

Fiziološki odgovor listova jabuke na toplinski stres

Karavidović, Dino

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:151:284443>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-23**



Sveučilište Josipa Jurja
Strossmayera u Osijeku

**Fakultet
agrobiotehničkih
znanosti Osijek**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Agrobiotechnical
Sciences Osijek - Repository of the Faculty of
Agrobiotechnical Sciences Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Dino Karavidović
Diplomski studij Bilinogojstvo
Smjer Biljna proizvodnja

FIZIOLOŠKI ODGOVOR LISTOVA JABUKE NA
TOPLINSKI STRES

Diplomski rad

Osijek, 2024.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI U OSIJEKU

Dino Karavidović

Diplomski studij Bilinogojstvo

Smjer Biljna proizvodnja

FIZIOLOŠKI ODGOVOR LISTOVA JABUKE NA
TOPLINSKI STRES

Diplomski rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

prof.dr.sc. Tihana Teklić, predsjednik

prof.dr.sc. Miroslav Lisjak, mentor

prof.dr.sc. Tomislav Vinković, član

Osijek, 2024.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	2
3. MATERIJAL I METODE	6
3.1. Opis pokusa	6
3.1.1. Biljni materijal i lokaliteti	6
3.1.2. Meteorološki pokazatelji i uzorkovanje	6
3.2. Laboratorijske analize	7
3.2.1. Određivanje sadržaja klorofila	7
3.2.2. Određivanje sadržaja prolina	8
3.2.3. Određivanje sadržaja fenola	9
3.2.4. Određivanje sadržaja flavonoida	9
3.2.5. Određivanje ukupne antioksidativne aktivnosti	10
3.3. Statistička obrada podataka	10
4. REZULTATI	11
5. RASPRAVA	20
6. ZAKLJUČAK	24
7. LITERATURA	25
8. SAŽETAK	28
9. SUMMARY	29
10. POPIS TABLICA	30
11. POPIS SLIKA	31
12. POPIS GRAFIKONA	32

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

BASIC DOCUMENTATION CARD

1. UVOD

Jabuka (*Malus domestica* Borkh.) se smatra četvrtom u redu važnih voćnih kultura nakon agruma, grožđa i banana te je najzastupljenija i dobro prilagođena voćna vrsta umjerenog pojasa. Tipično se uzgaja u Aziji i Europi od davnih vremena. Udomaćene sorte jabuka, jednu se svježe, osušene ili prerađene u sok, ili alkoholna pića kao što su vino i jabukovača. Plodovi jabuka su nutritivno vrlo bogati te se tradicionalno konzumiraju zbog pozitivnog učinka na zdravlje ljudi. Epidemiološka istraživanja povezuju konzumaciju jabuka sa smanjenim rizikom od razvoja nekih kroničnih bolesti kao što su karcinomi, kardiovaskularne bolesti, astma (Delgado-Pelayo i sur., 2014.).

Jabuka je važno voće koje se uobičajeno konzumira kao neprerađeni proizvod, ali se može konzumirati i kao smrznuti i sušeni proizvod. Svježe su jabuke dostupne diljem svijeta tokom cijele godine pa su njihov okus i tekstura važni (Doores i Splittstoesser, 1983.; Sugiura i sur., 2013.). Kultiviranu jabuku proširili su Rimljani diljem Europe i Azije skoro prije 3000 godina (Korban i Skirvin, 1984). U Hrvatskoj 2020. godine proizvodnja jabuka procijenjena je na 63.610 t, ubranih s površine od 4.360 ha. (<https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>).

Ekološki čimbenici vrlo značajno utječu na kvalitetu i količinu uroda u proizvodnji jabuka. Također, vrlo važan čimbenik tvorbe kvalitete i kvantitete prinosa je genetska osnova kao unutarnji čimbenik svake sorte. U stresnim uvjetima okoline ona određuje mogućnost biljke da se više ili manje uspješno aklimatizira kroz promjenu metabolizma u smjeru pojačane otpornosti na stres.

U našim krajevima, uslijed značajnih klimatskih promjena koje se odnose na prosječne temperature te količinu i raspored oborina tijekom vegetacijske sezone, voćarstvo je također jedna od pogođenih grana poljoprivrede. Bez obzira što je relativno veliki broj nasada suvremeno opremljen zaštitnim mrežama i navodnjavanjem, biljke su i dalje izložene toplinskom i sušnom stresu te ostaje problematika svladavanja velikih oscilacija određenih klimatskih pokazatelja i adaptabilnosti pojedinih sorti na takve uvjete.

Cilj ovog diplomskog rada je istražiti fiziološki odgovor u listu novih sorata jabuke, na toplinski i sušni stres u dva različita mikroklimata te na temelju dobivenih rezultata izdvojiti sorte koje su adaptabilnije na djelovanje nepovoljnih klimatskih prilika na proizvodnju jabuka.

2. PREGLED LITERATURE

Posljednjih godina objavljena su brojna istraživanja o učincima globalnih klimatskih promjena na ekosustave, a predviđa se da će klimatske promjene izazvati ekstremne temperature i suše. Suša je postala glavni čimbenik abiotskog stresa koji nepovoljno utječe na rast biljaka, preživljavanje i ograničava produktivnost usjeva, uzrokujući smanjenje prinosa i kvalitete ploda. Dokazano je da nedostatak vode utječe na različite fiziološke, biokemijske, metaboličke i molekularne procese u raznim biljkama, pa tako i jabukama. Nedostatak vode u biljkama uzrokuje oksidativni stres, prekomjernu proizvodnju reaktivnih kisikovih jedinica (ROS), uključujući superoksidni radikal (O_2^-) i vodik peroksid (H_2O_2), koji uzrokuju peroksidaciju lipida i oštećuju membrane, proteine, klorofil, nukleinske kiseline te u velikim koncentracijama uzrokuju staničnu smrt. Suša može uzrokovati značajno smanjenje i oštećenje fotosinteze i razgradnju klorofila u listovima (Massonnet i sur., 2007.). Negativni učinci suše na fiziologiju biljaka ovise o intenzitetu i trajanju sušnog stresa i genetskom kapacitetu biljke da se odupire štetnim učincima stresa kroz modifikaciju metabolizma. Biljke se u svrhu borbe protiv oksidacijskog učinka sušnog stresa, razvile različite antioksidativne obrambene mehanizme uključujući aktivaciju antioksidativnih enzima kao što su peroksidaza, superoksid-dismutaza, katalaza i pojačanu sintezu neenzimskih antioksidanasa kao što su fenolne kiseline, askorbinska kiselina, glutation, karotenoidi i dr. Neke biljke u uvjetima nedostatnih količina pristupačne vode nakupljaju osmolite kao što su prolin, glicin betain i topivi šećeri kako bi se zaštitile i ublažile stanje stresa uzrokovano sušom. U svrhu ublažavanja učinka sušnog stresa i poboljšanja obrambenog sustava, u biljnim organima sintetiziraju se i sekundarni metaboliti kao što su hlapljivi spojevi terpeni i fitohormoni kao što je brasinolid (Mihaljević i sur., 2021.).

Jabuka je ekonomski važna voćna vrsta čiji je genom potpuno sekvencioniran. U genomu jabuke identificirano je 25 HSF (*eng. Heat Shock Transcriptional Factors*) gena koji igraju ključnu ulogu u odgovoru biljaka na biotičke i abiotičke uzročnike stresa tijekom rasta i razvoja biljaka (Giorno i sur., 2012.; Morimoto, 1998.).

Greer (2015.) su istraživali utjecaj izlaganja listova jabuke sorte Red Gala, visokim temperaturama na proces fotosinteze i fluorescenciju fotosustava II. Optimalno zasićenje fotosustava a time i optimalno odvijanje procesa fotosinteze zabilježeno je pri 25 °C. Nakon toga, istraživači su izlagali listove povišenim temperaturama te pratili adaptaciju fotosustava na visoke temperature kroz praćenje fluorescencije fotosustava II. Dugotrajno

izlaganje visokim temperaturama uzrokovalo je smanjenje fotosinteze pri nižim temperaturama između 15 – 20 °C, međutim, nakon adaptacije fotosustava na visoke temperature došlo je do pomicanja granice toplinskog optimuma fotosinteze na 30 °C. Autori zaključuju da se efektivnost procesa fotosinteze i fotosustava s vremenom prilagođava visokoj temperaturi, međutim na početku izlaganja visokim temperaturama, kvantni doprinos fotosustava II opada dijelom zbog smanjenog fotokemijskog gšenja fluorescencije ali i zbog povećanja nefotokemijskog gašenja. Također, autori navode kako povećanje stupnja fotorespiracije na visokim temperaturama upućuje na metaboličko oštećenje listova, međutim smanjenjem temperature pada i stopa fotorespiracije i dolazi do oporavka fotosintetskog aparata.

Kumari i sur. (2023.) navode kako su prirodno sintetizirani fenolni spojevi dobili veliku znanstvenu pozornost zbog toga što je potvrđen njihov pozitivan učinak na zdravlje ljudi, a veliki broj fenolnih spojeva se može ekstrahirati iz povrća i voća. S metaboličke i fiziološke strane, fenolni spojevi su ključni u obrambenim reakcijama kao što su usporavanje procesa starenja a naglašava se i njihova antibakterijska, antioksidativna, antiproliferalna, protuupalna, antikancerogena, hipolipidemijska, antidiabetička, kardioprotektivna i neuroprotektivna uloga. Od svih konzumnih voćnih vrsta koje sadrže značajne količine fenolnih spojeva, jabuka je najzastupljenije voće na svijetu. Plod jabuke sadrži pet glavnih klasa polifenolnih spojeva koji se nalaze u jabukama: fenolni spojevi, flavanoli (katehin, epikatehin i pirocijanidini), dihidrohalkoni (florein glikozidi), fenolne kiseline (uglavnom klorogenske kiseline), flavonoli (kvercetin glikozidi) i antocijanini.

Pietta (2000.) navodi da su flavonoidi fenolne tvari izolirane iz mnogih vaskularnih biljaka i sadrže više od 8000 poznatih jedinstvenih spojeva. U biljkama djeluju kao antioksidansi, antimikrobici, fotoreceptori, vizualni atraktanti, repelenti hrane i fotoprotektori. Brojna istraživanja pokazala su da flavonoidi imaju biološke učinke, uključujući antialergijsko, antivirusno, protuupalno i vazodilatacijsko djelovanje. Međutim, antioksidativni učinci flavonoida su od najvećeg interesa, temeljeni na njihovoj sposobnosti da ograniče i uklone stvaranje slobodnih radikala. Antioksidativna aktivnost flavonoida *in vivo* je slabije dokumentirana, vjerojatno zbog ograničenog znanja o njihovoj konzumaciji kod ljudi. Većina unesenih flavonoida uvelike se razgrađuje u različite fenolne kiseline, od kojih neke još uvijek imaju sposobnost hvatanja slobodnih radikala. Apsorbirani flavonoidi i njihovi metaboliti mogu pokazati antioksidativno djelovanje *in vivo*.

Lee i sur. (2003.) su istraživali doprinos različitih fitokemikalija s antioksidativnim

djelovanjem na ukupni antioksidativni kapacitet kod šest sorata jabuke, pomoću ABTS (2,2'-azobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) reagensa. Doprinos pojedinih fenola ukupnoj antioksidativnoj aktivnosti su izrazili kao antioksidativni kapacitet ekvivalentan vitaminu C. Prosječni sadržaj najzastupljenijih fenola i vitamina C u šest ispitivanih sorti jabuka bio je: proantocijanidin B2 9,35; kvercetin glikozidi 13,20; epikatehin 8,65; floritin 5,59; klorogenska kiselina 9,02; vitamin C, 12,80 mg/100g Sv.T. Autori navode da postoji visoko linearna veza između koncentracije fenola, antioksidativnog kapaciteta i sadržaja vitamina C u plodu jabuka. Također, utvrđeno je da na ukupnu antioksidativnu aktivnost jabuka značajno veći utjecaj imaju flavonoidi kao što su kvercetin, proantocijanin B2 i epikatehin, u usporedbi sa vitaminom C, koji je zastupljen u visokim koncentracijama, međutim njegov doprinos ukupnoj antioksidativnoj aktivnosti utvrđenoj ABTS metodom, je mali.

