

SPREMENJEN PRIMARNI IN SEKUNDARNI METABOLIZEM JAGOD ZARADI OKUŽBE Z GLIVO *Colletotrichum nymphaeae* (Pass.) AA

Maja MIKULI -PETKOVŠEK¹, Nika WEBER², Valentina SCHMITZER³, Jerneja JAKOPI⁴,
Franci ŠTAMPAR⁵, Darinka KORON⁶, Alenka MUNDA⁷, Robert VEBERI⁸

^{1,2,3,4,5,8} Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Ljubljana

⁶ Kmetijski inštitut Slovenije, Oddelek za sadjarstvo, vinogradništvo in vinarstvo, Ljubljana

⁷ Kmetijski inštitut Slovenije, Oddelek za varstvo rastlin, Ljubljana

IZVLE EK

Pri sorti 'Clery' smo spremljali u inek okužbe z glivo *Colletotrichum nymphaeae* na vsebnost sladkorjev, organskih kislin in posameznih fenolov. Primarne metabolite smo analizirali s pomo jo HPLC-RI-PDA, fenolne snovi pa s HPLC-PDA-MS. *Colletotrichum nymphaeae*, je povzro il padec saharoze v plodovih teh porast fruktoze in glukoze. V okuženih plodovih je prišlo tudi do padca organskih kislin. Tako v živicah kot tudi v plodovih so bili prisotni derivati elagne kisline, flavanoli in flavonoli. V plodovih smo dodatno identificirali štiri razli ne antocianine. Ob primerjavi inficiranih in zdravih plodov so bile zna ilne razlike v vsebnosti posameznih fenolnih snovi iz razli nih skupin. Predvsem so narasli derivati elagne kisline, flavonoli so v glavnem bili ob infekciji nižji, medtem ko se je vsebnost flavanolov in antocianov pove ala z stopnjo infekcije. V živicah so derivati elagne kisline bodisi narasli ali padli, procianidini so v ve ini primerov padli, flavonoli pa narasli. Razlike so bile manj izražene kot v plodovih.

Klju ne besede: *Colletotrichum nymphaeae*, fenolne spojine, obrambni mehanizem, organske kisline, sladkorji

ABSTRACT

INFLUENCE OF *Colletotrichum nymphaeae* (Pass.) AA INFECTION ON PRIMARY AND SECONDARY METABOLITES IN STRAWBERRIES

The effect of *Colletotrichum nymphaeae* infection on the contents of sugars, organic acids, and individual phenolic compounds was investigated in strawberry cultivar 'Clery'. Primary metabolites were determined with the use of HPLC-RI-PDA and secondary metabolites further confirmed with HPLC-PDA-MS. *Colletotrichum nymphaeae* caused a decrease in sucrose and an increase in fructose and glucose in strawberry fruit. A significant decrease in the content of organic acids was recorded in infected fruit. Different forms of ellagic acid, flavanols and

¹ asist. dr., Jamnikarjeva 101, SI-1111 Ljubljana; E-mail: maja.mikulic-petkovsek@bf.uni-lj.si

² mag., inž. kmet., prav tam

³ asist. dr., prav tam

⁴ asist. dr., prav tam

⁵ prof. dr., prav tam

⁶ mag., Hacquetova 17, SI-1000 Ljubljana

⁷ dr., prav tam

⁸ izr. prof. dr., Jamnikarjeva 101, SI-1111 Ljubljana

flavonols were identified in strawberry runners and fruit. In fruit additionally four anthocyanins were identified. Significant differences in individual phenolic compounds in strawberry fruit were detected at the beginning of the infection compared to non-infected fruit. Specifically, ellagic acids significantly increased, flavonols generally decreased, and flavanols and anthocyanins increased with the progression of infection. Similarly, some forms of ellagic acid increased and others decreased in infected runners, procyanidins generally decreased and flavonols, increased but the differences were much less prominent compared to the fruit.

Key words: *Colletotrichum nymphaeae*, defence mechanism, organic acids, phenolic compounds, sugars

1 UVOD

Bolezen rna pegavost jagod je takoj za glivo *Botrytis cinera* druga gospodarsko najpomembnejša bolezen pri jagodah. Povzro a jo gliva *Colletotrichum nymphaeae* in je glavna povzro iteljica antraknoz na jagodah. Znamenja okužbe z glivo se kažejo kot okrogle rjavo rne pege na dozorevajo ih plodovih in kot nekroze na živicah in listnih pecljih rastline. Povzro a tudi listno pegavost ter venenje in propadanje mladih rastlin. Izredno velike probleme predstavlja v vlažnih letih (Damm in sod., 2012).

