

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
MEDNARODNI ŠTUDIJSKI PROGRAM SADJARSTVO

Matic NOVLJAN

**RAZLIKA V VSEBNOSTI PRIMARNIH
METABOLITOV V PLODIČIH JABLNE (*Malus
domestica* Borkh.) GLEDE NA NJIHOV POLOŽAJ V
SOCVETJU**

MAGISTRSKO DELO

Mednarodni študijski program Sadjarstvo - 2. stopnja

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
MEDNARODNI ŠTUDIJSKI PROGRAM SADJARSTVO

Matic NOVLJAN

**RAZLIKA V VSEBNOSTI PRIMARNIH METABOLITOV V
PLODIČIH JABLNE (*Malus domestica* Borkh.) GLEDE NA NJIHOV
POLOŽAJ V SOCVETJU**

MAGISTRSKO DELO
Mednarodni študijski program Sadjarstvo - 2. stopnja

**DIFFERENCE IN CONTENT OF PRIMARY METABOLITES IN
APPLE (*Malus domestica* Borkh.) FRUITLETS REGARDING THEIR
POSITION IN THE INFLORESCENCE**

M. SC. THESIS
International Master of Fruit Science

Ljubljana, 2013



Univerza
v Ljubljani
Biotehniška
fakulteta



INTERNATIONAL MASTER OF FRUIT SCIENCE

Master Degree Thesis

DIFFERENCE IN CONTENT OF PRIMARY METABOLITES IN APPLE (*Malus domestica* Borkh.) FRUITLETS REGARDING THEIR POSITION IN THE INFLORESCENCE

Matic NOVLJAN

Academic year: 2012/2013

Supervisor

prof. dr. Robert VEBERIČ

Committee members

prof. dr. Franc BATIČ, University of Ljubljana, Biotechnical faculty

prof. dr. Dominik VODNIK, University of Ljubljana, Biotechnical faculty

dr. Ivo ONDRÁŠEK, Mendel University in Brno, Faculty of Horticulture

prof. dr. Massimo TAGLIAVINI, Free University of Bolzano, Faculty of Science and Technology

Magistrsko delo je rezultat lastnega dela. Podpisani se strinjam z objavo svojega magistrskega dela na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddal v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Matic NOVLJAN

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du2-IMFS
- DK UDK 634.11:581.19:543.631(043.2)
- KG jablana/abscizija/redčenje plodičev/primarni metaboliti/sekundarni metaboliti/fenoli/položaj plodičev/socvetje/*Malus domestica*
- AV NOVLJAN, Matic
- SA VEBERIČ, Robert (mentor)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Mednarodni študijski program Sadjarstvo
- LI 2013
- IN RAZLIKA V VSEBNOSTI PRIMARNIH METABOLITOV V PLODIČIH JABLNE (*Malus domestica*. Borkh.) GLEDE NA NJIHOV POLOŽAJ V SOCVETJU
- TD Magistrsko delo (Mednarodni študijski program Sadjarstvo - 2. stopnja)
- OP X, 44, [4] str., 5 pregl., 2 sl., 3 pril., 37 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Redčenje pomembno vpliva na število in kakovost plodov pri jablani (*Malus domestica* Borkh.). Če plodov ne redčimo, jih dobršen del sam odpade med »junijskim trebljenjem«. Točni vzroki, oziroma mehanizmi pojave še niso popolnoma znani. Nas je zanimalo, kako redčenje in abscizija vplivata na vsebnost primarnih in sekundarnih metabolitov v plodičih. Izmerili smo vsebnost primarnih in sekundarnih metabolitov v plodičih redčenih dreves, plodičih z normalnih šopov in plodičih, ki so kazali znake abscizije ter rezultate primerjali med seboj. Za kvantitativno določanje vrednosti smo si pomagali s tekočinsko kromatografijo (HPLC) in določili vsebnost sladkorjev, organskih kislin, antocianov, flavanolov, flavonolov, hidroksicimetnih kislin, dihidrohalkonov in vsebnost skupnih fenolov (TPC). Z analizo in primerjavo plodičev ki so kazali znake abscizije s tistimi, ki so bili na videz zdravi smo ugotovili, da se v plodičih, ki kažejo znake abscizije poveča vsebnost sladkorjev, nasprotno pa se zmanjša vsebnost organskih kislin in vsebnost skupnih fenolov (TPC). Pri primerjanju vsebnosti plodičev glede na njihov položaj v šopu, pa smo ugotovili, da ima najvišji plodič (king flower) največ primarnih metabolitov, med tem ko so vrednosti sekundarnih metabolitov večje v plodičih nižje na cvetni osi.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2-IMFS
DC UDC 634.11:581.19:543.631(043.2)
CX apple/abscission/fruit thinning/primary metabolites/sekundary
metabolites/phenols/fruitlet position/inflorescence/*Malus domestica*
AU NOVLJAN, Matic
AA VEBERIČ, Robert (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, International Master of Fruit Science
PY 2013
TY DIFFERENCE IN CONTENT OF PRIMARY METABOLITES IN APPLE (*Malus domestica* Borkh.) FRUITLETS REGARDING THEIR POSITION IN THE INFLORESCENCE
DT M. Sc. Thesis (International Master of Fruit Science)
NO X, 44, [4] p., 5 tab., 2 fig., 3 ann., 37 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Thinning has a great influence on the number and quality of apple (*Malus domestica* Borkh.) fruits. If thinning is not performed, a larger portion of fruits drop by itself during »June drop«. What exactly triggers this phenomenon is not entirely known. We tried to determine how abscizion and thinning influences primary and secondary metabolite content and the influence of fruitlet position in fruit bunch on concentrations. With high pressure liquid chromatograph (HPLC) we determined the amount of sugars, organic acids, anthocyanin's, flavanols, flavonols, hydroxycinnamic acids, dihydrochalcone and total phenolic content (TPC). When we compared abscising fruitlets with the ones from healthy fruit bunches we found that abscising fruitlets have higher amounts of sugars but lower organic acids and TPC content. Position of fruitlet in fruit bunch influences the content, the highest positioned fruit has the highest content of sugars, but secondary metabolites content was higher in fruits positioned lower in the fruit bunch. Thinning of the fruitlets had an opposite effect of expected, it lowered the content of sugars when compared to the non-thinned fruit bunches.

KAZALO VSEBINE

	Str.
Ključna dokumentacijska informacija	II
Key words documentation	III
Kazalo vsebine	IV
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Kazalo prilog	IX
Seznam okrajšav	X
1 UVOD	1
1.1 VZROK ZA RAZISKAVO	1
1.2 DELOVNA HIPOTEZA	1
1.3 NAMEN RAZISKAVE	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 JABLANA (<i>MALUS DOMESTICA</i> Borkh.) - IZVOR IN BOTANIČNA RAZVRSTITEV	2
2.2 MORFOLOGIJA JABLANE	2
2.2.1 Rodni les	2
2.2.2 Cvet in cvetenje	3
2.2.3 Opraševanje in oplodnja	3
2.2.4 Plodovi	4
2.2.5 Rast in razvoj plodov	4
2.2.6 Peščišče in pečke	5
2.3 POMEMBNE ORGANSKE SPOJINE V JABLANI	5
2.3.1 Primarni metaboliti	5
2.3.2 Ogljikovi hidrati	5
2.3.3 Organske kisline	6
2.3.4 Fenoli	6
2.4 HORMONI IN REDČENJE	7
2.4.1 Redčenje – trebljenje	7

2.4.2	Izmenična rodnost	7
2.4.3	Načini redčenja	8
2.4.4	Kemično redčenje	8
2.5	ABSCIZIJA PLODIČEV	9
3	MATERIALI IN METODE	11
3.1	POSKUSNI NASAD	11
3.1.1	'Zlati delišes'	11
3.1.2	Podlaga M9	11
3.1.3	Vremenske razmere v pomladanskih mesecih leta 2013	12
3.1.4	Fenološke razmere v pomladanskih mesecih leta 2013	12
3.2	VZORČNI MATERIAL	12
3.3	METODE DELA	13
3.3.1	Priprava vzorcev	13
3.3.2	Ekstrakcija sladkorjev in organskih kislin	13
3.3.3	Ekstrakcija posameznih in skupnih fenolov	14
3.3.4	HPLC analiza	14
3.3.5	Analiza skupnih fenolov (TPC)	14
3.3.6	Statistična obdelava podatkov	15
4	REZULTATI	16
4.1	PRIMERJAVA VSEBNOSTI PRIMARNIH IN SEKUNDARNIH METABOLITOV ZDRAVIH PLODIČEV S PLODIČI IZ REDČENIH ŠOPOV	16
4.1.1	Skupni sladkorji	16
4.1.2	Skupne kisline	17
4.1.3	Vsebnost hidroksicimetnih kislin, antocianov, dihidrohalkonov, flavanolov, flavonolov in TPC	18
4.2	PRIMERJAVA VSEBNOSTI PRIMARNIH IN SEKUNDARNIH METABOLITOV V ZDRAVIH PLODIČIH MED RAZLIČNIMI POLOŽAJI V ŠOPU	19
4.2.1	Vsebnost skupnih sladkorjev, organskih kislin in TPC	19
4.2.2	Vsebnost antocianov, flavanolov, flavonolov, hidroksicimetnih kislin in dihidrohalkonov	20

4.3	PRIMERJAVA VSEBNOSTI PRIMARNIH IN SEKUNDARNIH METABOLITOV MED ABSCIZIVNIMI IN ZDRAVIMI PLODIČI	21
4.3.1	Sladkorji, organske kisline in TPC	21
4.3.2	Antociani, flavanoli, flavonoli, hidroksicimetna kislina in dihidrohalkoni	22
5	RAZPRAVA	23
5.1	PRIMERJAVA VSEBNOSTI PRIMARNIH IN SEKUNDARNIH METABOLITOV ZDRAVIH PLODIČEV S PLODIČI IZ REDČENIH ŠOPOV	23
5.1.1	Skupni sladkorji	23
5.1.2	Skupne organske kisline	23
5.1.3	Vsebnost hidroksicimetnih kislin, antocianov, dihidrohalkonov, flavanolov, flavonolov in TPC	24
5.2	PRIMERJAVA VSEBNOSTI PRIMARNIH IN SEKUNDARNIH METABOLITOV V ZDRAVIH PLODIČIH MED RAZLIČNIMI POLOŽAJI V ŠOPU	25
5.2.1	Skupni sladkorji	25
5.2.2	Skupne organske kisline	25
5.2.3	Vsebnost TPC	25
5.2.4	Vsebnost dihidrohalkonov, antocianov, flavanolov, flavonolov in hidroksicimetnih kislin	26
5.3	PRIMERJAVA ABSIZIVNIH PLODIČEV Z ZDRAVIMI PLODIČI Z ABSIZIVNIH ŠOPOV NE GLEDE NA POLOŽAJ V ŠOPU	27
5.3.1	Vsebnost skupnih sladkorjev, organskih kislin in TPC	27
5.3.2	Vsebnost dihidrohalkonov antocianov, flavanolov, flavonolov in hidroksicimetnih kislin	27
6	SKLEPI	28
7	POVZETEK (SUMMARY)	30
7.1	POVZETEK	30
7.2	SUMMARY	31
8	VIRI	41
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

- Preglednica 1: Povprečna skupna vsebnost hidroksicimetnih kislin, antocianov, dihidrohalkonov, flavanolov, flavonolov in skupnih fenolov (TPC) v plodičih »king flower« in zdravo socvetje ne glede na njihov položaj. Enake črke pri rezultatih označujejo, da ni statistično značilne razlike ($p \leq 0,05$) v povprečni vsebnosti spojin med obravnavanjema. 18
- Preglednica 2: Povprečne vsebnosti skupnih sladkorjev, organskih kislin in TPC v plodičih z zdravih šopov glede na njihov položaj v šopu. Različne črke pri rezultatih označujejo statistično značilno razliko ($p \leq 0,05$) v vsebnosti za posamezni položaj. 19
- Preglednica 3: Povprečne vsebnosti skupnih flavonolov, antocianov, dihidrohalkonov, flavanolov in hidroksicimetnih kislin v plodičih z zdravih šopov glede na njihov položaj v šopu. Različne črke pri rezultatih označujejo statistično značilno razliko ($p \leq 0,05$) v vsebnosti za posamezni položaj. 20
- Preglednica 4: Povprečne vsebnosti skupnih sladkorjev, kislin in TPC v plodičih, ki so kazali značilne abscizije (AA), plodičih, ki so bili v šopu s plodiči, ki so kazali značilne abscizije (AZ) in plodičih z zdravih socvetij (ZS), ne glede na njihov položaj v šopu. Različne črke pri rezultatih označujejo statistično značilno razliko ($p \leq 0,05$) v vsebnosti za posamezni položaj. 21
- Preglednica 5: Povprečna vsebnost antocianov, flavanolov, flavonolov, hidroksicimetnih kislin in dihidrohalkonov v plodičih, ki so kazali značilne abscizije, plodičih, ki so bili v šopu s plodiči, ki so kazali značilne abscizije in plodičih z zdravih socvetij, glede na njihov položaj v šopu. Različne črke pri rezultatih označujejo statistično značilno razliko ($p \leq 0,05$) v vsebnosti za posamezni položaj. 22

KAZALO SLIK

Slika 1: Povprečna vsebnost skupnih sladkorjev (g/kg) v plodičih »king flower« in plodičih z zdravih socvetij. Različne črke nad stolpcem označujejo statistično značilno razliko ($p \leq 0,05$) v vsebnosti skupnih sladkorjev 16

Slika 2: Povprečna vsebnost skupnih kislin v plodičih »king flower« in plodičih zdravo socvetje. Enake črke nad stolpcem označujejo, da ni statistično značilne razlike ($p \leq 0,05$) v vsebnosti skupnih kislin. 17

KAZALO PRILOG

Priloga A: Povprečna temperatura, število hladnih dni (Temp min <0 °C), in padavine za prvih pet mescev leta 2013 in dolgoletno povprečje

Priloga B: Lestvica BBCH s primerjavo s Fleckingerjevo lestvico z opisi posamezne faze

Priloga C: Povprečna velikost in masa plodičev ob vzorčenju

SEZNAM OKRAJŠAV

Okrajšava	Pomen
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
TPC	skupni fenoli – total phenolic content
KF	king flower – kraljevi cvet
AA	abscizivni plodič – obravnavanje
ZS	zdravi plodič z zdravega šopa plodičev – obravnavanje
AZ	zdravi plodič, ki je bil v šopu z abscizivnimi
GAE	galna kislina
LSD	least significant difference
BBCH	mednarodno priznana skala za določanje fenološke faze

1 UVOD

1.1 VZROK ZA RAZISKAVO

Dobro je znano dejstvo, da se najboljši plodovi pri jablani razvijejo, v kolikor je redčenje opravljeno pravilno in se na vsakem socvetju razvije po le en plod. Ta plod se razvije iz cveta, ki je na cvetni osi nameščen najvišje in se imenuje kraljevi cvet ali »king flower«. Pri prekomernem ovesku, pride do naravnega odpadanja plodičev, ki se imenuje tudi junijsko trebljenje plodičev. Zakaj do tega pride, ni točno znano. Pri trebljenju plodičev sodelujejo rastlinski hormoni, domneva pa se, da imajo vlogo tudi primarni metaboliti, predvsem pomanjkanje sladkorjev. V plodičih jablane se ob vsakem stresu spremeni tudi količina sekundarnih metabolitov. Točen vpliv spremembe vsebnosti ter dinamike sladkorjev v mladih plodičih še ni znan. Z raziskavo smo poskušali ugotoviti spremembe koncentracije primarnih in sekundarnih metabolitov v plodičih, kateri so kazali znake senescence.