Mihaljević i sur. (2021.) su proveli istraživanje koje je imalo za cilj usporediti reakciju tradicionalnih i modernih sorti jabuka na sušni stres. Istraživanja su proveli na šest sorata jabuka, tri tradicionalne i tri moderne, sa i bez navodnjavanja. Rezultati autora pokazuju da su tradicionalno kultivirane jabuke tolerantnije na sušni stres u usporedbi s novijim sortama. Tradicionalne sorte su u uvjetima suše imale veću fotosintetsku učinkovitost i zadržale veću provodljivost puči. Nasuprot tome, kod novijih sorata jabuke došlo je do značajnog pada fotosintetske učinkovitosti i provodljivosti puči. Nadalje, autori navode da tradicionalne sorte jabuke imaju veću antioksidacijsku enzimsku aktivnost što je rezultiralo nižim razinama peroksidacije lipida u usporedbi s novijim sortama. Na temelju dobivenih rezultata, autori zaključuju da tradicionalne sorte jabuke imaju bolji obrambeni sustav protiv oksidativnog stresa uzrokovanog sušom. Istraživanje naglašava važnost očuvanja tradicionalnih sorti jabuka koje su se prilagodile lokalnim uvjetima okoliša i posjeduju jedinstvene genetske osobine koje ih čine otpornijima na nedostatak vode i posljedično sušni stres.

Istraživači Šircelj i sur. (1999.) su proučavali fiziološki odgovor u listu dviju sorti jabuka, Elstar i Jonagold Wilmuta, pri blagom i jakom sušnom stresu. Rezultati istraživanja su pokazali da sušni stres značajno utječe na sadržaj pigmenta, askorbinske kiseline i slobodnih aminokiselina kod obje sorte. Sorta Elstar pokazala je značajnije smanjenje udjela klorofila i karotenoida te povećanje udjela prolina i ukupnih slobodnih aminokiselina u listu, u odnosu na sortu Jonagold Wilmuta. S druge strane, sorta Elstar je imala veći sadržaj askorbinske kiseline u usporedbi sa sortom Jonagold Wilmuta i to kod

obje varijante sušnog stresa. Istraživači su također otkrili da se kod obje sorte sadržaj slobodnih aminokiselina i askorbinske kiseline povećava proporcionalno s povećanjem intenziteta sušnog stresa, što ukazuje da ti spojevi mogu imati zaštitnu ulogu u uvjetima oksidativnog stresa uzrokovanog deficitom vode. Istraživanje naglašava važnost razumijevanja biokemijskih odgovora različitih sorata jabuka na sušni stres jer to može pomoći u identificiranju sorata koje su otpornije na nedostatak vode i razvoju strategija upravljanja s ciljem ublažavanja negativnih utjecaja suše na proizvodnju jabuka.

Prema Raza i sur. (2023.), klimatske promjene i čimbenici abiotičkog stresa ključni su uzroci globalnog gubitka usjeva. Između ostalog, ekstremne visoke i niske temperature mogu spriječiti rast i razvoj biljaka, smanjiti produktivnost te u najtežim slučajevima, uzrokovati smrt biljaka. Biljke su razvile različite strategije za ublažavanje štetnih učinaka temperaturnog stresa. Sinteza i akumulacija aminokiseline prolina u nevezanoj formi, jedan je od mehanizama fiziološkog odgovora na različite abiotičke stresove povezane sa nedostatkom vode ili problemima sa transpiracijom, a tu spada i stres izazvan visokim temperaturama. Velika količina slobodnog prolina u stanicama može biti posljedica pojačane razgradnje proteina uslijed intenziviranja proteolitičkih reakcija, ali i pojačane sinteze aminokiseline ili pak usporene ugradnje u proteine. Osim primjene prolina kao zaštitnog spoja pri ekstremnim temperaturama, autori naglašavaju važnost potencijala genetskog inženjeringa i istraživanjima koja se bave genima povezanim s metabolizmom prolina u svrhu razvoja takozvanih „temperaturno pametnih“ biljaka.

3. MATERIJAL I METODE

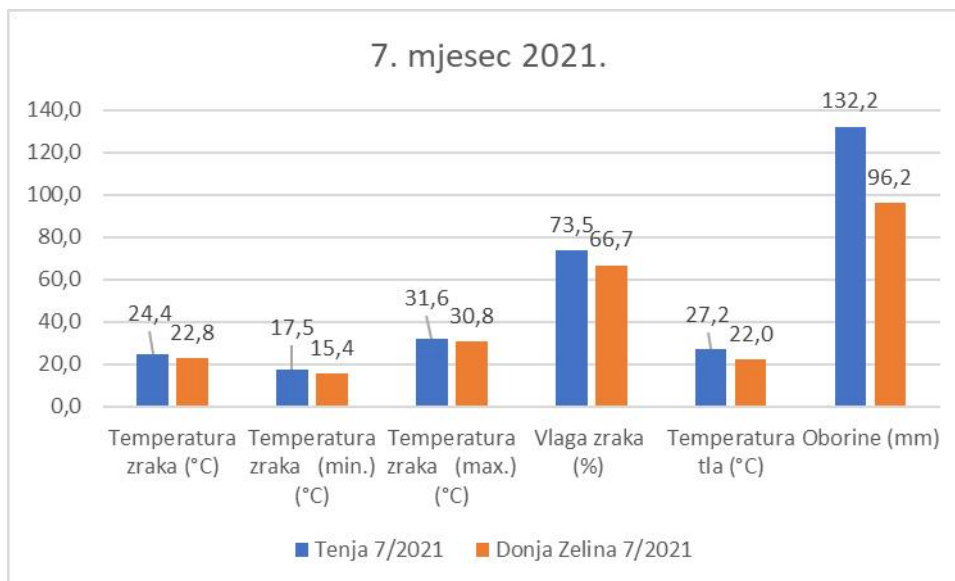
3.1. Opis pokusa

3.1.1. Biljni materijal i lokaliteti

Istraživanje je provedeno na 33 sorte jabuke koje pripadaju ljetnoj, jesenskoj i zimskoj grupi dozrijevanja, na dva mikroklimatski različita lokaliteta. Sadnja je obavljena na lokalitetu Tenja (Osječko-baranjska županija) i lokalitetu Donja Zelina (Zagrebačka županija). Voćnjaci su bili podignuti 2020. godine i na njima je bio proveden sustav navodnjavanja i postavljena zaštitna mreža. Pokus je postavljen po metodi slučajnog bloknoeg rasporeda, gdje jedan red u kojem su zastupljene sve 33 sorte, predstavlja jedno ponavljanje, a svaka sorta je zastupljena sa po 3 biljke u ponavljanju. Pokus je postavljen u 4 reda, odnosno 4 ponavljanja. Međuredni razmak sadnje je bio 3,2 m a razmak između biljki unutar redova je bio 0,8 m. Vanjska 2 reda te prvih 9 biljaka u redu predstavlja zaštitnu zonu u kojoj je zasađena sorta Zlatni Delišes. Konvencionalne metode uzgoja i zaštite od štetnike primjenjivane su tijekom vegetacije.

3.1.2. Meteorološki pokazatelji i uzorkovanje

Prosječna temperatura zraka na lokalitetu Tenja u srpnju 2021. godine bila je 24,4 °C, a na lokalitetu Donja Zelina 22,8 °C. Prosječne Minimalne i maksimalne temperature na lokaciji Tenja se iznosile 17,5 °C (min) odnosno 31,6 °C (max), dok je u Donjoj Zelini minimum bio 15,4 °C, a maksimum 30,8 °C. Prosječna vlaga zraka na lokaciji Tenja je bila 73,5 %, a na lokaciji Donja Zelina nešto niža 66,7 %. Količina oborina se također razlikovala na ove dvije lokacije te je tako na lokaciji Tenja u srpnju 2021. godine zabilježeno 132,2 mm kiše, a na lokaciji Donja Zelina 96,2 mm kiše (Grafikon 1.). Uzorkovanje listova jabuke obavljeno je 15.7.2021. godine. Uzorci listova su odmah nakon uzorkovanja pohranjeni na -80 °C te su čuvani do dana analiza kada je tkivo lista macerirano u tekućem dušiku i usitnjeno do finog praha koji je korišten u laboratorijskim analizama.



Grafikon 1. Usporedba klimatskih pokazatelja za 7. mjesec 2021. godine na lokacijama Tenja i Donja Zelina

3.2. Laboratorijske analize

3.2.1. Određivanje sadržaja klorofila

Sadržaj kloroplastnih pigmenata odredili smo po Holmu i Wettsteinu spektrofotometrijskom metodom (Holm, 1954.; Wettstein, 1957.). Listove jabuke samljeli smo pomoću tekućeg dušika i odvagali smo 0,05 g praha u plastičnim epruvetama s navojem od 15 ml. Dodali smo 10 ml acetona i prah $MgCO_3$ za neutralizaciju kiselosti. Uzorke smo homogenizirali pomoću vrtložne mješalice. Zatim su uzorci stavljeni u centrifugu na 6000 RCF (*eng. Relative Centrifugal Force* – G sila) pri 4 °C u trajanju od 10 minuta. Nakon centrifugiranja uzorci su pipetirani automatskom pipetom u kivete te su mjerene apsorbancije pomoću spektrofotometra. Apsorbancija je mjerena na valnim duljinama 662, 644 i 440 nm. Dobivene vrijednosti uvrštene su u dolje navedene Holm-Wettsteinove jednadžbe za izračunavanje koncentracije pigmenta klorofila a (Chl a), klorofila b (Chl b), ukupnog klorofila a i b (Chl a+b) i karotenoida (Car).

$$\text{Klorofil a} = 9,784 \times A_{662} - 0,990 \times A_{644}$$

$$\text{Klorofil b} = 21,426 \times A_{644} - 4,65 \times A_{662}$$

$$\text{Klorofil a+b} = 5,134 \times A_{662} + 20,436 \times A_{644}$$

$$\text{Karotenoidi} = 4,695 \times A_{440} - 0,268 \times (\text{klorofil a+b})$$

3.2.2. Određivanje sadržaja prolina

Za određivanje sadržaja prolina koristili smo metodu po Carillu i Gibonu (2011.). Izvagali smo 0,5 g lista maceriranog u tekućem dušiku i dodali 1,5 ml 70 % etanola. Zatim smo uzorke homogenizirali pomoću vrtložne mješalice aparata i centrifugirali na 6000 RCF pri 4 °C u trajanju od 10 minuta. Nakon toga pipetirali smo 100 µl supernatanta u ependorf kivete od 2 ml i dodali 200 µl reakcijske smjese. Reakcijska smjesa je sadržavala 1 % ninhidrinske kiseline u 60 % octene kiseline i 20 % etanola. Zatim smo uzorak ponovo homogenizirali na vrtložnoj miješalici i stavili u vodenu kupelj na inkubaciju u trajanju od 20 min pri temperaturi od 95 °C. Nakon hlađenja uzorka, izmjerene su apsorbance uzoraka na čitaču mikrotitarskih pločica „Tecan Spark Microplate Reader“ (Slika 1. i 2.) pri valnoj duljini od 520 nm, a koncentracije prolina u uzorcima su izračunate iz jednadžbe pravca baždarne krivulje izrađene od serije standarda poznatih koncentracija prolina.



