

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Gregor LIPOVŠEK

**POVEZAVA MED FENOLNIMI SPOJINAMI IN
ODPORNOSTJO PLODOV NA OREHOVO ČRNO
PEGAVOST (*Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*) PRI
NAVADNEM OREHU (*Juglans regia* L.)**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Gregor LIPOVŠEK

**POVEZAVA MED FENOLNIMI SPOJINAMI IN ODPORNOSTJO
PLODOV NA OREHOVO ČRNO PEGAVOST (*Xanthomonas arboricola*
pv. juglandis) PRI NAVADNEM OREHU (*Juglans regia* L.)**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**RELATIONSHIP BETWEEN PHENOLIC COMPOUNDS AND FRUIT
RESISTANCE TO BACTERIAL BLIGHT (*Xanthomonas arboricola* *pv.*
juglandis) IN COMMON WALNUT (*Juglans regia* L.)**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija agronomije.

Rastlinski material za analizo smo nabrali na Raziskovalnem polju za lupinasto sadje Maribor. Analiza vzorcev in statistična obdelava rezultatov sta bili opravljene 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 prof. dr. Francija ŠTAMPARJA in za somentorico dr. Anito SOLAR.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: izr. prof. dr. Marijana JAKŠE
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

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

Član: znan. svet. dr. Anita SOLAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

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

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisani se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddal v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Gregor LIPOVŠEK

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK UDK 634.51:631.524.86:547.56 (043.2)
KG sadjarstvo/orah/*Juglans regia*/orehova črna pegavost/*Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*/fenoli
KK AGRIS F62/H20
AV LIPOVŠEK, Gregor
SA ŠTAMPAR, Franci (mentor)/SOLAR, Anita (somentor)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
LI 2012
IN POVEZAVA MED FENOLNIMI SPOJINAMI IN ODPORNOSTJO PLODOV NA OREHOVO ČRNO PEGAVOST (*Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*) PRI NAVADNEM OREHU (*Juglans regia* L.)
TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP X, 34, [4] str., 12 pregl., 14 sl., 3 pril., 56 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Namen naše raziskave je bil ugotoviti, če obstaja povezava med fenolnimi spojinami in odpornostjo plodov navadnega oreha (*Juglans regia* L.) na orehovo črno pegavost (*Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* (*Xaj*)). V poskus je bilo vključenih 6 sort ('Fernette', 'Erjavec', 'Cisco', 'Zdole-60', 'Šampion' in 'Seifersdorfer'). V dveh fenofazah (Gf+30 in Gf+45) smo nabrali zdrave in okužene plodove. Hkrati z vzorčenjem smo v nasadu tudi ocenjevali stopnjo okuženosti plodov s *Xaj*. V laboratoriju smo vzorce analizirali s sistemom visokoločljivostne tekočinske kromatografije (HPLC) in določili vsebnost fenolnih spojin, katere smo razdelili na 4 skupine (flavan-3-oli, flavonoli, galna kislina in hidroksicimetne kisline). Najprej smo primerjali različne fenolne spojine v zdravih plodovih in ugotovili, da obstajajo statistično značilne razlike med sortami. V drugem delu smo primerjali vsebnost fenolnih spojin v zdravih in okuženih plodovih pri vsaki sorti posebej. Ugotovili smo, da so se pri okužbi fenolne spojine pri vseh sortah povečali. Izjema je bila sorta 'Šampion', kjer se flavonoli in galna kislina ob okužbi niso povečali. Kot zadnje smo ugotavljali ali obstaja povezava med fenolnimi spojinami in odpornostjo plodov. S primerjavo vsebnosti fenolov v zdravih orehih in fenolov, ki so se razvili kot odgovor na okužbo s *Xaj* ter ocenjeno stopnjo okuženosti plodov v poskusnem nasadu, smo delno potrdili zvezo med odpornostjo plodov oreha na orehovo črno pegavost in vsebnostjo flavan-3-olov, hidroksicimetnih kislin in galne kisline.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
DC UDC 634.51:631.524.86:547.56 (043.2)
CX fruit growing/walnut/*Juglans regia*/bacterial blight/*Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*/phenolic compounds
CC AGRIS F62/H20
AU LIPOVŠEK, Gregor
AA ŠTAMPAR, Franci (supervisor)/SOLAR, Anita (co-supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University in Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy
PY 2012
TI RELATIONSHIP BETWEEN PHENOLIC COMPOUNDS FRUIT AND RESISTANCE TO BACTERIAL BLIGHT (*Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*) IN COMMON WALNUT (*Juglans regia* L.)
DT Graduation thesis (University studies)
NO X, 34, [4] p., 12 tab., 14 fig., 3 ann., 56 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The aim of our study was to determine, if a relationship between phenolic compounds and resistance of walnut fruits to bacterial blight (*Xanthomonas arboricola* pv. *Juglandis* (*Xaj*)) exists. The experiment involved six cultivars ('Fernette', 'Erjavec', 'Cisco', 'Zdole-60', 'Sampion' and 'Seifersdorfer'). We sampled healthy and infected fruit at two phenophases (Gf+30 and Gf+45). Simultaneously with sampling, we also evaluated the level of fruit infestation with *Xaj* in the orchard. In the laboratory, samples were analyzed by a system of high performance liquid chromatography (HPLC). The determined phenolic compounds were divided into 4 groups (flavan-3-ols, flavonols, gallic acid and hydroxycinnamic acid). Firstly, different phenolic compounds were quantified in healthy fruits, and significant differences in phenolic contents were found between the studied cultivars. Secondly, we compared the content of phenolic compounds in healthy and infected fruits of each cultivar. We saw that phenolic compounds increased due to *Xaj* infection in all cultivars. The exception was the cultivar 'Sampion', where the flavonols and gallic acid did not increase after the infection. Finally, we evaluated the possible correlation between phenolic compounds and fruit resistance to *Xaj*. By comparing the content of phenols in healthy and infected nuts, and evaluated disease severity in the orchard, the linkage between the resistance of walnut fruits to bacterial blight and the contents of flavan-3-ols, hydroxycinnamic acids and gallic acid was partly confirmed.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key Words Documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Kazalo prilog	IX
Okrajšave in simboli	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 OREH (<i>Juglans regia</i> L.)	2
2.1.1 Okoljske zahteve	2
2.1.2 Biologija oreha	2
2.2 OREHOVA ČRNA PEGAVOST (<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>juglandis</i>)	3
2.3 FENOLNE SNOVI	4
2.3.1 Razdelitev fenolnih spojin	5
2.3.1.1 Enostavni fenoli	5
2.3.1.2 Fenolne kisline	6
2.3.1.3 Naftokinoni	6
2.3.1.4 Flavonoidi	6
2.3.1.5 Lignin	6
2.3.1.6 Tanini	7
2.4 POVEZAVA MED FENOLNIMI SPOJINAMI IN ODPORNOSTJO	7
3 MATERIAL IN METODE	9
3.1 RASTLINSKI MATERIAL	9
3.1.1 Opisi sort	9
3.1.1.1 'Seifersdorfer'	9
3.1.1.2 'Šampion'	10
3.1.1.3 'Zdole-60'	10
3.1.1.4 'Cisco'	10
3.1.1.5 'Erjavec'	10
3.1.1.6 'Fernette'	11
3.2 METODA DELA	11
3.2.1 Vzorčenje in priprava vzorcev	11

3.2.2	Analiza fenolov s pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC)	12
3.2.2.1	Analiza vzorcev	12
3.2.3	Statistična obdelava podatkov	13
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	14
4.1	VPLIV SORTE NA VSEBNOST FENOLOV PRI ZDRAVIH OREHIH	14
4.1.1	Flavan-3-oli	14
4.1.2	Flavonoli	15
4.1.3	Galna kislina	16
4.1.4	Hidroksicimetne kisline	17
4.2	VSEBNOST FENOLOV V ZDRAVIH IN OKUŽENIH OREHIH	19
4.2.1	'Seifersdorfer'	19
4.2.2	'Šampion'	20
4.2.3	'Zdole-60'	21
4.2.4	'Cisco'	22
4.2.5	'Erjavec'	23
4.2.6	'Fernette'	24
4.3	ZVEZA MED VSEBNOSTJO FENOLOV IN ODPORNOSTJO PLODOV NA OREHOVO ČRNO PEGAVOST	25
5	SKLEPI	28
6	POVZETEK	29
7	VIRI	30
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Razvrstitev fenolnih snovi (Abram in Simčič, 1997)	5
Preglednica 2: Datum vzorčenja plodov pri šestih sortah oreha	11
Preglednica 3: Povprečne vsebnosti flavan-3-olov v mg/kg za šest sort orehov v zeleni lupini zdravih plodov	14
Preglednica 4: Povprečne vsebnosti flavonolov v mg/kg za šest sort orehov v zeleni lupini zdravih plodov	15
Preglednica 5: Povprečne vsebnosti galne kisline v mg/kg za šest sort orehov v zeleni lupini zdravih plodov	16
Preglednica 6: Povprečne vsebnosti hidroksicimetnih kislin v mg/kg za šest sort orehov v zeleni lupini zdravih plodov	18
Preglednica 7: Vsebnost fenolnih spojin (mg/kg) v zeleni lupini pri zdravih in okuženih plodovih pri sorti 'Seifersdorfer'	19
Preglednica 8: Vsebnost fenolnih spojin (mg/kg) v zeleni lupini pri zdravih in okuženih plodovih pri sorti 'Šampion'	20
Preglednica 9: Vsebnost fenolnih spojin (mg/kg) v zeleni lupini pri zdravih in okuženih plodovih pri sorti 'Zdole-60'	21
Preglednica 10: Vsebnost fenolnih spojin (mg/kg) v zeleni lupini pri zdravih in okuženih plodovih pri sorti 'Cisco'	22
Preglednica 11: Vsebnost fenolnih spojin (mg/kg) v zeleni lupini pri zdravih in okuženih plodovih pri sorti 'Erjavec'	23
Preglednica 12: Vsebnost fenolnih spojin (mg/kg) v zeleni lupini pri zdravih in okuženih plodovih pri sorti 'Fernette'	24

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Zgodnja okužba plodu oreha s <i>Xaj</i> (foto: Anita Solar)	4
Slika 2: Močnejše okužen plod oreha s <i>Xaj</i> (foto: Anita Solar)	4
Slika 3: Kolekcijski nasad orehov Biotehniške fakultete v Mariboru (foto: Anita Solar)	9
Slika 4: Povprečne vsebnosti flavan-3-olov \pm standardne napake v mg/kg za šest preučevanih sort orehov v zeleni lupini zdravih plodov	15
Slika 5: Povprečne vsebnosti flavanolov \pm standardne napake v mg/kg za šest preučevanih sort orehov v zeleni lupini zdravih plodov	16
Slika 6: Povprečne vsebnosti galne kisline \pm standardne napake v mg/kg za šest preučevanih sort orehov v zeleni lupini zdravih plodov	17
Slika 7: Povprečne vsebnosti hidrokisimernih kislin \pm standardne napake v mg/kg za šest preučevanih sort orehov v zeleni lupini zdravih plodov	18
Slika 8: Povprečna vsebnost fenolnih spojin \pm standardne napake (mg/kg) v zeleni lupini pri zdravih (Z) in okuženih (O) plodovih pri sorti 'Seifersdorfer'	19
Slika 9: Povprečna vsebnost fenolnih spojin \pm standardne napake (mg/kg) v zeleni lupini pri zdravih (Z) in okuženih (O) plodovih pri sorti 'Šampion'	20
Slika 10: Povprečna vsebnost fenolnih spojin \pm standardne napake (mg/kg) v zeleni lupini pri zdravih (Z) in okuženih (O) plodovih pri sorti 'Zdole-60'	21
Slika 11: Povprečna vsebnost fenolnih spojin \pm standardne napake (mg/kg) v zeleni lupini pri zdravih (Z) in okuženih (O) plodovih pri sorti 'Cisco'	22
Slika 12: Povprečna vsebnost fenolnih spojin \pm standardne napake (mg/kg) v zeleni lupini pri zdravih (Z) in okuženih (O) plodovih pri sorti 'Erjavec'	23
Slika 13: Povprečna vsebnost fenolnih spojin \pm standardne napake (mg/kg) v zeleni lupini pri zdravih (Z) in okuženih (O) plodovih pri sorti 'Fernette'	24
Slika 14: Povprečna skupna vsebnost analiziranih fenolnih spojin pri zdravih (Z) in okuženih (O) plodovih oreha za preučevanih šest sort z vrisano povprečno stopnjo okuženosti plodov s <i>Xaj</i>	25

KAZALO PRILOG

PRILOGA A: Stopnja okuženosti orehov (%) s *Xaj*, Maribor 2008.

PRILOGA B: Formula za izračun stopnje okuženosti (P) orehov (%) s *Xaj*.

PRILOGA C: Ocenjevalna tabela

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Okrajšava	Pomen
FFS	Fitofarmaceutvska sredstva
Gf+30	Fenofaza 30 dni po Gf, orehi velikosti oljke
Gf+45	Fenofaza 45 dni po Gf, otrditev- lignifikacija luščine
HPLC	Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (ang. High Performance Liquid Chromatography)
SvM	Sveža masa
<i>Xaj</i>	Orehova črna pegavost (<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>juglandis</i>)

1 UVOD

1.1 VZROK ZA RAZISKAVO

Orehova črna pegavost je ena najpomembnejših boleznih orehov in prizadane liste, poganjke, cvetove in plodove. Kemično varstvo je pogosto neučinkovito zaradi omejenega izbora fitofarmaceutskih sredstev in zaradi težavnega škropljenja velikih dreves oreha. Zato je sajenje odpornejših sort najboljši način za doseganje boljšega zdravstvenega stanja in večjega pridelka. K naravni odpornosti sadnega drevja veliko prispevajo fenolne spojine, ki pri odpornih sortah zavrejo bolezen.

