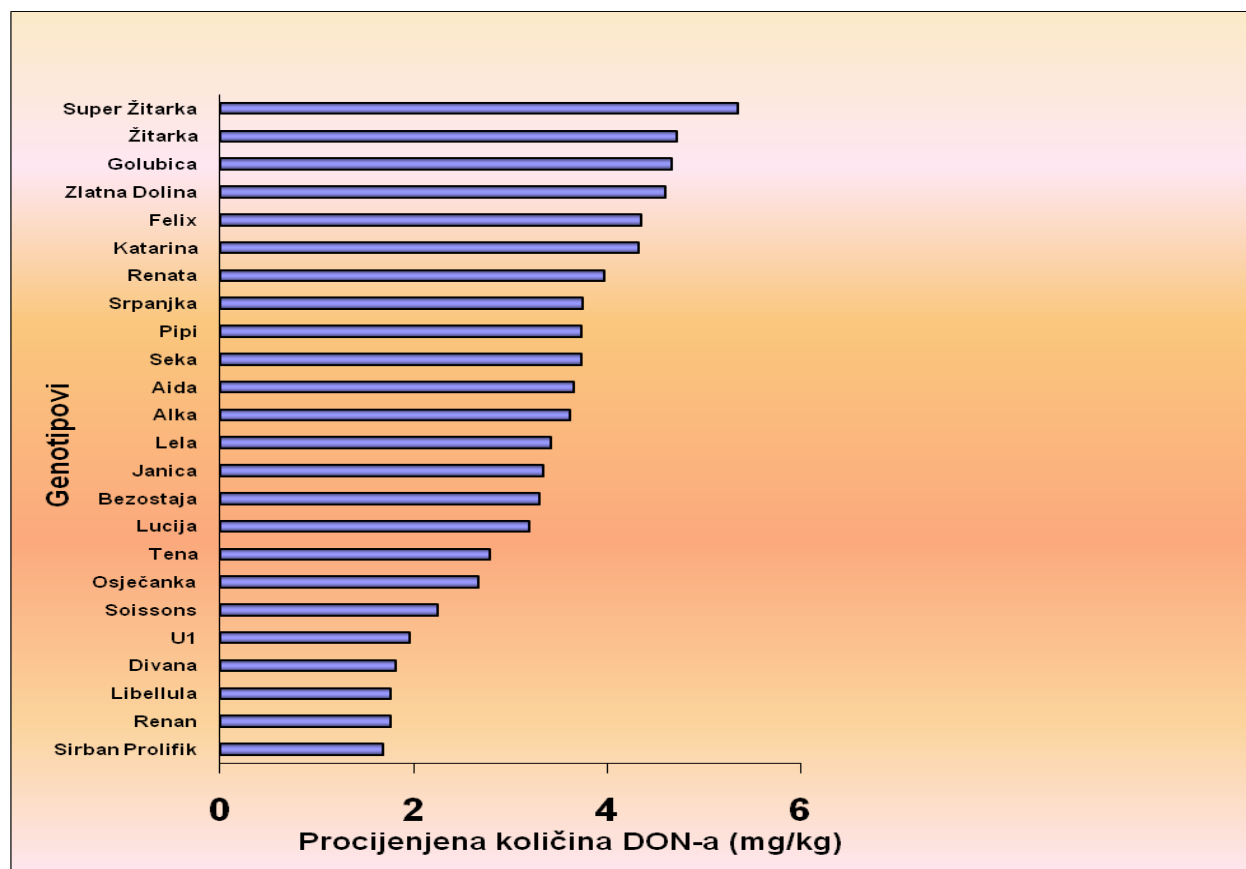
Tretman	Tulln, 2009.	Osijek, 2009.
Tulln, 2008.	0,40	0,59**
Tulln, 2009.		0,30

\*\* $p \leq 0,01$ ; \* $p \leq 0,05$

#### 4.11. Procijenjena količina DON-a

Najmanje procijenjene količine DON-a utvrđene su kod genotipova Sirban Prolifik (1,7 mg/kg), Renan (1,8 mg/kg), Libellula (1,8 mg/kg) i Divana (1,8 mg/kg), a najveće kod genotipova Super Žitarka (5,4 mg/kg), Žitarka (4,7 mg/kg) Golubica (4,7 mg/kg) i Zlatna Dolina (4,6 mg/kg) (Graf 6.).

Graf 6. Procijenjena količina DON-a



Tablica 44. Spearmanov korelacijski koeficijent za procijenjenu količinu DON-a i FCK

Svojstvo	Procijenjena količina DON-a
FCK	0,48*

\*\*p≤0,01; \*p≤0,05

Utvrđena je značajna korelacija ( $r=0,48$ ) između zrna zaraženih Fusariumom i procijenjene količine DON-a (Tablica 44.).

#### 4.12. Visina i datum cvjetanja genotipova ozime pšenice

Analizom varijance za visinu genotipova utvrđena je statistički visoko značajna razlika između genotipova i okolina te za interakciju genotip\*okolina (Tablica 45.).

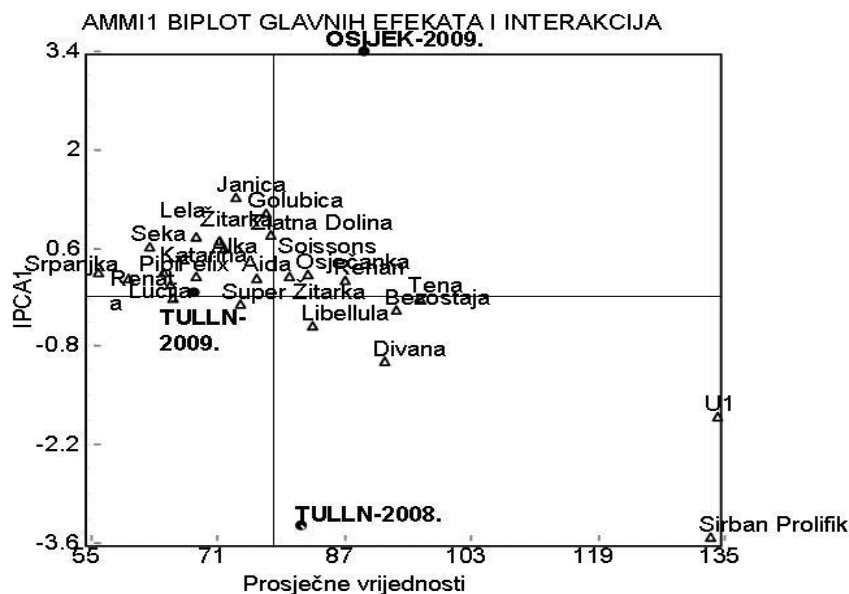
Tablica 45. Analiza varijance za visinu genotipova ozime pšenice u tri okoline (2007./08. i 2008./09. u Tullnu i 2008./09 u Osijeku)

Izvor varijabilnosti	Visina biljke			
	Stupnjevi slobode	Sredina kvadrata	F-vrijednost	P
Genotip	23	2329,19	216,72***	<,0001
Repeticija	1	16,67	1,55ns	0,2170
Okolina	2	5680,26	528,52***	<,0001
Genotip*Okolina	46	42,42	3,95***	<,0001
Pogrješka	71	10,75		

\*\*\*, \*\*, \* = značajnost na  $P < 0,001$ ,  $0,01$  i  $0,05$ ; ns = neznačajnost ( $P > 0,05$ )

Na obje lokacije (Osijek i Tulln) najviši genotipovi bili su U1 (134 cm), Sirban Prolifik (133 cm), Tena (96 cm) i Bezostaja (94 cm). Najniži genotipovi bili su Srpanjka (56 cm), Renata (60 cm), Seka (62 cm) i Katarina (64 cm) (Graf 7.).

Graf 7. AMMI model istraživanih genotipova ozime pšenice za njihovu visinu (2007./08. i 2008./09. u Tullnu i 2008./09. u Osijeku)



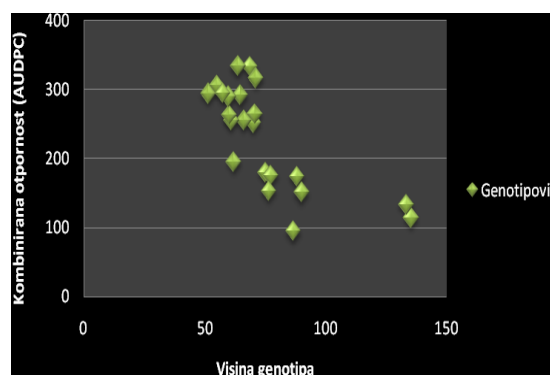
Spearmanovim korelacijskim koeficijentom utvrđena je visoka negativna značajnost između visine genotipova i AUDPC-a za ukupnu otpornost ( $r=-0,77$ ) te visine genotipova i AUDPC-a za Tip I otpornost ( $r=-0,81$ ). Između visine genotipova i AUDPCA-a za Tip II otpornost ( $r=0,14$ ) te između visine genotipova i AUDPC-a za Tip III otpornost ( $r=-0,18$ ) nije utvrđena statistički značajna korelacija (Tablica 46.). Najniži genotipovi u dvije godine pokusa u Tullnu bili su Srpanjka (51,5 cm), Renata (55,1 cm), Seka (57,5 cm) i Katarina (59,9 cm), a najviši genotipovi bili su Sirban Prolifik (135,3 cm) i U1 (133,3 cm) (Graf 8., 9., 10., 11.; Dodatak 1.).

Tablica 46. Spearmanov korelacijski koeficijent za visinu i različite tipove otpornosti genotipova ozime pšenice izmjereno u Tullnu u 2007./08. i 2008./09. godini

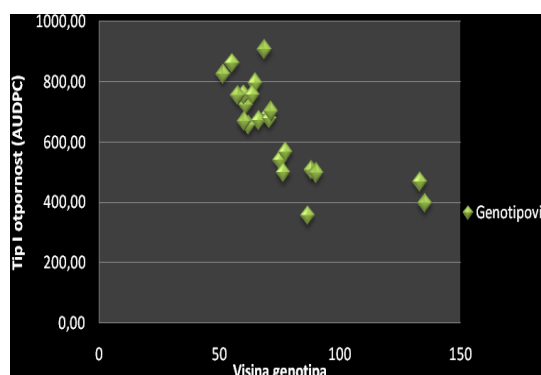
Svojstvo	AUDPC za Tip I otpornost	AUDPC za Tip II otpornost	AUDPC za Tip III otpornost	AUDPC za ukupnu otpornost
Visina genotipa	-0,81**	0,14	-0,18	-0,77**

\*\* $p \leq 0,01$ ;  $p \leq 0,05$

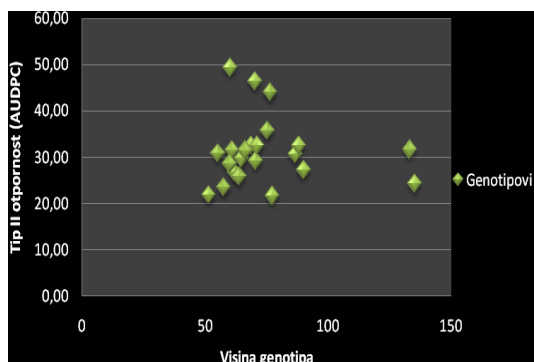
Graf 8. Ukupna otpornost (AUDPC) /visina genotipa



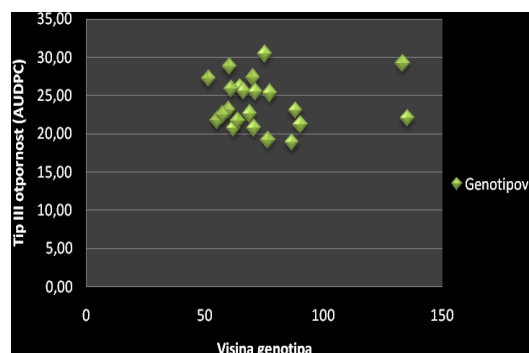
Graf 9. Tip I otpornost (AUDPC) /visina genotipa



Graf 10. Tip II otpornost (AUDPC) /visina genotipa



Graf 11. Tip III otpornost (AUDPC) /visina genotipa



Analizom varijance za datum cvjetanja genotipova nisu utvrđene statistički značajne razlike između genotipova, godina, niti za interakciju genotip\*godina (Tablica 47.).

Tablica 47. Analiza varijance za datum cvjetanja genotipova ozime pšenice u Tullnu u 2007./08. i 2008./09. godini

Izvor varijabilnosti	Datum cvjetanja			
	Stupnjevi slobode	Sredina kvadrata	F-vrijednost	P
Genotip	23	37,87	0,67ns	0,8501
Godina	1	12,04	0,21ns	0,6464
Genotip*Godina	23	2,22	0,04ns	1,0000
Pogrješka	48	56,50		

\*\*\*, \*\*, \* = značajnost na  $P < 0,001$ ,  $0,01$  i  $0,05$ ; ns = neznajnost ( $P > 0,05$ )

Nije utvrđena statistički značajna razlika između datuma cvjetanja i AUDPC-a za tipove otpornosti genotipova ozime pšenice (Tablica 48.).

Tablica 48. Spearmanov korelacijski koeficijent između datuma cvjetanja i AUDPC-a za različite tipove otpornosti genotipova ozime pšenice

Svojstvo	AUDPC za Tip I otpornost	AUDPC za Tip II otpornost	AUDPC za Tip III otpornost	AUDPC za ukupnu otpornost
Datum cvjetanja	-0,40	0,33	0,05	-0,36

\*\* $p \leq 0,01$ , \* $p \leq 0,05$

#### 4.13. Genetska divergentnost

Korištena su 24 mikrosatelitna markera za 18 lokusa da bi se ocijenila genetska udaljenost 30 genotipova pšenice. Ukupno je otkriveno 152 alela. Broj alela po lokusu varirao je od 1 za *Gwm888* do 14 za *Gwm681*, s prosječnim brojem od 8,44 alela po lokusu (Tablica 49.). Najveći broj alela po lokusu zabilježen je na A genomu sa 7,17 alela, u usporedbi s genomom B, koji je imao 5,86 alela, i genomom D, koji je imao 5,00 alela. Najveći broj alela zabilježen je na 7. kromosomu (9,50), dok je najmanji broj alela otkriven na 3. i 4. kromosomu (5,00 i 5,25) (Tablica 50.).