Rastline se na okužbo patogenov odzovejo s sintezo dolo enih fenolnih spojin, še posebej s fenolnimi kislinami in flavanoli. Fenolne kisline in konjugati elagne kisline prepre ijo širitev patogena z lignifikacijo poškodovanih delov rastline (Treutter, 2006). Nekatere študije kažejo, da lahko fenolne spojine aktivno sodelujejo pri obrambi rastlin proti škodljivcem, glivam, bakterijam ali virusom (Mikuli -Petkovšek in sod., 2011; Rusjan in sod., 2012). Zaradi majhnega števila dovoljenih fungicidov, ki se lahko uporabljajo v pridelavi jagod, je ena od možnosti uspešnega boja proti antraknozi uporaba odpornih sort. Zato je bil naš namen poskusa poiskati možne povezave med boleznijo in vsebnostjo primarnih in sekundarnih metabolitov v rastlini skozi razli ne bolezenske stadije rastline. Izsledki raziskave bi omogo ili vklju itev dolo enih komponent fenolnih snovi, ki so pomembne pri obrambnem mehanizmu rastline na patogene, v razli ne programe križanj, z namenom dobiti sorte odporne proti antraknozi.

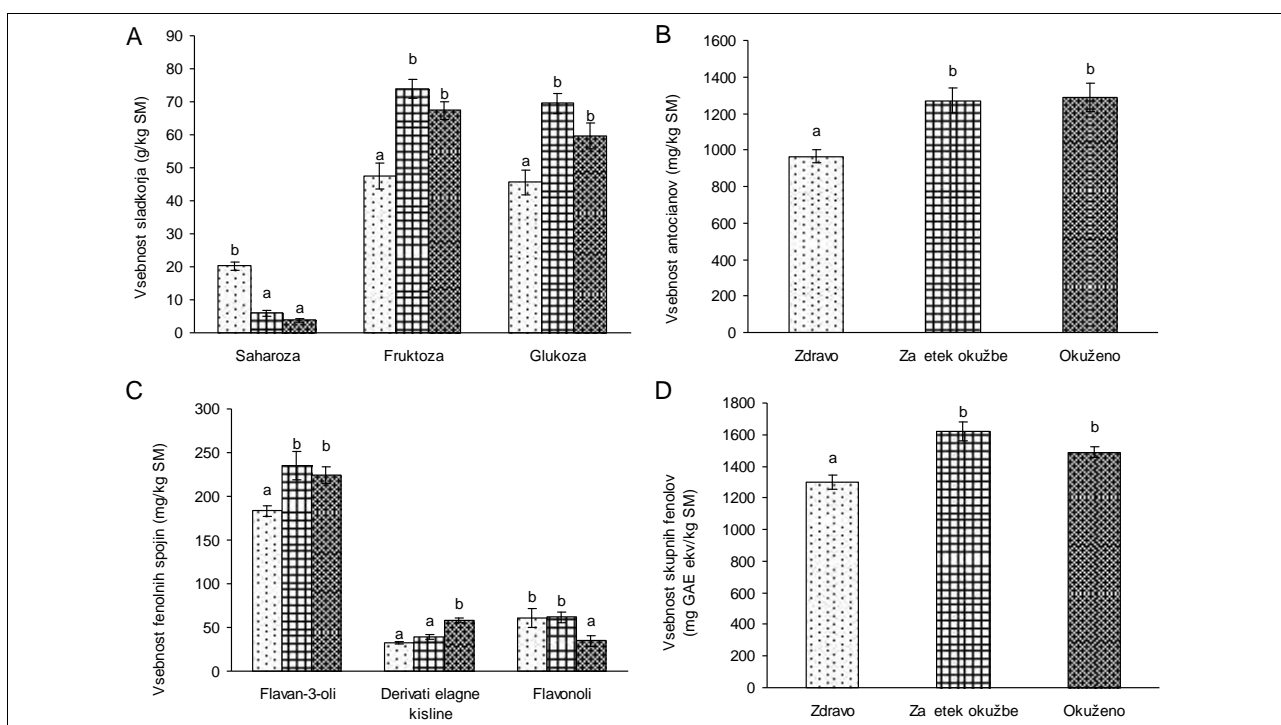
2 MATERIAL IN METODE

V poskus je bila vklju ena sorta jagode 'Clery'. Vzorce plodov smo nabrali v treh stadijih: zdravi plodovi, plodovi na katerih so bili znaki za etka okužbe z glivo *Colletotrichum nymphaeae* ter okuženi plodovi. Pri živicah smo vzor ili samo zdrave in okužene živice z omenjeno glivo. Plodove in živice smo nabrali 15. septembra 2011. Vzorci plodov so bili v pobrani v tehnološki zrelosti. Vzorce smo takoj zamrznili v teko em dušiku in jih do za etka analiz shranili pri temperaturi - 20 °C.

