

SADRŽAJ POLIFENOLA I ANTIOKSIDATIVNI KAPACITET EKSTRAKATA LISTOVA PARADAJZA ZARAŽENIH PLAMENJAČOM

Dejan Prvulović¹, Slađana Medić-Pap², Dario Danojević²,
Sonja Tančić-Živanov², Dragana Latković¹

Izvod: Plamenjača je jedan od glavnih uzroka smanjenja prinosa paradajza što može dovesti do velikih ekonomskih gubitaka. U ovom radu je ispitan biohemijski odgovor listova paradajza sorte ‘Plovdivski kasni’ na infekciju prouzročivačem plamenjače *Phytophthora infestans*. Utvrđeno je da postoji korelacija između stepena zaraženosti biljke i sadržaja ukupnih polifenola i flavonoida u listovima. Različiti sadržaj fenolnih jedinjenja je uticao i na antioksidativni kapacitet ekstrakata listova. Povećanjem stepena infekcije sadržaj rastvorljivih polifenolnih jedinjenja i antioksidativni kapacitet listova se smanjivao.

Ključne reči: antioksidantni testovi, fenoli, paradajz, plamenjača

Uvod

Paradajz (*Solanum lycopersicum* L.) je jedna od najznačajnijih povrtarskih vrsta, koristi se širom sveta u velikim količinama u svežem ili prerađenom obliku (Ray i sar., 2011). Plamenjača koju prouzrokuje *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary je glavni uzročnik smanjenja prinosa paradajza (Nowicki i sar., 2013). Razvoju i širenju bolesti pogoduje pro hladno, kišovito vreme praćeno visokom relativnom vlažnošću vazduha (Medić-Pap i sar., 2017). U takvim uslovima spoljne sredine hemijski tretmani su se pokazali kao neefikasni (Gisi i sar., 2011).

Biljke su razvile brojne odbrambene mehanizme od napada patogena. Kontakt sa patogenom dovodi do aktivacije strukturnih i hemijskih barijera koje štite organizam od daljeg prodora mikroorganizama u tkiva i organe (Lattanzio i sar., 2006). Poznato je da je prvi odgovor biljke na napad patogena brza sinteza velike količine reaktivnih kiseoničnih čestica ROS (reactive oxygen species) (Mandal i sar., 2008). ROS imaju veoma značajnu ulogu kao signalni molekuli, ali su istovremeno i vrlo reaktivni. Da bi se predupredili toksični efekti delovanja ROS biljke proizvode enzimske i neenzimske antioksidantne mehanizme odbrane koji su sposobni da uklanjaju reaktivne kiseonične čestice (Helepciuc i sar., 2014).

Polifenoli su velika klasa sekundarnih biomolekula biljaka koji imaju veoma značajnu ulogu u odbrani organizma od patogena (Freeman i Beatie, 2008). Flavonoidi, jedna od podklasa fenolnih jedinjenja, imaju važnu ulogu u otpornosti biljaka prema patogenim bakterijama i gljivama (Oszmiański i sar., 2015). Flavonoidi na različite načine mogu da zaštite biljku: da dovedu do inaktivacije enzimskih sistema kod

¹Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Trg Dositeja Obradovića 8, Novi Sad, Srbija (dejanp@polj.uns.ac.rs);

²Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Maksima Gorkog 30, 21000 Novi Sad, Srbija;

patogena ili da formiraju kristalne structure u biljnom tkivu koje će sprečiti dalji prodor patogena (Skadhauge i sar., 1997). Polifenolna jedinjenja su efikasni antioksidansi, sposobni da neutrališu slobodne kiseonične radikale koje proizvode patogeni i/ili biljka (Dai i sar., 1996).

Cilj ovog rada je bio da se ispita uticaj stepena zaraženosti listova plamenjačom na sadržaj polifenolnih jedinjenja i antioksidativni kapacitet listova paradajza sorte Plovdivski kasni.

Materijal i metode rada

Listovi paradajza sorte 'Plovdivski kasni' za biohemijsku analizu uzorkovani su u fazi plodonošenja iz poljskog ogleđa na lokalitetu Rimski Šančevi. Uzeto je po slučajnom izboru ukupno 30 (10 po ponavljanju) potpuno razvijenih vrših listova sa različitim biljaka. Intenzitet prirodne zaraze listova plamenjačom ocenjen je po modifikovanoj EPPO skali: 0-bez simptoma, 1-manje od 5% površine lista sa simptomima 2-5-10% površine lista sa simptomima 3-10-25% površine lista sa simptomima 4- 25-50% površine lista sa simptomima 5- plamenjača prekriva više od 50% lisne površine. Nakon ocene listovi su grupisani na osnovu intenziteta oboljenja i urađena je biohemijska analiza.

