

FENOLNE SNOVI KOT ODZIV JABLANE NA OKUŽBO Z JABLANOVIM ŠKRLUPOM (*Venturia inaequalis*)

Maja MIKULIČ PETKOVŠEK¹, Franci ŠTAMPAR², Robert VEBERIČ³

^{1,2,3}Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Katedra za sadjarstvo, vinogradništvo in
vrtinarstvo, Ljubljana

IZVLEČEK

V raziskavi smo proučevali, ali okužba z jablanovim škrlupom na listih in plodovih jablane povzroči spremembo v vsebnosti določenih fenolnih spojin. Okužba z glivo *Venturia inaequalis* je spremenila metabolizem fenolnih spojin tako, da se je povečala njihova sinteza v okuženih delih listov in kožice. Kožica plodov in listi okuženi z *V. inaequalis* kažejo v primerjavi z zdravim tkivom več kot štirikrat večjo vsebnost klorogenske kisline, 1 do 3 krat več katehina, 2 do 4 krat več epikatehina ter do 4,4 krat več rutina in kvercitrina. Zaradi večje vsebnosti posameznih fenolov, je bila tudi vsebnost skupnih fenolov v okuženem tkivu 1,1 do 2,4 krat večja kot v zdravih listih in plodovih.

Ključne besede: fenolne spojine, jablanov škrlup, listi, obrambni mehanizem, plodovi

ABSTRACT

PHENOLIC COMPOUNDS AS RESPONSE TO APPLE SCAB (*Venturia inaequalis*) INFECTION

The aim of the research was to determine the changes of some phenolic compounds in the leaves and apple fruits infected with apple scab. Infection with the *Venturia inaequalis* fungus changed the metabolism of phenolic compounds, which caused their increased synthesis at the infected sites of leaves and peel. In comparison to the healthy tissue, the peel of fruit and leaves infected with *V. inaequalis* showed a more than 4-fold increase in chlorogenic acid, 1 to 3 times more catechin, 2 to 4 times more epicatechin and up to 4.4 times more rutin and quercitrin. Owing to the increased quantity of single phenolics, the content of total phenolics in the infected tissue was 1.1 to 2.4 times higher than in the healthy leaves and fruit.

Key words: apple scab, defence mechanism, fruits, leaves, phenolic compounds

1 UVOD

Kemični, mehanski ali biotični stres spremeni fenolni metabolizem jablane. Fenolne spojine so vključene v naravne obrambne reakcije jablane (*Malus domestica* Borkh.) proti številnim boleznim. Rastline se na okužbo odzovejo s sintezo fenolnih snovi, še posebej s fenolnimi kislinami. Fenolne kisline (klorogenska, *p*-kumarna in kavina kislina) preprečijo širitev patogena z lignifikacijo poškodovanih površin (Treutter, 2001).

Pri jablani imajo flavonoli in flavan-3-oli posebno funkcijo pri odpornosti proti glivi *V. inaequalis* (Treutter in Feucht 1990 a, b). V tkivih jablan, okuženih z glivo *V. i.* so ugotovili akumulacijo flavan-3-olov (epikatehina, procianidina B2, procianidina B5 in procianidina E-B5) (Treutter in Feucht, 1990a).

¹ dr., Jamnikarjeva 101, SI-1111 Ljubljana

² prof. dr., prav tam

³ doc. dr., prav tam

V raziskavi smo poskušali ugotoviti, ali okužba z jablanovim škrlupom na listih in plodovih jabolane povzroči spremembo v vsebnosti določenih fenolnih spojin.