Slika 1. Mikrotitarske pločice sa reakcijskom smjesom za analizu sadržaja prolina



Slika 2. Čitač mikrotitarskih pločica Tecan Spark

3.2.3. Određivanje sadržaja fenola

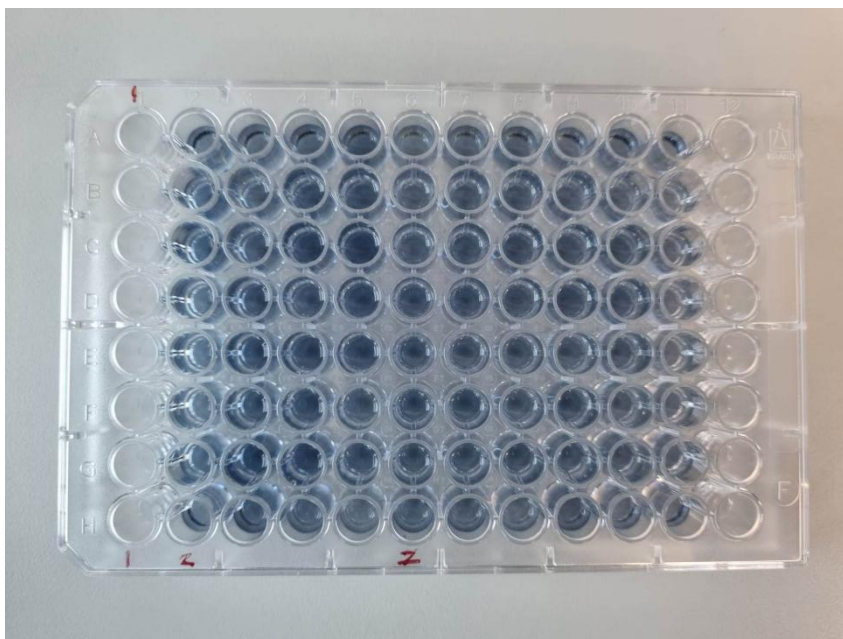
Sadržaj ukupnih fenola određuje se koristeći Folin-Ciocalteu reagens, metodom koju su opisali Singleton i Rossi (1965.) Kao standard koristili smo otopinu galne kiseline. U epruvete od 2 ml pipetira se 100 µl biljnog soka. Zatim se u epruvete dodaje 1 ml 70 % etanola i promiješa pomoću vrtložne miješalice. Nakon toga uzorci se pohranjuju pri -20 °C u trajanju od 48 sati te se tijekom toga perioda ekstrahiraju fenoli. Nakon ekstrakcije uzorci se centrifugiraju 15 min na 6000 RCF pri 4 °C. Pipetira se 100 µl supernatanta u plastične epruvete od 2 ml, te se dodaje 1,5 ml destilirane vode (dH₂O), 100 µl Folin-Ciocalteu reagensa i promiješa na vrtložnoj miješalici. Nakon 5 min doda se 300 µl zasićene Na₂CO₃. Reakcijska smjesa se promiješa i inkubira 60 min na 37 °C, te se mjeri apsorbancija pri 765 nm. Koncentracija ukupnih fenola proračuna se pomoću jednadžbe pravca baždarne krivulje koja se dobila mjerenjem apsorbancije galne kiseline poznatih koncentracija te se izražava kao ekvivalent galne kiseline.

3.2.4. Određivanje sadržaja flavonoida

Sadržaj flavonoida u listovima jabuke određen je iz etanolnih ekstrakta prema Ordonez i sur. (2006.), gdje se 4 % aluminij klorid (AlCl₃) koristi kao reagens za specifično obojenje. Odvagano je 100 mg macerata na analitičkoj vagi te je dodano 2 mL 70 % etanola. Pipetira se 10 µl ekstrakta te dodatno razrjeđuje sa istim volumenom 70 % etanola te doda 180 µl reakcijske smjese. Reakcijska smjesa se promiješa na vrtložnoj miješalici i stavlja na inkubaciju u trajanju od 60 min, u tami, pri sobnoj temperaturi. Za izradu baždarne krivulje korištene su otopine kvercetina poznate koncentracije. Nakon inkubacije, izmjerena je apsorbancija uzoraka na čitaču mikrotitarskih pločica pri valnoj duljini 415 nm, a koncentracije flavonoida proračunate su iz jednadžbe pravca baždarne krivulje te izražene kao ekvivalent kvercetina.

3.2.5. Određivanje ukupne antioksidativne aktivnosti

Antioksidativna aktivnost utvrđena je FRAP metodom (*eng. Ferric Reducing Antioxidant Power*) prema Benzie i Strain (1996.), gdje u prisustvu reducirajućih antioksidansa dolazi do redukcije žuto obojenog Fe(III)-TPTZ (željezo(3)-2,4,6-tripiryridyl-S-triazine) u plavo obojeni Fe(II)-TPTZ. Približno 10 mg macerata odvagano je u epruvetu od 2 ml, te se doda 2 mL 70 % etanola. Uzorak se promiješa na vrtložnoj miješalici i stavlja u centrifugu na 15 minuta pri 4 °C i 6000 RCF. FRAP reagens pripremi se od acetatnog pufera (pH 3,6), željezovog klorida, TPTZ i destilirane vode. Kao standard se koristi otopina 1 M željezovog (II) sulfata. Uzorci se inkubiraju u mraku u vodenoj kupelji 4 min pri 37 °C. Nakon inkubiranja uzorci se prenose na mikrotitarsku pločicu (Slika 3.) i mjeri se apsorbancija pri 593 nm.



Slika 2. Mikrotitarska pločica sa uzorcima za analizu ukupne antioksidativne vrijednosti FRAP metodom

3.3. Statistička obrada podataka

Rezultati laboratorijskih analiza obrađeni su pomoću programa za statističku obradu podataka (SAS Institute, 2003.) i Microsoft Office Excell 2010. Korištene su slijedeće statističke metode: opisna statistika, analiza varijance (ANOVA), statistički testovi značajnosti utjecaja primijenjenih tretmana – F test i Tukey's HSD test (*eng. Honestly Significant Difference*).

4. REZULTATI

U prosjeku za oba lokaliteta, sadržaj klorofila a kretao se u rasponu od 0,357 do 0,558 mg/g Sv.T. dok se sadržaj klorofila b kretao u rasponu od 0,105 do 0,239 mg/g Sv.T. Najveći utvrđeni sadržaj karotenoida bio je 0,357 a najmanji 0,121 mg/g Sv.T. (Tablica 1.).

Najmanja koncentracija klorofila a utvrđena je u listovima sorti Gala Dark Ann, Opal i Gala Royal Beaut, a najveća kod sorata Jeromine, Roats King Red Delicious i Goldrush Coop38. Najmanji sadržaj klorofila b u listovima utvrđen je u listovima sorata Pinova, Gala Dark Ann, Red Topaz i Topaz, a najveći kod sorata Orion i Jonagold Novajo. Najmanja koncentracija ukupnih klorofila utvrđena je kod sorata Gala Dark Ann i Reglindis a najveća kod sorata Orion, Roats King Red Delicious i Jeromine. Najmanju koncentraciju karotenoida imale su sorte Opal i Golden Smothee a najveću Allegro 1 i Galval 3.

Sorta Gala Dark Ann imala je najmanji sadržaj klorofila a, klorofila b i klorofila a+b u listovima, u odnosu na ostale 32 sorte jabuka dok je sorta Jeromine je u prosjeku sadržavala veće koncentracije klorofila a, klorofila b i karotenoida u odnosu na ostale sorte.

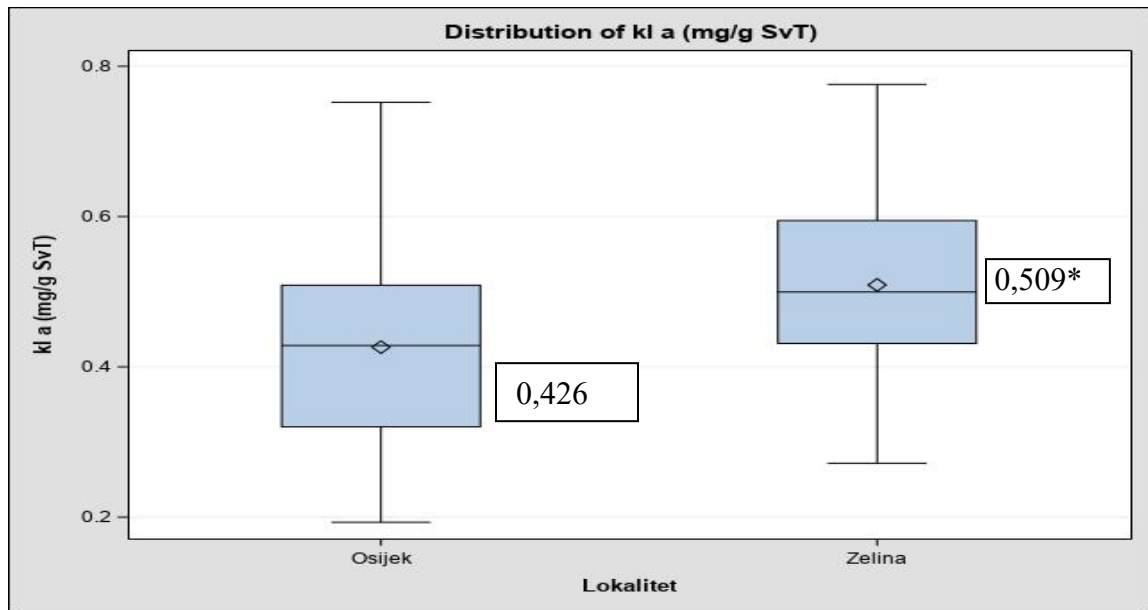
U prosjeku za oba lokaliteta, najmanji sadržaj prolina utvrđen je u listovima sorata Braeburn Maririred i Jeromine dok je najveći utvrđen kod sorata Orion i Red Idared (Tablica 2.). Prosječni sadržaj fenola bio je najveći u listovima sorata Collina 2, Jonagold Novajo i Jonaprince a najniži u listovima sorata Braeburn Lchbuie i Braeburn Maririred. Sorte Granny Smith, Karneval i Collina 2 isticale su se najvećim prosječnim sadržajem flavonoida u listovima dok je kod Crimson Crisp Coop39 i Reglindis, utvrđen najniži sadržaj flavonoida u listovima. Najveća antioksidativna aktivnost utvrđena je kod sorata Jeromine i Roats King Red Delicious a najniža kod sorata Santana, Jonaprince i Jonagold Novajo.

Tablica 1. Prosječni sadržaj klorofila a (Chl a), klorofila b (Chl b), klorofila a+b (Chl a+b), karotenoida (Car) (mg g/Sv.T.) te omjeri klorofila a i b (Chl a/Chl b) i omjer klorofila i karotenoida (Chl a+b/Car) u listovima 33 sorte jabuke na lokalitetima Osijek i Donja Zelina.