1.2 DELOVNA HIPOTEZA

V okviru naloge smo si postavili naslednje hipoteze:

Na pravilno zredčenih šopih plodičev, kjer je po le en plodič na šop, imajo plodiči povprečno večjo vsebnost ogljikov hidratov kot pri šopih z več plodiči. Plodiči, ki kažejo znake senescence, imajo povprečno bistveno manjšo vsebnost sladkorjev od normalno razvijajočih se plodičev. Plodiči, nameščeni nižje na cvetni osi, imajo povprečno manjšo vsebnost ogljikovih hidratov od plodičev, nameščenih višje. V plodičih, ki kažejo znake abscizije, je kot odziv na stres povečana vsebnost sekundarnih metabolitov.

1.3 NAMEN RAZISKAVE

Namen raziskave je ugotoviti razlike v vsebnosti primarnih in sekundarnih metabolitov, glede na položaj plodiča v šopu. Prav tako je cilj magistrske naloge ugotoviti, kakšna je razlika v vsebnosti primarnih in sekundarnih metabolitov v plodičih, ki kažejo znake senescence. Ker je redčenje plodov eden izmed bolj pomembnih ukrepov za zagotavljanje vsakoletnega in visoko kvalitetnega pridelka v komercialnih sadovnjakih, je pomembno, da poznamo tudi naravne vzroke in mehanizme trebljenja ter odpadanja plodičev.

2 PREGLED OBJAV

2.1 JABLANA (*MALUS DOMESTICA* Borkh.) - IZVOR IN BOTANIČNA RAZVRSTITEV

Botanično jablana spada v družino rožnic (Rosaceae), poddružino Pomoidae in rod *Malus* (Sancin, 1988). Žlahtna jablana (*Malus domestica* Borkh.) spada v poddružino Pomoidae, družina Rosaceae skupaj s hruško (*Pyrus spp.*), kutino (*Cydonia oblonga* Mill.), japonsko nešpljo (*Eriobotrya japonica* Lindl.) in nešpljo (*Mespilus germanica* L.). V poddružini Pomoidae je 18 vrst, skupna lastnost vseh pa je osnovno kromosomske število 17, ki je nenavadno in različno od preostalih pripadnikov družine Rosaceae, kjer je to 7 ali 9. Rod *Malus* sestavlja vsaj 15 izvornih vrst, še vedno pa potekajo raziskave in debate o točnem številu, ki bi lahko bilo tudi 33 (Rieger, 2006).

Divje jablane rastejo po celotni Evropi, kavkaški regiji, Mali Aziji in Kitajski. V splošni veljavi je teorija, da se je domača jablana razvila iz kompleksnih križancev več divjih vrst jablane. Botanično ime za navadno jablano je bilo v različnih virih navedeno kot *Malus pumila*, *Malus domestica* ali *Malus sylvestris*, čeprav je sedaj sprejeto ime *Malus domestica* Borkh. Jablane veljajo že dolgo za pomembno sadje zahodnih civilizacij, zelo verjetno so jo vzgajali v Grčiji že 600 let pred našim štetjem, ostanke jabolk pa so našli na arheoloških izkopavališčih količarskih naselij na območju današnje Švice in severnega dela Italije (Jackson in sod., 2011).

2.2 MORFOLOGIJA JABLANE

2.2.1 Rodni les

Sorodne sadne vrste si delijo podobne lastnosti, zato je opis rodnega lesa za jablano enak kot za hruške. Za jablano so značilne brstike, brstiči, rodne šibe, rodne pogače in zverižen rodni les (Jazbec in sod., 1995). Najbolj kakovosten rodni les so kratki poganjki, torej brstiči in brstike (Štampar, 2010). Brstike so 7 do 10 cm dolgi poganjki, brstiči pa do 3 cm dolgi poganjki, ki imajo na koncu mešani brst.

Rodne šibe so tanke 15 do 30 cm dolge veje, ki imajo na koncu mešani brst. Od lesnih mladičev, ki so nerodne mladike, se ločijo po tem, da imajo le-te na koncu lesni brst, kateri je bolj koničast. Ob straneh rodnih šib so razvrščeni vegetativni brsti. Na mestih, kjer je plod, se pogosto razvijejo rodne pogače, pri starejših drevesih pa zasledimo zverižen rodni les, ki

nastane zaradi stalnega priraščanja in razčlenjevanja rodnih pogač, brstik in brstičev (Jazbec in sod., 1995).

V primeru dobre oskrbe jablane s hranili ali pri določenih sortah je možna tudi diferenciacija stranskih brstov v rodne brste (Štampar, 2010). Brsti, ki diferencirajo v rodne, v pazduhah listov, so slabše razviti in dajejo manjše plodove (Jazbec in sod., 1995). Čas nastajanja cvetnih brstov je pri večini sadnih vrst osem do deset mesecev pred cvetenjem. Na diferenciacijo brstov vplivajo različni dejavniki kot so tla, vreme, podlaga, sorta, ovesek. Pri jablani se diferenciacija cvetnih brstov začne v začetku avgusta, lahko pa čas diferenciacije variira tudi za en mesec, odvisno od sorte in razmer (Jazbec in sod., 1995).

2.2.2 Cvet in cvetenje

Jablane imajo dvospolne cvetove, to so cvetovi, kjer so v istem cvetu tako moški kot ženski spolni organi (Jazbec in sod., 1995). Cvetenje pri jablani traja osem do deset dni in je navadno v aprilu in maju, odvisno od sorte. V obdobju razvoja plodov predstavlja cvetenje kritično fazo, saj se v obdobju cvetenja na hladnejših območjih večkrat pojavljajo nizke temperature, katere so nemalokrat vzrok za pozebe (Sancin, 1988). Venčni listi cveta jablane so bele barve imajo pa rdeče-rožnato spodnjo stran, zaradi česar poznamo stadij rdeči brst. Plodnica je epiginična, vrasla v cvetno čašo. Vsebuje pet prekatov, kateri običajno vsebujejo po dve semenski zasnovi. Cvetišče je skupek štirih do šestih cvetov pri katerem se sredinski cvet odpre prvi. Temu, sredinskemu cvetu navadno pravimo »kraljevi cvet« (king flower), ponavadi se iz njega razvije večji plod kot ostali iz ostalih cvetov.

2.2.3 Oprševanje in oplodnja

Večina sort jablan je samoneoplodnih, zaradi česar za oplodnjo potrebujejo cvetni prah drugih sort. Le manjši del jablanovih sort je samooploden. Nekatere sorte so triploidne z 51 kromosomi, druge pa diploidne s 34 kromosomi. Kaljivost peloda je v glavnem dobra pri diploidnih sortah, medtem ko je pri triploidnih sortah kaljivost peloda zelo slaba. To je tudi razlog, da se triploidne sorte ne uporablja kot oprševalne sorte. Za uspešno oplodnjo je zato potrebno paziti pri izboru sort in imeti v nasadu najmanj dve sorte ki sta diploidni, prav tako je potrebno biti pozoren na čas cvetenja posamezne sorte, saj mora bit za dobro oplodnjo glavne sorte cvetenje sočasno. Na oplodnjo vplivajo tudi vremenski dejavniki. Hladno in deževno vreme ni ugodno za oprševalce in s tem oplodnjo. Tako nizke kot tudi

visoke temperature ovirajo dobro oprševanje in oplodnjo. Optimalna temperatura za oplodnjo jablan je 18 °C do 21 °C.

Običajen odstotek oplojenih cvetov je do 30, odvisno od razmer v času cvetenja. Za normalno rodnost jablane je dovolj da se oplodijo že samo 3 do 8 cvetov od stotih. V kolikor oplodnja presega 10 odstotkov je ukrep redčenja plodičev nujen, saj se v nasprotnem primeru drevo preveč izčrpa (Sancin, 1988). Kadar drevesa tvorijo strnjeno vrsto, se čebele raje pomikajo po vrsti, kot med vrstami, zato je za dobro opršitev bolje, če so oprševalne sorte pomešane z glavno sorto. Da pa se izognemo problemu ločevanja sadežev med obiranjem, se za oprševalne namene sadi vrste z malimi sadeži, na primer *Malus floribunda* Siebold (Westwood, 1993).

2.2.4 Plodovi

Jabolko in njemu sorodne sadne vrste spadajo v posebno vrsto plodov, katero poznamo pod angleško nadpomenko »pome«. Večino mesnatega plodu jablane predstavlja omeseno cvetišče in ne plodnica. Jabolko prištevamo k birnim plodom, saj je sestavljeno iz petih plodnih listov (karpelov), v katerih sta običajno po dve semenici. Semena so relativno majhna, črna in rahlo strupena (Rieger, 2006). Plod jablane vsebuje okoli 84 % vode in 15 % ogljikovih hidratov, od katerih je največ sadnega sladkorja. Jabolka vsebujejo tudi pektin, zaradi česar uživanje jabolk ugodno vpliva na prebavila. V jabolkih so dobro zastopane tudi mineralne snovi, ki nevtralizirajo kisline, katere se v človeškem telesu tvorijo pri presnovi. Več vitamina C in drugih spojin vsebujejo jabolka, ki rastejo na bolje osvetljenih delih krošnje. Pomemben vpliv na obarvanost plodov ima lepo vreme v jesenskih dneh, čim večje so razlike med dnevнимi in nočnimi temperaturami, hitreje in lepše se plodovi obarvajo (Sancin, 1988).

2.2.5 Rast in razvoj plodov

Rast plodov skozi celotno sezono je rezultat celične delitve pred in po cvetenju, rasti celič po cvetenju ali obojega. Pomembnost teh dejavnikov je odvisna od sadne vrste. Običajno, se v prvih nekaj tednih povečuje število celič, v drugi fazah pa se zgodi rast celič, pri jablani traja faza delitev celič prve 3 do 4 tedne, za to fazo nastopi faza volumenske ali ekspanzijске rasti celič.

Na rast in razvoj plodu pri jablani vpliva tudi oplodnja, v kolikor med cvetenjem ni prišlo do oplodnje, takšen plodič odpade kmalu po cvetenju. Na rast in razvoj pa tudi vpliva,

koliko od 4 do 6 semen je v plodiču, v kolikor je razporeditev semen v plodu neenakomerna, pogosto pride do neenake rasti plodov z močno izraženo rastjo, kjer so semena prisotna, oziroma s pomanjkanjem rasti tam, kjer semen ni. To kaže na tesno povezavo rasti plodov s prisotnostjo hormonov (Jackson in sod., 2011).

2.2.6 Peščišče in pečke

Peščišče je notranji del plodu, omejujejo ga prevodni snopiči. Prevodni snopiči potekajo v smeri od peclja do mesta v podčašični jamicici, od kjer izraščajo ostanki prašnikov. Oblika peščišča je sortno značilna in je kot taka dobro znamenje za določanje sort. Peščišče je različnih oblik, lahko je odprto, zaprto ali polodprtlo, prav tako je po izgledu lahko elipsaste, ploščate, čebulaste ali srčaste oblike in različno veliko (Hartman, 2003).

2.3 POMEMBNE ORGANSKE SPOJINE V JABLANI

2.3.1 Primarni metaboliti

Rastline sintetizirajo velik nabor različnih organskih spojin, katere običajno imenujemo primarni in sekundarni metaboliti, čeprav je včasih meja med njimi zelo nejasna. Obstaja več definicij teh dveh tipov metabolitov, večina pa označuje primarne metabolite, kot spojine, katere imajo esencialne vloge povezane s fotosintezo, dihanjem in razvojem ter rastjo (v to skupino vključujemo preproste sladkorje, maščobe, nukleotide, aminokisline, organske kisline itd.). Za razliko od primarnih, sekundarni metaboliti nimajo direktnega vpliva na rast in razvoj celic, omogočajo pa rastlini preživeti v okolju (Veberič, 2010).

2.3.2 Ogljikovi hidrati

Kot produkt fotosinteze se v citosolu fotosintetskih celic sintetizirata tudi glukoza in fruktoza. Glukoza in fruktoza se ne moreta premeščati po floemu, služita kot vmesna člena pri sintezi saharoze. V nekaterih rastlinah se kopičijo znatne količine fruktanov. Fruktani so polimeri sestavljeni iz molekule saharoze in molekul fruktoze, največja velikost fruktanske molekule je 250 posameznih molekul heksoze (Scott, 2008).

Saharoza je topen disaharid, kateri je proizveden v citosolu fotosintetskih celic v listu. Pri večini rastlin se ogljikovi hidrati premeščajo po rastlini v obliki saharoze. Škrob je netopen ogljikov hidrat, kateri je proizveden v kloroplastih. V mladih plodovih jablane se kopči v

levkoplastih, z rastjo in zorenjem plodov pa se pretvori v sladkorje. V svežih plodovih jabolk 10 % teže predstavljajo sladkorji in 4 % škrob (Jackson in sod., 2011).

Z uporabo HPLC in GC-MS analize plodov jablane sorte 'Honeycrisp' je bila ugotovljena prisotnost 12 različnih ogljikovih hidratov. Ob analizi celotnih plodov, vsebnost primarnih metabolitov, tudi ogljikovih hidratov, narašča z razvojem ploda. V mesu ploda sorte 'Honeycrisp' so glavni predstavniki ogljikovih hidratov sladkorji fruktoza, saharoza in sorbitol, ki pa je slatkorni alkohol (Zhang in sod., 2009).

2.3.3 Organske kisline

Organske kisline so izrednega pomena za rastline. So pomembni vmesni člen metaboličnih procesov, te kisline so direktno povezane z rastjo, razvojem in senescenco. Sadni sokovi imajo nizek pH, ker vsebujejo velike količine sadnih kislin. Skupna vsebnost organskih kislin je zelo različna med posameznimi vrstami, od 0,2 % v hruškah do 0,8 % v limeti. Pomembno vlogo v sadju imajo organske kisline tudi z organoleptičnih vidikov, saj so ravno organske kisline tiste, ki dajo sadju in proizvodom iz sadja kiselkast in osvežilen okus (Gallander, 1985).

V sadju se organske kisline nahajajo v celični tekočini, kjer so vezane v obliki estrov, glikozidov ali soli. V sadju je največ citronske in jabolčne kisline, odvisno od vrste sadja pa so prisotne tudi vinske, izocitronske kisline (Gvozdenović, 1989). Glavne organske kisline, katere se nahajajo v sadju so vinska, jabolčna, askorbinska in citronska (Scherer, 2012).

2.3.4 Fenoli

Fenoli tvorijo drugo največjo skupino rastlinskih sekundarnih metabolitov, kateri služijo obrambi. Prepoznanih je že več kot 10000 rastlinskih fenolnih spojin. Večina fenolov nastane po sintezi poti šikimske kisline. Živali te sinteze poti nimajo, zaradi česar so nezmožne sintetizirati aromatske aminokisline kot so fenilalanin, tirozin in triptofan. Skupina fenolnih spojin imenovani antociani, so za rastline pomembni kot barvila, pomembno vlogo imajo fenolne spojine tudi pri sintezi lignina (Scott, 2008). Fenolne spojine so prisotne v velikih koncentracijah v epidermu listov in kožici plodov in imajo raznovrstne in pomembne vloge kot sekundarni metaboliti. Fenolne spojine prispevajo k vsem vidikom rastlinskih odzivov na zunanje dražljaje, tako biotske kot abiotske. Niso le

indikator stresa, ampak so tudi eden izmed mediatorjev rastlinske odpornosti na bolezni in škodljivce (Veberič, 2010).

