

Uticaj Prohexadione-Ca i zakidanja prvih serija mladih izdanaka na profil i sadržaj fenolnih jedinjenja u plodu maline (*Rubus idaeus* L.)

Jasminka Milivojević, Milena Poledica, Dragan Radivojević, Mihailo Nikolić

Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Nemanjina 6, 11080 Zemun, Srbija
E-mail: jasminka@agrif.bg.ac.rs

Primljeno: 02. septembra 2014; prihvaćeno: 13. oktobra 2014.

Rezime. U radu je proučavan uticaj retardanta rasta Prohexadione-Ca (ProCa) i pomotehničke mere zakidanja prvih serija mladih izdanaka na promene u sadržaju i profilu fenolnih jedinjenja u plodovima sorte maline Willamette (*Rubus idaeus* L.). Istraživanja su izvedena u periodu 2010–2011. godina u zasadu maline, koji se nalazi u blizini Krupnja. Ogled je obuhvatio šest tretmana: kontrola – bez tretiranja; 2ProCa – sa dva tretiranja ProCa; Z – sa jednim zakidanjem izdanaka; Z + 2ProCa – sa jednim zakidanjem izdanaka i dva tretiranja ProCa; 2Z – sa dva zakidanja izdanaka; 2ProCa + 2GA₃ – sa dva tretiranja ProCa, i neposredno zatim giberelinskom kiselinom. Prvo zakidanje mladih izdanaka je obavljeno sredinom aprila, a drugo krajem aprila u obe godine ispitivanja. U 2ProCa i Z + 2ProCa tretmanu folijarna aplikacija sa ProCa vršena je dva puta u periodu april–maj u intervalu od tri nedelje srazmerno dinamici porasta novih jednogodišnjih izdanaka tj. u momentu kada oni dostignu visinu od 30 cm. Primenjene su sledeće koncentracije ProCa: 125 ppm (kod prvog tretiranja) i 200 ppm (kod drugog tretiranja). Tretiranje giberelinskom kiselinom (GA₃) je izvršeno dva puta neposredno nakon primene ProCa u koncentraciji od 250 ppm. Dobijeni rezultati su potvrdili dominantno prisustvo glikozida kvercetina i antocijana: cijanidin-3-soforozida i cijanidin-3-glukozida u plodu maline. Među brojnim fenolnim komponentama identifikovane su i visoke koncentracije slobodne elaginske kiseline i derivata elaginske kiseline galoil-bis-HHDP-glukoze. Jedno zakidanje izdanaka kombinovano sa dve aplikacije ProCa je ispoljilo pozitivan uticaj na povećanje sadržaja kvercetin-diheksozida, kvercetin-3-vicianozida, kvercetin-3-galaktosida, slobodne elaginske kiseline, kao i antocijana: cijanidin-3-soforozida i cijanidin-3-glukozida u plodu sorte maline Willamette.

Ključne reči: malina, Willamette, hemijski regulator rasta, rezidba, antocijani, flavonoli, fenolne kiseline

Uvod

Tradicionalni načini kontrole bujnosti maline zasnivaju se pretežno na primeni pomotehničke mere zakidanja prvih serija mladih izdanaka, kako bi kasnije ostavljeni i odabrani izdanci imali dovoljno prostora, svetlosti i hranljivih materija za svoj razvoj (Poledica et al., 2013; Nikolić & Milivojević, 2010). Istraživanje Nenadića (1986) je potvrdilo da potpuno uklanjanje prvih serija mladih izdanaka pre početka cvetanja rodnih dvogodišnjih izdanaka ima pozitivne efekte na pri-

nos, kvalitet ploda i prevenciju bolesti. Veliku primenu u regulisanju prekomerne bujnosti kod različitih vrsta voćaka našli su i hemijski regulatori rasta (Rademacher, 2000). Prohexadione-Ca (ProCa; 3-oxido-4-propionyl-5-oxo-3-cyclohexene-carboxylate) je jedan od hemijskih regulatora rasta, koji se pokazao kao korisno sredstvo za smanjenje vegetativnog porasta i poboljšanje kvaliteta plodova voćaka (Ramírez et al., 2010). Inhibitor je biosinteze giberelina sa niskom toksičnošću i ograničenim delovanjem (Owens & Stover, 1999). Pored pozitivnih efekata na regulisanje bujno-

sti i povećanje produktivnosti, nova saznanja o metaboličkim putevima sinteze i razgradnje određenih jedinjenja ukazala su na činjenicu da ProCa može ispoljiti i neke sporedne efekte. Fletcher *et al.* (2000) i Dwyer *et al.* (2001) ističu da regulatori rasta povećavaju aktivnost enzima antioksidativnog zaštitnog sistema, doprinoseći na taj način ukupnom fenolnom metabolizmu biljaka.

Prisustvo fenolnih jedinjenja predstavlja važan parametar kvaliteta ploda, koji ne samo da utiče na očuvanje njegove hranljive vrednosti i senzoričkog kvaliteta, već je značajan i sa aspekta zdravstvene korisnosti za ljudski organizam (Dragišić-Maksimović *et al.*, 2013; Milivojević *et al.*, 2011a; Moyer *et al.*, 2002). S obzirom da različite pomotehničke mere (Landolt, 2011) i ekološki faktori (Anttonen & Karjalainen, 2005) mogu pokrenuti razne puteve sinteze i izazvati variranje u sastavu i sadržaju fenolnih jedinjenja, cilj ovih istraživanja je bio da se ispita da li do ovakvih promena dolazi u plodu maline sorte Willamette pod uticajem primene retardanta rasta ProCa i zakidanja prvih serija mladih izdanaka, primenjenih samostalno ili u kombinaciji.

