



UNIVERZITET U NOVOM SADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET
AGRONOMIJA



**Fitohemijska analiza i antioksidantni kapacitet
plodova trešnje inficiranih gljivom *Monilinia laxa*
Aderh. i Ruhl.**

- Doktorska disertacija -

Mentor: prof. dr Đorđe Malenčić

Kandidat: Boško Borković, dipl. inž. - master

Novi Sad, 2018. godine

ZAHVALNICA

*Neizmerno se zahvaljujem mentoru **prof. dr Đorđu Malenčiću** na velikoj podršci, strpljenju i razumevanju tokom izrade disertacije.*

***Dr Biljani Kiprovske** se zahvaljujem na velikom i nesebičnom zalaganju tokom celokupnog perioda doktorskih studija i izrade disertacije kako bi ona dobila poseban oblik.*

***Prof. dr Veri Stojšin** dugujem zahvalnost za angažovanje i izdvojeno vreme oko izrade fitopatološkog dela kao i na korisnim smernicama u izradi celokupne disertacije.*

*Zahvalnost dugujem i **prof. dr Dejanu Prvuloviću** i **doc. dr Mirjani Ljubojević** na korisnim sugestijama tokom pisanja disertacije.*

*Zahvaljujem se laborantima sa predmeta hemija i biohemija **Gabrijeli Kšan, Ani Kuzmanović** i **Jeleni Savić** na pomoći oko eksperimentalnog dela disertacije.*

*Veliku zahvalnost dugujem kolegama sa Departmana za fitomedicinu i zaštitu životne sredine **dr Renati Iličić** i **dr Mili Grahovac** na smernicama i pomoći oko izrade fitopatološkog dela disertacije, laborantu **Zoranu Bogdanoviću** kao i kolegini **dr Jovani Hrustić** sa Instituta za pesticide i zaštitu životne sredine iz Beograda na korisnim sugestijama.*

Hvala porodici, prijateljima i kolegama na podršci, ljubavi i razumevanju.

UNIVERZITET U NOVOM SADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	dipl. inž. - master Boško Borković
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Prof. dr Đorđe Malenčić, Redovni profesor, Poljoprivredni fakultet Novi Sad
Naslov rada: NR	Fitohemijska analiza i antioksidantni kapacitet plodova trešnje inficiranih gljivom <i>Monilinia laxa</i> Aderh. i Ruhl.
Jezik publikacije: JP	Srpski (latinica)
Jezik izvoda: JI	srp. / eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	AP Vojvodina
Godina: GO	2018
Izdavač: IZ	Autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Poljoprivredni fakultet, Trg Dositeja Obradovića 8 21000 Novi Sad, Departman za ratarstvo i povrtarstvo

Fizički opis rada: FO	(broj poglavlja / stranica / slika / grafikona / tabela/ referenci / priloga) 8 poglavlja/ 120 strana/ 16 slika/ 20 grafikona/ 18 tabela/ 272 reference
Naučna oblast: NO	Biotehničke nauke
Naučna disciplina: ND	Agronomija, Biotehnologija, Hemija i biohemija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	sorte trešnje, mrka trulež, primarni, sekundarni biomolekuli, enzimaska aktivnost, antioksidanti kapacitet
UDK	
Čuva se: ČU	Poljoprivredni fakultet, Trg Dositeja Obradovića 8, 21000 Novi Sad
Važna napomena: VN	Nema
Izvod: IZ	<p>Mrka trulež, čiji je prouzrokovatelj <i>Monilinia laxa</i>, spada u najčešće i najznačajnije bolesti ploda koštičavih voćaka, naročito trešnje. Cilj ovog rada je bio da se utvrde razlike u reakciji devet sorti plodova trešnje (različitih pomoloških osobina) prema mrkoj truleži, uzorkovanih sa oglednog dobra Departmana za voćarstvo i vinogradarstvo, Poljoprivredni fakultet Novi Sad na Rimskim Šančevima (koordinate: 45°20'N, 19°51'E). S obzirom da se u prirodnim uslovima plod trešnje može zaraziti od strane više patogena, biohemijski parametri su analizirani i na veštački inokulisanim plodovima. Ispitivane sorte su pokazale značajne razlike u pojavi oboljenja na plodu, kako u uslovima veštačke inokulacije, tako i u prirodnoj infekciji. U oba slučaja kod sorti su zabeležene različite ocene intenziteta zaraze, zavisno od sortimenta. Biohemijskom analizom plodova zabeležene su značajne razlike u sadržaju rastvorljivih proteina (SP), aktivnosti supereksid dismutaze (SOD), aktivnosti gvajakol peroksidaze (GPx), aktivnost pirogalol peroksidaze (PPx), lipidnoj peroksidaciji (LP). Utvrđene su značajne razlike u sadržaju šećera, organskih kiselinih i sekundarnih metabolita (fenoli, tanini, proantocijanidini, flavonoidi, antocijanini). Takođe rezultati su pokazali razlike u antioksidantnoj aktivnosti (DPPH, FRAP, ABTS i TRC testovi). Na sadržaj sekundarnih biomolekula kao i na antioksidantnu aktivnost uticali su sorta, intenzitet zaraze ploda, kao i interakcija između ova dva faktora. Većina ispitivanih sorti je pokazala visok sadržaj polifenolnih komponenti, dok je u uslovima infekcije,</p>

sadržaj ovih parametara bio značajno niži. Na osnovu dobijenih rezultata, sadržaj sekundarnih metabolita se može koristiti kao jedan od parametara u oceni otpornosti sorti trešnje prema mrkoj truleži.	
Datum prihvatanja teme od strane NN veća: DP	08. 02. 2017.
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO	predsednik: dr Vera Stojšin, redovni profesor, Poljoprivredni fakultet Novi Sad <hr/> član: dr Đorđe Malenčić, redovni profesor, Poljoprivredni fakultet Novi Sad – mentor <hr/> član: dr Dejan Prvulović, vanredni profesor, Poljoprivredni fakultet Novi Sad <hr/> član: dr Mirjana Ljubojević, docent, Poljoprivredni fakultet Novi Sad <hr/> član: dr Biljana Kiprovska, naučni saradnik, Naučni institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad <hr/>

UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF AGRICULTURE
KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD Thesis
Author: AU	Boško Borković, <i>MSc</i>
Mentor: MN	Đorđe Malenčić, Full Professor Faculty of Agriculture Novi Sad
Title: TI	Phytochemical analysis and antioxidant capacity of sweet cherry fruits infected with <i>Monilinia laxa</i> Aderh. and Ruhl.
Language of text: LT	Serbian (Latin letter)
Language of abstract: LA	Serbian / English
Country of publication: CP	Serbia
Locality of publication: LP	AP Vojvodina
Publication year: PY	2018
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	Faculty of Agriculture Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 8 21000 Novi Sad Department of Field and Vegetable Crops
Physical description: PD	8 chapters/ 120 pages/ 16 figures/ 20 graphs/ 18 tables/ 272 references/
Scientific field SF	Biotechnical Sciences

Scientific discipline SD	Agronomy, Biotechnology, Chemistry and Biochemistry
Subject, Key words SKW	sweet cherry cultivars, brown rot, primary and secondary biomolecules, enzymatic activity, antioxidant capacity
UC	
Holding data: HD	Faculty of Agriculture, Trg Dositeja Obradovića 8, 21000 Novi Sad
Note: N	No
Abstract: AB	<p><i>Monilinia laxa</i> Aderh. i Ruhl. is the predominant causal agent of brown rot disease of stone fruit orchards, especially sweet cherries (<i>Prunus avium</i> L.). The objective of this study was to identify and screen reaction in response of nine cherry genotypes, with different pomological properties, against brown rot. These genotypes were harvested at commercial maturity from Orchard Rimski Šančevi, belonging to the Department of Fruit Science and Viticulture of the Faculty of Agriculture in Novi Sad (coordinates: 45°20'N, 19°51'E). Given the fact that sweet cherry fruits are prone to infection by a number of pathogens in the field, biochemical parameters were analysed on artificially inoculated fruits, as well. The cultivars studied showed significant differences in terms of the occurrence of disease on fruits, both under artificial inoculation and infection in the field. In both cases different varieties of infection intensity were recorded, depending on the cultivar. Changes in terms of soluble proteins (SP), enzyme actativity: superoxid dismutase activity (SOD), guaiacol peroxidase activity (GPx) and pyrogallol peroxidase activity (PPx) was recorded. Biochemical analysis of fruits suggested significant differences in contents of primary metabolites (sugars, organic acids) and secondary metabolites (phenols, tannins, proanthocyanidins, flavonoids, anthocyanins). Antioxidant activity were also tested (DPPH, FRAP, ABTS i TRC assays). The differences in the chemical composition were influenced by several factors. There were cultivars specificities and intensity of infection, as well as the interaction of the two that induced differences. The majority of the genotypes examined showed high polyphenolics content, while under the infection, the content was significantly lower. Based on the results obtained, the secondary metabolites content can be used as one of the parameters for evaluating the resistance of sweet cherry cultivars to brown</p>

rot.	
Accepted on Scientific Board on: AS	08. 02. 2017.
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	<p>president: Dr Vera Stojšin, Full Professor Faculty of Agriculture, Novi Sad</p> <hr/> <p>member: Dr Đorđe Malenčić, Full Professor Faculty of Agriculture Novi Sad – mentor</p> <hr/> <p>member: Dr Dejan Prvulović, Associate Professor Faculty of Agriculture Novi Sad</p> <hr/> <p>member: Dr Mirjana Ljubojević, Assistant Professor, Faculty of Agriculture Novi Sad</p> <hr/> <p>member: Dr Biljana Kiprovska, Research Associate, Institute of Field and Vegetable Crops, Novi Sad</p> <hr/>

SADRŽAJ

1. UVOD	5
2. PREGLED LITERATURE	9
2. 1. Rasprostranjenost i značaj trešnje u voćarskoj proizvodnji	9
2. 2. Sistematsko mesto i klasifikacija sorti trešnje.....	10
2. 3. Biljka i patogen	12
2. 3. 1. Reakcija biljke na prisustvo patogena	12
2. 3. 2. Fitopatogeni trešnje	15
2. 3. 2. 1. Mrka trulež plodova trešnje	17
2. 4. Hemijski sastav ploda trešnje.....	19
2. 4. 1. Antioksidantni enzimi.....	23
2. 4. 1. 1. Peroksidaze	23
2. 4. 1. 2. Superoksid-dismutaze (SOD)	24
2. 4. 1. 3. Katalaza.....	24
2. 4. 2. Organske kiseline i ugljeni hidrati	25
2. 4. 3. Polifenoli	26
2. 4. 3. 1. Flavonoidi	28
2. 4. 3. 2. Fenolne kiseline	30
2. 4. 3. 3. Tanini	32
3. CILJ ISTRAŽIVANJA	34
4. RADNA HIPOTEZA	36
5. MATERIJAL I METODE	37
5. 1. Biljni materijal.....	37
5. 2. Plan ogleda	38
5. 3. Fitopatološka istraživanja.....	38
5. 3. 1. Izolacija gljive i veštačka inokulacija (provera patogenosti)	39
5. 3. 2. Dobijanje čistih kultura monosporijalnih izolata.....	39
5. 3. 3. Karakteristike patogena <i>Monilinia laxa</i>	40
5. 3. 4. Ocene intenziteta zaraze	41
5. 4. Biohemijski pokazatelji analiziranih plodova trešnje na infekciju patogenom <i>Monilinia laxa</i>	41