2.4 HORMONI IN REDČENJE

2.4.1 Redčenje – trebljenje

Večina sadnih vrst proizvede veliko število cvetov, iz katerih se tudi po slabih oplodnjih razvije veliko število plodov, ponavadi preveliko, da bi se lahko razvili ustrezne kakovosti. Verjetno so ravno zaradi tega, številne sadne vrste razvile mehanizme trebljenja, s katerimi odvržejo odvečne plodove v različnih časovnih terminih (Bangerth, 2000). Količina plodov, ki ostanejo na posamezno drevo je močno povezano s samim vigorjem posamezne sorte (Iwanami, 2012). Naravno trebljenje pri jablani je pogost pojav, ki pa ima različne vzroke in se zato izraža ob določenih obdobjih, najpogosteje izraženo in pomembno trebljenje pri jablani pa je tako imenovano junijsko trebljenje. Trebljenje po cvetenju je povezano z začetkom rasti embrijev v semenih. Ker je razvoj embrijev brez oplodnje nemogoč, je to trebljenje le zakasnel odziv na nezadostno oplodnjo. Kadar pa je ovesek velik, pride do izredne konkurence med plodiči za primarne metabolite. To privede do situacije, kjer ostanejo le najbolje razviti plodiči. Junijsko trebljenje se do nekolikšne mere da omiliti z zagotavljanjem optimalnih razmer za oprasitev, teoretično tudi z aplikacijo hormonov, ki pa ni vedno komercialno sprejemljiva možnost (Jackson in sod., 2011).

2.4.2 Izmenična rodnost

Kadar pridelek niha med posameznimi leti, to imenujemo alternativna ali izmenična rodnost. Vzroki za ta pojav v intenzivnih, dobro oskrbovanih nasadih, še pogosteje pa v vrtovih so različni, spomladanske pozebe cvetov, bujna rast, prevelik ovesek, poškodbe listne površine in podobno. Velik problem predstavlja dejstvo, da je drevesa, ko »zanihajo« (eno leto močno rodijo, drugo leto pridelek pa izostane) težko spraviti nazaj v normalen ritem rodnosti. Pojav je prisoten v vseh nasadih, lahko tudi znotraj dreves (na posameznih rodnih nosilcih) do določenega odstotka. Posebej močno izražena izmenična rodnost je pri jablanah in hruškah, nekoliko manj pri koščičarjih, medtem, ko pri jagodičju izmenične rodnosti skoraj ni zaznati (Štampar in sod., 2005).

Določene sorte jablan, kot so naprimjer 'Elstar', 'Zlati delišes' (Grigorian, 2003), 'Fuji' in 'Honeycrisp' so bolj podvržene izmenični rodnosti, medtem ko nekatere sorte skoraj ne kažejo znakov izmenične rodnosti, kot je na primer kakor 'James Grieve' (Jackson in sod.,

2011). Izkušnje kažejo, da lahko izmenična rodnost nastopi že po prvem obiranju, torej v zelo mladem nasadu, ki še ni v polni rodnosti (Črnko in sod., 1995).

2.4.3 Načini redčenja

Poznamo več načinov redčenja plodov, ročno, mehansko in kemično. Nekoč se je plodove redčilo glede na razdaljo med njimi, danes vemo, da je bolj učinkovito redčenje po velikosti. Redčenje po velikosti, je selektivno odstranjevanje majhnih, slabih plodov ne glede na razdaljo med njimi, vendar ob upoštevanju količine redčenja. Mehansko redčenje je možno opraviti na različne načine. Med ali tik po cvetenju, lahko izkušen delavec s curkom vode učinkovito razredči plodiče. Drugi način je uporaba mehanske metlice s katero »ometemo« odvečne plodiče. Tretji način je uporaba vibracijske naprave, s katero stresemo celotno drevo, slednja metoda zahteva največ veščin, saj obstaja velika nevarnost premočnega redčenja. Slabost zadnje metode je tudi ta, da selektivno redči debelejše plodove, saj imajo zaradi večje mase večji moment ob stresanju kot manjši plodovi, poleg tega pa odstrani več plodov z bolj trdnih delov krošnje in je takšno redčenje neenakomerno (Westwood, 1993).

Redčenje plodov je pomembno tudi z vidika kakovosti plodov, Sladič (2010) je ob testiranju vpliva različnih kemičnih pripravkov za redčenje plodičev na kakovost plodov opazil statistično značilno povečano vsebnost sladkorjev v plodovih sorte 'Jonagold', v primerjavi s kontrolo. Ni pa zaznal vpliva na vsebnost skupnih kislin. Dodatno je tudi opazil, da je pripravek Maxcel pozitivno vplival na vsebnost skupnih fenolov v kožici in mesu, prav tako je pozitivno vplival na rodnost in skupno količino plodov 1. kakovostnega razreda. Podobne pozitivne vplive na vsebnost sladkorjev in rodnost jablan je opazil pri sorti 'Zlati delišes' (Jackson in sod., 2011).

2.4.4 Kemično redčenje

Začetki raziskav na področju kemičnega redčenja plodov segajo v 40. leta 20. stoletja, ko so zaradi slabih razmer na trgu pridelovalci iskali načine, kako enostavno odstraniti plodove z dreves, saj tako dreves ni bilo potrebno varovati pred škodljivci. Prvi učinkovit pripravek je bil katransko olje, katero je odstranilo cvetove v fazi zelenih popkov. V letu 1939 je obetajoče rezultate kazal dinitro-o-cikloheksifenol. Istočasno so odkrili, da natrijev dinitro-o-kresilat (DNOC) prepreči opašitev, če je apliciran na stigme cvetov. Prav tako so leta 1939 α -naftil ocetna kislina kislina (NAA) in α -naftil acet amid (NAAm) testirali med cvetenjem na jablani, z namenom povečanja oveska. Učinek je bil nasproten, obe spojini

sta povzročili odpadanje cvetov in plodičev. Ob tem naključnem odkritju je bilo ugotovljeno, da sta NAA pri koncentraciji 10-15 ppm in NAA pri koncentraciji 30-50 ppm učinkoviti spojini za redčenje in da ob uporabi 15 do 25 dni po cvetenju ne povzročata poškodb na zeleni masi. Druga sredstva za redčenje po cvetenju so bila preizkušena še v 70. letih 20. stoletja, 6-metil-2,3-kinoksalin ditiol ciklični karbonat (Morestan), in 2-kloro-ethyl fosfonska kislina (etefon). Oba sta učinkovita na jablanah.

Različne spojine imajo različen način delovanja. DNOC direktno ubije cvetni prah in pestiče. NAA, NAAm, NPA in 3-CPA pa vplivajo na ravnovesje avksinov v sistemu, točni biokemični procesi pa niso znani. V nekaterih primerih je razvoj embria ustavljen, zaradi česar kasneje odpadejo plodiči. Razvoj endosperma med citokinezo je občutljiv na NAA. Učinek etefona je sproščanje etilena v tkiva, ki povzročijo abscizijo v obdobju po cvetenju (Westwood, 1993). Uporaba kemičnih sredstev ne vpliva na dinamiko odpadanja plodov ampak zgolj poveča hitrost odpadanja plodov (Botton in sod, 2011).

Prednosti kemičnega redčenja, pred ročnim ali mehanskim, so velike. Manjši stroški redčenja, boljša kakovost in velikost plodov in bolše cvetenje v prihodnjem letu pri sortah, ki so nagnjene k izmenični rodnosti. Možna tveganja so nevarnost pozebe ob zgodnji aplikaciji sredstev za redčenje, premočno redčenje, poškodbe na listi masi in različni učinki ob uporabi na drevesih različne starosti in vigorja (Westwood, 1993). Dobro je dokumentirano dejstvo, da so plodiči z manjšim številom semenskih zasnov bolj podvrženi absciziji, velja tudi, da so plodiči najbolj ranljivi za kemična sredstva za redčenje, ko so veliki 7 do 12 mm (Greene, 2006).

2.5 ABSCIZIJA PLODIČEV

Abscizija je izraz, ki opisuje proces naravne ločitve rastlinskega organa od rastline. Vzrok za abscizijo je lahko del programiranega razvoja rastline, ali pa odziv na stres. Abscizija je vrhunec sprememb v izražanju genov, rezultat česar je rahljanje celičnih sten v določenem območju in na koncu ločitev organa od rastline (Taylor in Whitelaw, 2001). Abscizija plodičev jablane (*Malus domestica* Borkh.) se začne s stimulacijo proizvidnje etilena in pridobljeno občutljivost nanj. Model, s katerim se trenutno razлага abscizijo pravi, da se avksin, katerega proizvaja navezani organ premešča navzdol po peclju skozi abscizijsko cono in s tem zavira njen aktivacijo z zmanjševanjem občutljivosti abscizijске cone na etilen. Abscizija pa se začne s senescenco s katero je povezana povečana proizvodnja etilena, ki pospešuje razgradnjo avksina. Zaradi zmanjšanega premeščanja avksina skozi abscizijsko cono, se poveča občutljivost abscizijске cone na etilen, hkrati se poveča tudi

aktivnost hidrolitičnih encimov kar privede to ločitve celic in s tem odpada organa (Dal Cin in sod., 2009).

Trenutno obstajata dve hipotezi za razlago abscizije plodičev. Ena predvideva, da pride do abscizije zaradi nezadostne preskrbe plodičev z asimilati, bodisi zaradi omejene produkcije, ali razporeditve plodičev. Druga teorija predvideva hormonalni mehanizem, s katerim rastlina obvaruje izbrane plodove pred pomanjkanjem asimilatov kasneje v sezoni (Bangerth, 2000).

Bangerth (2000) navaja, da trenutno sprejeti model za abscizijo rastlinskih organov, ne more biti uporabljen za plodiče. Pravi, da je abscizija plodičev bistveno bolj zapleten proces, ki ga ni možno razložiti s splošno sprejetim senescenčnim modelom. V svoji raziskavi navaja, da je pri absciziji plodičev v šopu najbolj pomembna dominanca »king flower« plodiča in polarni transport avksina iz plodiča. Ta polarni transport avksina, ki zavira razvoj občutljivosti absciziskske cone na peclju plodiča istočasno v socvetju zavira polarni transport avksina skozi peclje drugih plodičev, zaradi česar se pogosteje razvije občutljivost absciziskske cone na etilen pri ostalih plodičih. Pri jablani je dominanca in z njo povezana abscizija ostalih plodičev izredno opazna z »king flower« plodičem in ostalimi. V primeru, da se »king flower« plodič odstrani, bistveno manj ostalih plodičev abscizira, saj med njimi ni tako izrazite dominance.

Guardiola (1997) ugotavlja, da ima ključno vlogo na redčenje plodičev pri citrusih število cvetov v prvi fazi. Namreč, ob velikem številu cvetov pride že zgodaj do močne konkurence za minerale, zato je del plodnic slabše razvit in posledično so ti plodiči bolj nagnjeni k odpadanju, kljub temu je abscizija bolj regulirana z notranjimi dejavniki. Do močne konkurence med plodiči pride v trenutku, ko plodiči iz rastočih ponorov postanejo akumulacijski ponori, ta trenutek pa tudisov pada z abscizijo plodičev in trenutkom, ko je v listih na vejah minimalna vsebnost ogljikovih hidratov, ter določenih mineralnih snovi v listih okoli cvetišč. Tako neposredni podatki kažejo na to, da je primanjkljaj ogljikovih hidratov lahko vzrok za odpad določenega dela plodičev v dobro negovanih sadovnjakih in da bi bilo možno zvečati pridelek s pravilno preskrbo z ogljikovimi hidrati. Povezava med ogljikovimi hidrati in abscizijo prihaja iz povečane senzibilnosti absciziskske cone na etilen pri zmanjšanih koncentracijah ogljikovih hidratov. Mehouachi (1995) je s poskusi defoliacije na citrusih prav tako opazil, da je junijsko trebljenje bolj izrazito pri drevesih, kjer je bil del listne mase odstranjen.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 POSKUSNI NASAD

Poskus je bil izveden na Laboratorijskem polju Biotehniške fakultete, Oddelka za agronomijo. Nasad je bil zasajen leta 2001. Drevesa rastejo na podlagi M9 in niso namakana (Klinar, 2010). Sadovnjak se uporablja za namen raziskovalnega dela. Gre za klasično komercialno zasaditev jablan z razdaljami 3,5 m med vrstami in 1m v vrstah. Nasad ima stalno 2,5 m visoko oporo brez protitočne mreže, medvrstni prostor je zatravljen in redno košen. Nasad je vključen v integrirano pridelavo. S sorte 'Zlati delišes' sta zasajeni le dve vrsti, ki sta dolgi 90 m in potekata v smeri sever - jug. Nasad se nahaja na 298 m nadmorske višine. Gojitvena oblika je sončna os (solaxe).

3.1.1 'Zlati delišes'

Sorta 'Zlati delišes' (v originalu 'Golden Delicious') je naključni sejanec, katerega je odkril Anderson H. Mullins okrog leta 1890 v ameriški zvezni državi West Virginia. Sejanec je odkupil drevesničar Paul Stark, sorto poimenoval 'Golden Delicious' ter jo leta 1916 uvedel v pridelavo. 'Zlati delišes' je ena najbolj razširjenih sort v svetu in spada med glavne sorte slovenskega sadnega izbora. Sorta je diploidna (Viršček Marn in Stopar, 1998). Splošne lastnosti te sorte so, da imajo plodovi dolge peclje in so tako odporni na močnejši veter in ne odpadajo z dreves. S plodovi je potrebno ravnati nežno, saj so občutljivi na otiske. Sorta je zelo občutljiva za škrlup in zahteva rodovitna in ne prevlažna tla. Močno razširjena je tudi v območjih, ki zanjo niso najbolj primerena, zaradi česar postanejo plodovi, pridelani v takšnih območjih, rjasti in slabše kakovosti. To je razlog, da so žlahtnitelji v preteklih letih vzgojili veliko število različkov z boljšimi lastnostmi od izhodiščne sorte (Sancin, 1988).

3.1.2 Podlaga M9

Podlaga M9 je trenutno najpomembnejša jablanova podlaga, prištevamo jo med šibko rastoče vegetativno množene podlage. Ker drevo razvije nekoliko večjo krošnjo kot na podlagi M27, potrebuje skozi celotno obdobje uspevanja drevesa oporo. Glavne značilnosti te podlage so, da pri intenzivni oskrbi drevesa hitro zarodijo in skozi celotno rodno dobo redno rodijo ob visoki kakovosti plodov. Z večino jablanovih sort je podlaga skladna, čeprav se na mestu cepljenja v nekaterih primerih razvije večja ali manjša zadebelitev. Podlaga je precej odporna proti gnilobi koreninskega vrata, nekoliko bolj pa je občutljiva

na škrlup, jablanovo plesen in krvavo uš. Slabo prenaša nizke zimske temperature in je občutljiva za presušna ali prevlažna tla (Sancin, 1988).

3.1.3 Vremenske razmere v pomladanskih mesecih leta 2013

Vremenske razmere v prvih 5 mesecih leta 2013 so bistveno odstopale od povprečja. Skupno je padlo kar 292,4 mm več padavin kakor povprečno in je bilo za 99,5 ur manj sončnega obsevanja. Povprečna temperatura in število hladnih dni (temp. min $<0^{\circ}\text{C}$) nista bistveno odstopala, povprečna temperatura je bila za $3,8^{\circ}\text{C}$ večja in bilo je 5,6 manj hladnih dni v povprečju. Kljub temu, pa je bilo kar 15,9 več dni s snežno odejo (Agencija republike Slovenije za okolje, 2013) (Priloga A).

3.1.4 Fenološke razmere v pomladanskih mesecih leta 2013

Razmere za rast in razvoj sadnih rastlin so bile ugodne, saj je bil prehod iz hladnih zimskih dni v toplejše pomladanske dokaj oster in tako ni bilo nevarnosti pozeb, ki so sicer precej pogost pojav v centralnem delu Slovenije. Na osnovi fenoloških podatkov vidimo, da je vegetacijsko obdobje v začetku kasnilo, kasneje pa se je uskladilo z dolgoletnim povprečje (Agencija republike Slovenije za okolje, 2013). Jablane (*Malus domestica* Borkh.) v poskusnem nasadu so bile 25.4.2013 v fazi rdečih brstov (BBCH 57), 29.4.2013 je nastopil začetek cvetenja (BBCH 60 – 61). 3.5.2013 je bilo polno cvetenje (BBCH 65) in 9.5.2013 je bilo konec cvetenja (BBCH 69) (Priloga B).