Materijal i metode

Ispitivanje uticaja retardanta rasta ProCa i pomotehničke mere zakidanja prvih serija mladih izdanaka na promene u profilu i sadržaju fenolnih jedinjenja u plodu sorte maline Willamette je izvedeno u periodu 2010–2011. godina u zasadu maline koji se nalazi u mestu Tolisavac (Opština Krupanj, 44°21'10.08" SGŠ i 19°23' 20.04" IGD, nadmorska visina 384–390 m). Zasad je zasnovan 2000. godine po sistemu vertikalnog špalira, sa dva reda jednostrukih žica. Primenjeno rastojanje sadnje je bilo 2,5 m između redova i 0,25 m između biljaka u redu. Ogled je izveden po potpunom slučajnom planu i obuhvatio je šest tretmana: kontrola – bez tretiranja; 2ProCa – sa dva tretiranja ProCa; Z – sa jednim zakidanjem izdanaka; Z + 2ProCa – sa jednim zakidanjem izdanaka i dva tretiranja ProCa; 2Z – sa dva zakidanja izdanaka; 2ProCa + 2GA₃ – sa dva tretiranja ProCa, i neposredno zatim giberelinskom kiselinom. Prvo zakidanje mladih izdanaka je obavljeno sredinom aprila, a drugo krajem aprila u obe godine ispitivanja. U 2ProCa, Z + 2ProCa i 2ProCa + 2GA₃ tretmanima folijarna aplikacija sa ProCa vršena

je dva puta u periodu april–maj u intervalu od tri nedelje srazmerno dinamici porasta novih izdanaka. Tretirani su mladi izdanci čitavom dužinom, u momentu kada dostignu visinu do 30 cm. Primenjene su sledeće koncentracije ProCa: 125 ppm (kod prvog tretiranja) i 200 ppm (kod drugog tretiranja). Primena egzogene giberelinske kiseline (GA₃) je izvedena da bi se ispitaio mehanizam uticaja ProCa na aktivnost endogenih giberelina. Tretiranje giberelinskom kiselinom je izvršeno dva puta, neposredno nakon primene ProCa u koncentraciji od 250 ppm.

Za hemijske analize su uzeti uzorci plodova maline u punoj zrelosti (po 30 plodova je uzeto po ponavljanju, odnosno 120 plodova po tretmanu). Neposredno po berbi plodovi su zamrznuti na temperaturi od -20 °C. Fenolna ekstrakcija uzoraka izvršena je po protokolu Mikulič-Petkovšek *et al.* (2012). Zaleđeni plodovi su homogenizovani u avanima, a zatim su od svakog homogenata uzeti uzorci mase 5 g i ekstrahovani u 10 ml metanola, koji sadrži 3% (v/v) mravlje kiseline i 1% (w/v) 2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT), na hlađenom ultrasoničnom kupatilu u trajanju od sat vremena. BHT je dodat uzorcima da spreči oksidaciju. Nakon centrifugiranja u trajanju od 10 minuta na 10.000 x g svaki supernatant je profiltriran kroz poliamidni filter (Chromafil AO-25/25) i prebačen u bočicu pre injektiranja u HPLC sistem.

Identifikacija i kvantifikacija fenolnih jedinjenja je vršena na Thermo Finnigan Surveyor HPLC sistemu (Thermo Scientific, San Jose, SAD) sa „diode array“ detektorom podešenim da prati promenu apsorbance na 280 nm (flavanoli, derivati hidroksicinamičnih kiselina), 350 nm (flavonoli, derivati elaginske kiseline) i 530 nm (antocijani). Korišćena je kolona Gemini C18 (150 × 4,6 mm; Phenomenex, Torrance, SAD) sa kuglicama dijametra 3 μm. Termostatirani odeljak za kolonu je bio podešen na 25 °C. Elucioni rastvori su se sastojali iz 1% mravlje kiseline u redetilovanoj vodi (A) i 100% acetonitrila (B). Uzorci su eluirani po linearnom gradijentu: 0–5 minuta, 3–9 % B; 5–15 minuta, 9–16% B; 15–45 minuta, 16–50% B; 45–50 minuta 50% izokratski (Marks *et al.*, 2007) sa injekcionom zapreminom od 20 μl i protokom od 1 ml min⁻¹.

Sve fenolne komponente su identifikovane upotrebom masenog spektrometra (Thermo Scientific, LCQ Deca XP MAX) sa elektrosprej jonizacijom (ESI), koji je bio optimiziran u negativnom jon modu

(za sve fenolne grupe osim antocijana) i pozitivnom jon modu (za antocijane). Analiza je izvedena upotrebom punog skeniranja MSⁿ zavisnih podataka skeniranih u opsegu od 115 do 1500 *m/z*. Zapremina injektiranja je bila 10 μ l, a protok je održavan na 1 *ml min*⁻¹. Spektralni podaci su obrađeni u programu Excalibur (Thermo Scientific). Identifikacija jedinjenja je potvrđena poređenjem retencionih vremena i njihovih spektralnih prikaza, kao i dodavanjem standardnih rastvora uzorku i fragmentacijom.

Koncentracija fenolnih komponenti je izračunata iz odnosa površine pikova komponenti i odgovarajućih standarda, i izražena je u *mg kg*⁻¹ sveže mase ploda maline. Kod komponenti za koje su nedostajali standardi, kvantifikacija je vršena upotrebom sličnih jedinjenja kao standarda. Tako su heksozid 1 i 2 p-kumarinske kiseline kvantifikovani u ekvivalentima kumarinske kiseline, heksozid kafeinske kiseline kvantifikovan je u ekvivalentima kafeinske kiseline, kvercetin-3-vicianozid i kvercetin-3-ksilozilglukoronid u ekvivalentima kvercetin-3-galaktozida, svi cijanidin glikozidi u ekvivalentima cijanidin-3-galaktozida, oba pelargonidin glikozida u ekvivalentima pelargonidina i svi derivati elaginske kiseline u ekvivalentima elaginske kiseline. Za kvantifikaciju ostalih ispitivanih jedinjenja korišćeni su sledeći standardi: kafeinska i elaginska kiselina, pelargonidin, kampferol, izoramnetin i cijanidin-3-galaktozid (Sigma-Aldrich Chemie, St. Louis, MO, SAD), kvercetin-3-galaktozid, kvercetin-3-glukozid, kvercetin-3-glukoronid, (-)-epikatehin, p-kumarinska kiselina, procijanidin B2 (Fluka Chemie GmbH, Buchs, Švajcarska) i kvercetin-3-O-arabinozid (Apin Chemicals, Abingdon, Velika Britanija).