5. 4. 1. Određivanje sadržaja proteina i aktivnosti antioksidantnih enzima u plodovima trešnje.....	42
5. 4. 1. 1. Priprema ekstrakata za određivanje proteina i enzima	42
5. 4. 1. 2. Određivanje sadržaja proteina.....	42
5. 4. 1. 3. Određivanje aktivnosti superoksid-dismutaze (SOD)	43
5. 4. 1. 4. Određivanje aktivnosti gvajakol peroksidaze (GPx)	44
5. 4. 1. 5. Određivanje aktivnosti pirogalol peroksidaze (PPx)	44
5. 4. 1. 6. Intenzitet lipidne peroksidacije	45
5. 4. 2. Određivanje sadržaja šećera i organskih kiselina u plodovima trešnje	46
5. 4. 3. Određivanje sadržaja polifenola u plodovima trešnje	47
5. 4. 3. 1. Priprema ekstrakata za spektrofotometrijsko određivanje polifenola i antioksidantnih testova.....	47
5. 4. 3. 2. Određivanje sadržaja ukupnih fenola.....	47
5. 4. 3. 3. Određivanje sadržaja ukupnih tanina.....	48
5. 4. 3. 4. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida	49
5. 4. 3. 5. Određivanje sadržaja kondenzovanih tanina (proantocijanidina).....	50
5. 4. 3. 6. Određivanje sadržaja ukupnih antocijanina	50
5. 4. 3. 7. Određivanje sadržaja polifenolnih komponenti	51
5. 4. 4. Određivanje antioksidantnog kapaciteta ekstrakata plodova trešnje.....	52
5. 4. 4. 1. Određivanje neutralizacije DPPH ⁻ radikala	52
5. 4. 4. 2. Ispitivanje redukcione sposobnosti ekstrakata FRAP metodom.....	53
5. 4. 4. 3. Ispitivanje ukupne redukcione moći ekstrakata (TRC test).....	54
5. 4. 4. 4. Ispitivanje sposobnosti neutralizacije ABTS ^{•+} radikala	55
5. 5. Statistička obrada podataka.....	56
6. REZULTATI I DISKUSIJA	57
6. 1. Fitopatološka istraživanja.....	57
6. 1. 1. Simptomi mrke truleži (<i>Monilinia laxa</i>).....	57
6. 1. 2. Provera patogenosti	57
6. 1. 3. Karakteristike patogena <i>Monilinia laxa</i>	58
6. 1. 4. Ocene intenziteta zaraze	61
6. 1. 4. 1. Ocene intenziteta zaraze u prirodnoj infekciji	61

6. 1. 4. 2. Ocene intenziteta zaraze u uslovima veštačke inokulacije	62
6. 2. Biohemijški pokazatelji odgovora plodova trešnje na infekciju patogenom <i>M. laxa</i>	63
6. 2. 1. Fitohemijška analiza enzimskih antioksidanata i intenzitet lipidne peroksidacije	63
6. 2. 1. 1. Sadržaj rastvorljivih proteina u plodovima trešnje	63
6. 2. 1. 2. Aktivnost antioksidantnih enzima u plodovima trešnje.....	64
6. 2. 1. 2. 1. Aktivnost pirogolol peroksidaze (PPx) u plodovima trešnje	64
6. 2. 1. 2. 2. Aktivnost gvajakol peroksidaze (GPx) u plodovima trešnje	65
6. 2. 1. 2. 3. Aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u plodovima trešnje.....	66
6. 2. 1. 3. Intenzitet lipidne peroksidacije u plodovima trešnje	68
6. 2. 1. 4. Analiza varijanse enzimskih antioksidanata i intenziteta lipidne peroksidacije	69
6. 2. 2. HPLC analiza sadržaja primarnih metabolita u plodovima trešnje	70
6. 2. 2. 1. Sadržaj šećera u plodovima trešnje.....	70
6. 2. 2. 2. Sadržaj organskih kiselina u plodovima trešnje	72
6. 2. 3. Fitohemijška analiza sekundarnih metabolita.....	75
6. 2. 3. 1. Sadržaj ukupnih fenola u plodovima trešnje.....	75
6. 2. 3. 2. Sadržaj ukupnih tanina u plodovima trešnje.....	77
6. 2. 3. 3. Sadržaj ukupnih flavonoida u plodovima trešnje.....	79
6. 2. 3. 4. Sadržaj ukupnih antocijanina u plodovima trešnje	81
6. 2. 3. 5. Sadržaj proantocijanidina u plodovima trešnje.....	82
6. 2. 3. 6. Analiza varijanse polifenolnih komponenti	84
6. 2. 3. 7. HPLC analiza sadržaja sekundarnih metabolita u plodovima trešnje.....	85
6. 2. 3. 7. 1. Sadržaj hidrokscimetnih kiselina u plodovima trešnje.....	86
6. 2. 3. 7. 2. Sadržaj flavanona u plodovima trešnje.....	88
6. 2. 3. 7. 3. Sadržaj flavanola u plodovima trešnje.....	88
6. 2. 3. 7. 4. Sadržaj flavona u plodovima trešnje.....	89
6. 2. 3. 7. 5. Sadržaj flavonola u plodovima trešnje.....	90
6. 2. 3. 7. 6. Sadržaj antocijanina u plodovima trešnje.....	91
6. 2. 3. 7. 7. Sadržaj cijanogenih glikozida (amigdalina) u plodovima trešnje	93
6. 2. 4. Antioksidantni kapacitet plodova trešnje	94
6. 2. 4. 1. Ispitivanje neutralizacije DPPH - radikala.....	94
6. 2. 4. 2. Ispitivanje redukcionne sposobnosti ekstrakata FRAP metodom.....	95

6. 2. 4. 3. Ispitivanje redukcione sposobnosti ekstrakata TRC metodom	96
6. 2. 4. 4. Ispitivanje sposobnosti neutralizacije ABTS ^{•+} radikala	97
6. 2. 4. 5. Analiza varijanse antioksidantnih testova.....	98
6. 2. 4. 6. Korelacije između antioksidanata i antioksidantnih testova.....	99
7. ZAKLJUČAK	101
8. LITERATURA.....	103
9. BIOGRAFIJA	120

1. UVOD

Voćarstvo spada u jednu od najznačajnijih grana poljoprivrede u našoj zemlji, koja se prostire na relativno malom prostoru u odnosu na druge poljoprivredne delatnosti (ratarstvo i povrtarstvo). Rezultati popisa poljoprivrede iz 2012. g. ukazuje na to da voćnjaci u Srbiji zauzimaju 163.310 ha (bez jagode), odnosno 4,8% površina ukupnog poljoprivrednog zemljišta (Republički zavod za statistiku, 2012), što je mali udeo s obzirom da se Srbija nalazi u klimatskom pojasu u kome preovladavaju povoljni zemljišni uslovi za gajenje voćaka.

Proizvodnja voća, kao delatnost poljoprivrede doprinosi razvoju i drugih industrijskih grana, kao što su farmaceutska, prerađivačka, hemijska, kao i razvoju uslužnih delatnosti poput transporta, trgovine i turizma (Nikolić i sar., 2012). Gajenje voćaka zahteva angažovanje velikog broja radne snage, što kod nekih voćnih vrsta značajno može da poveća rashode u proizvodnji. Veće površine pod voćem koje se gaji na nagnutim terenima može sprečiti eroziju zemljišta i pospešiti mikroklimu. Voćarstvo daje važan doprinos u ishrani stanovništva jedne zemlje jer je voće hrana izrazite nutritivne vrednosti. Ono sadrži različita jedinjenja veoma važna za održavanje zdravlja ljudi. Polen i nektar voćaka u znatnom obimu koriste i pčele u svojoj ishrani, čime se neposredno utiče na bolje oprašivanje i dobijanje meda (Nikolić i sar., 2012). Pored toga što se koristi u svežem stanju, ujedno je i značajna sirovina za dobijanje različitih prerađevina. Za preradu se često, pored plodova, koristi i drvo voćaka (Ninkovski, 1998; Beker i sar., 2010; Angin, 2014).

U odnosu na druge biljne vrste, u proizvodnji voća u Srbiji, trešnja se u Srbiji nalazi na osmom mestu sa učešćem od 2,7%. Ukupne površine, prinos, kao i prinos po stablu svake godine rastu značajno. U Srbiji u periodu 2005-2008. ukupna proizvodnja se povećala sa 20.000 na 30.000 t, a prosečni prinos sa 10,7 na 16 kg/stablu (Ognjanov i sar., 2011). Trešnja se u Srbiji gaji na 3,7 hiljada hektara, a više od četvrtine ukupnih površina nalaze se u opštini Grocka. Nikolić, (2018) je došla do rezultata da proizvodnja trešnje ima izražene oscilacije po godinama, što čini 1,7% ukupne proizvodnje analiziranog voća u Srbiji i svrstava je na deveto mesto u ukupnoj proizvodnji voća.

Trešnja je deficitarna voćna vrsta, koja na tržištu postiže visoku cenu. Republika Srbija ima povoljne uslove (klimatske i zemljišne) za gajenje ove voćne vrste, stoga je važno povećati i

unaprediti proizvodnju uvođenjem savremene tehnologije (Mišić, 2002; Nikolić, 2000). Zasadi u našoj zemlji su uglavnom ekstenzivnog tipa, sa sortimentom koji već dugo nije bitnije osavremenjavan.

Proizvodnju trešnje u intenzivnoj proizvodnji “ograničava” veliki broj bolesti i štetočina. Razvijajući se u zajedničkom ekosistemu sa svojim parazitima i raznim drugim prouzrokovateljima oštećenja, biljke su tokom evolucije izgrađivale svoje odbrambene sisteme sa kojima su se uspešno suprotstavljale dejstvu svih nepogodnih spoljnih činilaca. Pošto su „nepokretne“, biljke ne mogu napadati druge organizme, one se mogu samo braniti, pa su zato svi njihovi mehanizmi odbrane defanzivne prirode (Cowling i Horsfall, 1980).

Sve biljne vrste napadaju različite bolesti u koje spadaju: gljive, bakterije, virusi, fitoplazme. Od svih fitopatogenih organizama najrasprostranjenije su gljive koje prouzrokuju mikoze. Najznačajnije mikoze koštičavih voćaka su: *Blumeriella jaapii* (ospičavost lišća), *Monilinia spp.* (trulež ploda, sušenje grana i cvetova), *Stigmia carpophila* (rešetavost lišća), (Miletić i Tamaš, 2011).

Simptome koje izazivaju vrste roda *Monilinia spp.* manifestuju se sušenjem grana i grančica, a kasnije i truleži plodova (Balaž i sar., 2012; Holb, 2003). Na svim koštičavim voćkama, u kišnim godinama praćenim visokim temperaturama i visokom vlažnošću vazduha, *Monilinia spp.* mogu naneti značajne gubitke u proizvodnji. Simptomi oboljenja se ispoljavaju na cvetovima, mladarcima, grančicama i plodovima. Inficirani cvetovi dobijaju mrku boju, suše se i opadaju. Sa inficiranih cvetova zaraza prelazi na letoraste koje može prstenasto da zahvati. Iznad zahvaćenog dela dolazi do njihovog sušenja (Jones i Sutton, 1996). Plodovi koštičavih vrsta voćaka mogu biti zaraženi u svim fazama razvoja, od zametanja do pune zrelosti. Međutim, zeleni plodovi znatno su otporniji od plodova u fazi dozrevanja (Hrustić, 2013; Balaž i sar., 2012). S obzirom da se infekcija gljivom dešava u fazi cvetanja, aplikacija fungicida se vrši u fazi cvetanja (jedno do dva tretiranja) i jedno u fazi početka dozrevanja plodova.

U poslednjih nekoliko godina istraživanja u biotehnologiji su bazirana na ispitivanju biohemijskog sastava različitih biljnih organa, kao i ispitivanja sastava biljaka pod uticajem nekih ekoloških činilaca, kao i nakon tehnoloških postupaka. Istraživanja su fokusirana, pored primarnih biomolekula, i na sekundarne biomolekule, najčešće polifenole. Radi se o

jedinjenjama koja se prirodno pojavljuju u svim vrstama voćaka kao rezultat sekundarnog metabolizma i koja imaju različite funkcije u biljkama (Veberič i sar., 2012).

