

## ODZIV MALIN NA OKUŽBO Z MALINOVO SUŠICO (*DIDIMELLA APPLANATA* IN *LEPTOSPHERIA CONIOTHYRIUM*)

Maja MIKULI -PETKOVŠEK<sup>1</sup>, Valentina SCHMITZER<sup>2</sup>, Franci ŠTAMPAR<sup>3</sup>,  
Robert VEBERI<sup>4</sup>, Darinka KORON<sup>5</sup>

<sup>1,2,3,4</sup> Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Ljubljana,

<sup>5</sup> Kmetijski inštitut Slovenije, Oddelek za sadjarstvo, vinogradništvo in vinarstvo, Ljubljana

### IZVLE EK

Namen poskusa je bil preveriti, kako se med seboj razlikuje fenolni profil zdravih in okuženih malinovitih rozg z malinovo sušico, ki jo povzroča gliva *Didymella applanata* in *Leptosphaeria coniothyrium*. Rozge smo vzorili na treh sortah 'Autumn Bliss', 'Himbo Top' in 'Polka'. Vsebnost skupnih fenolov in taninov smo določili s spektrofotometrijo, medtem ko smo posamezne fenole analizirali s HPLC-MS. Okužba z obema glivama, ki povzročata sušico, je znatno spremenila vsebnost fenolnih snovi. Z okužbo se je povečala zlasti vsebnost flavanolor in taninov. Ravno nasprotno pa se je z okužbo zmanjšala vsebnost derivatov hidroksicimetnih kislin in elagne kisline ter flavonolor. Sorte 'Himbo Top' in 'Polka' sta vsebovali višje vsebnosti derivatov hidroksicimetnih kislin in elagne kisline v zdravih in obolelih rozgah v primerjavi s sorto 'Autumn Bliss'. Sorta 'Polka' je imela tudi najvišje vsebnosti flavanolor in taninov v primerjavi z ostalima dvema sortama. Kljub visokim vsebnostim individualnih in skupnih fenolor so bile rozge sorte 'Polka' močno okužene z *D. applanata* in *L. coniothyrium*. Rezultati zato nakazujejo, da je mogoče povezati vsebnost fenolor z občutljivostjo na sušico.

**Ključne besede:** fenolne spojine, malinova sušica, obrambni mehanizem, rozge

### ABSTRACT

#### CHANGES IN PHENOLIC PATTERN DUE TO RASPBERRY SPUR AND CANE BLIGHT (*DIDIMELLA APPLANATA* AND *LEPTOSPHERIA CONIOTHYRIUM*)

The phenolic profile of healthy and infected raspberry canes was investigated on three raspberry cultivars: 'Autumn Bliss', 'Himbo Top' and 'Polka'. The content of total phenols and tannins was determined spectrophotometrically, while individual phenolics were analyzed using HPLC-MS analysis. Moreover, *Didymella applanata* and *Leptosphaeria coniothyrium* infection significantly altered the metabolism of phenolic compounds. Spur and cane blight diseases caused an increase of flavanols and tannins. Contrary, the levels of hydroxycinnamic acid derivatives, conjugates of ellagic acid and quercetin glycosides were significantly reduced. 'Himbo Top' and 'Polka' cultivars contained higher levels of hydroxycinnamic acid and ellagic acid derivatives in healthy and infected canes compared to 'Autumn Bliss' cultivar. 'Polka' cultivar also contained the highest level of flavanols and tannins compared to other two cultivars. However, despite high

<sup>1</sup> asist. dr., Jamnikarjeva 101, SI-1111 Ljubljana; E-mail: maja.Mikulic-Petkovsek@bf.uni-lj.si

<sup>2</sup> asist. dr., prav tam

<sup>3</sup> prof. dr., prav tam

<sup>4</sup> izr. prof. dr., prav tam

<sup>5</sup> mag., Hacquetova 17, SI-1000 Ljubljana

content levels of flavanols and total phenols measured in 'Polka' cultivar the canes were extremely infected with *D. applanata* and *L. coniothyrium*. The results of the study suggest that the level of phenolic compounds could be linked to the differences in disease susceptibility.