Dobijeni rezultati statistički su obrađeni primenom metode jednofaktorijalne analize varijanse (ANOVA) korišćenjem programa Statistika (verzija 6.0). Analize su urađene u 4 ponavljanja, a rezultati su prikazani kao srednje vrednosti \pm standarda greška. Značajnost razlika između srednjih vrednosti tretmana određena je LSD testom na nivou značajnosti 0,05.

Rezultati i diskusija

Uticaj ProCa i zakidanja prvih serija mladih izdanaka na sadržaj derivata hidroksicinamičnih kiselina, elaginske kiseline i flavanola u plodu maline. Fenolna jedinjenja bitno doprinose ispoljenoj antioksidativnoj

aktivnosti voća, a brojna istraživanja su već potvrdila njihovo prisustvo u plodovima crvene maline, kao i njihova lekovita svojstva (Milivojević *et al.*, 2011b; Kafkas *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2002). U zavisnosti od hemijske strukture, fenolna jedinjenja se mogu podeliti u nekoliko klasa, među kojima u plodu maline dominiraju flavonoidi, elagitanini i fenolne kiseline.

Bešlić *et al.* (2010) ističu da različite pomotehničke mere primenjene kod vinove loze, uključujući intenzitet rezidbe i opterećenje čokota rodnom, mogu značajno uticati na promene u sastavu i sadržaju fenolnih jedinjenja u bobicama. To potvrđuju i rezultati dobijeni u ovom radu za individualne fenolne komponente detektovane u plodu maline. Plodovi iz tretmana sa dva zakidanja mladih izdanaka imali su veći sadržaj heksozida 1 p-kumarinske kiseline (0,494 *mg kg*⁻¹ sv. m. pl.), dok je samostalna primena ProCa rezultirala značajno nižim vrednostima za dati parametar (0,313 *mg kg*⁻¹ sv. m. pl.), posebno u poređenju sa sadržajem heksozida 2 p-kumarinske kiseline (2,032 *mg kg*⁻¹ sv. m. pl.). Sličan trend uočen je i kod sadržaja kafeinske kiseline u plodu ispitivane sorte, koja je najviše i približne vrednosti ispoljila u 2Z i Z tretmanu (0,557 i 0,550 *mg kg*⁻¹ sv. m. pl., po redosledu). Ukupni sadržaj derivata hidroksicinamičnih kiselina kretao se od 1,740 *mg kg*⁻¹ sv. m. pl. u Z + 2ProCa tretmanu do 2,890 *mg kg*⁻¹ sv. m. pl. u Z tretmanu (Tab. 1), pri čemu su dobijene vrednosti u svim tretmanima niže od vrednosti koje navode Kähkönen *et al.* (2001) za plod crvene maline (25 *mg 100 g*⁻¹). Do značajnog povećanja ukupnog sadržaja hidroksicinamičnih kiselina u plodu ispitivane sorte maline došlo je u tretmanu sa jednim zakidanjem izdanaka u poređenju sa 2Z i Z + 2ProCa tretmanima, što se može objasniti smanjenjem bujnosti izdanaka do optimalnog nivoa i shodno tome poboljšanim uslovima osvetljenosti unutar špalira.

Flavonoidi su podeljeni u mnoge klase uključujući flavanole, flavanole, antocijane, proantocijanidine, epikatehin i izoflavonoide (Shahidi & Naczk, 1995). U plodovima ispitivane sorte maline registrovane su visoke vrednosti ukupnih flavanola, koji uključuju epikatehin i procijanidin dimer B2. Sadržaj procijanidina B2 u plodovima ispitivane sorte kretao se od 7,4 *mg kg*⁻¹ sv. m. pl. u Z + 2ProCa tretmanu do 14,2 *mg kg*⁻¹ sv. m. pl. u 2ProCa tretmanu, ali u poređenju sa plodovima kontrolnih biljaka značajne razlike nisu utvrđene. Epikatehin je okarakterisan kao predominantni flavanol u plodu crvene maline (Määttä-Riihinen *et al.*, 2004), što je

Tab. 1. Uticaj Prohexadione-Ca (ProCa) i zakidanja prvih serija mladih izdanaka na sadržaj derivata hidroksicinamičnih kiselina, elaginske kiseline i flavanola ($mg\ kg^{-1}$ sv. m. plo.) u plodu sorte maline Willamette
Effect of Prohexadione-Ca (ProCa) and young canes removal on the content of derivatives of hydroxycinnamic acids, ellagic acids and flavanols ($mg\ kg^{-1}$ FW) in the fruit of raspberry 'Willamette'