Pored “odbrambene” funkcije, fenoli su veoma važni i zbog toga što njihovo prisustvo značajno utiče na boju i ukus ploda (Kim i sar., 2003). Sve je više literaturnih podataka o prirodnim fenolima u plodovima i drugim biljnim delovima kao prerađevinama voća (Štampar i sar., 2006), zbog njihovog povoljnog uticaja na zdravlje čoveka, kao i zbog komercijalne upotrebe. Plodovi voća predstavljaju kompleksne mešavine polifenola, koje se nalaze u različitim oblicima u biljkama. U hemijskom smislu, fenoli u plodovima su uglavnom fenolne kiseline i flavonoidi, koji su podeljeni na nekoliko podklasa. Glavne flavonoidne grupe čine: flavonoli, antocijanidini i flavanoli. Pored razlika u samoj strukturi, fenoli mogu biti povezani sa različitim ugljenim hidratima i organskim kiselinama i jedni s drugima (Veberič i sar., 2012). Generalno, više fenolnih kiselina i flavonoida se nalaze u pokožici plodova voćaka zbog svoje uloge u odbrani od biotičkih i abiotičkih faktora spoljašnje sredine.

Trešnja predstavlja dobar izvor primarnih (šećera i organskih kiselina) i sekundarnih (fenolnih jedinjenja) biomolekula. Sastav i koncentracija ovih jedinjenja u velikoj meri utiču na karakteristike ukusa kao i na kvalitet plodova (Blando i sar., 2004; Kim i sar., 2005; Fazzari i sar., 2008). Fenoli su veoma važni za biljke jer grade integralni deo strukture ćelijskog zida, uglavnom kao polimeri. Struktura pigmenta, primarnih i sekundarnih biomolekula se može menjati tokom faza sazrevanja ploda (Eltaieb i Roddick, 1984).

U nauci i u praksi, veoma je važno istaknuti fenole koji imaju ključnu ulogu u otpornosti, tj. reakciji biljke da se odupre infekciji različitih patogena (Mikulić-Petkovšek i sar., 2010; Wallace i Fry, 1994; Strack, 1997). U uslovima stresa (oštećenje tkiva, infekcija) u biljkama se kao odbrambeni mehanizam indukuje sinteza polifenolnih jedinjenja (Britton, 1983; Dixon i Paiva, 1995). Fenoli spadaju u neenzimske antioksidante. Takvu funkciju imaju i enzimski antioksidantni odbrambeni sistemi. Uloga antioksidantnih odbrambenih sistema je da se „suprotstave“ oksidativnom oštećenju od reaktivnih kiseoničnih vrsta (reactive oxygen species, ROS). Neki od antioksidantnih enzima su superoksid-dismutaze (SOD), katalaza (Cat), glutation reduktaza (GR), glutation-S-transferaza (GST) i razne vrste biljnih peroksidaza (Px) (Nizzamuddin i sar., 1987). Iako živi organizmi podležu starenju izazvanom dejstvom prooksidanata, minimalna akumulacija oštećenih ćelijskih komponenata se postiže višestrukim

Fitohemijška analiza i antioksidantni kapacitet plodova trešnje inficiranih gljivom *Monilinia laxa* Aderh i Ruhl,
B. Borković

dejstvom antioksidativnih jedinjenja i enzima koji repariraju ili uklanjaju oštećene komponente (Tumbas, 2010).

2. PREGLED LITERATURE

2. 1. Rasprostranjenost i značaj trešnje u voćarskoj proizvodnji

Koštichave voćne vrste dominiraju u ukupnoj voćarskoj proizvodnji u Srbiji, kako po broju stabala, tako i po količini plodova koji se proizvedu. Međutim, proizvodnju koštichavih voćaka ugrožava veliki broj patogena među kojima se posebno ističu vrste roda *Monilinia*, široko rasprostranjene u svim voćarskim regionima sveta (Hrustić, 2013).

Trešnja (*Prunus avium* L.) je jedna od najstarijih voćnih vrsta čije su plodove ljudi koristili od davnina. Novije sorte su uvezene krajem XIX veka iz Zapadne Evrope. Kod nas su dugo gajene samo domaće, autohtone sorte, a od 1950. počinje uvođenje u proizvodnju i novijih, komercijalnih sorti, krupnijeg ploda.

Po proizvodnji trešnja se u svetu nalazi na šestom mestu, od toga se najveći deo proizvede u Evropi (44%), Aziji (39%) i Severnoj Americi (13%) (Iličić, 2016). Prema podacima Republičkog zavoda za statistiku, u našoj zemlji u 2011. godini u rodu se nalazilo 1.864.000 stabala trešnje sa ukupnim prinosom od 28.557 tona, a prema podacima FAO, 2009. godine Srbija se nalazi na 18 mestu u svetu po proizvodnji trešnje (Blagojević i Božić, 2012). Prema Sredojeviću (2011), trešnja se uglavnom gaji na porodičnim gazdinstvima, dok manje od 1 % proizvodnje pripada preduzećima i zadrugama.

Trešnja je koštichava voćna vrsta koja spada u jedno od najranijeg sezonskog voća koja se pretežno koristi za potrošnju u svežem stanju. Radi se o vrsti koja nema neke posebne zahteve u pogledu zemljišta, klime i geografskog mesta (nadmorska visina).

Za razliku od nekih drugih poljoprivrednih useva (jabuka), u toku godine ova biljka ima značajno manji broj pesticidnih tretmana, pa se stoga može uvrstiti u grupu zdravstveno bezbednijih proizvoda. Sezona potrošnje trešnje kod nas traje oko mesec i po dana, do kraja juna. Pored stonje potrošnje u domaćinstvu, trešnja se koristi i u prerađivačkoj industriji, i to za proizvodnju džemova, kompota, voćnih salata, sokova. Značaj trešnje u voćarskoj proizvodnji značajno umanjuje to što je za branje potrebna velika radna snaga usled sitnih plodova i velikih dimenzija stabla, te se zbog toga u nauci teži ka stvaranju slabo bujnih vegetativnih podloga

(Milatović i sar., 2015). Pored upotrebe ploda u ishrani, koštice se mogu koristiti u proizvodnji aktivnog uglja (Beker i sar., 2010; Angin, 2014). Drvo se može koristiti za izradu nameštaja i muzičkih instrumenata, ali nije dobro za izradu građevinske stolarije jer brzo propada i truli (Ninkovski, 1998).

2. 2. Sistematsko mesto i klasifikacija sorti trešnje

Po sistematici biljaka, trešnja, *Prunus avium* L. ima sledeću klasifikaciju:



Carstvo: Plantae

Razdeo: Magnoliophyta

Klasa: Magnoliopsida

Red: Rosales

Porodica: *Rosaceae*

Rod: *Prunus*

Vrsta: *Prunus avium*

Slika 1. *Prunus avium* L. (original)

Trešnja je listopadno drvo, ponekad dostigne visinu i preko 20 m (Slika 1). Listovi se nalaze na lisnim drškama, pri čijim se osnovama nalaze dve žlezde. Plod je monokarpna koštunica, loptast je i može biti tamno crvene, ružičaste ili žute boje. Trešnjin plod je mesnat i slatkog je ukusa (Mratinić i Kojić, 1998). Prečnik ploda je oko 1 centimetar, a kod kulturnih sorti može biti i znatno krupniji.

U svetu postoji 2000 sorti trešnje, međutim sortiment u Srbiji je dosta zastareo, i potrebno je introdukovati nove sorte. Dominiraju starije sorte kao što su Germersdorfska, Hedelfingelska, Lionska rana i Napoleonova (Milatović i sar., 2011). Za razliku od prethodnih, manje su zastupljene Stela, Burlat, Van i Drojanova žuta, ali gaje se i autohtone stare sorte kao što su Đurđevka, Crnica i Belica (Nikolić i sar., 1999).

Prema Milatoviću i sar., (2015), postoji više kriterijuma kako bi se mogla izvršiti klasifikacija sorti trešnje (Tabela 1). Za klasifikaciju prema vremenu zrenja, kao standard se koristi sorta Burlat, čije je prosečno vreme zrenja 20. maj.

Tabela 1. Kriterijumi klasifikacija sorti trešnje (Milatović i sar., 2015)

Kriterijum klasifikacije		napomena
prema boji pokožice	crvena šarena žuta	(osnovna žuta i dopunska crvena)
prema boji soka	obojen bezbojan	
prema čvrstoći mesa	meko srednje čvrsto čvrsto	
prema krupnoći ploda	sitan srednje krupan krupan veoma krupan	
prema nameni	potrošnja u svežem stanju industrijska prerada	
prema vremenu zrenja	vrlo rane rane srednje rane srednje pozne pozne sorte vrlo pozne sorte	(2 do 8 dana pre Burlata) (do 5 dana posle Burlata) (6 do 12 dana posle Burlata) (13 do 19 dana posle Burlata) (20 do 26 dana posle Burlata) (27 do 33 dana posle Burlata)

Prema Ninkovskom (1998), po zastupljenosti, sorte trešnje su podeljene na:

- a) vodeće sorte (za proizvodne zasade) kakve su: Burlat, Van, Stella i Bing;
- b) prateće sorte (koriste se kao oprašivači): Suvenir, Compact Stella, Imperor Francis, Lambert, Germerzdorfska i Drojanova žuta;
- c) sorte lokalnog značaja (pretežno autohtonog porekla): Primavera, Lionska rana, Asenova rana, Hedelfigenska, Denisenova rana i perspektivne: Sunburst, Lapins, New Star, Sweetheart i Celeste.

Pored navedenih, danas se sve više gaje i sorte Rita, Early Star, Early Lory, Burlat, Benton, Skena, Carmen, Vera, Cristalina, Katalin, Summit, Regina, Black Star, Kordia, Džordžija i Valerij Čkalov (Iličić, 2016).

Jedna od važnijih odlika sorti koja je u vezi sa otpornošću na trulež (prouzrokovatelj: *M. laxa*) jeste debljina pokožice ploda. One sorte koje su sklonije pucanju, kod njih se, po pravilu, u većini slučajeva javlja trulež (Holb, 2006). Sorte sa debljom pokožicom manje su osjetljive na trulež ploda, u odnosu na sorte sa tankom pokožicom. Otpornost na trulež plodova se gubi ukoliko dođe do povrede epidermisa ploda. Zbog toga, sorte otporne na ovaj patogen moraju da poseduju i dobru otpornost na pucanje ploda usled kiše (Milatović i sar., 2011). Otpornost na pucanje ploda je ekonomski veoma značajna osobina trešnje. Sorte koje se u oplemenjivanju koriste kao potencijalni donori ove osobine su: Sue, Sam, Riversova rana, Viva, Kristin, Lapins, Kordija, Tehlovan, Regina, Fertard, Blek star (Iezzoni i sar., 1991; Sansavini i Lugli, 2008).