**Key words:** canes, defence mechanism, phenolic compounds, spur and cane blight

## 1 Uvod

Polifenolne spojine imajo v rastlini različne funkcije. Sodelujejo pri pigmentaciji, rasti, razvoju in imajo tudi obrambno funkcijo. Raziskave so pokazale, da imajo fenoli iz skupine flavonoidov, taninov in lignanov antifugicidno delovanje. Rastline se na okužbo patogenov odzovejo s sintezo nekaterih fenolnih spojin, še posebej s fenolnimi kislinami. Fenolne kisline (klorogenska, *p*-kumarna in kavina kislina) preprečijo širitev patogena z lignifikacijo poškodovanih delov rastline (Treutter, 2006). Pri jablani imajo flavonoli in flavan-3-oli pomembno funkcijo pri odpornosti proti glivi *Venturia inaequalis*. V okuženih tkivih so ugotovili akumulacijo dihidrohalkonov in flavan-3-olov (katehina, epikatehina, procianidinov) (Mikuli -Petkovšek in sod., 2011; Mikuli -Petkovšek in sod., 2009).

V raziskavi smo poskušali ugotoviti, ali okužba z malinovo sušico na rozgah malin povzroči spremembe v vsebnosti posameznih fenolnih spojin.

## 2 MATERIAL IN METODE

70

Poskus je potekal v letih 2009-2012 v sadovnjaku Kmetijskega inštituta Slovenije, ki se nahaja na Brdu pri Lukovici. V poskus smo vključili tri sorte malin: 'Autumn Bliss', 'Himbo Top' in 'Polka', iz katerih smo v letu 2012 vzorili zdrave in z malinovo sušico okužene rozge. Nabrali smo 20 rozg vsake sorte in jih takoj zamrznili v tekočem dušiku in jih do analiz shranili v zamrzovalniku pri -20 °C. Iz okuženega tkiva na rozgah smo tik pred analizo izrezali okužene dele z 1-2 mm pasom zdravega tkiva. V štirih letih poskusa smo ocenjevali stopnjo okužbe malin po lestvici (Kikas in sod., 2002).

Ekstrakcijo fenolov smo izvedli po metodi (Mikuli -Petkovšek in sod., 2011). Vsebnost posameznih fenolov smo analizirali na HPLC-PDA sistemu (kolona Phenomenex Gemini C18), vsebnost skupnih fenolov spektrofotometrično (765 nm) po metodi s Folin-Ciocalteujevimi reagentom (Singleton in sod., 1999) ter vsebnost taninov (725 nm) po DPPH metodi (Makkar in sod., 2007). Podatke smo statistično obdelali s programom Statgraphic Plus 4.0. Uporabili smo dvosmerno analizo variance ( $p < 0,05$ ).

## 3 REZULTATI IN RAZPRAVA

V rozgah malin največji delež predstavljajo fenoli iz skupine flavanolov (približno 90%), v manjši meri so glikozidi kvercetina (6%), nato sledijo derivati elagne kisline (3%), najmanj pa je hidrokscimetnih kislin in njenih derivatov (manj kot 1%).

Rezultati kažejo, da je okuženo tkivo na rozgah imelo značilno nižjo vsebnost skupnih hidrokscimetnih derivatov (slika 1 A). Z okužbo se je njihova vsebnost zmanjšala za približno 10 do 35%. Zmanjšanje njihove vsebnosti zaradi okužbe gre pripisati temu, ker so fenolne kisline osnova za nastanek lignina, suberina in lignanov (Boerjan in sod., 2003). V sintezni poti se cimetne kisline porabljajo, kar se odraža na njihovi manjši vsebnosti pri obolelem tkivu, obratno pa se na obolelih mestih rozge nalaga oplutenelo tkivo, ki je sestavljeno predvsem iz lignina, suberina in lignanov. Sorti 'Himbo Top' in 'Polka' sta imeli v rozgah značilno višjo vsebnost

derivatov hidroksicimetnih kislin v primerjavi s sorto 'Autumn Bliss'. Ta odziv rastline gre verjetno pojasniti s stopnjo okužbe na rozgah, saj je sorta 'Autumn bliss' skozi štiri leta spremljanja pokazala najmanjšo stopnjo okuženosti z glivama *Didymella applanata* in *Leptosphaeria coniothyrium* (preglednica 1). Znano je namreč, da se vsebnost hidroksicimetnih kislin z okužbo spremeni (Mikulič-Petkovšek in sod., 2011).