Fenolna jedinjenja <i>Phenolic compounds</i>	Pojedinačna fenolna jedinjenja <i>Individual phenolic compounds</i>	Tretman/Treatment					
		Kontrola <i>Control</i>	2ProCa <i>Two applications of ProCa</i>	Z <i>R</i>	Z + 2ProCa <i>R + 2ProCa</i>	2Z <i>2R</i>	2ProCa + 2GA ₃ <i>Two applications of ProCa and GA₃</i>
Derivati hidroksicinamičnih kiselina <i>Derivatives of hydroxycinnamic acids</i>	<i>p</i> -kumarinska kiselina-heksozid 1	0,478 ± 0,1 ab	0,313 ± 0,0 b	0,488 ± 0,1 ab	0,367 ± 0,0 ab	0,494 ± 0,1a	0,481 ± 0,1 ab
	<i>p</i> -kumarinska kiselina-heksozid 2	1,492 ± 0,3 abc	2,032 ± 0,2 a	1,852 ± 0,2 ab	0,959 ± 0,1 c	0,994 ± 0,1 c	1,311 ± 0,2 bc
	Kafeinska kiselina-heksozid	0,539 ± 0,1 ab	0,353 ± 0,0 b	0,550 ± 0,1 a	0,414 ± 0,0 ab	0,557 ± 0,1 a	0,541 ± 0,1 ab
	Ukupno/Total amount	2,509 ± 0,41 ab	2,699 ± 0,17 ab	2,890 ± 0,37 a	1,740 ± 0,09 c	2,045 ± 0,17 bc	2,333 ± 0,14 abc
Flavanoli <i>Flavanols</i>	Epikatehin	4,4 ± 1,2 b	9,2 ± 0,9 a	8,6 ± 1,6 a	9,5 ± 0,9 a	9,9 ± 1,2 a	6,9 ± 0,4 ab
	Procijanidin dimer (procijanidin B2)	14,0 ± 2,2 ab	14,2 ± 2,2 a	9,4 ± 1,4 ab	7,4 ± 1,9 b	11,9 ± 3,3 ab	13,5 ± 4,3 ab
	Ukupno/Total amount	18,4 ± 1,7 nz	23,4 ± 2,6 nz	18,0 ± 2,6 nz	16,9 ± 2,1 nz	21,8 ± 3,1 nz	20,4 ± 4,4 nz
Derivati elaginske kiseline <i>Derivatives of ellagic acids</i>	Elaginska kiselina-pentozid 1	12,0 ± 0,5 b	12,6 ± 0,9 ab	14,5 ± 1,0 a	13,9 ± 0,4 ab	11,9 ± 0,8 b	12,7 ± 0,6 ab
	Elaginska kiselina-pentozid 2	9,5 ± 0,5 a	10,0 ± 0,6 a	9,0 ± 0,6 a	9,5 ± 0,3 a	6,3 ± 0,9 b	10,0 ± 0,5 a
	Elaginska kiselina	18,8 ± 8,4 b	21,4 ± 4,6 b	42,5 ± 11,2 b	68,7 ± 5,7 a	28,8 ± 7,8 b	19,4 ± 5,1 b
	4-O-acetoksilozid elaginske kiseline	2,7 ± 0,1 a	3,0 ± 0,2 a	3,0 ± 0,2 a	2,8 ± 0,1 a	2,9 ± 0,3 a	3,1 ± 0,2 a
	Galolil-bis-HHDP-glukoza	232,9 ± 35,4 a	277,9 ± 22,1 a	228,9 ± 23,6 a	199,2 ± 34,0 a	225,9 ± 30,8 a	255,2 ± 6,0 a
Ukupno/Total amount	275,9 ± 29,3 nz	324,9 ± 25,0 nz	297,9 ± 28,3 nz	294,1 ± 27,5 nz	275,8 ± 27,8 nz	300,4 ± 15,7 nz	

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti za 4 ponavljanja ± standardna greška. Različite slovne oznake u redu, a u okviru svakog pojedinačnog jedinjenja ukazuju na statistički značajne razlike na nivou 0,05. Različite slovne oznake u okviru ukupnih vrednosti analiziranih grupa jedinjenja ukazuju na statistički značajne razlike na nivou 0,05; nz – bez značajnosti razlika. kontrola – bez tretmana; 2ProCa – sa dva tretiranja ProCa; Z – sa jednim zakidanjem izdanaka; Z + 2ProCa – sa jednim zakidanjem izdanaka i sa dva tretiranja ProCa; 2Z – sa dva zakidanja izdanaka; 2ProCa + 2GA₃ – sa dva tretiranja ProCa i neposredno zatim giberelinskom kiselinom/Results are the means of 4 replicates ± standard error. Values in the row followed by different letters within each individual phenolic compound are significantly different at $P \leq 0.05$. Values in the row followed by different letters within each group of analysed phenolic compounds are significantly different at $P \leq 0.05$. ns – not significant. Control – without treatment; 2ProCa – with two applications of ProCa; R – one cane removal; R + 2ProCa – one cane removal with two applications of ProCa; 2R – two cane removals; 2ProCa + 2GA₃ – two applications of ProCa and afterwards with gibberellic acid GA₃

suprotno našim rezultatima koji ukazuju ipak na veći sadržaj flavanola procijanidin B2 dimera u plodu maline sorte Willamette, posebno u 2ProCa tretmanu ($14,2\ mg\ kg^{-1}$ sv. m. pl.). Posmatrajući uticaj pojedinih tretmana na sadržaj epikatehina mogu se uočiti značajno veće vrednosti ne samo u tretmanima sa samostalnom primenom ProCa ($9,2\ mg\ kg^{-1}$ sv. m. pl.) i kombinovanom primenom ProCa i zakidanja izdanaka ($9,5\ mg\ kg^{-1}$ sv. m. pl.), već i u tretmanima sa jednim i dva zakidanja izdanaka ($8,6$ i $9,9\ mg\ kg^{-1}$ sv. m. pl., po redosledu) u poređenju sa kontrolom ($4,4\ mg\ kg^{-1}$ sv. m. pl.). Međutim, primenjeni tretmani nisu ispoljili značajan uticaj na ukupne vrednosti analiziranih flavanola u ovom radu.