Tablica 49. Prikaz korištenih mikrosatelitnih markera, njihovih kromosomskih lokacija, očekivanih veličina alela, broja alela i PIC vrijednost

Mikrosatelitni marker	Kromosomska lokacija	Očekivana veličina alela (bp)	Broj alela (Na)	PIC
Gwm164	1A	120	7	0,76
Gwm642	1D	180-200	5	0,69
Gwm558	2A	-	7	0,75
Wmc667	2A	-	10	0,82
Gwm120	2B	150-170	9	0,82
Gwm349	2D	210-260	6	0,76
Gwm1071	3A	150	8	0,76
Barc84	3B	-	2	0,07
Gwm160	4A	180	5	0,56
Gwm610	4A	170	6	0,81
Gwm888	4B	195	1	0,08
Gwm624	4D	130-140	9	0,84
Barc56	5A	125	6	0,66
Barc319	5A	-	7	0,82
Gwm408	5B	-	7	0,67
Gwm335	5B	200-240	9	0,82
Gwm190	5D	200-250	2	0,24
Barc3	6A	-	5	0,75
Gwm427	6A	180-200	6	0,79
Gwm219	6B	150-190	8	0,83
Gwm816	6B	180-190	5	0,72
Barc273	6D	225-240	3	0,60
Gwm681	7A	190	14	0,90
Gwm870	7A	135	5	0,78

Tablica 50. Prikaz broja alela i broja korištenih mikrosatelita po genomima i kromosomima

Genom	Broj alela	Broj korištenih mikrosatelita
A	7,17	12
B	5,86	7
D	5,00	5
Kromosom		
1	6,50	2
2	8,00	4
3	5,00	2
4	5,25	4
5	6,20	5
6	5,40	5
7	9,50	2

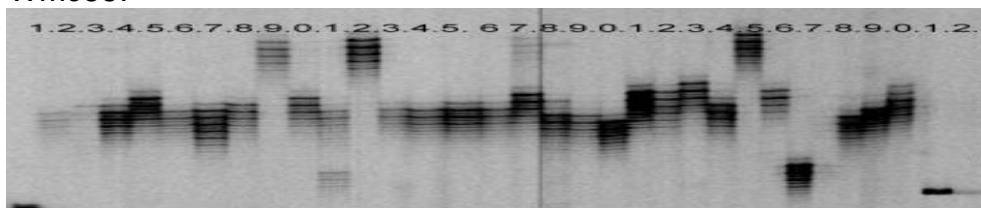


PIC vrijednosti za mikrosatelite varirale su od 0,07 do 0,90 (Tablica 49). Oko 87,5 % SSR markera koji prožimaju 7 kromosoma A, B i D genoma imalo je PIC vrijednost veću od 0,50 što ukazuje na to da je većina markera omogućila visoke razine polimorfizma. Najviše polimorfan SSR lokus bio je *Gwm681* na kromosomskoj lokaciji 7A sa 14 alela, i najvećom PIC vrijednosti od 0,90.

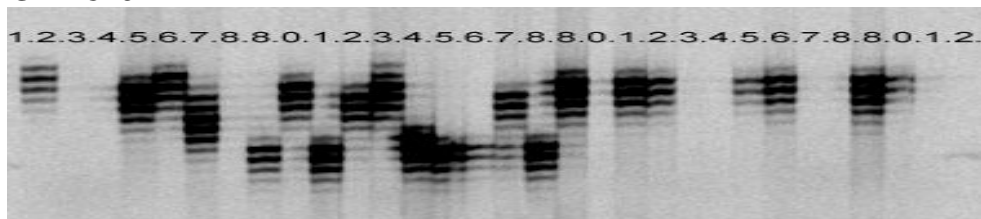
Najmanja genetska sličnost utvrđena je između genotipova Pipi i Chinese Spring (0,00), Pipi i Sumai (0,05), Janica i Courtot (0,05), Janica i Pipi (0,05), a vrijednosti su bile iste za Diceov i Bandov koeficijent. Najveća genetska sličnost dobivena je između genotipova Super Žitarka i Žitarka (0,65), Tena i Osječanka (0,65), istih vrijednosti za Diceov i Bandov koeficijent. Slične vrijednosti imale su Tena i Bezostaja (Dice=0,60; Band=0,62), Lela i Toras (0,65; 0,60), Janica i Alka (0,60; 0,61), Felix i Seka (0,57; 0,62), s malim razlikama u koeficijentima (Prilog 1).

*Slika 5.* Produkti amplifikacije s početnicama *Wmc667*, *Gwm349*, *Barc273* na 30 genotipova ozime pšenice (snimila V. Španić)

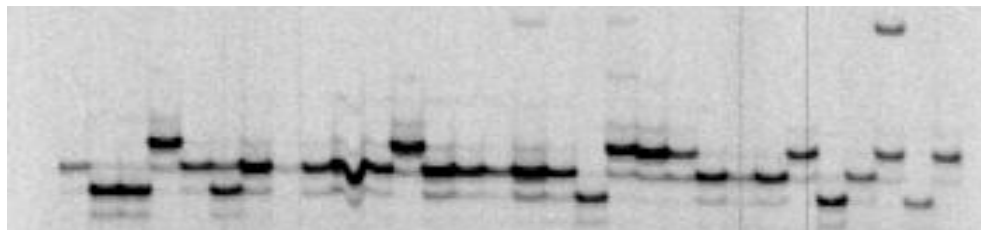
*Wmc667*



*Gwm349*

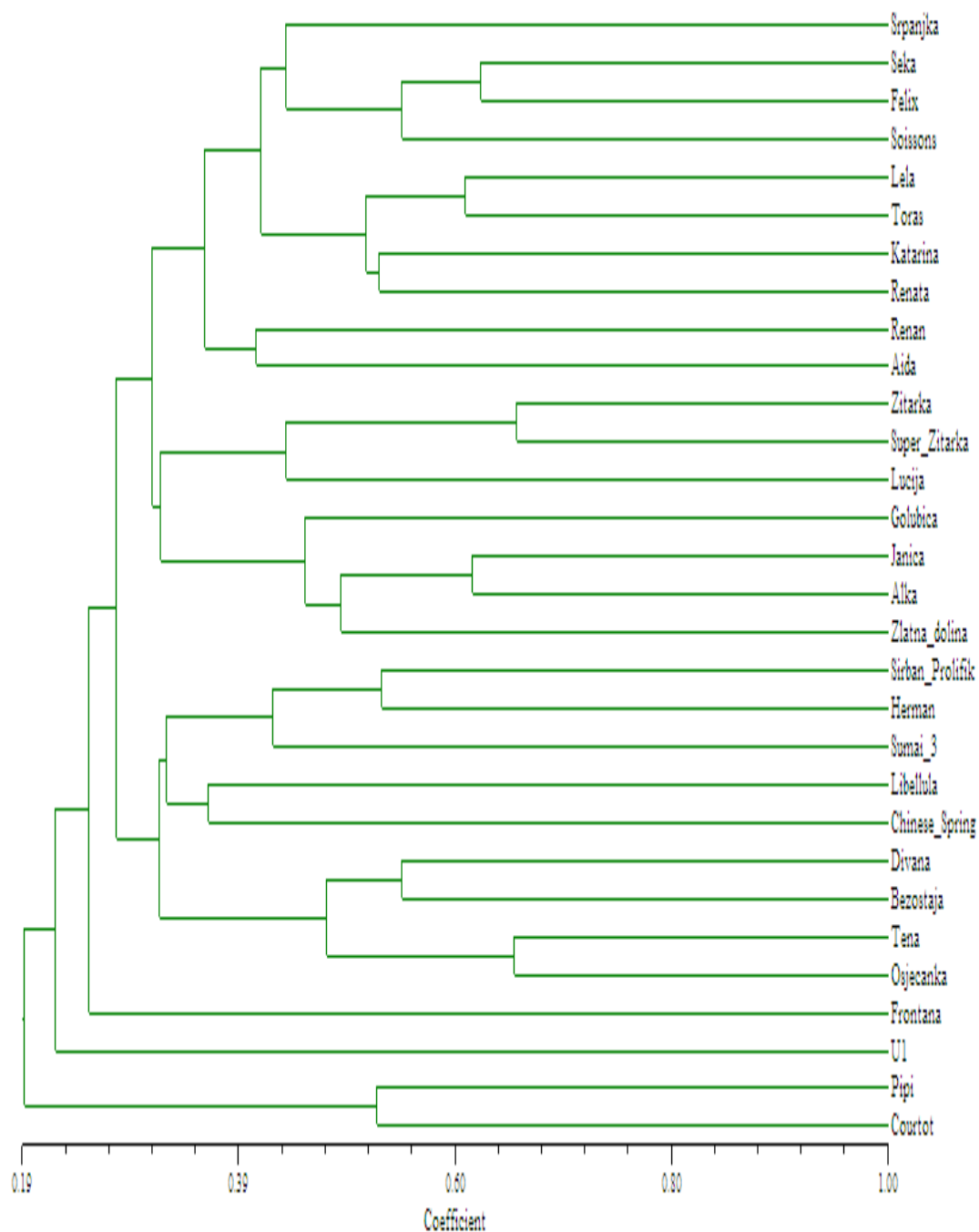


*Barc273*

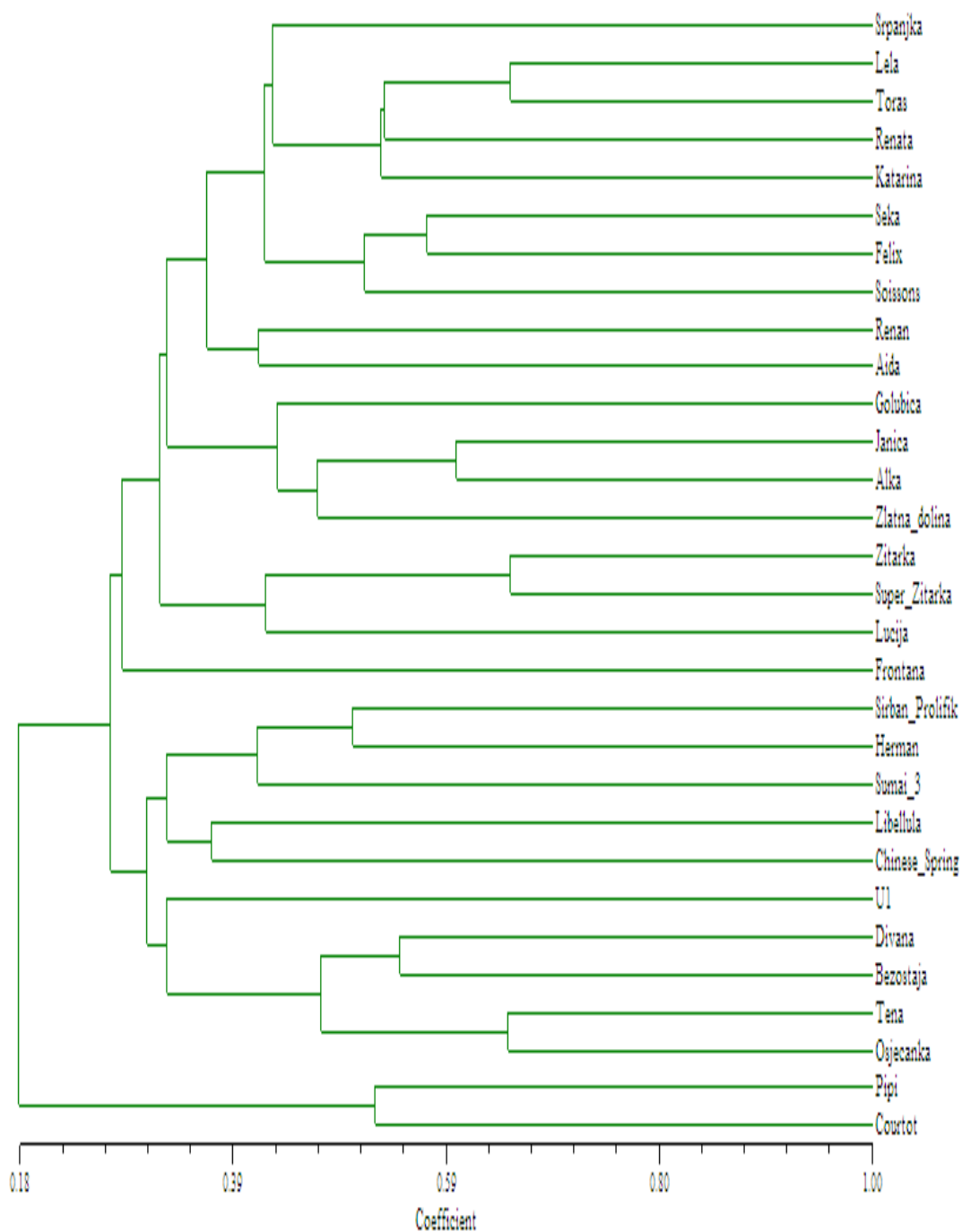


Na Slici 5. prikazani su produkti amplifikacije s tri markera (*Wmc 667*, *Xgwm 349* i *Barc 273*). Pomoću vrijednosti genetske sličnosti za istraživane genotipove učinjena je analiza UPGMA metodom te napravljeni dendogrami (Graf 12. i 13.). Na dendogramu se uočava izdvojenost genotipova Pipi i Courtat u odnosu na ostale genotipove, pa su se, prema tome, i razdvojile dvije velike grupe. U drugoj velikoj grupi izdvojen je genotip U1 i Frontana kao zasebna podgrupa. Prema dendogramu, najmanje udaljenosti uz korištenje Band koeficijenta utvrđene su za genotipove Seku i Felix, Lelu i Toras, Žitarku i Super Žitarku, Janicu i Alku te Osječanku i Tenu. Sličan prikaz dobiven je i pomoću Diceovog koeficijenta.

Graf 12. Dendogram 30 genotipova krušne pšenice baziran na 24 SSR markera. Vrijednosti X-osi odgovaraju BAND-ovom koeficijentu sličnosti.



Graf 13 Dendrogram 30 genotipova krušne pšenice baziran na 24 SSR markera. Vrijednosti X-osi odgovaraju DICE-ovom koeficijentu sličnosti.



## 5. RASPRAVA

### 5.1. Morfološka i molekularna identifikacija *Fusarium* vrsta

U cilju da se utvrde najzastupljenije vrste roda *Fusarium* na području istočne Hrvatske, sakupljena su zrna sa simptomima FHB, s kojih je izolirano više od 400 *Fusarium* izolata. Morfološke identifikacije su dugotrajniji procesi koji zahtjevaju dosta rada, uz korištenje različitih morfoloških karakteristika pri identifikaciji *Fusarium* vrsta. Zbog sličnosti različitih *Fusarium* vrsta, često se na temelju morfoloških karakteristika ne može sa 100 % sigurnošću utvrditi identificirana vrsta. Taksonomistima često identifikacija *Fusarium* vrsta predstavlja poteškoću zbog morfoloških i fizioloških razlika između izolata kod mnogih vrsta. Osim toga, morfološke su identifikacije komplicirane zbog varijabiliteta u kulturi te zbog činjenice da *Fusarium* vrste mogu brzo mutirati i degenerirati u kulturi. Zbog takve složenosti kod morfološke identifikacije često se dogodi da se ista *Fusarium* vrsta pojavljuje pod drugačijim nazivima u različitim zemljama. Molekularne tehnike omogućile su puno brža i preciznija istraživanja. U provedenom istraživanju prvo su učinjene morfološke identifikacije, a kao odlična potvrda poslužile su molekularne identifikacije.