3.2 VZORČNI MATERIAL

Vzorčni material smo nabrali 30.5.2013, takrat, ko so se začeli kazati prvi znaki abscizije pri plodičih jablane. Imeli smo 4 skupine vzorcev. 1. skupino so predstavljali vzorci poimenovani »KF« – »King flower«, plodiči iz te skupine so plodiči, katere smo predhodno označili, veje na katerih so se nahajali, smo istočasno z označevanjem zredčili tako, da so na vejah ostali zgolj po en plodič na šop plodičev, to je »king flower« plodič. 2. skupino vzorcev so predstavljali plodiči nabrani na zdravih šopih plodičev, to so bili šopi plodičev, kjer na dan vzorčenja ni bilo prisotnih abscizivnih plodičev in je bilo v šopu po vsaj 6 plodičev. Skupino smo poimenovali »ZS« - »zdrava socvetja«. 3. skupino vzorcev so sestavljeni plodiči, ki so na dan vzorčenja kazali znake abscizije, poimenovali smo jih »AA« – »abscizivni plodiči«. Zadnjo 4. skupino vzorcev so predstavljali plodiči, ki so se nahajali na istem šopu kot abscizivni plodiči, le da so bili zdravi oziroma niso kazali znakov abscizije. Te smo poimenovali »AZ« - »abscizivni zdravi«.

Ob razvrščanju vzorcev smo podrobno pregledali vsak šop plodičev in določili položaj posameznega plodiča v šopu in ga ustrezno razvrstili. Položaj 1 pomeni, da je plodič zasedal najvišje mesto v socvetju, položaj 6 pa najnižje.

Za potrebe obravnavanja KF, smo v sadovnjaku na izbranih drevesih izvedli redčenje na posameznih vejah. To smo storili kmalu po cvetenju tako, da smo celotno vejo, na kateri se je nahajal šop plodičev z ustreznimi pogoji zredčili ročno, da so ostali le »king flower« plodovi. Izbor šopov in redčenje smo opravili 9.5.2013.

Da bi preprečili vpliv različnih tipov rodnega lesa, smo poskušali vzorčiti šope plodičev s karseda enakimi razmerami. To so bili šopi plodičev, ki so izraščala na terminalnem brstu kratkega rodnega lesa 5-15cm, kateri izrašča iz 2 letnega lesa.

3.3 METODE DELA

Analize vsebnosti fenolnih snovi, sladkorjev in organskih kislin so bile narejene na Katedri za sadjarstvo, vinogradništvo in vrtnarstvo Biotehniške fakultete. Pri vsakem vzorcu smo imeli 4 ponovitve.

Za analizo vzorcev smo uporabili splošno razširjeno metodo HPLC, analiza s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti.

3.3.1 Priprava vzorcev

Pred pripravo vzorcev smo vzorčni material pregledali in razvrstili. Že med nabiranjem vzorčnih šopov smo jih sortirali glede na njihov status, to je, šope plodičev, kjer so bili prisotni abscizivni plodiči posebej, zdrave šope plodičev posebej in predredčene šope plodičev »king flower« posebej. Zatem, smo v laboratoriju določili položaj vsakega plodiča v šopu, izmerili njegov premer, maso, in ga prerezali na pol. Nato smo plodiče razvrstili po skupinah v papirnate vreče in jih zamrznili (Priloga C).

3.3.2 Ekstrakcija sladkorjev in organskih kislin

Za ekstrakcijo sladkorjev in organskih kislin smo vzorce sesekljali z nožem, nato zatehtali 1 g vzorca plodičev, ga prelili s 3 ml bidestilirane vode in pustili na stresalniku 1 uro, da so sladkorji in organske kisline ekstrahirali v raztopino. Nato smo vzorce centrifugirali 10

minut pri 10000 obratih/min (Eppendorf Centrifuge 5810, Hamburg, Nemčija). Supernatant smo prefiltrirali skozi 0,45 µm celulozni filter v 2 ml viale, katere smo shranili na -20 °C do nadalnjih analiz HPLC sistema Thermo Finnigan Surveyor s kvartetno črpalko.

3.3.3 Ekstrakcija posameznih in skupnih fenolov

Za ekstrakcijo skupnih in posameznih fenolov smo vzorce z nožem drobno sesekljali zatehtali 1,5 g vzorca plodičev in ga prelili z 8 ml metanola s 3 % mravljinčne kisline. Vzorce smo dali v ohlajeno (0 °C) ultrazvočno kopel za 1 uro. Nato smo jih centrifugirali 10 minut pri 10000 obratih/min (Eppendorf Centrifuge 5810, Hamburg, Nemčija). Supernatant smo prefiltrirali skozi 0,45 µm poliamidni filter v 2 ml viale, katere smo shranili na -20 °C do nadalnjih analiz HPLC sistema Thermo Finnigan Surveyor s kvartetno črpalko.

Izbira vzorcev je potekala naključno za vse skupine vzorcev, razen za skupino »king flower«, saj je bila ta skupina vzorcev pripravljena vnaprej in označena v nasadu z rdečim trakom. Ostale vzorce smo nabrali na dan vzorčenja 30.5.2013, skladno s pravili za homogenost vzorčnega materiala, opisanimi v poglavju 3.2 vzorčni material.

3.3.4 HPLC analiza

HPLC – High Pressure Liquid Chromatography se veliko uporablja za analize posameznih spojin v različnih snoveh. Analiza nam postreže s podatki o sestavi posameznega vzorca. Podatki, katere se dobi s tako analizo, so tako kvalitativne kot kvantitativne narave (McPolin, 2009). HPLC je v principu le izboljšana kolonska kromatografija. Namesto, da mobilna faza le kaplja skozi kolono gravitacijsko, je potisnjena skozi njo pod velikim tlakom, do 400 atm. To zelo pospeši postopek. Druga pomembna izboljšava so metode detekcije, katere je možno uporabiti. Te metode so visoko avtomatizirane in zelo občutljive (Clark, 2007).

3.3.5 Analiza skupnih fenolov (TPC)

Z uporabo Folin-Ciocalteu-ovega reagenta smo ocenili vsebnost skupnih fenolov. 100 µl vzorca smo dodali 500 µl Folin-Ciocalteu-ovega 20 % natrijevega karbonata in 1,9 ml bidestilirane vode ter 6 ml bidestilirane vode. Vzorce smo zmešali in pustili pri 40 °C 30 minut. Za tem smo izmerili absorbanco posameznega vzorca s pomočjo spektrofotometra (Perkin-Elmer, UV/visible Lambda Bio 20) pri valovni dolžini 765 nm. Kot slepi vzorec

smo uporabili prej omenjeno mešanico reagentov in bidestilirane vode. Absorbacija posameznega vzorca je bila izmerjena s tremi ponovitvami. Vsebnost skupnih fenolov je izražena v mg GAE/kg (miligrami galne kisline na kilogram sveže mase).

3.3.6 Statistična obdelava podatkov

Podatke, pridobljene z analizo vzorcev s HPLC, smo statistično obdelali s pomočjo programa MS Excela 2010 in Statgraphic Plus for Windows. Z metodo analize variance (ANOVA) smo ugotavljali statistično značilne razlike. Če so med obravnavanji obstajale statistično značilne razlike, smo preizkusili še z testom mnogoterih primerjav (LSD ali Duncan test) pri tveganju $p \leq 0,05$. Statistično značilne razlike so označene s črkami. Kjer se povprečja obravnavanj statistično značilno razlikujejo, so črke različne, kjer pa se rezultati statistično značilno ne razlikujejo, so črke enake.

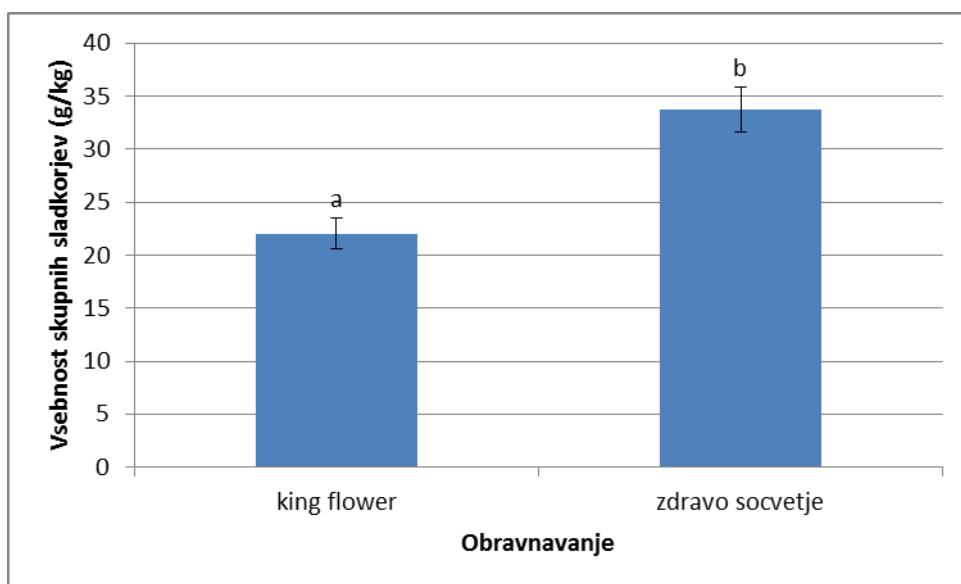
4 REZULTATI

4.1 PRIMERJAVA VSEBNOSTI PRIMARNIH IN SEKUNDARNIH METABOLITOV ZDRAVIH PLODIČEV S PLODIČI IZ REDČENIH ŠOPOV

S primerjavo plodičev z zdravih socvetij pri katerih ni bilo znakov začetka abscizije (ZS) s plodiči iz redčenih šopov, to je šopov, kjer smo predhodno odstranili vse plodiče razen plodiča, ki se nahaja najvišje na cvetni osi, to je »king flower« (KF) plodič, smo žeeli ugotoviti ali redčenje kakorkoli vpliva na vsebnost primarnih in sekundarnih metabolitov. Primerjali smo vsebnost skupnih sladkorjev, skupnih organskih kislin, TPC izražen v mg GAE/kg, hidroksicimetnih kislin, antocianov, flavanolov, flavonolov in dihidrohalkonov.

4.1.1 Skupni sladkorji

Vsebnost skupnih sladkorjev je statistično značilno različna med obravnavanjema »king flower« in »zdravo socvetje«, saj je povprečna vsebnost skupnih sladkorjev večja v plodičih z zdravih socvetij (slika 1).

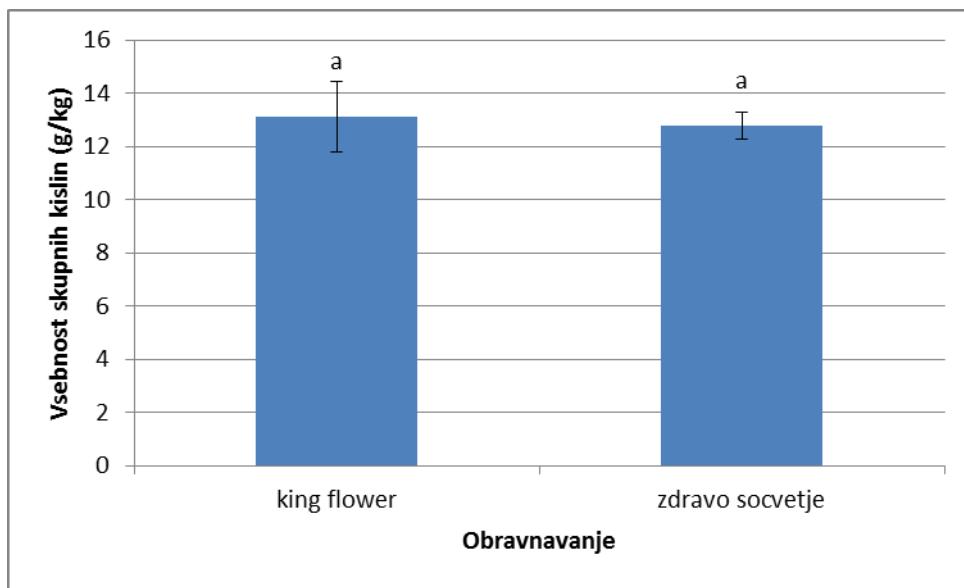


Slika 1: Povprečna vsebnost skupnih sladkorjev (g/kg) v plodičih »king flower« in plodičih z »zdravih socvetij«. Različne črke nad stolpcem označujejo statistično značilno razliko ($p \leq 0,05$) v vsebnosti skupnih sladkorjev.

Figure 1: Average total sugar content (g/kg) in »king flower« and »healthy fruit« bunch fruitlets. Different letter above columns indicate significant differences ($p \leq 0,05$) in the total sugar content between samples.

4.1.2 Skupne kisline

Vsebnost skupnih kislin ni statistično značilno različna pri obravnavanjih »king flower« in »zdravo socvetje«. Povprečna vsebnost skupnih kislin je za obe obravnavanji okoli 13 g/kg (slika 2).



Slika 2: Povprečna vsebnost skupnih kislin v plodičih »king flower« in plodičih zdravo socvetje. Enake črke nad stolpcji označujejo, da ni statistično značilne razlike ($p \leq 0,05$) v vsebnosti skupnih kislin.

Figure 2: Average total acids content (g/kg) in »king flower« and healthy fruit bunch fruitlets. Different letter above columns indicate significant differences ($p \leq 0,05$) in the total acids content between samples.

4.1.3 Vsebnost hidroksicimetnih kislin, antocianov, dihidrohalkonov, flavanolov, flavonolov in TPC

Vsebnost hidroksicimetnih kislin, antocianov, dihidrohalkonov, flavanolov, flavonolov in TPC ni statistično značilno različna med obravnavanjema. Od vseh naštetih sekundarnih metabolitov je edino vrednost hidroksicimetnih kislin nekoliko večja v plodičih »king flower«, vseh ostalih snovi je bilo prisotnih več v plodičih »zdravih socvetij«. Rezultati nam povedo, da redčenje plodičev ne poveča vsebnosti teh sekundarnih metabolitov v plodičih (preglednica 1).

Preglednica 1: Povprečna skupna vsebnost hidroksicimetnih kislin, antocianov, dihidrohalkonov, flavanolov, flavonolov in skupnih fenolov (TPC) v plodičih »king flower« in »zdravo socvetje« ne glede na njihov položaj. Enake črke pri rezulatih označujejo, da ni statistično značilne razlike ($p \leq 0,05$) v povprečni vsebnosti spojin med obravnavanjema.

Table 1: Average total content of hydroxycinnamic acids, antocyanins, dihydrochalcones, flavanols, flavonols and TPC in »king flower« and “healthy inflorescence” fruitlets with no regard to their position in the inflorescence. Same letters at results indicate there is no statistical significant differences ($p \leq 0,05$) in the content of listed metabolites.

	TPC mg GAE/kg	Hidroksicimetne kisline mg/100g	Antociani mg/100g	Dihidrohalkoni mg/100g	Flavanoli mg/100g	Flavonoli mg/100g
King flower	6217,1±393,1 a	153,24±3,10 a	1,11±0,35 a	117,42±1,54 a	306,59±16,04 a	74,98±7,12 a
Zdravo socvetje	6985,5±683,8 a	151,82±6,58 a	2,01±0,42 a	121,71±14,82 a	325,80±28,53 a	96,30±9,55 a

4.2 PRIMERJAVA VSEBNOSTI PRIMARNIH IN SEKUNDARNIH METABOLITOV V ZDRAVIH PLODIČIH MED RAZLIČNIMI POLOŽAJI V ŠOPU

Primerjali smo vsebnost skupnih sladkorjev, organskih kislin, TPC, hidroksicimetnih kislin, antocianov, flavanolov, flavonolov in dihidrohalkonov v zdravih plodičih glede na položaj, katerega so zasedali v šopu. Namenski primerjave je ugotoviti, kako položaj v šopu vpliva na preskrbljenost posameznega plodiča z asimilati.