Jagodasto voće se smatra glavnim izvorom elaginske kiseline, koja je uobičajeno prisutna u vidu polimera (elagitanina) ili glikozidnih derivata (Cordeunsi et al., 2005). Derivat elaginske kiseline galolil-bis-HHDP-glukoza imao je dominantnu zastupljenost u plodu sorte maline Willamette ($199,2\ mg\ kg^{-1}$ sv. m. pl. u Z + 2ProCa tretmanu – $277,9\ mg\ kg^{-1}$ sv. m. pl. u 2ProCa tretmanu), pri čemu nije uočena značajnost razlika u izmerenim vrednostima između ispitivanih tretmana. Međutim, sadržaj slobodne elaginske kiseline, znatno niži u odnosu na sadržaj prethodno pomenutog jedinjenja, bio je statistički značajno veći u tretmanu sa kombinovanom primenom zakidanja izdanaka i aplikacijom ProCa ($68,7\ mg\ kg^{-1}$ sv. m. pl.) u odnosu

na ostale ispitivane tretmane (18,8–42,5 mg kg⁻¹ sv. m. pl.). U 2Z tretmanu uočena je značajno niža vrednost sadržaja pentozida 2 elaginske kiseline (6,3 mg kg⁻¹ sv. m. pl.) u poređenju sa kontrolom i ostalim ispitivanim tretmanima, dok je kod pentozida 1 elaginske kiseline značajno viša vrednost dobijena u Z tretmanu (14,5 mg kg⁻¹ sv. m. pl.) samo u odnosu na 2Z i kontrolni tretman (11,9 i 12,0 mg kg⁻¹ sv. m. pl., po redosledu). Među derivatima elaginske kiseline, 4-O-acetoksilozid je imao najmanju zastupljenost (2,7–3,1 mg kg⁻¹ sv. m. pl.), bez postojanja značajnosti razlika u dobijenim vrednostima između tretmana. Posmatrajući ukupne vrednosti za analizirane derivate elaginske kiseline, značajnost razlika između tretmana takođe nije usta-

novljena. Poređenjem dobijenih vrednosti za sadržaj elaginske kiseline sa literaturnim navodima, interesantno je zapaziti da su Milivojević et al. (2011b) u svojim istraživanjima registrovali znatno niže vrednosti za dati parametar kod sorte Willamette (1,98 µg g⁻¹ sv. m. plo.).

Uticaj ProCa i zakidanja prvih serija mladih izdanaka na sadržaj flavonola i antocijana u plodu maline. Rezultati sadržaja flavonola dobijeni u ovom radu potvrdili su da je kvercetin dominantno zastupljen fenol u plodu crvene maline, što se slaže sa navodima Häkkinen et al. (1999) i Milivojević (2008). Kombinovana primena ProCa i zakidanja prvih serija mladih izdanaka uticala je na povećanje sadržaja kvercetin-diheksok-

Tab. 2. Uticaj Prohexadione-Ca (ProCa) i zakidanja prvih serija mladih izdanaka na sadržaj flavonola i antocijana (mg kg⁻¹ sv. m. plo.) u plodu sorte maline Willamette

Effect of Prohexadione-Ca (ProCa) and young canes removal on the content of flavonols and anthocyanins (mg kg⁻¹ FW) in the fruit of raspberry 'Willamette'

Fenolna jedinjenja <i>Phenolic compounds</i>	Pojedinačna fenolna jedinjenja <i>Individual phenolic compounds</i>	Tretman/Treatment					2ProCa + 2GA ₃ <i>Two applications of ProCa and GA₃</i>
		Kontrola <i>Control</i>	2ProCa <i>Two applications of ProCa</i>	Z <i>R</i>	Z + 2ProCa <i>R + 2ProCa</i>	2Z <i>2R</i>	
Flavonoli <i>Flavonols</i>	Kvercetin-diheksozid	5,3 ± 1,4 b	5,7 ± 0,3 b	6,6 ± 0,3 ab	8,2 ± 0,4 a	4,6 ± 0,4 b	5,4 ± 0,8 b
	Kvercetin-3- vicianozid	3,1 ± 0,2 b	3,1 ± 0,2 b	3,2 ± 0,2 b	3,9 ± 0,2 a	2,3 ± 0,1 b	2,6 ± 0,2 b
	Kvercetin-3- galaktozid	1,9 ± 0,2 b	2,6 ± 0,1 b	2,7 ± 0,3 b	4,8 ± 1,3 a	2,2 ± 0,2 b	2,4 ± 0,1 b
	Kvercetin-3- glukozid	1,5 ± 0,1 a	1,6 ± 0,1 a	1,8 ± 0,1 a	1,5 ± 0,1 a	1,7 ± 0,2 a	1,5 ± 0,2 a
	Kvercetin-3- glukoronid	10,8 ± 1,2 c	12,4 ± 1,9 abc	16,5 ± 1,6 a	12,0 ± 1,0 bc	16,4 ± 2,1 ab	10,9 ± 3,2 c
	Kvercetin-3- ksilozilglukoronid	0,3 ± 0,0 a	0,3 ± 0,0 a	0,4 ± 0,0 a	0,3 ± 0,0 a	0,4 ± 0,0 a	0,3 ± 0,1 a
	Kvercetin-3- arabinopiranozid	3,6 ± 0,3 a	4,2 ± 0,5 a	4,9 ± 0,4 a	4,0 ± 0,2 a	4,7 ± 0,6 a	4,9 ± 1,2 a
	Izorametnin glukozid 1	6,1 ± 0,3 a	6,4 ± 0,8 a	6,4 ± 0,4 a	6,9 ± 0,2 a	6,1 ± 0,6 a	6,7 ± 0,2 a
	Izorametnin glukozid 2	2,4 ± 0,1 a	3,0 ± 0,3 a	2,9 ± 0,2 a	3,0 ± 0,3 a	2,7 ± 0,2 a	2,8 ± 0,1 a
	Kampferol-3glukoronid	0,8 ± 0,1 b	0,9 ± 0,2 ab	1,2 ± 0,1 a	0,8 ± 0,1 b	1,2 ± 0,2 a	0,9 ± 0,2 ab
Ukupno/Total amount		35,8 ± 3,1 nz	40,2 ± 3,6 nz	46,6 ± 3,4 nz	45,4 ± 2,0 nz	42,3 ± 3,7 nz	39,1 ± 3,0 nz
Antocijani <i>Anthocyanins</i>	Cijanidin-diheksozid	23,1 ± 3,0 b	22,7 ± 2,9 b	25,1 ± 2,8 ab	30,4 ± 2,4 a	10,0 ± 1,3 c	7,8 ± 0,8 c
	Cijanidin-3-soforozid	503,1 ± 10,5 bc	561,0 ± 34,7 ab	550,7 ± 35,3 b	654,4 ± 25,7 a	408,3 ± 30,9 d	409,7 ± 43,0 cd
	Cijanidin-3-galaktozid	5,3 ± 1,1 bc	7,6 ± 0,8 a	7,0 ± 0,8 ab	6,7 ± 0,8 ab	4,4 ± 0,5 c	4,5 ± 0,6 c
	Cijanidin-3-glukozid	160,2 ± 10,0 bc	172,7 ± 7,4 b	170,3 ± 16,8 bc	217,3 ± 12,4 a	137,4 ± 7,8 c	147,2 ± 12,3 bc
	Pelargonidin-3-soforozid	100,5 ± 6,3 bc	108,2 ± 4,6 b	106,8 ± 10,5 bc	136,3 ± 7,8 a	86,1 ± 4,9 c	92,3 ± 7,7 bc
	Pelargonidin-3-glukozid	39,6 ± 2,7c	49,3 ± 2,1 b	49,7 ± 4,4 b	59,8 ± 3,9 a	32,3 ± 4,1 c	34,1 ± 2,9 c
Ukupno/Total amount		831,8 ± 9,0 bc	921,5 ± 21,1 b	909,6 ± 68,7 b	1.104,9 ± 45,8 a	678,5 ± 48,6 d	695,6 ± 61,7 cd