Na temelju provedenih istraživanja i korištenjem molekularnih markera, može se govoriti o dominantnosti četiriju *Fusarium* vrsta na području istočne Hrvatske. Provedeno istraživanje identifikacije *Fusarium* vrsta putem molekularnih markera poslužilo je kao potvrda provedenoj morfološkoj identifikaciji. Da bi se utvrdile ostale *Fusarium* vrste, koje su zastupljene u manjim postocima na području istočne Hrvatske potrebno je provesti istraživanja kroz više godina te morfološku identifikaciju nadopunjavati molekularnim metodama. U borbi protiv određenoga patogena, oplemenjivač mora poznavati i genetsku varijabilnost patogena (**Martinčić i Kozumplik, 1996.**).

Vrsta *F. graminearum* bila je najdominantnija u obje godine istraživanja. Druga vrsta po učestalosti u 2008. godini bila je *F. avenaceum*, a *F. culmorum* u 2009., iako su to bile male varijacije. Ti su rezultati u skladu s istraživanjima u drugim državama u Europi (**Lemmens i sur., 2004., Isebaert i sur., 2004., Gromadzka i sur., 2008.**), gdje su dominirale iste vrste. U Njemačkoj **Birzele i sur., (2002.)**, iznijeli su sljedeće podatke o zastupljenosti *Fusarium* vrsta: u 1997. godini: *F. avenaceum* (30 %), *F. graminearum* i *F. culmorum* (35 %), *F. poae* (26 %), *F. tricinctum* (1 %), ostale *Fusarium* vrste (8 %); u 1998. godini: *F. avenaceum* (51 %), *F. graminearum* i *F. culmorum* (37 %), *F. poae* (9 %), ostale *Fusarium* vrste (3 %). U Poljskoj *Fusarium* vrste istraživali su **Tomczak i sur., (2002.)**. 1998. godine u regiji Zulway i Wielkopolska dominirale su: *F. graminearum* (20 %; 23 %), *F. culmorum* (16 %; 25 %), *F. avenaceum* (31 %; 25 %),

*Microdochium nivale* (33 %; 26 %). U 1999. godini: *F. graminearum* (26 %; 38 %), *F. culmorum* (10 %; 7 %), *F. avenaceum* (29 %; 52 %), *M. nivale* (35 %; 3 %).

## 5.2. Horizontalna otpornost

U cilju analize horizontalne otpornosti, provedeno je istraživanje u kojemu su korištena tri različita izolata (*F. graminearum*, *F. culmorum* i *F. avenaceum*), ispitujući različita svojstva (Tip I otpornost, ukupna otpornost, masa 50 klasova, masa zrna dobivena od 50 klasova). Za kontrolni tretman korišten je fungicid. Analizom varijance za svako svojstvo utvrđene su statistički značajne razlike između genotipova kod svih svojstava. Utvrđene su visoko značajne korelacije za ispitivana svojstva između svih izolata. Time je potvrđena horizontalna priroda FHB otpornosti. U slučaju kontrolnoga tretmana s fungicidima samo su neka svojstva statistički značajno korelirala s tretmanima gdje su korišteni izolati. Tako je za Tip I otpornost tretman fungicidom korelirao s tretmanima s *F. graminearum* i *F. avenaceum*, za masu 50 klasova s tretmanima izolatima te za masu zrna od 50 klasova s *F. graminearum*. Horizontalna otpornost kontrolirana je s više gena pa je zato nazvana poligena ili multigena otpornost. Ona je i nespecifična za određene rase te je stabilna i trajna, za razliku od vertikalne otpornosti, koja je kontrolirana jednim genom otpornosti te je manje stabilna. Istraživanje je pokazalo visoke korelacije između svih izolata, što ukazuje na slične reakcije na različite *Fusarium* vrste i njihove izolate, odnosno tretmane proizišle iz umjetnih infekcija s različitim izolatima *Fusariuma*. Tako visoke korelacije u skladu su s prijašnjim istraživanjima (**Mesterhazy i sur., 2005.**).

## 5.3. Pristup FHB otpornosti

Ocjena FHB otpornosti na genotipovima pšenice oduzima puno vremena, zahtjevna je i donosi povećane troškove zbog fenotipske ekspresije koja je kvantitativne prirode te je pod utjecajem okolinskih uvjeta. Precizne fenotipske ocjene, nakon inokulacija, preduvjet su istraživanju u programima koji se bave proučavanjem genotipova pšenice na otpornost na FHB. U ovom istraživanju umjetne inokulacije u poljskim pokusima provedene su individualno za svaki genotip u vrijeme cvjetanja inokulatom koji je sadržavao makrokonidije određene *Fusarium* vrste, što je dovelo do razvoja FHB na svim istraživanim genotipovima. Istraživanje je provedeno u Tullnu tijekom dvije godine te u Osijeku u jednoj godini. Postavljenim poljskim pokusom na dvije lokacije unutar dvije godine u četiri repeticije u Osijeku i dvije repeticije u Tullnu, kao i korištenje sustava za navodnjavanje u Tullnu, kojim se osigurala optimalna vlažnost, omogućila se preciznija ocjena razine otpornosti istraživanih genotipova. Pokus u stakleniku proveden

je u Tullnu u dvije različite okoline, odnosno dva različita odjeljka staklenika, da bi se dobile preciznije informacije o istraživanim svojstvima.

Da bi se utvrdile sastavnice otpornosti, korištene su različite inokulacijske tehnike. Pojava FHB (Tip I otpornost), kao i intezitet FHB (ukupna otpornost) ocijenjeni su nakon sprejne inokulacije u poljskim pokusima. Ukupna otpornost ovisi o mnogo gena koji imaju ulogu u prisutnosti ili formiranju različitih obrambenih struktura. Ispitivanjem ukupne otpornosti na dvije različite lokacije, a izmjereno na 22. dan nakon inokulacija, kao najotporniji bili su genotipovi nositelji gena na otpornost (Soissons, Renan) te genotipovi koji su korišteni u prošlosti (Sirban Prolifik, Libellula, U1) i Divana. Poznato je da genotip Renan ima QTL za otpornost na FHB na kromosomu 5AL (**Gosman i sur., 2007.**), dok genotip Soissons ima stabilan major FHB QTL povezan s *Rht-D1* lokusom (**Srinivasachary i sur., 2009.**). Razlog manje zaraženosti kod starijih genotipova može biti pripisan pasivnim mehanizmima otpornosti zbog više stabiljike, rastresitijega klasa ili posjedovanja gena za otpornost na FHB. Ne treba isključiti ni mogućnost promjene izolata patogena koji su dominirali na starijim genotipovima.

Tip I otpornost može u velikoj mjeri biti pod utjecajem okolinskih uvjeta u vrijeme FHB infekcije, kao i pod utjecajem morfoloških osobina klasa. Najbolju Tip I otpornost imali su genotipovi u literaturi poznatih otpornosti (Renan, Bezostaja) i viši stariji genotipovi (Divana, Sirban Prolifik, U1, Osječanka, Tena). Bezostaja posjeduje gene za FHB otpornost na kromosomu 2AS. Neke druge analize ukazuju da posjeduje i alele na kromosomu 5A (**Gupta i sur., 2001.**) te je i bilo za očekivati da Bezostaja pripada među otpornije genotipove. **Ban i sur., (2003.)**, smatraju da su genetska mjesta za Tip I i Tip II otpornost različita, a istovremeno su otkrili da jedan QTL na kromosomu 2DS pokazuje negativne efekte na Tip I i Tip II otpornost, što znači da Sumai 3 osim otpornih, ima i osjetljive gene. Niti **Shaner i Buechley, (2003.)**, nisu pronašli značajne korelacije između ta dva tipa otpornosti.

Tipu II i Tipu III otpornosti pristupilo se inokulirajući središnji klasić klasa te izmjerivši progresiju simptoma bolesti u uvjetima staklenika, gdje su regulirane temperatura i vlaga, te je na taj način smanjena mogućnost pogriješke. Kod Tip II otpornosti primjenjeno je ubodno ranjavanje, a kod Tip III otpornosti DON samo je uveden u cvijet između leme i palee bez ranjavanja. Relativna vlaga nakon inokulacija podignuta je na 80 %, da bi se usporila evaporacija primjenjene kapljice sa sporama. Smatramo da o Tipu II otpornosti možemo zaključiti na temelju izbljeđivanja vršnoga dijela klasa na temelju visoko značajnih korelacija između izbljeđivanja vršnoga dijela klasa i FHB simptoma. Ono, najvjerojatnije, nastaje jer dolazi do prekida translociranja vode i hranjivih tvari u vrh klasa. Središnji dio klasa kojim putuju voda i hranjive tvari biva uništen na mjestu inokulacije te je onemogućen transport vode i hranjiva kroz rahilu. Otporniji genotipovi prema AUDPC-u u razdoblju od dvije godine u Tullnu za Tip II otpornost bili su Libellula, Srpanjka, Seka, Sirban Prolifik, Felix, Lela, Tena, Katarina,

Renan, Aida, Žitarka i Divana. Na temelju rezultata koji su prikazani Grafom 14. ili 15., uočavamo kako genotip Sirban Prolifik možda ima neke slične alele s genotipom Hermann, a Hermann je otprije poznat kao otporniji genotip (**Badea i sur., 2008.**). Genotip Pipi imao je veću zarazu nego drugi genotipovi kod Tip II otpornosti. Međutim, to odstupanje možda bi trebalo pripisati nekim drugim čimbenicima, koji su proizašli iz slučajnosti, a ne iz neotpornosti genotipa. Moguće je da su biljčice toga genotipa bile nešto slabije, a samim time i klasovi, kod kojih je uslijedilo jače širenje zaraze. Prvi vidljivi simptomi prouzročeni tretiranjem DON-om bili su izbljeđene mrlje na klasićima. One su se pojavile u manje od 1 % tretiranih klasića 2 do 4 dana nakon tretmana. Izbljeđene mrlje širile su se u akropetalnome i bazipetalnome smjeru. Već nakon sedam dana, kod osjetljivih genotipova u vršnome dijelu, iznad tretmana DON-om, došlo je do izbljeđivanja te se zrna više nisu mogla normalno razviti. Kao što je i očekivano, klasovi tretirani DON-om nisu pokazivali FHB simptome (ružičasta i narančasta obojenja od micelija). Promatrajući DON simptome tijekom pet ocjena, zabilježen je progresivan rast simptoma kod svih genotipova. Primjena DON-a u središnji dio klasa, kod osjetljivih genotipova prouzročila je potpuno bljeđenje vršnoga dijela klasa, što ukazuje na to da se o otpornosti na DON može zaključiti i na temelju izbljeđenja vršnoga dijela klasa. Najotporniji genotipovi na DON, prema AUDPC-u, bili su Renan, Divana, Osječanka, Alka, Lela, Aida i Tena. Genotip Divana na dendogramu nalazi se blizu Bezostaje, što ukazuje na postojanje zajedničkih alela za otpornost. Međutim, na temelju kontrolnoga genotipa, koji je na 19. dan ocjene imao samo 0,1 % zaraze, može se postaviti pitanje posjeduju li ostali genotipovi, koji su imali preko 2 % zaraze, otpornost na akumulaciju DON-a.

U provedenom istraživanju nekoliko genotipova pokazalo je određenu razinu Tip II otpornosti na 26. dan nakon inokulacija (E2-1T, Sirban Prolifik, Renan, Lela). Međutim, gotovo svi genotipovi imali su nisku Tip I otpornost, koja je na 26. dan kod svih genotipova iznosila preko 50 %, osim kod Divane (44,3 %) i Sirban prolifika (48,0 %). Navedene su vrijednosti vrlo visoke i kod tih genotipova te je nemoguće govoriti o nekoj inicijalnoj otpornosti. Iako je genotip Divana imao veću Tip I otpornost nego drugi genotipovi, kod razvoja zaraze na 19. dan našla se u grupi genotipova koji su imali veći postotak zaraze, iako je imala nizak postotak simptoma do 10. dana, a kasnije je širenje patogena od jedne ili više primarnih infekcija rezultiralo jakim napadom. Promatrajući ukupnu otpornost, postotak zaraze dostizao je preko 50 % kod nekih genotipova. Genotipovi koji imaju do 20 % zaraženih klasova mogu se proglasiti relativno otpornijima (Sirban prolifik, Renan, Libellula, Divana i U1).



#### 5.4. Međuovisnost istraživanih tipova otpornosti

U ovom istraživanju Tip II otpornost nije pokazala značajne korelacije s drugim tipovima otpornosti. Visoka korelacija utvrđena je samo između Tip I i ukupne otpornosti. Može se postaviti pitanje jesu li pojava FHB i jakost FHB pod sličnom genetskom kontrolom, jer su između njih utvrđene visoke korelacije. **Somers, (2003.)**, je pronašao slabu korelaciju između inteziteta FHB i širenja FHB te zaključio da su ta svojstva kontrolirana različitim lokusima. Općenito je širenje FHB pokazalo malu do umjerenu vezu s ostalim FHB svojstvima.

Bez obzira na niske korelacije koje su dobivene između pojedinih svojstava, **Yu i sur., (2008.)**, smatraju da se selekcijom na Tip II otpornost može simultano poboljšati Tip I i Tip III otpornost kod pšenice.

#### 5.5. Agronomska svojstva

Urod zrna pšenice složeno je kvantitativno svojstvo, kontrolirano minor genima, niske do srednje heritabilnosti pod jakim utjecajem okolinskih činitelja (**Drezner i sur., 2007.**). Stoga je poželjno pokuse izvoditi na više lokacija, kao što je to u ovom istraživanju. Tip V otpornost je otpornost koja se očitava kao tolerantnost uroda zrna. Moglo bi se reći da genotipovi koji imaju dobar urod te ga u prisutnosti zaraze zadržavaju na razini koja je iznad prosjeka drugih genotipova, potencijalno posjeduju Tip V otpornost. Rezultati analize varijance pokazali su značajan utjecaj genotipa, tretmana i interakcije genotip\*tretman za urod zrna. Razlike između genotipova u urodu zrna bile su za očekivati između starijih i novijih genotipova. Očite su i razlike nastale između dva tretmana (kontrolnoga tretmana i tretmana izolatom *F. culmorum*). Značajne razlike između genotipova kod svih tipova otpornosti dovele su do velikih varijacija u urodu zrna, hektolitarskoj masi i masi 1000 zrna. U kontrolnome tretmanu bio je širok raspon uroda zrna od 59,90 dt/ha do 94,22 dt/ha te u inokuliranome tretmanu od 26,83 dt/ha do 81,93 dt/ha. Razlika između tretmana proizišla je iz umjetnih infekcija inokulatom od spora *F. culmorum* koje su znatno smanjile urod zrna kod nekih genotipova. Dobro su očuvali urode zrna stariji genotipovi, koji bi mogli biti potencijalni nositelji gena za otpornost ili je pretpostavka da posjeduju pasivne mehanizme, kao što je duža stabljika, te su tolerantniji na napad patogena. Možda je došlo do promjene patogenosti samih izolata patogena koji su tada dominirali. Tolerantnost je utvrđena u genotipovima kod kojih je gubitak uroda (%) bio manji te s manjim FHB simptomima. Promatrajući gubitke u urodu zrna, pojedini genotipovi imali su gubitke i preko 60 % (Golubica) u inokuliranome tretmanu u odnosu na kontrolni. No, genotipovi Libellula, Divana, U1 i Sirban Prolifik imali su neznatne gubitke uz nižu razinu uroda zrna. Manje gubitke imali su i genotipovi Lucija, Soissons, Srpanjka, Bezostaja, Renan i Osječanka.