4.2.1 Vsebnost skupnih sladkorjev, organskih kislin in TPC

Položaj plodiča v šopu bistveno ne vpliva na vsebnost skupnih sladkorjev, organskih kislin in skupnih fenolov (TPC). Le plodič na prvem položaju (king flower) ima statistično značilno različno, in s tem tudi največjo vsebnost sladkorjev (33,73 g/kg). Vsebnosti organskih kislin sta nekoliko večji v 1. in 2. plodiču 12,78 g/kg in 12,17 g/kg, rezultata sta tudi statistično značilno različna od ostalih štirih, kjer so vrednosti manjše, najmanjša je 9,91 g/kg. Vsebnosti TPC se ne razlikujejo statistično značilno med plodiči na položajih 1, 2, 3, 4 in 6. Zanimivo je, da je največja vrednost 9110,1 mg GAE/kg na 5. položaju in tudi statistično značilno različna od preostalih, razen od naslednje največje vrednosti, ki je na 3. položaju 8069,1 mg GAE/kg in se ne razlikuje od obeh skupin statistično značilno. (Preglednica 2)

Preglednica 2: Povprečne vsebnosti skupnih sladkorjev, organskih kislin in TPC v plodičih z zdravih šopov glede na njihov položaj v šopu. Različne črke pri rezultatih označujejo statistično značilno razliko ($p \leq 0,05$) v vsebnosti za posamezni položaj. Položaj 1 je najvišji položaj v socvetju (king flower), položaj 6 najnižje.

Table 2: Average total content of sugars, organic acids and TPC in fruitlets from healthy fruit bunches regarding their position in fruit bunch. Different letter at results indicate significant differences ($p \leq 0,05$) in content between samples. »Položaj 1« indicates the highest rank in inflorescence (king flower), »položaj 6« the lowest.

Povprečne vsebnosti glede na položaj v šopu	Sladkorji (g/kg)	Organske kisline (g/kg)	TPC (mg GAE/kg)
Položaj 1	33,73±2,13 b	12,78±0,51 b	6985,5±683,8 a
Položaj 2	26,39±1,38 a	12,17±0,70 b	7506,9±331,5 a
Položaj 3	25,63±0,65 a	10,05±0,73 a	8069,1±532,1 ab
Položaj 4	27,44±1,13 a	10,40±0,45 a	6792,6±366,9 a
Položaj 5	27,04±1,74 a	10,29±0,28 a	9110,1±559,3 b
Položaj 6	28,55±1,83 a	9,91±0,27 a	6706,3±188,0 a

4.2.2 Vsebnost antocianov, flavanolov, flavonolov, hidroksicimetnih kislin in dihidrohalkonov

Analiza vsebnosti antocianov, flavanolov, flavonolov, hidroksicimetnih kislin in dihidrohalkonov je pokazala, da med različnimi položaji plodičev v šopu ni statistično značilnih razlik v vsebnosti flavonolov, antocianov in flavanolov. Vsebnost hidroksicimetnih kislin je statistično različna le na položaju 6 od ostalih. Vsebnost dihidrohalkonov se ni statistično značilno razlikovala med prvimi 4 položaji, je pa bila vsebnost na 5. položaju statistično različna od 1. in 6. položaja. Vsebnost na 6. položaju je bila najmanjša (84,93 mg/100g) in statistično različna od vseh, razen prvega položaja, kjer je bila vsebnost (121,71 mg/100g), na ostalih položajih je bila vsebnost večja. (Preglednica 3)

Preglednica 3: Povprečne vsebnosti skupnih flavonolov, antocianov, dihidrohalkonov, flavanolov in hidroksicimetnih kislin v plodičih z zdravih šopov glede na njihov položaj v šopu. Različne črke pri rezultatih označujejo statistično značilno razliko ($p \leq 0,05$) v vsebnosti za posamezni položaj. Položaj 1 je najvišji položaj v socvetju (king flower), položaj 6 najnižje.

Table 3: Average total content of flavonols, antocyanins, dihydrochalcones, flavanols, hidroksicinnemetic acids in fruitlets from healthy fruit bunches regarding their position in fruit bunch. Different letter at results indicate significant differences ($p \leq 0,05$) in content between samples. »Položaj 1« indicates the highest rank in inflorescence (king flower), »položaj 6« the lowest.

Povprečne vsebnosti glede na položaj v šopu	Flavonoli (mg/100g)	Antociani (mg/100g)	Dihidrohalkoni (mg/100g)	Flavanoli (mg/100g)	Hidroksicimetne kisline (mg/100g)
Položaj 1	96,30±9,55 a	2,01±0,42 a	121,71±14,82 ab	325,8±28,5 a	151,8±6,6 b
Položaj 2	102,44±7,85 a	2,60±0,49 a	148,39±9,38 bc	314,6±13,2 a	152,9±3,2 b
Položaj 3	95,01±7,98 a	3,02±0,59 a	150,75±11,59 bc	309,8±19,6 a	153,4±5,9 b
Položaj 4	87,49±10,02 a	2,17±0,35 a	152,05±19,23 bc	282,1±25,4 a	144,1±8,6 b
Položaj 5	104,28±6,52 a	4,32±0,67 a	186,63±21,21 c	304,0±65,5 a	163,9±9,6 b
Položaj 6	78,39±5,53 a	2,31±0,65 a	84,93±9,71 a	198,1±23,8 a	117,2±9,3 a

4.3 PRIMERJAVA VSEBNOSTI PRIMARNIH IN SEKUNDARNIH METABOLITOV MED ABSIZIVNIMI IN ZDRAVIMI PLODIČI

Primerjali smo povprečno vsebnost primarnih in sekundarnih metabolitov v plodičih z zdravih socvetij (ZS) s plodiči, ki so kazali znake abscizije (AA) in z zdravimi plodiči, ki so bili v šopu s plodiči z znaki abscizije (AZ), ne glede na njihov položaj v šopu. Primerjali smo vsebnost skupnih sladkorjev, skupnih organskih kislin, TPC, dihidrohalkonov, antocianov, flavanolov, flavonolov in hidroksicimetnih kislin.

4.3.1 Sladkorji, organske kisline in TPC

Povprečna vsebnost skupnih sladkorjev ni statistično značilno različna med plodiči AA, AZ in ZS. Povprečna vsebnost skupnih organskih kislin je z 8,73 g/kg najmanjša pri AA in tudi statistično značilno različna od AZ in ZS. Vsebnost TPC je največja pri ZS in se statistično značilno razlikuje od AA in AZ, ki pa se med seboj ne razlikujeta statistično značilno. (preglednica 4).

Preglednica 4: Povprečne vsebnosti skupnih sladkorjev, kislin in TPC v plodičih, ki so kazali znake abscizije (AA), plodičih, ki so bili v šopu s plodiči, ki so kazali znake abscizije (AZ) in plodičih z zdravih socvetij (ZS), ne glede na njihov položaj v šopu. Različne črke pri rezultatih označujejo statistično značilno razliko ($p \leq 0,05$) v vsebnosti za posamezni položaj. Položaj 1 je najvišji položaj v socvetju (king flower), položaj 6 najnižje.

Table 4: Average total content of sugars, acids and TPC in fruitlets showing signs of abscission (AA), healthy fruitlets from inflorescence where absizing fruitlets were noticed (AZ) and fruitlets from healthy inflorescence (ZS), with no regard to their position in the inflorescence. Different letter at results indicate significant differences ($p \leq 0,05$) in the total sugars, acids, TPC and dihydrochalcones content between samples. »Položaj 1« indicates the highest rank in inflorescence (king flower), »položaj 6« the lowest.

Povprečne vsebnosti ne glede na položaj plodiča v šopu	Sladkorji (g/kg)	Organske kisline (g/kg)	TPC (mg GAE/kg)
AA	28,50±0,70 a	8,73±0,47 a	5274,5±308,5 a
AZ	26,29±0,94 a	13,22±0,63 c	4842,3±505,8 a
ZS	27,08±0,63 a	10,61±0,30 b	7654,7±268,9 b

4.3.2 Antociani, flavanolji, flavonoli, hidroksicimetna kislina in dihidrohalkoni

Vsebnost antocianov, flavanolov, flavonolov in hidroksicimetnih kislin se pri obravnavanju ZS statistično značilno razlikuje od obeh drugih obravnavanj. Obravnavanja AA in AZ se statistično značilno razlikujeta le v vsebnosti flavonolov. Obravnavanje ZS ima največje vrednosti antocianov (2,92 mg/100g), flavanolov (298,37 mg/100g) in hidroksicimetnih kislin (148,46 mg/100g). Vsebnost dihidrohalkonov se med vsemi tremi obravnavanji statistično značilno razlikuje, najmanjša je pri plodičih AZ (87,74 mg/100g) in največja pri plodičih AA (233,64 mg/100g). Obravnavanje AZ ima najmanjše vrednosti vseh spojin. (Preglednica 5)

Preglednica 5: Povprečna vsebnost antocianov, flavanolov, flavonolov, hidroksicimetnih kislin in dihidrohalkonov v plodičih, ki so kazali znake abscizije, plodičih, ki so bili v šopu s plodiči, ki so kazali znake abscizije in plodičih z zdravih socvetij, glede na njihov položaj v šopu. Različne črke pri rezultatih označujejo statistično značilno razliko ($p \leq 0,05$) v vsebnosti za posamezni položaj.

Table 5: Average total content of antocyanins, flavanols, flavonols, hydroxycinnamic acids and dihydrochalcones in fruitlets showing signs of abscission, fruitlets from healthy inflorescence and healthy fruitlets from inflorescence where absizing fruitlets were noticed regarding their position in the inflorescence. Different letter at results indicate significant differences ($p \leq 0,05$) in the total antocyanins, flavanols, flavonols and hydroxycinnamic acids content between samples.

Povprečne vsebnosti ne glede na položaj plodiča v šopu	Antociani (mg/100g)	Flavanoli (mg/100g)	Flavonoli (mg/100g)	Hidroksicimetne Kisline (mg/100g)	Dihidrohalkoni (mg/100g)
AA	1,73±0,13 a	184,32±11,18 a	111,58±4,75 c	107,12±3,38 a	233,64±10,20 c
AZ	1,25±0,15 a	160,82±18,27 a	60,99±6,06 a	103,81±7,72 a	87,74±9,27 a
ZS	2,92±0,27 b	298,37±14,03 b	93,77±3,90 b	148,46±3,81 b	142,34±9,49 b

5 RAZPRAVA

5.1 PRIMERJAVA VSEBNOSTI PRIMARNIH IN SEKUNDARNIH METABOLITOV ZDRAVIH PLODIČEV S PLODIČI IZ REDČENIH ŠOPOV

Primerjali smo vsebnost primarnih in sekundarnih metabolitov plodičev jablane z zdravih socvetij s »king flower« plodiči, kjer smo opravili redčenje in pustili po zgolj en plodič na šop. Primerjali smo vsebnost skupnih sladkorjev, organskih kislin, dihidrohalkonov, antocianov, flavanolov, flavonolov, hidroksicimetnih kislin in TPC.

5.1.1 Skupni sladkorji

Sveži zreli plodovi jablane (*Malus domestica* Borkh.) sorte 'Zlati delišes' vsebujejo okoli 14 % sladkorjev (Blažek in sod., 2003). V razvijajočih se plodovih jablane, vsebnost sladkorjev stalno narašča, medtem, ko se vsebnost škroba prehodno povieča med razvojem. Na razmerje sladkorjev in škroba je moč vplivati z razpoložljivostjo asimilatov, na katero lahko posredno vplivamo z redčenjem v začetnih razvojnih stopnjah. V plodovih, ki se razvijejo posamično je vsebnost osmotsko aktivnih komponent v povprečju 14 % večja kot v manjših plodovih, ki so rasli skupaj v šopu. V večjih plodovih sta vsebnosti fruktoze in saharoze večji za 9 % in 20 % (Berüter, 1990).

V poskusu smo ugotovili, da se vsebnost sladkorjev močno razlikuje med plodiči v šopih, kjer je bilo redčenje opravljeno, "KF" in plodiči z zdravih socvetij, kjer redčenje ni bilo opravljeno. S 33,7 g/kg je vsebnost sladkorja v plodičih zdravih socvetij za kar 6,7 g/kg večja od tiste v "KF" plodičih, kateri vsebujejo 27,0 g/kg skupnih sladkorjev. Rezultati kažejo, da je vsebnost skupnih sladkorjev manjša v plodičih, kjer je bilo opravljeno redčenje, ker pa analiza škroba ni bila narejena, je mogoče, da je skupna vsebnost ogljikov hidratov večja, saj so bili plodiči vzorčeni v obdobju najintenzivnejše rasti.

5.1.2 Skupne organske kisline

Karboksilne kisline so ene izmed najpogosteje določanih spojin v sadju, te imajo tudi izredno pomembno vlogo pri kakovosti in prehranski vrednosti sadja. Imajo neposreden vpliv na senzorične lastnosti sadja in sadnih sokov, istočasno pa se jih uporablja kot indikatorje zrelosti (Blanco in sod., 1996). Zhang in sod. (2010), so z raziskavo vsebnosti organskih kislin skozi čas razvoja plodu opazili, da skupna koncentracija organskih kislin v plodu doseže največjo vrednost od 2 do 4 tedne po cvetenju in nato upada vse do obiranja plodov. Kljub upadanju koncentracije skupnih kislin v plodu, pa absolutna količina kislin narašča vse do zrelosti plodov. Ta raziskava je bila opravljena na sorti 'Honeycrisp', vendar so ob primerjavi z raziskavami opravljenimi na drugih sortah ugotovili, da gre za podoben

vzorec. Awad in sod. (2001) navaja, da je skupna vsebnost kislin manjša v zrelih plodovih, kjer je bilo opravljen redčenje.

Rezultati naše analize so pokazali, da ni bistvene razlike v vsebnosti organskih kislin med "KF" plodiči in plodiči z »zdravih socvetij«. Plodiči "KF" so sicer imeli s 13,1 g/kg malenkost večjo vsebnost organskih kislin od plodičev z »zdravih socvetij«, ki so imeli 12,8 g/kg, vendar je razlika zanemarljiva in ni statistično značilna.

5.1.3 Vsebnost hidroksicimetnih kislin, antocianov, dihidrohalkonov, flavanolov, flavonolov in TPC

Med rastjo jabolka se skupna vsebnost polifenolov zmanjšuje (Zhang in sod., 2012). Raziskav o vplivu redčenja na vsebnost skupnih polifenolov je zelo malo z izjemo raziskav narejenih o antocianih. Pri raziskavi o vplivu redčenja na vsebnost flavonoidov in klorogenske kisline, so ugotovili, da plodovi z dreves, na katerih je bilo redčenje opravljen, sicer vsebujejo večje količine flavonoidov, da pa so te zanemarljivo majhne (Awad in sod., 2001).

Plodiči z »zdravih socvetij« so vsebovali več antocianov, dihidrohalkonov, flavanolov in flavonolov, vendar so bile vrednosti le malenkost večje od tistih v »king flower« obravnavanju in niso bile statistično značilno različne. »king flower« obravnavanje je imelo večje vrednosti hidroksicimetnih kislin, ki pa se niso statistično značilno razlikovale od obravnavanja »zdravo socvetje«. Vsebnost TPC je bila 6217,1 mg GAE/100g pri »king flower« in 6985,5 pri obravnavanju zdravo socvetje. »king flower« plodiči so vsebovali 117,42 mg/100g dihidrohalkonov medtem ko so plodiči z »zdravih socvetij« vsebovali 121,71 mg/100g. Analiza vsebnosti polifenolov je pokazala, da redčenje plodičev bistveno ne vpliva na vsebnost polifenolov v plodičih jablane. Pričakovali smo bolj raznolike podatke, glede na to, da je povečana vsebnost polifenolov običajen odziv na stres (Adyanthaya, 2007).