Ekstrakcijo sladkorjev in organskih kislin smo izvedli po metodi (Mikuli -Petkovšek in sod., 2007) ter fenolov po metodi (Mikuli -Petkovšek in sod., 2010). Vsebnost primarnih in sekundarnih metabolitov smo analizirali na HPLC sistemu ter vsebnost skupnih fenolov spektrofotometri no (765 nm) po metodi s Folin-Ciocalteujevim reagentom (Singleton in sod., 1999). Podatke smo statisti no obdelali s programom Statgraphic Plus 4.0. Uporabili smo enosmerno analizo variance ($p < 0,05$).

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

V plodovih jagod sta po vsebnosti glavna sladkorja fruktoza in glukoza, saharoza predstavlja do 15 % vseh sladkorjev kot poročajo tudi (Basson in sod., 2010). Okužba z glivo *Colletotrichum n.* je povzročila znatno povečanje fruktoze in glukoze v plodovih, obratno pa znatno zmanjšanje saharoze (slika 1 A). Ta slika se je odrazila tudi pri skupnih sladkorjih. Zdravi plodovi so imeli znatno najmanjše vsebnosti skupnih sladkorjev, njihova vsebnost se je povečala z začetkom infekcije, medtem ko so okuženi plodovi imeli statistično največje vsebnosti skupnih sladkorjev. Njihova vsebnost se je z okužbo povečala za približno 15 %. Prevladujejo organske kisline, v jagodah jabolna in citronska kislina (99 % skupnih kislin). Šikimska in fumarna kislina sta zastopani le v sledovih. V vsebnosti citronske kisline ni bilo znanih razlik med obravnavanji, so pa okuženi plodovi imeli znatno manj jabolne kisline (rezultati niso prikazani).



Slika 1: Vsebnost posameznih sladkorjev, fenolnih spojin po posameznih skupinah ter skupnih fenolov v zdravih in okuženih plodovih jagode z glivo *Colletotrichum nymphaeae* (v mg/kg sveže mase (SM))

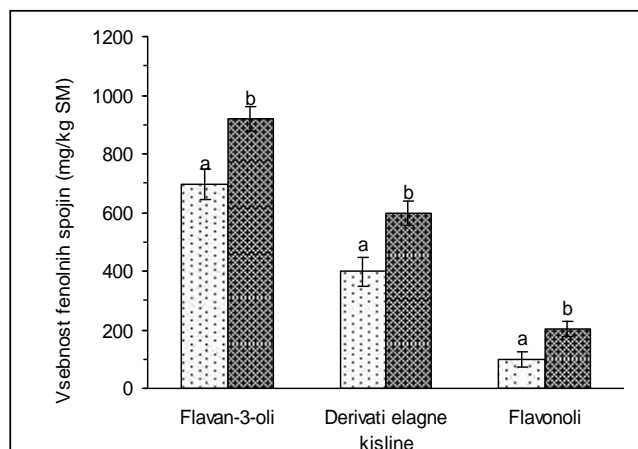
□ zdravo □ za etek okužbe □ okuženo

Figure 1: The content of individual sugars, phenolic groups and total phenolics in healthy and infected strawberry fruits with fungus *Colletotrichum nymphaeae* [in mg/kg fresh weight (FW)]

□ healthy □ beginning of infection □ infected

Po vsebnosti so v plodovih jagod prevladujejo polifenolne spojine antociani. Glavna antociana sta pelargonidin-3-glukozid in pelargonidin-3-malonilglukozid. Z začetkom okužbe postane robno tkivo med zdravim in okuženim delom temnejše obarvano, kar gre verjetno pripisati intenzivni sintezi antocijanov. Rezultati kažejo, da se je vsebnost skupnih antocijanov v plodovih z okužbo znatno povečala (slika 1 B). Velik delež v živicah in plodovih jagod predstavljajo tudi flavan-3-oli. Analizirani je bil širok spekter procianidinov, to so predvsem dimeri in trimeri. Odziv rastline na okužbo se je odrazil z znatno ilnim povečanjem flavan-3-olov v okuženem tkivu,