2 MATERIAL IN METODE

V poskus, ki je potekal v letih 2005 in 2006 na lokacijah Ljubljana in Maribor, so bila vključena šestletna drevesa sort 'Zlati delišes' in 'Jonagold' cepljena na podlago M9. Kljub temu, da je bilo izvajano redno kemično varstvo dreves proti boleznim, so se na listih ter na plodovih pojavili posamezni simptomi okužbe z jablanovim škrlupom. Izbrali smo 20 dreves, od tega smo na desetih drevesih nabirali samo zdrave liste in plodove, na ostalih desetih pa s škrlupom okužene liste in plodove. Liste smo vzorčili 5 do 7-krat v sezoni, medtem ko smo plodove nabirali v času tehnološke zrelosti. Nabrane liste in plodove smo zamrznili v tekočem dušiku in jih shranili v zamrzovalniku pri -20°C . Iz okuženega tkiva na listih kot tudi na kožici plodov smo izrezali pege z 1-2 mm pasom zdravega tkiva.

Ekstrakcijo fenolov smo izvedli po metodi Escarpa in Gonzalez (2000). Vsebnost posameznih fenolov smo analizirali na HPLC-PDA sistemu (kolona Phenomenex Gemini C18), vsebnost skupnih fenolov spektrofotometrično (765 nm) po metodi s Folin-Ciocalteujevim reagentom (Singleton in Rossi, 1965) ter antioksidativno aktivnost (520 nm) po DPPH metodi (Brand-Williams in sod., 1995). Podatke smo statistično obdelali s programom Statgraphic Plus 4.0. Uporabili smo enosmerno analizo variance ($p < 0,05$).

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

Vsebnosti fenolnih spojin v listih sorte 'Jonagold' v letu 2006 so prikazane v preglednici 1 ter njihove vsebnosti v kožici plodov za obe leti v sliki 1.

Vsebnosti floridzina so bile v zdravih listih od 37,7 do 66,1 mg/g DW. Podobne vsebnosti navajajo tudi Mayr (1995, cit. po Treutter, 2001) ter Leser in Treutter (2005). Okuženi listi so vsebovali statistično več floridzina v primerjavi z zdravimi listi, do 2,8 krat več. Zdravo tkivo kožice je imelo značilno manjše vrednosti floridzina v primerjavi z okuženim tkivom. Vrednosti floridzina v zdravi kožici so bile do 2,3 krat manjše kot na pegi. Kot kažejo naši rezultati se ob okužbi z glivo *Venturia inequalis* sintetizira več floridzina, kar sta potrdila tudi Leser in Treutter (2005).