5.2 PRIMERJAVA VSEBNOSTI PRIMARNIH IN SEKUNDARNIH METABOLITOV V ZDRAVIH PLODIČIH MED RAZLIČNIMI POLOŽAJI V ŠOPU

Za to primerjavo smo se odločili, ker nas je zanimalo, kako posamezen položaj v šopu vpliva na njegovo preskrbljenost z asimilati. Namreč, zanima nas ali so določeni položaji slabši od drugih, v smislu preskrbljenosti. Plodič, ki se razvije iz prvega cveta (king flower) ima prednost pred ostalimi, predstavlja tudi večji ponor za asimilate, zaradi česar se asimilati prvi porabljam za ta plod (Miranda in sod., 2005). Kako velika je prednost tega prvega plodiča in kako vpliva na druge, smo žeeli ugotoviti s to primerjavo.

5.2.1 Skupni sladkorji

Primerjali smo vsebnost skupnih sladkorjev v plodičih glede na položaj. Plodič na prvem položaju je vseboval znatno več skupnih sladkorjev (33,73 g/kg) od plodičev na ostalih mestih. Vsebnost se je statistično značilno razlikovala od ostalih. Zanimiv podatek je tudi ta, da imel plodič na 3. položaju najmanjšo vsebnost skupnih sladkorjev (25,63 g/kg). Vsebnost sladkorjev v plodičih je bila kot po pričakovanjih, največja v prvem plodiču. Pričakovali pa smo nekoliko večje razlike med plodiči na ostalih položajih glede na to, da plodiči nameščeni nižje na cvetni osi bolj pogosto odpadejo (Botton in sod., 2011).

5.2.2 Skupne organske kisline

Vsebnost skupnih organskih kislin, je bila podobno kot vsebnost skupnih sladkorjev največja v plodiču na 1. položaju, vendar je imel tudi plodič na 2. položaju podobno vsebnost skupnih organskih kislin, ti dve vrednosti (12,78 in 12,17 g/kg) sta se statistično značilno razlikovali od ostalih. Najmanjša vsebnost je bila ugotovljena v plodiču na 6. mestu (9,91 g/kg). Vsebnost skupnih organskih kislin nam zaradi majhnih razlik v vsebnosti med različnimi položaji pove zelo malo o odnosih plodičev v socvetju.

5.2.3 Vsebnost TPC

Rezultati primerjave vsebnosti TPC so precej različni, namreč, vsebnost TPC je precej večja v plodiču na 5. mestu (9110,1 mg GAE/kg) in tudi statistično značilno različna od vseh, razen tiste v plodiču na 3. mestu (8069,1 mg GAE/kg). Vsebnosti v plodičih s položajev 1, 2, 4, 6 so v razponu od 6792,6 mg GAE/kg do 7506,9 mg GAE/kg. Če vemo, da je povečanje vsebnosti skupnih fenolov običajen odziv na stres (Adyanthaya, 2007) bi lahko rekli, da sta plodiča na 3. in 5. položaju najbolj podvržena stresu in bosta najbolj verjetno odpadla. To delno sovpada z ugotovitvami Bottona in sod. (2011), saj so

ugotovili, da plodiči nameščeni nižje na cvetni osi bolj verjetno odpadejo (v raziskavi so opazovali le prvih 5 položajev) med tem, ko je verjetnost za odpad 3. in 4. plodiča enaka.

5.2.4 Vsebnost dihidrohalkonov, antocianov, flavanolov, flavonolov in hidroksicimetnih kislin

Ob primerjavi vsebnosti dihidrohalkonov, antocianov, flavanolov, flavonolov in hidroksicimetnih kislin v plodičih med različnimi položaji smo ugotovili, da se vsebnost flavonolov, flavanolov in antocianov ne razlikuje statistično značilno med različnimi položaji. Vsebnost hidroksicimetnih kislin je statistično značilno različna le v plodiču na 6. položaju, saj je vsebnost precej manjša kot v ostalih (117,2 mg/100g), naslednja najmanjša vrednost je bila 144,1 mg/100g na 4. položaju, medtem ko je bila največja vsebnost ugotovljena na 5. položaju (163,9 mg/100g). Vsebnosti dihidrohalkonov so bile zelo raznolike med položaji. Največja vsebnost je bila na 5. položaju (186,63 mg/100g), najmanjša na 6. položaju 84,93 mg/100g). Vrednosti na 1., 2., 3. in 4. položaju med seboj niso bile statistično značilno različne, so se pa vrednosti na 2., 3. in 4. položaju statistično značilno razlikovale od tiste na 6. položaju. Vrednost na 1. položaju pa se je statistično značilno razlikovala od tiste na 5. položaju. Zanimiv podatek je ta, da so bile podobno kot pri vsebnostih TPC največje vrednosti flavonolov, dihidrohalkonov, antocianov in hidroksicimetnih kislin ugotovljene pri plodiču na 5. položaju.

5.3 PRIMERJAVA ABSCIZIVNIH PLODIČEV Z ZDRAVIMI PLODIČI Z ABSCIZIVNIH ŠOPOV NE GLEDE NA POLOŽAJ V ŠOPU

5.3.1 Vsebnost skupnih sladkorjev, organskih kislin in TPC

Stopar in sod. (2000) so v poskusu vpliva senčenja dreves na abscizijo z rezultati delno potrdili domnevo o tem, da pomanjkanje ogljikov hidratov vodi do abscizije plodičev. Rezultati so pokazali, da imajo plodiči, kateri so bolj podvrženi absciziji povečane vsebnosti škroba, manj glukoze in rahlo povečane vsebnosti fruktoze. Nasprotno pa Yuan in Greene (2000) poročata o večji vsebnosti ogljikovih hidratov v plodičih, ki so abscizirali v primerjavi s tistimi, ki so ostali na drevesih. Opazno povečanje vsebnosti saharoze v plodičih, ki so kazali znake abscizije so tudi opazili Botton in sod. (2011).

Ob primerjavi vsebnosti skupnih sladkorjev, organskih kislin in TPC ne glede na položaj plodiča se je pokazalo, da imajo plodiči ki kažejo znake abscizije (AA) največjo vsebnost skupnih sladkorjev (28,50 g/kg), ki pa ni bistveno različna od drugih dveh skupin plodičev (26,29 g/kg pri zdravih plodičih na abscizivnih socvetjih (AZ) in 27,08 pri zdravih plodičih z zdravimi socvetji (ZS). Skupna vsebnost organskih kislin je statistično značilno različna med vsemi tremi skupinami in najmanjša pri AA plodičih (8,73 g/kg) in največja pri AZ (13,22 g/kg). ZS plodiči so imeli srednjo vrednost 10,61 g/kg. Največjo vsebnost TPC so imeli plodiči ZS (7654,7 mg GAE/kg), najmanjšo plodiči AZ (4842,3 mg GAE/kg) in sredinsko plodiči AA (5274,5 mg GAE/kg). Glede na to, da je porast vsebnosti fenolov običajen odziv jablane na stres (Adyanthaya, 2007), bi iz tega lahko sklepali, da so plodiči ZS podvrženi največjemu stresu, kar se zdi nenavadno in v neskladju z dejstvom, da ti plodiči niso kazali znakov abscizije.

5.3.2 Vsebnost dihidrohalkonov antocianov, flavanolov, flavonolov in hidroksicimetnih kislin

Plodiči z zdravih socvetij so vsebovali največ antocianov (2,92 mg/100g), flavanolov (298,37 mg/100g) in hidroksicimetnih kislin (148,46 mg/100g) in imeli tudi statistično značilno različne vrednosti od obravnavanj AA in AZ. Najmanjše vrednosti vseh 5 flavonoidov so bile ugotovljene pri obravnavanju AZ, vendar statistično značilno različne od vsebnosti pri obravnavanju AA le pri vsebnosti dihidrohalkonov.

6 SKLEPI

V poskusu smo proučevali vpliv redčenja na vsebnost skupnih sladkorjev, organskih kislin in fenolnih spojin. Prav tako smo proučevali vsebnost teh spojin v plodičih, ki kažejo znake abscizije ter vsebnost v plodičih glede na položaj v socvetju.

Pri primerjavi plodičev, kjer smo opravili redčenje, s tistimi iz neredčenih šopov smo ugotovili, da redčenje vpliva, na spremembe vsebnosti primarnih in sekundarnih metabolitov.

Plodiči iz redčenih šopov so imeli statistično značilno manjšo vsebnost skupnih sladkorjev, od tistih iz neredčenih šopov. Vsebnost skupnih organskih kislin je bila zanemarljivo različna, vsebnost skupnih fenolnih spojin (TPC) in tudi ostalih fenolnih spojin z izjemo hidroksicimetnih kislin je bila pri redčenih plodičih manjša od tiste pri neredčenih plodičih.

Hipotezo, da imajo plodiči, kjer je bilo redčenje izvedeno, večjo povprečno vsebnost skupnih sladkorjev zavrnemo, saj imajo plodiči, kjer je bilo redčenje izvedeno, manjšo povprečno vsebnost skupnih sladkorjev od tistih, kjer redčenje ni bilo izvedeno.

S primerjanjem vsebnosti primarnih in sekundarnih metabolitov med plodiči z različnih položajev v šopu, se nam je potrdila domneva, da ima plodič na prvem položaju (king flower) prednost saj je vseboval največje vrednosti primarnih metabolitov, to je skupnih sladkorjev in organskih kislin. Vsebnosti sladkorjev med ostalimi 5 plodiči niso statistično značilno različne.

Hipotezo, da imajo plodiči nameščeni nižje na cvetni osi manjšo vsebnost ogljikov hidratov delno potrdimo.

Pri primerjavi plodičev, ki kažejo znake abscizije z zdravimi plodiči z abscizivnih šopov in zdravimi plodiči z zdravih šopov smo ugotovili, da je vsebnost skupnih sladkorjev največja, v plodičih ki kažejo znake abscizije. Kljub veliki vsebnosti skupnih sladkorjev pa imajo abscizivni plodiči najmanjše vsebnosti skupnih organskih kislin. Vsebnosti skupnih fenolnih spojin so bile največje v plodičih z zdravih šopov, medtem ko so bile vrednosti najmanjše pri zdravih plodičih iz abscizivnih šopov.

S temi rezultati delno zavrnemo hipotezo, da je v plodičih, ki kažejo znake abscizije, povečana vsebnost sekundarnih metabolitov, saj vsebujejo več sekundarnih metabolitov od zdravih plodičev z abscizivnih socvetij, a manj od zdravih plodičev z zdravih socvetij. Prav

tako zavrnemo hipotezo, da je v plodičih, ki kažejo znake abscizije zmanjšana vsebnost skupnih sladkorjev.

Točne mehanizme s katerimi bi razložili rezultate, je težko ugotoviti. Domnevamo, da se v abscizivnih plodičih prve porabijo organske kisline, s senescenco pa se zmanjša vsebnost vode v plodičih, kar poveča koncentracijo skupnih sladkorjev, istočasno pa se kot odziv na stres, kompleksnejši ogljikovi hidrati razgradijo.

Rezultati vsebnosti primarnih in sekundarnih metabolitov v plodičih glede na njihov položaj kažejo, da gre za izredno zapleteno dinamiko premeščanja asimilatov in konkurenco. Če bi želeli bolj podrobno razumeti to dinamiko in proces abscizije, bi bilo potrebno izvajati vzorčenje v daljšem časovnem obdobju in z večjim vzorcem. Potrebne bi bile tudi analize vsebnosti škroba, encimske aktivnosti in hormonov.

7 POVZETEK (SUMMARY)

7.1 POVZETEK

V poskusnem sadovnjaku laboratorijskega polja BF smo v letu 2013 izvedli poskus vpliva redčenja plodičev jablane (*Malus domestica* Borkh.) na vsebnost primarnih in sekundarnih metabolitov. Predmet poskusa je bilo tudi opazovanje spremembe primarnih in sekundarnih metabolitov v plodičih, ki kažejo znake abscizije, istočasno pa smo želeli ugotoviti vpliv položaja plodiča v šopu na vsebnost teh snovi. Za vsako skupino vzorcev smo imeli po 4 ponovitve. Pripravo in analizo vzorcev smo opravili na Katedri za sadjarstvo, vinogradništvo in vrtnarstvo Biotehniške fakultete v Ljubljani.

Vsebnost skupnih sladkorjev, organskih kislin in fenolnih spojin v plodičih smo določili s pomočjo tekočinske kromatografije (HPLC).

Plodiči iz redčenih šopov se bistveno razlikujejo od plodičev iz neredčenih šopov le v vsebnosti skupnih sladkorjev, ki je statistično značilno manjša. Vsebnost skupnih kislin in skupnih fenolnih spojin se med plodiči iz redčenih šopov in plodiči iz neredčenih šopov bistveno ne razlikuje.

Položaj plodiča v šopu ima pomemben vpliv na plodičovo vsebnost primarnih in sekundarnih metabolitov. Najvišje nameščeni plodič (king flower) ima statistično značilno različno, večjo vsebnost skupnih sladkorjev od ostalih. Vsebnosti fenolov pa so med plodiči zelo različne. Vsebnosti nobenega fenola tudi ni imel povečane »king flower«. V povprečju so bile največje vrednosti fenolnih spojin ugotovljene pri plodiču na 5. položaju.

Plodiči, ki kažejo znake abscizije sicer, imajo večjo vsebnost skupnih sladkorjev od zdravih plodičev iz abscizivnih šopov in plodičev z zdravih šopov, ki pa ni statistično značilno različna. Statistično značilno različno imajo vsebnost skupnih organskih kislin, ki je tudi povprečno najmanjša. Vsebnost skupnih fenolnih spojin imajo abscizivni plodiči manjšo od tistih z zdravih šopov in večjo od zdravih plodičev iz abscizivnih šopov, statistično značilno različno pa le od plodičev iz zdravih šopov.

Na podlagi rezultatov smo zavrnili ali delno zavrnili vse tri hipoteze. Redčenje plodičev ne poveča vsebnosti skupnih sladkorjev v plodičih. Plodiči, ki so pred tem, da odpadejo, ne vsebujejo povečanih vsebnosti fenolnih spojin in verjetno ne odpadejo zaradi pomanjkanja sladkorjev. Plodiči nameščeni nižje na cvetni osi sicer imajo znatno manjšo vsebnost

sladkorjev od prvega plodiča, vendar vsebnost sladkorjev med preostalimi 5 plodiči ni statistično značilno različna.

7.2 SUMMARY

INTRODUCTION

It is a well-known fact that best quality apple fruits develop when thinning is done at the appropriate time and correctly, leaving only one fruit per inflorescence. This fruit develops from »king flower«. If too many fruits are developing on a tree, self-regulating thinning occurs in June, called June drop. True mechanisms of this event are not entirely known. Plant hormones bear important role in fruit thinning and some theories say primary metabolites also play a key role, in form of competition for sugars. Exact change in sugar dynamics and content in fruitlets has not been researched yet.

With this research we tried to determine the changes of primary and secondary metabolites in fruitlets that showed signs of senescence and were bound to drop during the June drop in respect to healthy ones. Other aims of our research were to determine differences in the content of primary and secondary metabolites with respect to the position of a fruitlet in fruit bunch and whether thinning influences the total content of primary and secondary metabolites in fruitlets. Since fruit thinning is one of the most important technological activities in commercial orchards it is important for us to know the natural causes of self-regulatory thinning.