U prethodnim istraživanjima inokulacije su smanjile urode do 20 % (**Spanic i sur., 2008.**). **Martinčić i Kozumplik, (1996.)** navode sniženje uroda nastaloga zarazama *Fusarium* spp. od 50 do 80 %. Utvrđene su visoko značajne korelacije ( $r=0,82$ ) između gubitaka u urodu zrna i simptoma na 22. dan nakon prve inokulacije. Ta je tvrdnja potvrda istraživanju koje je proveo **Mesterhazy, (1996.)**, kada je dobio visoku korelaciju vizualnih simptoma s gubitkom uroda (0,80-0,97).

Poželjno je da pšenica ima što veću hektolitarsku masu i masu 1000 zrna, što bi se moglo svrstati u parametre kvalitete. Veća masa 1000 zrna daje veći udio endosperma u zrnju i time veći prinos brašna. Veći je prinos brašna što je i veća hektolitarska masa (**Horvat, 2005.**). Genotip Golubica, koji je imao velike gubitke u urodu zrna, imao ih je i u hektolitarskoj masi i masi 1000 zrna (20,25 %; 39,95 %). Velike gubitke kod oba svojstva, uz male izuzetke, imali su genotipovi Srpanjka, Sirban Prolifik i U1.

## 5.6. Kvaliteta istraživanih genotipova pšenice

Kvaliteta pšenice kompleksno je svojstvo, genetski kontrolirano, koje je pod velikim utjecajem vanjskih čimbenika. Klasovi pšenice mogu biti napadnuti mnogobrojnim gljivama, kao što su *Tilletia caries*, te vrste iz roda *Fusarium*, koje mogu smanjiti prinos, klijavost i kvalitetu zrna. Druga grupa su saprofitske gljive (*Alternaria*, *Cladosporium* i druge), koje čine manje štete, poput gubitka u boji ili daju crna obojenja zrna (**Chelkowski, 1991.**). Zaražena zrna najčešće su izbljeđena i s tamnijim embrijom. Zrna oštećena *Fusarium* vrstama smatraju se toksičnima te postotak takvih zrna (FDK) može predstavljati mjeru za toksičnost. Velik broj zrna normalne je veličine i mase te će preko 90 % deoksinivalenola u takvim zrnima ostati prisutno i kod izmeljavanja. Kvaliteta genotipova ozime pšenice determinirana je mnogobrojnim svojstvima uključujući sadržaj proteina, hektolitarsku masu, masu 1000 zrna i mlinarsko-pekarske karakteristike brašna i tijesta. Drugi značajan pokazatelj kvalitete je zdravstvena sigurnost koja može biti narušena zbog stvaranja mikotoksina u zrnima pšenice. Sva ta svojstva mogu biti pod utjecajem okoline, plodoreda i agrotehničkih mjera.

Gubitke u tehnološkim svojstvima te pekarskoj i pivarskoj kvaliteti zbog zaraza *Fusarium* vrstama utvrdili su i **Prange i sur., 2005.** Sadržaj proteina vrlo je složeno svojstvo niže nasljednosti, a pod utjecajem okoline, te je u negativnoj korelaciji s urodom zrna. U ovom istraživanju gotovo kod svih genotipova ostvaren je veći sadržaj proteina, sedimentacijske vrijednosti brašna i vlažnoga glutena u tretmanu koji je inficiran izolatom *F. culmorum*. Slične rezultate dobili su **Pawelzik i sur., (1998.)** i **Matthaus i sur., (2002.)**. Proteini se formiraju u ranoj fazi razvoja zrna. Pri infekcijama s *Fusarium* vrstama neće doći do smanjenja sadržaja proteina, već će biti narušene rezervne bjelančevine endosperma zrna, odnosno gluten. Štura zrna bila su sitnija te su

imala i manji endosperm, što je povezano s povećanjem sadržaja proteina, a kao posljedica iskorištenja ugljikohidrata od strane patogena. **Wang i sur., (2005.)** nisu utvrdili da je na sadržaj proteina utjecala infekcija s *F. culmorum*.

Veći sadržaj proteina, sedimentacijske vrijednosti i vlažnoga glutena u prosjeku je ostvaren na uzorcima genotipova ozime pšenice u tretmanu koji je umjetno zaražen izolatom *F. culmorum* nego u kontrolnome tretmanu. Najveća razlika između dva tretmana za sadržaj proteina utvrđena je kod genotipova Divana, Aida i Golubica. Sličan trend nastavio se i za sedimentacijsku vrijednost, gdje su najveće razlike utvrđene kod genotipova Divana, Renata, Aida, Felix, Žitarka, Bezostaja, Renan i Lela, te za vlažni gluten kod genotipa Divana. U sva tri svojstva kvalitete manje razlike između dva tretmana utvrđene su kod genotipova Sirban Prolifik, Pipi i Super Žitarka, s malim odstupanjima. Da bi se dobile pouzdanije informacije o utjecaju inokulacije na pekarsku kakvoću genotipova, potrebno je proučiti primarne strukture glijadina i glutenina, sastavnica glutena. Prihvaćeno je da glijadini utječu na rastezljivost, a glutenini na čvrstoću i i elastičnost tijesta (**Horvat, 2005.**).

**Prange i sur., (2005.)** smatraju da visoke razine DON-a u zrnu pšenice ne moraju nužno narušiti pekarsku kvalitetu.

### 5.7. Broj zrna zaraženih Fusariumom (FCK)

Kod pojedinih genotipova postotak zrna zaraženih Fusariumom prelazio je 50 % (Alka, Pipi, Lucija), dok su ispod 30 % FCK-a imali genotipovi Divana, Tena i Libellula. Utvrđena je visoka korelacija ( $r=0,59$ ) između lokacije Osijek u 2009. godini i lokacije Tulln u 2008. godini. Prema procijenjenim količinama DON-a, **Liu i sur., (1997.)**, utvrdili su visoke značajne korelacije između postotka inficiranih zrna i sadržaja DON-a. To ukazuje da vizualna ocjena inficiranoga sjemena daje pouzdanu procjenu otpornosti na FHB. U ovom istraživanju dobivene su statistički značajne razlike između procijenjene količine DON-a i i vrijednosti FCK (%) ( $r=0,48$ ). **Mesterhazy, (1996.)** je utvrdio visoke pozitivne korelacije između vizualnih FHB simptoma i postotka inficiranoga sjemena ( $r=0,87-0,99$ ).

### 5.8. Visina biljke i FHB otpornost

U ovom istraživanju visina biljke bila je u značajnoj negativnoj korelaciji s AUDPC-om za Tip I i ukupnu otpornost, što je značilo da ako je bio manji AUDPC broj, viša je bila biljka i obrnuto. S AUDPC-om za Tip II i Tip III otpornost visina biljaka nije pokazala značajne korelacije. Niži genotipovi imaju tendenciju veće zaraze *Fusarium* vrstama. Na

to je ukazano i u prethodnim istraživanjima (**Mesterhazy, 1995., Hilton i sur. 1999., Buerstmayer i sur., 2000., Somers i sur., 2003.**). Kod prirodnih infekcija viši genotipovi imaju klasove na većoj udaljenosti od primarnog izvora inokuluma (poput biljnih ostataka) te se smatra da bi se umjetnim infekcijama trebao minimalizirati učinak visine biljke.

Negativna korelacija između AUDPC-a i visine biljke u ovom istraživanju mogla bi se pripisati ili genetskim učincima i/ili utjecaju mikroklima. Unatoč radu sustava za navodnjavanje, klasovi viših biljaka mogli su se brže osušiti i na taj način mogli su biti izloženi manjoj vlazi nego klasovi nižih genotipova.

Za mapirajuću populaciju genotipa Frontane (koji je uzeta kao kontrolni genotip kod genotipiziranja) potvrđeno je da posjeduje QTL-ove na kromosomu 4B i 5A koji bi mogli doprinositi FHB otpornosti (**Steiner i sur., 2004.**). Genotip Frontana nije pokazao veću sličnost s istraživanim genotipovima. Smatra se da bi alel za polupatuljast rast *Rht8* mogao utjecati na inicijalnu infekciju u poljskim uvjetima. **Handa i Ban, (2008.)**, su identificirali QTL nazvan *QFhs.kibr-2D*, koji sudjeluje u Tip I i Tip II otpornosti, te kontroliranju akumulacije DON-a, a usko je povezan sa SSR lokusom Xgwm261 i alelom za polupatuljasti rast *Rht8*. Kratka stabljika pokazala je slabu povezanost s Tip II otpornosti (-0,32), i još slabiju s Tip III otpornosti (-0,18), ali značajne negativne međuovisnosti s ukupnom otpornosti (-0,64). Osim utjecaja visine biljke, autori sugeriraju na postojanje drugih potencijalnih gena u regiji *QFhs.kibr-2D*, vjerojatno kontroliranih s *Rht8*. Uključuju mogućnost utjecaja MRP proteina. U ovom istraživanju viša stabljika negativno je korelirala s nižim AUDPC-om Tip I i ukupnu otpornost, dok za AUDPC za Tip II i Tip III otpornost nisu utvrđene jače povezanosti. Postavljena je hipoteza da kraća stabljika kod genotipova koji imaju *Rht8* alel, kao genotip Sumai 3, najčešće je sklona oštećenjima od FHB nastalim zbog inicijalne infekcije. Međutim, kod Sumai 3 do toga ne dolazi, što bi se moglo objasniti QTL-om koji prouzročuje neke epistatske efekte na Tip I i Tip II otpornost. Smatra se da je QTL na 2DS kompleks gena kontroliranih s *Rht8* za Tip I otpornost i specifičnih gena za kontroliranje Tip II otpornosti i detoksifikaciju DON-a.

**Buerstmayer i sur., (2000.) i Haberle i sur., (2009.)**, smatraju da je moguće tijekom vođenja oplemenjivačkoga procesa odabrati genotipove s kraćim stabljikama, ali da ujedno imaju FHB otpornost, iako postoji značajna negativna korelacija između vizualnih FHB simptoma i visine biljke.

## 5.9. Datum cvjetanja i FHB otpornost

Mnogi autori ukazuju na otpornost ranozrelijih genotipova na *Fusarium* vrste. U cilju uklanjanja zbnunjućega učinka datuma cvjetanja, genotipovi su individualno inokulirani

u fazi punoga cvjetanja (prema Zadoksovoj skali stadij 61-69), i dva dana poslije. Varijacije temperatura imale su veliku ulogu tijekom dana za vrijeme inokulacija. QTL-ovi za datum cvjetanja detektirani su u regijama genoma za koje je poznato da nose major gene za fotoperiod i vernalizaciju (**McIntosh i sur., 1998.**). **Gervais i sur., (2003.)**, identificirali su ko-lokalizaciju između QTL-ova otpornosti i datuma cvjetanja na kromosomu 2B. FHB otpornost značajno je korelirala s datumom cvjetanja (**Klahr i sur., 2007.**).

**Schmolke i sur., (2008.)**, pronalaze QTL-ove za otpornost na kromosomu 7BS koji su u vezi s QTL-om za datum cvjetanja, ali smatraju da je aditivan efekt na datum cvjetanja imao malu važnost. **Emrich i sur., (2008.)**, utvrdili su da je datum klasanja negativno koreliran s intezitetom zaraze. Kod ječma nije pronađena značajna korelacija između FHB simptoma i visine biljke, kao niti između FHB simptoma i datuma cvjetanja (**Ma i sur., 2008.**). U ovom istraživanju nisu utvrđene korelacije između datuma cvjetanja i AUDPC-a za tipove otpornosti.

### 5.10. Genetska divergentnost

Ovim istraživanjem utvrđena je genetska divergentnost između 30 genotipova ozime pšenice (*Tr. aestivum*) mikrosatelitnim markerima. 24 korištena markera amplificiralo je ukupno 152 alela, s prosječnim brojem od 6,33 alela po lokusu. Najveći broj alela (7,17) po lokusu utvrđen je na genomu A. Nešto manje alela utvrđeno je na genomu B (5,86), i genomu D (5,00). Te su vrijednosti veće nego što su utvrdili **Dreisigacker i sur., (2004.)**. Oni su utvrdili da je na genomu A prosječan broj alela iznosio 5,90, genomu B 6,80 i genomu D 5,80. Nešto veći broj prosječnih alela utvrdio je **Dvojković, (2009.)** (D=9,65; A=8,86; B=8,93). Genetska sličnost kod istraživanih genotipova kretala se od 0,00 do 1,00. Promatrajući izračunate vrijednosti pomoću Diceovog i Bandovog koeficijenta, za očekivati je bilo da su visoki oni između Super Žitarke i Žitarke, jer je Žitarka jedan od roditelja Super Žitarki. Osječanka je nastala mutacijom na genotipu Teni (s EMS 1,5 %), što je i razlog njihove genetske sličnosti.

Visoki koeficijenti genetske sličnosti dobiveni su i između Tene i Bezostaje, jer je Bezostaja jedan od roditelja Teni. Seka i Felix također su slični po genetskoj strukturi jer imaju zajedničkoga roditelja Srpanjku. Između Janice i Alke također je utvrđena visoka sličnost, također kao posljedica zajedničkoga roditelja (Alka ima jednog od roditelja Osk.5.140-22-91 koji je podrijetlom srodan genotipu Srpanjki, a jedan od roditelja Janice je Srpanjka). Visoka genetska sličnost između Lele i Torasa teško je objašnjiva i najvjerojatnije proizišla nekim dalekim zajedničkim alelima. Dendogram je na bazi sličnosti razdijelio genotipove u dvije velike grupe. Jedna grupa, gdje su Pipi i Courtat, odijeljena je od druge grupe, u kojoj se genotip U1 izdvojio od drugih genotipova.