Suvi biljni materijal (200 mg) je samleven u mlinu do finog praha i ekstrahovan sa 50 mL 70% rastvora acetona u toku 24 časa. Nakon centrifugiranja na 5000 obrtaja min⁻¹ u toku 10 minuta, supernatant je prenet u obeležene kivete i čuvan u frižideru za dalje biohemijske analize.

Sadržaj ukupnih polifenola (UP) je određen kolorimetrijskom metodom pomoću Folin-Ciocalteu reagensa (Nagavani i Raghava Rao, 2010). Koncentracija ukupnih flavonoida (UF) u biljnom materijala je izmeren spektrofotometrijski pomoću rastvora AlCl₃ (Saha i sar., 2013). Sadržaj UP i UF u acetonskim ekstraktima lista paradajza je izražen u miligram-ekvivalentima kvercetina u gramu suvog biljnog materijala (mg QE/g SM). Antioksidativni kapacitet ekstrakata lista paradajza je izmeren sa šest različitih spektrofotometrijskih testova. Sposobnost uklanjanja DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikala je izmerena po metodi koju su opisali Lai i Lim (2011). Ukupna antioksidativna aktivnost (UAA) je određena fosfomolibdenskom metodom (Kalaskar i Surana, 2014). Metodom po Saha i sar. (2013) je određen ukupni redukcionni kapacitet (URK) acetonskih ekstrakata. Rezultati FRAP (ferric-reducing antioxidant power) testa su dobijeni metodom opisanom u radu Valentão i sar. (2002). Sposobnost uklanjanja molekula ABTS (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) je određena po metodi Miller i sar. (1993). Rezultati testova antioksidativne aktivnosti su izraženi u miligram-ekvivalentima troloksa u gramu suvog biljnog materijala (mg trolox/g SM). Sposobnost inhibicije formiranja superoksid radikala ekstrakata je izmerena preko NBT (nitro blue tetrazolium) testa i izražena u % inhibicije (Kalaskar i Surana, 2014). Merenja su urađena u tri ponavljanja

Dobijeni rezultati biohemijskih parametara su obrađeni u statističkom programu STATISTICA ver. 12 (StatSoft, Inc., USA) primenom analize varijanse i poređenjem srednjih vrednosti putem Bonferoni testa ($P < 0,05$). Koeficijenti korelacija su izračunati prema Spearman-u.

Rezultati istraživanja i diskusija

Sadržaj ukupnih polifenola opada sa povećanjem zaraženosti lisne površine plamenjačom (Tabela 1). Pri čemu je najveća razlika u sadržaju ukupnih polifenola između listova bez prisustva simptoma i listova na kojima plamenjača prekriva manje od 5% površine lista. U sadržaju ukupnih flavonoida nema značajne razlike između listova bez simptoma i listova sa intenzitetom infekcije do 10% (Tabela 1). Pri povećanju zaraženosti listova iznad 10% sadržaj UF opada.

Tabela 1. Sadržaj polifenola i antioksidativna aktivnost ekstrakata lista paradajza
 Table 1. Polyphenolic content and antioxidant activity of tomato leaves extracts

Parametar <i>Parameter</i>	Stere infekcije <i>Infection rate</i>				
	0	1	2	3	4
Ukupni polifenoli (UP) <i>Total polyphenolics (TP)</i>	52,27 ± 0,797	50,81 ± 1,262	52,12 ± 1,031	41,99 ± 0,398	33,89 ± 0,793
Ukupni flavonoidi (UF) <i>Total flavonoids (TF)</i>	35,64 ± 0,349	20,23 ± 0,737	14,81 ± 0,149	15,47 ± 0,129	8,47 ± 0,165
DPPH test <i>DPPH test</i>	4,41 ± 0,121	3,76 ± 0,292	2,80 ± 0,196	2,41 ± 0,239	1,38 ± 0,078
ABTS test <i>ABTS test</i>	1,57 ± 0,006	1,50 ± 0,039	1,31 ± 0,049	1,33 ± 0,017	1,22 ± 0,059
FRAP test <i>FRAP test</i>	6,62 ± 0,181	4,98 ± 0,189	3,64 ± 0,083	3,42 ± 0,115	2,54 ± 0,117
NBT test <i>NBT test</i>	55,81 ± 1,030	52,96 ± 1,151	52,05 ± 0,992	43,22 ± 0,358	35,77 ± 0,669
Ukupni redukcion kapacitet (URK) <i>Total reduction capacity (TRC)</i>	8,95 ± 0,245	9,13 ± 0,181	9,34 ± 0,183	8,90 ± 0,092	7,20 ± 0,161
Ukupna antioksidativna aktivnost (UAA) <i>Total antioxidant activity (TAA)</i>	53,77 ± 2,431	57,463 ± 1,413	61,03 ± 2,491	59,51 ± 0,467	50,31 ± 1,229

