

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Monika KLINAR

**VPLIV JABLANOVEGA ŠKRLUPA**  
**(*Venturia inaequalis* (Cooke) G. Wind./Aderh.) NA**  
**VSEBNOST FENOLNIH SNOVI V LISTIH JABLANE**  
**(*Malus domestica* Borkh.) SORTE 'ZLATI DELIŠES'**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Monika KLINAR

**VPLIV JABLANOVEGA ŠKRLUPA  
(*Venturia inaequalis* (Cooke) G. Wind./Aderh.) NA VSEBNOST  
FENOLNIH SNOVI V LISTIH JABLANE (*Malus domestica* Borkh.)  
SORTE 'ZLATI DELIŠES'**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**EFFECT OF APPLE SCAB (*Venturia inaequalis* (Cooke) G.  
Wind./Aderh.) ON PHENOLIC CONTENT IN APPLE LEAVES (*Malus  
domestica* Borkh.) CULTIVAR 'GOLDEN DELICIOUS'**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija agronomije.

Rastlinski material za analizo smo nabrali na Laboratorijskem polju Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Analiza vzorcev in statistična obdelava rezultatov sta bili opravljeni na Katedri za sadjarstvo, vinogradništvo in vrtnarstvo Oddelka za agronomijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za agronomijo je za mentorja diplomskega dela imenovala doc. dr. Roberta VEBERIČA.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Franc BATIČ  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: doc. dr. Robert VEBERIČ  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Franci Aco CELAR  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svojega diplomskega dela v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddala v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Monika KLINAR

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn  
 DK UDK 634.11:632.4:631.524.6:547.56 (043.2)  
 KG sadjarstvo/jablana/*Malus domestica*/jablanov škrlup/*Venturia inaequalis*/fenoli  
 KK AGRIS F01/H20  
 AV KLINAR, Monika  
 SA VEBERIČ, Robert (mentor)  
 KZ SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
 ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo  
 LI 2010  
 IN VPLIV JABLANOVEGA ŠKRLUPA (*Venturia inaequalis* (Cooke) G. Wind./Aderh.) NA VSEBNOST FENOLNIH SNOVI V LISTIH JABLANE (*Malus domestica* Borkh.) SORTE 'ZLATI DELIŠES'  
 TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)  
 OP XI, 35 [3] str., 11 pregl., 20 sl., 2 pril., 54 vir.  
 IJ sl  
 JI sl/en  
 AI V nalogi so bile preučevane fenolne spojine v listih na jablanov škrlup (*Venturia inaequalis* (Cooke.) G. Wind. Aderh.) občutljive sorte jablane (*Malus domestica*) 'Zlati delišes'. V poskus so bila vključena drevesa jablane, in sicer dve obravnavanji po deset dreves (škropljena drevesa s fungicidi in kontrolna drevesa, ki niso bila škropljena) iz sadovnjaka Laboratorijskega polja Biotehniške fakultete v Ljubljani. Vzorce smo nabirali v petih terminih, v 21-dnevnih razmikih od 15. junija do 11. septembra 2007. Pri analizi s sistemom visokoločljivostne tekočinske kromatografije (HPLC) smo določili vsebnosti fenolnih spojin iz skupine flavonoidov (epikatehin, katehin in kvercetin glikozide: rutin, kvercetin-galaktozid, kvercetin-glukozid in kvercetin-ramnozid), klorogensko in kavno kislino iz skupine hidroksicimetnih kislin ter floridzin, ki ga uvrščamo v skupino dihidrohalkonov. Razlike med obravnavanji smo ugotovili pri analizi epikatehina, kavne kisline, kvercetin-glukozida in kvercetin-ramnozida. Vsebnost epikatehina je bila v vseh terminih vzorčenja v neškropljenih listih večja kot v škropljenih. Enako velja tudi za kavno kislino, kvercetin-glukozid in kvercetin-ramnozid. Vsebnost katehina se je med rastno dobo zmanjševala. Izmerjene vrednosti so bile v neškropljenih listih večje kot v škropljenih le junija in septembra. Povečano vsebnost klorogenske kisline in rutina zaradi okužbe z jablanovim škrlupom smo zaznali šele v avgustovskem in septembrskem terminu. Koncentracija v neškropljenih listih je bila pri klorogenski kislini skoraj dvakrat večja, pri rutinu pa za tretjino večja, kot v škropljenih listih. Koncentracija kvercetin-galaktozida je bila v prvem vzorčenju večja v listih škropljenih dreves, kot v neškropljenih, v naslednjem terminu je bilo obratno, pri kasnejših vzorčenjih ni bilo razlik med obravnavanji. Vpliva okužbe z jablanovim škrlupom na vsebnost floridzina v listih jablane nismo potrdili, saj se koncentracije med obravnavanji niso razlikovale med rastno dobo. Vsota analiziranih fenolnih snovi pa nam je pokazala, da je vsebnost fenolnih snovi med rastno dobo v neškropljenih listih večja kot pa v škropljenih listih.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
DC UDC 634.11:632.4:631.524.6:547.56 (043.2)  
CX fruit growing/apple tree/*Malus domestica*/apple scab/*Venturia inaequalis*/phenolic compounds  
CC AGRIS F01/H20  
AU KLINAR, Monika  
AA VEBERIČ, Robert (supervisor)  
PP SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy  
PY 2010  
TI EFFECT OF APPLE SCAB (*Venturia inaequalis* (Cooke) G. Wind./Aderh.) ON PHENOLIC CONTENT IN APPLE LEAVES (*Malus domestica* Borkh.) CULTIVAR 'GOLDEN DELICIOUS'  
DT Graduation Thesis (University studies)  
NO XI, 35, [3] p., 11 tab., 20 fig., 2 ann., 54 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB In the research project, phenolic compounds in the leaves on apple scab susceptible apple cultivar 'Golden Delicious' from Laboratory Field of the Biotechnical Faculty in Ljubljana were studied. In the experiment were included ten trees, which were sprayed and ten trees, which were not. Leaf samples were picked at 21- day intervals, five times in the period of 15<sup>th</sup> June to 11<sup>th</sup> September 2007 and were analysed using the system of high performance liquid chromatography (HPLC). In the analysis the levels of phenolic compounds from the group of flavonoids (epicatechin, catechin and quercetin-glycosides: rutin, quercetin-galactoside, quercetin-glucoside and quercetin- rhamnoside), caffeic and chlorogenic acid from the group of hydroxycinnamic acids and phloridzin, which belongs to the group of dihydrochalcone were determined. Differences between treatments in the content of epicatechin, caffeic acid, quercetin-glucoside and quercetin-ramnoside were determined. The content of epicatechin was higher in unsprayed leaves in comparison with healthy ones. The results were the same also for caffeic acid, quercetin-glucoside and quercetin-rhamnoside. During the growth period the content of catechin declined. In June and September the values in infected leaves were higher than in healthy leaves. An increased content of chlorogenic acid and rutin because of scab infection in August and September was measured. In infected leaves the content of chlorogenic acid was almost 2- fold higher and the content of rutin one third higher in comparison to healthy leaves. At first sampling the concentration of quercetin-galactoside was higher in healthy leaves, at the second sampling the concentration was higher in infected leaves. In other tree samplings no statistically significant differences were found. The content of phloridzin in apple leaves did not differ between healthy and infected leaves. The total of analysed phenolic compounds showed that the content of phenolic compounds in infected (not sprayed) leaves was higher in comparison with healthy (sprayed) leaves.

## KAZALO VSEBINE

	Str.
Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Kazalo prilog	X
Okrajšave in simboli	XI
1 <b>UVOD</b>	1
1.1 VZROKI ZA RAZISKAVO	1
1.2 DELOVNA HIPOTEZA	1
1.3 NAMEN RAZISKAVE	1
2 <b>PREGLED RAZISKAV</b>	2
2.1 JABLANOV ŠKRLUP ( <i>Venturia inaequalis</i> (Cooke) G. Wind./ Aderh.)	2
2.2 FENOLNE SNOVI	3
2.2.1 <b>Biosinteza fenolnih spojin</b>	3
2.2.2 <b>Razdelitev fenolnih spojin</b>	5
2.2.2.1 Enostavni fenoli	5
2.2.2.2 Fenolne kisline	5
2.2.2.3 Naftokinoni	6
2.2.2.4 Stilbeni	6
2.2.2.5 Flavonoidi	6
2.2.2.6 Lignin	7
2.2.2.7 Tanini	7
2.3 POVEZAVA MED FENOLNIMI SNOVMI IN ODPORNOSTJO	7
3 <b>MATERIALI IN METODE</b>	9
3.1 LOKACIJA	9
3.1.1 <b>Splošne značilnosti nasada</b>	9
3.1.2 <b>Stanje dreves</b>	9
3.1.3 <b>Klimatske razmere</b>	10
3.2 RASTLINSKI MATERIAL	11
3.2.1 <b>Sorta 'Zlati delišes'</b>	11
3.2.2 <b>Podlaga M9</b>	12
3.3 METODA DELA	12
3.3.1 <b>Priprava vzorca in ekstrakcija fenolov iz listov jablane</b>	12
3.3.2 <b>Analiza s pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC)</b>	13
3.3.2.1 Analiza vzorcev	14
3.3.3 <b>Statistična analiza</b>	15
4 <b>REZULTATI</b>	16
4.1 EPIKATEHIN IN KATEHIN	16

4.2	KAVNA IN KLOROGENSKA KISLINA	18
4.3	FLORIDZIN	20
4.4	KVERCETIN-GALAKTOZID	21
4.5	KVERCETIN-GLUKOZID	22
4.6	KVERCETIN-RAMNOZID	23
4.7	RUTIN	24
4,8	VSOTA ANALIZIRANIH FENOLNIH SNOVI	25
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA</b>	<b>27</b>
<b>6</b>	<b>SKLEPI</b>	<b>30</b>
<b>7</b>	<b>POVZETEK</b>	<b>31</b>
<b>8</b>	<b>VIRI</b>	<b>32</b>

**ZAHVALA**  
**PRILOGE**

## KAZALO PREGLEDNIC

		Str
Preglednica 1	Razvrstitev fenolnih spojin (Abram in Simčič, 1997; Robards, 1999).	5
Preglednica 2	Vsebnost epikatehina (mg/100g) v škropljenih in neškropljenih listih jablane sorte 'Zlati delišes'.	16
Preglednica 3	Vsebnost katehina (mg/100g) v škropljenih in neškropljenih listih jablane sorte 'Zlati delišes'.	16
Preglednica 4	Vsebnost kavne kisline (mg/100g) v škropljenih in neškropljenih listih jablane sorte 'Zlati delišes'.	18
Preglednica 5	Vsebnost klorogenske kisline (mg/100g) v škropljenih in neškropljenih listih jablane sorte 'Zlati delišes'.	19
Preglednica 6	Vsebnost floridzina (mg/100g) v škropljenih in neškropljenih listih jablane sorte 'Zlati delišes'.	20
Preglednica 7	Vsebnost kvercetin-galaktozida (mg/100g) v škropljenih in neškropljenih listih jablane sorte 'Zlati delišes'.	21
Preglednica 8	Vsebnost kvercetin-glukozida (mg/100g) v škropljenih in neškropljenih listih jablane sorte 'Zlati delišes'.	22
Preglednica 9	Vsebnost kvercetin-ramnozida (mg/100g) v škropljenih in neškropljenih listih jablane sorte 'Zlati delišes'.	23
Preglednica 10	Vsebnost rutina (mg/100g) v škropljenih in neškropljenih listih jablane sorte 'Zlati delišes'.	24
Preglednica 11	Vsota analiziranih fenolnih snovi (mg/100g) v škropljenih in neškropljenih listih jablane sorte 'Zlati delišes'.	25



## KAZALO SLIK

		Str.
Slika 1	Splošna strukturna formula fenolne spojine (Taiz in Zeiger, 2006).	3
Slika 2	Shematski prikaz biosinteze fenolnih spojin, prirejeno po Heldt (1997).	4
Slika 3	Splošna strukturna formula flavonoida (Balasundram in sod., 2006).	6
Slika 4	Strukturne formule glavnih skupin flavonoidov (Balasundram in sod., 2006).	7
Slika 5	Povprečne temperature po dekadah (°C) v Ljubljani v letu 2007 (Mesečni bilten, 2007).	10
Slika 6	Povprečna količina padavin (mm) v posameznem mesecu v Ljubljani v letu 2007 (Mesečni bilten, 2007).	10
Slika 7	Plod sorte 'Zlati delišes' (Drevesnica ..., 2010).	11
Slika 8	Oblika plodu sorte 'Zlati delišes' s peščiščem (Zlati delišes ..., 2010).	12
Slika 9	HPLC kromatogram za epikatehin, katehin, kavno in klorogensko kislino pri valovni dolžini 280 nm.	14
Slika 10	HPLC kromatogram za kvercetin-glikozide pri valovni dolžini 280 nm.	14
Slika 11	Vsebnost epikatehina (mg/100g) v škropljenih in neškropljenih listih jablane sorte 'Zlati delišes'.	17
Slika 12	Vsebnost katehina (mg/100g) v škropljenih in neškropljenih listih jablane sorte 'Zlati delišes'.	18
Slika 13	Vsebnost kavne kisline (mg/100g) v škropljenih in neškropljenih listih jablane sorte 'Zlati delišes'.	19
Slika 14	Vsebnost klorogenske kisline (mg/100g) v škropljenih in neškropljenih listih jablane sorte 'Zlati delišes'.	20
Slika 15	Vsebnost floridzina (mg/100g) v škropljenih in neškropljenih listih jablane sorte 'Zlati delišes'.	21

Slika 16	Vsebnost kvercetin-galaktozida (mg/100g) v škropljenih in neškropljenih listih jablane sorte 'Zlati delišes'.	22
Slika 17	Vsebnost kvercetin-glukozida (mg/100g) v škropljenih in neškropljenih listih jablane sorte 'Zlati delišes'.	23
Slika 18	Vsebnost kvercetin-ramnozida (mg/100g) v škropljenih in neškropljenih listih jablane sorte 'Zlati delišes'	24
Slika 19	Vsebnost rutina (mg/100g) v škropljenih in neškropljenih listih jablane sorte 'Zlati delišes'.	25
Slika 20	Vsota analiziranih fenolnih snovi (mg/100g) v škropljenih in neškropljenih listih jablane sorte 'Zlati delišes'.	26

## KAZALO PRILOG

- PRILOGA A Povprečne mesečne temperature in količine padavin
- PRILOGA A1 Mesečna povprečna dnevna temperatura (°C) ter odklon od dolgoletnega povprečja (°C), količina padavin (mm) in količina padavin (%) od dolgoletnega povprečja v rastni dobi 2007 za Ljubljano (Mesečni bilten, 2007).
- PRILOGA A2 Mesečna povprečna dnevna temperatura (°C) po dekadah ter količina padavin (mm) po dekadah v rastni dobi 2007 za Ljubljano (Mesečni bilten, 2007).
- PRILOGA B Termini škropljenja v nasadu v rastni sezoni 2007 ter koncentracija uporabljenih fitofarmaceutskih sredstev.

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

<b>Okrajšava</b>	<b>Pomen</b>
in sod.	In sodelavci
HPLC	Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (ang. High Performance Liquid Chromatography)
PAL	Fenilalanin amoniak liaza
SS	Suha snov
škrlup	Jablanov škrlup
FFS	Fitofarmacevtska sredstva
kvercetin-ramnozid	Kvercetin-3-ramnozid
kvercetin-galaktozid	Kvercetin-3-galaktozid
kvercetin-glukozid	Kvercetin-3-glukozid
rutin	Kvercetin-3-rutinozid

## 1 UVOD

### 1.1 VZROKI ZA RAZISKAVO

Najbolj razširjene sorte jablane, kot so 'Zlati delišes', 'Jonagold', 'Gala' idr. so poznane predvsem po svoji odlični kakovosti in velikem povpraševanju med kupci. Vendar pa te sorte niso odporne na jablanov škrlup, zato jih je potrebno večkrat letno škropiti s fungicidi, da bi zagotovili plodove brez vidnih poškodb zaradi jablanovega škrlupa. V zadnjih letih so bile v sadovnjake uvedene na jablanov škrlup odporne sorte. Na škrlup odporne sorte so obetavne, ker omogočajo pridelavo brez sintetičnih fitofarmaceutskih sredstev (FFS) (ekološka pridelava), imele pa naj bi tudi podobno kakovost kot za škrlup občutljive sorte (Mikulič Petkovšek in sod., 2007).