SORTA	Chl a	Chl b	Chl a+b	Car	Chl a/b	Chl a+b/ Car
Allegro 1	0,444	0,135	0,579	0,357	3,307	2,302
B.Lochbuie	0,538	0,164	0,701	0,220	3,271	3,233
B.Marired	0,525	0,153	0,677	0,208	3,432	3,276
Bay 3341	0,438	0,128	0,567	0,169	3,408	3,340
CCCoop39	0,423	0,118	0,541	0,158	3,573	3,403
Collina 2	0,402	0,123	0,525	0,347	3,295	2,126
Freya	0,474	0,127	0,600	0,182	3,722	3,289
FujiFubrax8	0,497	0,154	0,651	0,204	3,331	3,231
G.rushCoop38	0,552	0,152	0,704	0,211	3,647	3,354
GDarkAnn	0,357	0,108	0,465	0,152	3,303	3,035
GSSchniga4	0,399	0,122	0,521	0,164	3,277	3,149
Gala royal beaut	0,390	0,117	0,507	0,170	3,313	2,976
Galval3	0,463	0,147	0,610	0,348	3,175	2,246
Ggalaxy	0,441	0,132	0,573	0,176	3,331	3,227
Gsmith	0,514	0,146	0,660	0,214	3,507	3,208
Gsmothee	0,415	0,186	0,600	0,127	2,560	5,034
Jeromine	0,558	0,170	0,728	0,232	3,282	3,134
Jnovajo	0,460	0,205	0,666	0,132	2,648	5,544
Jonaprince	0,522	0,140	0,662	0,189	3,724	3,493
Karneval	0,493	0,143	0,636	0,189	3,452	3,331
Merkur	0,447	0,119	0,566	0,176	3,762	3,219
Opal, UEB3264	0,369	0,157	0,525	0,121	2,695	4,610
Orion	0,532	0,239	0,771	0,159	2,603	5,144
Pinova	0,414	0,105	0,518	0,156	3,954	3,336
R.Idared	0,522	0,160	0,681	0,216	3,281	3,184
R.Topaz	0,430	0,107	0,538	0,162	4,081	3,233
Reglindis	0,388	0,108	0,496	0,151	3,601	3,246
Roats King Red Delicious	0,556	0,175	0,731	0,241	3,188	3,028
Rozela	0,523	0,144	0,667	0,200	3,636	3,336
Santana	0,450	0,136	0,586	0,182	3,312	3,173
Sirius	0,531	0,163	0,694	0,191	3,283	3,662
Super Chief Sandidge	0,512	0,160	0,672	0,210	3,209	3,168
Topaz	0,453	0,111	0,564	0,164	4,080	3,386
HSD	0,183	0,059	0,239	0,075	0,315	0,418
F test	3,05	7,59	3,27	17,46	41,20	90,18
p	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

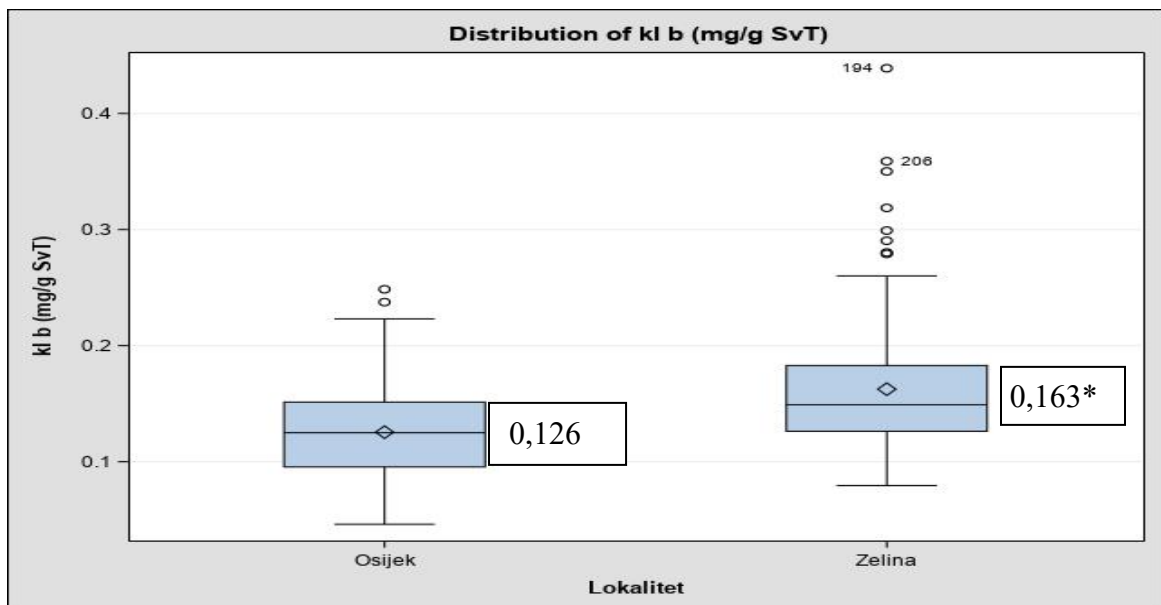
Tablica 2. Prosječni sadržaj prolina (PRO) (mmol/g Sv.T.), fenola (PHE) (mg GA/mg Sv.T.), flavonoida (FLA) (mg QC mg/Sv.T.) i antioksidativna aktivnosti (FRAP) (mM FeSO₄/g Sv.T.) u listovima 33 sorte jabuke na lokalitetima Osijek i Donja Zelina.

SORTA	PRO	PHE	FLA	FRAP
Allegro 1	1,172	0,603	0,045	0,496
B.Lochbuie	1,144	0,490	0,048	0,664
B.Maririred	1,051	0,507	0,050	0,711
Bay 3341	1,084	0,656	0,047	0,598
CCCoop39	1,181	0,644	0,039	0,426
Collina 2	1,416	0,777	0,063	0,490
Freya	1,173	0,554	0,047	0,570
FujiFubrax8	1,242	0,676	0,058	0,604
G.rushCoop38	1,400	0,657	0,059	0,572
GDarkAnn	0,992	0,623	0,048	0,532
GSSchniga4	1,099	0,693	0,056	0,503
Gala royal beaut	1,187	0,676	0,057	0,608
Galval3	1,307	0,670	0,059	0,610
Ggalaxy	1,164	0,677	0,049	0,547
Gsmith	1,296	0,651	0,064	0,565
Gsmothee	1,160	0,731	0,052	0,510
Jeromine	1,012	0,616	0,050	0,794
Jnovajo	1,181	0,749	0,047	0,387
Jonaprince	1,124	0,747	0,050	0,399
Karneval	1,242	0,658	0,067	0,422
Merkur	1,078	0,630	0,054	0,444
Opal, UEB3264	1,273	0,675	0,059	0,460
Orion	1,435	0,727	0,053	0,465
Pinova	1,175	0,612	0,051	0,447
R.Idared	1,479	0,617	0,059	0,645
R.Topaz	1,271	0,717	0,061	0,561
Reglindis	1,050	0,573	0,033	0,599
Roats King Red Delicious	1,171	0,642	0,052	0,789
Rozela	1,178	0,605	0,048	0,617
Santana	1,284	0,610	0,067	0,548
Sirius	1,246	0,754	0,058	0,405
Super Chief Sandidge	1,090	0,621	0,051	0,470
Topaz	1,192	0,687	0,060	0,563
HSD	0,349	0,124	0,013	0,193
F test	3,46	8,55	9,75	8,54
p	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000



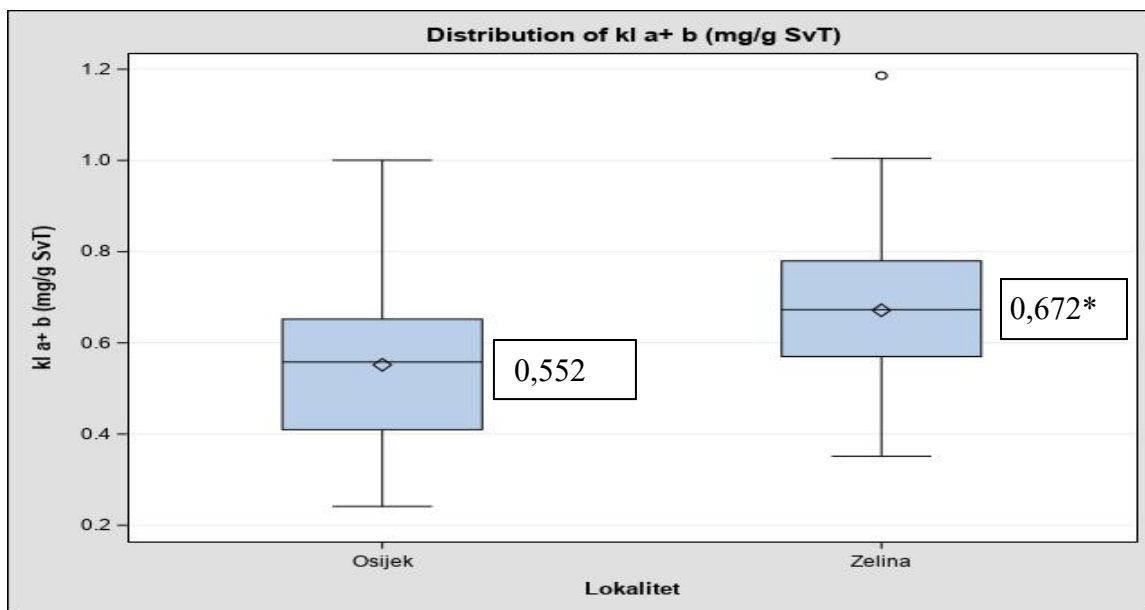
Grafikon 2. Prosječni sadržaj klorofila a u listovima 33 sorte jabuke na lokalitetima Osijek i Donja Zelina

Prosječni sadržaj klorofila a na lokalitetu Osijek iznosio je 0,426 mg/g Sv.T. te je bio statistički značajno niži od prosječnog sadržaja klorofila a utvrđenog u listovima jabuka na lokalitetu Donja Zelina, koji je iznosio 0,509 mg/g Sv.T. (Grafikon 2.).



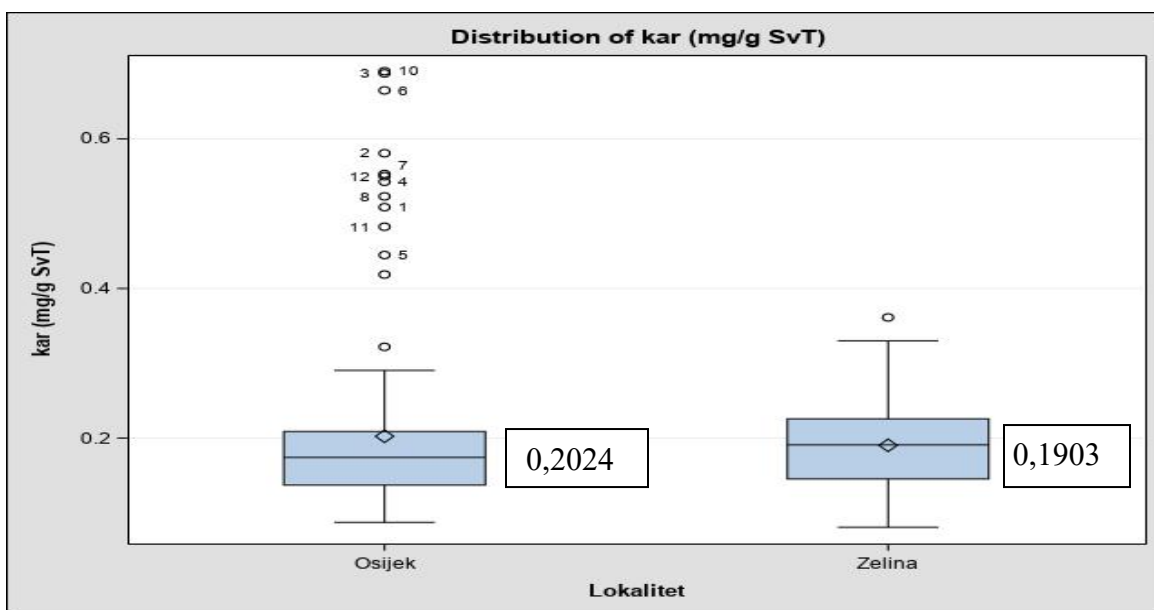
Grafikon 3. Prosječni sadržaj klorofila b u listovima 33 sorte jabuke na lokalitetima Osijek i Donja Zelina

Prosječni sadržaj klorofila b također je bio niži u listovima sorata jabuka na lokalitetu Osijek te je iznosio 0,126 mg/g Sv.T., dok je na lokalitetu Donja Zelina iznosio 0,163 mg/g Sv.T. (Grafikon 3.).