¹mg QE/g SM ²mg trolox/g SM ³%

Pri porastu zaraženosti listova od 0 do 25% nije ustanovljena značajna razlika u vrednostima URK. Međutim uočava se značajan pad URK kada zaraženost lista dostigne 25-50% (Tabela 1). Ukupna antioksidativna aktivnost raste sa povećanjem zaražene površine listova, ali opada kada ta zaraženost pređe 25% (Tabela 1).

Dobijeni rezultati ukazuju da se biljka u početnim fazama infekcije brani akumulacijom UK i UF i povećanjem antioksidativne aktivnosti. Što je u saglasnosti sa Nowicki et al., (2012). koji ukazuju na to da su fenolna jedinjenja uključena u primarnu liniju odbrane biljaka paradajza pri napadu *P. infestans*.

Visoko značajna negativna korelacija utvrđena je između intenziteta oboljenja listova i sadržaja ukupnih fenola, ukupnih flavonoida, DPPH, ABTS, FRAP i NBT testa (Tabela 2.). Dok su ovi biohemijski parametri međusobno u pozitivnoj korelaciji.

Tabela 1. Korelacija između biohemijskih parametara i intenziteta zaraženosti lista
 Table 1. Correlation between biochemical parameters and leaf infection intensity

Parametar <i>Parameter</i>	UP	UF	DPPH	ABTS	FRAP	NBT	URK	UAA
Intenzitet oboljenja/ <i>Disease severity</i>	-0,80**	-0,88**	-0,97**	-0,89**	-0,98**	-0,95**	-0,51	-0,03
UP ¹ /TP ¹		0,55	0,83**	0,69**	0,85**	0,86**	0,59*	0,36
UF ¹ /TF ¹			0,88**	0,92**	0,86**	0,80**	0,30	-0,04
DPPH ² /DPPH ²				0,92**	0,99**	0,91**	0,45	0,05
ABTS ² /ABTS ²					0,91**	0,85**	0,23	-0,01
FRAP ² /FRAP ²						0,95**	0,48	0,06
NBT ³ /NBT ³							0,50	0,11
URK ² /TRC ³								0,63*

*značajno na nivou 5% ** značajno na nivou 1%

Zaključak

Rezultati prikazani u ovom radu ukazuju na negativnu korelaciju između sadržaja polifenolnih jedinjenja, antioksidativnog kapaciteta i stepena infekcije listova paradajza sorte 'Plovdivski kasni' sa *P. infestans*. Povećanjem intenziteta zaraženosti listova paradajza ove sorte smanjuje se biosinteza polifenolnih jedinjenja što za posledicu ima niži kapacitet antioksidativne zaštite.

Napomena

Istraživanja u ovom radu deo su projekta TR-31030 „Stvaranje sorata i hibrida povrća za gajenje na otvorenom polju i zaštićenom prostoru“ koji finansira [Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije](#).

Literatura

- Dai G.H., Nicole M., Andary C., Martinez C., Bresson E., Boher B., Daniel J.F., Geiger J.P. 1996. Flavonoids accumulate in cell walls, middle lamellae and callose-rich papillae during an incompatible interaction between *Xanthomonas campestris* pv. *Malvacearum* and cotton. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 49,285-306.
- Freeman B.C., Beattie G.A. 2008. An overview of plant defences against Pathogens and Herbivores. *The Plant Health Instructor*, DOI: 10.1094/PHI-I-2008-0226-01
- Gisi U., Walder F., Resheat-Eini Z., Edel D., Sierotzki H. 2011. Changes of genotype, sensitivity and aggressiveness in *Phytophthora infestans* isolates collected in European countries in 1997, 2006 and 2007. *Journal of Phytopathology* 159, 223-232.