1.2 DELOVNA HIPOTEZA

Predvidevamo, da se sorte oreha razlikujejo med seboj po vsebnosti in sestavi fenolnih spojin v plodovih, da obstajajo razlike v vsebnosti in sestavi fenolnih spojin med zdravimi in z orehovo črno pegavostjo okuženimi plodovi.

Predvidevamo tudi, da obstaja zveza med odpornostjo orehov na orehovo črno pegavost in vsebnostjo fenolnih spojin v plodovih.

1.3 NAMEN RAZISKAVE

Ugotoviti, kakšen vpliv imajo fenolne spojine na dovzetnost plodov oreha (*Juglans regia* L.) na okužbo z bakterijo *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* (Xaj).

2 PREGLED OBJAV

2.1 OREH (*Juglans regia* L.)

Oreh je stara tradicionalna sadna vrsta, ki jo lahko najdemo po vsej Sloveniji do 1000 m nadmorske višine. Spada v družina *Juglandaceae*, v kateri je sedem rodov in okrog 60 vrst. Je enodomna lestnata rastlina s pernatost sestavljenimi listi. Napomembnejši predstavnik družine je prav *Juglans regia* L. - navadni, perzijski ali angleški oreh. Razširjen je po Evropi, Aziji, severni, srednji in južni Ameriki, ter delno tudi v Oceaniji in severni Afriki (Solar, 2008).

2.1.1 Okoljske zahteve

Za rast oreha so najbolj primerna zmerno topla, humidna območja, s čim manjšimi temperaturnimi nihanjem. Drevo lahko v fazi mirovanja prenese zelo nizke temperature. Vegetativni brsti prenesejo od -28 do -32 °C. Vendar pa so glavni omejujoč dejavnik v Sloveniji za gojenje orehov nizke spomladanske temperature, ki se pojavljajo v začetku rasti in cvetenja. Zato so za spomladanske pozebe manj občutljive brežine in lege, rahlo nagnjene v smeri vzhod-zahod, in zato bolj primerne kot ravnine (Solar, 2008).

Oreh zaradi obsežnega koreninskega sistema potrebuje tla, globoka vsaj 1,5 do 2 m, ki morajo biti dobro zračna, strukturna, z veliko vodno kapaciteto in odcedna. Čez celo rastno dobo potrebuje vsaj 600 mm padavin. Kjer so padavine neenakomerno porazdeljene preko leta, je nasade priporočljivo namakati (Solar, 2008).

2.1.2 Biologija oreha

Oreh je vetrocvetka, ki ima ločene moške in ženske cvetove. Moška socvetja imajo obliko mačic ali res in so sestavljena iz 70 do 150 cvetov. Razvijejo se iz cvetnih brstov, ki so v pazduhah listov nameščeni vzdolž poganjkov. Ženski cvetovi se razvijejo iz mešanih brstov, ki so običajno na koncu enoletnih poganjkov kot terminalni brsti. Iz njih se razvijejo mladike z dvema do petimi listi, na njihovem vrhu pa običajno eden do štiri ženski cvetovi. Zaradi enodomnosti spada oreh med samooplodne rastline, vendar zaradi časovno neizenačenega cvetenja moških in ženskih cvetov (dihogamija) redko pride do samooploditve. Zato sadimo v nasadih več sort, ki se ujemajo v času cvetenju, ter omogočajo dobro oprahšitev in oploditev (Solar, 2008).

Rodni brsti so običajno končni ali terminalni brsti na enoletnih poganjkih. Nekatere sorte rodijo tudi na obstranskih ali lateralnih brstih. Lateralna rodnost je tudi pomemben cilj sodobne selekcije, saj je rodni potencial takih sort bistveno večji od terminalno rodnih. Plod oreha je sestavljen iz luščine in jedrca. Jedrce obdaja endokarp ali olesenela luščina,

ki je sestavljena iz dveh simetričnih polovic, ki sta zarasli s šivom. Zelena lupina ali mezokarp predstavlja zunanji ovoj oreha. Jedrce je užiten del oreha in se razvije iz dveh kotiledonov. Sestavljeno je iz dveh polovic, ki sta med seboj ločeni s primarno pregrado (Solar, 2008).

2.2 OREHOVA ČRNA PEGAVOST (*Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*)

Orehova črna pegavost (*Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*) je ena gospodarsko najpomembnejših boleznih oreha. Razširjena je povsod, kjer gojijo orehe, naj si bo za plodove ali za les. Okužuje vse zelene dele na orehovem drevesu: moška socvetja, liste, listne peclje, plodove in mlade poganjke. V splošnem velja, da je mlajše tkivo bolj občutljivo od starejšega, kar kaže na vlogo sekundarnih metabolitov, tudi fenolov (Solar s sod., 2006a). Veliko škodo povzroča v deževnih letih, zlasti če obilno deževje nastopi že spomladi, med brstenjem in na začetku razvoja plodov. Ker bakterija prezimi na drevesu, ob ugodnih pogojih zelo hitro spomladi povzroči prve okužbe zelenega tkiva. Zaradi bakterioze počrni moška socvetja (mačice) in mladi plodiči, ki najpogosteje odpadejo. Če pride do okužbe kasneje, se plodovi obdržijo na drevesu, vendar so neuporabni - imajo črno luščino ter potemnelo in grenko, deformirano in neužitno jedrce. Bolezen lahko povzroča tudi 100 % izpada pridelka. Škoda je največja na zgodnjih sortah oreha, medtem ko sorte, ki brstijo v začetku maja, ponavadi uidejo primarnim okužbam. Na intenzivnost okužbe vpliva tudi mikroklima v nasadu. Pregosto posajena drevesa, ravninske lege s slabim pretokom zraka in goste, slabo prezračene in osvetljene krošnje so idealno okolje za hitro širjenje bolezni.

Med preventivne ukrepe varstva sodi škropljenje z bakrovimi pripravki (Solar, 2006). Običajna praksa vključuje tri do pet škropljenj letno. Prvo sovpada s časom brstenja, drugo in tretje škropljenje se opravi pred oz. po cvetenju ženskih cvetov, četrto pa dva do tri tedne kasneje. Peto škropljenje je potrebno v mladih nasadih v primeru bujne poletne rasti poganjkov. V nasadih se v deževnih letih škropi tudi večkrat. Pokazalo se je, da so dodatna poletna škropljenja pogosto neučinkovita (Ninot in sod., 2000) ali celo škodljiva, saj so privedla do nastanka proti bakru odpornih oblik bakterije (Gardan in sod., 1993; Olsen in sod., 1997; Charlot in Radix, 1997). Poleg tega imajo preveliki vnosi bakra v tla za posledico motnje metabolizma dreves, nesprejemljivi pa so tudi z vidika varovanja okolja.



Slika 1: Zgodnja okužba plodu oreha s *Xaj* (foto: Anita Solar)



Slika 2: Močnejše okužen plod oreha s *Xaj* (foto: Anita Solar)

2.3 FENOLNE SNOVI

Fenolne spojine so sekundarni metaboliti, ki se pojavljajo v izobilju v vseh rastlinskih delih (Treutter, 2001). Pripadajo veliki in heterogeni skupini biološko aktivnih spojin. Njihova sinteza je odvisna od številnih encimov. Sodelujejo v različnih presnovnih poteh (Barz in sod., 1985). Fenoli so vključeni v fizioloških procesih rasti in razvoja sadnih dreves. Naravni fenoli so vključeni v obrambni mehanizem rastlin (Usenik in sod., 2004). Pomembni so pri obrambi rastlin pred rastlinojedci, delujejo kot kemične signalne spojine pri cvetenju, oplojevanju in rastlinski simbiozi (Abram in Simčič, 1997).

Nastajajo iz aminokislina fenilalanin ali njenega prekursorja, šikimske kisline. Pod fenolne spojine prištevamo vse tiste spojine, ki imajo najmanj en aromatski obroč in najmanj eno

ali več –OH skupin direktno vezanih na aromatski obroč. V naravi se običajno pojavljajo spojine z več –OH skupinami in zato se je za njih uveljavilo ime polifenoli (Abram, 2000).

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

2.3.1 Razdelitev fenolnih spojin

Najbolje lahko razdelimo fenolne spojine 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, ligane, medtem ko polimerne fenolne spojine delita na lignin in tanine.

Preglednica 1: Razvrstitev fenolnih snovi (Abram in Simčič, 1997)

Št. C atomov	Osnovni skelet	Skupina
6	C ₆	enostavni fenoli
7	C ₆ C ₁	fenolne kisline
8	C ₆ C ₂	fenilacetne kisline
9	C ₆ C ₃	hidroksicimetine kisline, fenilpropeni, kumarini, izokumarini, kromoni
10	C ₆ C ₄	naftokinoni
13	C ₆ C ₁ C ₆	ksantoni
14	C ₆ C ₂ C ₆	stilbeni, antrakinoni
15	C ₆ C ₃ C ₆	flavonoidi
18	(C ₆ C ₃) ₂	lignani, neolignani
30	(C ₆ C ₃ C ₆) ₂	biflavonoidi
n	(C ₆ C ₃) _n (C ₆) _n (C ₆ C ₃ C ₆) _n	lignini, melanini, kondenzirani tanini

2.3.1.1 Enostavni fenoli

Splošna formula za enostavne fenole je C₆. V rastlinskem svetu niso razširjeni (Abram in Simčič, 1997).

2.3.1.2 Fenolne kisline

Fenolne kisline so prisotne skoraj povsod v rastlini (Abram in Simčič, 1997). Delimo jih na dve podskupini: hidroksibenzojske in hidroksicimetne kisline. V skupino hidroksibenzojskih kislin spadajo galna, *p*-hidroksibenzojska, protocatehulna, vanilna in siringinska kislina. Njihova osnovna struktura je C_6C_1 . Hidroksicimetne kisline pa so aromatske spojine, ki imajo stransko verigo s tremi ogljiki (C_6C_3). V tej skupini so v največji meri prisotne kavina, ferulna, *p*-kumarna in sinapinska kislina (Bravo, 1998).

2.3.1.3 Naftokinoni

Naftokinoni so fenolne spojine s strukturo C_6C_4 (Abram in Simčič, 1997). Najdemo jih pri orehih (juglon in 1,4-naftokinon) (Colarič in sod., 2005; Solar in sod., 2006a, 2006b).

2.3.1.4 Flavonoidi

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

Sestavlja jih petnajst ogljikovih atomov in imajo majhno molekulsko maso. Njihova osnovna struktura je $C_6C_3C_6$. Sestavljeni so iz treh delov, dva aromatska obroča, ki sta povezana z verigo iz treh ogljikovih atomov, ter heterociklični obroč. 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).

Za flavonoide kot podskupino fenolov velja, da imajo antioksidativne, protimikrobne, antimutagene in antikarcinogene lastnosti (Robards in Antolovich, 1997).

Flavan-3-oli (katehin) so brezbarvne komponente, ki so v rastlinah široko zastopani. Največje vsebnosti so v čaju, veliko pa jih je tudi v čokoladi (Yu in sod., 2005). Lapornik (2005) opisuje katehine kot snovi z močno antioksidativno aktivnostjo, protimikrobnim, antimutagenim in antikarcinogenim delovanjem.

2.3.1.5 Lignin

Lignin je sestavni del celične stene. Njegova splošna formula je $(C_6C_3)_n$. Rastlini daje oporo, zagotavlja stabilnost vaskularnim tkivom v ksilemu, ima pa tudi obrambno funkcijo.

Zaradi kemičnih in mehaničnih lastnosti je herbivorom onemogočena presnova lignina. Zavira tudi rast patogenov. V rastlinah se tvori kot odziv na poškodbe. Le nekaj gliv in bakterij je sposobno razgraditi lignin (Heldt, 1997).

2.3.1.6 Tanini

Tanini so tretja najpomembnejša skupina fenolov. Imajo relativno veliko molekulsko maso. Razdelimo jih na hidrolizabilne in kondenzirane tanine. Kondenzirani tanini so polimeri flavonoidov. Hidrolizabilni tanini pa so poliestri galne kisline (Heldt, 1997).

Tanini so naravna obramba rastlin pred živalmi, saj jih le te ne morejo prebaviti, hkrati pa reagirajo z encimi prebavnega trakta rastlinojedov. Rastline varujejo tudi pred mikroorganizmi, saj deaktivirajo encime mikroorganizmov (Heldt, 1997).

2.4 POVEZAVA MED FENOLNIMI SPOJINAMI 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 tvorijo 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 tvorijo 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).

Rastline na stres običajno odgovorijo s povečanjem 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 beljakovine podobno kot tanini. Prisotnost teh oksidacijskih produktov upočasni in celo zavre okužbo poškodovanega rastlinskega tkiva s patogenom. 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 kavine kisline v oljkah, 6,7-dimetoksikumarin v citrusih, resveratrol v grozdju itd. (Abram in Simčič, 1997).