Jablanov škrlup, ki ga povzroča gliva *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Wind./ Aderh., je najpomembnejša in najpogostejša bolezen na jablani. Gliva zmanjša kakovost plodov in zmanjša asimilacijsko površino zaradi poškodb listov. Glavna nevarnost za okužbo se pojavi spomladi in predvsem v deževnem vremenu, vendar pa nevarnost okužb traja vse do obiranja. Na škrlup odporne sorte kot del obrambe tvorijo fenole, zato smo želeli preveriti, če sorta 'Zlati delišes', glede na to, da je občutljiva na škrlup, tvori več fenolnih snovi v okuženih listih. Pri tej sorti se običajno uporablja fungicide za preprečevanje te bolezni.

### 1.2 DELOVNA HIPOTEZA

Predvidevamo, da se škropljena in neškropljena drevesa razlikujejo po vsebnosti fenolnih snovi v listih jablane. Glede na prejšnje študije predpostavljamo, da je vsebnost fenolnih snovi večja v okuženih listih v primerjavi z zdravimi listi, torej da se vsebnost fenolnih snovi v listih jablane po okužbi z jablanovim škrlupom poveča.

Predvidevamo tudi, da bodo vsebnosti posameznih fenolnih snovi različne med datumi vzorčenja listov.

### 1.3 NAMEN RAZISKAVE

Namen raziskave je ugotoviti, kako se neškropljena in s fungicidi škropljena drevesa razlikujejo po vsebnosti fenolnih snovi v listih ter tako doprinesti k poznavanju interakcij rastlina – patogena gliva.

## 2 PREGLED RAZISKAV

### 2.1 JABLANOV ŠKRLUP (*Venturia inaequalis* (Cooke) G. Wind./Aderh.)

Jablanov škrlup, ki ga povzroča gliva *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Wind./Aderh., je najpomembnejša bolezen na jablani, predvsem na območjih, kjer je obilno spomladansko in poletno deževje. Bolezen se pojavlja v obliki škrlupastih peg na površju listov, brstov in plodov. Večje poškodbe na listni površini zmanjšajo asimilacijsko površino lista, to pa lahko vodi do goljenja dreves. Če se okužba pojavi na plodu že zelo zgodaj, se plod ne razvija normalno, ampak je na prizadetih mestih viden zaostanek v rasti. Tak plod pogosto počni, v rane pa se hitro naseli sadna gniloba (Mikulič Petkovšek in sod., 2009a).

Gliva *Venturia inaequalis* ima spolno in nespolno obliko. Spolna oblika povzroča primarne okužbe spomladi, nespolna oblika pa povzroča sekundarne okužbe med rastno dobo in skladiščenjem. Spolna oblika se razvije čez zimo v okuženem odpadlem listju, v posebnih vrečastih trosiščih s sporami, ki jih imenujemo askospore. Nespolne spore, imenovane konidiji, pa se razvijejo na pegah iz micelija tik pod povrhnjico (Maček, 1990).

Okužba se začne spomladi, ko ob obilnejših padavinah iz trosišč bruhajo zrele askospore. Zračni tokovi jih zanesejo na liste in plodiče jablan. Spore kalijo le, če je listje dovolj dolgo mokro. Hitrost kalitve je odvisna od temperature. Kalitev in prodiranje spore v list se konča z okužbo. Inkubacijska doba, ki je potrebna, da se na listu pokažejo vidna znamenja bolezni - pege, je odvisna od temperature, običajno pa traja od 10 do 17 dni (Maček, 1990). Na listnih pegah nastane nespolna oblika glive - konidiofori in na njih nespolni trosi - konidiji (Maček, 1990).

Jablanov škrlup zmanjša pridelke in kakovost plodov, okuženi plodovi s črnimi škrlupastimi pegami pa zato niso tržno zanimivi (Mikulič Petkovšek in sod., 2009a).

Če želimo v nasadu nadzorovati bolezen, to zahteva 15 ali več škropljenj s fungicidnimi sredstvi na leto. Alternativa je sajenje na jablanov škrlup odpornih sort (Mikulič Petkovšek in sod., 2009a).

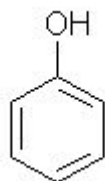
Na jablanov škrlup odporne sorte jabolk imajo znatno večjo vsebnost posameznih in skupnih fenolnih snovi v primerjavi z na škrlup neodpornimi sortami (Mikulič Petkovšek in sod., 2007).

Kemično varstvo jablanovega škrlupa predstavlja precejšen del ukrepov varstva pred škodljivimi organizmi, ki je nujno za varstvo jablanovih nasadov, kadar imamo v nasadu posajeno eno ali več na škrlup neodpornih sort. Parisi in sod. (1994) so ugotovili, da je v Franciji za varstvo pred boleznijo potrebnih 15 do 20 škropljenj na leto, odvisno od leta in regije. Ta intenzivna škropljenja imajo negativen vpliv na koristne organizme, kar pa lahko vodi do razvoja nekaterih škodljivih organizmov (Mercier in sod., 2000; Cuthbertson in Murchie, 2003).

## 2.2 FENOLNE SNOVI

V živih organizmih so prisotne spojine, ki jih delimo na primarne in sekundarne metabolite. Sekundarni metaboliti nastanejo iz primarnih (Abram in Simčič, 1997). Pomen sekundarnih metabolitov za rastlino dolgo časa ni bil poznan, saj naj bi bili nepomembni za rastlino, za njeno rast in razvoj. Vendar pa so ugotovili, da imajo pomembno ekološko funkcijo (Taiz in Zeiger, 2006). Pomembno vlogo imajo pri rasti in razmnoževanju, saj zagotavljajo zaščito pred patogeni in plenilci (Bravo, 1998). Sekundarne metabolite razdelimo v tri večje skupine: terpeni, fenolne spojine in spojine, ki vsebujejo dušik (Abram in Simčič, 1997).

Fenolne spojine so strukturno raznolika in pomembna skupina sekundarnih metabolitov rastlin (Abram in Simčič, 1997). So ene najbolj široko zastopanih skupin fitokemikalij in so fiziološko in morfološko precej pomembne v rastlinah. Struktura rastlinskih fenolov vsebuje aromatski obroč (slika 1), na katerega je pripeta hidroksilna funkcionalna skupina (-OH) oziroma spojine, ki izvirajo iz šikiminske poti in fenilpropanoidnega metabolizma (Robards in sod., 1999).



Slika 1: Splošna strukturna formula fenolne spojine (Taiz in Zeiger, 2006).

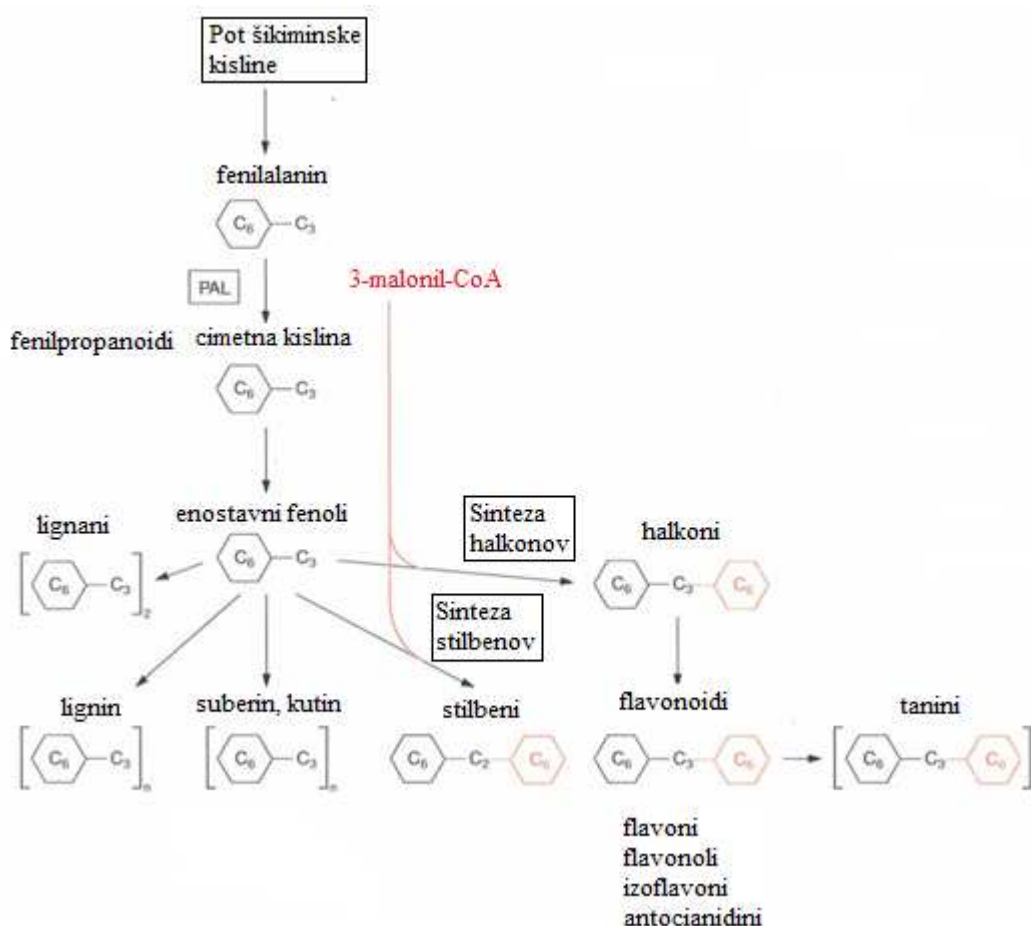
Fenolne snovi imajo neposreden vpliv na metabolizem, rast in razvoj rastline (Kozlowsky in Pallardy, 1997). Kot fiziološko aktivne komponente so koristne za rastlino, ker rastlino varujejo pred stresom, delujejo kot privabila (atraktanti) ali odvrčala (repelenti), poleg tega pa so tudi biokemijski dejavniki, ki vplivajo na odpornost rastline na patogene (Treutter, 2005). V naravi so fenolne spojine pomembne pri obrambi rastlin pred rastlinojedci, delujejo kot kemijske signalne spojine pri cvetenju, oplojevanju in rastlinski simbiozi (Abram in Simčič, 1997).

Fenolne snovi so tudi učinkoviti antioksidanti. Naravni antioksidanti so predvsem polifenolne spojine. Od teh imajo antioksidativni učinek flavonoidi, derivati cimetne kisline in kumarini. Poznano je, da ima velik vpliv na antioksidacijsko sposobnost položaj in razporeditev -OH skupin (Abram in Simčič, 1997).

### 2.2.1 Biosinteza fenolnih spojin

Fenolne spojine so sekundarni metaboliti in vse, razen flavonoidov, nastajajo iz fenilalanina ali njegovega prekursorja, šikiminske kisline. Iz glikolize in pentoza fosfatne poti se enostavni ogljikovi hidrati pretvorijo v aminokislino z aromatskim obročem. Fenolne spojine se nato sintetizirajo preko šikiminske kisline. Sintezo fenolnih spojin

omogoča encim fenilalanin amoniak liaza (PAL), ki povzroči odcepitev molekule amoniaka od fenilalanina. Nastane *trans*-cimetna kislina, iz nje pa naprej cimetna in kumarna kislina ter njuni derivati - fenilpropanoidi, ki gradijo bolj kompleksne fenolne spojine (Taiz in Zeiger, 2006). Biosinteza flavonoidov pa je drugačna. Del flavonoida se namreč sintetizira iz acetil CoA po malonilski poti (Abram in Simčič, 1997) (slika 2).



Slika 2: Shematski prikaz biosinteze fenolnih spojin, prirejeno po Heldt (1997).

Regulacija biosinteze je dokaj pojasnjena za tkivne kulture. Ključni encim je PAL, ki iz fenilalanina katalizira nastanek cimetne kisline, prekursorja za lignin in nekatere alkaloidne in rastlinske fenolne spojine. Aktivnost encima PAL se močno poveča, kadar obsevamo rastlino z rdečo ali UV svetlobo, pod vplivom mikroorganizmov ter pri poškodbah. Fenolne snovi nastajajo v odvisnosti od fizioloških potreb celice (Abram in Simčič, 1997).

Biosinteza in kopičenje sekundarnih spojin sta odvisna od rasti in okoljskih razmer (Mikulič Petkovšek in sod., 2009a). Veberič in sod. (2005) so ugotovili, da ima na vsebnost fenolnih snovi vpliv tudi tehnologija pridelave. Ekološko pridelana jabolka imajo večjo vsebnost fenolnih snovi kot jabolka iz integrirane pridelave, kar pripisujejo različnim stresnim faktorjem v nasadu, kot so bolezni, škodljivci ali pomanjkanje hranil. Vse to vpliva na kopičenje fenolnih snovi. Na sintezo fenolnih snovi vplivajo tudi okoljski



dejavniki. Če je rastlina izpostavljena stresu, je vsebnost fenolnih snovi v rastlini večja (Treutter, 2001; Hamauzu, 2006).

## 2.2.2 Razdelitev fenolnih spojin

Fenolne spojine lahko najboljše razdelimo po številu C-atomov (Robards in sod., 1999; Abram in Simčič, 1997) (preglednica 1). Abram in Simčič (1997) fenolne spojine razdelita na enostavne fenole, fenolne kisline, naftokinone, stilbene, flavonoide, lignane, medtem ko polimerne fenolne spojine na lignin in tanine.

Preglednica 1: Razvrstitev fenolnih spojin (Abram in Simčič, 1997; Robards in sod., 1999).

Število C-atomov	Osnovni skelet	Skupina
6	$C_6$	enostavni fenoli
7	$C_6C_1$	hidroksibenzojske kisline
8	$C_6C_2$	fenilacetne kisline
9	$C_6C_3$	hidroksicimetne kisline, fenilpropeni, kumarini, izokumarini, kromoni
10	$C_6C_4$	naftokinoni
13	$C_6C_1C_6$	ksantoni
14	$C_6C_2C_6$	stilbeni, antrakinoni
15	$C_6C_3C_6$	flavonoidi
18	$(C_6C_3)_2$	lignani, neolignani
30	$(C_6C_3C_6)_2$	biflavonoidi
n	$(C_6C_3)_n$ $(C_6)_n$ $(C_6C_3C_6)_n$	lignini, melanini, kondenzirani tanini (flavolani)

### 2.2.2.1 Enostavni fenoli

Enostavni fenoli s splošno formulo  $C_6$  v rastlinskem svetu niso razširjeni (Abram in Simčič, 1997).

### 2.2.2.2 Fenolne kisline

Najdemo jih skoraj povsod v rastlinah (Abram in Simčič, 1997). Fenolne kisline sestavljata dve podskupini: hidroksibenzojske in hidroksicimetne kisline. V skupino hidroksibenzojskih kislin, s strukturo  $C_6C_1$ , spadajo galna, *p*-hidroksibenzojska, protokatehulna, vanilna in siringinska kislina. Hidroksicimetne kisline pa so aromatske spojine, ki imajo stransko verigo s tremi ogljiki ( $C_6C_3$ ). V tej skupini so v največji meri prisotne kavna, ferulna, *p*-kumarna in sinapinska kislina (Bravo, 1998).

### 2.2.2.3 Naftokinoni

Naftokinoni so fenolne spojine s strukturno formulo  $C_6C_4$  (Abram in Simčič, 1997). Najdemo jih pri oreh (juglon in 1,4-naftokinon) (Colarič in sod., 2005).

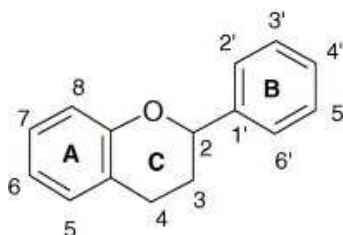
#### 2.2.2.4 Stilbeni

Stilbeni imajo strukturno formulo  $C_6C_2C_6$ . Najbolj znan stilben je resveratrol, ki ga najdemo v grozdju (Robards in sod., 1999).

#### 2.2.2.5 Flavonoidi

Flavonoidi sestavljajo največjo skupino rastlinskih fenolov, saj predstavljajo več kot polovico od osem tisoč v naravi prisotnih fenolnih spojin (Harborne in sod., 1999). Od teh je največ antocianov, katehina, procianidinov, flavonov in flavonolov. Mnogi od njih so obarvani, običajno so v vakuolah, nekatere najdemo tudi v kromoplastih ali kloroplastih (Abram in Simčič, 1997).