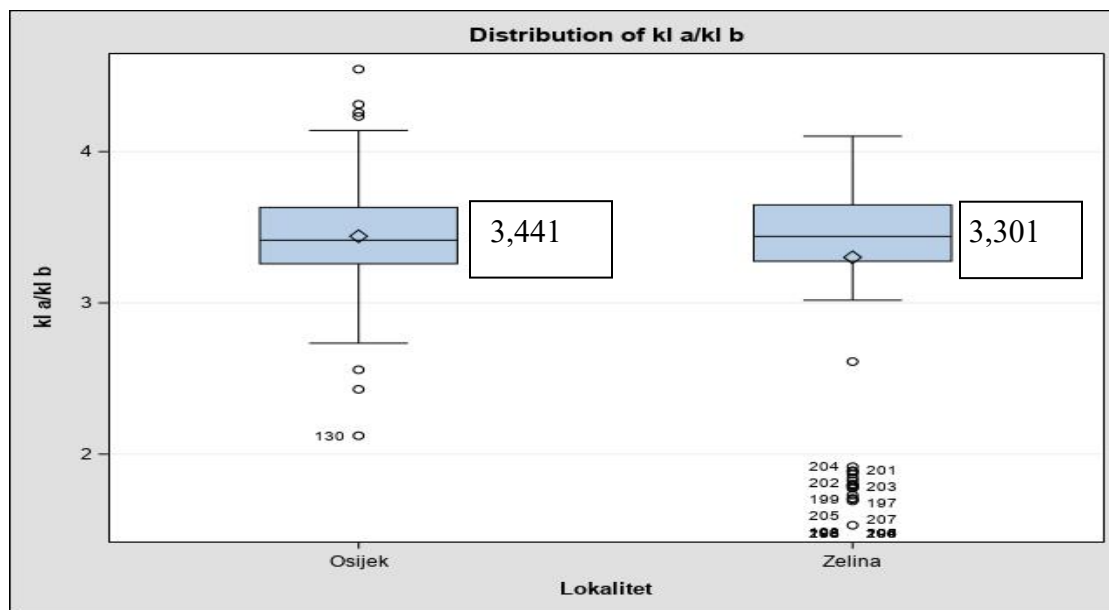
Grafikon 4. Prosječni sadržaj ukupnih klorofila u listovima 33 sorte jabuke na lokalitetima Osijek i Donja Zelina

Prosječni sadržaj ukupnih klorofila je također bio značajno viši u listovima jabuka na lokalitetu Donja Zelina te je iznosio 0,672 mg/g Sv.T. dok je na lokalitetu Osijek ta vrijednost bila 0,552 mg/g Sv.T. (Grafikon 4.).



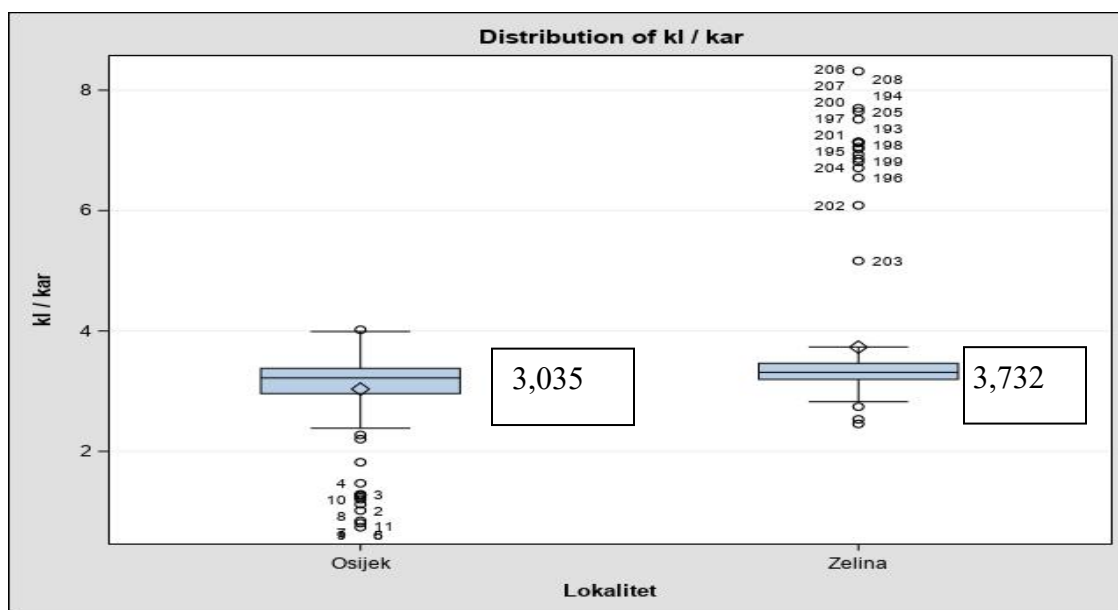
Grafikon 5. Prosječni sadržaj karotenoida u listovima 33 sorte na lokalitetima Osijek i Donja Zelina

Prosječni sadržaj karotenoida u listovima jabuka na lokalitetu Osijek iznosio je 0,2024 mg/g Sv.T., a na lokalitetu Donja Zelina 0,1903 mg/g Sv.T. te se ove dvije vrijednosti nisu statistički značajno razlikovale (Grafikon 5.).



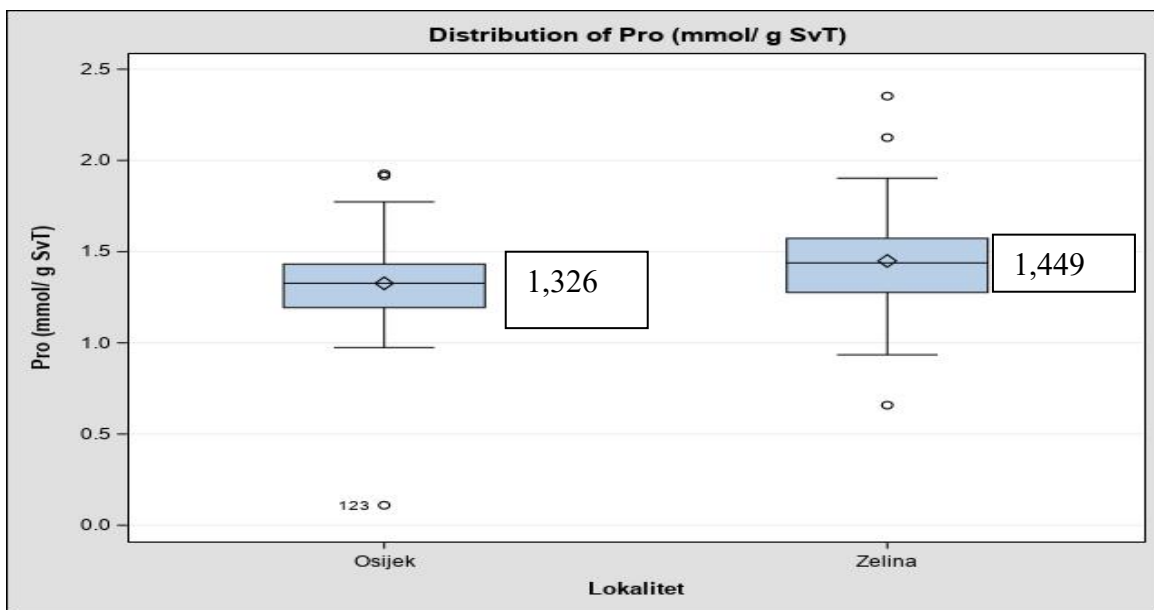
Grafikon 6. Prosječni omjer klorofila a i b u listovima 33 sorte jabuke na lokalitetima Osijek i Donja Zelina

Prosječni omjer klorofila a i b na lokalitetu Osijek iznosio je 3,441 mg/g Sv.T., a na lokalitetu Donja Zelina 3,301 mg/g Sv.T. te se ove dvije vrijednosti nisu statistički značajno razlikovale (Grafikon 6.).



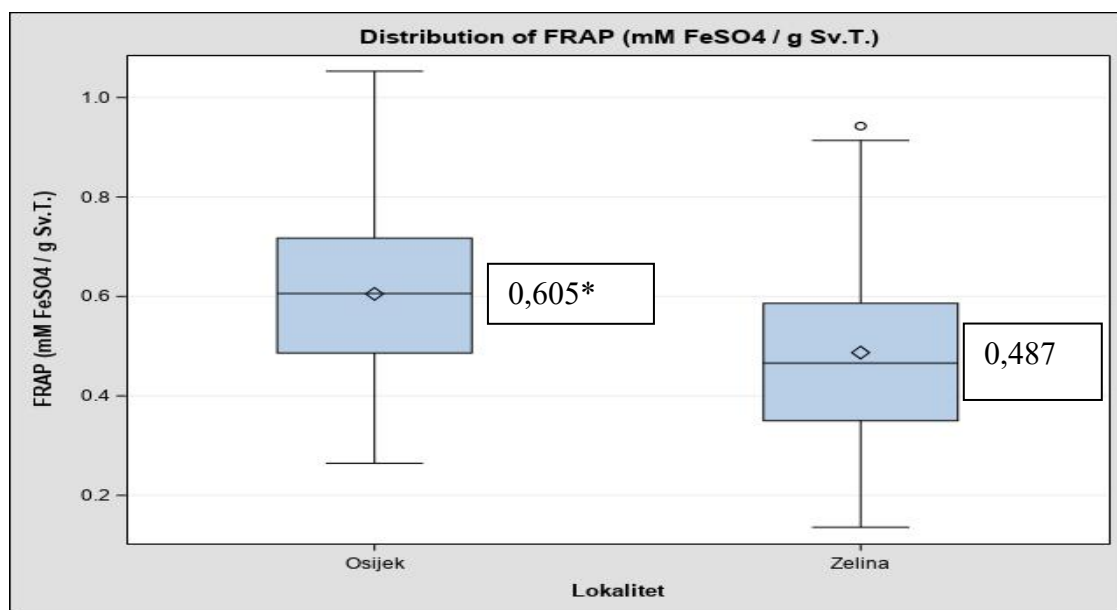
Grafikon 7. Prosječni omjer ukupnih klorofila i karotenoida u listovima 33 sorte jabuke na lokalitetima Osijek i Donja Zelina

Prosječni omjer ukupnih klorofila i karotenoida utvrđen u listovima jabuka na lokalitetu Osijek iznosio je 3,035 mg/g Sv.T., a na lokalitetu Donja Zelina 3,732 mg/g Sv.T. te se ove dvije vrijednosti nisu statistički značajno razlikovale.



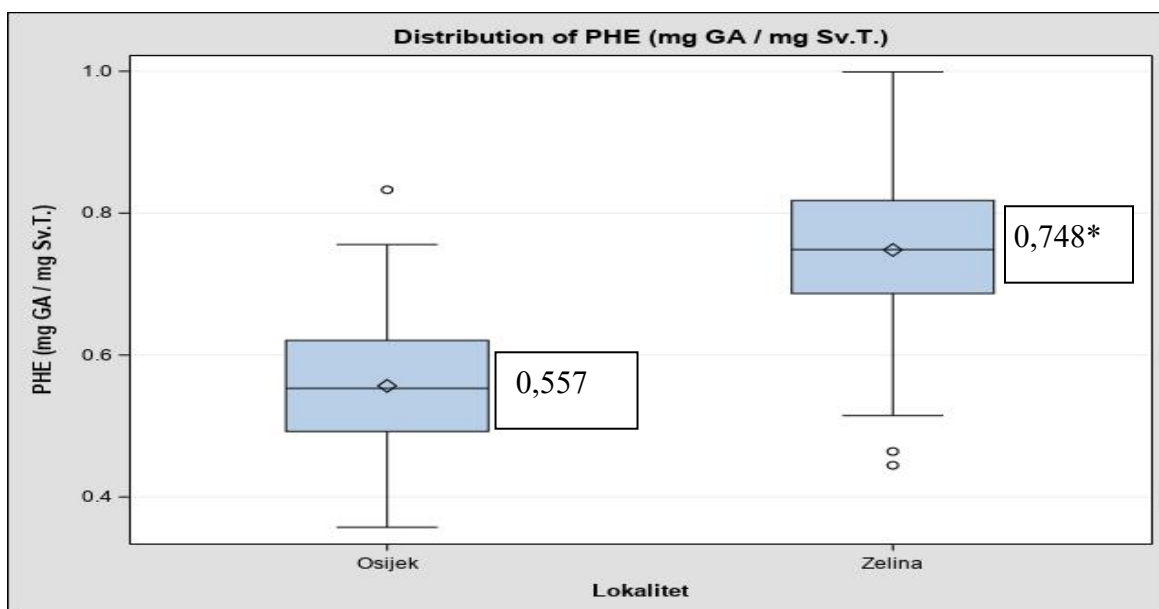
Grafikon 8. Prosječni sadržaj prolina u listovima 33 sorte jabuke na lokalitetima Osijek i Donja Zelina

Prosječni sadržaj prolina utvrđen u listovima jabuka nije se značajno razlikovao te je na lokalitetu Osijek vrijednost navedenog pokazatelja sušnog stresa iznosila 1,326 mg/g Sv.T., a na lokalitetu Donja Zelina 1,449 mg/g Sv.T (Grafikon 8.).