Preglednica 1: Stopnja okuženosti rozg malin z glivama *Didymella applanata* in *Leptosphaeria coniothyrium* v letih od 2009 do 2012.

Table 1: Infection rate of primocane raspberries by *Didymella applanata* and *Leptosphaeria coniothyrium* from planting in 2009 to 2012

Sorta /Leto	2009	2010	2011	2012
'Autumn Bliss'	1	3	3	7
'Himbo Top'	1	3	5	9
'Polka'	1	7	9	9

Stopnja okužbe je bila ocenjena po naslednji lestvici: 1= nepoškodovano 0%, 2 = zelo majhne poškodbe < 5 %, 3 = majhne poškodbe 5-25 %, 5= srednje poškodbe 26-50 %, 7= mo ne poškodbe 51-75 %, 9= zelo mo ne poškodbe 76-100 %.

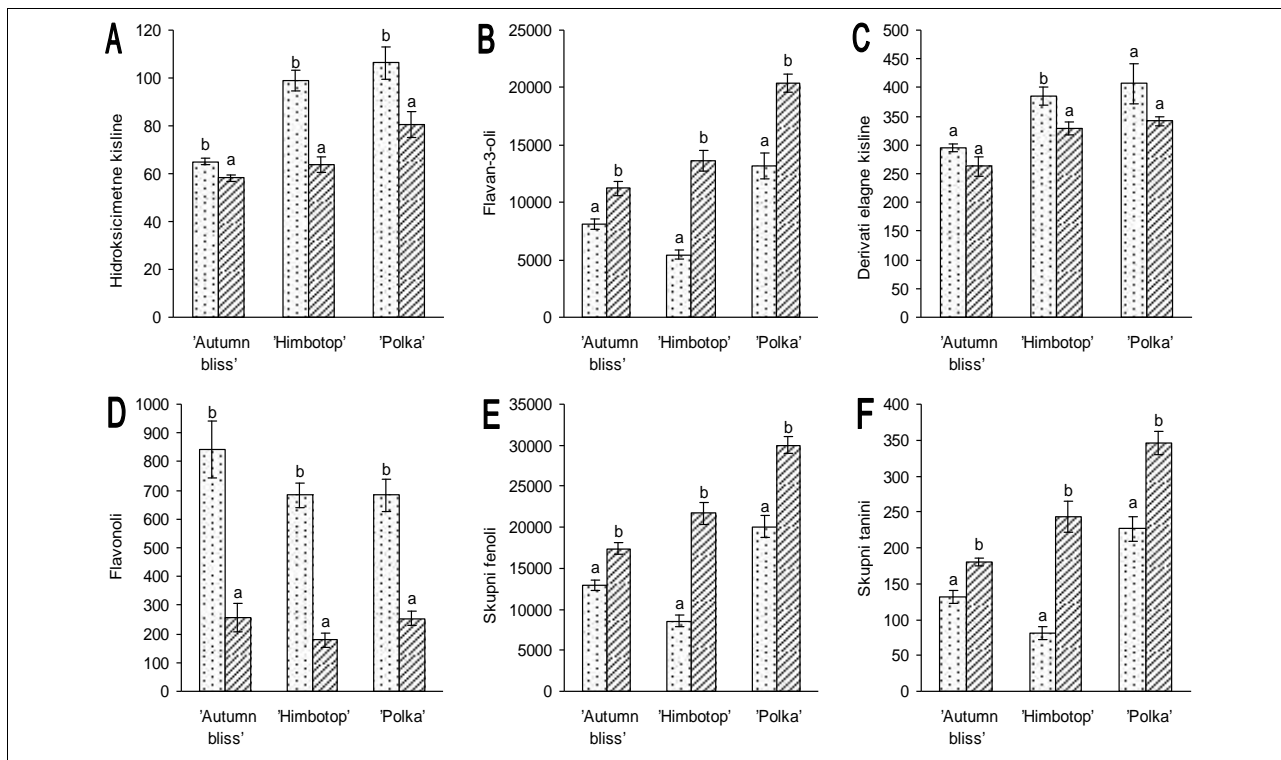
Skupina flavan-3-olov je pri malinah zelo obsežna tako po vsebnosti kot tudi po številu nosilci. V rozgah so bili analizirani številni procianidin dimeri in trimeri. Rezultati kažejo, da so imele okužene rozge 1,4 do 2,5 krat višje vsebnosti flavan-3-olov v primerjavi z zdravimi (slika 1 B). Predhodne objave tudi poročajo o višjih vsebnostih flavanolov v tkivih okuženih z različnimi patogeni (Rusjan in sod., 2012a). Po največji vsebnosti skupnih flavan-3-olov je izstopala sorta Polka, ki je imela do 2,5 krat višjo vsebnost v primerjavi s sortama 'Himbo Top' in 'Autumn Bliss'. Po nekaterih študijah smatrajo, da je visoka vsebnost flavanolov v rastlinskih tkivih razlog za večjo odpornost (Leser and Treutter, 2005). To sicer ne drži za sorto Polka, saj je v treh letih spremljanja imela res visoke stopnje okužbe z glivama *D. applanata* in *L. coniothyrium*. Rozge so bile precej napadene z omenjenima patogenoma in so tako imele od 51 do 90% stopnjo okužbe.