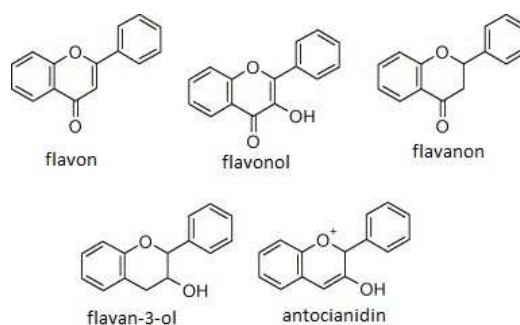
Flavonoide sestavlja petnajst ogljikovih atomov in imajo majhno molekulska maso, njihova osnovna struktura pa je  $C_6C_3C_6$  (Bohm, 1998; Merken in Beecher, 2000; Abram in Simčič, 1997). Flavonoide sestavljajo trije deli, dva aromatska obroča (A in B), ki sta povezana z verigo iz treh ogljikovih atomov, ter heterociklični obroč C (slika 3). Taka struktura je rezultat dveh ločenih metabolnih poti, ena je šikiminska pot (Taiz in Zeiger, 2006), druga pot pa poteka preko acetyl CoA (Abram in Simčič, 1997).



Slika 3: Splošna strukturna formula flavonoida (Balasundram in sod., 2006).

Privlačnost jabolka za potrošnika opredelimo tako z videzom, kot tudi s čvrstostjo mesa, okusom in koristnostjo za zdravje. Flavonoidi kot podskupina fenolov in kot sekundarni rastlinski metaboliti prispevajo k barvi sadja, koristni pa so tudi za zdravje ljudi. Za flavonoide tako velja, da imajo antioksidativne, protimikrobne, antitumorske in antikarcinogene lastnosti (Robards in Antolovich, 1997).

Flavonoide razdelimo na flavone (apigenin, lutelin), flavonole (miricetin, kvercetin), flavan-3-ole (katehin, epikatehin), flavanone (naringenin), dihidroflavonole (taksifolin), antocianidine (cianidin), izoflavone (genistein), kalkone (butein) itd. (Abram in Simčič, 1997) (slika 4).



Slika 4: Strukturne formule glavnih skupin flavonoidov (Balasundram in sod., 2006).

### 2.2.2.6 Lignin

Lignin je razvejan polimer s splošno formulo  $(C_6C_3)_n$ . Je sestavni del celične stene (Abram in Simčič, 1997). Rastlini daje mehansko oporo, zagotavlja stabilnost vaskularnim tkivom v ksilemu, ima pa tudi obrambno funkcijo. Mehanične in kemične lastnosti lignina onemogočajo herbivorom, da bi lignin lahko prebavili. Lignin tudi zavira rast patogenov. V rastlinah se tvori kot odziv na rane. Samo nekaj bakterij in gliv lahko lignin razgradi (Heldt, 1997).

### 2.2.2.7 Tanini

Tanini so tretja najpomembnejša skupina fenolov, imajo relativno veliko molekulsko maso, razdelimo pa jih na hidrolizabilne in kondenzirane tanine. Kondenzirani tanini so polimeri flavonoidov in so tako produkti fenilpropanoidnega metabolizma. Hidrolizabilni tanini pa so poliestri galne kisline. Galna kislina v rastlinah se večinoma tvori iz šikimata (Heldt, 1997).

Tesno so povezani s proteini, saj tvorijo vodikove vezi z  $-NH$  skupino peptidov, teh vezi pa prebavni encimi ne morejo cepiti. Reagirajo tudi z encimi prebavnega trakta rastlinojede živali. Tanini so tako naravna obramba rastline pred živalmi. Rastline varujejo tudi pred mikroorganizmi, saj deaktivirajo encime mikroorganizmov (Heldt, 1997).

## 2.3 POVEZAVA MED FENOLNIMI SNOVMI IN ODPORNOSTJO

Za fenolne spojine sklepajo, da prispevajo k odpornosti rastlin na mehanske strese, ki so posledica ali prisotnih insektov ali mehanskih poškodb, okužb z glivami, bakterijami in virusi. Obrambni mehanizem verjetno vključuje sodelovanje fenolnih spojin pri lignifikaciji celične stene okrog poškodovanega dela. Kot odgovor na stres naj bi rastline izkoristile v celici že prisotne fenolne spojine ali pa zaradi stresa nastale fenolne spojine (fitoaleksini) (Abram in Simčič, 1997). Fitoaleksini so stresni presnovki, za glive strupene snovi, ki jih sintetizirajo višje rastline po okužbi z glivami ali včasih zaradi drugih dražljajev. Delujejo lokalno (Durst in Werck- Reichhart, 1995). Najbolj zanimivi so predvsem tisti, ki se sintetizirajo v sekundarnem metabolizmu. Mnogi fitoaleksini ali

kemične snovi, ki so že predhodno prisotne v rastlinskem tkivu, spadajo prav v skupino fenolnih snovi (Grayer in Kokubun, 2001).

Običajni odgovor rastline na stres je povečanje vsebnosti fenolnih spojin, posebno klorogenske kisline. Neposredno po poškodbi pride do oksidacije že obstoječih fenolnih spojin, v kar je vključena polifenol oksidaza, nato sledi razgradnja in končno zmanjšanje njihove vsebnosti. *O*-kinoni, ki nastanejo po oksidaciji fenolnih spojin, se lahko polimerizirajo in imajo tudi antimikrobno sposobnost, polimerizirani produkti pa lahko obarjajo proteine podobno kot tanini. Prisotnost teh oksidacijskih produktov upočasni in celo inhibira okužbo poškodovanega rastlinskega tkiva s patogenimi mikroorganizmi. Neposredno za tem sledi znatno povečanje vsebnosti fenolnih spojin. Kot je bilo že omenjeno, se okrog rane začne tvoriti lignin in za to sintezo so potrebni prekursorji npr. hidroksicimetna kislina. Tako rastlina zaustavi izgubljanje vode in ustvari se fizična ovira, ki otežuje vstop mikroorganizmom. Številne fenolne spojine v sadežih imajo tudi antimikrobno učinkovitost in zato lahko pripomorejo k obrambi rastline zaradi stresa. Take spojine so klorogenska kislina, *p*-kumarna kislina, heterozidi kavne kisline v oljkah, 6,7-dimetoksikumarin v citrusih, resveratrol v grozdju itd. (Abram in Simčič, 1997).

Sekundarne spojine v rastlinah so močno prisotne v interakcijah med patogeni in rastlinami. Fenolne spojine naj bi sodelovale pri odpornosti jablane na jablanov škrlup (*Venturia inaequalis*). Fenoli so toksični za patogene (primer takih fenolov so flavanoli in hidroksicimetne kisline). Flavanoli v jabolkih imajo zelo pomembno vlogo pri odpornosti na jablanovi škrlup (Mikulič Petkovšek in sod., 2009a). Zmožnost akumuliranja flavanolov po infekciji v tkivih, ki obdajajo okužene dele, je odvisna od tega, ali je sorta odporna ali občutljiva (Treutter in Feucht, 1990b) in je dodaten dokaz, da so te snovi res prisotne v obrambnem mehanizmu jablane na jablanov škrlup (Mayr in sod., 1995). Na škrlup odporne sorte imajo večjo vsebnost flavanolov in hidroksicimetne kisline, vendar pa na škrlup neodporne sorte prav tako lahko kopičijo flavanole v tkivu, ki obdaja okužene dele (Mikulič Petkovšek in sod., 2009a).

Predhodne študije so pokazale (Mayr in sod., 1997; Michalek in sod., 1999), da je za uspešno obrambo pred patogeni nujna hitra biosinteza flavanolov, ki se začne pri fenilalaninu. Zaviranje delovanja encima PAL vodi do resnih znamenj jablanovega škrlupa, zaradi zmanjšane akumulacije flavonola. Poleg tega so nadaljnje raziskave pokazale, da dodajanje dušika za rast zmanjša akumulacijo flavanonida v listih, s tem pa se poveča občutljivost na škrlup (Rühmann in sod., 2002; Leser in Treutter, 2005; Strissel in sod., 2005).

Treutter in Feucht (1990a) sta ugotovila, da je skupna vsebnost flavanolov v kožici na škrlup odpornih sort trikrat večja kot v na škrlup neodpornih sortah. Fenolne snovi se tvorijo in shranjujejo v zdravih rastlinskih celicah, kjer obdajajo ranjene in okužene celice. Poškodovane celice tvorijo in oddajajo signalne snovi, ki potujejo do zdravih celic. Zato je aktivnost encimov, ki oksidirajo fenole, v prizadetem tkivu večja, kot pa v zdravem. Različne ravni fenolov lahko vplivajo na zaščito rastline (Mikulič Petkovšek in sod., 2009a).

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 LOKACIJA

Poskus je bil izveden leta 2007 v poskusnem sadovnjaku na Laboratorijskem polju Biotehniške fakultete v Ljubljani. Nasad je razdeljen na standardni in ekološki nasad. V ekološkem nasadu se varstvo rastlin izvaja z bioinsekticidi ter pripravki na podlagi bakra in žvepla, v standardnem nasadu pa je varstvo prilagojeno integrirani pridelavi, pri kateri se uporabljajo insekticidi, fungicidi in akaricidi. Jablane so bile v polni rodnosti.

##### 3.1.1 Splošne značilnosti nasada

Nasad jablan je bil posajen leta 2001. Vzorčna drevesa jablan na laboratorijskem polju so bila posajena na podlagi M9. Drevesa niso bila namakana. Škropljena drevesa so bila tretirana v skladu s zahtevami integrirane pridelave. Vendar pa smo kljub uporabi fungicidov na listih opazili znamenja jablanovega škrlupa. Vremenski dejavniki (temperatura in padavine) so bili v letu 2007 primerni za razvoj jablanovega škrlupa.

##### 3.1.2 Stanje dreves

V nasadu smo tekom sezone izvajali program škropljenja po standardih za integrirano pridelavo (priloga B). Škropili smo 13-krat v rastni dobi od aprila do avgusta.

Okuženost listov na neškropljenih drevesih se je skozi sezono povečevala. V juniju smo pri neškropljenih drevesih zabeležili srednje močno okužbo, ko je bilo inficiranih vsaj 20 % listov, do septembra so se poškodbe večale in dosegle nad 75 % inficiranih listov.

Na kontrolnih drevesih smo zabeležili minimalne okužbe s škrlupom. Na začetku sezone smo liste ocenili z oceno 9 (brez znamenj okužbe), med rastno dobo pa smo prišli do ocene 6 (do 5 % listov z vsaj eno pego). Za analize smo uporabili samo zdrave liste.

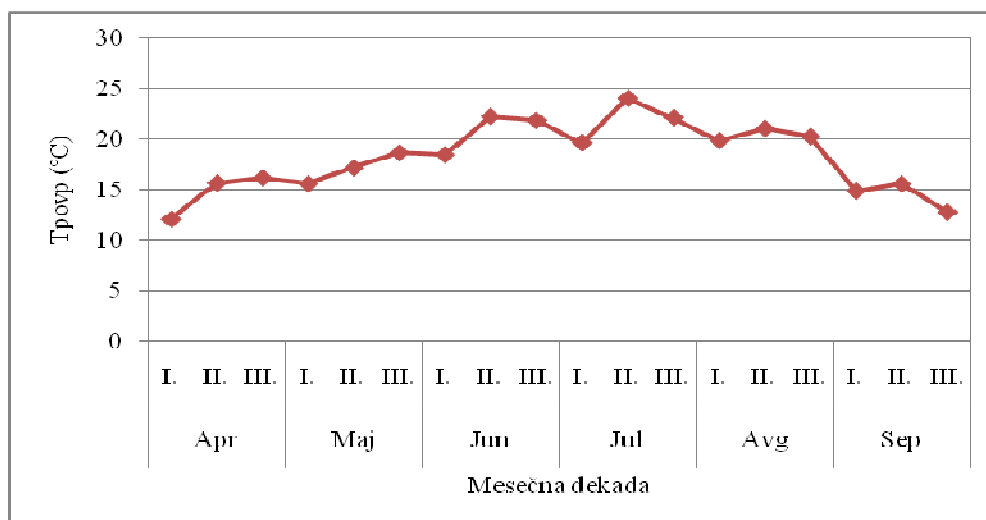
Okužbo z jablanovim škrlupom smo ocenjevali po lestvici, kjer smo vrednotili stanje okuženosti z ocenami od 1 do 9 (cit. po Veberič, 1998):

- |   |     |
|---|-----|
| ▪ brez vidnih znamenj okužbe                      | 9   |
| ▪ nekaj malih peg – minimalna okužba              | 8   |
| ▪ do 5 % listov z vsaj eno pego – slaba okužba    | 6-7 |
| ▪ okrog 20 % inficiranih listov- srednja okužba   | 4-5 |
| ▪ okrog 50 % inficiranih listov- močna okužba     | 2-3 |
| ▪ nad 75 % inficiranih listov – zelo močna okužba | 1   |

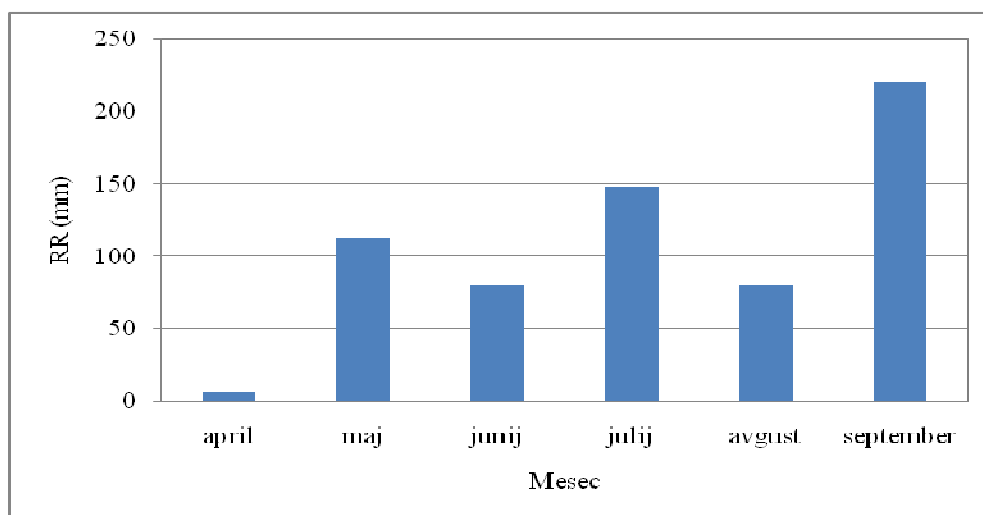
### 3.1.3 Klimatske razmere

Leto 2007 je bilo nadpovprečno toplo leto, temperature so bile višje od dolgoletnega povprečja (priloga A1). Temperature od aprila do avgusta so bile nad dolgoletnim povprečjem, le prvi jesenski mesec je prekinil zaporedje nadpovprečno toplih mesecev (slika 5).

Padavine so bile v aprilu, maju, juniju in avgustu, v vseh mesecih pod dolgoletnim povprečjem (priloga A2). V juliju je bilo več padavin kot običajno. Padavine so bile septembra 2007 povsod precej nad dolgoletnim povprečjem (slika 6).



Slika 5: Povprečne temperature po dekadah (°C) v Ljubljani v letu 2007 (Mesečni bilten ..., 2007).



Slika 6: Povprečna količina padavin (mm) v posameznem mesecu v Ljubljani v letu 2007 (Mesečni bilten ..., 2007).

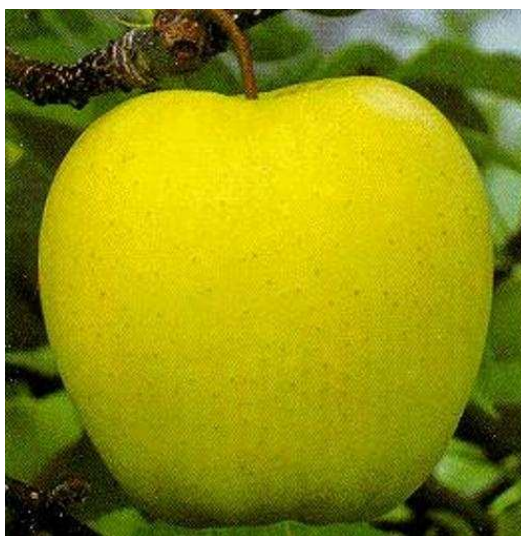
## 3.2 RASTLINSKI MATERIAL

V raziskavo smo vključili drevesa jablane sorte 'Zlati delišes', cepljena na podlago M9.