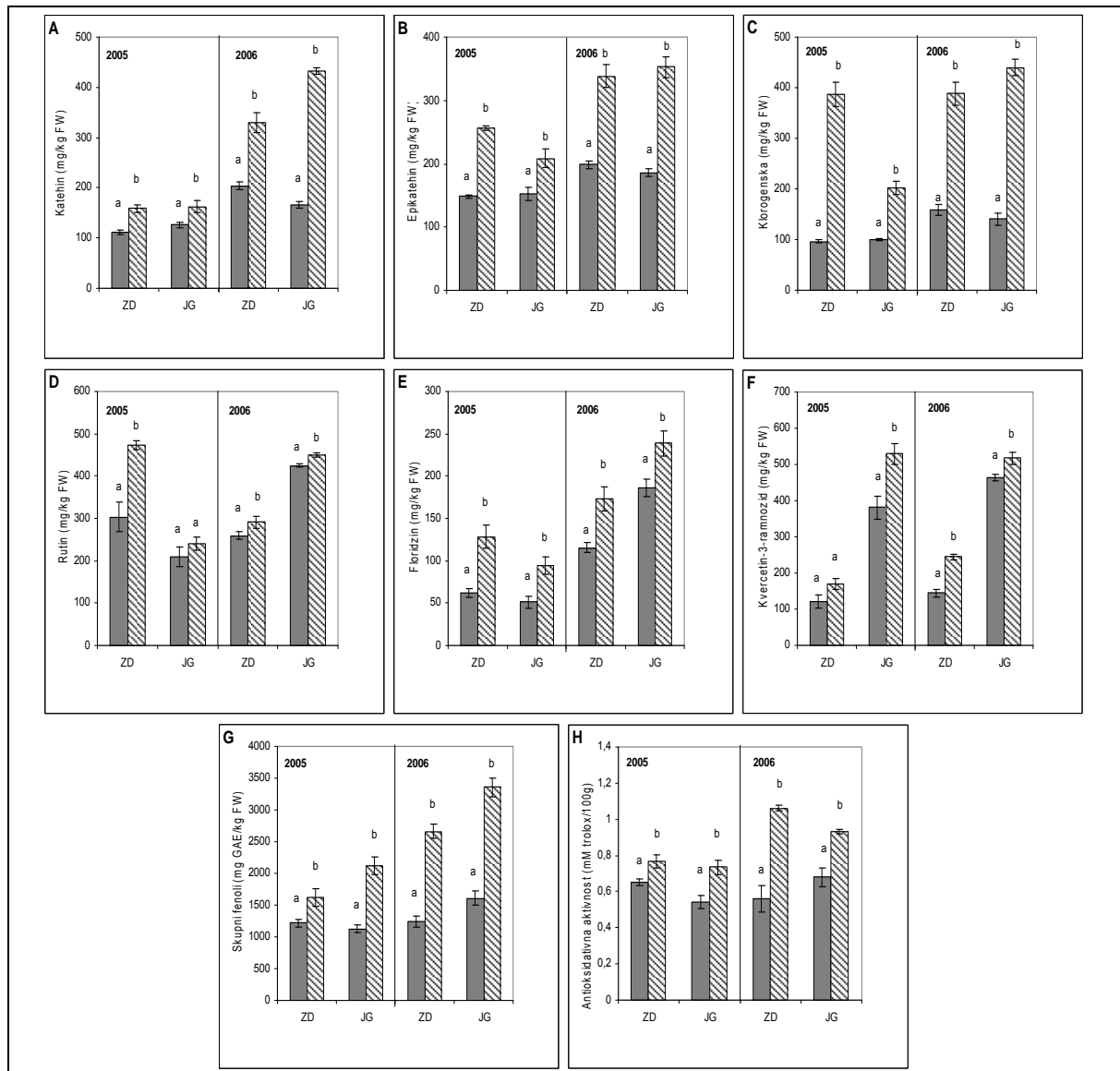
Aglikon floretin se je med termini precej spreminjal, kar sta v svoji raziskavi ugotovila tudi Leser in Treutter (2005). Njegove vsebnosti so v zdravih listih nihale od 2,9 do 21,0 mg/100 g listov (rezultati niso prikazani). Okuženi listi so imeli do 5,4 krat več floretina v primerjavi z zdravimi listi.

Od flavonolov smo določili vsebnost rutina in kvercetin-3-ramnozida (kvercitrin). Vsebnost kvercetin-3-*O*-rutinozida (rutin), kvercetin-3-*O*-galaktozida (hiperin) in kvercetin-3-*O*-glukozida (isokvercitrin) smo izrazili kot ekvivalent rutina. Vsebnost rutina je bila v zdravih listih od 5,1 do 8,2 mg/g DW. V okuženih listih z jablanovim škrlupom se je vsebnost rutina povečala za 1,3 do 4,4 krat. Prav tako je s škrlupom okužena kožica plodov vsebovala značilno več rutina, in sicer pega do 1,6 krat več v primerjavi z zdravim tkivom.

Skozi rastno dobo so se vsebnosti kvercetin-3-ramnozida precej spreminjale. Kožica plodov in listi okuženi s škrlupom so imeli značilno večje vsebnosti kvercitrina v primerjavi z zdravim tkivom. Gliva *V. i.* je povzročila večjo sintezo flavonolov rutina kot tudi kvercetin-3-ramnozida. Do podobnih rezultatov sta prišla tudi Treutter in Feucht (1990 a, b), ki sta ugotovila, da listi jabolane ob okužbi z glivo *Venturia inaequalis* akumulirajo flavonole.