Za vrste iz rodu *Rubus* so značilni predvsem derivati elagne kisline. Na osnovno komponento elagne kisline se vežejo različni sladkorji kot tudi druge skupine (npr. etil in metil). V rozgah smo analizirali osem derivatov elagne kisline. Rezultati so pokazali, da so imele zdrave rozge značilno višje vsebnosti derivatov elagne kisline v primerjavi z bolanim tkivom (slika 1 C). Ta ugotovitev lahko pojasnimo z dejstvom, da se verjetno derivati elagne kisline pri okužbi s patogeni porabljajo za nastanek taninov. Tudi Pfabel in sod. (2012) poročajo, da se vsebnost taninov z okužbo poveča, kar gre verjetno na račun zmanjšanja konjugatov elagne kisline, saj je elagna kislina predstopnja v sintezni poti taninov.

Obratna slika kot pri derivatih elagne kisline se je pokazala pri vsebnosti skupnih taninov v rozgah maline. Okužene rozge vseh proučevanih sort so imele značilno višje vsebnosti taninov v primerjavi z zdravimi rozgami (slika 1 F). Obolela mesta na rozgah so tako imela 1,4 do 3 krat višje vsebnosti taninov kot zdravo tkivo. Ta rezultat nam potrjuje, da se je res verjetno na račun zmanjšanja ellagnih komponent povečala vsebnost taninov.

Iz skupine flavanolov smo analizirali samo glikozide kvercetina (K), in sicer K-3-galaktozid, K-3-glukozid, K-3-arabinozid, K-3-glukuronid in K-3-ksilozilglukuronid. Največji odstotek k njihovi vsoti prispeva K-3-glukuronid, in sicer 45 do 70% vsote flavanolov. Rezultati so pokazali, da je okužba privedla do zmanjšanja vsebnosti kvercetinov v obolelem tkivu rozg, saj se je njihova vsebnost zaradi okužbe zmanjšala za 2,7 do 3,8 krat v primerjavi z zdravim tkivom (slika 1 D). Verjetno do tega pride na račun povečanja flavan-3-olov pri okuženem tkivu, zaradi

esar se posledi no zmanjša vsebnost kvercetinov, saj so le ti predstopnja v fenilpropanoidni poti in se intenzivno porabljajo za nastanek mono- in polimernih flavan-3-olov.