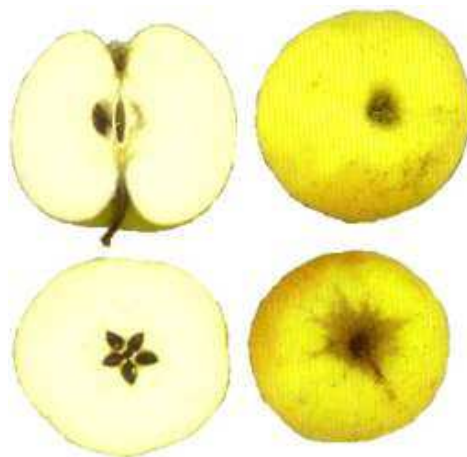
### 3.2.1 Sorta 'Zlati delišes'

Sorta 'Zlati delišes' ('Golden Delicious') je ameriškega izvora in je naključni sejanec, ki je bila leta 1916 uvedena v pridelavo. Spada med glavne sorte slovenskega sadnega izbora in je ena najbolj razširjenih sort jablan na svetu. Sorta 'Zlati delišes' ima tudi veliko klonov, ki se od izhodiščne sorte razlikujejo predvsem po načinu razraščanja in po pojavu rje na kožici, ki je pri tej sorti moteča (Viršček Marn in Stopar, 1998) (slika 7).

'Zlati delišes' zori v zadnji dekadi septembra. Ima dobre skladiščne sposobnosti, v kontrolirani atmosferi zdrži tudi do junija. Rodnost je obilna in redna, včasih tudi izmenična. Zato je 'Zlati delišes' potrebno redčiti. Rast je srednje bujna, krošnja pa razprostrta in zmerno gosta. Zelo občutljiva je na jablanov škrup, pa tudi na viroze in bakrove pripravke. Je zelo prilagodljiva, za visoko kakovost plodov pa potrebuje bogata, srednje vlažna, prepustna tla ter ne pretoplo in ne prehladno podnebje. Plodovi so srednje debeli do debeli. So okroglasti, okroglasto kopasti, kopasti ali podolgovato kopasti in simetrični ter nekoliko rebrasti. Oblika je močno odvisna od vremena in vremenskih razmer. Plodovi istega drevesa so po obliki precej izenačeni. Koža je suha in gladka, bolj ali manj močno prekrita s sivo- do rumenorjavo mrežasto rjo, ki močno kvari videz plodov. Obseg rje je odvisen od vremenskih razmer in oskrbe. Zelenkastorumena barva z dozorevanjem prehaja v zlato rumeno. Lenticele so srednje številne, sivozelene in svetlo obrobljene ali rjaste in različno velike. Pecelj je dolg do zelo dolg, tanek in prožen, pogosto ukrivljen in na koncu malo zadebeljen. Meso je zelenkastorumeno do kremasto, sočno in čvrsto do srednje čvrsto, sladko, z blago kislino in žlahtno aromo (slika 8). Plodovi so občutljivi za otiske in prevoze (Viršček Marn in Stopar, 1998).



Slika 7: Plod sorte 'Zlati delišes' (Drevesnica ..., 2010).



Slika 8: Oblika plodu sorte 'Zlati delišes' s peščičem (Zlati delišes ..., 2010).

### 3.2.2 Podlaga M9

Podlaga M9 je podlaga za jablane. Je najbolj razširjena šibkorastoča vegetativna podlaga. Drevesa potrebujejo oporo. Raste v lahkih in težkih tleh. Občutljiva je na prekomerno vlago v tleh. Drevesa, cepljena na to podlago, obilno in zgodaj rodijo. Plodovi so debeli in lepo obarvani (Štampar in sod., 2005). Drevesa, cepljena na podlago M9, so nizka in so primerna za sajenje v nasadu. Podlaga je občutljiva na nizke temperature, še posebej na zimsko pozebo. Močno odganja koreninske izrastke. Odporna je na gnilobo koreninskega vratu (Jazbec in sod., 1985).

## 3.3 METODA DELA

### 3.3.1 Priprava vzorca in ekstrakcija fenolov iz listov jablane

Liste smo vzorčili leta 2007. V poskus so bila vključena drevesa jablane sorte 'Zlati delišes', in sicer dve obravnavanji po deset dreves (škropljena drevesa s fungicidi in kontrolna drevesa, ki so bila škropljena po standardnem škropilnem programu, brez uporabe fungicidov). Vzorčenje listov smo začeli 15. junija in ga nadaljevali vse poletje. Zadnje vzorce smo pobrali 11. septembra. Vzorce smo pobrali na 21 dni. Za posamezno obravnavanje smo naredili pet ponovitev.

Z vsakega drevesa smo nabrali po deset razvitih zdravih oz. okuženih listov. Nabirali smo mlade, fotosintetsko aktivne, polno razvite liste, in sicer 3. ali 4. list od vrha poganjka. Vzorce listov smo zamrznili v tekočem dušiku in jih do začetka laboratorijskih analiz hranili v zamrzovalniku pri  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Laboratorijske analize so temeljile na merjenju vsebnosti fenolnih snovi v vzorcih listov jablane. Fenole smo določili s pomočjo HPLC (High performance liquid chromatography) – tekočinske kromatografije visoke ločljivosti.



Vzorci za analizo na HPLC smo pripravili tako, da smo liste jablane od vsakega posameznega vzorčenja in glede na to, ali so bili škropljeni ali ne, dali v tarilnico in jih prelili s tekočim dušikom. Tako smo zdrobili iz listov fin prah. Zatehtali smo 1 g snovi, ki smo jo prelili z 20 ml ekstrakcijske raztopine. Ekstrakcijsko raztopino je sestavljal metanol, ki je vseboval 1 % 2,6-di-tert-butil-4-metilfenol (BHT). BHT smo uporabili, da bi preprečili oksidacijske procese med ekstrakcijo. Vzorce smo nato za 1 uro potopili v ultrazvočno kopel. V centrifugi smo jih centrifugirali 7 minut pri 10.000 obratih pri 4 °C. Supernatant smo nato skozi poliamidne filtre prefiltrirali v vialo, ki smo jih shranili v zamrzovalniku pri -20 °C do HPLC analiz.

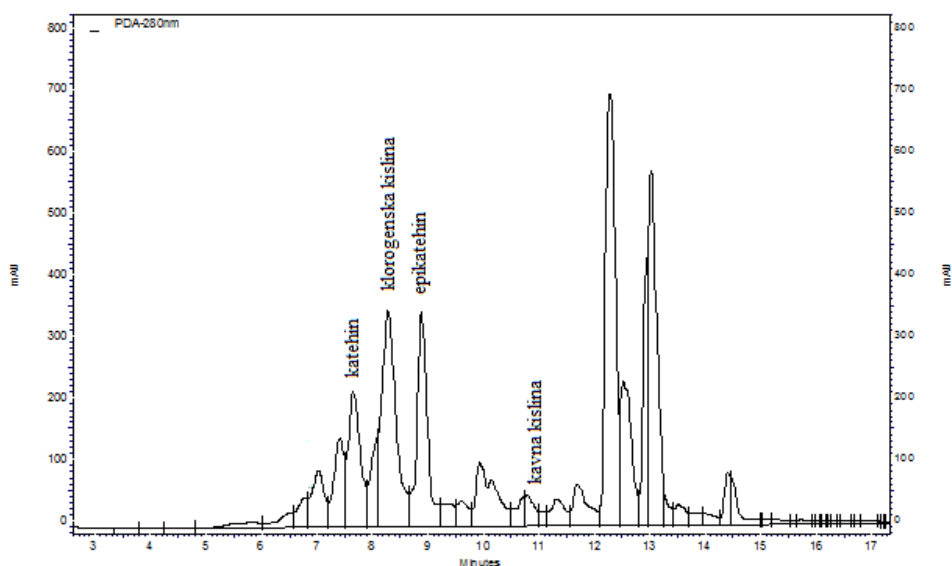
### 3.3.2 Analiza s pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC)

Za separacijo in določanje fenolnih snovi v različnih delih rastline najpogosteje uporabljamo različne vrste kromatografij. Kromatografske tehnike temeljijo na porazdelitvi vzorca med mobilno in trdno fazo (Pečavar, 1998).

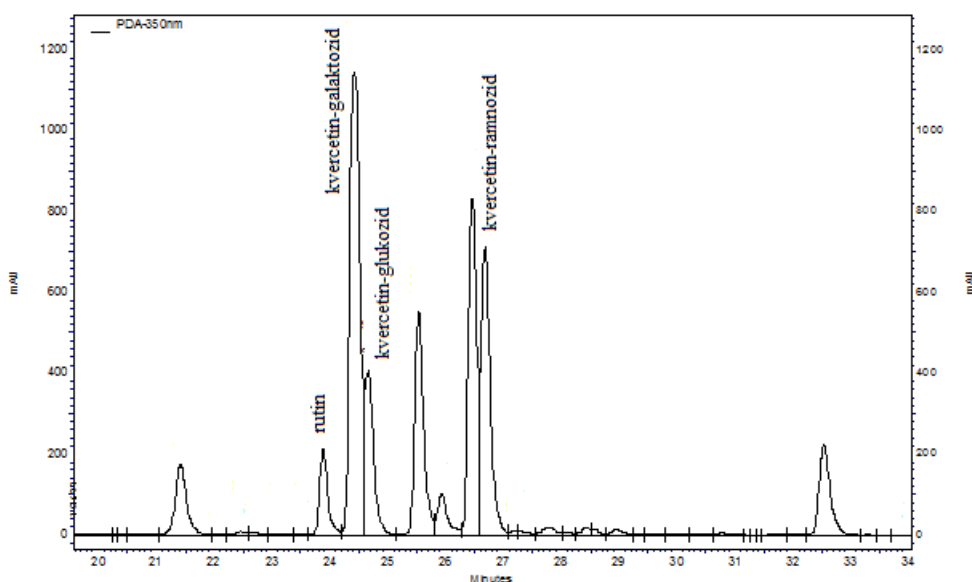
Kromatografska analiza je postopek, kjer ločimo posamezne komponente vzorca in jih nato zaznamo z ustreznim detektorjem (Žorž, 1991).

Sistem HPLC sestavljajo: rezervoar z mobilno fazo, črpalka, injektor, kolona, detektor in rekorder. Sodobni HPLC sistemi so opremljeni tudi z računalnikom z ustrežno programsko opremo.

Pri HPLC molekule vzorca na poti skozi kolono prehajajo med mobilno in stacionarno fazo, pri čemer se premikajo le z mobilno fazo, v stacionarni fazi pa mirujejo. Natančnost analize je odvisna od stabilnosti pretoka. Pri adsorpcijski in reverzni kromatografiji se stacionarna in mobilna faza ločita v polarnosti, pri ionski izmenjalni kromatografiji pa se ločita na osnovi njunega električnega naboja. Pri tem pride do različne porazdelitve določenih komponent med obe fazi, zaradi česar različne komponente vzorca različno dolgo potujejo skozi kolono. Bistven del sistema HPLC je kolona, saj v njej potekajo najpomembnejši procesi separacije. Stacionarna faza se nenehno malo raztaplja v mobilni fazi. Retenzijski čas je definiran kot čas, ki ga komponenta prebije v koloni. Ta je značilen za določeno komponento in ga pri konstantnem pretoku lahko uporabimo za njeno identifikacijo. Detektor je najšibkejši člen kromatografskega sistema in kontinuirano zaznava posamezne komponente po prehodu skozi kolono. Organske molekule večinoma absorbirajo svetlobo valovne dolžine 254 in 280 nm. Rekorder zapisuje električni signal analogno v obliki kromatografskega zapisa, dobljene rezultate pa v obliki vrhov (slika 9 in slika 10) (Žorž, 1991).



Slika 9: HPLC kromatogram za epikatehin, katehin, klorogensko in kavno kislino pri valovni dolžini 280 nm.



Slika 10: HPLC kromatogram za kvercetin-glikozide pri valovni dolžini 350 nm.

### 3.3.2.1 Analiza vzorcev

Fenolne spojine smo analizirali na tekočinskem kromatografu modela Surveyor (Thermo Finnigan San Jose, ZDA). Detekcija fenolnih spojin je potekala pri valovni dolžini 280 in 350 nm. Hidroksicimetne kisline, hidroksibenzojske kisline in flavan-3-oli so bili analizirani pri 280 nm, floridzin in kvercetin-glikozide pa pri 350 nm. Spekter je bil sneman v območju valovne dolžine od 200-400 nm. Uporabili smo kolono Phenomenex Gemini C<sub>18</sub> (150 x 4,60 mm, 3 μm) pri 25 °C. Ločevanje fenolnih spojin je potekalo z mešanjem dveh mobilnih faz. Volumen injiciranjega vzorca je bil 10 μl in hitrost pretoka 1 ml/min.

Fenolne spojine smo določili s primerjavo retenzijskih časov, UV spektrov in dodatkov standardne raztopine v vzorcu. Koncentracije fenolnih spojin smo izračunali iz višine vrhov na kromatogramu za vzorce in ustrezne standarde. Koncentracije smo izrazili v mg/100g suhe snovi oz. v mg/g suhe snovi. Metoda je povzeta po Mikulič in sod., 2004. Analiza na HPLC sistemu je bila opravljena na Katedri za sadjarstvo, vinogradništvo in vrtnarstvo Biotehniške fakultete v Ljubljani.

### **3.3.3 Statistična analiza**

Podatke, ki smo jih dobili z izračuni, smo uredili v preglednice in grafikone v programu Microsoft Office Excel 2007 in jih statistično obdelali s pomočjo programa Statgraphic Plus for Windows 4.0 z enosmerno statistično analizo variance (ANOVA). Razlike med obravnavanji smo testirali s pomočjo testa mnogoterih primerjav (LSD- test) pri tveganju  $p < 0,05$ . Statistično značilne razlike smo označili s črkami ali zvezdicami. Obravnavanja, pri katerih nismo ugotovili statistično značilne razlike, so označena z isto črko. V preglednicah in grafikonih so podane povprečne vrednosti in standardne napake za opazovani parameter.

V diplomskem delu so rezultati predstavljeni tabelarično in grafično.

## 4 REZULTATI

Fenolne snovi so pomemben dejavnik pri obrambi rastline pred patogeni. V listih jablane sorte 'Zlati delišes' smo identificirali 9 različnih fenolnih snovi: epikatehin, katehin, klorogensko kislino, kavno kislino, floridzin ter kvercetin-galaktozid, kvercetin-glukozid, kvercetin-ramnozid in rutin.

Rezultate analiz, vsebnosti fenolnih snovi v listih jablane smo statistično obdelali in jih predstavljamo v tabelarni in grafični obliki. Vsebnosti posameznih fenolnih spojin smo izrazili v mg/100 g suhe snovi (SS).

### 4.1 EPIKATEHIN IN KATEHIN

Flavan-3-oli, kamor spadata epikatehin in katehin, so bili prav tako identificirani v analiziranih listih.

Preglednica 2: Vsebnost epikatehina (mg/100g) v škropljenih in neškropljenih listih jablane sorte 'Zlati delišes' med rastno dobo.

Termin	Neškropljeno	Škropljeno
15.6.	22,5 ± 1,4 <b>a</b>	13,9 ± 1,4 <b>b</b>
6.7.	11,3 ± 1,5	10,8 ± 1,6
27.7.	9,8 ± 0,8 <b>a</b>	4,9 ± 0,6 <b>b</b>
17.8.	27,9 ± 2,5 <b>a</b>	10,4 ± 1,2 <b>b</b>
11.9.	24,0 ± 0,7 <b>a</b>	9,9 ± 1,1 <b>b</b>

Različne črke v vrstici pomenijo statistično značilne razlike med obravnavanji po LSD-testu pri intervalu zaupanja 5 % ( $p < 0,05$ ). Prikazane so povprečne vrednosti ± standardna napaka.

Preglednica 3: Vsebnost katehina (mg/100g) v škropljenih in neškropljenih listih jablane sorte 'Zlati delišes' med rastno dobo.