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti za 4 ponavljanja ± standardna greška. Različite slovne oznake u redu, a u okviru svakog pojedinačnog jedinjenja ukazuju na statistički značajne razlike na nivou 0,05. Različite slovne oznake u okviru ukupnih vrednosti analiziranih grupa jedinjenja ukazuju na statistički značajne razlike na nivou 0,05; nz – bez značajnosti razlika. kontrola – bez tretmana; 2ProCa – sa dva tretiranja ProCa; Z – sa jednim zakidanjem izdanaka; Z + 2ProCa – sa jednim zakidanjem izdanaka i sa dva tretiranja ProCa; 2Z – sa dva zakidanja izdanaka; 2ProCa + 2GA₃ – sa dva tretiranja ProCa i neposredno zatim gibberelinskom kiselinom/Results are the means of 4 replicates ± standard error. Values in the row followed by different letters within each individual phenolic compound are significantly different at P ≤ 0.05. Values in the row followed by different letters within each group of analysed phenolic compounds are significantly different at P ≤ 0.05. ns – not significant. Control – without treatment; 2ProCa – with two applications of ProCa; R – one cane removal; R + 2ProCa – one cane removal with two applications of ProCa; 2R – two cane removals; 2ProCa + 2GA₃ – two applications of ProCa and afterwards with gibberellic acid GA₃

zida ($8,2 \text{ mg kg}^{-1}$ sv. m. pl.), kvercetin-3-vicianozida ($3,9 \text{ mg kg}^{-1}$ sv. m. pl.) i kvercetin-3-galaktozida ($4,8 \text{ mg kg}^{-1}$ sv. m. pl.) u poređenju sa ostalim tretmanima, među kojima značajnost razlika za dobijene vrednosti nije ustanovljena. Sa druge strane, samostalna primena zakidanja prvih serija mladih izdanaka, izvedena jedan put ili dva puta rezultirala je većim sadržajem kvercetin-3-glukoronida ($16,5$ i $16,4 \text{ mg kg}^{-1}$ sv. m. pl., po redosledu) u poređenju sa kontrolom i Z + 2ProCa tretmanom. Takođe je u poređenju sa kontrolnim tretmanom ($0,8 \text{ mg kg}^{-1}$ sv. m. pl.), značajno veći sadržaj kampferol-3-glukoronida ($1,2 \text{ mg kg}^{-1}$ sv. m. pl.) registrovan samo u tretmanima sa jednim i dva zakidanja prvih serija mladih izdanaka. Dobijene vrednosti sadržaja kampferola u ovom radu su niže od vrednosti koje navode Milivojević *et al.* (2011b) za sortu Willamette ($2,40 \mu\text{g g}^{-1}$ sv. m. plo.). Samostalna primena ProCa ili njegova primena u kombinaciji sa zakidanjem prvih serija mladih izdanaka nisu značajno uticale na promene sadržaja glukozida izoramnetina u odnosu na vrednosti izmerene u plodu kontrolnih biljaka. Značajnost razlika u dobijenim vrednostima sadržaja kvercetin-3-glukozida, kvercetin-3-ksilozilglukoronida i kvercetin-3-arabinopiranozida nije takođe registrovana između ispitivanih tretmana. Iako su variranja postojala i između sadržaja ukupnih flavonola u funkciji primenjenih tretmana, značajnost razlika u dobijenim vrednostima nije ustanovljena.