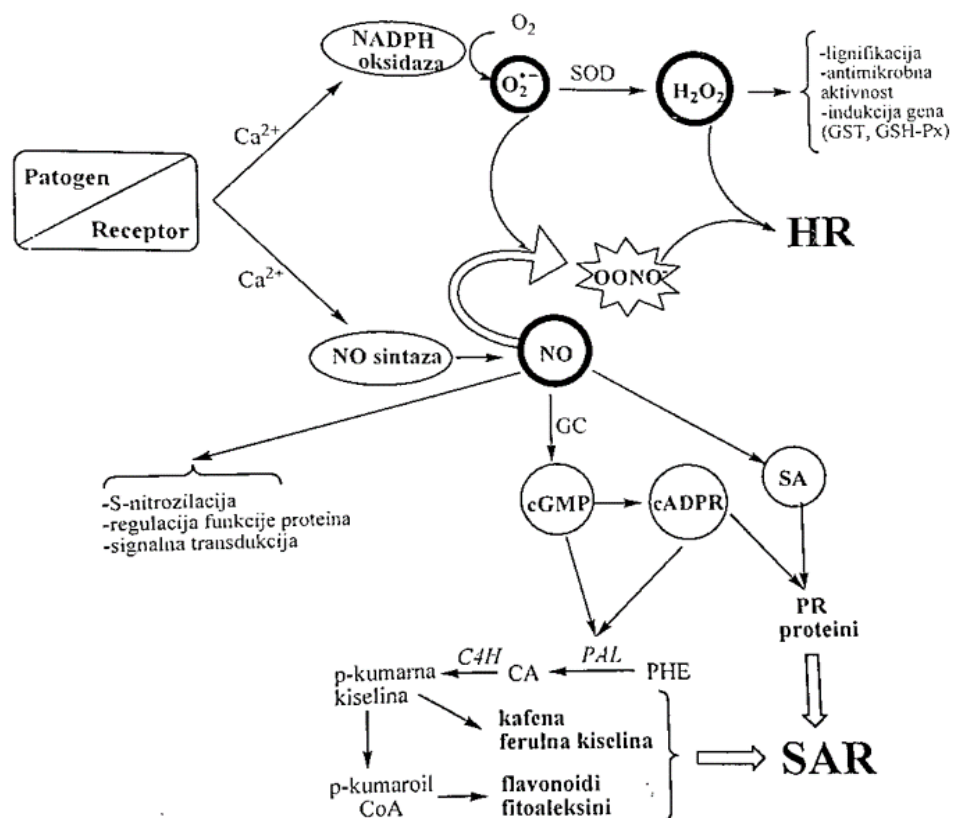
2. 3. Biljka i patogen

Biljni svet je u neprekidnoj opasnosti od napada mnogobrojnih parazita za koje biljni organizam predstavlja prirodnu sredinu za život i razvoj. Biljni paraziti su različiti (gljive, bakterije, virusi, fitoplazme) sa velikim potencijalom razmnožavanja i reprodukcije. Razvijajući se u zajedničkom ekosistemu sa svojim parazitima i raznim drugim prouzrokovateljima oštećenja, biljke su izgrađivale svoje odbrambene sisteme s kojima su se uspešno suprotstavljale dejstvu svih nepovoljnih spoljnih činilaca.

2. 3. 1. Reakcija biljke na prisustvo patogena

Uzroci stresa mogu biti biotički (gljiva, bakterija, virus) i abiotički (temperatura, teški metali, polutanti). Prilikom dejstva činioca spoljne sredine u većini slučajeva se javlja oštećenje tkiva. Prilikom napada patogena biljka se "bori" da zaustavi dalje širenje infekcije. Hipersenzibilna reakcija (HR) je analogna reakcija koja dovodi do stvaranja nekrotičnih lezija na mestu infekcija i na taj način dolazi do zaustavljanja daljeg širenja patogena (Delledonne, 2005). Mehanizam kojim biljke reaguju na infekciju (napad patogena) analogan je imunološkoj reakciji životinja kod koje makrofagi ubijaju bakterije dejstvom aktiviranih oblika kiseonika i azot monoksida (NO). U HR najvažniju ulogu imaju ROS (reaktivne kiseonične vrste) i RNOS (reaktivne azotne vrste) koji dovode do "oksidativne eksplozije" (Popović i Štajner, 2008).

Nastajanje HR se dešava u nekoliko reakcija (Slika 2). Reakcijom između NO i O_2^- nastaje $OONO^-$ koji sa H_2O_2 dovodi do krajnjeg proizvoda HR tj. nekroze tkiva. Pored hipersenzibilne reakcije koja nastaje na mestu napada patogena, može doći i do toga da biljka postane rezistentna na dati patogen, tj. dolazi do biohemijskih promena koje dovode do otpornosti (Delledonne, 2005).



Slika 2. Uloga ROS i NO radikala za vreme hipersenzitivne reakcije (HR) u razvoju sistemske rezistentnosti (Delledonne, 2005), GC (guanilat-ciklaza), cGMP (ciklični guanozin-monofosfat), cADPR (ciklična ADP riboza), SA (salicilna kiselina), PR protein (pathogenesis related proteins/protein patogeneze), PHE (fenilalanin), CA (cimetna kiselina), PAL (fenilalanin amonijum lijaza), HR (Hypersensitive response/hipersenzibilna reakcija), SAR (Systemic acquired resistance/sistemska rezistentnost), C4H (cinamat 4-hidrolaza)

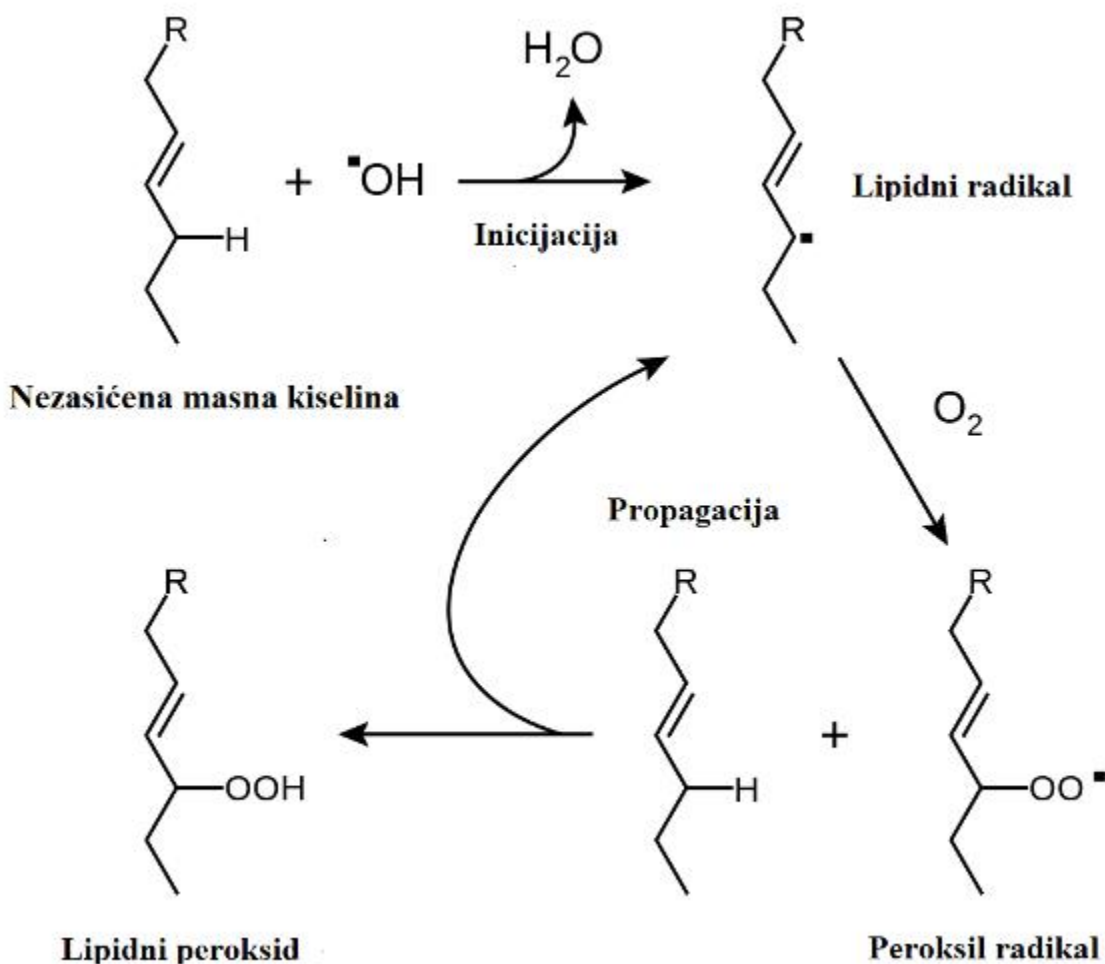
Lipidna peroksidacija predstavlja metabolički proces koji se dešava u aerobnim uslovima i najviše je istraživan od svih posledica aktivnosti ROS na strukturu i funkciju ćelijskih membrana (Kiproviski, 2013). Ovaj proces je reakcija nastanka lipidnih peroksida (LOOH), koji nastaju u

reakciji ROS i nezasićenih masnih kiselina (Malenčić i sar., 2003). Lipooksigenaza (LOX) je enzim koji katalizuje reakciju lipidne peroksidacije. Ovaj enzim ima ulogu u formiranju hidroperoksida (LOOH) koji se vrlo brzo razlažu u druga reaktivna jedinjenja (Popović i Štajner, 2008). Nezasićene masne kiseline koje se nalaze u membranskim fosfolipidima posebno su osetljive na napad ROS-a. Hidroksil radikal $\cdot\text{OH}$ može dovesti do peroksidacije nekih nezasićenih masnih kiselina.

Peroksidacija masnih kiselina tokom napada ROS-a dovodi do smanjenja fluidnosti i povećanja permeabilnosti membrane. Nekoliko reaktivnih vrsta, kao npr. aldehidi i alkoholi, formiraju se razgradnjom lipidnih hidroperoksida (Davies, 2000). Malondialdehid (MDA) jedan je od finalnih proizvoda peroksidacije nezasićenih masnih kiselina fosfolipida, i odgovoran je za oštećenja plazmaleme (Gutteridge, 1995, Halliwell i sar, 1993). Istraživanja su pokazala da je efekat reproduktivnih organa patogene gljive *Phytophthora infestans* kod krompira povećao dejstvo enzima lipooksigenaza, a samim tim i lipidne peroksidacije (Göbel i sar, 2003).

Prema Girotti, (1985), Abuja i Albertini (2001), lipidna peroksidacija (Slika 3) se odvija u tri faze:

- a) inicijacija u kojoj dolazi do eliminacije atoma vodonika metil grupe molekula nezasićene masne kiseline pod uticajem reaktivnih kiseoničnih vrsta (hidroksil radikal, peroksil radikal) (Sharma i sar, 2012);
- b) propagacija u kojoj nastali alkil radikal intramolekulskim premeštanjem dvostruke veze prelazi u konjugovani dien koji sa kiseonikom gradi peroksil-radikal ($\text{LOO}\cdot$). Sa susednog molekula nezasićene masne kiseline oduzimanjem vodonikovog atoma se formira novi alkil radikal, dok se peroksil-radikal stabilizuje gradeći hidroperoksid (LOOH) (Popović i Štajner, 2008);
- c) terminacija koja obuhvata reakcije koje se odigravaju izmedju slobodnih radikala (alkil-radikali, peroksil-radikali) pri čemu nastaju tercijarni produkti oksidacije, stabilni i nereaktivni dimeri i polimeri (Popović i Štajner, 2008).



Slika 3. Reakcije lipidne peroksidacije (http://www.wikiwand.com/sl/Reaktivna_kisikova_spojina)

2. 3. 2. Fitopatogeni trešnje

Sve gajene biljne vrste napada veći broj prouzrokovaca bolesti (gljive, bakterije, virusi, fitoplazme). Najznačajnije fitopatogene gljive trešnje su prouzrokovaci sušenja cvetova, rodnih grančica i truleži plodova gde spadaju *Monilinia laxa* (Aderh. i Ruhl.), Honey (1945), *Monilinia fructicola* (G.Winter) i Honey (1928) i *Monilinia fructigena* Honey, (1945). Pored navedenih vrsta, ekonomske štete u vidu ospičavosti lista trešnje u našim agroekološkim uslovima prouzrokuje *Blumeriella jaapii* (Rehm). U nekim godinama, značajno mogu da oštete voćarke zasade i gljive kao što su *Stigmina carpophila* (Lév.) M.B. Ellis, (1959) koja prouzrokuje

rešetavost lista i prouzrokovatelj citosporoznog izumiranja trešnje *Cytospora cincta* (Fr:Fr.) Höhn (Ogawa i sar., 2008; Balaž i sar., 2012).