Termin	Neškropljeno	Škropljeno
15.6.	42,3 ± 3,0 <b>a</b>	31,6 ± 3,5 <b>b</b>
6.7.	31,0 ± 3,9	22,7 ± 2,8
27.7.	21,8 ± 2,7	19,1 ± 2,0
17.8.	17,1 ± 2,1 <b>b</b>	25,1 ± 1,4 <b>a</b>
11.9.	18,8 ± 1,1 <b>a</b>	12,4 ± 1,2 <b>b</b>

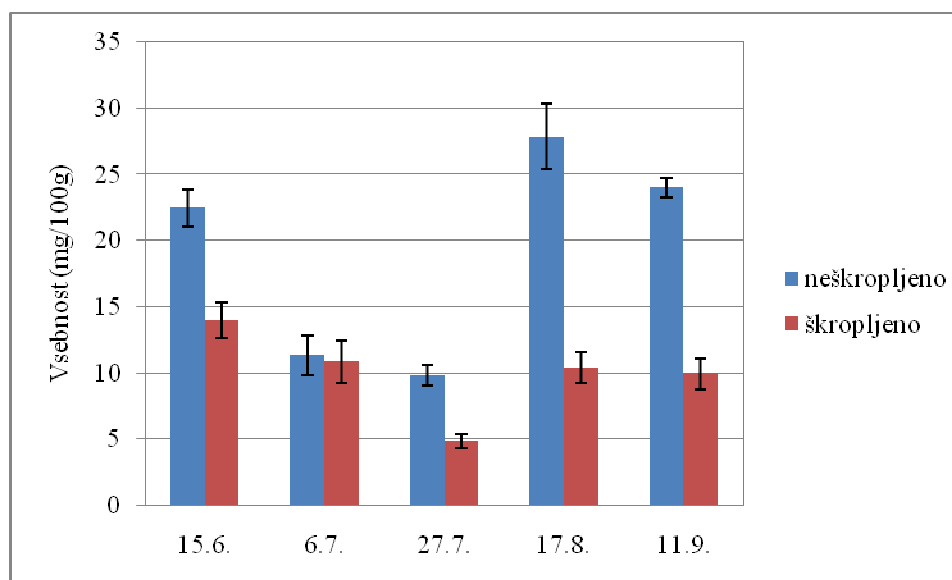
Različne črke v vrstici pomenijo statistično značilne razlike med obravnavanji po LSD-testu pri intervalu zaupanja 5 % ( $p < 0,05$ ). Prikazane so povprečne vrednosti ± standardna napaka.

V škropljenih listih jablane je vsebnost epikatehina v primerjavi z vsebnostjo v neškropljenih listih manjša (preglednica 2, slika 9). Vsebnost epikatehina v škropljenih listih je skozi celotno rastno dobo bolj ali manj konstantna, medtem ko vsebnost

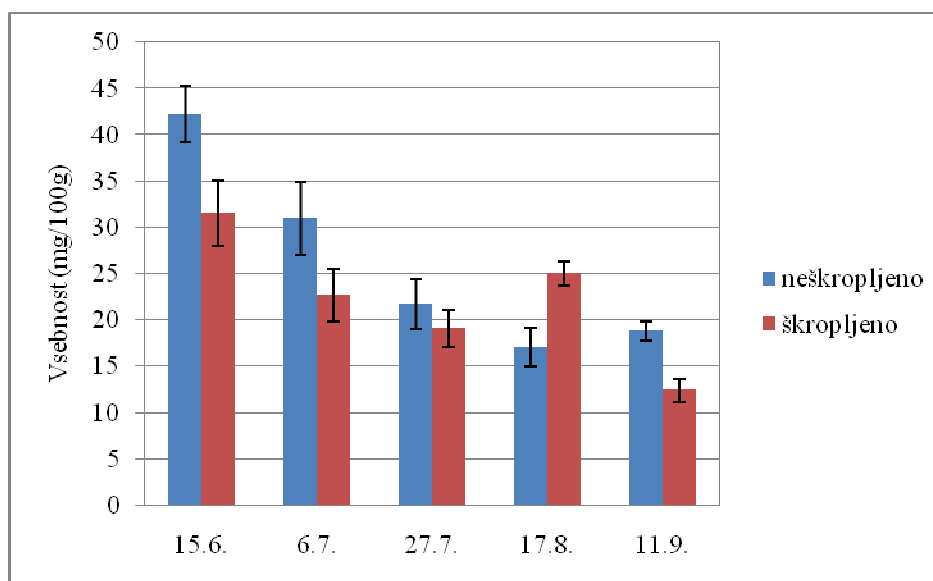
epikatehina v neškropljenih listih močno variira. Vsebnost katehina v neškropljenih listih skozi rastno dobo močno upada, saj je v juniju vrednost katehina v neškropljenih listih 42,3 mg/100g, septembra pa le še 18,8 mg/100g. V podobnem razmerju upada tudi vsebnost katehina v škropljenih listih. Povečanje katehina v škropljenih listih se pojavi avgusta, ko je vsebnost katehina v škropljenih (25,1mg/100g) listih večja kot v neškropljenih (17,1mg/100g).

Majhno vsebnost epikatehina smo izmerili v škropljenih listih v tretjem terminu konec julija (4,9 mg/100g). Največjo vrednost epikatehina pa vsebujejo neškropljeni listi, ki smo jih vzorčili v četrtem terminu avgusta (27,9 mg/100g).

Povprečna vrednost epikatehina v neškropljenih listih je 19,1 mg/100g, v škropljenih pa 10,0 mg/100g. Povprečna vrednost katehina v neškropljenih listih je 26,2 mg/100g. Povprečna vrednost katehina v škropljenih listih pa je samo malo manjša od vrednosti v neškropljenih listih, tj. 22,2 mg/100g.



Slika 11: Vsebnost epikatehina (mg/100g) v škropljenih in neškropljenih listih jablane sorte 'Zlati delišes'.



Slika 12: Vsebnost katehina (mg/100g) v škropljenih in neškropljenih listih jablane sorte 'Zlati delišes'.

#### 4.2 KAVNA IN KLOROGENSKA KISLINA

Obe kislini uvrščamo med derivate cimetine kisline. To so spojine z aromatskim obročem (Bravo, 1998).

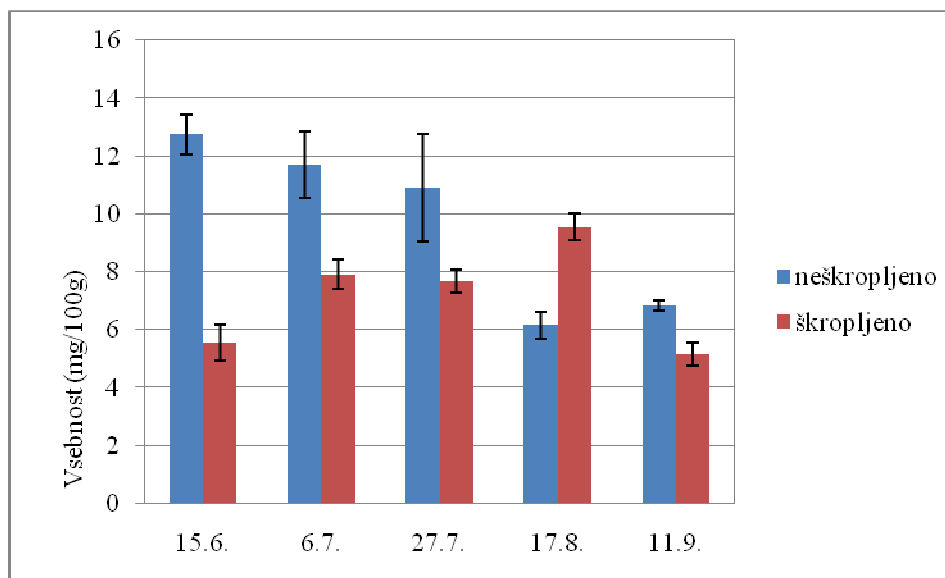
Preglednica 4: Vsebnost kavne kisline (mg/100g) v škropljenih in neškropljenih listih jablane sorte 'Zlati delišes' med rastno dobo.

Termin	Neškropljeno	Škropljeno
15.6.	12,7 ± 0,7 <b>a</b>	5,6 ± 0,6 <b>b</b>
6.7.	11,7 ± 1,2 <b>a</b>	7,9 ± 0,5 <b>b</b>
27.7.	10,9 ± 1,9	7,7 ± 0,4
17.8.	6,5 ± 0,5 <b>b</b>	9,5 ± 0,5 <b>a</b>
11.9.	6,8 ± 0,2	5,1 ± 0,4

Različne črke v vrstici pomenijo statistično značilne razlike med obravnavanji po LSD-testu pri intervalu zaupanja 5 % ( $p < 0,05$ ). Prikazane so povprečne vrednosti ± standardna napaka.

Primerjava vsebnosti kavne kisline v škropljenih in neškropljenih listih je pokazala statistično značilno razliko razen v terminu konec julija (preglednica 4, slika 11). V neškropljenih listih je bila vsebnost kavne kisline junija precej večja, kot v škropljenih listih. Razlika v prid vsebnosti kavne kisline v škropljenih listih se pojavi le avgusta, ko vsebnost kavne kisline naraste na 9,5 mg/100g v primerjavi z vsebnostjo 6,2 mg/100g, ki jo doseže kavna kislina v neškropljenih listih. V drugem julijskem terminu pa med obravnavanji ni statistično značilnih razlik.

Povprečna vrednost kavne kisline v škropljenih listih je bila 7,2 mg/100g, v neškropljenih pa 9,7 mg/100g.



Slika 13: Vsebnost kavne kisline (mg/100g) v škropljenih in neškropljenih listih jablane sorte 'Zlati delišes'.

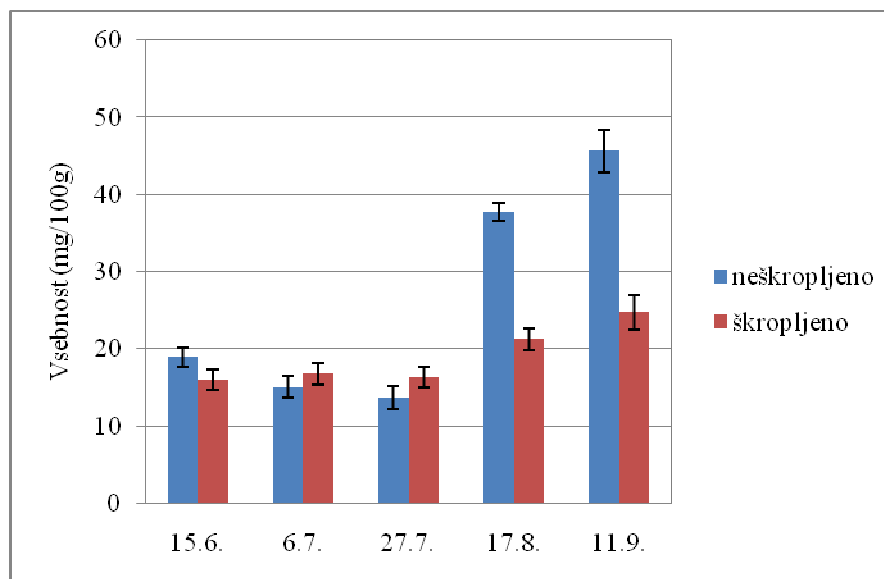
Preglednica 5: Vsebnost klorogenske kisline (mg/100g) v škropljenih in neškropljenih listih jablane sorte 'Zlati delišes' med rastno dobo.

Termin	Neškropljeno	Škropljeno
15.6.	18,9 ± 1,3	16,0 ± 1,3
6.7.	15,1 ± 1,4	16,8 ± 1,4
27.7.	13,7 ± 1,5	16,4 ± 1,4
17.8.	37,8 ± 1,1 <b>a</b>	21,3 ± 1,4 <b>b</b>
11.9.	45,7 ± 2,8 <b>a</b>	24,7 ± 2,2 <b>b</b>

Različne črke v vrstici pomenijo statistično značilne razlike med obravnavanji po LSD-testu pri intervalu zaupanja 5 % ( $p < 0,05$ ). Prikazane so povprečne vrednosti ± standardna napaka.

Kot je razvidno iz preglednice 5, v vsebnosti klorogenske kisline v junijskem in julijskih terminih ni statistično značilnih razlik. Vsebnosti so majhne, v primerjavi s kasnejšimi termini vzorčenja (slika 12). V avgustu pa se zgodi preobrat in se vsebnost klorogenske kisline v neškropljenih listih močno poveča. Poveča se tudi vsebnost klorogenske kisline v škropljenih listih, vendar le malo, to je za 4,9 mg/100g, medtem ko se v neškropljenih listih poveča za 24,1 mg/100g. Vsebnost klorogenske kisline se septembra poveča še za dodatnih 7,9 mg/100g. V avgustu in septembru je med obravnavanji statistično značilna razlika.

Povprečna vsebnost klorogenske kisline v neškropljenih listih je bila 26,2 mg/100g, v škropljenih listih pa 19,0 mg/100g.



Slika 14: Vsebnost klorogenske kisline (mg/100g) v škropljenih in neškropljenih listih jablane sorte 'Zlati delišes'.

### 4.3 FLORIDZIN

Floridzin je fenolna spojina, ki ga uvrščamo v skupino dihidrohalkonov.

Preglednica 6: Vsebnost floridzina (mg/100g) v škropljenih in neškropljenih listih jablane sorte 'Zlati delišes' med rastno dobo.

Termin	Neškropljeno	Škropljeno
15.6.	176,5 ± 15,0	162,0 ± 13,1
6.7.	141,1 ± 13,1	127,6 ± 12,1
27.7.	115,5 ± 13,4	133,2 ± 10,0
17.8.	159,7 ± 17,5	199,3 ± 11,9
11.9.	137,9 ± 5,3	146,4 ± 9,8

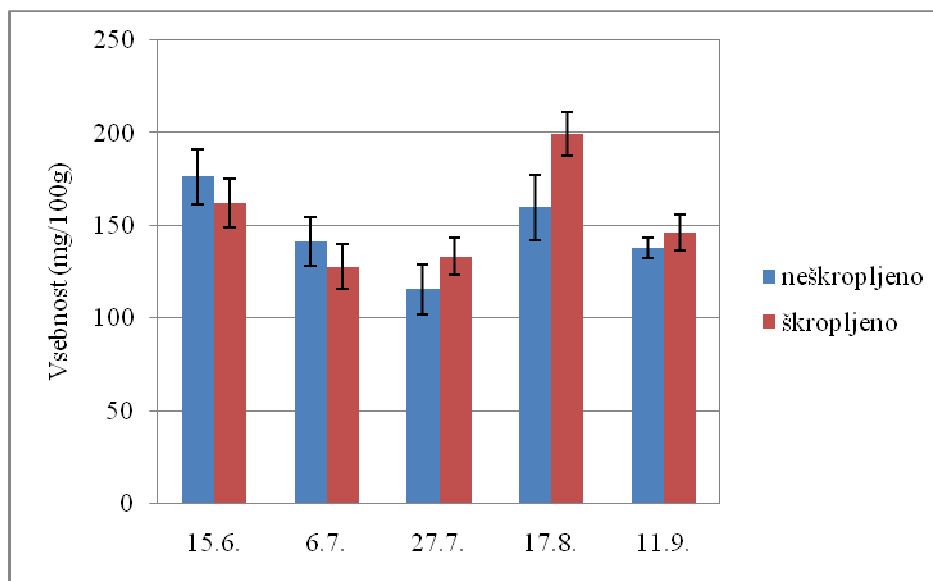
Prikazane so povprečne vrednosti ± standardna napaka.

Iz preglednice 6 lahko vidimo, da med vsebnostmi floridzina v škropljenih in neškropljenih listih ni bilo statistično značilnih razlik. Junija in v prvem terminu julija je bila vsebnost floridzina malenkost večja v neškropljenih listih, v drugem terminu julija, v avgustu in septembru pa je bila vsebnost floridzina večja v škropljenih listih, vendar ne statistično značilno (slika 13).

Koncentracija dihidrohalkona floridzina je bila, poleg kvercetin-glukozida in kvercetin-ramnozida, v listih jablane od vseh fenolnih snovi največja. Vrednosti v zdravih listih so bile v razponu od 127,6 do 199,3 mg/100g, v neškropljenih listih pa od 115,5 do 176,5



mg/100g. Povprečje vsebnosti floridzina v škropljenih listih je bilo 153,71 mg/100g, v neškropljenih pa 146,12 mg/100g.



Slika 15: Vsebnost floridzina (mg/100g) v škropljenih in neškropljenih listih jablane sorte 'Zlati delišes'.