Identifikacija i kvantifikacija antocijana u plodu ispitivane sorte ukazuje na činjenicu da su najzastupljeniji antocijani cijanidin-3-glukozid i cijanidin-3-soforozid, dok se ostale konjugovane forme cijanidina javljaju sporadično. Tretman Z + 2ProCa je uslovio značajno veći sadržaj dominantno zastupljenih antocijana ($217,3$ i $654,4 \text{ mg kg}^{-1}$ sv. m. pl., po redosledu), dok je samostalna primena ProCa rezultirala značajno višom vrednosti cijanidin-3-galaktozida ($7,6 \text{ mg kg}^{-1}$ sv. m. pl.) u plodu ispitivane sorte u poređenju sa vrednostima registrovanim u 2Z, 2ProCa + 2GA₃ i kontrolnom tretmanu. U pogledu sadržaja identifikovanih konjugovanih formi pelargonidina, zapaža se dva do tri puta veći sadržaj pelargonidin-3-soforozida u odnosu na vrednosti pelargonidin-3-glukozida u svim ispitivanim tretmanima. Najviše vrednosti za oba jedinjenja su registrovane u Z + 2ProCa tretmanu, kao što je utvrđeno i kod cijanidin-3-soforozida i cijanidin-3-glukozida. Posmatrajući ukupne vrednosti sadržaja identifikovanih antocijana u plodu maline može se za-

paziti da je značajno viša vrednost dobijena u Z + 2ProCa tretmanu ($1104,9 \text{ mg kg}^{-1}$ sv. m. pl.) u odnosu na ostale ispitivane tretmane. Povećanje sadržaja antocijana u plodu ispitivane sorte nakon primene ProCa i zakidanja mladih izdanaka može se objasniti stvaranjem boljih svetlosnih uslova putem redukcije vegetativnog porasta i smanjenja gustine sklopa u špalirskom sistemu gajenja maline. Prema navodima Milivojević (2008), svetlost je jedan od najšire proučavanih faktora spoljašnje sredine, koji utiče na metabolizam fenolnih jedinjenja, odnosno stimuliše sintezu flavonoida, posebno antocijana i u manjem stepenu glikozida flavonola.

Zaključak

Zakidanje prve serije mladih izdanaka i primena ProCa na jednogodišnjim izdancima maline, izvedeni pojedinačno ili u kombinaciji, pozitivno su uticali na hemijske osobine plodova ispitivane sorte. Ipak, sadržaj individualnih fenolnih jedinjenja ukazuje na postojanje variranja u dobijenim vrednostima između analiziranih tretmana zavisno od proučavanog jedinjenja.

Kombinovana primena ProCa i zakidanja izdanaka uticala je na povećanje sadržaja kvercetin-diheksozida, kvercetin-3-vicianozida, kvercetin-3-galaktozida i slobodne elaginske kiseline. Takođe je uslovlila i značajno veći sadržaj antocijana: cijanidin-3-soforozida, cijanidin-3-glukozida, cijanid-diheksozida, pelargonidin-3-soforozida i pelargonidin-3-glukozida u plodu sorte maline Willamette. Sa druge strane, samostalna primena zakidanja prvih serija mladih izdanaka uslovlila je povećanje sadržaja heksozida 1 p-kumarinske i kafeinske kiseline, kvercetin-3-glukoronida i kampferol-3-glukoronida. Pojedinačna i kombinovana primena ProCa i zakidanja izdanaka uticale su na povećanje sadržaja epikatehina. Ispitivane mere nisu značajno uticale na promene u sadržaju flavonola glukozida izoramnetina, kvercetin-3-glukozida, kvercetin-3-ksilozilglukoronida, kvercetin-3-arabinopiranozida, kao i flavanola procijanidina B2 u odnosu na vrednosti izmerene u plodu kontrolnih biljaka.

Uzimajući u obzir sadržaj identifikovanih fenolnih jedinjenja u ovom eksperimentu može se konstatovati da dominantno mesto u fenolnom profilu kod sorte maline Willamette imaju antocijani i derivati elaginske kiseline, dok je kvercetin detektovan kao dominantno zastupljen flavonol u plodu ispitivane sorte.

Pojava varijabilnosti u profilu i sadržaju fenolnih jedinjenja u plodu sorte maline Willamette između analiziranih tretmana ukazuje da primenjena mera zakidanja prvih serija mladih izdanaka i hemijska regulacija bujnosti izdanaka, koji se razvijaju u sledećoj seriji, mogu značajno doprineti poboljšanju nutritivnog kvaliteta ploda maline.

Zahvalnica/Acknowledgements

Ova istraživanja su finansijski podržana od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (31–46008).