V listih smo določili tudi flavan-3-ole (epikatehin in katehin). Zdravi listi so vsebovali od 7,3 do 76,2 mg/100g DW katehina in 22,3 do 89,4 mg/100g DW epikatehina. Vsebnost katehina se je v okuženih listih povečala približno za 1 do 3-krat ter epikatehina za 2 do 4-krat v primerjavi z zdravimi listi. Tudi med zdravim in okuženim tkivom kožice je značilna razlika v

vsebnosti flavan-3-olov. O akumulaciji flavan-3-olov v tkivih jablane okuženih z glivo *Venturia inaequalis* poročajo tudi Treutter in Feucht (1990a).



Slika 1: Vsebnost posameznih in skupnih fenolov (v mg/kg sveže mase (SM) ter antioksidativna aktivnost (mM troloxa/100g sveže mase) v zdravi in z jablanovim škrlupom okuženi kožici sort 'Zlati delišes' in 'Jonagold' na lokaciji Maribor v letih 2005 in 2006. ■ zdravo ▨ škrlup

Figure 1: The content of single and total phenolics [in mg/kg fresh weight (FW)] and antioxidative activity [mM troloxa/100g fresh weight] in healthy and in infected apple peel at cultivars 'Golden Delicious' and 'Jonagold' at Maribor location in years 2005 and 2006. ■ healthy ▨ scab

Vsebnost klorogenske kisline se je v okuženih listih povečala za 1,1 do 4,2 krat v primerjavi z zdravimi listi. Če primerjamo vsebnost klorogenske kisline med zdravo kožico in pego, je bila njena vsebnost pri slednji do 4 krat večja. Vsebnosti ostalih analiziranih hidroksicimetnih kislin so bile nižje od vsebnosti klorogenske kisline (rezultati niso prikazani). Njihove koncentracije so se med rastno dobo le malo spreminjale. Ob okužbi s škrlupom se je vsebnost tako ferulne, *p*-kumarne kot kavine kisline povečala.

Preglednica 1: Vsebnost fenolnih spojin [povprečje v mg/100g ali v mg/g suhe mase (rutin, floridzin, kvercetin-3-ramnozidin in skupni fenoli)] v zdravih in s škrlupom okuženih listih sorte 'Jonagold' v različnih terminih na lokacijah Ljubljana (LJ) in Maribor (MB) v letu 2006.

Table 1: The content of phenolic compounds [mean in mg/100g or in mg/g dry weight (rutin, phloridzin, quercetin-3-ramnoside and total phenolics)] in healthy and in scab infected leaves at cultivars 'Jonagold' at various times at Ljubljana (LJ) and Maribor location (MB) in year 2006.