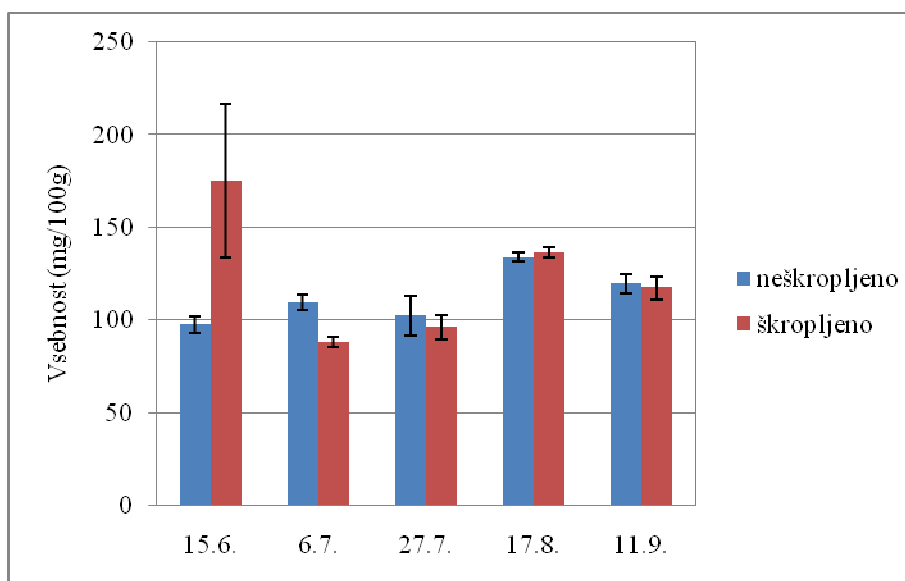
#### 4.4 KVERCETIN-GALAKTOZID

Preglednica 7: Vsebnost kvercetin-galaktozida (mg/100g) v škropljenih in neškropljenih listih jablane sorte 'Zlati delišes' med rastno dobo.

Termin	Neškropljeno	Škropljeno
15.6.	97,4 ± 4,4	175,4 ± 41,5
6.7.	109,5 ± 3,9 <b>a</b>	88,1 ± 2,6 <b>b</b>
27.7.	119,5 ± 10,9	117,5 ± 6,4
17.8.	134,0 ± 2,5	136,3 ± 2,8
11.9.	119,5 ± 5,3	117,5 ± 6,2

Različne črke v vrstici pomenijo statistično značilne razlike med obravnavanji po LSD-testu pri intervalu zaupanja 5 % ( $p < 0,05$ ). Prikazane so povprečne vrednosti ± standardna napaka.

Primerjava vsebnosti kvercetin-galaktozida v škropljenih in neškropljenih listih jablane nam pokaže, da med obravnavanji ni statistično značilnih razlik, razen v prvem julijskem terminu, ko je vsebnost kvercetin-galaktozida v neškropljenih listih za 21,5 mg/100g večja, kot v škropljenih listih (preglednica 7, slika 14). Povprečje vsebnosti kvercetin-galaktozida v neškropljenih listih je 112,5 mg/100g, povprečje v škropljenih listih pa 122,64 mg/100g. Vsebnost kvercetin-galaktozida v škropljenih listih v junijskem terminu najbolj odstopa od povprečja.



Slika 16: Vsebnost kvercetin-galaktozida (mg/100g) v škropljenih in neškropljenih listih jablane sorte 'Zlati delišes'.

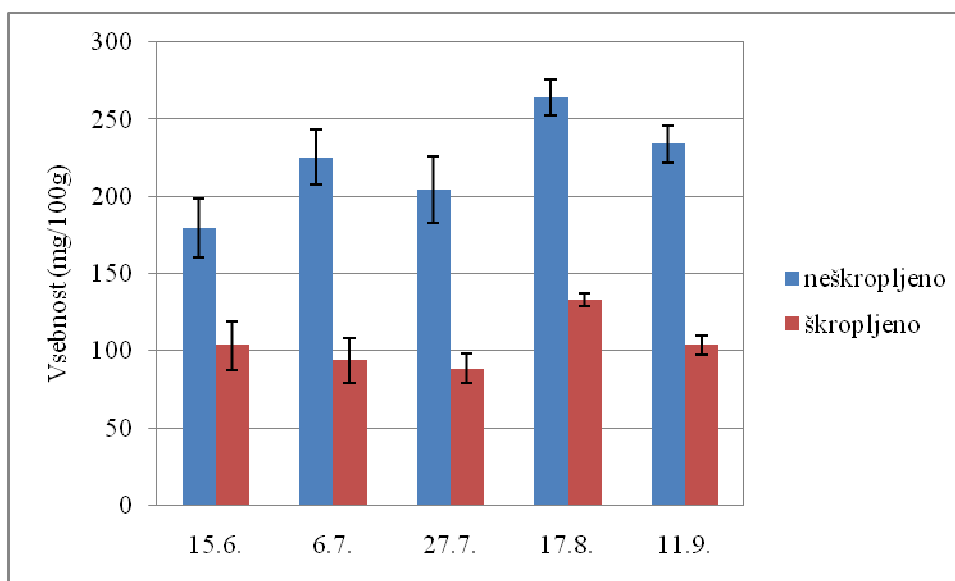
#### 4.5 KVERCETIN-GLUKOZID

Preglednica 8: Vsebnost kvercetin-glukozida (mg/100g) v škropljenih in neškropljenih listih jablane sorte 'Zlati delišes' med rastno dobo.

Termin	Neškropljeno	Škropljeno
15.6.	179,6 ± 18,9 a	103,6 ± 15,8 b
6.7.	225,5 ± 18,0 a	93,9 ± 14,6 b
27.7.	204,5 ± 21,6 a	88,8 ± 9,5 b
17.8.	264,4 ± 11,6 a	133,2 ± 4,5 b
11.9.	234,1 ± 12,2 a	103,8 ± 6,1 b

Različne črke v vrstici pomenijo statistično značilne razlike med obravnavanji po LSD-testu pri intervalu zaupanja 5 % ( $p < 0,05$ ). Prikazane so povprečne vrednosti ± standardna napaka.

Primerjava vsebnosti kvercetin-glukozida med škropljenimi in s škrlupom okuženimi listi jablane sorte 'Zlati delišes' je pokazala statistično značilne razlike v vseh petih terminih (preglednica 8). V škropljenih listih je bilo statistično značilno manj kvercetin-glukozida kot v neškropljenih. Največja vsebnost kvercetin-glukozida je bila v neškropljenih listih izmerjena v avgustovskem terminu, in sicer 264,4 mg/100g. Povprečna vsebnost kvercetin-glukozida v škropljenih listih je bila 104,6 mg/100g, v neškropljenih listih pa 221,6 mg/100g (slika 15).



Slika 17: Vsebnost kvercetin-glukozida (mg/100g) v škropljenih in neškropljenih listih jablane sorte 'Zlati delišes'.

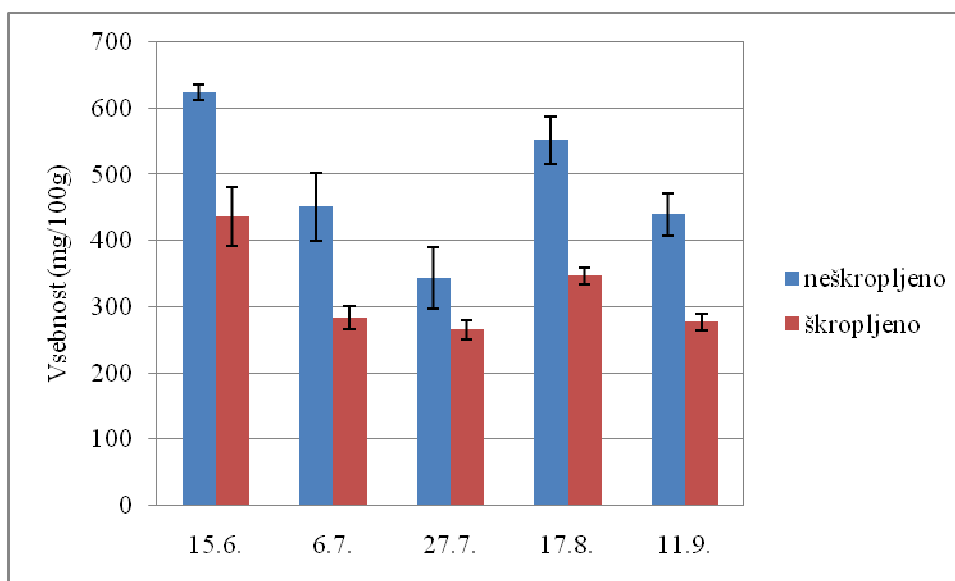
#### 4.6 KVERCETIN-RAMNOZID

Preglednica 9: Vsebnost kvercetin-ramnozida (mg/100g) v škropljenih in neškropljenih listih jablane sorte 'Zlati delišes' med rastno dobo.

Termin	Neškropljeno	Škropljeno
15.6.	624,4 ± 11,8 a	436,9 ± 44,5 b
6.7.	451,0 ± 50,6 a	284,1 ± 17,4 b
27.7.	344,0 ± 46,4	265,0 ± 14,0
17.8.	552,0 ± 35,9 a	346,5 ± 12,1 b
11.9.	439,5 ± 32,3 a	277,2 ± 12,6 b

Različne črke v vrstici pomenijo statistično značilne razlike med obravnavanji po LSD-testu pri intervalu zaupanja 5 % ( $p < 0,05$ ). Prikazane so povprečne vrednosti ± standardna napaka.

Razlike v vsebnosti kvercetin-ramnozida so bile med škropljenimi in neškropljenimi listi v štirih terminih statistično značilne, le v enem terminu niso bile statistično značilne (preglednica 9). V vseh petih terminih je bila vsebnost kvercetin-ramnozida v neškropljenih listih večja, kot v škropljenih. Povprečna vsebnost kvercetin-ramnozida v škropljenih listih je bila 321,9 mg/100g, v neškropljenih listih pa 482,2 mg/100g. Vsebnost kvercetin-ramnozida v neškropljenih listih je bila največja v junijskem terminu, in sicer 624,4 mg/100g, najmanjša pa v drugem julijskem terminu, ko smo izmerili 344,0 mg/100g. Največjo vrednost je kvercetin-ramnozid v škropljenih listih dosegel v junijskem terminu (436,9 mg/100g), najmanjšo pa prav tako kot pri neškropljenih listih, v drugem julijskem terminu (265,0 mg/100g) (slika 16).



Slika 18: Vsebnost kvercetin-ramnozida (mg/100g) v škropljenih in neškropljenih listih jablane sorte 'Zlati delišes'.

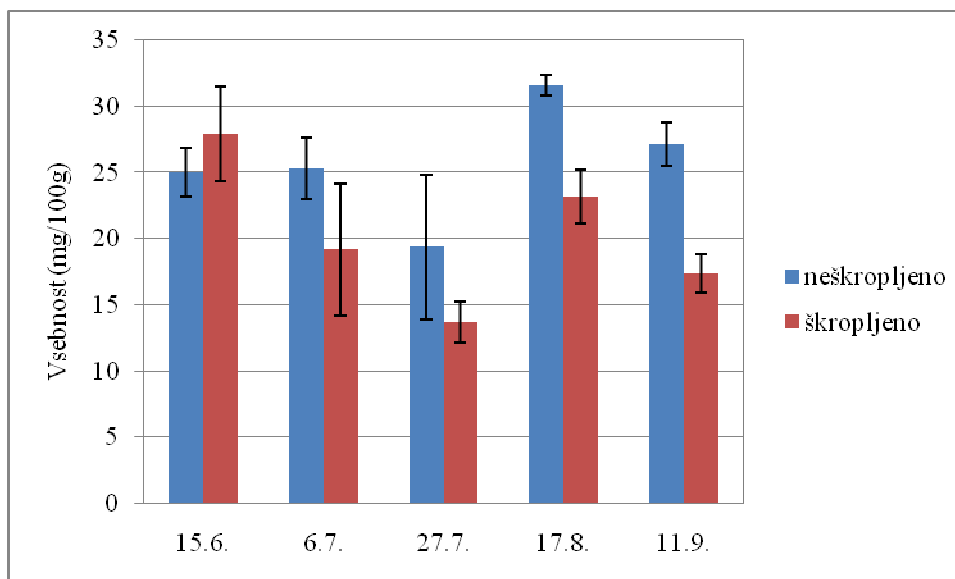
#### 4.7 RUTIN

Preglednica 10: Vsebnost rutina (mg/100g) v škropljenih in neškropljenih listih jablane sorte 'Zlati delišes' med rastno dobo.

Termin	Neškropljeno	Škropljeno
15.6.	25,0 ± 1,8	27,9 ± 3,6
6.7.	25,3 ± 2,3	19,2 ± 5,0
27.7.	19,4 ± 5,5	13,7 ± 1,6
17.8.	31,6 ± 0,8 <b>a</b>	23,2 ± 20,0 <b>b</b>
11.9.	27,2 ± 1,7 <b>a</b>	17,4 ± 1,4 <b>b</b>

Različne črke v vrstici pomenijo statistično značilne razlike med obravnavanji po LSD-testu pri intervalu zaupanja 5 % ( $p < 0,05$ ). Prikazane so povprečne vrednosti ± standardna napaka.

Junija je bila vsebnost rutina v škropljenih listih večja kot v neškropljenih listih, vendar razlike niso bile statistično značilne. V vseh ostalih terminih je bila vsebnost rutina večja v neškropljenih listih. Največjo vrednost rutina smo izmerili v neškropljenih listih v avgustu, tj. 31,6 mg/100g. Statistično značilni razlike med obravnavanji smo ugotovili v avgustu in septembru. V prvih treh terminih pa ni statistično značilne razlike med obravnavanji. Povprečna vrednost rutina v neškropljenih listih je bila 25,7 mg/100g, v škropljenih listih pa 20,3 mg/100g (preglednica 10, slika 17).



Slika 19: Vsebnost rutina (mg/100g) v škropljenih in neškropljenih listih jablane sorte 'Zlati delišes'.

#### 4.8 VSOTA ANALIZIRANIH FENOLNIH SNOVI

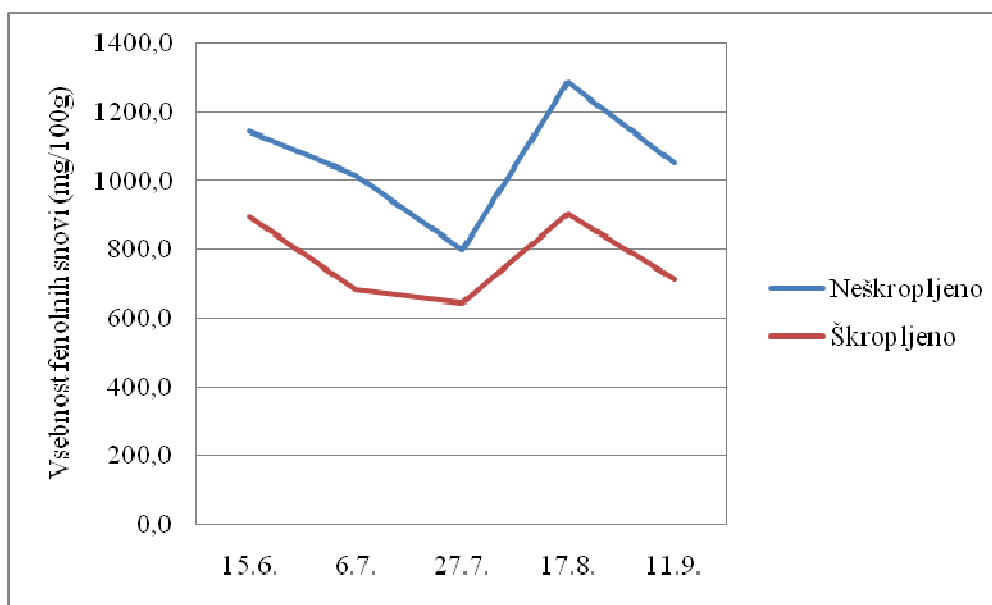
Primerjali smo vsoti fenolnih snovi, glede na termin vzorčenja in glede na to, ali je bilo drevo škropljeno ali ne.

Preglednica 11: Vsota analiziranih fenolnih snovi (mg/100g) v škropljenih in neškropljenih listih jablane sorte 'Zlati delišes'.