Pri navadnem orehu (*Juglans regia* L.) so fenolne spojine proučevali z različnih vidikov. Kot dobra markerja fiziološkega staranja so Claudot in sod. (1993) določili hidrojuglon in miricitrin. Sorta ima velik vpliv na količino in vsebnost fenolnih spojin, kar so dokazali pri orehih (Colarič in sod., 2005; Štampar in sod., 2006; Solar in sod., 2006a, 2006b; Jakopič in sod., 2007), pa tudi pri drugih sadnih vrstah (Usenik in sod., 2004; Veberič in sod. 2005, Solar in sod., 2009a; Jakopič in sod., 2011). Zunanje plasti semen običajno vsebujejo večjo količino polifenolnih spojin, kar lahko razložimo s tem, da imajo pri rastlinah funkcijo zaščite (Terpinc, 2006). V raziskavi fenolov v jabolkah so jih več odkrili v njihovi lupini kot v mesu (Veberič in sod., 2005). Tudi orehi imajo lahko v kožici jedrc do sedemstokrat več fenolov kot v njihovem mesu (Colarič in sod., 2005). Ob okužbi z jablanovim škrlupom (*Venturia inaequalis*) se vsebnost fenolnih snovi v plodovih in listih jablane poveča (Mikulič-Petkovšek, 2009).

Odpornost je lahko posledica morfoloških ali fizioloških sprememb. Morfološko lahko določena rastlina razvije tršo lupino, zaščitne ovojnice okoli semen, trnje, ipd. Pomemben del fiziološke obrambe pri rastlinah pa so fenolne spojine. Mahoney in Molyneux (2004) sta proučevala, katere snovi v orehih preprečujejo rast glivam *Aspergillus flavus* in ugotovila, da je oreh zelo dobro zaščiten pred glivami. Pomaga mu kožica okoli jedrca, predvsem pa so pomembni fenoli. Fenolne snovi preprečujejo rast glivam, tudi če prodrejo v notranjost zaradi počene ovojnice. Radix in sod. (1994) so ugotovili, da imajo plodovi sorte 'Parisienne' v apikalnem delu več juglona kot sorta 'Franquette'. Sorta 'Parisienne' je manj občutljiva na orehovo črno pegavost kot 'Franquette', kar kaže na vlogo juglona v obrambnem mehanizmu oreha. To so potrdili tudi Matias in sod. (2009). Delno so to potrdili tudi Solar in sod. (2006b), vendar ugotavljajo, da pri obrambi sodelujejo še drugi fenoli poleg juglona. Nizka vsebnost katehina v začetnih fazah razvoja plodov bi bila lahko vzrok za večjo občutljivost plodov na orehovo črno pegavost (Solar in sod., 2006b). Colarič in sod. (2004) so izmerili več katehina, vanilne kisline in miricetina v manj občutljivih sortah 'Elit', 'Franquette' in 'Fernor' v primerjavi z bolj občutljivimi sortami 'Cisco', 'Hartley' in 'Šampion'.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 RASTLINSKI MATERIAL

Rastlinski material, ki smo ga uporabili za analizo fenolnih spojin, smo nabrali v kolekcijskem nasadu Raziskovalnega polja za lupinarje v Mariboru, ki deluje v sklopu Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

Nasad se nahaja na nadmorski višini 274 m, v ravnini. Tla so rahlo kislja in plitva. V raziskavo so bila vključena odrasla drevesa v polni rodnosti, stara med 14 in 16 let. Sadilna razdalja je 10 x 10 m. V nasadu se redno vzdržuje negovana ledina med vrstami in dvakrat letno herbicidni pas v vrsti.



Slika 3: Kolekcijski nasad orehov Biotehniške fakultete v Mariboru (foto: Anita Solar)

Uporabili smo plodove šestih sort orehov, ki spadajo v tri razrede glede na odpornost oz. občutljivost na okužbo s *Xaj*: zelo občutljivi 'Šampion' in 'Seifersdorfer', srednje občutljivi 'Cisco' in 'Zdole-60' ter malo občutljivi 'Fernette' in 'Erjavec'.

3.1.1 Opisi sort

3.1.1.1 'Seifersdorfer'

Izvira iz Nemčije, okolice Dresdena. Brsti zgodaj - v drugi dekadi aprila. Zaradi zgodnjega brstenja so lahko problematične spomladanske pozebe. Zelo občutljiv je na okužbo s *Xaj*.

Drevo bujno raste, krošnja je piramidne oblike, spodnje veje se povešajo. Zarodi v šestem letu, pridelek je dober do zelo dober. Dozori konec septembra, začetek oktobra. Plod je srednje velik, okrogel do rahlo ovalen. Luščina je tanka in gladka. Lahko se lušči. Jelderce je temno in močnega ter dobrega okusa (Fructus, 2012).

3.1.1.2 'Šampion'

Je vojvodinska sorta. Brsti sredi tretje dekade aprila. Je srednje občutljiva za spomladanske pozebe. Plodovi so zelo občutljivi na okužbo s *Xaj*. Raste bujno in dobro rodi. Opraševalne sorte so sorte 'Franquette', 'Elit' in 'NS-pozni'. Plod je velik, po obliki podolgovat, z rahlo zašiljenim vrhom. Luščina je dokaj gladka, sivkaste barve. Jedrce je veliko, temnejše barve. Zori v prvi polovici oktobra (Štampar in sod., 2009).

3.1.1.3 'Zdole-60'

Je slovenska selekcija. Drevo pozno odžene (dva do štiri dni pred sorto 'Franquette') in zgodaj odvrže liste. Brsti zadnji teden aprila. Drevo je šibkejše rasti, nekoliko pokončnega habitusa in z rodnimi lateralnimi poganjki. Enoletni poganjki in plodovi so srednje občutljivi za orehovo črno pegavost. Rodi srednje do obilno ter redno. Plod je okroglasto podolgovate oblike. Tehta od 9,1 – 10,2 g. Izplen jedrca je 44-50 %. Luščina je gladka z močnim spojem. Jelderce je svetlo in se lahko lušči (Solar in Štampar, 2006).

3.1.1.4 'Cisco'

Je ameriški križanec sort 'Meylannaise' x 'Pedro'. Odžene v zadnji dekadi aprila, en teden pred sorto 'Franquette'. Drevo je šibkejše rasti, nekoliko pokončnega habitusa in gosto obraščeno z rodnimi lateralnimi poganjki. Razvije srednje veliko moških socvetij. Rodnost je srednja do obilna, zelo odvisna od ravnih razmer. Plodovi so nekoliko bolj občutljivi za orehovo črno pegavost. Tehtajo okrog 11 g, so privlačne okroglasto podolgovate oblike, luščina je svetla in gladka, izplen jedrca je 46-48 %. Priporočamo jo za sajenje v nasadih ali vrtovih, primerna je kot opraševalna sorta za sorto 'Chandler'. Oprašujejo jo sorte 'G-139', 'Fernor' in 'Franquette' (Godec in sod., 2009).

3.1.1.5 'Erjavec'

Je slovenska selekcija. Brsti sedem dni pred sorto 'Franquette' in dva dni po sorti 'G-139'. Drevo raste zelo bujno in razprostrto. Občutljivost enoletnih poganjkov in plodov na okužbo s *Xaj* je zelo majhna. Redno ter obilno rodi - rodna je večina lateralnih brstov. Majhen do srednje velik plod ima okroglo obliko in tehta 8,6-10,2 g. Izplen jedrca je 49-54 %. Luščina je rjava ter dobro spojena. Jelderce je svetlo in se srednje lahko izlušči (Solar in Štampar, 2006).

3.1.1.6 'Fernette'

Je francoski križanec, potomec sort 'Franquette' in 'Lara'. Brsti po 1. maju, zato dobro kljubuje poznim spomladanskim pozebam. Občutljivost za orehovo črno pegavost je zelo majhna. Raste srednje bujno, nekoliko razprostrto. Zarodi zelo zgodaj in redno ter obilno rodi - rodna je večina lateralnih brstov. Opraševalni sorti sta sorti 'Franquette' in 'Ronde de Montignac'. Plod je velik, okroglasto podolgovate, rahlo oglate oblike. Luščina je svetla, gladka in dobro spojena. Jedrce je veliko in nekoliko rjavkasto. Zori v drugi dekadi oktobra (Godec in sod., 2009).

3.2 METODA DELA

3.2.1 Vzorčenje in priprava vzorcev

Orehe smo nabrali v dveh fenofazah: ko so bili veliki kot oljke (Gf+30) in v fenofazi olesenele luščine (Gf+45). Za vsako sorto smo pobrali plodove z dveh dreves, in sicer z vsakega drevesa po pet zdravih orehov in pet orehov, okuženih s *Xaj*. Tako smo dobili 10 zdravih in 10 okuženih plodov za vsako sorto in fenofazo.

Preglednica 2: Datum vzorčenja plodov pri šestih sortah oreha

Sorta	Gf+30	Gf+45
Seifersdorfer	10. junij	26. junij
Šampion	17. junij	2. julij
Erjavec	23. junij	9. julij
Cisco	23. junij	9. julij
Zdole-60	30. junij	15. julij
Fernette	30. junij	15. julij

Hkrati z vzorčenjem smo tudi ocenjevali stopnjo okuženosti plodov s *Xaj*. Na vsakem drevesu smo ocenili 20 naključno izbranih plodov: po pet plodov z vsake strani krošnje. Ocene so bile od 0, kar je pomenilo zdrav plod, pa do 5, kar je pomenilo močno okužen in od boleznih deformiran plod (Priloga C).

Laboratorijsko analizo smo izvedli na Katedri za sadjarstvo, vinogradništvo in vrtnarstvo Biotehniške fakultete. Plodove, ki smo jih v hladilni torbi po vsakem vzorčenju pripeljali iz nasada, smo zamrzili s pomočjo tekočega dušika. Iz zamrzjenih plodov smo odrezali vzorec mezokarpa (zelena lupina). Pri okuženih plodovih smo vzorec vzeli na mestu okužbe skupaj z ozkim (1-2 mm) robom zdravega mezokarpa. Zatehtali smo 0,3 g vzorca in ga zmleli ter prelili s 3 ml ekstrakcijske raztopine metanol (3 ml) z 1% 2,6-di-tert-butil-4-metil-fenol (BHT). BHT smo dodali, da smo preprečili oksidacijo med ekstrakcijo. Vzorce smo za 30 min potopili v ultrazvočno kopel pri 4 °C in jih nato centrifugirali za 10

min. pri 10.000 obratih na minuto. Prefiltrirali smo jih skozi polimidni filter Chromafil® AO-45/25 (Macherey-Nagel) s premerom por 0,45µm v vialo. Tako smo pripravili 120 vzorcev, katere smo shranili na -20 °C za HPLC analizo.

3.2.2 Analiza fenolov s pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC)

Kromatografska analiza temelji na ločevanju posameznih komponent vzorca, ki jih nato zaznamo z ustreznim detektorjem. Posamezne komponente raziskovalnega vzorca se ločijo med seboj na podlagi njihovih fizikalnih in kemijskih interakcij z mobilno in stacionarno fazo (Žorž, 1991).

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti je separacijska tehnika, ki temelji na porazdelitvi vzorca med mobilno fazo, ki je tekočina majhne viskoznosti in stacionarno fazo, ki je trdna snov. Mobilna faza potuje skozi stacionarno fazo v določeni smeri. Topljenci, ki imajo večjo afiniteto do mobilne faze, preidejo hitreje iz kolone kot topljenci, ki se zadržujejo v stacionarni fazi. Eluirajo se v vrstnem redu po velikosti porazdelitvenih koeficientov glede na stacionarno fazo. Porazdelitev je posledica velikosti porazdelitvenih sil med molekulami topljenca in molekulami obeh faz. Močnejše kot so sile med molekulami topljenca in molekulami v stacionarni fazi, počasneje se topljenec eluira (Šircelj, 2001).

3.2.2.1 Analiza vzorcev

Za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti smo uporabili tekočinski kromatograf Surveyor, proizvajalca Thermo Finnigan (San Jose, ZDA), s kvarterno črpalko. Uporabili smo kolono Gemini C₁₈ (150 x 4,6 mm, 3 µm; Phenomenex, ZDA). Analiza je potekala pod kromatografskimi pogoji Escarpa in Gonzales (2000). Gradient je bil povzet po Marks in sod. (2007). Volumen injeciranega vzorca je bil 20 µl, pretok mobilne faze pa 1 ml/min. Temperatura kolone je bila 25 °C. Ločevanje fenolnih spojin je potekalo z mešanjem dveh mobilnih faz: topilo A je bila 1 % mravljična kislina v bidestilirani vodi, topilo B pa je bil 100 % acetonitril. Analiza posameznega vzorca je trajala 45 minut.

Detekcija fenolnih spojin je potekala pri valovnih dolžinah med 200 in 600 nm. Fenolne spojine smo kvalitativno določili s primerjavo retencijskih časov, absorpcijskih maksimumov v UV spektru in z dodatki standardne raztopine vzorcu in kvantitativno na osnovi primerjave višine vrhov na kromatografu glede na standardne raztopine. Koncentracije fenolov so izražene v mg/kg sveže mase (SvM).