Gljive iz roda *Monilinia* pripadaju carstvu Fungi, razdelu Ascomycota, podrazdelu Discomycetes, klasi Pezizomycotina, podklasi Leotiomycetes, redu Helotiales, porodici *Sclerotiniaceae* (Vasić, 2016). U povoljnim godinama za razvoj patogena, vrste roda *Monilinia* mogu u potpunosti da unište prinos (Ogawa i sar., 1995; Hong i sar., 1997; Balaž, 2000; Larena i sar., 2005). Istraživanja su pokazala da je u prirodnoj infekciji *Monilinia laxa* kod koštičavih voćaka prisutna u 96,34% slučajeva, dok je zastupljenost ostalih vrsta roda *Monilinia* znatno manja: *M. fructigena* 2,44% slučajeva, *M. fructicola* 1,22% slučajeva (Hrustić, 2013). Shodno tome, *M. laxa* spada u najznačajnije fitopatogene trešnje.

Pored bolesti koje prouzrokuju gljive, po značaju se izdvajaju i biljne bakterioze. Najznačajnije bakterije su *Pseudomonas syringae* pvs. (van Hall 1902.) koja izaziva bakteriozno izumiranje trešnje, zatim bakteriozni rak korena koju prouzrokuje *Agrobacterium tumefaciens* (Smith i Townsend, 1907; Arsenijević, 1997; Obradović i sar., 2010; Gavrilović i Milijašević, 2004; Balaž i sar., 2012). Pored navedenih bakterija trešnju mogu parazitirati i *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* (Smith) (Vauterin i sar., 1995) prouzrokovatelj bakteriozne pegavosti, rešetavosti lista i rak rana koštičavih voćaka. Prisustvo ove bakterije u našoj zemlji do sada nije eksperimentalno potvrđeno (Iličić, 2016).

Najznačajnije viroze trešnje su: sitničavost plodova trešnje (LChV-1), šarenilo lista višnje (CVA), rđasto šarenilo lista (CNRMV), prstenasta pegavost lista (CGRMV), nekroze kore šljive u asocijaciji sa raznim drugim virusima (PBNSPaV) (Sabanadžović i sar., 2005).

Pored mikoza, bakterioza i viroza, koštive voćke parazitiraju i fitoplazme. Prema domaćim literaturnim izvorima kod nas ne postoji dovoljno utemeljenih eksperimentalnih podataka o prisustvu fitoplazmi na trešnji (Iličić, 2016).

U svetu, najznačajnije fitoplazmoze su: X – disease (X – disease i Western X disease) (Kirkpatrick i sar., 2008), cherry lethal yellows (Zhu i sar., 1998) i cherry little leaf (Valiunas i

sar., 2005). U Evropi je prisutna fitoplazma Evropskog žutila koštičavih voćnih vrsta (European Stone Fruit Yellows, ESFY) na kajsiji, breskvi, Evropskoj šljivi, višnji, trešnji, crnom trnu i bademu (Navrátil i sar., 2001; Fialová i sar., 2004).

2. 3. 2. 1. Mrka trulež plodova trešnje

Prouzrokovatelj: Teleomorf: *Monilinia laxa* Aderh. i Ruhl.

Anamorf: *Monilia laxa* Aderh. i Ruhl.

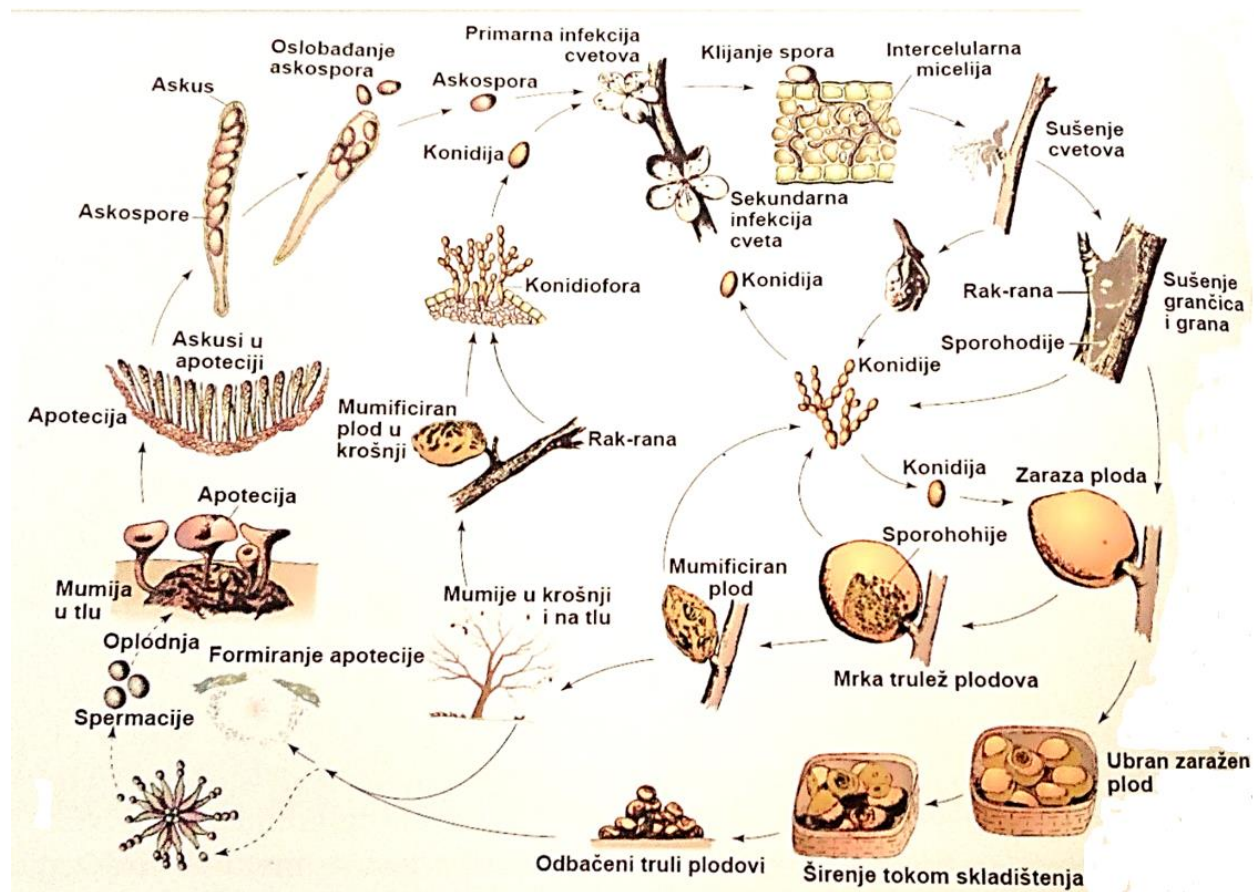
Brown rot

Monilinia spp. (*M. laxa*, *M. fructigena* i *M. fructicola*) predstavljaju fitopatogene gljive koje prouzrokuju truleži plodova, sušenje grana i cvetova a može da zarazi različite vrste voćaka. Domaćini na kojima parazitiraju iz roda *Monilinia* su sve jabučaste i koštičaste voćke s tim da *M. laxa* parazitira u većini slučajeva višnju, trešnju, kajsiju i šljivu.

Simptomi. Istraživanja su pokazala da se prvi simptomi na plodovima ispoljavaju pojavom manjih kružnih, mrkih pega, koja se poput oreola obrazuju oko mesta infekcije, najčešće na mestu neke rane i povrede. Ove rane najčešće nanose insekti, koji oštećivanjem ploda delovima tela ili usnim aparatom omogućuju lako prodiranje gljive u tkivo domaćina. Pored ovog načina prodiranja patogena, takođe do infekcije može doći i na mestu dodira između dva ploda (Hrustić, 2013). Razvojem oboljenja, pega se koncentrično širi u većem broju slučajeva, a u prisustvu padavina, visoke vlažnosti vazduha i visoke temperature za nekoliko dana trulež zahvata cele plodove (Holb, 2008; Ivanović i Ivanović, 2017).

Ciklus razvoja i epidemiologija. Patogen prezimi u zaraženim biljnim delovima (Slika 3), naročito na zaraženim grančicama, granama, osušenom lišću, mumificiranim plodovima (Byrde i Willetts, 1997). Na proleće, patogen proizvodi konidije na pomenutim zaraženim biljnim ostacima, a prve infekcije se dešavaju u fenofazi cvetanja (Balaž i sar., 2012). Savršeni stadijum gljive (teleomorf) uglavnom se može dobiti u *in vitro* uslovima, a u prirodnim uslovima se retko javlja (Batra and Harada, 1986). Apotecije, koje se pojavljuju u obliku pečurke na mumificiranim plodovima, proizvode askospore. Za razliku od savršenog, nesavršeni stadijum (*Monilia laxa*) je prisutan u prirodnim uslovima. Za ostvarenje infekcija, u našim uslovima,

najveći značaj imaju konidije (Balaž i sar., 2012). Konidije se šire tokom proleća putem vetra i kiše i vrše zarazu cvetova (Byrde i Willetts, 1997). Inficirani cvetovi su odgovorni za proizvodnju sekundarnog inokuluma koji dalje nastavljaju ciklus bolesti tokom prolećne sezone. Micelije gljive rastu kroz cvetne delove i tako dospevaju u grančice i prouzrokuju njihovo sušenje (Milatović i sar., 2015). Infekcije cveta se dešavaju i na temperaturama ispod 10 °C, ako kišni period traje duže od 24 h (Joseph i sar., 1995), ali optimalne temperature za ostvarivanje infekcije *Monilinia spp.* se kreću u intervalu od 22-25 °C. Na ovim temperaturama dovoljno je da cvet bude vlažan 3-4 h (Miletić i Tamaš, 2011). Infekcije ploda javljaju se u vreme dozrevanja, ali najznačajnije infekcije dešavaju se preko mehaničkih povreda (abiotičkih ili biotičkih) (Ram i Bhardwaj, 2004). Gibert i sar. (2009) smatraju da najznačajniji put prodora patogena predstavljaju pukotine na kutikuli. One nastaju kada plod dostigne maksimalni porast, nekoliko nedelja pred berbu, a pukotine čine 10% površine ploda.