## 6. ZAKLJUČAK

Na osnovi provedenih istraživanja, može se zaključiti:

1. Na temelju morfoloških i molekularnih analiza, na genotipovima ozime pšenice u istočnome dijelu Hrvatske identificirane su četiri najzastupljenije *Fusarium* vrste (*Fusarium graminearum*, *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. poae*).
2. Utvrđene su značajne pozitivne korelacije između različitih *Fusarium* izolata, što potvrđuje horizontalnu narav *Fusarium* otpornosti.
3. Proučavani genotipovi ozime pšenice značajno su se razlikovali u tipovima otpornosti na *Fusarium* vrste. Najbolju ukupnu otpornost u Osijeku i Tullnu imali su genotipovi Sirban Prolifik, Renan, Libellula, Divana i U1. Promatrajući AUDPC na lokaciji Tulln u dvije godine, najveću ukupnu otpornost imali su genotipovi Divana, Sirban Prolifik, U1 i Tena. Za Tip I otpornost najmanji postotak zaraženih klasova na 26. dan imali su genotipovi Divana, Sirban Prolifik, Renan, U1 i Bezostaja. Najmanji AUDPC za Tip I otpornost imali su genotipovi Divana, Sirban Prolifik, Renan, U1, Osječanka i Tena. Promatrajući Tip II otpornost, najmanji postotak zaraze na 19. dan imali su genotipovi Sirban Prolifik, Renan i Lela. Najveću Tip II otpornost (prema AUDPC-u) imali su genotipovi Libellula, Srpanjka, Seka, Sirban Prolifik, Felix, Lela, Tena, Katarina, Renan, Aida, Žitarka i Divana. Najmanje simptoma na 19. dan za Tip III otpornost imali su genotipovi E2-1T, Sirban Prolifik, Renan, Divana i U1. Prema AUDPC-u, najveću Tip III otpornost imali su genotipovi Renan, Divana, Osječanka, Alka, Lela, Aida i Tena.
4. Utvrđene su značajne pozitivne korelacije između Tip I i ukupne otpornosti, a neznajčajne za ostale tipove otpornosti.
5. Promatrajući agronomska svojstva u kontrolnome i inokuliranome tretmanu, došlo je do gubitaka u inokuliranome tretmanu, u odnosu na kontrolni. Gubici za urod zrna u inokuliranome tretmanu prelazili su 60 %, za hektolitarsku masu preko 20 %, te za masu 1000 zrna preko 39 %. Najmanje gubitke za urod zrna imali su genotipovi Libellula, Divana, U1, Sirban Prolifik, Lucija, Soissons, Srpanjka, Bezostaja, Renan i Osječanka; za hektolitarsku masu genotipovi U1, Libellula, Sirban Prolifik; za masu 1000 zrna genotipovi Srpanjka i Sirban Prolifik. Promatrajući kvalitetu, utvrđene su više vrijednosti svojstava u inokuliranome tretmanu u usporedbi s kontrolnim tretmanom. Za sadržaj proteina razlike između tretmana bile su od 0,6 do 3,1 %, za sedimentacijsku vrijednost od -5 do 30 %, za vlažni gluten od -0,3 do 8,7 %.
6. Utvrđene su značajne negativne korelacije između visine biljke i AUDPC-a za Tip I otpornost te visine biljke i AUDPC-a za ukupnu otpornost.

7. Pomoću mkrosatelita utvrđena je najmanja genetska udaljenost između genotipova Super Žitarke i Žitarke, Tene i Osječanke, Tene i Bezostaje, Lele i Torasa, Janice i Alke te Felixa i Seke.

Suradnjom oplemenjivača i istraživača srodnih disciplina, i na molekularnoj razini očekuje se stvaranje otpornijih genotipova pšenice na FHB, što će omogućiti veću i sigurniju proizvodnju hrane u svijetu.

## 7. CITIRANA LITERATURA

Altpeter, F, Posselt, UK (1994) Production of high quantities of 3-acetyldeoxynivalenol and deoxynivalenol. *Appl Microbiol Biotechnol* 41:384-387

Anand, A, Zhou, T, Trick, HN, Gill, BS, Bockus, WW, Muthukrishnan S (2003) Greenhouse and field testing of transgenic wheat plants stably expressing genes for thaumatin-like protein, chitinase and glucanase against *Fusarium graminearum*. *J Exp Bot* 54:1101-1111

Anderson, JA, Stack, RW, Liu, S, Waldron, BL, Fjeld, AD, Coyne, C, Moreno-Sevilla, B, Mitchehell Fetch, J, Song, QJ, Cregan, PB, Frohberg, RC (2001) DNA markers for *Fusarium* head blight resistance QTLs in two wheat populations. *Theor Appl Genet* 102:1164-1168

Anderson, JA (2007) Marker-assisted selection for *Fusarium* head blight resistance in wheat. *Int J Food Microbiol* 119:51-53

Argyris, J, Van Sanford, D, TeKrony, D (2003) *Fusarium graminearum* Infection during Wheat seed Development and Its Effect on Seed Quality. *Crop Sci* 43:1782-1788

Argyris, J, TeKrony, D, Don Hershman, VanSanford, D, Hall, M, Kennedy, B, Rucker, M, Edge, C (2005) *Fusarium* Head Blight Infection following Point Inoculation in the Greenhouse Compared with Movement of *Fusarium graminearum* in Seed and Floral Components. *Crop Sci* 45:626-634

Badea, A, Eudes, F, Graf, RJ, Laroche, A, Gaudet, DA, Sadasivaiah, RS (2008) Phenotypic and marker-assisted evaluation of spring and winter wheat germplasm for resistance to *fusarium* head blight. *Euphytica* 164:803-819

Bai, G, Shaner, G (1994) Scab in wheat: Prospects for control. *Plant Dis* 78:760-766

Bai, GH, Kolb, FL, Shaner, G, Domier, LL (1999) Amplified fragment length polymorphism markers linked to a major quantitative trait locus controlling scab resistance in wheat. *Phytopathology* 89:343-348

Bai, GH, Shaner, G, Ohm, H (2000) Inheritance of resistance to *Fusarium graminearum* in wheat. *Theor Appl Genet* 100:1-8



- Bai, GH (2001) Deoxynivalenol-nonproducing *Fusarium graminearum* Causes Initial Infection, but does not Cause Disease Spread in Wheat Spikes. *Mycopathologia* 153:91-98
- Bai, GH, Guo, P, Kolb, FL (2003) Genetics Relationships among Head Blight Resistance Cultivars of Wheat Assessed on the Basis of Molecular Markers. *Crop Sci* 43:498-507
- Bai, G, Shaner, G (2004) Management and resistance in wheat and barley to *Fusarium* head blight. *Annu Rev Phytopathol* 42:135-161
- Ban, T (2003) Comparative genetic analysis of FHB-resistant germplasm for wheat improvement. National *Fusarium* head blight proceedings. Bloomington, Minnesota, 13-15 December, 215-217
- Beaumont, MA, Ibrahim, KM, Boursot, P, Bruford, MW (1998) Measuring genetic distance. In: *Molecular tools for screening biodiversity*. Chapman and Hall. Chapter 17:315-325
- Beckmann, JS, Soller, M (1983) Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement: methodologies, mapping and costs. *Theor Appl Genet* 67:35-43
- Beyer, M, Verreet, JA, Ragab, WSM (2004) Effect of relative humidity on germination of ascospores and macroconidia of *Gibberella zeae* and deoxynivalenol production. *Int J Food Microbiol* 98:233-240
- Birzele, B, Meier, A, Hindorf, A, Kramer, J, Dehne, HW (2002) Epidemiology of *Fusarium* infection and deoxynivalenol content in winter wheat in the Rhineland, Germany. *Eur J Plant Pathol* 108:625-630
- Blandino, M, Minelli, L, Reyneri, A (2006) Strategies for the chemical control of *Fusarium* head blight: Effect on yield, alleographic parameters and deoxynivalenol contamination in winter wheat grain. *Eur J Agron* 25:193-201
- Bottalico, A, Perrone, G (2002) Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *Eur J Plant Pathol* 108:611-624
- Brennan, JM, Egan, D, Cooke, BM, Doohan, FM (2005) Effect of temperature on head blight of wheat caused by *Fusarium culmorum* and *F. graminearum*. *Plant Pathol* 54:156-160

Browne, RA (2009) Investigation into components of partial disease resistance, determined *in vitro*, and the concept of types of resistance to *Fusarium* head blight (FHB) in wheat. *Eur J Plant Pathol* 123:229-234

Buerstmayr, H, Lemmens, M, Fedak, G, Ruckenbauer, P (1999) Back-cross reciprocal monosomic analysis of *Fusarium* head blight resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet* 98:76-85

Buerstmayr, H, Steiner, B, Lemmens, M, Ruckenbauer, P (2000) Resistance to *Fusarium* head blight in two winter wheat crosses: heritability and trait associations. *Crop Sci* 40:1012-1018

Buerstmayr, H, Lemmens, M, Hartl, L, Doldi, L, Steiner, B, Stierschneider, M, Ruckenbauer, P (2002) Molecular mapping of QTLs for *Fusarium* head blight resistance in spring wheat. I. Resistance to fungal spread (Type II resistance). *Theor Appl Genet* 104:84-91

Buerstmayr, H, Steiner, B, Hartl, L, Griesser, M, Angerer, N, Lengauer, D, Miedaner, T, Schneider, B, Lemmens, M (2003) Molecular mapping of QTLs for *Fusarium* head blight resistance in spring wheat. II. Resistance to fungal penetration and spread. *Theor Appl Genet* 107:503-508

Buerstmayr, H, Ban, T, Anderson, JA (2009) QTL mapping and marker-assisted selection for *Fusarium* head blight resistance in wheat: a review. *Plant Breeding* 128: 1-26

Bushnell, WmR, Hazen, BE, Pritsch, C (2003) Histology and Physiology of *Fusarium* head blight. In: Leonard, K. J. and Bushnell, W. R.: *Fusarium Head Blight of Wheat and Barley*. The American Phytopathological Society. Chapter 3:44-83

Cadalen, T, Sourdille, P, Charmet, G, Tixier, MH, Gay, G, Boeuf, C, Bernard, S, Leroy, P, Bernard, M (1998) Molecular markers linked to genes affecting plant height in wheat using a double-haploid population. *Theor Appl Genet* 96:933-940

Chala, A, Weinert, J, Wolf, A (2003) An Integrated Approach to the Evaluation of the Efficacy of Fungicides Against *Fusarium culmorum*, the Cause of Head Blight of Wheat. *J Phytopathol* 151:673-678

Chelkowski, J (1989) Formation of mycotoxins produced by *Fusaria* in heads of wheat, triticale and rye. In: *Fusarium, Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity*. Elsevier. Chapter 4:63-85

- Chelkowski, J (1991) Fungal pathogens influencing cereal seed quality at harvest. In: Cereal grain, Mycotoxins, Fungi and Quality in Drying and storage. Elsevier. Chapter 3:53-67
- Chen, WP, Chen, PD, Liu, DJ, Kynast, R, Friebe, B, Velazhahan, R, Muthukrishnan S, Gill, BS (1999) Development of wheat scab symptoms is delayed in transgenic wheat plants that constitutively express a rice thaumatin-like protein gene. Theor Appl Genet 99:755–760
- Ciofi, C, Funk, SF, Coote, T, Cheesman, DJ, Hammond, RL, Saccheri, IJ, Bruford, MW (1998) Genotyping with microsatellite markers. In: Molecular tools for screening biodiversity. Chapman and Hall. Chapter 11.1:195-203
- Collard, BCY, Jahufer, MZZ, Brouwer, JB, Pang, ECK (2005) An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker assisted selection for crop improvement: The basic concepts. Euphytica 142:169-196
- Corio da Luz, W, Stockwell, CA, Bergstrom, C (2003) Biological Control of *Fusarium graminearum*. In: Leonard, KJ and Bushnell, W R: Fusarium Head Blight of Wheat and Barley. The American Phytopathological Society. Chapter 14:381-394
- Ćosić, J (1997) Fusarium spp. na pšenici i otpornost nekih genotipova na palež klasova. Magistarski rad. Poljoprivredni fakultet Osijek. str 64
- Ćosić, J, Jurković, D, Vrandečić, K, Šimić, B (2007) Pathogenicity of Fusarium species to wheat and barley ears. Cereal Res Commun 35:529-532
- Del Ponte, EM, Fernandes, JMC, Bergstrom, GC (2007) Influence of Growth Stage on Fusarium Head Blight and Deoxynivalenol Production in Wheat. Phytopathology 155:577-581
- Demeke, T, Clear, RM, Patrick, SK, Gaba, D (2005) Species-specific PCR-based assays for the detection of *Fusarium* species and a comparison with the whole seed agar plate method and trichothecene analysis. Int J Food Microbiol 103:271-284
- Devos, K, Gale, MD (1992) The use of randomly amplified marker in wheat. Theor Appl Genet 101:107-118
- Dice, LR (1945) Measures of the amount of ecologic association between species. Ecology 26:297-302

Dilbirligi, M, Erayman, M, Gill, KS (2005) Analysis of recombination and gene distribution in the 2L1.0 region of wheat (*Triticum aestivum* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.). *Genomics* 86:47-54

Dilbirligi, M, Erayman, M, Campbell, BT, Raddhawa, HS, Baenziger, PS, Dweikat, I, Gill, KS (2006) High-density mapping and comparative analysis of agronomically important traits on wheat chromosome 3A. *Genomics* 88:74-87

Dill-Macky, R (2003) Inoculation Methods and Evaluation of Fusarium Head Blight Resistance in Wheat. In: Leonard, KJ and Bushnell, WR: *Fusarium Head Blight of Wheat and Barley*. The American Phytopathological Society. Chapter 8:184-210

Draeger, R, Gosman, N, Steed, A, Chandler, E, Thomsett, M, Srinivasachary, Schondelmaier, J, Buerstmayer, H, Lemmens, M, Schmolke, M, Mesterhazy, M, Nicholson, P (2007) Identification of QTLs for resistance to Fusarium head blight, DON accumulation and associated traits in the winter wheat variety Arina. *Theor Appl Genet* 115:617-625

Dreisigacker, S, Zhang, P, Warburton, ML, Skovmand, B, Hosington, D, Bohn, M, Melchinger, AE (2004) SSR and Pedigree Analyses of Genetic Diversity among CIMMYT Wheat Lines Targeted to Different Megaenvironments. *Crop Sci* 44:381-388

Drezner, G, Dvojkovic, K, Horvat, D, Novoselovic, D, Lalic, A (2007) Environmental impacts on wheat agronomic and quality traits. *Cereal Res Commun* 35:357-360

Dubin, HJ, van Ginkel, M (1990): The status of wheat diseases and disease research in warmer areas. In: Sauder, DA: *Wheat for the Nontraditional Warm areas*. Foz do Iguacu, Brazil. p. 125-145

Dvojkovic, K, Drezner, G, Horvat, D, Novoselovic, D, Spanic, V (2007) Fusarium head blight influence on agronomic and quality traits of winter wheat cultivars. *Cereal Res Commun* 35:365-368

Dvojković, K (2009) Genetska raznolikost hrvatskih kultivara pšenice. Disertacija. Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. str 155