3.2.3 Statistična obdelava podatkov

Podatke smo analizirali z enosmerno analizo variance s pomočjo programa Statgraphics Plus 4.0. Razlike v vsebnosti posameznih fenolnih spojin med sortami smo statistično testirali s Tukey-testom pri stopnji tveganja $p < 0,05$. Razlike v vsebnosti fenolnih spojin med zdravimi in okuženimi plodovi smo določili s preizkusom mnogoterih primerjav (LSD test) pri tveganju $p < 0,05$. Statistično značilne razlike smo označili z različnimi črkami. V preglednicah in slikah so podane povprečne vrednosti dveh terminov vzorčenja skupaj in standardne napake.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

V zdravih in okuženih plodovih oreha smo določili deset fenolnih spojin, od tega pet flavanolov (kvercetin-glukozid, kvercetin-3-arabinozid, kvercetin-3-ksilozid, kvercetin-3-ramnozid, miricetin-3-*O*-ksilozid), katehin iz skupine flavan-3-olov, tri hidroksicimetne kisline (4-*O*-*p*-kumarno-kininska, 3-kavino-kininska in 3-*O*-*p*-kumarno-kininska) ter galno kislino iz skupine hidroksibenzojskih kislin. V tabelarični in grafični obliki bomo predstavili kumulativne vsebnosti za posamezne skupine fenolov pri proučevanih šestih sortah oreha. V preglednicah in slikah so podane povprečne vrednosti obeh terminov vzorčenja skupaj.

4.1 VPLIV SORTE NA VSEBNOST FENOLOV PRI ZDRAVIH OREHIH

V mezokarpu zdravih orehov smo pri vseh sortah določili štiri skupine fenolov: flavan-3-oli, flavonoli, galna kislina in hidroksicimetne kisline.

4.1.1 Flavan-3-oli

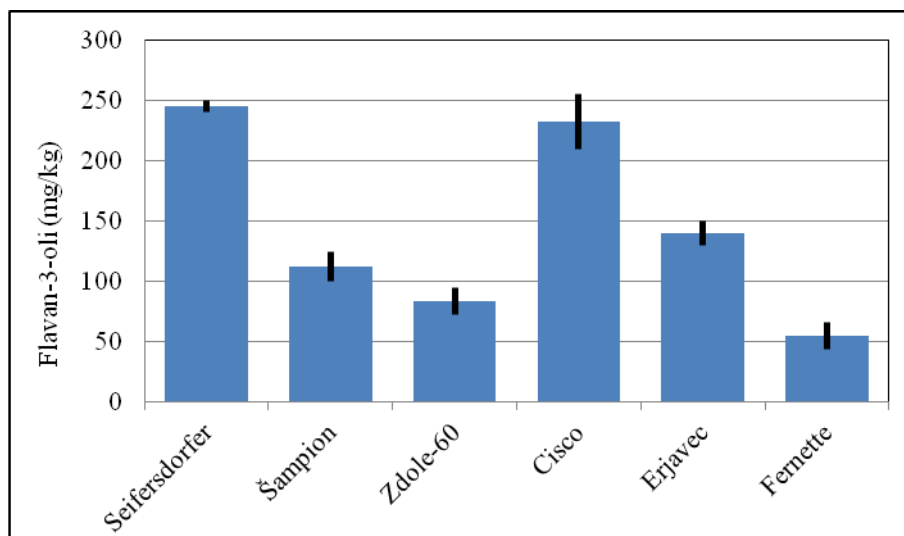
Spadajo v veliko skupino flavonoidov. Flavan-3-ole razdelimo na katehin in epikatehin (Abram in Simčič, 1997).

Preglednica 3: Povprečne vsebnosti flavan-3-olov v mg/kg za šest sort orehov v zeleni lupini zdravih plodov

Sorta	Flavan-3-oli
Seifersdorfer	245,46 ± 4,5 d*
Šampion	112,17 ± 11,86 bc
Zdole-60	83,64 ± 11,03 ab
Cisco	232,49 ± 22,87 d
Erjavec	139,96 ± 9,97 c
Fernette	54,44 ± 10,76 a

*Ista črka pomeni, da ni statistično značilnih razlik med sortami (LSD test, interval zaupanja 5 %). Prikazane so povprečne vrednosti ± standardna napaka v mg/kg sveže mase.

Izmerjene povprečne vrednosti flavan-3-olov pri zdravih plodovih so bile največje pri sortah 'Seifersdorfer' (245,46 mg/kg) in 'Cisco' (232,49 mg/kg). Sorti imata statistično značilo več flavan-3-olov od drugih sort (preglednica 3, slika 4). Sorti 'Erjavec' in 'Šampion' sta imeli srednjo vsebnost flavan-3-olov (139,69 oz. 112,17 mg/kg). Najmanj flavan-3-olov so imeli plodovi sort 'Zdole-60' in 'Fernette' (83,64 in 54,44 mg/kg). Sorta 'Fernette' se statistično značilno loči od vseh drugih sort, razen sorte 'Zdole-60', ter je imela za 4,5 krat manj flavan-3-olov kot sorta 'Seifersdorfer'.



Slika 4: Povprečne vsebnosti flavan-3-olov \pm standardne napake v mg/kg za šest preučevanih sort orehov v zeleni lupini zdravih plodov

Flavan-3-ole so pri orehih določili že v raziskavah Colarič in sod. (2004), Solar in sod. (2006b) in Štampar in sod. (2006). Vrednosti med sortami so se razlikovale, tako kot pri naši raziskavi. V raziskavi Solar in sod. (2006b) sta bili vključeni tudi sorti 'Cisco' in 'Šampion', ki sta imeli podobne vrednosti flavan-3-olov kot smo jih izmerili mi.

4.1.2 Flavonoli

Spadajo tako kot flavan-3-oli v veliko skupino flavonoidov. Flavonole razdelimo na kvercetin in miricetin (Abram in Simčič, 1997).

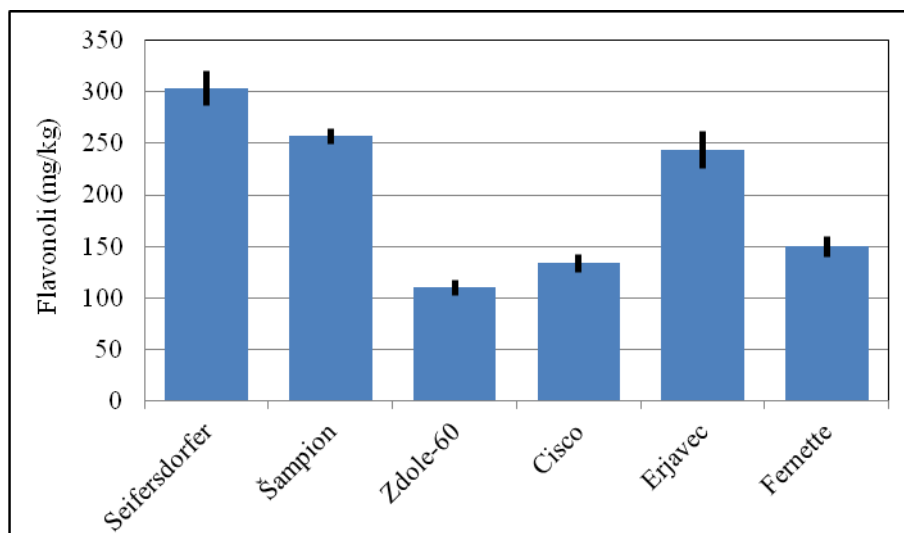
Preglednica 4: Povprečne vsebnosti flavonolov v mg/kg za šest sort orehov v zeleni lupini zdravih plodov

Sorta	Flavonoli
Seifersdorfer	304,14 \pm 17 d*
Šampion	257,08 \pm 7,43 c
Zdole-60	109,49 \pm 8,09 a
Cisco	133,66 \pm 8,64 ab
Erjavec	243,24 \pm 18,08 c
Fernette	149,51 \pm 9,68 b

*Ista črka pomeni, da ni statistično značilnih razlik med sortami (LSD test, interval zaupanja 5 %). Prikazane so povprečne vrednosti \pm standardna napaka v mg/kg sveže mase.

Največjo vsebnost flavonolov je imela sorta 'Seifersdorfer' s 304,14 mg/kg in se statistično značilno razlikuje od vseh drugih sort v naši raziskavi (preglednica 4, slika 5). Sledita sorti

‘Šampion’ (257,08 mg/kg) in ‘Erjavec’ (243,24 mg/kg). Orehi sort ‘Fernette’ in ‘Cisco’ so imeli skoraj polovico manj flavonolov (149,51 in 133,66 mg/kg), statistično značilno najmanj pa jih je bilo v plodovih sorte ‘Zdole-60’ (109,49 mg/kg) in ‘Cisco’ (133,66 mg/kg).



Slika 5: Povprečne vsebnosti flavonolov ± standardne napake v mg/kg za šest preučevanih sort orehov v zeleni lupini zdravih plodov

Amaral in sod. (2004) so določili flavonole v listih orehov. V plodovih oreha so Colarič in sod. (2004), Solar in sod. (2006b) in Štampar in sod. (2006) določili različne vrednosti flavonolov, ki so se razlikovale med sortami, kar je skladno z našimi rezultati.

4.1.3 Galna kislina

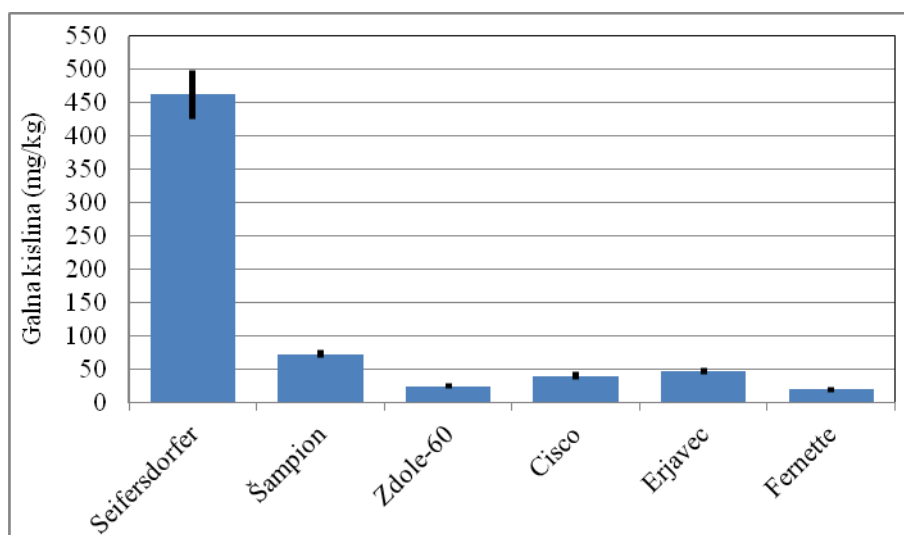
Spada v podskupino hidroksibenzojske kisline. Osnovna struktura je C_6C_1 (Abram in Simčič, 1997).

Preglednica 5: Povprečne vsebnosti galne kisline v mg/kg za šest sort orehov v zeleni lupini zdravih plodov

Sorta	Galna kislina
Seifersdorfer	462,67 ± 36,47 c*
Šampion	73,65 ± 5,54 b
Zdole-60	25,03 ± 3,92 a
Cisco	40,97 ± 5,46 ab
Erjavec	47,82 ± 4,04 ab
Fernette	19,91 ± 3,94 a

*Ista črka pomeni, da ni statistično značilnih razlik med sortami (LSD test, interval zaupanja 5 %). Prikazane so povprečne vrednosti ± standardna napaka v mg/kg sveže mase.

Povprečna vsebnost galne kisline pri zdravih plodovih je bila statistično značilno največja pri sorti 'Seifersdorfer' (462,67 mg/kg) (preglednica 5, slika 6), kar je 6,5 krat več od druge največje vsebnosti pri sorti 'Šampion' (73,65 mg/kg) in kar 23 krat oz. 18 krat več od najmanjše izmerjenih vrednosti pri sortah 'Fernette' (19,91 mg/kg) in 'Zdole-60' (25,03 mg/kg). Pri sortah 'Cisco' (40,97 mg/kg) in 'Erjavec' (47,82 mg/kg) smo analizirali podobno vsebnost galne kisline.



Slika 6: Povprečne vsebnosti galne kisline \pm standardne napake v mg/kg za šest preučevanih sort orehov v zeleni lupini zdravih plodov

Galno kislino so določili v orehih Solar in sod. (2006b), Zhang in sod. (2009) in Štampar in sod. (2006). Vrednosti so se med sortami razlikovale, tako kot v našem primeru.