LITERATURE REVIEW

Apple (*Malus domestica* Borkh.)

Domestic apple (*Malus domestica* Borkh.) belongs to the subfamily Pomoidae, family Rosaceae along with common pear (*Pyrus spp.*), quince (*Cydonia oblonga* Mill.), loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) and common medlar (*Mespilus germanica* L.). 18 different species form the subfamily Pomoidae share the same basic chromosome number 17. This is unusual and different from the rest of Rosaceae family species, which mostly have only 7 or 9 chromosomes. Genus *Malus* is made up of at least 15 species and there is ongoing research and debate on the exact number, which is believed to be as high as 33 (Rieger, 2006).

Related species share some common features, which is why, description of apple bearing wood is the same as for pear (Jazbec in sod. 1995). Apple bearing wood is of different

lengths, but the best quality bearing wood are short, one year old shoots which should be somewhere between 3 cm do 10 cm in length and have a mixed bud at their tip (Štampar, 2010).

Flowering in apples lasts from eight to ten days and usually occurs at the end of April until the first days of May, depending on the cultivar. Flowering is the most critical phase of fruit development since it is not uncommon for low temperatures to occur in the colder regions which often result in frost (Sancin, 1988).

Most of apple cultivars are self-infertile which is why they need pollen from other cultivars for successful pollination, only a small portion of apple cultivars is self-fertile. Apple cultivars also differ in ploidy, which also has an effect on pollination; pollen from diploid cultivars has a higher rate of germination compared to triploid cultivars. To ensure good crop, there must be at least two diploid cultivars with overlapping flowering time in any given orchard. As little as 3 to 8 out of a hundred flowers need to be pollinated for a normal crop, if pollination exceeds 10% thinning is necessary to prevent exhaustion of trees (Sancin, 1988). For pollinating purposes apple species such as *Malus floribunda* Siebold is used in modern commercial orchards (Westwood, 1993).

Apple and its relatives make a special category of fruits known as the pome fruits. Most of the fleshy part of fruit develops from the floral cup and not the ovary. Fruit has five seed cavities which contain 2 seeds each (Rieger, 2006). Growth of the fruit is the result of cell divisions and growth of the cells before and after flowering. Phase of cell division lasts for the first 3 to 4 weeks, after which, phase of cell enlargement starts. Shown on graph, apple fruit growth appears in a form of singular sigmoid curve.

Important organic compounds in apple fruit

Plants synthesize a great variety of organic compounds, which we refer to as primary and secondary metabolites, though there is no clear border between them. Primary metabolites are those that have essential roles in photosynthesis, respiration, growth and development. Sugars, lipids, nucleotides, amino acids and organic acids are usually referred to as primary metabolites (Veberič, 2010).

Primary metabolites

As a product of photosynthesis glucose and fructose accumulate cytosol of photosynthetically active plant cells. They are not transported through phloem so they serve as intermediates in sucrose metabolism. Young apple fruits contain larger amounts of starch, which is a more complex carbohydrate, and is metabolized into soluble sugars as the fruit matures and ripens (Jackson et al., 2011). 12 different carbohydrates have been found in apple fruits of 'Honeycrisp' variety with the use of HPLC and GC-MS analyses (Zhang et al., 2009).

Organic acids play an important role in plants, they are the intermediates in metabolic processes. They are directly linked to growth, development and senescence (Gallander, 1985). In fruits, organic acids are found in intracellular fluid where they are bound in form of esters, glycosides or salts. Concentration of acids can also reach such high levels, crystallization occurs as is case with calcium oxalate in young fruits. (Gvozdenović, 1989). Most important organic acids in fruits are tartaric, malic, ascorbic and citric (Scherer, 2012).

Secondary metabolites

Phenols represent the second largest group of secondary metabolites in plants which serve them for defense purposes. More than 10000 plant phenol compounds have been identified. Most of the phenolic compounds are synthesized via shikimic acid pathway (Scott, 2008). Phenol compounds are synthesized as a result of plant reactions to outside stimuli, biotic and abiotic. Phenols are more than just stress indicators, they are also key mediators in plant resistance against pests (Veberič, 2010).

Hormones and thinning

Most fruit species produce a surplus flowers which even when poorly pollinated produce too many fruits for tree to provide for which is probably reason behind the self-regulatory thinning (Bangerth, 2000). June drop is usually just a response to insufficient pollination, causing unpollinated fruits to drop. Another cause of June drop can also be, a strong competition for primary metabolites when too many fruits are developing. This in effect results in the drop of all but the few best developed fruits (Jackson et al., 2011).

A common phenomenon in orchards is alternate bearing. Alternating bearing, as the name implies means good crop is usually succeeded by a lack of crop or a very small crop the next year, and this can repeat in cycles. Causes of this are many, spring frosts, vigorous growth, damages to leaf surface, or simply too many fruits were left to develop on a tree on any particular year. Biggest challenge growers are facing is the fact that once the trees fall into this cycle it is very hard to get them back into normal cycle (Štampar et al., 2005).

There are many different ways of fruit thinning, hand, mechanized and even chemical. In the past thinning was done with respect to spacing between fruits, nowadays it's much more efficient to thin by size (Westwood, 1993). As researcher Sladič (2010) describes, thinning is also important quality wise. He noted an increase of sugars, phenols in meat and skin of 'Jonagold' apples, he also noted thinning with chemical Maxcel has a positive effect on bearing and number of 1st class quality fruits.

Chemical thinning started as a way of removing fruits from trees due to low market prices, tests started in 1940's. The first efficient chemical was tar oil which removed flowers in the phase of green buds. Shortly after, many other chemicals have been tested and gave varying results. Two of the most promising chemicals were NAA and NAAm which, when used properly had no ill effects on trees green mass. Chemical thinning has many advantages compared to hand or mechanic. It is cheap, yields better quality and size fruits and better flowering in the following year with cultivars which are prone to alternating bearing (Westwood, 1993).

Fruit abscission

Abscission is the process in which plant organ gets detached from its mother plant. It can be either programmed as a part of plant development or reaction to stress (Taylor and Whitelaw, 2001). Abscission of apple fruitlets starts with stimulation of ethylene production and acquired sensitivity to it. The model currently accepted suggests auxin, which is produced by the organ is transported down the petiole, where it passes abscission zone and thus retards its activation by reducing its sensitivity to ethylene. Abscission itself starts with senescence processes such as increased production of ethylene, which in turn affects auxin metabolism (Dal Cin et al., 2009).

At the moment two theories are discussed about fruit abscission. The first says, fruit abscission occurs due to lack of primary metabolites, either because of competition or lack of production. The other speaks of hormonal mechanisms with which plant protects a few fruits from the lack of primary metabolites later in the season (Bangerth, 2000). Model

accepted for plant organs such as leaves can not be applied on fruitlets, because abscission of fruitlets is much more complexed. In abscission of fruitlets, the dominance of “king flower” fruitlet play an important role. While the polar auxin transport through the petiole retards abscission through known processes, the fact that “king flower” fruitlet is highest and most developed in the fruit bunch, also means, that in the fruit bunch, polar auxin transport from other fruitlets into the inflorescence is inhibited. In lower positioned fruitlets much less auxin travels through abscission zone, which is why they are more likely to fall off. If “king flower” fruit is removed, there is noticeable dominance amongst other fruitlets on lower positions, but much less notable.

Guardiola (1997) did research on citrus fruits and noted that number of flowers plays a key role in fruit thinning. A great number of flowers in the beginning create a strong competition for minerals which is why some ovaries are poorly developed causing the fruitlets to drop. Researcher Mehouachi (1995) did research on influence of defoliation on citruses, he noticed june drop to be higher in trees that had part of their leaves removed, indicating nutritional stress involvement in the june drop.

Materials and methods

Experiment was done at the laboratory field of Biotechnical faculty. Samples were collected from an orchard planted in 2001. Orchard is not being irrigated (Klinar, 2010). Trees are planted 1 m apart in line and 3,5 m between lines, they have a permanent 2,5 m high support. Orchard is included in integrated production and is managed as a commercial orchard.

Cultivar ‘Golden Delicious’ is a random seedling which was discovered around the year 1890 by Anderson H. Mullins, later this seedling was bought by Paul Stark who named the cultivar and introduced it to production (Viršček Marn and Stopar, 1998). It is one of the most common cultivars grown around the globe, even in areas where conditions are not very suitable which is why fruits from those regions are of lesser quality. Throughout the years breeders have produced many clones with better qualities than the original cultivar (Sancin, 1988). One of the most important rootstocks of the modern orchards is the ‘M9’ vegetatively propagated rootstock. Growing on ‘M9’ trees need constant support, bear fruits early and have a constant quality and quantity of fruit through whole production time. It is compatible with most cultivars (Sancin, 1988).

Weather and phenological conditions in spring of 2013

Weather in the first 5 months of 2013 was very different from average, there was 292,4 mm of excess rainfall compared to average and 99,5 h less of sun radiation. But the average temperature and number of cold days (temp. min <0 °C) was not very different from average). Because of a very sudden change from lower temperatures to higher, there was no danger of frost, which is otherwise a common thing in central parts of Slovenia (Agencija republike Slovenije za okolje, 2013). In the experimental orchard, apple (*Malus domestica* Borkh.) was in the stage of red bud on 25th April 2013, start of flowering was on 29th April 2013 and flowering ended on 9th May 2013.

Sampling material

We sampled the material on 30th May 2013, as soon as first signs of abscission were visible on apple fruitlets. We collected four groups of samples. 1st group were the “KF” – “King flower” samples, fruitlets from this group have been marked on a prior occasion when we also thinned the branches where they were found in such way, only »king flower« fruitlets were left. The 2nd group was collected from healthy fruit bunches, where no abscising fruitlets were found and at least 6 fruitlets were present per fruit bunch, the group was named “ZS”-“zdrava socvetja”, meaning healthy fruit bunch. 3rd group were fruitlets with signs of abscission, we called them “AA” – “abscizivni plodiči”, meaning abscising fruitlets. The last, 4th group were fruitlets which were picked from fruit bunches with abscising fruitlets but without signs of abscission, these were called “AZ” – “abscizivni zdravi”, meaning healthy fruitlets from same bunches as the fruitlets that showed signs of abscission.

Analyses of phenols, sugars and organic acids were done at the Biotechnical faculty, each sample had 4 repetitions. For the analyses HPLC method was used. Before preparing samples for analyses, they were checked and arranged. Samples were arranged by their status and the position they occupied in fruit bunch. Each fruitlet was measured in diameter, weighed and cut in half.

We prepared the samples for extraction of sugars and organic acids by chopping them finely with a knife. We weighed 1 g of sample and immersed it with 3 ml of twice distilled water and then left on the shaker for 1 h to extract. After that the samples were centrifuged for 10 min at 10000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5810, Hamburg, Germany). Supernatants were filtered through a 0.45 µm cellulose ester filter, transferred to a vial and analyzed using HPLC.

For the extraction of phenolic compounds we finely chopped samples, weighed 1,5 g and immersed it with 8 ml of methanol containing 3% of formic acid. Samples were put in a cooled ultrasound bath for 1 h after which we centrifuged them for 10 min at 10000 rpm. Supernatants were filtered through a 0.45 µm polyamide filter, transferred to a vial and analyzed using HPLC.

Data provided by the HPLC analyses was statistically quantified with the use of MS Excel 2010 and Statgraphic Plus for Windows. Data from analyses was tested for any differences among treatments using one-way analysis of variance (ANOVA). Significant differences among means were determined by LSD or Duncan test with a significance level of 0,05.

Results and discussion

We compared content of sugars, organic acids, anthocyanin's, flavonoles, flavanoles, hydroxycinnamic acids and total phenolic content (TPC) and dihydrochalcones between different samples.

When we compared fruitlets where thinning was done with those growing in clusters with no thinning performed, content of total sugars was the lowest in fruitlets where thinning was performed, they contained 27,0 g/kg of total sugars whereas fruitlets where no thinning was performed contained 33,7 g/kg of total sugars which has also proven to be statistically significantly different. Results show us, that thinning has an effect on total sugar content as it lowers it, but as Berüter (1990) reports, sugar content in developing apple fruits develop throughout the growing season and fruits, where thinning is performed contain 14% more osmotic active components. With thinning, ratio between sugars and starches is influenced. At harvest, larger fruits which grow individually in inflorescence contain 9% more fructose and 20% more of sucrose.

When comparing organic acids content between fruitlets where thinning was performed with those where no thinning was performed, we noticed, thinning had little effect on organic acids content. Fruitlets where thinning was performed contained 13,1 g/kg of organic acids, those where no thinning was performed contained 12,8 g/kg, not a statistically significant difference Even so, Awad et al. (2001) found that total organic acids content is even lower in fruits where thinning is performed. Our research shows otherwise, but we did however sampled developing fruitlets, not ripen fruits. This is important because as fruits develop organic acids concentrations start to drop 2 to 4 weeks after bloom until harvest, though total organic acids content per fruit grows until harvest (Zhang et al., 2010).

TPC content of fruitlets where thinning was not performed was not statistically significantly different from that in fruitlets where thinning was performed which contained 6217,1 mg GAE/kg and those where thinning wasn't performed 6985,5 mg GAE/kg. Awad et al. (2001) reports that there aren't really any research available on effects of thinning on flavonoid or chlorogen acid content, but there are however some research about the effects of thinning on content of anthocyanin's. But this is due to fact, good exposure of fruits to sun directly increases anthocyanins. He found that fruits where thinning was performed do contain higher amounts of flavonoids, but the increase is very slight, in some cases even nil.

We got a very interesting set of information when we compared the content of fruitlets with respect to their position in the fruit bunch. As many researchers before, we found that the 1st fruit in the fruit bunch (king flower) has the highest amounts of sugars (33,73 g/kg) and statistically significantly different from other. Second highest amount of sugars was to our surprise in the 6th fruitlet (28,55 g/kg), this value was not statistically significantly different from others. King fruit also had the highest amount of organic acids (12,78 g/kg) and the second highest amount was found in the 2nd fruitlet (12,17 g/kg), these two values were statistically significantly different from others, 6th fruitlet however, had the lowest amount of organic acids (9,91 g/kg). The fact that all fruitlets except for the 1st one had very similar content of total sugars, could be due to the fact, that once a fruitlet undergoes nutritional stress, content of sucrose increases (Botton et al., 2011), so some of the fruitlets might have already been stressed and undergoing different processes which occur prior to abscission.

When we looked at flavonoids, we got very different results. For TPC, flavanols, dihydrochalcones, anthocyanin's and hidroxcinnamic acids the highest amount was found in 5th fruitlet. Values weren't always statistically significantly different from others but nevertheless. In fact, values of flavonols, anthocyanin's and flavanols had no statistically significant differences. Values of TPC were, as mentioned before, highest in 5th fruitlet (9110,1 mg GAE/kg) and lowest in 6th fruit (6706,3 mg GAE/kg). It is known that increased content of polyphenols is a reaction to stress (Adyanthaya, 2007) which is why we could assume, 5th fruitlet was stressed and the most likely candidate for abscission, but in order to verify this other analyses would need to be done.

Our research was very much focused on effects of abscission on content of sugars, organic acids and TPC, which is why we compared abscising fruitlets with healthy fruitlets from healthy fruit bunch and with healthy fruitlets from the same fruit bunch where we found the abscising fruitlets.

We found that abscising fruitlets with 28,50 g/kg had the highest total sugar content, compared to 26,29 g/kg at healthy fruitlets from abscising inflorescences and 27,08 g/kg at healthy ones, though the results did not statistically significantly differ. The content of organic acids was the lowest in abscising fruitlets (8,73 g/kg) and highest in healthy fruitlets from abscising fruit bunches (13,22 g/kg). To our surprise, the highest content of TPC was found in healthy fruitlets (7654,7 mg GAE/kg) and was statistically significantly different from other two, whereas abscising fruitlets (4842,3 mg GAE/kg) and healthy fruitlets from abscising fruit bunch (5274,5 mg GAE/kg) did not have very different content.