Grafikon 9. Prosječna antioksidativna aktivnost u listovima 33 sorte jabuke na lokalitetima Osijek i Donja Zelina

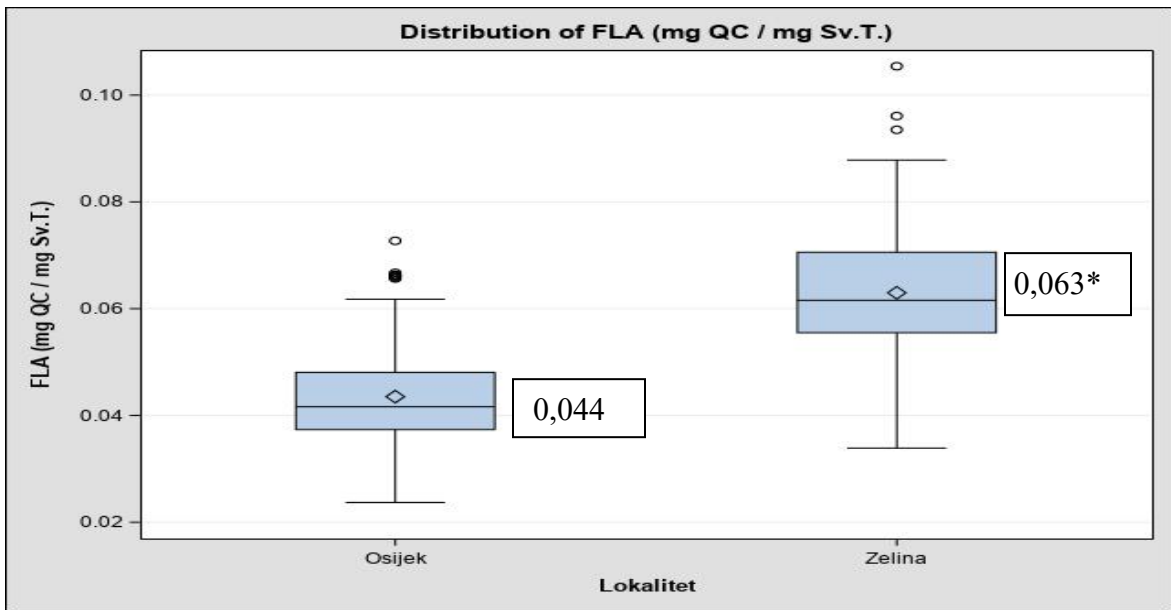
Prosječna antioksidativna aktivnost utvrđena FRAP metodom je bila značajno veća u listovima jabuka uzorkovanih na lokalitetu Osijek te je iznosila 0,605 mg/g Sv.T. u usporedbi sa prosječnom vrijednošću utvrđenom u listovima jabuka na lokalitetu Donja Zelina 0,487 mg/g Sv.T (Grafikon 9.).



Grafikon 10. Prosječni sadržaj fenola u listovima 33 sorte jabuke na lokalitetima Osijek i Donja Zelina

Prosječni sadržaj fenola u listovima jabuka na lokalitetu Osijek iznosio je 0,557 mg/g Sv.T., te je ova vrijednost bila statistički značajno veća u usporedbi sa sadržajem utvrđenim u listovima jabuka na lokalitetu Donja Zelina 0,748 mg/g Sv.T. (Grafikon 10.).

Značajno manji prosječni sadržaj flavonoida u listovima jabuka, utvrđen je na lokalitetu Osijek, 0,044 mg/g Sv.T., dok je na lokalitetu Donja Zelina sadržaj flavonoida u listovima jabuka iznosio 0,063 mg/g Sv.T. (Grafikon 11.).



Grafikon 11. Prosječni sadržaj flavonoida u listovima 33 sorte jabuke na lokalitetima Osijek i Donja Zelina

5. RASPRAVA

Visoke temperature u kombinaciji sa nedostatnim količinama vode, jedni su od glavnih uzročnika abiotskog stresa u suvremenoj poljoprivrednoj proizvodnji diljem svijeta. Mafakheri i sur. (2010.) su istraživali utjecaj sušnog stresa na sadržaj prolina, sadržaj klorofila, fotosintezu i transpiraciju, provodljivost puči i prinos kod tri sorte slanutka različite otpornosti na sušu popraćenu visokim temperaturama. Provedeno je terensko ispitivanje s četiri režima navodnjavanja po slučajnom bloknom rasporedu s tri ponavljanja. Tretmani sušnog stresa uključivali su kontrolu (bez suše), sušni stres tijekom vegetativnog stadija, sušni stres u fazi cvatnje te sušni stres u vegetativnoj fazi i u cvatnji. Svi ispitivani fiziološki parametri bili su pod utjecajem sušnog stresa. Nedostatak vode tijekom vegetativnog rasta ili cvatnje značajno je smanjio razine klorofila a, klorofila b i ukupnog klorofila u listovima. U kontrolnim uvjetima i u uvjetima suše, akumulacija prolina bila je veća kod sorte koja je otpornija na deficit vode (ILC482) u usporedbi sa manje tolerantnom sortom na vodni deficit (Pirouz). Fotosinteza, transpiracija, provodljivost puči i prinos bili su viši, a stomatalna koncentracija CO₂ niža u uvjetima nedostatka vode nego u kontrolnim uvjetima. Autori dokazuju da su mehanizmi fiziološke prilagodbe na stres kao i genetska podloga sorte ključni u smanjenju štetnih učinaka nedostatka vode te je sorta Bivaniej otporna na sušu, dala značajno veći prinos u uvjetima suše u usporedbi sa sortom Pirouz, koja je osjetljiva na sušu. Također, autori navode da se nedostatak vode tijekom cvatnje značajno jače reflektira na smanjenje prinosa u usporedbi sa nedostatkom vode tijekom vegetativne faze rasta.

U našim istraživanjima u prosjeku za oba ispitivana lokaliteta, najnižu koncentraciju klorofila a i b te ukupnih klorofila imala je sorta Gala Dark Ann a zatim sorte Gala Royal Beaut i Opal (Tablica 1.). S druge strane najveća koncentracija ukupnih klorofila i klorofila a zabilježena je u listovima sorte Jeromine i Roats King Delicious. Razlika u sadržaju klorofila a kod sorata sa najmanjim i najvećim sadržajem je bila otprilike 36 % a za vrijednosti sadržaja klorofila b približno 56 %, što nam govori da je sadržaj klorofila u listovima također izražena sortna specifičnost kod jabuke.

Osim klorofila, biološki aktivni spojevi zastupljeni u kloroplastima su i karotenoidi, a među najvažnije u toj skupini spojeva spadaju beta-karoten, likopen, lutein i zeaksantin. β -karoten i likopen pripadaju karotenima topivim u mastima, dok lutein i zeaksantin pripadaju ksantofilima s najmanje jednom hidroksilnom skupinom (Krinsky, 2005). Karotenoidi su vrlo važni u procesu fotosinteze jer sudjeluju u građi antena kompleksa u

fotosustavima ali su i vrlo važni spojevi s antioksidativnim djelovanjem koji štite fotosintetski aparat od fotooksidacije. U našim istraživanjima najveći prosječni sadržaj karotenoida u listovima jabuka je utvrđen kod sorata Allegro 1 i Galval 3 dok su sorte Golden Smoothee i Opal imale čak za 66 % niži sadržaj karotenoida (Tablica 1.).

Jie Y. i sur., (2008.) su istraživali ulogu prolina kao organskog osmoregulatora koji može poboljšati otpornost na sušu popraćenu visokim temperaturama. Praćena je akumulacija prolina u lišću jabuke nakon primjene različitih biološki aktivnih spojeva kod trogodišnjih stabala jabuke (*Malus domestica* Borkh cv. Rehd Fuji/*Malus hupehensis* (Pamp) Rehd.). Rezultati pokazuju da se koncentracija prolina povećava za 110,67, 135,12 odnosno 115,96 % u uvjetima sušnog stresa kod biljaka koje su prskane abscizinskom (ABA) i salicilnom kiselinom (SA) te je efekt povećanja akumulacije prolina u listovima bio vidljiv i 10 dana nakon prestanka navodnjavanja. Koncentracija malondialdehida (MDA), produkta peroksidacije lipida, smanjila se u varijantama tretmana s ABA i SA u uvjetima suše i visoke temperature. Tretman glicin betainom (GB) je povećao razine prolina i značajno smanjio razine MDA u uvjetima blagog do umjerenog nedostatka vode pri 50-60 % poljskog vodnog kapaciteta. Ovi rezultati sugeriraju da primjena fiziološki aktivnih spojeva poput ABA, SA, GB i OA mogu zaštitno djelovati u obrani jabuke od oksidativnog oštećenja, uzrokovanog sušnim stresom praćenim visokim temperaturama, kroz povećanje akumulacije prolina u listova.

Kao što vidimo u tablici 2 sadržaj prolina kretao se u rasponu od 1,012 do 1,479 mg/g Sv.T. Najmanju koncentraciju prolina imale su sorte Braeburn Maririred i Jeromine a najveću Red Idared i Orion.

Jedna od vrlo zastupljenih grupa spojeva kod biljaka su fenoli, koji se sintetiziraju putem šikiminske kiseline iz L-tirozina ili L-fenilalanina. Enzimi za ovaj put sinteze se ne nalaze u životinjskim stanicama i stoga životinje u svojim metaboličkim putevima ne proizvode fenole ili razgrađuju fenolni prsten, međutim, fenoli se nkupljaju u stanicama i tkivima životinja koje se hrane biljkama. Biljni fenoli u ljudskoj prehrani uključuju jednostavne fenole (hidroksibenzojeva kiselina), fenilpropanoide (hidroksicimetna kiselina), flavonoide (triciklički hidroksipolifenoli) i njihove složene derivate od kojih neki poput, npr. aflavina u crnom čaju, mogu biti izvorno prisutni kod u biljci ili mogu nastati u procesima prerade i dorade prehrambenog proizvoda. Fenoli daju gorak okus svježoj hrani (Lea, 1992.). Fenolni spojevi kao što su fenolne kiseline i flavonoidi imaju izraženo antioksidativno

djelovanje te mogu imati pozitivni učinak na zdravlje ljudi smanjujući rizik od velikog broja bolesti metaboličkih poremećaja i povezanih komplikacija, kao npr. kod dijabetesa tipa 2 (Balasundram i sur., 2006.). Međutim, različite skupine fenolnih spojeva imaju različita biološka svojstva i malo se zna o mehanizmima kojima mogu pridonijeti prevenciji bolesti. Poznato je preko 4000 flavonoida. Flavonoidi se uglavnom nalaze u drvenastim i vanjskim dijelovima biljaka (Macheix i sur., 1990.). Stoga se nalaze u dijelovima biljke, poput pokožice i sjemenki, koji se često odbacuju tijekom pripreme hrane. Kuhnau (1976.) je flavonoide nazvao "polu-esencijalnim" komponentama hrane. Prema ovom stajalištu, fenoli su kao skupina spojeva esencijalni u prehrani, međutim niti jedan flavonoid nema nezamjenjivu, vitalnu metaboličku funkciju poput npr. vitamina. Ova "polu-esencijalna" funkcija može biti povezana s njihovom sposobnošću da zaštite vitamin C i vitamin E od oksidativne razgradnje kod biljaka koje rastu, kod konzerviranja hrane, tijekom procesa kuhanja, tijekom probave i apsorpcije te u krvožilnom sustavu i tjelesnim tkivima. Flavonoidi u biljnoj tvari se uglavnom nalaze u glikoliziranom obliku (konjugirani s različitim ugljikohidratima) te se izvorno pretpostavljalo da se u takvom obliku ne mogu apsorbirati u crijevu i da je apsorpcija flavonoida iz hrane zanemariva. Međutim, glikolizacija povećava topljivost flavonoida u vodi, a studije su pokazale da to olakšava njihovu apsorpciju iz probavnog trakta u krvotok (Hollman, 1995.). Fenoli, posebice flavonoidi, fenolne kiseline i tanini, imaju važno svojstvo inhibicije α -glukozidaze i α -amilaze, glavnih enzima odgovornih za probavu ugljikohidrata iz hrane (Lin i sur., 2016.).