4.1.4 Hidroksicimetne kisline

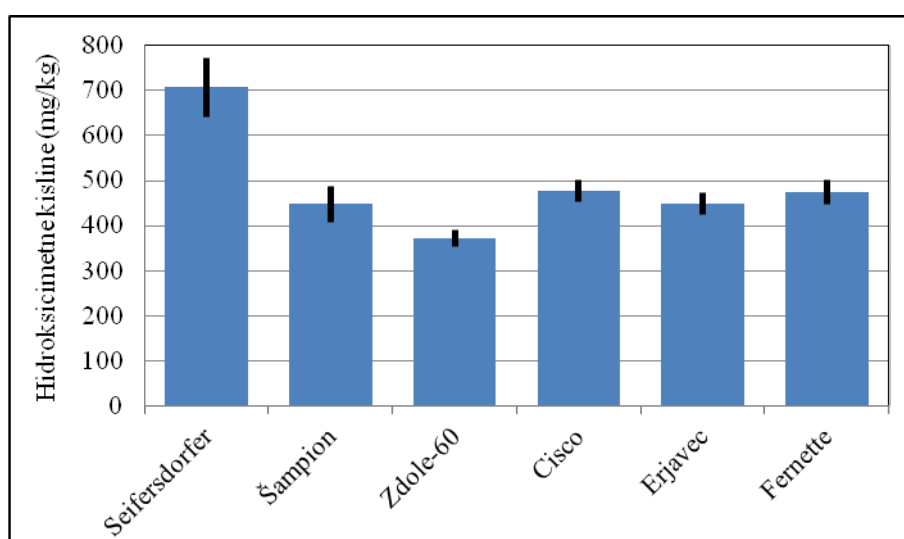
Najpomembnejša hidroksicimetna kislina, ki jo dobimo v sadju, je klorogenska kislina (Macrae in sod., 1993). Hidroksicimetne kisline so prisotne v jabolkih, hruškah, breskvah, marelicah, češnjah, slivah, borovnicah, krompirju (Rice-Evans in sod., 1996)

Preglednica 6: Povprečne vsebnosti hidroksicimetnih kislin v mg/kg za šest sort orehov v zeleni lupini zdravih plodov

Sorta	Hidroksicimetne kisline
Seifersdorfer	707,41 ± 65,44 b*
Šampion	447,38 ± 39,74 a
Zdole-60	371,44 ± 19,69 a
Cisco	477,85 ± 23,69 a
Erjavec	448,82 ± 24,12 a
Fernette	474,01 ± 27,87 a

*Ista črka pomeni, da ni statistično značilnih razlik med sortami (LSD test, interval zaupanja 5 %). Prikazane so povprečne vrednosti ± standardna napaka v mg/kg sveže mase.

Največjo povprečno vsebnost hidroksicimetnih kislin smo izmerili pri sorti 'Seifersdorfer' (707,41 mg/kg), ki se statistično značilno razlikuje od drugih sort (preglednica 6, slika 7). Pri njih smo izmerili med 477,85 mg/kg ('Cisco') in 371,44 mg/kg ('Zdole-60') hidroksicimetnih kislin. Od štirih analiziranih fenolnih skupin (flavan-3-oli, flavonoli, galna kislina in hidriksicimetne kisline) so bile hidroksicimetne kisline prisotne v največjih koncentracijah pri vseh sortah.



Slika 7: Povprečne vsebnosti hidroksicimetnih kislin ± standardne napake v mg/kg za šest preučevanih sort orehov v zeleni lupini zdravih plodov

Različne hidroksicimetne kisline so analizirali pri orehih Amaral in sod. (2004) in Solar in sod. (2006a, 2006b). V njihovih raziskavah so se vsebnosti bolj razlikovale med sortami kot pri naši. Vzroki so verjetno v tem, da so raziskali drugačne sorte, v nekaterih primerih je bil tudi čas vzorčenja drugačen. Eden od možnih vzrokov je tudi, da so analizirali druge hidroksicimetne kisline kot v naši raziskavi.

4.2 VSEBNOST FENOLOV V ZDRAVIH IN OKUŽENIH OREHIH

Ugotovili smo, da se je v zeleni lupini okuženih orehov vsebnost fenolnih spojin v skoraj vseh primerih povečala v primerjavi z zdravimi plodovi. S preglednicami in slikami bomo prikazali odziv fenolov na okužbo z orehovo črno pegavostjo pri posameznih sortah.

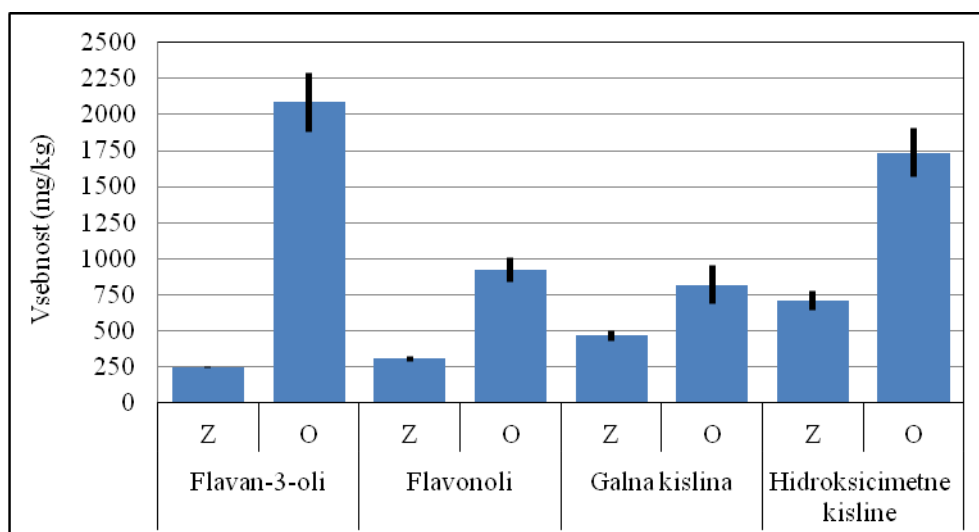
4.2.1 'Seifersdorfer'

Preglednica 7: Vsebnost fenolnih spojin (mg/kg) v zeleni lupini pri zdravih in okuženih plodovih pri sorti 'Seifersdorfer'

Fenolne spojine	Zdravi	Okuženi
Flavan-3-oli	245,46 ± 4,5 a *	2084,94 ± 203,96 b
Flavonoli	304,14 ± 17 a	923,81 ± 84,65 b
Galna kislina	462,67 ± 36,47 a	817,78 ± 131,97 b
Hidroksicimetne kisline	707,41 ± 65,44 a	1735,28 ± 169,09 b

*Ista črka pomeni, da ni statistično značilnih razlik med zdravimi in okuženimi plodovi (LSD test, interval zaupanja 5 %). Prikazane so povprečne vrednosti ± standardna napaka v mg/kg sveže mase.

Sorta 'Seifersdorfer' je imela med vsemi proučevanimi sortami največ fenolnih spojin v zdravih plodovih. V okuženih plodovih so se vrednosti še povečale, kar je razvidno iz preglednice 7 in slike 8. Pri vseh fenolnih spojinah smo ugotovili statistično značilne razlike v povprečnih vsebnostih med zdravimi in okuženimi plodovi. Flavan-3-olov je bilo 8,5 krat več, flavonoli so se povečali za trikrat, vsebnost galne kisline se je povečala za 1,8 krat, hidroksicimetnih kislin pa skoraj za 2,5 krat.



Slika 8: Povprečna vsebnost fenolnih spojin ± standardne napake (mg/kg) v zeleni lupini pri zdravih (Z) in okuženih (O) plodovih pri sorti 'Seifersdorfer'

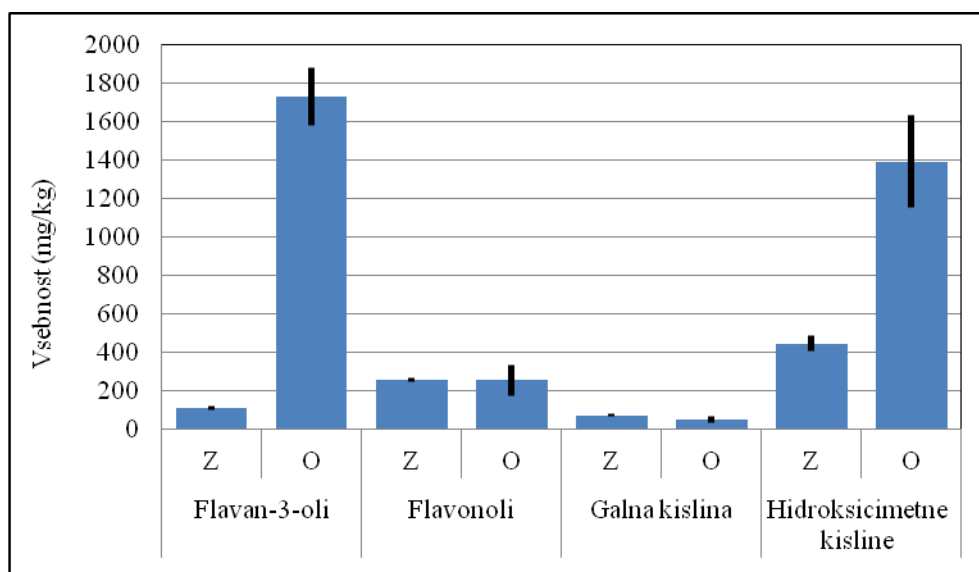
4.2.2 'Šampion'

Preglednica 8: Vsebnost fenolnih spojin (mg/kg) v zeleni lupini pri zdravih in okuženih plodovih pri sorti 'Šampion'

Fenolne spojine	Zdravi	Okuženi
Flavan-3-oli	112,17 ± 19,54 a*	1732,62 ± 149,4 b
Flavonoli	257,08 ± 7,43 a	254,17 ± 79,97 a
Galna kislina	73,65 ± 5,54 a	49,35 ± 14,84 a
Hidroksicimetne kisline	447,39 ± 39,74 a	1393,15 ± 238,45 b

*Ista črka pomeni, da ni statistično značilnih razlik med zdravimi in okuženimi plodovi (LSD test, interval zaupanja 5 %). Prikazane so povprečne vrednosti ± standardna napaka v mg/kg sveže mase.

Kot je razvidno iz preglednice 8, je razlika v vsebnosti fenolnih spojin med zdravimi in okuženimi plodovi statistično značilna pri flavan-3-olih in hidroksicimetnih kislinah. V okuženih plodovih smo izmerili 15,5 krat več flavan-3-olov in trikrat več hidroksicimetnih kislin kot v zdravih plodovih. Pri flavonolih in galni kislini pa ni bilo statistično značilnih razlik med zdravimi in okuženimi plodovi (slika 9).



Slika 9: Povprečna vsebnost fenolnih spojin ± standardne napake (mg/kg) v zeleni lupini pri zdravih (Z) in okuženih (O) plodovih pri sorti 'Šampion'

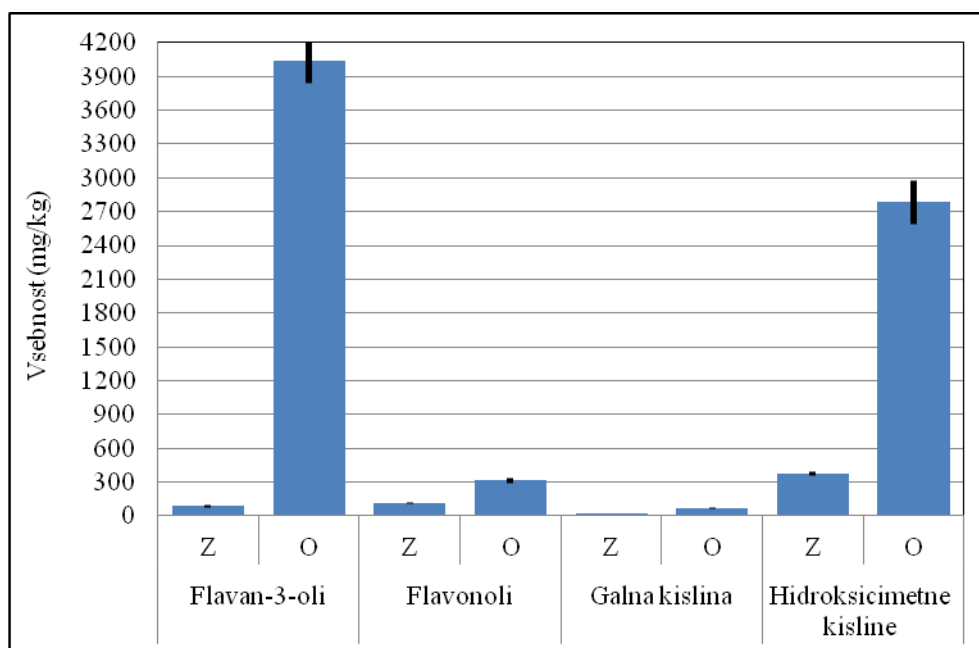
4.2.3 'Zdole-60'

Preglednica 9: Vsebnost fenolnih spojin (mg/kg) v zeleni lupini pri zdravih in okuženih plodovih pri sorti 'Zdole-60'

Fenolne spojine	Zdravi	Okuženi
Flavan-3-oli	83,64 ± 11,03 a*	4039,57 ± 195,74 b
Flavonoli	109,49 ± 8,09 a	313,58 ± 20,9 b
Galna kislina	25,03 ± 3,92 a	66,77 ± 8,21 b
Hidroksicimetne kisline	371,44 ± 19,69 a	2782,29 ± 189,34 b

*Ista črka pomeni, da ni statistično značilnih razlik med zdravimi in okuženimi plodovi (LSD test, interval zaupanja 5 %). Prikazane so povprečne vrednosti ± standardna napaka v mg/kg sveže mase.

Pri sorti 'Zdole-60' so se pri vseh štirih skupinah fenolnih spojin pokazale statistično značilne razlike med zdravimi in okuženimi plodovi (preglednica 9). Največja razlika je bila izmerjena za flavan-3-ole, ki se je v okuženih plodovih povečala za 48,5 krat v primerjavi z zdravimi (slika 10). To je največje povečanje vsebnosti katerega koli fenola v analizi med vsemi sortami. Ostale fenolne spojine so se povečale za 7,5 krat (hidroksicimetne kisline), trikrat (flavonoli) in 2,5 krat (galna kislina).