Datum	Lokacija	Obrav.	Katehin	Epikatehin	Klorogenska kislina	Rutin	Kvercetin-3-ramnozid	Floridzin	Skupni fenoli
25.5.	LJ	zdravi	23,1 a	55,1 a	59,9 a	8,2 a	7,8 a	59,3 a	61,9 a
		okuženi	36,7 b	74,9 b	77,1 b	10,2 b	9,1 b	70,5 b	95,5 b
	MB	zdravi	76,2 a	71,6 a	85,3 a	5,6 a	4,5 a	46,0 a	57,3 a
		okuženi	117,8 b	152,2 b	96,7 b	13,2 b	9,9 b	127,9 b	125,4 b
19.6.	LJ	zdravi	29,1 a	70,1 a	28,8 a	7,3 a	4,9 a	42,3 a	66,1 a
		okuženi	62,9 b	158,6 b	135,4 b	10,7 b	6,3 b	60,9 b	98,5 b
	MB	zdravi	40,1 a	88,4 a	32,7 a	5,1 a	5,5 a	51,5 a	55,1 a
		okuženi	55,4 b	153,0 b	82,4 b	10,9 b	8,8 b	103,3 b	133,8 b
14.7.	LJ	zdravi	14,7 a	70,5 a	21,9 a	7,3 a	4,5 a	37,7 a	59,4 a
		okuženi	47,9 b	164,7 b	105,2 b	11,1 b	5,4 b	63,2 b	86,6 b
	MB	zdravi	22,2 a	59,3 a	21,5 a	6,6 a	5,3 a	66,1 a	55,7 a
		okuženi	51,9 b	118,4 b	68,5 b	11,8 b	9,2 b	127,5 b	110,8 b
8.8.	LJ	zdravi	13,3 a	69,7 a	22,9 a	7,9 a	4,6 a	43,1 a	64,9 a
		okuženi	22,6 b	176,8 b	127,2 b	12,7 b	6,4 b	79,1 b	93,0 b
	MB	zdravi	7,3 a	22,3 a	4,2 a	7,6 a	4,5 a	64,7 a	68,1 a
		okuženi	21,4 b	60,2 b	32,2 b	12,2 b	6,1 b	103,2 b	133,6 b
2.9.	LJ	zdravi	21,3 a	89,4 a	36,4 a	7,4 a	4,4 a	47,4 a	59,1 a
		okuženi	39,5 b	179,3 b	141,1 b	13,1 b	6,8 b	73,2 b	87,7 b
	MB	zdravi	15,8 a	63,0 a	11,4 a	7,3 a	3,9 a	63,3 a	70,8 a
		okuženi	25,6 b	116,4 b	65,8 b	12,4 b	5,6 b	104,4 b	113,1 b

* različne črke prikazujejo statistično značilne razlike med zdravimi in z jablanovim škrlupom okuženimi listi (LSD test, $p < 0,05$) v posameznem terminu in na posamezni lokaciji.

Na okuženih delih listov se je zaradi okužbe z glivo *V. i.* povečala količina skupnih fenolov. Rezultati kažejo, da je gliva povzročila 1,1 do 2,4 krat večjo vsebnost skupnih fenolov v okuženem tkivu v primerjavi z zdravim tkivom listov. Pega na kožici je imela 1,3 do 2,1 krat večje vrednosti skupnih fenolov v primerjavi z zdravo kožico. V povezavi s povečanjem fenolov se posledično povečajo tudi vrednosti antioksidativne aktivnosti kožice. Zdrava kožica je imela vrednosti antioksidativne aktivnosti od 0,56 do 0,65 mM troloxa/100g, pega pa je imela vrednosti 1,2 do 1,9 krat večje.

4 SKLEPI

Gliva *Venturia inaequalis* je na listih kot tudi na plodovih povzročila večjo sintezo analiziranih fenolnih snovi kot tudi skupnih fenolov. Poleg fenolov verjetno obstajajo še druge snovi, ki so vključene v obrambne mehanizme proti jablanovemu škrlupu.

5 LITERATURA

- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C., 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm.-Wiss. + Technol.*, 28: 25-30.
- Escarpa, A., Gonzalez, M.C., 2000. Optimization strategy and validation of one chromatographic method as approach to determine the phenolic compounds from different sources. *Journal of Chromatography A*, 897: 161-170.
- Leser, C., Treutter, D., 2005. Effect of nitrogen supply on growth content of phenolic compounds and pathogen (scab) resistance of apple trees. *Physiologia Plantarum*, 123: 49-56.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16: 144-158.
- Treutter, D., Feucht, W., 1990a. The pattern of flavan-3-ols in relation to scab resistance of apple cultivars. *Journal of Horticultural Science*, 65: 511-517.
- Treutter, D., Feucht, W., 1990b. Accumulation of flavan-3-ols in fungus-infected leaves of Rosaceae. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 97: 634-641.
- Treutter, D. 2001. Biosynthesis of phenolic compounds and its regulation in apple. *Plant Growth Regulation*, 34: 71-89.