Kao što vidimo u tablici 2 sadržaj fenola kretao se u rasponu od 0,490 do 0,749 mg/g Sv.T (Tablica 2.). Najmanju koncentraciju fenola imale su sorte Braeburn Lochbuie i Braeburn Maririred a najveću Collina2, Jonagold Novajo i Jonaprince. Ne postoji korelacija između sadržaja prolina i fenola u listovima jabuka i sadržaja prolina i flavonoida. U tablici 2. vidljivo je da porastom sadržaja fenola pada antioksidativna aktivnosti u listovima jabuke.

Piluzza i Bullita (2011.) su proučavali odnos između antioksidativne aktivnosti i sadržaja fenola u acetonskim ekstraktima 24 mediteranske divlje i kultivirane biljke. Antioksidativni kapacitet izražen je u ekvivalentu troloxa, koristeći TEAC, DPPH i ABTS metode. Ukupni fenoli, izraženi u ekvivalentu galne kiseline (GAE), varirali su od 3,18 (*Allium sativum* L.) do 147,68 (*Pistacia lentiscus* L.) mg GAE/g suhe tvari. Visoke vrijednosti TEAC odgovarale su visokom sadržaju fenola, dok su biljke s niskom antioksidativnom aktivnošću imale nizak sadržaj fenola. TEAC test i ukupni sadržaj fenola bili su u pozitivnoj korelaciji i s DPPH i ABTS testom. Istraživači navode da različiti

odnosi između antioksidativne aktivnosti i ukupnog sadržaja fenola mogu biti posljedica nekoliko čimbenika te da se moraju uzeti u obzir potencijalne interakcije između različitih antioksidansa u reakcijskoj smjesi, tj. sinergija i antagonizam, zbog čega antioksidativna aktivnost ne ovisi samo o koncentraciji već i o strukturi i interakcijama između antioksidansa. Primijetili su da uzorci artemizije, bršljana i koprive, a koji imaju sličnu ukupnu koncentraciju fenola, jako variraju u vrijednostima antioksidativne aktivnosti. S druge strane, ekstrakti paprati i pupčanog kupusa s različitim ukupnim sadržajem fenola, imali su slične vrijednosti antioksidativne aktivnosti, ali vrijedi uzeti u obzir da se antioksidativno djelovanje biljnih ekstrakata može povezati s prisutnošću nekih pojedinačnih aktivnih fenolnih spojeva.

Nie J. i sur., (2009.) navode da su flavonoidi glavna skupina polifenola koji se nalaze u jabukama, a koji imaju niz fizioloških svojstava i aktivnosti korisnih za ljudsko zdravlje. U jabuci su identificirana 34 flavonoida koji pripadaju 5 klasa: flavanoli, flavonoli, dihidrokalkoni, antocijanini i flavanonoli. Sastav i koncentracija flavonoida u jabukama varira ovisno o sorti i tkivu ploda jabuke. Obično su broj vrsta flavonoida i njihova koncentracija značajno viši u kori jabuke u usporedbi sa usplodem. Koncentracija flavonoida u jabuci može se mijenjati tijekom njenog razvoja, zrenja i skladištenja.

U našim istraživanjima, sadržaj flavonoida u listovima jabuka se kretao u rasponu od 0,033 do 0,067 mg/g SvT (Tablica 2.). Najmanju koncentraciju flavonoida imale su sorte Reglindis i CCCoop39 a najveću Karneval, Santana, Granny Smith i Collina2. Vidljivo je da je padom sadržaja fenola u listovima jabuke došlo i do pada sadržaja flavonoida.

Kao što vidimo u tablici 2 antioksidativna aktivnost kretala se u rasponu od 0,387 do 0,794 mg/g SvT. Najniža antioksidativna aktivnost zabilježena je u listovima jabuka sorata Jonagold Novajo, Jonaprince i Sirius a najveća kod Jeromine i Roats King Red Delicious.

Sorta Braeburn Maririred imala je najniži sadržaj prolina i fenola, međutim antioksidativna je bila na jako visokoj razini dok je sorta Collina2 imala visoku koncentraciju fenola i flavonoida sa prosječnom koncentracijom prolina i antioksidativnom aktivnošću. Potrebna su daljnja istraživanja koja će ove analizirane parametre povezati s kvalitetom i kvantitetom prinosa kako bi se mogle kroz duže vremensko razdoblje izdvojiti sorte koje su stabilne u navedenim svojstvima i na temelju toga preporučiti za uzgoj u određenim mikroklimatskim uvjetima.

6. ZAKLJUČAK

1. Mikroklimatski uvjeti na dva istraživana lokaliteta su bili različiti u pogledu prosjeka oborina, prosječnih temperatura, maksimalnih i minimalnih temperatura i vlage zraka.
2. U prosjeku za oba lokaliteta vidljivo je da postoji sortna specifičnost kada govorimo o koncentraciji ispitivanih parametara i antioksidativnoj aktivnosti u listu.
3. Antioksidativna aktivnost u listu jabuka na lokalitetu Osijek je bila značajno viša što možemo povezati i sa višim prosječnim temperaturama te višim maksimalnim dnevnim i noćnim temperaturama.
4. Povećani sadržaj fenola i flavonoida u listovima jabuka na lokalitetu Zelina možemo protumačiti kroz njihovu smanjenu potrošnju u oksidativnom odgovoru na toplinski stres, pošto su i temperature na tom lokalitetu bile niže u usporedbi sa lokalitetom Osijek.
5. Na temelju ispitivanih parametara, više sorata se isticalo otpornošću na sušni i temperaturni stres na oba ispitivana lokaliteta te bi za uzgoj na području kontinentalne Hrvatske mogli preporučiti sorte Braeburn Aporo Mariri Red, Braeburn Lochbuie, Gala Schnitzer Schniga, Gala Schnicored i Granny Smith.

7. LITERATURA

1. Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 239(1), 70-76.
2. Carillo P., & Gibon Y. (2011). Protocol: extraction and determination of proline. Prometheus Wiki, 1-5.
3. Delgado-Pelayo, R., Gallardo-Guerrero, L., & Hornero-Méndez, D. (2014). Chlorophyll and carotenoid pigments in the peel and flesh of commercial apple fruit varieties. *Food Research International*, 65, 272-281.
4. Doores, S., & Splittstoesser, D. F. (1983). The microbiology of apples and apple products. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 19(2): 133-149.
5. Giorno, F., Guerriero, G., Baric, S., & Mariani, C. (2012). Heat shock transcriptional factors in *Malus domestica*: identification, classification and expression analysis. *BMC genomics*, 13, 1-13.
6. Greer, D. H. (2015). Temperature-dependent responses of the photosynthetic and chlorophyll fluorescence attributes of apple (*Malus domestica*) leaves during a sustained high temperature event. *Plant Physiology and Biochemistry*, 97, 139-146.
7. Holm, G. (1954). Chlorophyll mutations in barley. *Acta Agronomica Scandinavica*. 4(1), 457-471.
8. Hollman, P. C., de Vries, J. H., van Leeuwen, S. D., Mengelers, M. J., & Katan, M. B. (1995). Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 62(6), 1276-1282.
9. Hsiao, T. C. (1973). Plant responses to water stress. *Annual Review of Plant Physiology*, 24(1), 519-570.
10. James, D. J., Uratsu, S., Cheng, J., Negri, P., Viss, P., & Dandekar, A. M. (1993). Acetosyringone and osmoprotectants like betaine or proline synergistically enhance *Agrobacterium*-mediated transformation of apple. *Plant Cell Reports*, 12, 559-563.
11. Jie, Y., Yang, H., Zhang, H., & Zhang, W. (2008). Promotion of proline

- accumulation in apple leaves by bioregulators. *Acta Horticulturae*, 774, 237-242.
12. Korban, S. S., & Skirvin, R. M. (1984). Nomenclature of the cultivated apple. *Horticultural Science*, 19(2), 177-180.
 13. Krinsky N. I, Johnson E. J. (2005). Carotenoid actions and their relation to health and disease, *Molecular Aspects of Medicine*, 26, 459-516.
 14. Kuhnau J. (1976). The flavonoids: a class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Review of Nutrition and Dietetics*, 24, 117–20.
 15. Kumari, S., Manohar, S., Kumari, P., Krishnan, V., Maheshwari, C., Narwal, S., & Dahuja, A. (2023). The role of major phenolics in apple to total antioxidant capacity. In: *Apple Cultivation - Recent Advances*, Ed. Ayzin Küden. pp. 140.
 16. Lea, A. G. H. (1992). Flavour, colour and stability in fruit products: the effect of polyphenols. In: Hemingway RW, Laks P.E. (eds) *Plant Polyphenols*. New York: Plenum Press, 827–47.
 17. Lee, K. W., Kim, Y. J., Kim, D. O., Lee, H. J., & Lee, C. Y. (2003). Major phenolics in apple and their contribution to the total antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(22), 6516-6520.
 18. Lin D., Xiao M., Zhao J., Li Z., Xing B., Li X., Kong M., Li L., Zhang Q., Liu Y., Chen H., Qin W., Wu H., Chen S., (2016). An Overview of Plant Phenolic Compounds and Their Importance in Human Nutrition and Management of Type 2 Diabetes, *Molecules*, 21, 1374.
 19. Macheix J.J., Fleuriet A., Billot J. (2018). *Fruit Phenolics*. Boca Raton FL, CRC Press, pp. 390.
 20. Mafakheri, A., Siosemardeh, A. F., Bahramnejad, B., Struik, P. C., & Sohrabi, Y. (2010). Effect of drought stress on yield, proline and chlorophyll contents in three chickpea cultivars. *Australian Journal of Crop Science*, 4(8), 580-585.
 21. Massonnet, C., Costes, E., Rambal, S., Dreyer, E., & Regnard, J. L. (2007). Stomatal regulation of photosynthesis in apple leaves: evidence for different water-use strategies between two cultivars. *Annals of Botany*, 100(6), 1347-1356.
 22. Mihaljević, I., Viljevac Vuletić, M., Šimić, D., Tomaš, V., Horvat, D., Josipović,

- M., & Vuković, D. (2021). Comparative study of drought stress effects on traditional and modern apple cultivars. *Plants*, 10(3), 561.
23. Morimoto, R. I. (1998). Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes & Development*, 12(24), 3788-3796.
24. Nie, J., Lu, D., Li, J., Liu, F., & Li, F. (2009). Advances in studies on flavonoids in apple fruit. *Acta Horticulturae Sinica*, 36(9), 1390-1397.
25. Ordóñez, A.A.L., Gómez, J.D., Vattuone, M.A., Isla, M.I. (2006). Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq.) Swart extracts. *Food Chemistry*, 97, 452–458.
26. Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63(7), 1035-1042.
27. Piluzza G. i Bullita S. (2011). Correlations between phenolic content and antioxidant properties in twenty-four plant species of traditional ethnoveterinary use in the Mediterranean area, *Pharmaceutical Biology*, 49(3): 240–247.
28. Raza, A., Charagh, S., Abbas, S., Hassan, M. U., Saeed, F., Haider, S., & Varshney, R. K. (2023). Assessment of proline function in higher plants under extreme temperatures. *Plant Biology*, 25(3), 379-395.
29. Salvucci, M. E., & Crafts-Brandner, S. J. (2004). Inhibition of photosynthesis by heat stress: the activation state of Rubisco as a limiting factor in photosynthesis. *Physiologia Plantarum*, 120(2), 179-186.
30. Širčelj, H., Batić, F., & Štampar, F. (1999). Effects of drought stress on pigment, ascorbic acid and free amino acids content in leaves of two apple tree cultivars. *Phyton-horn, Plant Physiology*, 39(3), 97-100.
31. Van der Sluis, A. A., Dekker, M., de Jager, A., & Jongen, W. M. (2001). Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: effect of cultivar, harvest year, and storage conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8), 3606-3613.
32. Wettstein, D. (1957). Chlorophyll-letale und der submikroskopische Formwechsel der Plastiden. *Experimental Cell Research*, 12(3), 427-506.