tako v plodovih kot tudi v živicah (slika 1 C in 2). V živicah je bil katehin prevladujo i flavan-3-ol po vsebnosti. Tudi predhodne študije kažejo, da okužba z različnimi patogeni povzro i pove anje različnih flavan-3-olov, predvsem katehina in procianidinov (Mikuli -Petkovšek in sod., 2011; Rusjan in sod., 2012). Na ta na in rastlina omeji oziroma zaustavi rast in širjenje glive. Podoben odziv rastline je opazen tudi pri skupini različnih derivatov elagne kisline, ki se prav tako izrazito pove ajo ob okužbi (slika 1 C in 2).



Slika 2: Vsebnost posameznih sladkorjev, fenolnih spojin po posameznih skupinah ter skupnih fenolov v zdravih in okuženih živicah jagode z glivo *Colletotrichum nymphaeae* (v mg/kg sveže mase (SM))

□ zdravo ■ okuženo

Figure 1: The content of individual sugars, phenolic groups and total phenolics in healthy and infected strawberry runners with fungus *Colletotrichum nymphaeae* [in mg/kg fresh weight (FW)]

□ healthy ■ infected

Derivati elagne kisline so bili najštevilnejši, saj je bilo dolo enih dvanajst različnih spojin elagne kisline. Od flavonolov smo dolo ili sedem različnih snovi, največji delež predstavljata kempferol-3-glukuronid in kvercetin-3-glukuronid. Iz slike 1 C vidimo, da je okužba z glivo povzročila zmanjšanje skupnih flavonolov v plodovih in obratno znatno povečanje v živicah jagode (slika 2). Okužene živice so imele približno dvakrat višjo vsebnost skupnih flavonolov v primerjavi z zdravimi. Vsebnost skupnih fenolov je odraz vseh analiziranih posameznih fenolov ter predvsem flavan-3-olov in antocianov, ki zaradi njihove visoke vsebnosti največ prispevajo k skupnim fenolom v plodovih. Okužba z glivo *Colletotrichum n.* je povzročila približno 30 % višje vsebnosti skupnih fenolov v okuženem tkivu v primerjavi z zdravimi (Slika 1 D). Tudi druge raziskave kažejo, da se vsebnost skupnih fenolov v rastlinah zaradi napada patogenov znatno poveča (Mikuli -Petkovšek in sod., 2011; Rusjan in sod., 2012).

4 SKLEPI

Rezultati kažejo, da je okužba z glivo *Colletotrichum nymphaeae* povzročila spremembo primarnega in sekundarnega metabolizma. Odziv rastline se je odrazil z znatnim zmanjšanjem saharoze, jabolne in citronske kisline ter flavonolov v plodovih jagode ter obratno povečanjem flavan-3-olov, derivatov elagne kisline in antocianov.

5 LITERATURA

- Basson, C.E., Groenewald, J.H., Kossmann, J., Cronje, C., Bauer, R., 2010. Sugar and acid-related quality attributes and enzyme activities in strawberry fruits: Invertase is the main sucrose hydrolysing enzyme. *Food Chemistry*, 121: 1156-1162.
- Damm, U., Cannon, P.F., Woudenberg, J.H.C., Crous, P.W., 2012. The *Colletotrichum acutatum* species complex. *Studies in Mycology*, 73: 37-113.
- Mikuli -Petkovšek, M., Slatnar, A., Štampar, F., Veberi, R., 2010. The influence of organic/integrated production on the content of phenolic compounds in apple leaves and fruits in four different varieties over a 2-year period. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90: 2366-2378.
- Mikuli -Petkovšek, M., Slatnar, A., Veberi, R., Štampar, F., Solar, A., 2011. Phenolic response in green walnut husk after the infection with bacteria *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*. *Physiological Molecular Plant Pathology*, 76: 159-165.
- Mikuli -Petkovšek, M., Štampar, F., Veberi, R., 2007. Parameters of inner quality of the apple scab resistant and susceptible apple cultivars (*Malus domestica* Borkh.). *Scientia Horticulturae*, 114: 37-44.
- Rusjan, D., Veberi, R., Mikuli -Petkovšek, M., 2012. The response of phenolic compounds in grapes of the variety 'Chardonnay' (*Vitis vinifera* L.) to the infection by phytoplasma Bois noir. *European Journal of Plant Pathology*, 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, 1995: 152-178.
- Treutter, D., 2006. Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 4: 147-157.