Slika 10: Povprečna vsebnost fenolnih spojin ± standardne napake (mg/kg) v zeleni lupini pri zdravih (Z) in okuženih (O) plodovih pri sorti 'Zdole-60'

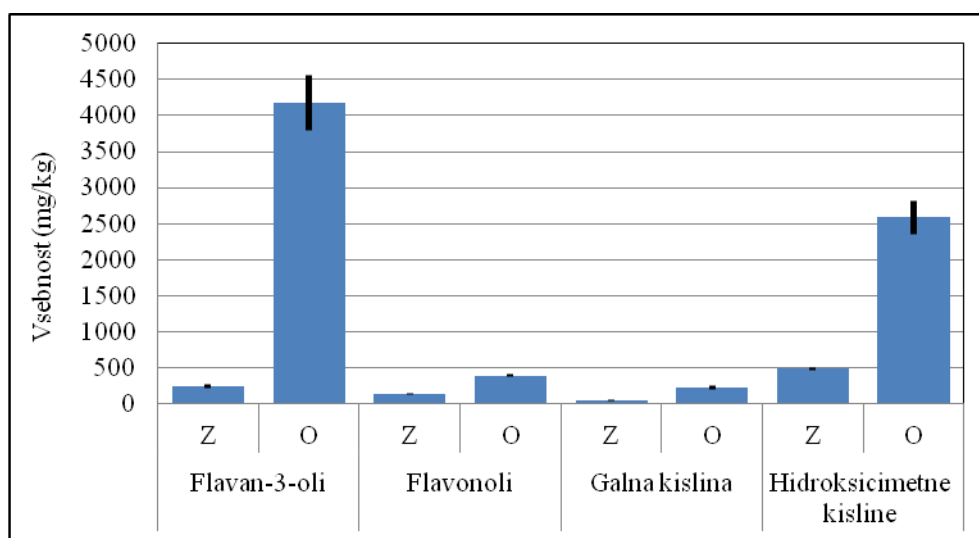
4.2.4 'Cisco'

Preglednica 10: Vsebnost fenolnih spojin (mg/kg) v zeleni lupini pri zdravih in okuženih plodovih pri sorti 'Cisco'

Fenolne spojine	Zdravi	Okuženi
Flavan-3-oli	232,49 ± 22,87 a*	4176,78 ± 384,32 b
Flavonoli	133,66 ± 8,64 a	384,77 ± 18,89 b
Galna kislina	40,96 ± 5,46 a	213,25 ± 30,49 b
Hidroksicimetne kisline	477,85 ± 23,69 a	2584 ± 228,7 b

*Ista črka pomeni, da ni statistično značilnih razlik med zdravimi in okuženimi plodovi (LSD test, interval zaupanja 5 %). Prikazane so povprečne vrednosti ± standardna napaka v mg/kg sveže mase.

Pri sorti 'Cisco' smo statistično značilne razlike med zdravimi in okuženimi orehi zabeležili pri vseh štirih skupinah fenolnih spojin (preglednica 10). Največje povečanje smo izmerili pri flavan-3-olih, ki so se v okuženih orehih povečali za 18 krat v primerjavi z zdravimi. Za skoraj 5,5 krat se je zvišale vsebnost hidroksicimetnih kislin. Dobrih petkrat je narasla vsebnost galne kisline, najmanj (slabe trikrat) pa vsebnost flavonolov (slika 11).



Slika 11: Povprečna vsebnost fenolnih spojin ± standardne napake (mg/kg) v zeleni lupini pri zdravih (Z) in okuženih (O) plodovih pri sorti 'Cisco'

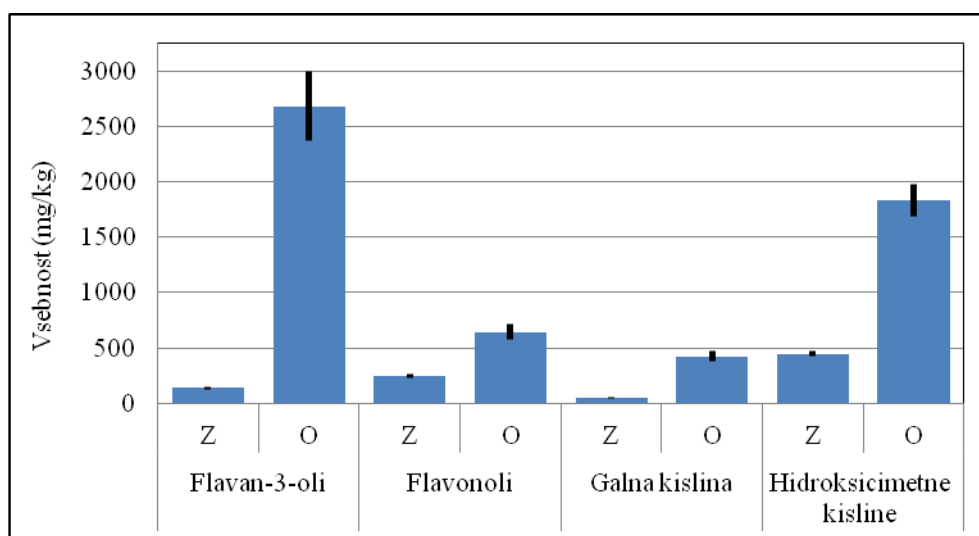
4.2.5 'Erjavec'

Preglednica 11: Vsebnost fenolnih spojin (mg/kg) v zeleni lupini pri zdravih in okuženih plodovih pri sorti 'Erjavec'

Fenolne spojine	Zdravi	Okuženi
Flavan-3-oli	139,96 ± 9,97 a*	2686,49 ± 317,37 b
Flavonoli	243,24 ± 18,08 a	644,62 ± 65,78 b
Galna kislina	47,82 ± 4,038 a	424,99 ± 48,35 b
Hidroksicimetne kisline	448,82 ± 24,12 a	1836,05 ± 148,63 b

*Ista črka pomeni, da ni statistično značilnih razlik med zdravimi in okuženimi plodovi (LSD test, interval zaupanja 5 %). Prikazane so povprečne vrednosti ± standardna napaka v mg/kg sveže mase.

Pri sorti 'Erjavec' so se pri vseh štirih obravnavanjih pokazale statistično značilne razlike v vsebnosti fenolov med zdravimi in okuženimi orehi (preglednica 11). Največja razlika je bila izmerjena za flavan-3-ole, ki so se pri okuženih orehih povečali za dobrih 19 krat v primerjavi z zdravimi (slika 12). Hidroksicimetne kisline so se povečale za štirikrat in za 2,5 krat flavonoli. Pri sorti 'Erjavec' smo zabeležili največje povečanje galne kisline med zdravimi in okuženimi orehi med vsemi preiskovanimi sortami. Vsebnost se je povečala za devetkrat.



Slika 12: Povprečna vsebnost fenolnih spojin ± standardne napake (mg/kg) v zeleni lupini pri zdravih (Z) in okuženih (O) plodovih pri sorti 'Erjavec'

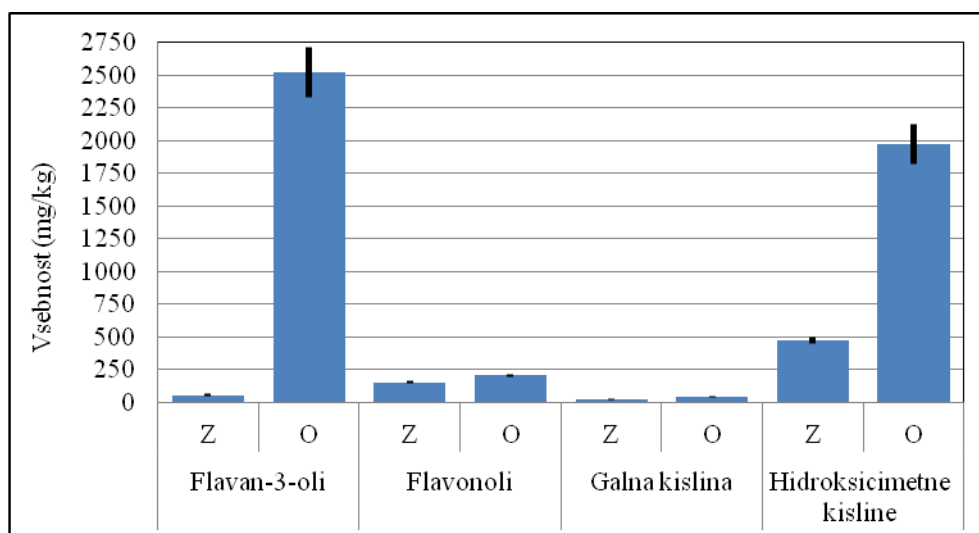
4.2.6 'Fernette'

Preglednica 12: Vsebnost fenolnih spojin (mg/kg) v zeleni lupini pri zdravih in okuženih plodovih pri sorti 'Fernette'

Fenolne spojine	Zdravi	Okuženi
Flavan-3-oli	54,44 ± 10,76 a*	2522,16 ± 188,72 b
Flavonoli	149,51 ± 9,68 a	206,38 ± 8,26 b
Galna kislina	19,91 ± 3,94 a	40,18 ± 4,5 b
Hidroksicimetne kisline	474,01 ± 27,87 a	1972,98 ± 150,89 b

*Ista črka pomeni, da ni statistično značilnih razlik med zdravimi in okuženimi plodovi (LSD test, interval zaupanja 5 %). Prikazane so povprečne vrednosti ± standardna napaka v mg/kg sveže mase.

Pri vseh štirih skupinah fenolnih spojin so se pokazale statistično značilne razlike med zdravimi in okuženimi orehi (preglednica 12). Največja razlika je bila izmerjena za flavan-3-ole, ki se je pri okuženih orehih povečala za slabih 47 krat v primerjavi z zdravimi (slika 13). Vsebnosti hidroksicimetnih kislin so se povečale štirikrat, flavonolov pa 1,4 krat. Okuženi orehi sorte 'Fernette' so imeli tudi dvakrat več galne kisline kot zdravi.



Slika 13: Povprečna vsebnost fenolnih spojin ± standardne napake (mg/kg) v zeleni lupini pri zdravih (Z) in okuženih (O) plodovih pri sorti 'Fernette'

Pri vseh sortah so se ob okužbi povečali flavan-3-oli, kar je skladno z ugotovitvami Mikulič-Petkovšek in sod. (2008, 2009) in Treutter (2005), kjer so povečanje flavan-3-olov zaznali ob okužbi jabolane s škrlupom. Na orehih so povečanje vsebnosti flavan-3-olov ugotovili Solar in sod. (2009b), ko so umetno okuževali plodove orehov s *Xaj*.

V okuženih orehih so se povečale tudi vrednosti flavonolov. Ti rezultati so skladni s povečanjem flavonolov ob okužbi plodov jabolane s škrlupom (Mikulič-Petkovšek in sod.,

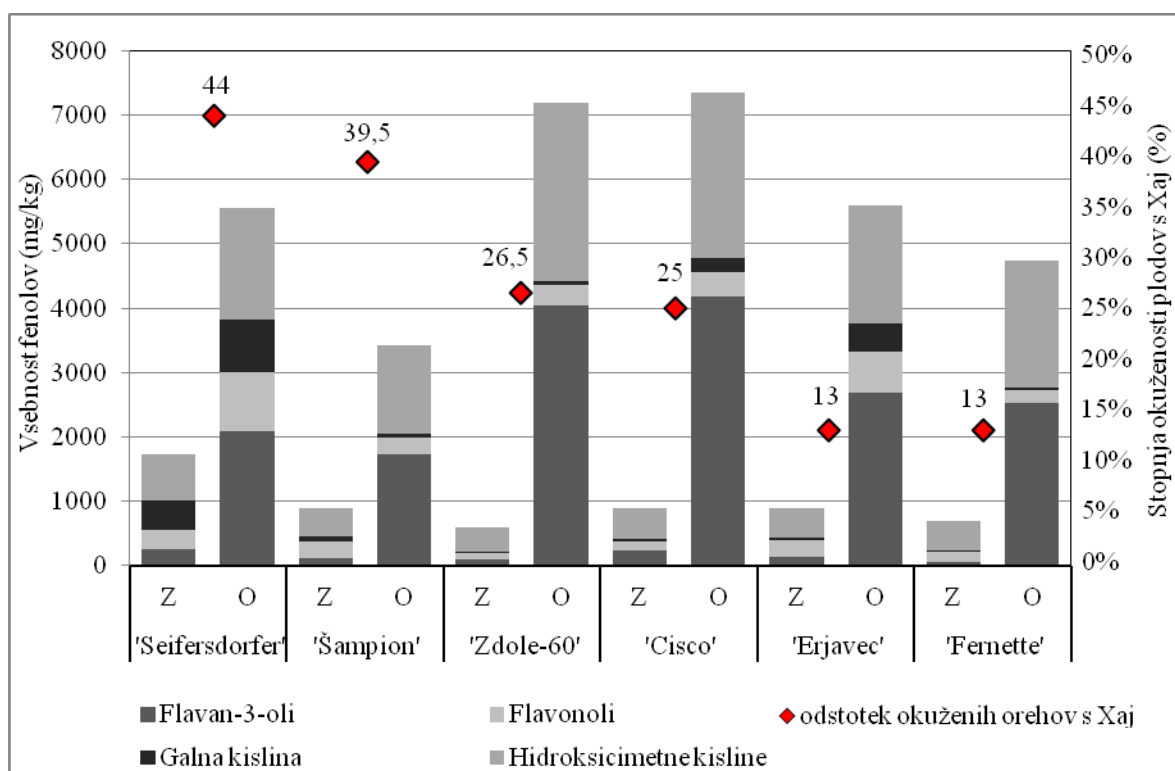
2008, 2011; Treutter, 2005). Izjema v naši raziskavi je bila sorta 'Šampion', kjer se vrednost flavonolov ob okužbi ni povečala, ampak je ostala na ravni pred okužbo.