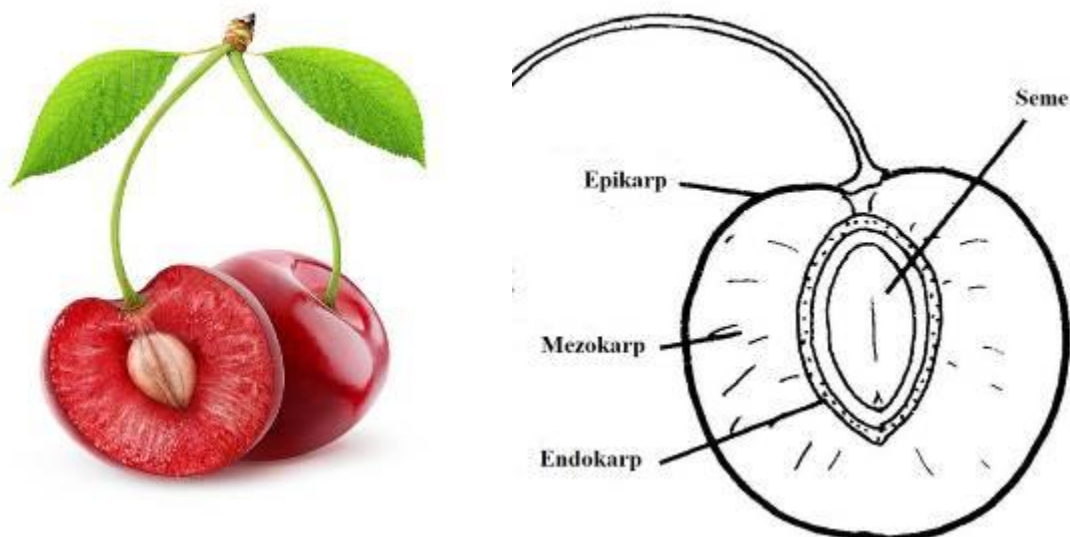
Slika 3. Biološki ciklus gljive *Monilinia laxa* (Agrios, 2005)

Zaštita. S obzirom da se infekcija gljivom dešava u fazi cvetanja, aplikacija fungicida se vrši u fazi cvetanja (jedno do dva tretiranja) i jedno u fazi početka dozrevanja plodova (vodeći računa o karenci). S obzirom da se patogen održava u obliku micelije u mumijama ili u zaraženim grančicama, jedna od nepesticidnih mera je uklanjanje zaraženog biljnog materijala u voćnjaku. U voćnjacima u kojima se ne primenju sredstva za zaštitu bilja, izvor infekcije mogu biti i zeleni plodovi (Balaž i sar., 2012).

Pored prouzrokovala bolesti, prinos i normalno razviće mogu da izazovu i štetočine trešnje. Najznačajnije štetočine ploda trešnje su: *Rhagoletis cerasi* (trešnjina muva) koja napada srednje kasne i kasne sorte trešnje, *Drosophila suzuki* (vinska mušica tačkastih krila) koja polaže jaja u plodove (u fazi zrenja), *Rhynchites auratus* (trešnjin svrdlaš) koji se hrani tek zametnutim plodovima. Navedene štetočine oštećuju plod, smanjuju tržišnu vrednost, a pored toga oštećuju kutikulu, i omogućavaju uslove za razvoj biljnih bolesti (Milatović i sar, 2015).

2. 4. Hemijski sastav ploda trešnje

Kvalitet plodova određuje se na osnovu oblika, boje i veličine, sadržajem primarnih metabolita (šećera, organskih kiselina) i sekundarnih biomolekula (uglavnom fenola i karotenoida). Obe grupe metabolita značajno doprinose ukusu i aromi voća (Veberič i sar., 2012; Tomas-Barberan i Espin, 2001). Prema Milatoviću i sar. (2015), u sastav jestivog dela ploda (Slika 4) ulaze: voda, šećeri, organske kiseline, proteini, masne kiseline, mineralne materije, vitamini, aromatična jedinjenja, fenolna jedinjenja i dr. Najveći udeo svežih plodova čini voda (Tabela 2) Najveći deo suve materije ploda čine šećeri, od kojih su najviše zastupljeni glukoza i fruktoza, dok je u manjim količinama zastupljena saharoza (Tabela 2). Od organskih kiselina najviše je zastupljena jabučna kiselina (preko 90%), dok su ostale kiseline zastupljene u manjem broju (ćilibarna, limunska, šikimska, fumarna) (Girard i Kopp, 1998; Usenik i sar., 2008). Promene u sadržaju organskih kiselina i odnosu šećera mogu dovesti do promena u ukusu voćaka i čvrstine ploda (Colarič i sar., 2005). Karakteristike ukusa su povezane sa jedinjenjima koje odlikuje rastvorljivost u vodi.



Slika 4. Poprečni presek ploda trešnje (<https://vrijeshoolpedagogie.com/2015/05/page/2/>)

Sladak ukus se najviše pripisuje monosaharidima i disaharidima. Kiseli ukusi su povezani sa organskim kiselinama i pH vrednosti, dok je gorak ukus često povezan sa prisustvom sekundarnih metabolita. Na nivo šećera i organskih kiselina, koje zavise od genotipa, utiču i faktori spoljašnje sredine, kao i tehnologije proizvodnje (Hudina i Štampar, 2009; Colarič i sar., 2005).

Vitamini spadaju u esencijalne materije, pa je važno unošenje hrane bogate vitaminima za normalno funkcionisanje organizma. Ovu voćnu vrstu karakteriše veći sadržaj vitamina A, odnosno njegovog provitamina beta karotena (Tabela 2), dok je zastupljen umeren sadržaj vitamina C (McCune i sar., 2011; Belitz i sar., 2009).

Pored atraktivnog izgleda, trešnja poseduje i niz lekovitih svojstava. Plod trešnje karakteriše velika antioksidantna aktivnost. Lekovitost ploda karakterišu fenolna jedinjenja, zastupljena kako u pokožici, tako i u mesu ploda. Ova jedinjenja predstavljaju važan faktor u odbrani od biotičkog ili abiotičkog stresa kod biljaka. Sastav i koncentracija polifenola u velikoj meri utiču na karakteristike ukusa i na kvalitet plodova (Blando i sar., 2004; Kim i sar., 2005., Fazzari i sar., 2008). Istraživanja su pokazala da je antioksidantna aktivnost u jakoj korelaciji sa

ukupnim sadržajem fenolnih jedinjenja i da se povećava sa zrelošću plodova (Serrano i sar., 2005).

Tabela 2. Sadržaj vode, primarnih biomolekula i mineralnih materija u plodu trešnje (USDA National Nutrient Database, 2018)

Hranljive materije ploda trešnje	jedinica mere	(na kg sveže mase)
Voda	g	822,50
Ukupni šećeri	g	128,20
Glukoza	g	65,90
Fruktoza	g	53,70
Saharoza	g	1,50
Galaktoza	g	5,90
Maltoza	g	1,20
Proteini	g	11,00
Masti	g	1,20
Dijetetska vlakna	g	21,00
Ukupne min. materije (pepeo)	g	4,80
Kalijum, K	g	2,20
Fosfor, P	g	0,21
Kalcijum, Ca	g	0,13
Magnezijum, Mg	g	0,11
Natrijum, Na	mg	0
Gvožđe, Fe	mg	3,60
Mangan, Mn	mg	0,70
Cink, Zn	mg	0,70
Bakar, Cu	mg	0,60
Vitamin C	mg	70,00
Tiamin, B1	mg	0,27
Riboflavin B2	mg	3,30
Niacin B3	mg	1,54
Pantotenska kiselina B5	mg	1,99
Piridoksin, B6	mg	0,49
Folna kiselina, B9	mg	40,00
Holin	mg	61,00
Vitamin A	mg	30,00
Vitamin E	mg	0,7
Vitamin K	mg	21,00
Beta karoten	mg	380,00

Polifenoli su od važnosti za biljke jer grade integralni deo strukture ćelijskog zida, uglavnom kao polimeri koji služe kao mehanička barijera u odbrani od mikroorganizama (Wallace i Fry, 1994; Strack, 1997). Varijacije sadržaja fenolnih jedinjenja (Tabela 3) u plodu trešnje su posledica delovanja velikog broja faktora, koji pored genetskih, uključuju i područje kultivacije kao mnogobrojne faktore životne sredine (Dorman i sar., 2003).

Tabela 3. Sadržaj nekih polifenola u plodu trešnje (USDA National Nutrient Database, 2018)

Grupa polifenola	jedinica mere	(na 100 g sveže mase)
Antocijanidini	mg	32,01
Flavonoli	mg	2,7
Flavanoli	mg	9,8
Proantocijanidini	mg	14,7

Antioksidanti predstavljaju svaki molekul koji prisutan čak i u maloj količini značajno sprečava ili odlaže oksidaciju supstrata (Halliwell i Gutteridge, 2007). Biljke sintetisu sve neophodne antioksidante potrebne za normalno funkcionisanje, dok životinje jedan deo unose ishranom.

Antioksidanti se mogu podeliti na:

- a) enzimske i
- b) neenzimske

Kao posledica procesa fotosinteze u biljkama dolazi do stvaranja molekularnog kiseonika i u ovakvom okruženju dolazi do spontanog "isticanja" elektrona iz elektron - transportnog lanca koji onda veoma lako mogu da reaguju sa kiseonikom što dovodi do nastanka već pomenutih reaktivnih kiseoničnih vrsta ROS (Halliwell i Gutteridge, 1995). Uloga enzimskih antioksidantnih odbrambenih sistema je da se „suprotstave“ oksidativnom oštećenju od reaktivnih kiseoničnih vrsta. Ovo uključuje antioksidantne enzime kao što su superoksid dismutaze (SOD), katalaze (Cat), glutation reduktaze (GR), glutation-S-transferaze (GST) i razne vrste biljnih peroksidaza (Px) (Nizamuddin i sar., 1987).

U neenzimske antioksidante spadaju: polifenoli, redukovani glutation, vitamin C, karotenoidi itd. (Halliwell i Gutteridge, 2007).

Način delovanja antioksidanata je specifičan zavisno od vrste enzima i reakcije koju katalizuju. Konačni rezultat svih tih reakcija je uklanjanje slobodnih radikala ili njihova transformacija u nereaktivna jedinjenja (Britton, 1983).

Biljke sintetisu mnoštvo sekundarnih biomolekula koji učestvuju u interakcijama biljke sa spoljašnjom sredinom, tj. imaju ekološku funkciju. Trešnja predstavlja dobar izvor fenolnih jedinjenja, ugljenih hidrata i organskih kiselina. Njihov sastav i koncentracija u velikoj meri

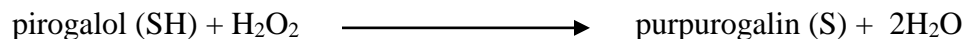
utiču na karakteristike ukusa, kao i na kvalitet plodova (Blando i sar., 2004; Kim i sar., 2005; Fazzari i sar., 2008). Polifenolna jedinjenja su sekundarni biomolekuli koji se indukuju u uslovima stresa (oštećenje tkiva, infekcija) (Britton, 1983; Dixon i Paiva, 1996). Njihova aktivacija i akumulacija oko oštećenog dela tkiva je jedan od odgovora biljke na stres.

2. 4. 1. Antioksidantni enzimi

2. 4. 1. 1. Peroksidaze

Peroksidaze su enzimi koji su široko rasprostranjeni u biljnom svetu. Izgrađene su iz četiri podjedinice (tetramer), pri čemu svaka podjedinica sadrži po molekul hema (Chelikani i sar., 2004). Peroksidaze pripadaju oksidoreduktazama koje katalizuju razgradnju vodonik peroksid (H_2O_2), pri čemu nastaje H_2O (Hiraga i sar., 2001). Kao jedan od najvažnijih enzima antioksidativne odbrane protiv abiotičkih i biotičkih faktora, peroksidaze učestvuju u sintezi fitoaleksina (Passardi i sar., 2007).

Pirogalol peroksidaza (PP_X) učestvuje u reakciji uklanjanja H_2O_2 pri čemu nastaje H_2O , a pirogalol služi kao supstrat koji donira elektrone za razgradnju H_2O_2 (Rekcija 1).



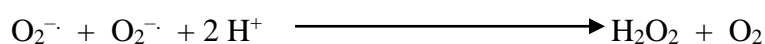
Rekcija 1. Rekcija uklanjanja vodonik peroksida pod dejstvom pirogalol peroksidaze

Peroksidaze se mogu naći u raznim organelama poput mitohondrija, Goldžijevog aparata i dr. Supstrati peroksidaza mogu biti različita fenolna jedinjenja (Eltner, 1994). Destrukcija flavonoida izazvana aktivnošću peroksidaza dovodi do nastajanja jedinjenja manje molekulske mase hidroksibenzoata i hidroksicinamata (Popović i Štajner, 2008).