Termin	Neškropljeno	Škropljeno
15.6.	1.143,0 ± 71,9	897,5 ± 89,7
6.7.	1.016,0 ± 72,9 <b>a</b>	682,1 ± 60,2 <b>b</b>
27.7.	798,1 ± 84,3	644,4 ± 43,4
17.8.	1.287,4 ± 26,5 <b>a</b>	904,7 ± 31,4 <b>b</b>
11.9.	1.050,2 ± 50,9 <b>a</b>	714,5 ± 39,2 <b>b</b>

Različne črke v vrstici pomenijo statistično značilne razlike med obravnavanji po LSD-testu pri intervalu zaupanja 5 % ( $p < 0,05$ ). Prikazane so povprečne vrednosti ± standardna napaka.

Iz preglednice 11 je razvidno, da je vsota analiziranih fenolnih snovi precej večja pri neškropljenih listih, kot pa pri škropljenih. Tudi slika 20 prikazuje, da je vsebnost fenolnih snovi med rastno dobo večja v vseh terminih. Statistično značilno se ne razlikujejo vsebnosti v junjskem in drugem julijskem terminu. Vsebnosti vsote analiziranih fenolnih snovi pa se statistično značilno razlikujejo v prvem julijskem terminu ter v avgustovskem in septembrskem terminu. Vsebnosti vsote analiziranih fenolnih snovi so največje v avgustovskem terminu.



Slika 20: Vsota analiziranih fenolnih snovi (mg/100g) v škropljenih in neškropljenih listih jablane sorte 'Zlati delišes'.

## 5 RAZPRAVA

V okviru našega poskusa smo analizirali vsebnosti različnih fenolnih snovi v listih jablane. Analizirali smo epikatehin, katehin, kavno in klorogensko kislino, floridzin, kvercetin galaktozid, glukozid, ramnozid ter rutin.

Jablana, sorte 'Zlati delišes' ni odporna na jablanov škrlup, zato so nas predvsem zanimale razlike v vsebnosti določene fenolne snovi v zdravih oz. okuženih listih ter spremembe vsake posamezne fenolne spojine skozi rastno dobo od junija do septembra.

Fenolne snovi se omenjajo tudi kot stresni metaboliti, saj njihov nastanek stimulirajo številni zunanji dejavniki kot so svetloba, kisik, temperatura, pomanjkanje vode in mehanske poškodbe (Swanson, 1993). Fenolne snovi naj bi prispevale k odpornosti rastline na mehanski stres. Mehanski stres je tudi okužba patogena. Rastlina se pred tem zavaruje tako, da tvori naravne snovi, ki so, v našem primeru za glivo, strupene. Vendar pa je za uspešno okužbo odgovornih več dejavnikov. Vreme je pomemben dejavnik pri okužbi, saj vlažno in deževno vreme pospešuje kalitev spor. V rastni dobi v letu 2007 so bile ugodne razmere za razvoj jablanovega škrupa.

Pri poskusu smo ugotovili, da se vsebnost fenolnih snovi v zdravih in okuženih listih razlikuje. Vsebnost se spreminja glede na obravnavanje, pa tudi glede na termin vzorčenja.

Ker se je izkazalo, da je bilo leto 2007 toplo, bi lahko to vplivalo na tvorbo fenolnih snovi.

Vsebnost epikatehina je bila večja v neškropljenih listih, tudi razlike v vsebnosti so med posameznimi termini večje, kot pri škropljenih.

Vsebnost katehina je bila največja na začetku rastne dobe, potem pa se med rastno dobo zmanjšuje. Tak trend je prisoten pri vsebnostih v škropljenih in neškropljenih listih. Solar in sod. (2006) poročajo o enakem vzorcu vsebnosti katehina v enoletnih poganjkih oreha skozi rastno dobo. V nasprotju s tem pa so Colarič in sod. (2006, 2007) poročali o vsebnosti katehina v listih hruške z največjo doseženo vrednostjo v začetku septembra.

V škropljenih listih je bilo od 4,9 do 13,9 mg/100g epikatehina in od 12,4 do 31,6 mg/100g katehina. Vrednosti za katehin so podobne kot tiste, o katerih sta poročala Leser in Treutter (2005) (20-75 mg/100g).

Ugotovili smo, da okuženi listi vsebujejo večje vsebnosti epikatehina (1,1 do 2,7-krat več) in katehina (1,2 do 1,5-krat več) kot pa zdravi listi. Treutter in Feucht (1990b) sta poročala o 6-krat večji vsebnosti flavan-3-olov v listih hruške, okužene z glivo *Gymnosporangium sabinae* v primerjavi z zdravimi tkivi. Treutter in Feucht (1990a), Picinelli in sod. (1995) in Mayr in sod. (1997) so ugotovili, da so se flavan-3-oli akumulirali v tkivih jablane, ki je bila okužena z glivo *Venturia inaequalis*. V listih češnje, okužene z glivo *Blumeriella jaapii*, so tudi odkrili večje vsebnosti katehina, epikatehina in procianidinov B2, B5 in C1, v primerjavi z zdravimi listi (Niederleitner in sod., 1994). Leser in Treutter (2005) sta

poročala, da so pri odporni sorti jablane 'Rewena' izmerili večje vrednosti katehina kot pri sorti 'Zlati delišes'.

Flavan-3-oli naj bi zavirali encime, ki jih izloča patogena gliva. Prav to pa naj bi bil razlog za prisotnost katehinov v obrambnem mehanizmu rastline (Treutter in Feucht, 1990a).

Vse te ugotovitve in rezultati nakazujejo na povezavo med naravno obrambo rastline in patogeno glivo *Venturia inaequalis*.

Vsebnost kavne kisline je bila junija v okuženih listih več kot dvakrat večja, kot v zdravih listih. Ta razlika se sicer glede na termin zmanjšuje, vendar je ob koncu vzorčenja vsebnost kavne kisline v okuženih listih še vedno večja, kot v zdravih. Ti podatki pa ne potrjujejo rezultatov raziskave Leser in Treutter (2005), ki sta poročala o tem, da se vsebnost hidroksicimetnih kislin med rastno dobo poveča v listih okuženih s škrlupom. Williams in Kuć (1969) pa sta v svojih raziskavah ugotovila, da hidroksicimetne kisline zavirajo rast in sporulacijo glive.

Klorogenska kislina je pomembna hidroksicimetna kislina. Sintetizirana klorogenska kislina se porabi za sintezo celične stene in predstavlja pomemben del obrambe pred patogenimi mikroorganizmi (Tomás- Barberán in sod., 1997).

Količinsko je bila klorogenska kislina najbolj zastopana hidroksicimetna kislina. V okuženih listih je bilo tudi do 1,9-krat več klorogenske kisline kot v zdravih. Mikulič Petkovšek in sod. (2009b) tudi poročajo o tem, da se vsebnost klorogenske kisline v okuženih listih poveča za 1,1- do 7,6-krat v primerjavi z zdravimi listi. Mikulič Petkovšek in sod. (2007) tudi trdijo, da stres povzroča povečanje vsebnosti klorogenske kisline. Vsebnost klorogenske kisline v na škrlup odpornih sortah je večja kot v na škrlup občutljivih sortah. Tako kot se je pokazalo v našem poskusu, tudi v mnogih raziskavah poročajo prav o tem, da naj bi bila klorogenska kislina vključena v obrambni mehanizem rastline (Mikulič Petkovšek in sod., 2003).

Zaključimo lahko, da okužba z glivo povzroči povečanje vsebnosti hidroksicimetnih kislin v listih jablane.

Dihidrohalon floridzin pogosto povezujemo z odpornostjo na številne bolezni. Zdrava rastlinska tkiva imajo pomembno manjše vsebnosti floridzina kot okužena tkiva. Okužba z jablanovim škrlupom pospeši sintezo floridzina v listih jablane (Mikulič Petkovšek in sod., 2009b).

Glede na to, da pri floridzinu ni bilo statistično značilnih razlik med obravnavanji, lahko sklepamo, da v našem poskusu floridzin ni ključna snov, ki rastlini pomaga pri obrambi pred patogeni.

Treutter (2001) ter Leser in Treutter (2005) pa v nasprotju z našimi ugotovitvami poročajo o tem, da je bila vsebnost floridzina v listih jablane največja od vseh fenolnih snovi. Ugotovili so tudi, da okužba z glivo povzroči večjo akumulacijo floridzina v okuženih listih, ki so vsebovali od 1,6 do 3,4-krat več floridzina, kot zdravi listi.



Vsebnosti kvercetin-galaktozida v škropljenih in neškropljenih listih se statistično značilno ne razlikujeta. Iz naših rezultatov tako sklepamo, da za naš poskus kvercetin-galaktozid nima pomembne vloge v obrambi pred patogeni oz. se tvori, ne glede na to, ali je rastlina okužena z glivo ali ne.

Za razliko od kvercetin-galaktozida, je bila vsebnost kvercetin-glukozida v okuženih listih od 1,7- do 2,4-krat večja, kot v zdravih listih. Prav tako je bilo tudi kvercetin-ramnozida več v okuženih listih, in sicer od 1,3- do 1,6-krat več kot v zdravih listih. Glede na vsebnost, je bilo teh dveh kvercetin glikozidov največ v listih. Tako lahko povzamemo, da se količinsko v zdravi rastlini tvori precej kvercetin-glukozida in kvercetin-ramnozida, če pa je rastlina okužena, se ta vsebnost še dodatno poveča, v povprečju od 1,3- do 2,4-krat.

Treutter (2001) je poročal o tem, da listi vsebujejo večjo vrednost kvercetinov, kot pa kožica ploda. Tudi Feucht (1994) je ugotovil, da s škruplom okuženi listi akumulirajo flavonole. Za razliko od njiju pa Picinelli in sod. (1995) niso ugotovili povezave med vsebnostjo flavonolov in odpornostjo na jablanov škrup pri jablani.

Rutina je, glede na naše rezultate, več v okuženih listih, in sicer so bile vrednosti v zdravih listih od 13,7 do 27,9 mg/100g, v okuženih listih pa od 19,4 do 31,6 mg/100g. Escarpa in Gonzales (1998) sta v svoji raziskavi dobila podobne rezultate, saj so se vrednosti rutina v listih gibale od 13,6 do 67,1 mg/100g.

Kot poroča Feucht (1994), okužba s škruplom povzroči povečanje sinteze flavonolov rutina in kvercetrina, kar pomeni, da listi, okuženi z glivo *V. inaequalis* akumulirajo flavonole. Treutter (1989) to razlaga s funkcijo katehina v obrambnem mehanizmu rastline.

Z analizo vsote analiziranih fenolnih snovi smo ugotovili, da je v okuženih listih večja vsebnost fenolnih snovi kot v zdravih listih. Iz tega sklepamo, da se več fenolnih snovi tvori v rastlini, ki jo okuži patogen, in je posledica naravnega mehanizma rastline ob napadu patogena. S tem lahko potrdimo našo hipotezo.

Okužba s patogenom vpliva na pospešeno sintezo fenolnih snovi, ki so že prisotne v rastlinskem tkivu. Mnogo raziskav je potrdilo, da okužba z glivo spodbudi tvorbo flavanolov, hidroksicimetnih kislin in floridzina (Mayr in sod., 1997; Leser in Treutter, 2005).

Dejstvo, da je nekaterih fenolnih snovi v zdravih listih več kot v okuženih, lahko razložimo predvsem s tem, da so drevesa izpostavljena drugim stresnim dejavnikom v nasadih, ki spodbudijo akumulacijo fenolnih komponent (Mikulič Petkovšek in sod., 2007), vendar ti dejavniki niso bili predmet proučevanja naše raziskave.

## 6 SKLEPI

V okviru našega poskusa smo analizirali vsebnost fenolnih snovi v listih jablane sorte 'Zlati delišes' v različnih terminih med rastno dobo. Zanimale so nas predvsem razlike med vsebnostjo določene fenolne snovi v škropljenih oz. zdravih in neškropljenih oz. okuženih listih.

Vsebnosti fenolnih snovi v zdravih listih jablane smo primerjali z vsebnostjo fenolnih snovi v okuženih listih. Iz te primerjave lahko sklepamo, da okužba z glivo *Venturia inaequalis* vpliva na sintezo fenolnih snovi. Ob okužbi se namreč v rastlini poveča vsebnost večine analiziranih fenolnih snovi, kot posledica obrambne reakcije rastline na okužbo.

Ugotovili smo:

- Statistično značilne razlike med vsebnostjo fenolnih snovi v neškropljenih in v škropljenih listih jablane smo zasledili pri epikatehinu, kavni kislini, kvercetin-glukozidu in kvercetin-ramnozidu. Iz tega lahko sklepamo, da so to najpomembnejše fenolne snovi, ki se sintetizirajo ob okužbi z jablanovim škrlupom in po navedbah drugih avtorjev sodelujejo pri obrambnem mehanizmu rastline.
- Statistično značilne razlike med vsebnostjo fenolnih snovi v neškropljenih in v škropljenih listih jablane ni bilo pri floridzinu. To pomeni, da se vsebnost floridzina ni povečala ob okužbi z jablanovim škrlupom, kljub temu, da nekatere študije kažejo na to, da je floridzin zelo pomembna fenolna komponenta, ki se sintetizira kot del obrambnega mehanizma jablane pri okužbi z glivo.
- Na vsebnost fenolnih snovi vplivajo tudi termini vzorčenja, saj je vsebnost fenolnih snovi večja v listih, ki so bili vzorčeni v avgustu in septembru, ko je gliva že zelo okužila liste. To velja za epikatehin, klorogensko kislino, kvercetin-glukozid in rutin.
- Vsota analiziranih fenolnih snovi nam pokaže, da obstajajo statistično značilne razlike med obravnavanji, kar pomeni, da povprečji škropljenih in neškropljenih listov nista enaki. Vsebnost analiziranih fenolnih snovi je v neškropljenih listih večja, kot v škropljenih.
- Vsebnost fenolnih snovi je v neškropljenih listih v večini primerov večja, kar potrjuje ugotovitve drugih raziskav, kjer so ugotavljali intenzivno sintezo fenolnih snovi kot del obrambnega mehanizma rastline na okužbo z jablanovim škrlupom.

Ti rezultati pomembno prispevajo k razumevanju razmerja rastlina - gliva in bi bili lahko uporabljeni za nadaljnje raziskave. V nadaljnjih raziskavah bi lahko preučili še ostale fenolne spojine, pa tudi druge komponente primarnega in sekundarnega metabolizma, ki bi lahko vplivale na odpornost jablane. Zanimivo bi bilo tudi raziskati mehanizem rastline, kako in ko se odzove na okužbo z glivo.

## 7 POVZETEK

Jablanov škrlup (*Venturia inaequalis* (Cooke) G. Wind./ Aderh.) je najbolj pogosta bolezen na jablani. Sorta 'Zlati delišes', ki smo jo preučevali, je na škrlup občutljiva, mnoge sorte pa so na škrlup že odporne. Na odpornost lahko vplivajo fenolne snovi, ki so prisotne v jablani.

Fenolne spojine so zelo razširjena in pomembna skupina sekundarnih metabolitov. Imajo neposreden vpliv na rast in razvoj rastline. Rastlino varujejo pred stresom. Okužba z glivo za rastlino predstavlja stres, zato rastlina kot obrambni mehanizem tvori fenolne snovi. Fenolne spojine naj bi tako sodelovale pri odpornosti jablane na jablanov škrlup, saj so toksične za patogene.

V letu 2007 smo izvedli poskus v poskusnem sadovnjaku na Laboratorijskem polju Biotehniške fakultete v Ljubljani. V poskus smo vključili dve obravnavanji po deset dreves jablane sorte 'Zlati delišes'. Eno obravnavanje je zajemalo drevesa, ki so bila škropljena proti jablanovemu škrlupu, drugo obravnavanje pa so bila drevesa, ki jih je gliva okužila. Vzorcili smo od junija do septembra, za posamezno obravnavanje smo naredili pet ponovitev, vzorce pa smo nabirali vsakih 21 dni. V laboratoriju smo nato s HPLC metodo določili vsebnosti fenolnih snovi v listih jablane.

V listih jablane smo identificirali naslednje fenolne spojine: epikatehin, katehin, kavno in klorogensko kislino, floridzin, kvercetin-galaktozid, kvercetin-glukozid, kvercetin-ramnozid ter rutin.

Vse analizirane fenolne spojine smo našli tako v zdravih, kot v okuženih listih, vsebnost le-teh pa se v zdravih in okuženih listih razlikuje.