Vsebnost galne kisline se je ob okužbi povečala pri vseh sortah z izjemo sorte 'Šampion', kjer so imeli okuženi orehi celo manj galne kisline kot zdravi. Hidroksicimetne kisline so se pri vseh sortah orehov ob okužbi povečale, kar so ugotovili tudi Mikulič-Petkovšek in sod. (2008, 2009, 2011) pri jablani, okuženi z jablanovim škrlupom.

Največje povečanje ob okužbi smo zabeležili pri flavan-3-olih in hidroksicimetnih kislinah, kar potrjujejo tudi Mikulič-Petkovšek in sod. (2008, 2009), Treutter (2005) in Solar in sod. (2009b).

4.3 ZVEZA MED VSEBNOSTJO FENOLOV IN ODPORNOSTJO PLODOV NA OREHOVO ČRNO PEGAVOST

Zvezo med fenoli v plodovih oreha in njihovo odpornostjo na orehovo črno pegavost smo poskušali določiti na osnovi vsebnosti različnih fenolnih spojin, ki so se razvile v zdravih plodovih, vsebnostjo fenolov, ki so nastali v obolelih plodovih kot odgovor na okužbo s *Xaj* ter stopnjo okuženosti plodov v nasadu.



Slika 14: Povprečna skupna vsebnost analiziranih fenolnih spojin pri zdravih (Z) in okuženih (O) plodovih oreha za preučevanih šest sort z vrisano povprečno stopnjo okuženosti plodov s *Xaj*

Iz slike 14 je razvidno, da se tako vsebnosti posameznih fenolov kot skupne količine zelo razlikujejo pri posamezni sorti, kar se ujema z ugotovitvami drugih avtorjev (Colarič in sod., 2004; Jakopič in sod., 2007; Solar in sod., 2006a; Treutter, 2005). Pri jablani so ugotovili, da imajo sorte, odporne na škrlup, več fenolov v listih in plodovih kot za škrlup občutljive sorte (Rat-Morris in sod., 1996; Mikulič-Petkovšek in sod., 2008, 2009). Pri orehu je imela sorta 'Ferner', ki je malo občutljiva za orehovo črno pegavost (Solar, 1995-2006), največjo vsoto šestih fenolov med proučevanimi šestimi sortami (Colarič in sod., 2004). Tudi pri sorti 'Franquette', ki ravno tako ni občutljiva na *Xaj*, je bila v plodovih izmerjena večja vsota fenolnih kislin in juglona kot pri petih drugih sortah z različno občutljivostjo na *Xaj* (Solar in sod., 2006b).

V naši raziskavi so največ fenolnih spojin vsebovali zdravi plodovi sorte 'Seifersdorfer'. Iz tega bi lahko sklepali, da je sorta manj občutljiva na orehovo črno pegavost kot druge proučevane sorte. Vendar dolgoletni podatki iz kolekcijskega nasada kažejo, da je ta sorta zelo občutljiva na *Xaj*. To je potrdilo tudi naše ocenjevanje stopnje okuženosti orehov v nasadu, ki je bila 44 % (slika 14, priloga A), kar je največji odstotek med vsemi šestimi sortami.

Sorta 'Šampion', ki ravno tako velja za zelo občutljivo, je imela v zeleni lupini zdravih orehov skoraj dvakrat manj fenolov kot 'Seifersdorfer', stopnja okuženosti z boleznijo pa je bila le nekoliko manjša (39,5 %). Pri zelo malo občutljivih sortah 'Erjavec' in 'Fernette' so bili plodovi v nasadu zelo zdravi. Stopnja napadenosti s *Xaj* je bila samo 13 % (slika 14, priloga A), skupna vsebnost analiziranih fenolov pa statistično značilno manjša kot pri najbolj občutljivi sorti 'Seifersdorfer'. Ti rezultati kažejo, da pri orehu ne velja obratno sorazmerje med vsebnostjo fenolov v zdravih plodovih in njihovo odpornostjo na *Xaj*, kar velja za jablano in škrlup (Treutter, 2005). To potrjujejo tudi rezultati, ki smo jih dobili pri srednje občutljivih sortah 'Zdole-60' in 'Cisco', ki sta imeli skoraj enako okužene plodove (26,5 in 25 %), vsebnost fenolov v zdravih plodovih pa je bila pri sorti 'Cisco' kar za 50 % večja kot pri sorti 'Zdole-60'.

V raziskavi smo ugotovili tudi, da je okužba z orehovo črno pegavostjo pri vseh sortah povzročila povečano sintezo fenolov. Enako reakcijo so opazili tudi Solar in sod. (2006b, 2009b, 2012) ter Matias in sod. (2009). Tudi pri jablani, okuženi s škrlupom, pride do povečane tvorbe fenolnih spojin (Mikulič-Petkovšek in sod., 2008, 2009, 2011).

Najšibkejši odziv na okužbo smo izmerili pri najmanj odpornih sortah 'Seifersdorski' in 'Šampion' (slika 14). V primerjavi z zdravimi plodovi se je skupna vsebnost fenolov v okuženih orehih povečala samo 3,2 krat oz. 3,8 krat. Pri srednje občutljivih sortah 'Cisco' in 'Zdole-60' je bilo povečanje 8,3 oz. 12,2 kratno, pri najmanj občutljivih sortah 'Fernette' in 'Erjavec' pa so imeli okuženi plodovi 6,8 krat in 6,4 krat več fenolov kot zdravi.

Pri sortah 'Zdole-60' in 'Fernette' je v okuženih plodovih najbolj narasla koncentracija flavan-3-olov: s *Xaj* okuženi orehi so jih imeli 48 oz. 46 krat več kot zdravi (slika 14). Kot sta ugotovila Treutter in Feucht (1990), flavan-3-oli prispevajo k manjši občutljivost jablan na škrlup. Iz tega lahko sklepamo, da so morda tudi v našem primeru flavan-3-oli vplivali na to, da je imela sorta 'Zdole-60' samo četrtno okuženih plodov, sorta 'Fernette' pa samo 13 % (slika 14).

Pri sortah 'Cisco' in 'Zdole-60' se je v okuženih plodovih najbolj (5,4 krat oz. 7,5 krat) povečala sinteza hidroksicimetnih kislin (slika 14). Hamazu (2006) poroča, da se rastline s sintezo fenolnih kislin odzivajo na različne vrste stresa, med drugim tudi na okužbo s patogeni. Fenolne kisline sodelujejo pri lignifikaciji rastlinskega tkiva, ki prepreči nadaljnjo širjenje okužbe. Možno je, da je bila povečana sinteza hidroksicimetnih kislin ob okužbi s *Xaj* tista, ki je vplivala, da stopnja okuženosti pri omenjenih dveh sortah ni preseгла 26,5 % (slika 14).

Okuženi plodovi malo občutljive sorte 'Erjavec' so imeli najnižjo stopnjo okuženosti s *Xaj* (slika 14, priloga A). V primerjavi z zdravimi plodovi, smo v okuženih izmerili devetkratni porast galne kisline, ki je morda preprečil, da bi se stopnja okuženosti plodov dvignila nad ocenjenih 13 %. Iz rezultatov sklepamo, da tudi galna kislina sodeluje pri obrambi orehov pred *Xaj*, o čemer poročajo tudi Solar in sod. (2012).

5 SKLEPI

V poskusu smo na šestih sortah oreha analizirali vsebnost fenolnih spojin v zdravih in okuženih plodovih v dveh terminih. Ob vzorčenju smo ocenili tudi stopnjo okuženosti plodov z bakterijo *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* v poskusnem nasadu (*in situ*).

Vsebnosti posameznih fenolnih spojin v plodovih oreha smo primerjali med sortami. Analizirali smo zdrave in okužene plodove. Na osnovi vsebnosti fenolov in stopnje okuženosti plodov smo poskusili poiskati zvezo med fenoli v orehih in njihovo odpornostjo na orehovo črno pegavost.

Ugotovili smo:

- Da se proučevane sorte statistično značilno ločijo glede na vsebnost fenolnih spojin v plodovih. Največ fenolov je imela sorta 'Seifersdorfer' najmanj pa sorta 'Zdole-60'.
- Da se pri vseh sortah zdravi orehi statistično značilno razlikujejo od plodov, okuženih s *Xaj* glede na analizirane fenolne spojine. Izjema je bila sorta 'Šampion', kjer pri flavonolih in galni kislini ni bilo statistično značilnih razlik. Razlike so največje pri flavan-3-olih in najmanjše pri flavonolih.
- Sestava ali profil fenolnih spojin je bil enak ne glede na proučevano sorto in zdravstveno stanje plodov. V vseh sortah smo našli falvan-3-ole, flavonole, galno kislino in hidroksicimetne kisline.
- Velika vsebnost fenolnih spojin v plodovih še ne pomeni, da je sorta odporna ali malo občutljiva na *Xaj*. Šele s primerjavo vsebnosti fenolov v zdravih in okuženih plodovih ter ocenjeno stopnjo okuženosti plodov v nasadu lahko sklepamo, da morda obstaja zveza med odpornostjo orehov na orehovo črno pegavost in vsebnostjo nekaterih fenolnih spojin v plodovih.

Tako lahko potrdimo delovno hipotezo, kjer smo predpostavljali, da obstajajo razlike med sortami v vsebnosti fenolnih spojin, ter da obstajajo razlike v vsebnosti fenolnih spojin med zdravimi in z orehovo črno pegavostjo okuženimi plodovi. Delno lahko potrdimo hipotezo, da obstaja zveza med odpornostjo orehov na orehovo črno pegavost in vsebnostjo fenolnih spojin v plodovih. Za trdnejšo potrditev te zveze bi bilo potrebno opraviti še druge raziskave, naprimer določiti antibakterijsko delovanje nekaterih fenolov v kontroliranih pogojih (*in vitro*) in analizirati sintezo fenolov kot odgovor na umetno okuževanje plodov.

6 POVZETEK

Orehova črna pegavost (*Xaj*) je ena najpomembnejših boleznih orehov in prizadene liste, poganjke, cvetove in plodove. Zaradi omejenega izbora FFS, predvsem pa težavnega škropljenja velikih dreves oreha je sajenje odpornejših sort najboljši način zagotavljanja boljšega zdravstvenega stanja dreves, posledično pa tudi večjega pridelka. Fenolne snovi veliko prispevajo k naravni odpornosti sadnega drevja. Pri odpornih sortah zavrejo okužbo.

V naši raziskavi smo analizirali vsebnosti štirih skupin fenolov (flavan-3-oli, flavonoli, galna kislina in hidrokscimetne kisline) v plodovih šestih sort orehov. Izbrali smo sorte 'Seifersdorfer', 'Šampion', 'Zdole-60', 'Cisco', 'Erjavec' in 'Fernette', ki so različno občutljive na orehovo črno pegavost. Hkrati z vzorčenjem smo ocenjevali stopnjo okuženosti plodov s *Xaj* v nasadu (*in situ*).

Namen raziskave je bil ugotoviti, ali obstajajo razlike v vsebnosti in sestavi fenolnih spojin med sortami. Ugotavljali smo tudi razlike med zdravimi in okuženimi plodovi glede na vsebnost in sestavo fenolnih spojin. Določali smo tudi zvezo med odpornostjo orehov na orehovo črno pegavost in vsebnostjo fenolnih spojin v plodovih.

Ugotovili smo, da obstajajo statistično značilne razlike v vsebnosti fenolnih spojin pri zdravih plodovih med sortami. Najbolj je izstopala sorta 'Seifersdorfer', ki je imela dvakrat več fenolnih spojin kot druge sorte. Od štirih analiziranih fenolnih skupin (flavan-3-oli, flavonoli, galna kislina in hidrokscimetne kisline) smo pri hidrokscimetnih kislinah izmerili največje vsebnosti pri vseh sortah. Med sortama 'Šampion' in 'Erjavec' ni bilo statistično značilnih razlik v vseh štirih analiziranih fenolnih skupinah.

Pri analiziranju razlik v vsebnosti fenolnih spojin med zdravimi in okuženimi plodovi smo ugotovili, da so se v vseh sortah ob okužbi najbolj povečale vsebnosti flavan-3-olov. Najbolj (48 krat) pri sorti 'Zdole-60'. To je največji porast vsebnosti kateregakoli fenola v analizi med vsemi sortami. Največje povečanje hidrokscimetne kisline smo zasledili pri sorti 'Zdole-60' (7,5 krat), galne kisline pa pri sorti 'Erjavec' (devetkrat). Vsebnost flavonolov se je podobno povečala pri vseh sortah. Pri petih sortah so se zdravi in okuženi plodovi statistično značilno razlikovali glede na vsebnost flavonolov. Zdravi orehi sorte 'Šampion' so se značilno razlikovali od okuženih samo po vsebnosti flavan-3-olov in hidrokscimetnih kislin.