72

Slika 1: Vsebnost skupnih hidroksicimetnih kislin, flavan-3-olov, taninov, flavonolov, derivatov elagne kisline in skupnih fenolov (v mg/kg sveže mase (SM) v zdravih in z malinovo sušico okuženih rozgah treh sort maline. □ zdravo tkivo ▨ okuženo tkivo

Figure 1: The content of total hydroxycinnamic acids, flavan-3-ols, tannins, flavonols, derivates of ellagic acid and total phenolics [in mg/kg fresh weight (FW)] in healthy and in spur and cane blight infected canes at three cultivars. □ healthy tissue ▨ infected tissue

Vsebnost skupnih fenolov je odraz vseh analiziranih posameznih fenolov ter predvsem flavan-3-olov, ki zaradi njihove visoke vsebnosti največ prispevajo k skupnim fenolom. Odziv rastline na okužbo se je odrazil na 1,3 do 2,5 kratnem povečanju skupnih fenolov (slika 1 E). Tudi druge raziskave kažejo, da se vsebnost skupnih fenolov v rastlinah zaradi napada škodljivcev ali okužb s patogeni, bakterijami ali virusi izrazito poveča (Mikulič-Petkovšek in sod., 2009, 2011; Rusjan in sod., 2012b).

#### 4 Sklepi

Na rozgah sta glivi *Didymella applanata* in *Leptosphaeria coniothyrium* povzročili spremembo sekundarnega metabolizma. Okuženo tkivo je imelo značilno višje vsebnosti flavanolov, skupnih fenolov in taninov ter značilno manj hidroksicimetnih kislin, derivatov elagne kisline ter flavonolov v primerjavi z zdravim tkivom.

## 5 LITERATURA

- Boerjan, W., Ralph, J., Baucher, M., 2003. Lignin biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 54: 519-546.
- Kikas, A., Libek, A., Hanni, L., 2002. Evaluation of raspberry cultivars in Estonia. *Acta Horticulturae*, 585: 203-207.
- Leser, C., Treutter, D., 2005. Effects of nitrogen supply on growth, contents of phenolic compounds and pathogen (scab) resistance of apple trees. *Physiol. Plant.*, 123: 49-56.
- Makkar, H.P.S., Siddhuraju, P., Becker, K., 2007. *Methods in molecular biology. V: Plant secondary metabolites.* 393: 67-81.
- Mikuli -Petkovšek, M., Slatnar, A., Štampar, F., Veberi, R., 2011. Phenolic compounds in apple leaves after infection with apple scab. *Biol. Plant.*, 55: 725-730.
- Mikuli -Petkovšek, M., Štampar, F., Veberi, R., 2009. Accumulation of phenolic compounds in apple in response to infection by the scab pathogen, *Venturia inaequalis*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 74: 60-67.
- Pfabel, C., Eckhardt, K.U., Baum, C., Struck, C., Frey, P., Weih, M., 2012. Impact of ectomycorrhizal colonization and rust infection on the secondary metabolism of poplar (*Populus trichocarpa* x *deltoides*). *Tree Physiol.*, 32: 1357-1364.
- Rusjan, D., Halbwirth, H., Stich, K., Mikuli -Petkovšek, M., Veberi, R., 2012a. Biochemical response of grapevine variety 'Chardonnay' (*Vitis vinifera* L.) to infection with grapevine yellows (*Bois noir*). *Eur. J. Plant Pathol.*, 134: 231-237.
- Rusjan, D., Veberi, R., Mikuli -Petkovšek, M., 2012b. The response of phenolic compounds in grapes of the variety 'Chardonnay' (*Vitis vinifera* L.) to the infection by phytoplasma *Bois noir*. *Eur. J. Plant Pathol.*, 133: 965-974.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *V: Packer, L. (ur.), Oxidants and Antioxidants, Pt A.* Elsevier Academic Press Inc, San Diego, s. 152-178.
- Treutter, D., 2006. Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Environ. Chem. Lett.*, 4: 147-157.