Emrich, K, Wilde, F, Miedaner, T, Piepho, HP (2008) REML approach for adjusting the Fusarium head blight rating to a phenological date in inoculated selection experiments of wheat. *Theor Appl Genet* 117:65-73

Gale, MD, Atkinson, MD, Chinoy, CN, Harcourt, RL, Jia, J, Li, QJ, Devos, KM (1995) Genetic maps of hexaploid wheat. Proceedings of the Eighth International Wheat Genetics Symposium, Beijing, China, 19-24, July, 1993, 1:29-40

Gale, LR (2003) Population Biology of *Fusarium* Species Causing Head Blight of Grain Crops. In: Leonard, K.J and Bushnell, WR: *Fusarium* Head Blight of Wheat and Barley. The American Phytopathological Society. Chapter 5:120-143

Gervais, L, Dedryver, F, Morlais, JY, Bodusseau, V, Negre, S, Bilous, M, Groos, C, Trottet, M (2003) Mapping of quantitative trait loci for field resistance to *Fusarium* head blight in an European winter wheat. *Theor Appl Genet* 106:961-970

Gosman, N, Bayles, R, Jennings, P, Kirby, J, Nicholson, P (2007) Evaluation and characterization of resistance to *Fusarium* head blight caused by *Fusarium culmorum* in UK winter wheat cultivars. *Plant Pathol* 56:264-276

Goswami, RS, Kistler, HC (2004) Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Mol Plant Pathol* 5:515-525

Gromadzka, K, Chelovski, J, Stepień, L, Golinski, P (2008) Occurrence of Zearalenone in wheat and maize grain in Poland. *Cereal Res Commun* 36:361-363

Gupta, PK, Varshney, RK, Sharma, PC, Ramesh, B (1999) Molecular markers and their applications in wheat breeding. *Plant Breeding* 118:369-390

Gupta, A, Lipps, PE, Sneller, CH, Campbell, KG (2001) Molecular and pedigree analysis of sources of resistance to FHB in wheat. National *Fusarium* Head Blight Forum. Erlanger, KV, 8-10 December, p 181

Haberle, J, Schweizer, G, Schweizer, G, Schondelmaier, J, Zimmermann, G, Hartl, L (2009) Mapping of QTL for resistance against *Fusarium* head blight in the winter wheat population Pelikan//Bussard/Ning 8026. *Plant Breeding* 128-27:35

Handa, H, Ban, T (2008) Relationship between plant height and *Fusarium* head blight resistance for the QTL on the wheat chromosome 2DS, QFhs.kibr-2DS. The 11<sup>th</sup> International Wheat Genetics Symposium proceedings. Sydney University Press, Brisbane, Australia, 24-29, August

Hilton, AJ, Jenkinson, P, Hollins, TW, Parry, DW (1999) Relationship between cultivar height and severity of *Fusarium* ear blight in wheat. *Plant Pathol* 48:202-208

Hollins, TW, Ruckenbauer, P, De Jong, H (2002) Progress towards wheat varieties with resistance to fusarium head blight. *Food Control* 14:239-244

Homdork, S, Fehrmann, H, Beck, R (2000) Effect of Field Application of Tebuconazole on Yield, Yield Components and the Mycotoxin Content of *Fusarium*-infected Wheat Grain. *Phytopathology* 148:1-6

Horvat, D (2005) Kvantifikacija bjelančevina gluten RP-HPLC metodom i procjena njihovog utjecaja na pekarsku kakvoću Os kultivara pšenice. Disertacija. Prehrambeno-Tehnološki fakultet Sveučilišta J.J.Strossmayera u Osijeku. str. 111

Huang, XQ, Boerner, A, Roeder, MS, Ganai, MW (2002) Assessing genetic diversity of wheat (*Triticum aestivum* L.) germplasm using microsatellite markers. *Theor appl genet* 105:699-107

Huttner, E, Debrand, M (2001) Contribution of Genomics to Wheat Improvement. In: Bonjean, AP and Angus, WJ: *The World Wheat Book*. Lavoisier Publishing. Chapter 41:1061-1079

Irristat for Windows © 2005, Version 5.0, International Rice Research Institute DAPO Box 7777, Metro Manilla, Phillipines

Isebaert, S, Devreese, R, Maene, P, Fremaut, D, Vlaemynck, G, Haesaert, G (2004) Differences in susceptibility of winter wheat varieties for *Fusarium* species under Belgian growing conditions. *Commun Agric Appl Biol Sci* 69:449-561

Klahr, A, Zimmermann, G, Wenzel, G, Mohler, V (2007) Effects of environment, disease progress, plant height and heading date on detection in QTLs for resistance to *Fusarium* head blight in an European wheat cross. *Euphytica* 154:17-28

Kolb, FL, Bai, GH, Muehlbauer, GJ, Anderson, JA, Smith, KP, Fedak, G (2001) Host Plant Resistance Genes for *Fusarium* Head Blight: Mapping and Manipulation with Molecular Markers. *Crop Sci* 41:611-619

Korzun, V (2002) Use of molecular markers in cereal breeding. *Cell. Mol Biol Lett* 7:811-820

Kremer, A, Petit, RJ, Ducouso, A (1998) Structure of gene diversity, gene flow and gene conservation in *Quercus petraea*. In: Turok, J, Kremer, A, de Vries, S (Eds.), *First European Meeting on Social Hardwoods*. IPGRI, Roma. p. 133–144

Lemmens, M, Buerstmayr, H, Ruckenbauer, P (1993) Variation in *Fusarium* head blight susceptibility of international and Austrian wheat breeding material. *Die Bodenkultur* 44:65-78

Lemmens, M, Josephs, R, Schuhmacher, R, Grausgruber, H, Buerstmayr, H, Ruckenbauer, P, Neuhold, G, Fidesser, M, Krska, R (1997) Head blight (*Fusarium* spp.) on wheat: investigations on the relationship between disease symptoms and mycotoxin content. *Cereal Res Commun* 25:459:465

Lemmens, M, Buerstmayr, H, Krska, R, Schuhmacher, R, Grausgruber, H, Ruckenbauer, P (2004) The effect of inoculation treatment and long-term application of moisture on *Fusarium* head blight symptoms and deoxynivalenol contamination in wheat grains. *Eur J Plant Pathol* 110:229-308

Lemmens, M, Haim, K, Lew, H, Ruckenbauer, P (2004) The Effect of Nitrogen Fertilization on *Fusarium* Head Blight Development and Deoxynivalenol Contamination in Wheat. *Phytopathology* 152:1-8

Lemmens, M, Scholz, U, Berthiller, F, Dall'Asta, C, Koutnik, A, Schuhmacher, R, Adam, G, Buerstmayr, H, Mesterhazy, A, Krska, R, Ruckenbauer, R (2005) The Ability to Detoxify the Mycotoxin Deoxynivalenol Colocalizes With a Major Quantitative Trait Locus for *Fusarium* Head Blight Resistance in Wheat. *Mol Plant Microbe In* 12:1318-1324

Leslie, JF, Summerell, BA (2006) *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing. p. 388

Lin, F, Kong, ZX, Zhu, HL, Xue, SL, Wu, JZ, Tian, DG, Wei, JB, Zhang, CQ, Ma, ZQ (2004) Mapping QTL associated with resistance to *Fusarium* head blight in the Nanda 2419 X Wangshuibai population. I. Type II resistance. *Theor Appl Genet* 109:1504-1511

Lynch, M (1990) The similarity index and DNA fingerprinting. *Mol Biol Evol* 7:478-484

Liu, WZ, Langseth, W, Skinnnes, H, Elen, ON, Sundheim, L (1997) Comparison of visual head blight ratings, seed infection levels, and deoxynivalenol production of assessment of resistance in cereals inoculated with *Fusarium culmorum*. *Eur J Plant Pathol*. 103:589-595

Liu, S, Anderson, JA (2003) Marker assisted evaluation of *Fusarium* head blight resistant wheat germplasm. *Crop Sci* 43:760-766

- Ma, M, Ge, M, Zhang, X, Lu, W, Yu, D, Chen, H, Chen, J (2008) Resistance to *Fusarium* head Blight and Deoxynivalenol Accumulation in Chinese Barley. *J Phytopathol* 157:166-171
- Mackintosh, CA, Garvin, DF, Radmer, LE, Heinen, SJ, Muehlbauer (2006) A model wheat cultivar for transformation to improve resistance to *Fusarium* Head Blight. *Plant Cell Rep* 25:313-319
- Maiorano, A, Blandino, M, Reyneri, A, Vanara, F (2008) Effects of Maize residues on the *Fusarium* spp. Infection and deoxynivalenol (DON) contamination of wheat grain. *Crop Prot* 27:182-188
- Mardi, M, Buerstmayer, H, Ghareyazie, B, Lemmens, M, Mohammadi, SA, Nolz, R, Ruckenbauer, R (2005) QTL analysis of resistance to *Fusarium* head blight in wheat using a 'Wangshuibai'-derived population. *Plant Breeding* 124:329-333
- Martinčić, J, Kozumplik, V (1996) Oplemenjivanje bilja: teorije i metode, ratarske kulture. Poljoprivredni fakultet Osijek i Agronomski fakultet Zagreb
- Matthäus, K, Dänicke, S, Vahjen, W, Simon, O, Wang, J, Valenta, H, Meyer, K, Strumpf, A, Zieseni, H, Flachowsky, G (2002) Progression of mycotoxin and nutrient concentrations in wheat after inoculation with *Fusarium culmorum*. *Archi Anim Nutr* 58:19-35
- McCormick, S (2003) The Role of DON in Pathogenicity. In: Leonard, K. J. and Bushnell, W. R.: *Fusarium* Head Blight of Wheat and Barley. The American Phytopathological Society Chapter 7:165-183
- McIntosh, RA (1998) Breeding wheat for resistance to biotic stresses. *Euphytica* 100:19-34
- Mesterhazy, A (1978) Comparative analysis of artificial inoculation methods with *Fusarium* spp. on winter wheat varieties. *Phytopathology* 93:12-25
- Mesterhazy, A (1995) Types and components of resistance to *Fusarium* head blight of wheat. *Plant Breeding* 114:337-386
- Mesterhazy, A (1996) Breeding for resistance to *Fusarium* head blight of wheat. In: Dubin, HJ, Gilchrist, J, Reeves, A, McNab, A (1996) *Fusarium* head scab: global status and future prospects. International Maize and Wheat Improvement Center. pp. 79-85



Mesterhazy, A, Bartok, T, Mirocha, G, Komoroczy, R (1999) Nature of wheat resistance to *Fusarium* head blight and the role of deoxynivalenol for breeding. Plant Breeding 118:97-110

Mesterhazy, A (2002) Role of deoxynivalenol in aggressiveness of *Fusarium graminearum* and *F. Culmorum* and in resistance to *Fusarium* head blight. Eur J Plant Pathol 108:675-684

Mesterhazy, A (2003) Breeding Wheat for Fusarium Head Blight Resistance in Europe. In: Leonard, KJ and Bushnell, WR: Fusarium Head Blight of Wheat and Barley. The American Phytopathological Society. Chapter 9:211-240

Mesterhazy, A, Bartok, T, Kaszonyi, G, Varga, M, Toth, B, Varga, J (2005) Common resistance to different *Fusarium* spp. causing *Fusarium* head blight in wheat. Eur J Plant Pathol 112:267-281

Mesterhazy, A, Toth, B, Bartok, T, Varga, M (2008) Breeding strategies against FHB in winter wheat and their relation to Type I resistance. Cereal Res Commun 36:37-43

Miedaner, T, Wilde, F, Korzun, V, Ebmeyer, E, Schmolke, M, Hartl, L, Schon, CC (2009) Marker selection for Fusarium head blight resistance based on quantitative trait loci (QTL) from two European sources compared to phenotypic selection in winter wheat. Euphytica 166:219-227

Miller, JD, Arnison, PG (1986) Degradation of deoxynivalenol by suspension cultures of the Fusarium head blight resistant wheat cultivar Frontana. Can J Plant Pathol 8:147-150

Moller, EM, Chelkowski, J, Geiger, HH (1999) Species-specific PCR Assays for the Fungal Pathogens *Fusarium moniliforme* and *Fusarium subglutinans* and their Application to Diagnose Maize Ear Rot Disease. J Phytopathol 147:497-508

Nei, M, Li, WH (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:5269-5273

Nelson, PE, Toussaun, TA, Marasas, WFO (1983) Fusarium species. The Pennsylvania State University Press. p.193

Nicholson, P, Simpson, DR, Weston, G, Rezanoor, HN, Lees, AK, Parry, DW, Joyce, D (1998) Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in cereals using PCR assays. Physiol Mol Plant Pathol 53:17-37

- Nirenberg, HI (1981) A simplified method for identifying *Fusarium* spp. occurring on wheat. *Can J Botany* 59:1599-1609
- Oldrach, K, Serazetdinova, L, Becker, D, Lorz, H (2001) Molecular Breeding for improved biotic stress resistance. In: *Developments in Plant Breeding* 9:311-316
- Ortiz, R, Trethowan, R, Ferrara, GO, Iwanaga, M, Dodds, JH, Crouch, JH, Crossa, J, Braun, HJ (2007) High yield potential, shuttle breeding, genetic diversity, and a new international wheat improvement strategy. *Euphytica* 157:365-384
- Parry, DW (1990) How do we control disease?. In: Parry, D.W.: *Plant Pathology in Agriculture*. Cambridge University press. Chapter 5:85-156
- Parry, DW, Jenkinson, P, McLeod, L (1995) *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals-a review. *Plant Pathol* 44:207-238
- Parry, DW, Nicholson, P (1996) Development of PCR assay to detect *Fusarium Poae* in wheat. *Plant Pathol* 45:383-391
- Pawelzik, E, Permady, H, Weinert, J, Wolf, GA (1998) *Getreide mehl and brot* 52:264-266
- Pellegrineschi, A, McLean, S, Salgado, M, Velazquez, L, Hernandez, R, Brito, RM, Noguera, M, Meldhurst, A, Hosington (2001) Transgenic wheat plants: a powerful breeding source. In: *Developments in Plant Breeding* 9:311-316
- Peng, JH, Bai, Y, Haley, SD, Lapitan, NLV (2009) Microsatellite-based molecular diversity of bread wheat germplasm and association mapping of wheat resistance to the Russian wheat aphid. *Genetica* 135:95-122
- Perkowski, J, Wiwart, M, Busko, M, Laskowska, M, Berthiller, F, Kandler, W, Krska, R (2007) *Fusarium* toxins and total fungal biomass indicators in naturally contaminated wheat samples from north-eastern Poland in 2003. *Food Addit Contam* 24:1292-1298
- Placinta, CM, D'Mello, JPF, Macdonald, AMC (1999) A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Anim Feed Sci Tech* 78:21-37
- Prange, A, Birzele, B, Kramer, J, Meier, A, Modrow, H, Kohler, P (2005) *Fusarium*-inoculated wheat, deoxynivalenol contents and baking quality in relation to infection time. *Food Control* 16:739-749