Peroksidaze katalizuju reakciju između vodonik peroksida i drugih reduktanata, i njihova aktivnost je u korelaciji sa “odbranom” biljke od patogena (Jwa i sar., 2006). Pored toga što učestvuju u odbrani protiv patogena direktno, poznata je i njihova indirektna uloga u sintezi polimera ćelijskih membrana (kutina i suberina) koji predstavljaju “važnu barijeru” u odbrani protiv biotičkog i abiotičkog stresa (Quiroga i sur, 2000).

2. 4. 1. 2. Superoksid-dismutaze (SOD)

Superoksid dismutaza (SOD, EC 1.15.1.1) je zajednički naziv za grupu enzima koji naizmenično katalizuje dismutaciju (ili podelu) radikala superoksida (O_2^-) u molekularni kiseonik (O_2) ili vodonik-peroksid (H_2O_2) (Reakcija 2). Superoksid nastaje kao nusproizvod metabolizma kiseonika i ako nije uklonjen, može uzrokovati oštećenje ćelija (Hayyan i sar., 2016). Vodonik peroksid je takođe štetan i njegovo razlaganje katalizuje enzim katalaza. Dakle, SOD je važna antioksidativna odbrana u svim živim ćelijama izloženim kiseoniku.



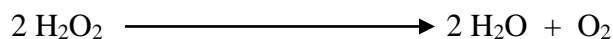
Reakcija 2. Nastajanje vodonik peroksida pod dejstvom SOD.

Svi SOD enzimi su metaloproteini koji u aktivnom centru sadrže metalne jone. Postoje tri glavne vrste SOD, u zavisnosti od proteina i metalnog kofaktora (Quint i sar., 2006; Tainer i sar., 1982):

- a) tip Cu / Zn (koji vezuje i bakar i cink), (lokalizovani u citoplazminom matriksu i hloroplastima)
- b) Fe i Mn tipove (koji se vezuju bilo gvožđe ili mangan) (lokalizovana u mitohondrijama i hloroplastima)
- c) tip Ni (koji vezuje nikel) (lokalizovana u hloroplastima)

2. 4. 1. 3. Katalaza

Katalaza (CAT; EC 1.11.1.6), je tetramerni hemoproteinski enzim koji katalizuje uklanjanje vodonik-peroksida do vode i molekula kiseonika (Reakcija 3), i ubraja se u najvažnije katalizatore koji učestvuju u antioksidantnom metabolizmu (Willekens 1997; Scandalios 1997). Katalaza je kod biljaka pretežno lokalizovana u peroksisomima. U aktivnom centru sadrži jon Fe.



Reakcija 3. Reakcija uklanjanja vodonik peroksida pod dejstvom katalaze

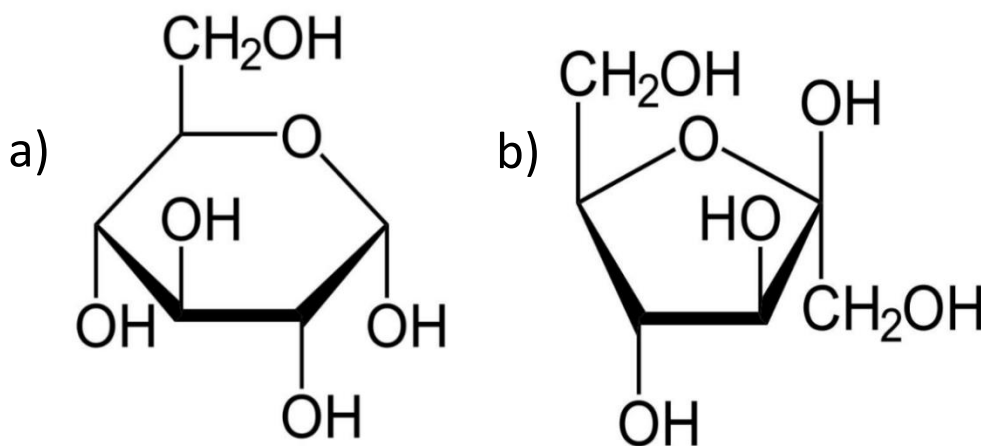
2. 4. 2. Organske kiseline i ugljeni hidrati

Organske kiseline su nosilac ukusa kiselosti kod ploda trešnje. Njihova koncentracija se menja tokom razvoja ploda i sazrevanja. Kiseline osim što utiču na svežinu ukusa, modifikuju percepciju drugih ukusa (slatko, gorko) (Jackson, 2000). Sadržaj organskih kiselina u plodu trešnje se kreće od 0,3-1% (Milatović i sar., 2015). Najzastupljenija organska kiselina je jabučna (90%), dok su ostale kiseline kao što su ćilibarna, fumarna i šikimska zastupljene u manjim količinama (Usenik i sar., 2008).

Ugljeni hidrati (šećeri) predstavljaju jedan od najvažnijih sastojaka koji karakterišu kvalitet voća i povrća. Brojna istraživanja bazirana su na ispitivanju šećera sa aspekta hemijskog sastava ploda.

Glukoza (groždani šećer) je najznačajniji i najrasprostranjeniji monosaharid (Slika 5). U biljkama, a naročito voću se nalazi u biljnim sokovima ili vezana u saharozi, maltozi, skrobu i drugim šećerima. Sa aspekta biohemije od posebnog je značaja fosfatni estar glukoze koji služi kao energetski materijal u ćelijama i prekursor u biosintezi polisaharida (Popović, 2001).

Fruktoza (Slika 5) je monosaharid poznat pod nazivom „voćni šećer“. Ovaj šećer ulazi u sastav voćnih sokova, disaharida (saharoze), trisaharida (rafinoze). U slobodnom obliku se najviše nalazi u voću i povrću, a sa fosfornom kiselinom gradi estre. Fosforni estar fruktoze učestvuje u sintezi di- i oligosaharida (Popović, 2001).



Slika 5. Strukturne formule glukoze (a) i fruktoze (b)

U plodu trešnje se pored glukoze i fruktoze može naći i saharoza koja je prisutna u manjim količinama. Dok su monosaharidi glukoza i fruktoza prisutni od zametanja do pune zrelosti, saharoza se javlja tek u fazi intenzivnog porasta ploda i to u maloj količini (Voća i sar., 2008). Neka istraživanja su pokazala slučaj gde saharoza nije ni detektovana u plodu (Dolenc i Štampar, 1997). Značajno je da je sadržaj glukoze u momentu pune zrelosti čak tri puta veći u odnosu na sadržaj u zametnutom plodu, ali ona ne mora biti dominantan šećer u momentu pune zrelosti (Voća i sar., 2008).

Prema Popoviću (2001), pored mono- i disaharida u voću, mogu se naći i polioli (šećerni alkoholi). Polioli nastaju redukcijom karbonilne grupe, ne podležu vrenju sa kvascima i imaju sladak ukus. Šećerni alkohol sorbitol može se naći u voćkama poput trešnje, kruške, jagode, šljive. Iz sorbitola se dobija vitamin C.

S obzirom na to da su šećeri i aminokiseline pretežno prisutni u floemu i listu apoplasta glavni razlog napada nekih fitopatogenih organizama jeste obezbeđenje hranljivih materija za svoj rast i razvoj. U početku patogeni koloniziraju površinu biljke, a zatim prodiru i u unutrašnjost (Myburg i sar., 2001; Dinant i sar., 2010).

2. 4. 3. Polifenoli

Primarni metaboliti utiču na strukturnu funkciju same biljke, dok sekundarni biomolekuli utiču na adaptiranost biljke, a nastaju i kao odgovor na biotički i abiotički stres (Rasoli, 2011). Polifenoli su sekundarni metaboliti biljaka u kojima imaju višestruku ulogu kao što su boja, ukus, otpornost biljke prema bolestima i mikroorganizmima. Prema složenosti biljni fenoli se dele u nekoliko klasa (Tabela 4). Dominantne strukture u listovima biljaka su flavonol glikozidi, hidroksicinamati, dok su tanini i antocijanini dominantni u plodovima i cvetovima (Popović i Malenčić, 2006).

Polifenoli su široko rasprostranjena grupa sekundarnih metabolita koji mogu biti vrlo jednostavne strukture (fenolne kiseline) ili vrlo složene strukture (lignini). Zajednička karakteristika fenolnih jedinjenja je da sadrže aromatičan prsten sa jednom ili više hidroksilnih grupa. Hidroksilne grupe mogu biti metilovane ili esterifikovane.

Tabela 4. Glavne strukturne klase fenola u biljakama (Popović i Malenčić, 2006; Robards i sar., 1999)

Broj C atoma	Ugljenični skelet	Naziv grupe	Primer jedinjenja
6	C ₆	prosti fenoli	katehol, hidrohinon, resorcinol
7	C ₆ -C ₁	hidroksibenzoati	4-hidroksibenzoeva, salicilna
8	C ₆ -C ₂	acetofenoni fenilacetati	4-hidroksifenilsirćetna kiselina
9	C ₆ -C ₃	hidroksicinamati fenilpropanoidi kumarini hromoni	ferulna, kafena, kumarna eugenol, miristicin umbeliferon, eskuletin eugenin
10	C ₆ -C ₄	naftohinoni	juglon
13	C ₆ -C ₁ -C ₆	ksantoni	
14	C ₆ -C ₂ -C ₆	stilbeni antrahinoni	resveratrol
15	C ₆ -C ₃ -C ₆	flavonoidi	flavanoni (naringenin, hesperetin) flavoni (apigenin, luteolin) flavonoli (kvercetin, kaempferol) katehini (katehin, epikatehin) antocijani (pelargonodin, cijanidin) halkoni
18	(C ₆ -C ₃) ₂	lignani	pinoresinol
30	(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂	biflanoidi	agatisflavon
N	(C ₆) _n (C ₆ -C ₁) _n (C ₆ -C ₃) _n (C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	katehinski tanini galni tanini lignini kondenzovani tanini	

Do danas je identifikovano nekoliko stotina različitih fenola, u slobodnom obliku ili u obliku glikozida (Leucuta i sar., 2005). Neki od ugljenih hidrata koji ulaze u sastav glikozida su: glukoza, galaktoza, arabinoza, ramnoza, ksiloza, manoza glukuronska i galakturonska kiselina i dr.

Prema Monties i sar. (1989) polifenolna jedinjenja se akumuliraju uglavnom u ćelijskim zidovima u epidermalnim ćelijama na površini ploda. Biosinteza ovih jedinjenja zavisi od svetlosti, a akumulacija polifenolnih jedinjenja varira i u zavisnosti od fiziološkog stanja biljke (Macheix i sar., 1990). Istraživanja su pokazala da je kod crvenih plodova poput trešnje i višnje sadržaj polifenola viši kod kojih se flavonoidi i antocijani akumuliraju tokom sazrevanja (Britton, 1983; Macheix i sar., 1990). Takođe, došlo je do zaključka da faktori posle ubiranja plodova (transport i skladištenje) mogu uticati na hemijski sastav plodova. Plodovi voća posle branja, tokom skladištenja, brže sazrevaju i dolazi do smanjenja sadržaja kiselina, i povećanja sadržaja antocijanina (Serrano i sar., 2009; Gonçalves i sar., 2004).

Pored strukturne uloge, antioksidantna aktivnost je izuzetno značajna karakteristika ovih jedinjenja u biljnom svetu, tačnije njihova sposobnost da budu donori vodikovih atoma i da kao takvi uklanjaju slobodne radikale, uz formiranje fenoksi radikala, koji su stabilniji, a i manje reaktivni (Kukrić i sar., 2013)

Takođe, flavonoli, derivati hidroksicimetne kiseline su najpoznatiji fitotoksini i fitoaleksini (Strack, 1997) koji imaju ulogu u odbrani od patogena.