Vsebnost epikatehina je v neškropljenih listih večja v primerjavi s škropljenimi. Vsebnost katehina skozi rastno dobo upada, v neškropljenih listih se zmanjša kar za 2,3-krat. Junija je bila vsebnost kavine kisline v okuženih listih več kot 2-krat večja kot v zdravih listih. Vsebnost klorogenske kisline je majhna, vendar pa se v avgustovskem ter tudi v septembrskem terminu vsebnost v neškropljenih listih močno poveča (za 24,1 mg/100g) v primerjavi z vsebnostjo v julijskem terminu. Avgusta in septembra je tako med obravnavanji pri neškropljenih listih statistično značilna razlika. Vsebnost klorogenske kisline se torej povečuje s stopnjo okužbe. Spremembe vsebnosti floridzina in kvercetin-galaktozida med rastno dobo niso bile statistično značilne, povprečji obeh fenolnih snovi sta bili enaki. Kvercetin-glukozida je bilo v zdravih listih statistično manj, kot v okuženih. Vrednosti kvercetin-ramnozida pa so bile v okuženih listih večje kot v zdravih. Rutina je bilo največ avgusta in septembra, vsebnosti pa so bile večje v neškropljenih listih. Vsota analiziranih fenolnih snovi pa nam je pokazala, da je vsebnost fenolnih snovi v okuženih listih večja med rastno dobo kot pa v zdravih listih.

Jablana se na okužbo z glivo očitno odzove s sintezo in akumulacijo fenolnih snovi. Tako smo potrdili našo hipotezo, da vsebnost fenolnih snovi po okužbi z jablanovim škrlupom v listih jablane naraste. Trdimo lahko tudi, da obstaja povezava med glivo in odpornostjo, saj okužene rastline tvorijo in kopičijo fenolne snovi v tkivu, ki obdaja okužene dele.

## 8 VIRI

- Abram V., Simčič M. 1997. Fenolne spojine kot antioksidanti. *Farmaceutski vestnik*, 48: 573-589
- Balasundram N., Sundram K., Summan S. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence and potential uses. *Food Chemistry*, 99: 191-203
- Bohm B.A. 1998. Introduction to flavonoids. Amsterdam: Harwood Academic Publishers
- Bravo L. 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56: 317-333
- Colarič M., Veberič R., Solar A., Hudina M., Štampar F. 2005. Phenolic acids, syringaldehyde and juglone in fruits of different cultivars of *Juglans regia* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 6390-6396
- Colarič M., Štampar F., Hudina M. 2006. Changes in sugars and phenolics concentrations of Williams pear leaves during the growing season. *Canadian Journal of Plant Science*, 86: 1203-1208
- Colarič M., Štampar F., Hudina M. 2007. Bending affects phenolic content of William pear leaves. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B- Soil and Plant Science*, 57: 187-192
- Cuthbertson A.G.S., Murchie A.K. 2003. The impact of fungicides to control apple scab (*Venturia inaequalis*) on the predatory mite *Anystis baccarum* and its prey *Aculus schlechtendali* (apple rust mite) in Northern Ireland Bramley orchards. *Crop Protection*, 22: 1125-1130
- Drevesnica Omorika. Zlati delišes.  
[http://www.omorika.si/sl/jablane/zlati\\_delises/](http://www.omorika.si/sl/jablane/zlati_delises/) (maj, 2010)
- Durst F., Werck- Reichhart D. 1995. Biosynthesis of phenolic compounds: involvement of cytochrome P<sub>450</sub> enzyme. V: Polyphenols 94. International conference on polyphenols, Palma de Malorca, 1994. Brouillard R., Jay M., Scalbert A. (eds.). Paris, INRA: 57-65
- Escarpa A., Gonzales M.C. 1998. High performance liquid chromatography with diode-array detection for the determination of phenolic compounds in peel and pulp from different apple varieties. *Journal of Chromatography*, 823: 331-337
- Feucht W. 1994. The localization of phenols at the cellular and tissue level. *Acta Horticulturae*, 381: 803-815
- Grayer R.J., Kokubun T. 2001. Plant-fungal interactions: the search for phytoalexins and other antifungal compounds from higher plants. *Phytochemistry*, 56: 253-263

- Hamazu Y. 2006. Role and evolution of fruit phenolic compounds during ripening. Stewart Posthary. Review, 2: 1-7
- Harborne J.B., Baxter H., Moss G.P. 1999. London: Editors, Phytochemical dictionary: Handbook of bioactive compounds from plants (2nd ed.), Taylor & Francis: 976 str
- Heldt H.W. 1997. Plant biochemistry and molecular biology. Oxford University Press Inc., New York: 522 str
- Jazbec M., Vrabl S., Juvanc J., Honzak D. 1985. V sadnem vrtu. Ljubljana, Kmečki Glas: 389 str
- Kozłowski T.T., Pallardy S.G. 1997. Physiology of woody plants. 2nd ed. San Diego, CA: Academic Press: CA. 411 str
- Leser C., Treutter D. 2005. Effect of nitrogen supply on growth content of phenolic compounds and pathogen (scab) resistance of apple trees. Physiologia Plantarum, 123: 49-56
- Maček J. 1990. Posebna fitopatologija. Patologija sadnega drevja in vinske trte. 2. izdaja. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, VTOZD za agronomijo: 274 str
- Mayr U., Funfgelder S., Treutter D., Feucht W. 1995. Induction of phenol accumulation by pesticides under the control of environmental factors. V: Environmental biotic factors in integrated plant disease control. Manka M. (ed.). Warsaw, Poland, Polish Phytopathological Society: 399-402
- Mayr U., Michalek S., Treutter D., Feucht W. 1997. Phenolic compounds of apple and their relationship to scab resistance. Journal of Phytopathology, 145: 69-75
- Mercier V., Combe F., Defrance H., Fauvel G., Marboutie G., Simon S. 2000. Scab resistant apple trees and integrated pest management. IOBC wprs Bulletin, 23: 271-276
- Merken H.M., Beecher G.R. 2000. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48: 577-599
- Mesečni bilten ARSO – letnik 2007  
<http://www.arso.gov.si/o%20agenciji/knjiznica/mesečni%20bilten/bilten2007.htm>  
(maj, 2010)
- Michalek S., Mayr U., Treutter D., Lux- Endrich A., Gutmann M., Feucht W., Geibel M. 1999. Role of flavan-3-ols in resistance of apple trees to *Venturia inaequalis*. Acta Horticulturae, 484: 535-539

- Mikulič Petkovšek M., Usenik V., Štampar F. 2003. The role of chlorogenic acid in the resistance of apples to apple scab (*Venturia inaequalis* (Cooke) G. Wind. Aderh.). Research Reports Biotechnical Faculty University of Ljubljana, 81: 233-242
- Mikulič Petkovšek M., Štampar F., Veberič R. 2007. Parameters of inner quality of the apple scab resistant and susceptible apple cultivars (*Malus domestica* Borkh.). Scientia Horticulturae, 114: 37-44
- Mikulič Petkovšek M., Štampar F., Veberič R. 2009a. Accumulation of phenolic compounds in apple in response to infection by the scab pathogen, *Venturia inaequalis*. Physiological and Molecular Plant Pathology, 74: 60-67
- Mikulič Petkovšek M., Štampar F., Veberič R. 2009b. Seasonal changes in phenolic compounds in the leaves of scab-resistant and susceptible apple cultivars. Canadian Journal of Plant Science, 89: 745-753
- Niederleitner S., Zinkernagel V., Treutter D., Feucht W. 1994. Accumulation of flavanols in cherry leaves after infection by the fungus *Blumeriella jaapii*. Acta Horticulturae, 381: 767-771
- Parisi L., Guillaumès J., Wuster G. 1994. Variabilité de la sensibilité au fénarimol de souches de *Venturia inaequalis* provenant de vergers français. Agronomie, 14: 387-394
- Pečavar A. 1998. Osnove tekočinske kromatografije. Ljubljana, Kemijski inštitut: 30 str
- Picinelli A., Dapena E., Mangas J.J. 1995. Polyphenolic pattern in apple tree leaves in relation to scab resistance. A preliminary study. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 4: 2273-2278
- Robards K., Antolovich M. 1997. Analytical chemistry of fruit bioflavonoids. Analyst, 122: 11R-34R
- Robards K., Prenzler P.D., Tucker G., Swatsitang P., Glover W. 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. Food Chemistry, 66: 401-436
- Rühmann S., Leser C., Bannert M., Treutter D. 2002. Relationship between growth, secondary metabolism and resistance of apple. Plant Biology, 4: 137-143
- Solar A., Colarič M., Usenik V., Štampar F. 2006. Seasonal variations of selected flavonoids, phenolic acids and quinones in annual shoots of common walnut (*Juglans regia* L.). Plant Science, 170: 453-461
- Strissel T., Halbwirth H., Hoyer U., Zistler C., Stich K., Treutter D. 2005. Growth-promoting nitrogen nutrition affects flavanoid biosynthesis in young apple (*Malus domestica* Borkh.) leaves. Plant Biology, 7: 677-685

- Swanson B.G. 1993. Tannins and polyphenols. V: Encyclopaedia of food science, food technology and nutrition. Vol. 7. Macrae R., Robinson R.K., Sadler M.J. (eds). London, Academic Press: 4513-4517
- Štampar F., Lešnik M., Veberič R., Solar A., Koron D., Usenik V., Hudina M., Osterc G. 2005. Sadjarstvo. Ljubljana, Kmečki Glas: 416 str
- Taiz L., Zeiger E. 2006. Plant Physiology. 4. izdaja. USA, Sunderland (Mass.), Sinauer Associates: 764 str
- Tomás- Barberán F.A., Gil M.I., Castañer M., Artés F., Saltveit M.E. 1997. Effect of selected browning inhibitors on phenolic metabolism in steam tissue of harvest lettuce. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45: 583-589
- Treutter D. 1989. Chemical reaction detection of catehins and proanthocyanidins with 4-dimethylaminocinnamaldehyde. Journal of Chromatography, 45: 185-193
- Treutter D. 2001. Biosynthesis of phenolic compounds and their regulation in apple. Plant Growth Regulation, 34: 71-89
- Treutter D. 2005. Significance of flavanoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis. Plant Biology, 7: 581-591
- Treutter D., Feucht W. 1990a. The pattern of flavan-3-ols in relation to scab resistance of apple cultivars. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 65: 511-517
- Treutter D., Feucht W. 1990b. Accumulation of flavan-3-ols in fungus- infected leaves of Rosaceae. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten, Pflanzenpathologie und Pflanzenschutz, 97: 634-641
- Veberič R. 1998. Preizkušanje odpornih sort jablane (*Malus domestica* Borkh.). Diplomaska naloga. Ljubljana, Oddelek za agronomijo: 85 str
- Veberič R., Trobec M., Herbinger K., Hofer M., Grill D., Štampar F. 2005. Phenolic compounds in some apple (*Malus domestica* Borkh) cultivars of organic and integrated production. Journal of the Science of Food and Agriculture, 85: 1687-1694
- Viršček Marn M., Stopar M. 1998. Sorte jabolok. Ljubljana, Kmečki glas: 211 str
- Williams E.B., Kuć J. 1969. Resistance in malus to *Venturia inaequalis*. Annual Review of Phytopathology, 7: 223-246
- Zlati delišes.  
[http://www.sadjarstvo.com/Zlati\\_delišes.php](http://www.sadjarstvo.com/Zlati_delišes.php) (maj 2010)
- Žorž M. 1991. HPLC. Ljubljana, samozaložba: 154 str

## **ZAHVALA**

Iskreno se zahvaljujem svojemu mentorju doc. dr. Robertu Veberiču za strokovno pomoč, koristne nasvete in skrben pregled diplomskega dela.

Zahvaljujem se prof. dr. Franciju Acu Celarju in prof. dr. Francu Batiču za pregled naloge, vse napotke in pojasnila.

Posebej se zahvaljujem mami in atiju, ker sta mi omogočila študij in me podpirala na moji študijski poti. Hvala, ker mi stojita ob strani, verjameta vame in me imata rada.

Hvala mojemu Klemenu za vse pogovore, skrb in za vse spodbude in podporo pri študiju in tudi pri pisanju diplomske naloge. Hvala, ker me imaš rad.

Hvala Alenki, Petri in Tilnu za pomoč, pogovore, smeh in ker ste mi vedno stali ob strani. Najboljši sestri in brat ste.

Jerneja, hvala za strokovno pomoč, trud, pogovore, nasvete, kosila in smeh. Nastja, hvala za spodbudo in pogovore, za vse kavice in tortice ter ves smeh in dober voljo.

Hvala tudi vsem prijateljem, ki ste me podpirali in spodbujali.



## PRILOGA A

### Povprečne mesečne temperature in količine padavin

PRILOGA A1: Mesečna povprečna dnevna temperatura (°C) ter odklon od dolgoletnega povprečja (°C), količina padavin (mm) in količina padavin (%) od dolgoletnega povprečja v rastni dobi 2007 za Ljubljano (Mesečni bilten..., 2007).

Mesec	T <sub>povp</sub> (°C)	Odklon od dolgolet. povp. (°C)	Kol. padavin (mm)	Kol. padavin (%) od dolgolet. povp.
April	14,7	+ 4,8	6	10
Maj	17,2	+ 2,6	113	93
Junij	20,9	+ 3,1	80	50
Julij	22	+ 2,1	148	120
Avgust	20,4	+ 1,4	80	56
September	14,4	- 1,1	220	169

PRILOGA A2: Mesečna povprečna dnevna temperatura (°C) po dekadah ter količina padavin (mm) po dekadah v rastni dobi 2007 za Ljubljano (Mesečni bilten..., 2007).

Mesec	Dekada	T <sub>povp</sub> (°C)	RR (mm)
April	I.	12,1	6,2
	II.	15,7	0
	III.	16,2	0
Maj	I.	15,6	49,5
	II.	17,2	11,9
	III.	18,7	51,3
Junij	I.	18,5	21,5
	II.	22,3	49
	III.	21,9	9,1
Julij	I.	19,7	90,1
	II.	24,1	8,3
	III.	22,2	49,2
Avgust	I.	19,9	19,5
	II.	21,1	12,7
	III.	20,3	48
September	I.	14,9	43,3
	II.	15,6	96,5
	III.	12,8	79,9

#### Legenda

T<sub>povp</sub> ... povprečna temperatura zraka na višini 2m (°C)  
RR ... višina padavin (mm)

## PRILOGA B

### Termini škropljenja v nasadu v rastni sezoni 2007 ter koncentracija uporabljenih fitofarmaceutskih sredstev.

Datum	Opravilo v sadovnjaku	Sredstva in koncentracija uporabljenih fitofarmaceutskih sredstev
2.4.2007	Škropljenje nasada	Cuprblau Z (0,25%)
		Oleodiatinon (1,5%)
17.4.2007	Škropljenje nasada	Ziram (0,3%)
		Cosan (0,2%)
1.5.2007	Škropljenje nasada	Merpan (0,2%)
		Clarinet (0,15%)
		Calypso (0,03%)
7.5.2007	Škropljenje nasada	Indar (0,09%)
		Merpan (0,2%)
		Karathane (0,06%)
18.5.2007	Škropljenje nasada	Score (0,03%)
		Delan (0,08%)
		Actara (0,25%)
22.5.2007	Škropljenje trave s herbicidi v nasadu	Boom efekt (2%)
30.5.2007	Škropljenje nasada	Zato 50 WG (0,015%)
		Merpan (0,2%)
		Baycor (0,7%)
8.6.2007	Škropljenje nasada	Calypso (0,03%)
		Score (0,03%)
		Delan (0,08%)
		Topas (0,025%)
18.6.	Škropljenje nasada	Clarinet (0,15%)
		Ziram (0,15%)
		Diazol (0,1%)
2.7.2007	Škropljenje nasada	Delan (0,08%)
		Topas (0,04%)
		Calypso (0,05%)
		Cosan (0,2%)
9.7.2007	Škropljenje nasada	Dithane M45 (0,25%)
		Karathane (0,06%)
		Diazinon 20 (0,25%)
	Škropljenje trave s herbicidi v nasadu	Boom efekt (2%)
23.7.2007	Škropljenje nasada	Merpan (0,25%)
		Cosan (0,4%)
		Diazinon 20 (0,25%)
2.8.2007	Škropljenje nasada	Euparen multi (0,2%)
		Diazol (0,15%)
14.8.2007	Škropljenje nasada	Euparen multi (0,2%)
		Diazinon (0,25%)