S primerjavo vsebnosti fenolov v zdravih orehih in fenolov, ki so se razvili kot odgovor na okužbo s *Xaj* ter ocenjeno stopnjo okuženosti plodov v poskusnem nasadu smo delno potrdili zvezo med odpornostjo plodov oreha na orehovo črno pegavost in vsebnostjo flavan-3-olov, hidrokscimetnih kislin in galne kisline.

7 VIRI

- Abram V. 2000. Antioksidativno delovanje flavonoidov. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi dnevi, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 23-32
- Abram V., Simčič M. 1997. Fenolne spojine kot antioksidanti. Farmaceutski vestnik, 48: 573-589
- Amaral J.S., Seabra R.M., Andrade P.B., Valentao P., Pereira J.A., Ferreres F. 2004. Phenolic profile in the quality control of walnut (*Juglans regia* L.) leaves. Food Chemistry, 88: 373-379
- Barz W., Koester J., Weltring K.M., Strack D. 1985. Recent advances in the metabolism and degradation of phenolic compounds in plants and animals, V: The Biochemistry of Plant Phenolics. Van Sumere C.V., Lea P.J. (ur.). Oxford. Clarendon Press: 307-347
- Bravo L. 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. Nutrition Reviews, 56: 317-333
- Charlot G., Radix P. 1997. Influence of the type of soils on phenolic compounds of the nuts and crop losses. Acta Horticulturae, 442: 373-378
- Claudot A., Jay-Allemand C., Magel E.A., Drouet A. 1993. Phenylalanine ammonia-lyase, chalcone synthase and polyphenolic compounds in adult and rejuvenated walnut trees. Trees – Structure and function, 7, 2: 92-97
- Colarič M., Štampar F., Veberič R., Trobec M., Hudina M., Solar A. 2004. Vpliv vsebnosti različnih fenolnih spojin na primarno okužbo plodov oreha z bakterijskim ožigom (*Xanthomonas campestris* pv. *juglandis*). V: Zbornik referatov 1. slovenskega sadjarskega kongresa z mednarodno udeležbo, Krško, 24.-26. marec 2004. Hudina M. (ur.). Ljubljana, Strokovno sadjarsko društvo Slovenije: 303-310
- 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
- Durst F., Werck- Reichhart D. 1995. Biosynthesis of phenolic compounds: involment of cytochrome P450 enzyme. V: Polyphenols 94. International conference on polyphenols, Palma de Malorca, 1994. Brouillard R., Jay M., Scalbert A. (eds.). Paris, INRA: 57-65

- Escarp A., Gonzales M.C. 2000. Optimization strategy and validation of one chromatographic method as approach to determine the phenolic compounds from different sources. *Journal of Chromatography A*, 897: 161-170
- Fructus. Sorta 'Seifersdorfer'.
<http://www.fructus.ch/downloads/d-seifersdorfer-runde.pdf> (februar, 2012)
- Gardan L., Brault T., Germain E. 1993. Copper resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis* in French walnut orchards and its association with conjugative plasmids. *Acta Horticulturae*, 311: 259-265
- Godec B., Hudina M., Usenik V., Solar A., Vesel V., Ambrožič Turk B., Koron D. 2009. Posebno preizkušanje in vzgoja novih sort sadnih rastlin v letu 2008. Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije: 63 str.
- 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 Postharvest Review*, 2: 1-7
- Harborne J.B., Baxter H., Moss G.P. 1999. *Phytochemical dictionary: A handbook of bioactive compounds from plants* (2nd ed.). London, Taylor & Francis: 976 str.
- Heldt H.W. 1997. *Plant biochemistry and molecular biology*. New York, Oxford University Press Inc.: 522 str.
- Jakopič J., Colarič M., Veberič R., Hudina M., Solar A., Štampar F. 2007. How much do cultivar and preparation time influence on phenolics content in walnut liqueur. *Food Chemistry*, 104: 100-105
- Jakopič J., Mikulič-Petkovšek M., Likozar A., Solar A., Štampar F., Veberič R. 2011. HPLC-MS identification of phenols in hazelnut (*Corylus avellana* L.) kernels. *Food Chemistry*, 124: 1100-1106
- Lapornik B. 2005. Stabilnost polifenolov med staranjem v polizdelkih iz črnega ribeza. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 135 str.
- Macrae R., Robinson R. K., Sandler M. V. 1993. *Encyclopaedia of food science, food technology and nutrition*. London, Academic Press: 4514 str.

- Mahoney N., Molyneux R. J. 2004. Phytochemical inhibition of aflatoxigenicity in *Aspergillus flavus* by constituents of walnut (*Juglans regia*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 1882-1889
- Marks SC, Mullen W, Crozier A. 2007. Flavonoid and chlorogenic acid profiles of English cider apples. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87: 719-728
- Matias J., Aleta N., Rovira M., Moragrega C. 2009. Phenolic composition in *J. regia* commercial cultivars. Relationship with blight susceptibility.
http://www.cost873.ch/_uploads/_files/JMatias_WalnutPhenolics_Italy_1.pdf
(22.februar 2012)
- Mikulič-Petkovšek M., Štampar F., Veberič R. 2008. Increased phenolic content in apple leaves infected with the apple scab pathogen. *Journal of Plant Pathology*, 90: 49-55
- Mikulič-Petkovšek M., Štampar F., Veberič R. 2009. Accumulation of phenolic compounds in apple in response to infection by the scab pathogen, *Venturia inaequalis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 74: 60-67
- Mikulic Petkovsek M., Slatnar A., Stampar F., Veberic R. 2011. Phenolic compounds in apple leaves after infection with apple scab. *Biologia plantarum*, 55: 725-730
- Ninot A., Aleta N., Moragrega C., Montesinos E. 2000. Effect of Sheduling Applications on Walnut Blight Control. *Plant Diseases*, 86, 6: 583-587
- Olsen W.H., Buchner R.P., Adaskaveg J.E., Lindow S.E. 1997. Walnut blight control in California. *Acta Horticulturae*, 442: 361-365
- Radix P., Seigle-Murandi F., Charlot G. 1994. Walnut blight: development of fruit infection in two orchards. *Crop Protection*, 13, 8: 629-631
- Rat-Morris E., Amiot M.J., Tacchini M., Lespinasse Y. 1996. Phenolic composition of apple leaves, prior to infestation, associated with the resistance of the apple cv. FlorinaQuerina to the apple scab *Venturia inaequalis* and to the Rosy apple aphid *Dysaphis plantaginea*. V: *Polyphenols Communications 96*. 18th international conference on polyphenols, Bordeaux, 15-18 julij 1996. Vercauteren J., Cheze C., Dumon M., Weber J. (ur.) Bordeaux, Secretariat du Groupe Polyphenols: 355-356
- Rice-Evans C. A., Miller N. J., Paganga G. 1996. Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, 20: 933-956

- Robards K., Antolovich M. 1997. Analytical chemistry of fruit bioflavonoids. *Analyst*, 122: 11-34
- 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
- Solar A. 2006. Učinkovitejše varstvo orehov pred boleznimi. *SAD*, 17, 4: 3-5
- Solar A. 2008. Lupinarji – tehnologija pridelave. Gradivo razdeljeno na predavanjih za univerzitetni študij agronomije pri izbirnem predmetu Sadjarstvo 4. Letnik. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo (interno gradivo)
- Solar, A., Štampar, F. 2006. Evaluation of some perspective walnut genotypes in Slovenia. *Acta Horticulturae*, 705: 131-136
- Solar, A., Colarič, M., Usenik, V., Štampar, F. 2006a. Seasonal variations of selected flavonoids, phenolic acids and quinones in annual shoots of common walnut (*Juglans regia* L.). *Plant Science*, 170: 453-461
- Solar, A., Colarič, M., Hudina M., Štampar, F. 2006b. The phenolic content of walnut fruit as affected by cultivar and developmental stage. *Acta Horticulturae*, 705: 231-240
- Solar A., Veberič R., Bacchetta L., Botta R., Drogoudi P., Metzidakis I., Rovira M., Sarraquigne J. P., Silva A. P. 2009a. Phenolic characterization of some hazelnut cultivars from different European germplasm collections. *Acta Horticulturae*, 845: 613-618
- Solar A., Dreo T., Mikulič-Petkovšek M., Likozar A., Šuštaršič M., Veberič R., Matičič L., Ravnikar M., Štampar F. 2009b. Phenolic compounds as potential markers for walnut blight resistance. V: Annual COST 873 Meeting-MCM. Bacterial diseases of stone fruits and nuts. Book of abstracts, Cetara, 26-29 oktober 2009. Scortichini M. (ur.). Cetara, COST 873: 74-75
- Solar A., Jakopič J., Veberič R., Štampar, F. 2012. Correlations between *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* severity and endogenous juglone and phenolic acids in walnut. *Journal of Plant Pathology*, 94: 229-235
- Šircelj H. 2001. Ugotavljanje sušnega stresa pri jablani (*Malus domestica* Borkh.) z izbranimi biokemičnimi in fiziološkimi kazalci. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 164 str.

- Štampar F., Solar A., Hudina M., Veberič R., Colarič, M. 2006. Traditional walnut liqueur-cocktail of phenolics. *Food Chemistry*, 95: 627-631
- Štampar F., Lešnik M., Veberič R., Solar A., Koron D., Usenik V., Hudina M., Osterc G. 2009. *Sadjarstvo*. Ljubljana, Kmečki glas: 416 str.
- Terpinc P. 2006. *Arheje in antioksidanti*. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 47 str.
- Townsend G.R., Heuberger J.W. 1943. Methods for estimating losses caused by diseases in fungicide experiments. *Plant Disease Reporter*, 27: 340-343
- Treutter D. 2001. Biosynthesis of phenolic compounds and its regulation in Apple. *Plant Growth Regulation*, 34: 71–89
- Treutter D. 2005. Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis. *Plant Biology*, 7: 581–591
- Treutter D., Feucht W. 1990. The pattern of flavan-3-ols in relation to scab resistance of apple cultivars. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 65: 511-517
- Usenik V., Osterc G., Mikulič-Petkovšek M., Trobec M., Veberič R., Colarič M., Solar A., Štampar F. 2004. The involvement of phenolic compounds in the metabolism of fruit trees. V: *Razprave IV. razreda SAZU*. Ljubljana, SAZU: 187–204
- Veberič R., Trobec M., Herbingler 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
- Yu J., Ahmenda M., Goktepe I. 2005. Effects of processing methods and extraction solvents on concentration and antioxidant activity of peanut skin phenolics. *Food Chemistry*, 90: 199-206
- Zhang Z., Liao L., Moore J., Wu T., Wang Z. 2009. Antioxidant phenolic compounds from walnut kernels (*Juglans regia* L.). *Food Chemistry*, 113: 160-165
- Žorž M. 1991. *HPLC*. Ljubljana, samozaložba: 154 str.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Franciju Štamparju za vse kritike in skrben pregled diplomske naloge.

Posebej se zahvaljujem somentorici dr. Aniti Solar za potrpljenje, vzpodbude, pomoč in nasvete.

Hvala Katedri za sadjarstvo, vinogradništvo in vrtnarstvo za pomoč pri pripravi vzorcev in opravljene analize na HPLC.

Zahvaljujem se prof. dr. Marijani Jakše in prof. dr. Franci Aco Celarju za pregled naloge, vse napotke in pojasnila.

Iskrena hvala staršem, sestri in moji Katarini za vse, da se je lahko ta pot zaključila. Ta naloga je posvečena tebi, oči.

PRILOGA A

Stopnja okuženosti orehov (%) s *Xaj*, Maribor 2008

Sorta	Termin				Povprečje
	Gf+30		Gf+45		
	Datum	%	Datum	%	
Seifersdorfer	10.6.	26	26.6.	62,5	44
Šampion	17.6.	26	2.7.	53	39,5
Zdole-60	30.6.	28	15.7.	25	26,5
Cisco	23.6.	16,5	9.7.	36	25
Erjavec	23.6.	14,5	9.7.	11	13
Fernette	30.6.	8	15.7.	17,5	13

PRILOGA B

Formula za izračun stopnje okuženosti (P) orehov (%) s *Xaj* (Towsend in Heuberger, 1943)

$$P = \frac{\sum_0^i (n \times v)}{i \times N} \times 100 (\%)$$

P = % okuženosti

n = število plodov v posameznem ocenjevalnem razredu

v = številčna vrednost razreda (1, 2, 3, 4 ali 5)

i = številčna vrednost najvišjega razreda (5)

N = skupno število analiziranih plodov (20)

PRILOGA C

Ocenjevalna tabela (Towsend in Heuberger, 1943)

Stopnja okužbe	Delež prizadetega tkiva (%)	Razred
Zdrav plod, brez simptomov	0	0
Zelo šibka okužba – mala pega	0,1-3	1
Šibka okužba - dve do tri posamezne male pege	4-10	2
Srednja okužba – posamezne večje pege	11-25	3
Močna okužba – združene večje pege	26-50	4
Zelo močna okužba – deformiran plod	≥ 51	5