Conclusion

In our experiment we studied the effects of thinning on total sugar, organic acids and TPC content in fruitlets. Another focus was on effects of abscission on those metabolites and how the position of fruitlet in the fruit bunch influences the content.

When we compared fruitlets where thinning was performed to those where thinning was not done, we found that thinning does have an effect on content of primary and secondary metabolites.

Fruitlets where thinning was performed had a statistically significantly lower content of total sugars compared to those where thinning was not performed. Content of organic acids did not statistically significantly differ between samples, whereas the content of TPC was lower in fruitlets where thinning was performed, but also not statistically significantly.

Hypothesis, that fruitlets where thinning is performed, have a higher content of sugars is rejected, since they, in fact, have a lower content of sugars.

Comparing the contents of primary and secondary metabolites based on fruitlet position, we once again confirmed that the 1st fruit, has the highest amounts of primary metabolites, values at other positions were not statistically significantly different. Phenolics were predominantly elevated at 5th fruitlet and the second highest values were at 3rd fruitlet.

Thus we partially confirm the hypothesis that fruitlets positioned lower in the fruit bunch have lower amounts of primary metabolites.

When we compared abscising fruitlets with healthy fruitlets from abscising fruit bunch and healthy fruitlets we found that abscising fruitlets in fact had highest content of sugars and lowest content of organic acids. To our surprise content of TPC was the highest in healthy fruitlets.

With the results in mind, we partially reject the hypothesis that fruitlets abscise due to sugar shortage, and that abscising fruitlets have elevated levels of TPC due to stress. We found the opposite when compared to healthy fruitlets from healthy fruit bunches.

Explaining the results is not easy as more tests should be done in order to do so. We can only assume what the causes for such results are. The reason for drop in concentration of organic acids in abscising fruitlets could be the fact, organic acids are the first to be oxidized with senescence. Senescence and with it associated loss of water might be the reason behind the elevated concentrations of sugars in abscising fruits.

Results of primary and secondary metabolites content in fruitlets with respect to their position in the fruit bunch shows us there is a very complex dynamic of assimilate transport and competition. To better understand this dynamics and the process of abscission, sampling should be done on a bigger scale through a longer time frame. It would be wise to also perform analyses of enzymatic activity and hormones.

8 VIRI

Agencija republike Slovenije za okolje. Meteorološka postaja LJ-Bežigrad.

<http://meteo.ars.si/met/sl/archive/> (junij, 2013)

Adyanthaya I. 2007. Antioxidant response mechanisms in apples during post-harvest storage and implications for human benefits. Master thesis. Amherst, University of Massachusetts: 84 str.

Awad A. M., De Jager A., Dekker M., Jongen M.F. W. 2001. Formation of flavonoids and chlorogenic acid in apples as affected by crop load. *Scientia Horticulturae*, 91: 227-237

Bangerth F. 2000. Abscission and thinning of young fruits and their regulation by plant hormones and bioregulators. *Plant Growth Regulation*, 31: 43-59

Berüter J. 1990. Carbohydrate partitioning and changes in water relations of growing apple fruit. *Journal of Plant Physiology*, 135. 5: 583-587

Blažek J., Hlušičkova I., Varga A. 2003. Changes in quality characteristics of Golden Delicious apples under different storage conditions and correlations between them. *Horticultural Science Prague*, 30, 3: 81-89

Botton A., Eccher G., Forcato C., Ferrarini A., Begheldo M., Zermiani M., Moscatello S., Battistelli A., Velasco R., Ruperti B., Ramina A. 2011. Signaling pathways mediating the induction of apple fruitlet abscission. *Plant Physiology*, 155: 185-208

Clark J. 2007. High performance liquid chromatography

<http://www.chemguide.co.uk/analysis/chromatography/hplc.html> (junij, 2013)

Črnko J., Gutman-Kobal Z., Soršak A. 1995, Redčenje cvetja in plodičev jablane. Krško, TRON d.o.o. 54 str.

Dal Cin V., Barbaro e., Danesin M., Murayama H., Velasco R., Ramina A. 2009. Fruitlet abscission: A cDNA-AFLP approach to study genes differentially expressed during shedding of immature fruits reveals the involvement of a putative auxin hydrogen symporter in apple (*Malus domestica* L. Borkh). *Gene*, 442, 1-2: 26-36

Ferlež Rus A. 2010. Fenofaze jablane

www.kmetijskizavod-nm.si/file/2130/download/2515 (junij, 2013)

Gallander J. 1985. Major organic acids in fruits. The science workbook: Student research projects in Food-Agriculture-Natural resources. College of Agriculture, Ohio state university.

<http://www.math.unl.edu/~jump/Center1/Labs/Major%20Organic%20Acids%20in%20Fruits.pdf> (junij, 2013)

Greene D. W. 2006. Effect of auxin transport inhibitors on fruit growth and fruit set of 'Delicious' and 'Golden delicious' apples. Proceedings 33rd PGRSA annual meeting.
http://www.pgrsa.org/archive/2006_Proceedings/papers/036.pdf (julij, 2013)

Grigorian V., Bidarigh Sharemi S. 2003. Study on effective methods for reducing the alternate bearing in golden delicious apple cultivar. Journal of Agricultural Science and Technology, 5:31-37

Guardiola J. L. 1997. Competition for carbohydrates and fruit set. Departamento de Biología Vegetal. Valencia, Universidad Politécnica de Valencia.
http://irrec.ifas.ufl.edu/flcitrus/pdfs/short_course_and_workshop/citrus_flowering_97/Guardiola-Competition_for_Carbohydrates.pdf (julij, 2013)

Gvozdenović D. 1989. Od obiranja sadja do prodaje. Ljubljana, Kmečki glas: 291 str.

Hartman W. 2003. Farbatlas Alte Obst-sorten. Stuttgart, Eugen Ulmer: 318 str.

Jackson D., Looney N., Morley-Bunker M., Thiele G. 2011. Temperate & subtropical fruit production, third edition. Cambridge, Cambridge university Press: 181 str.

Jazbec M., Vrabl S., Juvanc J., Babnik M., Koron D. 1995. Sadni vrt. Ljubljana, Kmečki glas: 375 str.

Viršček Marn M., Stopar M. 1998. Sorte Jabolk. Ljubljana, Kmečki glas: 211 str.

Iwanami H., Moriya-Tanaka Y., Honda C., Wada M., Moriya S., Okada K., Haji T., Abe K. 2012. Relationships among apple fruit abscission, source strength, and cultivar. Scientia Horticulturae, 146: 39-44

Klinar M. 2010. Vpliv jablanovega škrlupa (*Venturia inaequalis* (Cooke) G. Wind/Aderh.) na vsebnost fenolnih spojin v listih jablane (*Malus Domestica* Borkh.) sorte 'Zlati delišes'. Diplomska naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 50 str.

Mehouachi J., Serna D., Zaragoza S., Agusti M., Talon M., Primo-Millo E. 1995. Defoliation increases fruit abscission and reduces carbohydrate levels in developing fruits and woody tissues of *Citrus Unshiu*. Plant Science, 107, 2: 189-197

McPolin O. 2009. An Introduction to HPLC for pharmaceutical analysis. Warrenpoint, Mourne training services: 137 str.
http://www.mournetrainingservices.co.uk/Preview_book_introduction_HPLC.pdf
(julij, 2013)

Rieger M. 2006. Introduction to fruit crops. New York, Haworth food & Agricultural Products press: 462 str.

Sancin V. 1988. Sadje z našega vrta. Trst, Založnišvo tržaškega tiska d.d.: 376 str.

Scherer R., Poloni Rybka A., Augusto Ballus C., Dillenburg Meinhart A., Texeira Filho J., Teixeira G. 2012. Validation of a HPLC method for simultaneous determination of main organic acids in fruits and juices. Food Chemistry, 135: 150-154

Scott P. 2008. Physiology and behaviour of plants. West Sussex, John Wiley& Sons Ltd: 305 str.

Stopar M., Resnik M., Žnidaršič Pongrac V. 2000. Non-structural carbohydrate status and CO₂ exchange rate of apple fruitlets at the time of abscission influenced by shade, NAA or BA. Scientia Horticulturae, 87: 65-76

Sladič M. 2010. Vpliv različnih pripravkov za redčenje na notranjo kakovost plodov jablane (*Malus domestica* Borkh.) pri sortah 'Zlati delišes' in 'Jonagold'. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška Fakulteta: 49 str.

Štampar F., Lešnik M., Veberič R., Solar A., Koron D., Usenik V., Hudina M., Osterc G. 2005. Sadjarstvo. Ljubljana, Kmečki glas: 416 str.

Štampar F. 2010. Rez sadnih rastlin. Ljubljana, ČZD Kmečki glas: 135 str.

Taylor E. J., Whitelaw A. C. 2001. Signals in abscission. *New Phytologist*, 151: 323-339

Veberič R. 2010. Bioactive compounds in fruit plants. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 65 str.

Westwood M. 1993. Temperate-zone pomology. Physiology and culture. 3rd ed. Portland, Timber press: 523 str.

Zhang Y., Li P., Cheng L., 2009. Development changes of carbohydrates, organic acids, amino acids and phenolic compounds in 'Honeycrisp' apple flesh. *Food Chemistry*, 123, 4: 1013-1018

Yuan R., Greene W. D., Benzyladenine as a chemical thinner for 'McIntosh' apples. I. fruit thinning effects and associated relationship with photosynthesis, assimilate translocation, and nonstructural carbohydrates. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 125, 2: 169-176

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorju izr. prof. dr. Robertu VEBERIČU za strokovno pomoč, koristne nasvete in skrben pregled diplomskega

Zahvaljujem se članom komisije doc. dr. Dominik VODNIKU, doc. dr. Borisu KRŠKI, doc. dr. Carlu ANDREOTTI-ju in predsedniku komisije prof. dr. Francu BATIČU za pregled in dopolnila magistrske naloge

Posebno se zahvaljujem staršema, Tonetu in Renati, ker sta mi omogočila študij in me ves čas mojega študija podpirala. Hvala za pomoč, nasvete in podporo.

Hvala bratu Gregorju in njegovemu dekletu Juditi za vse pogovore, spodbudo in pomoč.

Hvala tudi Deniz, za ljubeznivo skrb in podporo pri študiju.

Težko pa se zahvalim vsem tistim, ki sem vas tekom študija spoznal, v tujini in doma, in ste mi študijski čas polepšali na različne načine. Od prijetne družbe na zabavah, do zanimivih debat ob pijači ali pa kar med predavanji. Vsi ste bili brez dvoma odlična družba, brez katere bi študiranje ne bilo tako zabavno, zato se vam vsem skupaj zahvaljujem.

Zahvaljujem se tudi celotnemu kolektivu Biotehniške fakultete, ki je s svojo pomočjo, skrbjo in prijaznostjo poskrbel, da sem se na fakulteti počutil dobro in brezskrbno.

PRILOGA A – SUPPLEMENT A

Povprečna temperatura (°C), padavine (mm), sončno obsevanje (ur), število hladnih dni (t min<0 °C) in število dni s snegom za prvih pet mesecev leta 2013 in dolgoletno povprečje prvih petih mesecev leta (Agencija republike Slovenije za okolje, 2013)

Average temperature (°C), percipiration (mm), solar radiaton (hours), number of cold days (t min <0 °C) and number of days with snow cover in the first five months of 2013 and the average for the first five months (Agencija republike Slovenije za okolje, 2013)

mesec	povprečna t (°C)		Padavine (mm)		sončno obsevanje (ur)		število hladnih dni (t min <0 °C)		dni s snegom	
	2013	povp.	2013	povp.	2013	povp.	2013	povp.	2013	povp.
januar	2	-1,1	91,2	82	56,4	47	16	23,7	19	21
februar	0,9	1,4	195,3	80	25,8	85	20	18,2	26	15,2
marec	3,9	5,4	188,7	98	102,3	128	14	11,5	16	7,5
april	12,4	9,9	91	109	167,2	162	0	2,1	0	1,3
maj	14,8	14,6	217,2	122	180,8	210	0	0,1	0	0,1

PRILOGA B – SUPPLEMENT B

Lestvica BBCH s primerjavo s Fleckingerjevo lestvico z opisi posamezne faze BBCH scale with Fleckinger scale with description of each phase

FLECKINGER	BBCH	opis
ZIMSKO MIROVANJE	A	socvetje list
BRSTENJE	B	00 Cvetni in listni brsti so zaprti in prekriti s temnorjavimi luskami.
ZELENI VRŠIČKI	B	01 Začetek nabrekanja cvetnih in listnih brstov. Brstne luske so razprte, vidne so svetlo obarvane lise.
MIŠJE UHO	C	03 Konec nabrekanja cvetnih in listnih brstov. Brstne luske so svetlo obarvane in prekrite z laski (dlačicami).
ZELENI POPEK	C	07-09 Odpiranje brsta. Vidne so konice zelenih listov, ki pri cvetnih brstih prekrivajo cvetove, pri listnih brstih pa so približno 5 mm nad brstnimi luskami.
RDEČI, ROŽNATI POPEK	D	10 Stadij mlajega ušesa. Konice zelenih listov so 10 mm nad brstnimi luskami, prvi listi so razmaknjeni.
BALON STADIJ	D	19 Cvetni popki so vidni vendar še zaprti, prvi listi pa so že razviti.
ZAČETEK CVETENJA	E	31 Posamezni cvetovi ločeni, vendar še zaprti poganjek začne rasti.
	E2	57 Stadij rožnatih popkov. Cvetni pecji se podašujejo, časni listi so rahlo odprtji, venčni pa komaj opazni. Sredinski cvet razvitejši od ostalih (ima vidno rdečo kapico).
	F	59 Socvetja v balonskem stadiju; venčni listi se začnejo intenzivneje razvijati.
	F	60 Odprtji so prvi cvetovi (sredinski) v socvetju.
	F	61 Začetek cvetenja, odprtih 10 % cvetov.
	F	62 Odprtih okoli 20 % cvetov.
POLNO CVETENJE	F	63 Odprtih okoli 30 % cvetov.
STARANJE CVETOV	F2	64 Odprtih okoli 40 % cvetov.
KONEC CVETENJA	F2	65 Polno cvetenje; odprtih 50 % cvetov, prvi venčni listi začnejo odpadati.
RAZVOJ PLODOV	G	67 Intenzivno odpadvanje venčnih listov.
	H	69 Odpadli vsi venčni listi.
	I	71 Plodici so večji od 10 mm; plodici, ki se niso zavezali po cvetenju odpadajo.
	J	72 Plodici so večji od 20 mm.
	J	73 Sekundarno odpadanje plodiev.

(Ferlež Rus, 2010)

PRILOGA C – SUPPLEMENT C

Povprečni premer in masa plodičev glede na njihov položaj in status šopa plodičev ob vzorčenju.

Average diameter and mass of fruitlets with respect to their position and status of the fruit bunch.

Položaj v šopu	abscizni plodiči		abscizivni zdravi		zdravi plodiči		»king flower«	
	Premer (mm)	Masa (g)	Premer (mm)	Masa (g)	Premer (mm)	Masa (g)	Premer (mm)	Masa (g)
Položaj 1	10,18	0,88	18,10	3,82	18,75	4,10	18,64	4,11
Položaj 2	8,10	0,52	15,64	2,80	16,58	3,14		
Položaj 3	7,42	0,42	15,83	2,76	16,53	3,10		
Položaj 4	7,90	0,49	14,40	2,24	16,41	2,97		
Položaj 5	8,61	0,60	15,09	2,49	16,06	2,80		
Položaj 6	7,83	0,48	13,12	1,72	15,23	2,32		