Literatura

- Anttonen, J. M., Karjalainen, R.O. (2005): Environmental and genetic variation of phenolic compounds in red raspberry. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18: 759–769
- Bešlić, Z.S., Todić, S.R., Tešević, V.V., Jadranin, M.B., Novaković, M.M., Tešić, D. (2010): Pruning effect on content of quercetin and catechin in berry skins of cv. Blaufränkisch (*Vitis vinifera* L.). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 34: 461–466.
- Cordenunsi B.R., Genovese M.I., João R.O., Hassimotto N.A., Santos R.J., Lajolo F.M. (2005): Effects of temperature on the chemical composition and antioxidant activity of three strawberry cultivars. *Food Chemistry*, 91: 113–121.
- Dragišić Maksimović J., Milivojević J., Poledica M., Nikolić M., Maksimović V. (2013): Profiling antioxidant activity of two primocane fruiting red raspberry cultivars (Autumn bliss and Polka). *Journal of Food Composition and Analysis*, 31: 173–179.
- Dwyer J.P., Bannister P., Jameson P.E. (2001): Effects of three plant growth regulators on growth, morphology, water relations, and frost resistance in lemon wood (*Pittosporum eugenioides* A.Cunn.). *New Zealand Journal of Botany*, 33: 415–424.
- Fletcher A., Gilley A., Sankhla N., Davies T. (2000): Triazoles as plant growth regulators and stress protectants. *Horticultural Reviews*, 24: 55–138.
- Häkkinen S.H., Kärenlampi S.O., Heinonen M., Mykkänen H.M., Törrönen A.R. (1999): Content of the flavonols quercetin, myricetin and kaempferol in 25 edible berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 6: 2274–2279.
- Kafkas E., Ozgen M., Ozogul Y., Turemis N. (2008): Phytochemical and fatty acid profile of selected red raspberry cultivars: a comparative study. *Journal of Food Quality*, 31: 67–8.
- Kähkönen M.P., Hopia A.I., Heinonen M. (2001): Berry phenolics and their antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 4076–4082.
- Landolt, J.S. (2011): Effects of pruning level and canopy management practices on berry maturation rate and harvest parameters of Syrah wine grapes. PhD thesis, Faculty of California Polytechnic State University, San Luis Obispo.
- Liu M., Li X.Q., Weber C., Lee C.Y., Brown J., Liu R.H. (2002): Antioxidant and antiproliferative activities of raspberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 2926–30.
- Määttä-Riihinen K.R., Kamal-Eldin A., Törrönen A.R. (2004): Identification and quantification of phenolic compounds in berries of *Fragaria* and *Rubus* species (family *Rosaceae*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 6178–6187.
- Marks S.C., 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.
- Mikulić-Petrovšek M., Slatnar A., Štampar F., Veberič R. (2012): HPLC-MSn identification and quantification of flavonol glycosides in 28 wild and cultivated berry species. *Food Chemistry*, 135: 2138–2124.
- Milivojević J., Nikolić M., Dragišić Maksimović J., Radivojević D. (2011a): Generative and fruit quality characteristics of primocane fruiting red raspberry cultivars. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 35, 3: 289–296.
- Milivojević J., Maksimović V., Nikolić M., Bogdanović J., Maletić R., Milatović D. (2011b): Chemical and antioxidant properties of cultivated and wild *Fragaria* and *Rubus* berries. *Journal of Food Quality*, 34, 1: 1–9.
- Milivojević J. (2008): Pomološka i antioksidativna svojstva plodova jagodastih vrsta voćaka. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Zemun.
- Moyer R.A., Hummer K.E., Finn C.E., Frei B., Wrolstad R.E. (2002): Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 519–525.
- Nenadić D. (1986): Uklanjanje prvih serija izdanaka – nov metod u gajenju maline. *Jugoslovensko voćarstvo*, 20, 75/76: 539–543.
- Nikolić M., Milivojević J. (2010): Jagodaste voćke – tehnologija gajenja. Naučno voćarsko društvo Srbije, Čačak.
- Owens C.L., Stover E. (1999): Vegetative growth and flowering of young apple trees in response to prohexadione-calcium. *Horticultural Science*, 34, 7: 1194–1196.
- Poledica M., Milivojević J., Radivojević D., Dragišić-Maksimović J. (2013): Effect of Prohexadione-Ca and young canes removal on physiological characteristics of leaf and fruit in raspberry cultivar ‘Willamette’. *Journal of Agricultural Sciences*, 58, 2: 127–138.
- Rademacher W. (2000): Growth retardants: effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51: 501–531.
- Ramírez H., Leza-Hernández P.C., Benavides A., Amado-Ramírez C., Martínez-Osorio A., Rivera-Cruz C.E. (2010): Prohexadione-Ca modifies content of gibberellins and vitamin C, antioxidant capacity and enzymatic activity in apple. *Acta Horticulturae*, 884: 139–144.
- Shahidi F., Naczk M. (1995): Food phenolics. Sources, chemistry, effects, applications. Lancaster, USA: Technomic Publishing Company, Inc.

PROFILE AND CONTENT OF INDIVIDUAL PHENOLIC COMPOUNDS IN RASPBERRY FRUIT (*Rubus idaeus* L.) AFFECTED BY PROHEXADIONE-Ca AND YOUNG CANES REMOVAL TREATMENT**Jasminka Milivojević, Milena Poledica, Dragan Radivojević, Mihailo Nikolić***University of Belgrade, Faculty of Agriculture, Nemanjina 6, 11080 Zemun, Serbia**E-mail: jasminka@agrif.bg.ac.rs***Abstract**

The research was designed to evaluate the effect of growth regulator Prohexadione-Ca (ProCa) and young canes removal on the profile and content of individual phenolic compounds contained in the fruit of raspberry cultivar 'Willamette' (*Rubus idaeus* L.). Studies were conducted in the period of 2010–2011 in a commercial raspberry plantation located in Tolisavac village near Krupanj. The experimental design was completely randomized and examined the influence six treatments, as follows: control – no treatment; 2ProCa – with 2 ProCa applications; R – one removal of young canes; R + 2ProCa – young cane removal with 2 ProCa applications; 2R – two removals of young canes; 2ProCa + 2GA₃ – with 2 ProCa applications, and subsequently with gibberellic acid. The first series of young canes were removed for the first time in mid-April and for the second time at the beginning of May. In 2ProCa, Z + 2ProCa and 2ProCa + 2GA₃ treatments foliar application of ProCa was carried out twice during the period of April-May in three weeks interval, i.e. when the primocane growth reached 30 cm in height. The following concentrations of ProCa: 125 ppm

(first application) and 200 ppm (second application) were applied. The application of gibberellic acid (GA₃) was carried out two times shortly after application of *Prohexadione-Ca* in a concentration of 250 ppm.

The most prominent flavonols were quercetin glycosides, whereas cyanidin-3-sophoroside and cyanidin-3-glucoside were predominant anthocyanins detected in raspberry fruit. A very high content of free ellagic acid and its derivate galolil-bis-HHDP-glucose were also detected. Removal of young canes combined with two ProCa applications expressed a positive influence on increasing of quercetin-dihexoside, quercetin-3-vicianoside, quercetin-3-galactoside and free ellagic acid content, as well as anthocyanin's content (cyanidin-3-sophoroside and cyanidin-3-glucoside) in the fruit of 'Willamette' raspberry.

Key words: raspberry, 'Willamette', chemical growth regulator, pruning, anthocyanins, flavonols, phenolic acids