- Halepciuc F., Mitoi M., Manole-Păunescua A., Aldea F., Brezeanua A., Cornea C. 2014. Induction of plant antioxidant system by interaction by beneficial and/or pathogenic microorganisms. *Romanian Biotechnological Letters*, 19 (3),9366-9375.
- Kalaskar M.G., Surana S.J. 2014. Free radical scavenging, immunomodulatory activity and chemical composition of *Luffa acutangula* var. *Amara* (*Cucurbitaceae*) pericarp. *Journal of Chilean Chemical Society*, 59 (1), 2299-2302.
- Lai H.Y., Lim Y.Y. 2011. Evaluation of antioxidant activities of the methanolic extracts of selected ferns in Malaysia. *International Journal of Environmental Science Development*, 2, (6), 442-447.
- Lattanzio V., Lattanzio V.M.T., Cardinali A. 2006. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plant against fungal pathogens and insects. *Phytochemistry: Advances in Research* (ed. Filippo Imperato). Research Signpost, Kerala, India, pp: 23-67.
- Mandal S., Mitra A., Mallick N. 2008. Biochemical characterization of oxidative burst during interaction between *Solanum lycopersicum* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 72, 56-61.
- Medić-Pap S., Danojević D., Takač A., Maširević S., Červenski J., Popović V. 2017. Preliminary results of resistance of tomato accessions to late blight (*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary). *Ratarstvo i povrtarstvo* 54 (3), 87-92.
- Miller N.J., Rice-Evans C.A., Davies M.J., Gopinathan V., Milner A. 1993. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*, 84,407-412.
- Nagavani Dai, G.H.; Nicole, M.; Andary, C.; Martinez, C.; Bresson, E.; Boher, B.; Daniel, J.F.; Geiger, J.P. Flavonoids accumulate in cell walls, middle lamellae and callose-rich papillae during an incompatible interaction between *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* and cotton. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, Raghava Rao T. 2010. Evaluation of antioxidant potential and identification of polyphenols by RP-HPLC in *Michelia champaca* flowers. *Advances in Biological Research*, 4 (3),159-168.
- Nowicki M., Foolad M., Nowakowska M., Kozik E. 2012. [Potato and Tomato Late Blight Caused by *Phytophthora infestans*: An Overview of Pathology and Resistance Breeding](#) *Plant Disease* 96, 1, 4-17.
- Nowicki M., Kozik E.U., Foolad M.R. 2013. Late blight of tomato. In: Varshney RK, Tuberosa R, editors. *Translational genomics for crop breeding*: John Wiley & Sons Ltd. pp. 241–265.
- Oszmiański J., Kolniak-Ostek J., Biernat A. 2015. The content of phenolic compounds in leaf tissues of *Aesculusglabra* and *Aesculusparviflora* Walt. *Molecules*, 20, 2176-2189.
- Ray R.C., El Sheikha A.F., Panda S.H., Montet, D. 2011. Anti-oxidant properties and other functional attributes of tomato: An overview. *International Journal of Food and Fermentation Technology*. 1,139-148.
- Saha A.K., Rahman Md.R., Shahriar M., Saha S.K., Al Azad N., Das S. 2013. Screening of six Ayurvedic medicinal plant extracts for antioxidant and cytotoxic activity. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2 (2),181-188.

- Skadhauge B., Thomsen K., von Wettstein D., 1997. The role of barley testa layer and its flavonoid content in resistance to *Fusarium* infections. *Hereditas*, 126,147-160.
- Valentão P., Fernandes E. Carvalho F., Andrade P.B., Seabra R.M. Bastos M.L. 2002. Antioxidative properties of cardoon (*Cynara cardunculis* L.) infusion against superoxide radical, hydroxyl radical, and hypochlorous acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (17), 4989-4993.

POLYPHENOLIC CONTENT AND ANTIOXIDANT CAPACITY OF TOMATO LEAVES EXTRACTS INFECTED WITH LATE BLIGHT

*Dejan Prvulović¹, Slađana Medić-Pap², Dario Danojević²,
Sonja Tančić-Živanov²*

Abstract

Late blight is one of the main causes of the tomato yield losses. In this paper, the biochemical response of tomato variety Plovdivski kasni in leaves infected with *Phytophthora infestans* was analyzed. It was found that there is a correlation between the degree of disease severity and the content of total polyphenols and flavonoids in the leaves. The different content of phenolic compounds also affected the antioxidant capacity of leaf extracts. By increasing the degree of infection, the content of the soluble polyphenolic compounds and the antioxidant capacity of the leaves decreased.

Key words: antioxidant activity, late blight, polyphenolics, tomato

¹University of Novi Sad, Faculty of Agriculture, Trg Dositeja Obradovića 8, 21000 Novi Sad, Serbia (dejanp@polj.uns.ac.rs);

²Institut of Field and Vegetable Crops, Maksima Gorkog 30, 21000 Novi Sad, Serbia;