Pritsch, C, Muehlbauer, GJ, Bushnell, WR, Somers, DA, Vance, CP (2000) Fungal development and induction of defence response genes during early infection of wheat spikes by *Fusarium graminearum*. Mol Plant Microbe In 13:159-169

Pujar, S, Tamhankar, SA, Rao, VS, Gupta, VS, Naik, S, Ranjekar PK (1999) Arbitrarily primed PCR based diversity assessment reflects hierarchical grouping of Indian tetraploid wheat genotypes. Theor Appl Genet 99: 868-876

Rafalski, J, Tingey, S (1993) Genetic diagnostics in Plant Breed: RAPDs, microsatellites and machines. Trends Genet 9:275-280

Roeder, MS, Korzun, V, Wendehake, K, Plaschke, J, Tixier, MH, Leroy, P, Ganal, MW (1998) A microsatellite map of wheat. Genetics 149:2007-2023

Rohlf, FJ (1998) NTSYS-PC: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis system. Version 2.0. Applied Biostatistics. NewYork

Rudd, JC, Horsley, RD, McKendry, AL, Elias, EM (2001) Host Plant Resistance Genes for Fusarium Head Blight: Sources, Mechanisms and Utility in Conventional Breeding Systems. Crop Sci 41:620-627

Saghai-Marouf, MA, Soliman, KM, Jorgensen, RA (1984) Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley; Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. Proc Natl Acad Sci 81:8014-8018

Saharan, MS, Naef, A (2008) Detection of genetic variation among Indian wheat head scab pathogens (*Fusarium* spp./isolates) with microsatellite markers. Crop Prot 27:1148-1154

SAS Institute Inc. - SAS® 9.1.2. Qualification Tools User's Guide. Copyright © 2004 SAS Institute Inc., Cary, NC, USA

Schilling, AG, Moller, EM, Geiger, HH (1996) Polymerase chain reaction-based assays for species-specific detection of *F. culmorum*, *F. graminearum* and *F. avenaceum*. Phytopathology 86:515-522

Schroeder, HW, Christensen, JJ (1963) Factors affecting resistance of wheat to scab by *Gibberella zeae*. Phytopathology 53:831-838

Schmolke, M, Zimmermann, G, Schweizer, G, Miedaner, T, Korzun, V, Ebmeyer, E, Hartl, L (2008) Molecular mapping of quantitative trait loci for field resistance to Fusarium head blight in a European winter wheat population. Plant Breeding 127:459-464

Sears, ER (1954) The Aneuploids of Common Wheat. Bull 572, University of Missouri Agricultural Experiment Station, Columbia, MO

Shaner, G, Finney, RA (1977) The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat . *Phytopathology* 67:1051-1056

Shaner, G and Buechley, G (2003) Relation between Type II and Type I resistance to *Fusarium graminearum* in wheat. National Fusarium Head Blight Forum Proceedings. Bloomington, Minnesota 13-15, December, 227-230

Siranidou, E, Kang, Z, Buchenauer, H (2002) Studies on Symptom Development, Phenolic Compounds and Morphological Defence Responses in Wheat Cultivars Differing in Resistance to *Fusarium* Head Blight. *J Phytopathol* 150:200-208

Snijders, CHA, Van Eeuwijk, FA (1991) Genotype X strain interactions for resistance to Fusarium head blight caused by *Fusarium culmorum* in winter wheat. *Theor Appl Genet* 81:239-244

Somers, DJ, Fedak, G, Savard, M (2003) Molecular mapping of novel genes controlling Fusarium head blight resistance and deoxynivalenol accumulation in spring wheat. *Genome* 46:555-564

Somers, DJ, Isaac, P, Edwards, K (2004) A high density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet* 109:1105-1114

Somers, DJ, DePauw, JTR, Fox, S, Humphreys, G, Fedak, G (2005) Assembling complex genotypes to resist Fusarium in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet* 111:1623-1631

Song, QJ, Shi, JR, Singh, S, Fickus, EW, Costa, JM, Lewis, J, Gill, BS, Ward, R, Cregan, PB (2005) Development and mapping of microsatellite (SSR) markers in wheat. *Theor Appl Genet* 110:550-556

Spanic, V, Cosic, J, Dvojkovic, K, Maric, S, Guberac, V, Drezner, G (2008) Effect of fungicide and Fusarium head blight treatment on grain yield of winter wheat. *Cereal Res Commun* 36(Suppl B):299-300

Srinivasachary, Gosman, N, Steed, A, Hollins, TW, Bayles, R, Jennings, P, Nicholson, P (2009) Semi-dwarfing *Rht-B1* and *Rht-D1* loci of wheat differ significantly in their influence on resistance to Fusarium head blight. *Theor Appl Genet* 118:695-702

Stack, RW (2003) History of Fusarium Head Blight with Emphasis on North America. In: Leonard, KJ and Bushnell, WR: Fusarium Head Blight of Wheat and Barley. The American Phytopathological Society. Chapter 1:1-34

Stepien, L, Mohler, V, Bocianowski, J, Koczyk, G (2007) Assessing genetic diversity of Polish wheat (*Triticum aestivum*) varieties using microsatellite markers. Genet Resour Crop Ev 54:1499-1506

Steiner, B, Lemmens, M, Griesser, M, Scholz, U, Schondelmaier, J, Buerstmayr, H (2004) Molecular mapping of resistance to *Fusarium* head blight in the spring wheat cultivar Frontana. Theor Appl Genet 109:215-224

Stodart, BJ, Mackay, M, Raman, H (2005) AFLP and SSR analysis of genetic diversity among landraces of bread wheat (*Triticum aestivum* L. em. Thell) from different geographic regions. Aust J Agr Res 56:691-697

Tomczak, M, Wisniewska, H, Stepien, L, Kostecki, M, Chelkowski, J, Golinski, P (2002) Deoxynivalenol, nivalenol and moniliformin in wheat samples with head blight (scab) symptoms in Poland (1998-2000). Eur J Plant Pathol 108:625-630

Toth, B, Mesterhazy, A, Horvath, Z, Bartok, T, Varga, M, Varga, J (2005) Genetic variability of central European isolates of the *Fusarium graminearum* species complex. Eur J Plant Pathol 113:35-45

Toth, B, Kaszonyi, G, Bartok, T, Varga, J, Mesterhazy, A (2008) Common resistance of wheat to members of the *Fusarium graminearum* species complex and *F. culmorum*. Plant Breeding 127:1-8

Tottman, DR, Broad, H (1987) Decimal code for the growth stages of cereals. Ann Appl Biol 110:683-687

Van Eeuwijk, FA, Mesterhazy, A, Kling, CI, Ruckenbauer, P, Saur, L, Buerstmayr, H, Lemmens, M, Keizer, LCP, Maurin, L, Snijders, CHA (1995) Assessing non-specificity of resistance in wheat to head blight caused by inoculation with European strains of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum* and *F. nivale* using a multiplicative model for interaction. Theor Appl Genet 90:221-228

Van Ginkel, M, Van Der Schaar, W, Zhuping, Y, Rajaram, S (1996) Inheritance of resistance to scab in two wheat cultivars from Brazil and China. Plant Dis 80:863-867

Varshney, RK, Balyan, HS, Langridge, P (2006) Wheat. In: Kole, C: Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants, Volume 1, Cereals and Millets. Springer. Chapter 2:79-114

Zadoks, JC, Chang, TT, Konzac, FC (1974) A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Res* 14:415-421

Zwart, SR, Muylle, H, Van Bockstaele, E, Roldán-Ruiz, I (2008) Evaluation of genetic diversity of *Fusarium* head blight resistance in European winter wheat. *Theor Appl Genet* 117:813-828

Xu, X (2003) Effects of environmental conditions on the development of *Fusarium* ear blight. *Eur J Plant Pathol* 109: 683-689

Yang, Z, Gilbert, J, Procnier, JD (2006) Genetic diversity of resistances genes controlling fusarium head blight with simple sequence repeat markers in thirty-six wheat accessions from east asian origin. *Euphytica* 148:345-352

Young, ND (1999) A cautiously optimistic vision for marker-assisted breeding. *Mol Breeding* 5:505-510

Yu, JB, Bai, GH, Cai, SB, Ban, T (2006) Marker-assisted characterization of Asian wheat lines for resistance to *Fusarium* head blight. *Theor Appl Genet* 113:308-320

Yu, JB, Zhou, WC, Dong, YH, Kolb, FL (2008) Quantitative trait loci for *Fusarium* head blight resistance in a recombinant inbred population of Wangshuibai/Wheaton. *Phytopathology* 98:87-94

Waldron, BL, Moreno-Sevilla, JA, Anderson, JA, Stack, RW, Froberg, RC (1999) RFLP mapping of QTL for *Fusarium* head blight resistance in wheat. *Crop Sci* 39:805-811

Wang, J, Weiser, H, Pawelzik, E, Weinert, J, Keutgen, AJ, Wolf, GA (2005) Impact of the fungal protease produced by *Fusarium culmorum* on the protein quality and bread making properties of winter wheat. *Eur Food Res Technol* 220:552-559

## POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

AFLP - Amplified fragment length polymorphisms (polimorfizam dužine amplificiranih fragmenata)  
AUDPC - The area under the disease progress curve (područje unutar progresivne krivulje bolesti)  
BAND - Shared band similarity index (indeks sličnosti zajedničkih bendova)  
cM - CentiMorgan  
DNA - Deoksiribonukleinska kiselina  
dNTPs - Deoksinukletid 5'- trifosfati  
DON – Deoxynivalenol (deoksinivalenol)  
DONap - Approximate amount of DON in grain (procijenjena količina DON-a u zrnu)  
EDTA – Etilendiamintetraacetatna kiselina  
EMS - Etilmetansulfonat  
EtOH - Etanol  
FCK - Fusarium colonized kernels (broj zrna zaraženih Fusariumom)  
FDK - Fusarium damaged kernels (broj zrna oštećenih Fusariumom)  
FHB - Fusarium head blight (fuzarijska palež klasova)  
GS - Genetic similarity (genetska sličnost)  
LSD - Least Significant difference (najmanja značajna razlika)  
QTL - Qunatitative trait loci (lokus za kvantitativno svojstvo)  
MAS - Marker-assisted slection (selekcija potpomognuta markerima)  
NaOAc - Natrijev-acetat  
NDBS - The number of DON-bleached spikelets (broj DON-izblijeđenih klasića)  
NIV - Nivalenol  
PCR - Polymerase chain reaction (lančana reakcija polimerazom)  
PDA - Potato dextrose agar (krumpirozno dekstrozni agar)  
PIC - Polymorphic information content (informacijski sadržaj polimorfizma)  
RCBD - Randomized complete blocks design (kolmpletni randomizirani blokni raspored)  
RAPD - Random amplified polymorphic DNA (nasumično amplificirana polimorfna DNA)  
RFLP - Restriction fragment length polymorphism (polimorfizam dužine restrikcijskih fragmenata)  
SDS - Natrijev dodecil sulfat  
SAHN - Sequential agglomerative hierarical nested cluster analysis (sekvencijska aglomerativna hijerarhijska klaster analiza)  
SNA - Speziller Nährstoffarmer Agar (sintetički hranjivi agar)  
SNP - Single nucleotide polymorphism (polimorfizam jednog nukleotida)  
SSR - Simple sequence repeat (jednostavna ponavljajuća sekvenca)  
TAE - Tris acetat EDTA  
TBA - Tris borat EDTA  
TE - Tris EDTA  
TRIS - Tris(hidroksimetil)amino-metan  
UPGMA – Unweighted pair-group method of arithmetic averages (neponderirana metoda za sparivanje skupina na temelju prosječnih vrijednosti)

# PRILOZI

## 1. Dodatak

Prikaz visine i tipova otpornosti genotipova ozime pšenice u Tullnu 2007./08. i 2008./09. godine

Genotip	Visina biljke	Ukupna otpornost (AUDPC)	Tip I otpornost (AUDPC)	Tip II otpornost (AUDPC)	Tip III otpornost (AUDPC)
Srpanjka	51,5	294,6	826,4	21,9	27,2
Žitarka	64,8	291,8	796,8	29,7	26,1
Golubica	70,3	252,4	692,8	46,4	27,4
Super Žitarka	68,8	333,6	907,0	32,6	22,7
Janica	66,3	255,6	672,5	31,5	25,6
Lucija	61,0	255,6	723,8	31,5	25,9
Alka	65,8	252,6	715,3	28,9	19,5
Divana	86,6	94,8	356,9	30,7	18,9
Lela	62,0	195,4	656,9	26,7	20,8
Pipi	60,3	263,3	668,6	49,4	28,8
Katarina	59,9	290,4	755,9	28,6	23,2
Renata	55,1	306,5	861,9	30,8	21,7
Aida	70,6	264,5	678,9	29,3	20,8
Seka	57,5	295,3	754,8	23,5	22,5
Felix	63,8	334,2	757,5	25,8	21,7
Soissons	75,3	180,0	540,3	35,7	30,4
Renan	82,4	163,8	439,1	29,1	14,1
Sirban Prolifik	135,3	114,6	397,8	24,4	22,1
U1	133,3	133,2	469,0	31,7	29,2
Libellula	77,4	175,5	567,8	21,7	25,4
Bezostaja	88,1	174,1	507,6	32,5	23,1
Zlatna Dolina	71,3	317,2	702,6	32,6	25,5
Tena	90,1	151,0	498,6	27,2	21,2
Osječanka	76,5	153,3	498,5	44,0	19,2
Lsd 0,05	7,59	104,61	149,64	9,81	7,39



Postotak zaraze na genotipovima ozime pšenice zabilježen na 22. dan u Tullnu (2008. i 2009. godine) i Osijeku (2009. godine)

Genotip	Osijek 2009.	Tulln 2008.	Tulln 2009.
Golubica	75,0	55,0	10,0
Super Žitarka	70,5	70,0	20,0
Žitarka	64,3	65,0	12,5
Zlatna Dolina	58,0	67,5	12,5
Lela	50,0	40,0	12,5
Katarina	50,0	62,5	17,5
Aida	49,8	55,0	5,5
Bezostaja	45,8	52,5	0,8
Felix	45,8	65,0	20,0
Alka	43,5	55,0	10,0
Pipi	39,3	62,5	10,5
Tena	38,3	40,0	5,5
Renata	34,0	55,0	30,0
Lucija	31,0	52,5	12,5
Osječanka	27,8	37,5	15,0
Janica	27,8	65,0	7,5
U1	25,8	32,5	0,5
Seka	24,5	67,5	20,0
Divana	24,0	30,0	0,3
Srpanjka	22,5	65,0	25,0
Libellula	15,0	35,0	3,0
Sirban prolifik	13,0	37,5	0,1
Soissons	10,0	57,5	0,1
Renan	7,5	45,0	0,3

Matrica genetske sličnosti istraživanih genotipova pšenice (BAND koeficijent)