8. SAŽETAK

Usljed značajnih klimatskih promjena rastu prosječne temperature uz smanjene količine oborina tijekom vegetacijske sezone, što također negativno utječe i na proizvodnju jabuka. Stoga je pri podizanju nasada bitno voditi brigu o pravilnom odabiru sorte s obzirom na mikroklimatske uvjete koji su specifični za određeno uzgojno područje. Cilj ovog diplomskog rada je istražiti fiziološki odgovor u listu 33 sorte jabuke, na toplinski i sušni stres na dva mikroklimatski različita lokaliteta, Tenja i Donja Zelina. U prosjeku za oba lokaliteta, najmanji sadržaj klorofila a utvrđen je kod sorte Gala Dark Ann, a najveći kod sorte Jeromine dok je najmanja koncentracija klorofila b utvrđena kod sorte Pinova, a najveća u listovima sorte Orion. Sorta Braeburn Maririred isticala se najnižim, a Red Idared najvišim sadržajem prolina u listovima. Sorta sa najvećim sadržajem fenola u listovima bila je Collina2 a najvećim sadržajem flavonoida isticala se sorta Karneval. Utvrđen je i značajan utjecaj lokaliteta na sve ispitivane parametre. Na temelju ispitivanih parametara, više sorata se isticalo otpornošću na sušni i temperaturni stres na oba ispitivana lokaliteta te bi za uzgoj na području kontinentalne Hrvatske mogli preporučiti sorte Braeburn Aporo Mariri Red, Braeburn Lochbuie, Gala Schnitzer Schniga, Gala Schnicored i Granny Smith.

9. SUMMARY

As a result of significant climate changes, average temperatures are rising with reduced amounts of precipitation during the growing season, which also negatively affects apple production. Therefore, when planting plantations, it is important to take care of the correct selection of the variety with regard to the microclimatic conditions that are specific to a certain growing area. The aim of this thesis is to investigate the physiological response in the leaves of 33 apple varieties to heat and drought stress in two microclimatically different localities, Tenja and Donja Zelina. On average for both localities, the lowest chlorophyll a content was found in the Gala Dark Ann variety, and the highest in the Jeromine variety, while the lowest chlorophyll b concentration was found in the Pinova variety, and the highest in the leaves of the Orion variety. The variety Braeburn Maririred stood out with the lowest, and Red Idared with the highest proline content in the leaves. The variety with the highest phenol content in the leaves was Collina2, and the Karneval variety stood out with the highest flavonoid content. A significant influence of locality on all examined parameters was also determined. Based on the analyzed parameters, several cultivars stood out for their resistance to drought and temperature stress in both investigated localities, and the cultivars Braeburn Aporo Mariri Red, Braeburn Lochbuie, Gala Schnitzer Schniga, Gala Schnicored and Granny Smith could be recommended for cultivation in continental Croatia.

10. POPIS TABLICA

Tablica 1. Prosječni sadržaj klorofila a (Chl a), klorofila b (Chl b), klorofila a+b (Chl a+b), karotenoida (Car) (mg/g Sv.T.) te omjeri klorofila a i b (Chl a/Chl b) i omjer klorofila i karotenoida (Chl a+b/Car) u listovima 33 sorte jabuke na lokalitetima Osijek i Donja Zelina, str. 12.

Tablica 2. Prosječni sadržaj prolina (PRO) (mmol/g Sv.T.), fenola (PHE) (mg GA/mg Sv.T.), flavonoida (FLA) (mg QC/mg Sv.T.) i antioksidativna aktivnosti (FRAP) (mM FeSO₄ /g Sv.T.) u listovima 33 sorte jabuke na lokalitetima Osijek i Donja Zelina, str. 13.

11. POPIS SLIKA

Slika 1. Mikrotitarske pločice sa reakcijskom smjesom za analizu sadržaja prolina, str 8.

Slika 2. Čitač mikrotitarskih pločica Tecan Spark, str 8.

Slika 3. Mikrotitarska pločica sa uzorcima za analizu ukupne antioksidativne vrijednosti FRAP metodom, str 9.

12. POPIS GRAFIKONA

Grafikon 1. Usporedba klimatskih pokazatelja za 7. mjesec 2021. godine na lokacijama Tenja i Donja Zelina, str. 7.

Grafikon 2. Prosječni sadržaj klorofila a u listovima 33 sorte jabuke na lokalitetima Osijek i Donja Zelina, str. 14.

Grafikon 3. Prosječni sadržaj klorofila b u listovima 33 sorte jabuke na lokalitetima Osijek i Donja Zelina, str. 14.

Grafikon 4. Prosječni sadržaj ukupnih klorofila u listovima 33 sorte jabuke na lokalitetima Osijek i Donja Zelina, str. 15.

Grafikon 5. Prosječni sadržaj karotenoida u listovima 33 sorte na lokalitetima Osijek i Donja Zelina, str. 15.

Grafikon 6. Prosječni omjer klorofila a i b u listovima 33 sorte jabuke na lokalitetima Osijek i Donja Zelina, 16.

Grafikon 7. Prosječni omjer ukupnih klorofila i karotenoida u listovima 33 sorte jabuke na lokalitetima Osijek i Donja Zelina, str 16.

Grafikon 8. Prosječni sadržaj prolina u listovima 33 sorte jabuke na lokalitetima Osijek i Donja Zelina, str. 17.

Grafikon 9. Prosječna antioksidativna aktivnost u listovima 33 sorte jabuke na lokalitetima Osijek i Donja Zelina, str 17.

Grafikon 10. Prosječni sadržaj fenola u listovima 33 sorte jabuke na lokalitetima Osijek i Donja Zelina, str. 18.

Grafikon 11. Prosječni sadržaj flavonoida u listovima 33 sorte jabuke na lokalitetima Osijek i Donja Zelina, str. 19.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Diplomski studij Bilinogojstvo

FIZIOLOŠKI ODGOVOR LISTOVA JABUKE NA TOPLINSKI STRES

Dino Karavidović

Sažetak:

Uslijed značajnih klimatskih promjena rastu prosječne temperature uz smanjene količine oborina tijekom vegetacijske sezone, što također negativno utječe i na proizvodnju jabuka. Stoga je pri podizanju nasada bitno voditi brigu o pravilnom odabiru sorte s obzirom na mikroklimatske uvjete koji su specifični za određeno uzgojno područje. Cilj ovog diplomskog rada je istražiti fiziološki odgovor u listu 33 sorte jabuke, na toplinski i sušni stres na dva mikroklimatski različita lokaliteta, Tenja i Donja Zelina. U prosjeku za oba lokaliteta, najmanji sadržaj klorofila a utvrđen je kod sorte Gala Dark Ann, a najveći kod sorte Jeromine dok je najmanja koncentracija klorofila b utvrđena kod sorte Pinova, a najveća u listovima sorte Orion. Sorta Braeburn Maririred isticala se najnižim, a Red Idared najvišim sadržajem prolina u listovima. Sorta sa najvećim sadržajem fenola u listovima bila je Collina2 a najvećim sadržajem flavonoida isticala se sorta Karneval. Utvrđen je i značajan utjecaj lokaliteta na sve ispitivane parametre. Na temelju analiziranih parametara, više sorata se isticalo otpornošću na sušni i temperaturni stres na oba ispitivana lokaliteta te bi za uzgoj na području kontinentalne Hrvatske mogli preporučiti sorte Braeburn Aporo Mariri Red, Braeburn Lochbuie, Gala Schnitzer Schniga, Gala Schnicored i Granny Smith.

Ključne riječi: mikroklimatski uvjeti, prilagodba, sorte jabuke, sušni stres, toplinski stres

Rad je izrađen pri: Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Mentor: prof. dr. sc. Miroslav Lisjak

Broj stranica: 32

Broj slika i grafikona: 14

Broj tablica: 2

Broj literaturnih navoda: 32

Broj priloga: 0

Jezik izvornika: Hrvatski

Datum obrane: 07.03.2024.

Stručno povjerenstvo za obranu

1. prof. dr. sc. Tihana Teklić, predsjednik

2. prof. dr. sc. Miroslav Lisjak, mentor

3. prof. dr. sc. Tomislav Vinković, član

Rad je pohranjen u: Knjižnica Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Vladimira Preloga 1.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate thesis

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek
University Graduate Studies, Plant Production

PHYSIOLOGICAL RESPONSE OF APPLE LEAVES TO HEAT STRESS

Dino Karavidović

Abstract:

As a result of significant climate changes, average temperatures are rising with reduced amounts of precipitation during the growing season, which also negatively affects apple production. Therefore, when planting plantations, it is important to take care of the correct selection of the variety with regard to the microclimatic conditions that are specific to a certain growing area. The aim of this thesis is to investigate the physiological response in the leaves of 33 apple varieties to heat and drought stress in two microclimatically different localities, Tenja and Donja Zelina. On average for both localities, the lowest chlorophyll a content was found in the Gala Dark Ann variety, and the highest in the Jeromine variety, while the lowest chlorophyll b concentration was found in the Pinova variety, and the highest in the leaves of the Orion variety. The variety Braeburn Maririred stood out with the lowest, and Red Idared with the highest proline content in the leaves. The variety with the highest phenol content in the leaves was Collina2, and the Karneval variety stood out with the highest flavonoid content. A significant influence of locality on all examined parameters was also determined. Based on the analyzed parameters, several cultivars stood out for their resistance to drought and temperature stress in both investigated localities, and the cultivars Braeburn Aporo Mariri Red, Braeburn Lochbuie, Gala Schnitzer Schniga, Gala Schnicored and Granny Smith could be recommended for cultivation in continental Croatia.

Key words: microclimatic conditions, adaptation, apple varieties, drought stress, heat stress

Thesis performed at: Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

Mentor: PhD Miroslav Lisjak, assistant professor

Number of pages: 32

Number of figures: 14

Number of tables: 2

Number of references: 32

Number of appendices: 0

Original in: Croatian

Thesis defended on date: 07.03.2024.

Reviewers:

1. Tihana Teklić, PhD, full professor, president
2. Miroslav Lisjak, PhD, associate professor, mentor
3. Tomislav Vinković, PhD, associate professor, member

Thesis deposited at: Library of Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek, University of Josip Juraj Strossmayer, Vladimira Preloga 1.