Genotip	Srpanjka	Žitarka	Renan	SirbanProlifik	Golubica	Super Žitarka	U1	Libellula	Janica
Srpanjka	1,00								
Žitarka	0,48	1,00							
Renan	0,38	0,35	1,00						
Sirban Prolifik	0,20	0,29	0,23	1,00					
Golubica	0,40	0,38	0,23	0,10	1,00				
Super Žitarka	0,33	0,65	0,25	0,23	0,32	1,00			
U1	0,19	0,26	0,13	0,41	0,23	0,29	1,00		
Libellula	0,24	0,27	0,26	0,36	0,41	0,30	0,26	1,00	
Janica	0,28	0,37	0,10	0,25	0,55	0,30	0,20	0,30	1,00
Divana	0,25	0,23	0,32	0,25	0,19	0,23	0,36	0,19	0,21
Tena	0,32	0,19	0,32	0,40	0,38	0,23	0,23	0,38	0,32
Osječanka	0,30	0,24	0,27	0,33	0,38	0,27	0,32	0,45	0,37
Lela	0,34	0,33	0,22	0,23	0,31	0,36	0,22	0,31	0,44
Pipi	0,20	0,14	0,22	0,10	0,18	0,17	0,13	0,18	0,05
Courtot	0,24	0,13	0,29	0,23	0,27	0,17	0,13	0,30	0,05
Frontana	0,19	0,31	0,21	0,22	0,18	0,26	0,09	0,30	0,24
Katarina	0,50	0,38	0,41	0,24	0,48	0,32	0,14	0,32	0,37
Renata	0,45	0,23	0,43	0,29	0,29	0,17	0,22	0,32	0,32
Sumai 3	0,15	0,23	0,30	0,43	0,24	0,26	0,30	0,27	0,26
Chinese Spring	0,20	0,19	0,18	0,29	0,24	0,27	0,09	0,36	0,32
Aida	0,25	0,19	0,41	0,29	0,14	0,27	0,14	0,27	0,16
Seka	0,54	0,46	0,39	0,24	0,36	0,34	0,20	0,29	0,27
Toras	0,35	0,36	0,30	0,38	0,38	0,26	0,22	0,41	0,37
Hermann	0,22	0,32	0,30	0,53	0,21	0,35	0,20	0,40	0,24
Felix	0,39	0,36	0,34	0,19	0,28	0,30	0,21	0,27	0,21
Soissons	0,38	0,39	0,33	0,32	0,27	0,33	0,29	0,26	0,20
Lucija	0,42	0,43	0,20	0,13	0,27	0,45	0,12	0,26	0,39
Bezostaja	0,43	0,35	0,33	0,31	0,36	0,37	0,24	0,43	0,24
Zlatna Dolina	0,24	0,37	0,13	0,40	0,47	0,27	0,22	0,40	0,54
Alka	0,47	0,35	0,19	0,35	0,35	0,19	0,19	0,24	0,61

Genotip	Divana	Tena	Osječanka	Lela	Pipi	Courtot	Frontana	Katarina	Renata
Srpanjka									
Žitarka									
Renan									
Sirban Prolifik									
Golubica									
Super Žitarka									
U1									
Libellula									
Janica									
Divana	1,00								
Tena	0,43	1,00							
Osječanka	0,45	0,65	1,00						
Lela	0,19	0,23	0,28	1,00					
Pipi	0,18	0,09	0,10	0,13	1,00				
Courtot	0,23	0,23	0,32	0,13	0,52	1,00			
Frontana	0,14	0,09	0,22	0,30	0,09	0,26	1,00		
Katarina	0,20	0,20	0,32	0,51	0,10	0,27	0,40	1,00	
Renata	0,33	0,29	0,29	0,47	0,27	0,35	0,22	0,52	1,00
Sumai 3	0,24	0,38	0,43	0,48	0,05	0,26	0,27	0,29	0,36
Chinese Spring	0,15	0,30	0,33	0,24	0,00	0,18	0,27	0,24	0,29
Aida	0,25	0,30	0,33	0,33	0,24	0,41	0,36	0,43	0,38
Seka	0,27	0,32	0,24	0,36	0,26	0,29	0,19	0,49	0,56
Toras	0,24	0,29	0,29	0,60	0,09	0,22	0,31	0,52	0,55
Hermann	0,28	0,33	0,37	0,26	0,16	0,45	0,24	0,32	0,37
Felix	0,23	0,19	0,23	0,33	0,13	0,17	0,35	0,51	0,40
Soissons	0,27	0,27	0,23	0,27	0,26	0,33	0,30	0,41	0,39
Lucija	0,27	0,18	0,22	0,26	0,17	0,20	0,29	0,31	0,34
Bezostaja	0,55	0,62	0,40	0,17	0,13	0,24	0,13	0,27	0,26
Zlatna Dolina	0,20	0,39	0,28	0,32	0,09	0,22	0,39	0,37	0,28
Alka	0,32	0,37	0,33	0,39	0,15	0,14	0,19	0,38	0,45

Genotip	Sumai 3	Chinese Spring	Aida	Seka	Toras	Hermann	Felix	Soissons	Lucija	Bezostaja	Zlatna Dolina	Alka
Srpanjka												
Žitarka												
Renan												
Sirban												
Prolifik												
Golubica												
Super												
Žitarka												
U1												
Libellula												
Janica												
Divana												
Tena												
Osječanka												
Lela												
Pipi												
Courtot												
Frontana												
Katarina												
Renata												
Sumai 3	1,00											
Chinese Spring	0,36	1,00										
Aida	0,33	0,29	1,00									
Seka	0,24	0,24	0,41	1,00								
Toras	0,36	0,24	0,38	0,46	1,00							
Hermann	0,42	0,26	0,47	0,34	0,42	1,00						
Felix	0,21	0,22	0,42	0,62	0,40	0,26	1,00					
Soissons	0,17	0,18	0,36	0,54	0,39	0,40	0,55	1,00				
Lucija	0,21	0,13	0,27	0,29	0,26	0,20	0,17	0,16	1,00			
Bezostaja	0,26	0,27	0,22	0,33	0,30	0,29	0,29	0,33	0,32	1,00		
Zlatna Dolina	0,28	0,33	0,37	0,38	0,47	0,46	0,32	0,31	0,26	0,22	1,00	
Alka	0,25	0,30	0,20	0,51	0,38	0,28	0,34	0,33	0,37	0,37	0,44	1,00

Matrica genetske sličnosti istraživanih genotipova pšenice (DICE koeficijent)

Genotip	Srpanjka	Žitarka	Renan	Sirban Prolifik	Golubica	Super Žitarka	U1	Libellula	Janica
Srpanjka	1,00								
Žitarka	0,48	1,00							
Renan	0,38	0,35	1,00						
Sirban Prolifik	0,20	0,29	0,23	1,00					
Golubica	0,40	0,38	0,23	0,10	1,00				
Super Žitarka	0,33	0,65	0,25	0,23	0,32	1,00			
U1	0,19	0,26	0,12	0,44	0,22	0,29	1,00		
Libellula	0,24	0,27	0,26	0,36	0,41	0,30	0,26	1,00	
Janica	0,28	0,37	0,10	0,25	0,50	0,25	0,20	0,30	1,00
Divana	0,25	0,23	0,32	0,30	0,19	0,23	0,40	0,24	0,21
Tena	0,33	0,20	0,33	0,37	0,40	0,24	0,28	0,35	0,33
Osječanka	0,26	0,20	0,24	0,30	0,38	0,24	0,33	0,43	0,37
Lela	0,37	0,36	0,26	0,27	0,31	0,38	0,21	0,34	0,39
Pipi	0,20	0,14	0,22	0,10	0,18	0,17	0,13	0,18	0,05
Courtot	0,20	0,09	0,26	0,19	0,27	0,13	0,13	0,27	0,05
Frontana	0,19	0,31	0,21	0,22	0,18	0,26	0,08	0,30	0,24
Katarina	0,50	0,38	0,41	0,24	0,48	0,32	0,13	0,32	0,37
Renata	0,45	0,23	0,43	0,29	0,29	0,17	0,21	0,32	0,32
Sumai 3	0,15	0,23	0,30	0,43	0,24	0,26	0,30	0,27	0,26
Chinese Spring	0,20	0,19	0,18	0,29	0,24	0,27	0,09	0,36	0,32
Aida	0,25	0,19	0,41	0,29	0,14	0,27	0,13	0,27	0,16
Seka	0,54	0,46	0,39	0,24	0,36	0,34	0,19	0,29	0,27
Toras	0,37	0,38	0,32	0,35	0,40	0,27	0,22	0,38	0,39
Herman	0,24	0,28	0,32	0,50	0,22	0,32	0,21	0,42	0,19
Felix	0,34	0,40	0,30	0,28	0,28	0,34	0,21	0,31	0,26
Soissons	0,34	0,40	0,30	0,28	0,28	0,34	0,29	0,22	0,21
Lucija	0,42	0,38	0,20	0,18	0,27	0,45	0,12	0,30	0,39
Bezostaja	0,43	0,39	0,33	0,27	0,36	0,37	0,28	0,38	0,24
Zlatna Dolina	0,29	0,33	0,18	0,36	0,47	0,22	0,22	0,40	0,49
Alka	0,43	0,36	0,17	0,41	0,32	0,22	0,17	0,26	0,60

Genotip	Divana	Tena	Osječanka	Lela	Pipi	Courtot	Frontana	Katarina	Renata
Srpanjka									
Žitarka									
Renan									
Sirban Prolifik									
Golubica									
Super Žitarka									
U1									
Libellula									
Janica									
Divana	1,00								
Tena	0,45	1,00							
Osječanka	0,45	0,65	1,00						
Lela	0,19	0,24	0,28	1,00					
Pipi	0,18	0,10	0,10	0,13	1,00				
Courtot	0,23	0,24	0,29	0,13	0,52	1,00			
Frontana	0,14	0,10	0,19	0,33	0,09	0,22	1,00		
Katarina	0,20	0,20	0,29	0,53	0,10	0,24	0,40	1,00	
Renata	0,33	0,30	0,25	0,49	0,27	0,32	0,22	0,52	1,00
Sumai 3	0,24	0,40	0,40	0,50	0,05	0,23	0,27	0,29	0,36
Chinese Spring	0,15	0,32	0,30	0,27	0,00	0,14	0,27	0,24	0,29
Aida	0,25	0,32	0,30	0,36	0,24	0,38	0,36	0,43	0,38
Seka	0,27	0,32	0,21	0,39	0,26	0,26	0,19	0,49	0,56
Toras	0,25	0,25	0,25	0,65	0,10	0,19	0,33	0,52	0,57
Herman	0,35	0,31	0,35	0,31	0,17	0,44	0,21	0,33	0,39
Felix	0,23	0,15	0,20	0,36	0,09	0,13	0,39	0,51	0,36
Soissons	0,28	0,24	0,20	0,30	0,22	0,27	0,30	0,42	0,36
Lucija	0,31	0,19	0,19	0,29	0,17	0,17	0,25	0,31	0,34
Bezostaja	0,55	0,60	0,37	0,21	0,13	0,21	0,17	0,27	0,26
Zlatna Dolina	0,29	0,41	0,24	0,35	0,14	0,19	0,35	0,37	0,33
Alka	0,33	0,35	0,29	0,38	0,14	0,09	0,21	0,36	0,41

Genotip	Sumai 3	Chinese Spring	Aida	Seka	Toras	Hermann	Felix	Soissons	Lucija	Bezostaja	Zlatna Dolina	Alka
Srpanjka												
Žitarka												
Renan												
Sirban												
Prolifik												
Golubica												
Super												
Žitarka												
U1												
Libellula												
Janica												
Divana												
Tena												
Osječanka												
Lela												
Pipi												
Courtot												
Frontana												
Katarina												
Renata												
Sumai 3	1,00											
Chinese												
Spring	0,36	1,00										
Aida	0,33	0,29	1,00									
Seka	0,24	0,24	0,41	1,00								
Toras	0,38	0,25	0,40	0,46	1,00							
Herman	0,39	0,22	0,50	0,36	0,39	1,00						
Felix	0,26	0,27	0,37	0,57	0,42	0,32	1,00					
Soissons	0,18	0,19	0,37	0,50	0,37	0,37	0,52	1,00				
Lucija	0,21	0,13	0,27	0,29	0,27	0,26	0,17	0,17	1,00			
Bezostaja	0,26	0,27	0,22	0,33	0,27	0,26	0,25	0,29	0,32	1,00		
Zlatna Dolina	0,23	0,28	0,42	0,43	0,44	0,43	0,36	0,32	0,35	0,22	1,00	
Alka	0,27	0,32	0,18	0,49	0,38	0,32	0,40	0,27	0,38	0,34	0,44	1,00

## 2. Životopis

Valentina Španić

Rođena sam 16. ožujka 1981. godine u Osijeku. Osnovnu školu završila sam u Čepinu, a srednju (Jezičnu gimnaziju) u Osijeku. 2000. godine sam pohađala tečaj za volontere u lokalnim zajednicama (znanje i vještine s područja komunikacije, ophođenje sa sukobom, razvoj tima i suradnje u timu). Iste godine sam završila tečaj za rad na računalu (Spin studio, Osijek). Diplomirala sam 2005. godine na Poljoprivrednome fakultetu u Osijeku. Iste godine sam provela na poljoprivrednom istraživačkom institutu (Odjel za oplemenjivanje žitarica) u Martonvasaru (Mađarska) dva mjeseca, u sklopu međunarodne razmjene studenata. Tijekom studiranja dobila sam dvije Rektorove nagrade (2003./04. i 2004./05.).

Od 2006. godine zaposlena sam na Odjelu za oplemenjivanje i genetiku strnih žitarica Poljoprivrednoga instituta Osijek. Svoj rad započinjem kao znanstvena novakinja na projektu „Genetika i oplemenjivanje kvantitativnih svojstava pšenice“ (0073001), a od 2007. godine na projektu „Razvoj nove germplazme u oplemenjivanju kvantitativnih svojstava pšenice“ (073-0730718-0598) u sklopu programa „Novi pristup u oplemenjivanju pšenice i ječma“, sufinanciranim od Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa.

U sklopu svoga istraživačkoga rada provela sam osam mjeseci u IFA-Tulln (Austrija), na Odjelu za biotehnologiju u biljnoj proizvodnji. 2008. godine dobila sam stipendiju Sveučilišta u Beču „Die Stipendien des Vereins der Freunde der Universität für Bodenkultur Wien“. U dosadašnjem radu završila sam dva tečaja: 2007. Metodološki tečaj u biologiji i medicini, Institut Ruđer Bošković i 2008. Tečaj iz klasične i molekularne citogenetike u oplemenjivanju bilja, prof, Tamas Lelley, IFA-Tulln. Autorica ili koautorica sam na šest A1 radova, na jednom A2 i tri A3 rada. Sudjelovala sam na nekoliko domaćih i međunarodnih skupova.