Moderne tehnologije skladištenja bi potencijalno mogle povećati nutritivnu vrednost plodova kroz “sporiji” proces omekšavanja, tako da bi se plodovi mogu sakupljati u kasnijoj fazi zrenja, kada je više aktivnih biomolekula akumulirano (Wang i sar., 2006).

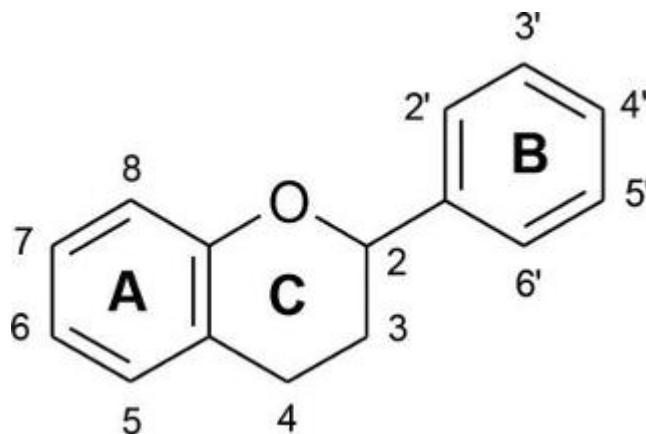
2. 4. 3. 1. Flavonoidi

Flavonoidi predstavljaju najveću grupu biljnih fenola (Slika 6) i u prirodi se javljaju slobodni ili u obliku glikozida. Podeljeni su u nekoliko podgrupa: halkoni, flavani, flavoni, flavonoli, izoflavoni, flavanoni, flavanonoli i antocijani (Brand, 2010; Popović i Malenčić, 2006; Robards i sar., 1999).

Do sada je izolovano preko 4000 jedinjenja koji pripadaju ovoj grupi (Ohshima i sar., 1998). Prisutni su u svim biljkama, a najveću strukturnu raznovrsnost dostigli su u skrivenosemenicama. Flavonoidi su biljni pigmenti odgovorni za boju cvetova, plodova i listova biljaka. Boja im varira od bele do žute, osim kod antocijanidina koji su odgovorni za skoro sve ružičaste nijanse (Petri i sar., 1997).

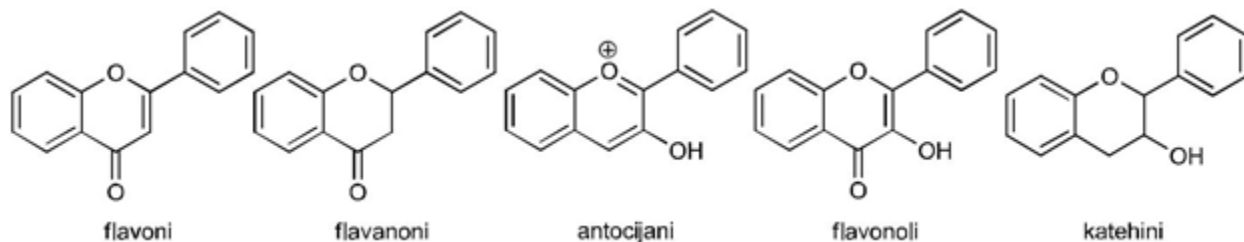
U osnovi molekula flavonoidnih aglikona nalazi se γ -piron (piranon-4), benzo- γ -piron (hromon) i 2-fenil- benzo- γ -piron (Popović, 2001). Osnovni strukturni skelet flavonoida čine 15 atoma ugljenika raspoređeni u osnovnoj strukturi $C_6-C_3-C_6$ (Slika 2).

Flavonoidi nastaju mešovitim biosintetskim putem preko halkona iz tri aktivirana acetata i derivata cimetne kiseline. Na ovaj način se formira osnovni skelet $C_6-C_3-C_6$, a naknadnom ciklizacijom osnovnog piranovog prstena dolazi do formiranja molekula flavanona.



Slika 6. Osnovni skelet flavonoida

Kasnijim transformacijama nastaju ostali tipovi flavonoidnih molekula (Kovačević, 2004; Tapas i sar., 2008).



Slika 7. Klase flavonoida

Flavoni (Slika 7) predstavljaju pigmente žute boje ali prisustvo tamnijih nijansi žute boje potiču od karotenoida (Fang i sar., 2007; Santos-Gomes i sar., 2002). Kao i većina flavonoida, flavoni se u prirodi najčešće sreću u obliku estara taninskih kiselina i u obliku glikozida. Flavoni koji se najčešće sreću u biljnom svetu su apigenin, luteolin i hrizin (Jodee i sar., 2011).

Flavanoni su bezbojna jedinjenja od koji su najpoznatiji naringenin i hesperetin. Vezani su šećernom komponentom u glikozide (Liu i sar., 2008). Najčešće se nalaze u južnom voću (limun, mandarine i narandže) (Ramful i sar., 2011), ali i u ostalom voću.

Antocijanini predstavljaju prave biljne pigmente i jedni su od najrasprostranjenijih flavonoidnih jedinjenja. Mogu se naći u svim vegetativnim i generativnim biljnim delovima. Važno je istaći da se mogu naći u skoro svim voćnim vrstama (Gil i sar., 1997; Lee, 2013; Pantelidis i sar., 2007). U biljkama se mogu naći u obliku glikozida nastalih vezivanjem flavonoidne komponente (antocijanidina) sa nekim od šećernih komponenata (glukoza, galaktoza i ramanosa) (Stojković, 2014).

Antocijanini pripadaju klasi flavonoidnih jedinjenja koji daju atraktivnu narandžastu, plavu i crvenu boju cveća. Pored toga što utiču na neke morfološke odlike, značajan su indikator kvaliteta voća, jer utiču na ukus i aromu plodova (Del Caro i Piga, 2008; Lee i Finn, 2007). U novije vreme su velika interesovanja za ove biomolekule kao funkcionalna jedinjenja (hrana) i kao potencijalni agensi protiv oksidativnog stresa (Stintzing i sar., 2002)

Kao i prethodne klase flavonoida, flavonoli se mogu naći u mnogim biljnim vrstama (Škerget i sar., 2005; Sultana i Anwar, 2008), kako u slobodnom obliku tako i u obliku glikozida. Najrasprostranjeniji flavonol je kvercetin (Chen i Zuo, 2007).

Flavanoli (katehini) su bezbojna jedinjenja prisutna u mnogim biljnim vrstama. Ova jedinjenja se u biljkama najčešće nalaze esterifikovana, najčešće galnom kiselinom (Ruidavets i sar., 2000). Katehini mogu biti fitotoksični i neke biljke ih sintetizuju u korenu da bi sprečile naseljavanje drugih biljaka na toj teritoriji (Bais i sar., 2003).

2. 4. 3. 2. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline se sastoje od fenolnog jezgra i bočnog niza koji sadrži jedan (derivati benzoeve kiseline) ili tri (derivati cimetine kiseline) ugljenikova atoma. Fenolne kiseline obuhvataju hidroksi i druge funkcionalne derivate benzoeve i cimetine kiseline (Veličković, 2012).

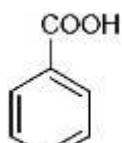
Pod pojmom “fenolna kiselina” podrazumeva se fenolno jedinjenje koje ima bar jednu karboksilnu grupu. Međutim, kada se govori o fenolnim kiselinama kao sekundarnim metabolitima biljaka, misli se na određenu grupu organskih kiselina koje se dalje prema svojoj strukturi dele na: derivate benzoeve i derivate cimetine kiseline (Slika 8) (Robbins, 2003). Obe grupe jedinjenja sastoje se od fenolnog jezgra i bočnog niza koji sadrži jedan (derivati benzoeve kiseline) ili tri (derivati cimetine kiseline) ugljenikova atoma.

Pored pomenutih kiselina u ovu grupu jednostavnih fenolnih jedinjenja spadaju i odgovarajući aldehidi. Derivati cimetine kiseline su u prirodi više rasprostranjeni, pa se tako kafena, *p*-kumarinska i ferulna kiselina nalaze u gotovo svim biljkama, dok se ostale fenolne kiseline vezuju za specifične biljne izvore.

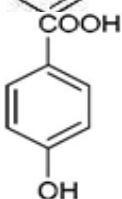
Slika 8. Strukture fenolnih kiselina (Robbins, 2003)

1. Derivati benzoeve kiseline

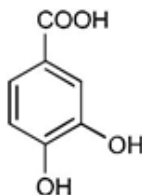
1.1. Benzoeva kiselina



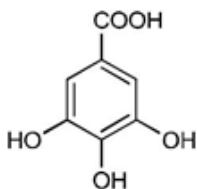
1.2. 4-hidroksibenzoeva kiselina



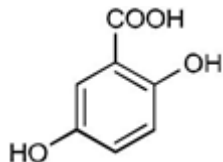
1.3. Prokatehinska kiselina



1.4. Galna kiselina

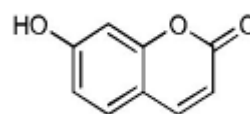


1.5. 2,5-dihidroksibenzoeva kiselina

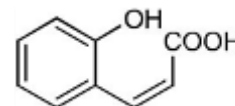


2. Derivati o-hidroksicimetine kiseline

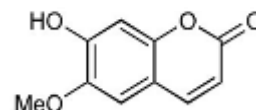
2.1. Umbeliferon



2.2. o-hidroksicimetna kiselina

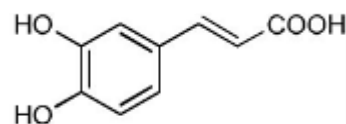


2.3. Skopoletin

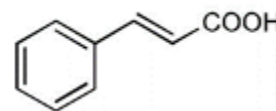


3. Derivati cimetine kiseline

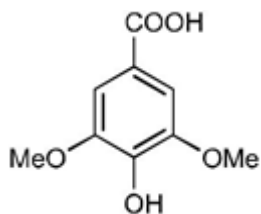
3.1. Kafena kiselina



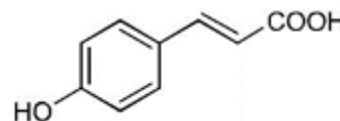
3.2. Cimetna kiselina



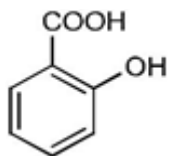
1.6. Siringinska
kiselina



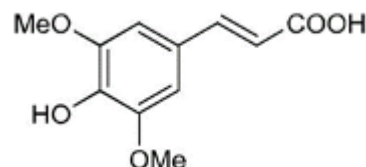
3.3. *p*-Kumarna kiselina



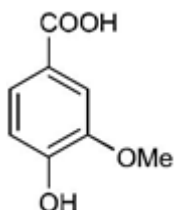
1.7. Salicilna
kiselina



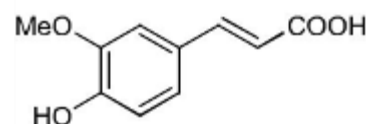
3.4. Sinapinska kiselina



1.8. Vanilinska
kiselina



3.5. Ferulna kiselina



2. 4. 3. 3. Tanini

Tanini predstavljaju složena polifenolna jedinjenja. Na osnovu strukturnih jedinica mogu se razdvojiti na:

- hidrolizujući (pirogalni) i
- kondenzovani (katehinski) tanini.

Biljke “bogate” taninima su veoma rasprostranjene u prirodi. Iako je velika pažnja posvećena njihovom istraživanju, termin ove polifenolne grupe je i dalje teško precizno definisati.

Obično se definišu kao polifenolne supstance rastvorljive u vodi koje imaju sposobnost vezivanja za proteine i formiraju nerastvorljive ili rastvorljive tanin-proteinske komplekse (Hasanpour i sar., 2011).

Takođe, tanini koji mogu da se vezuju sa složenim polisaharidima (celuloza, hemiceluloza i pektin) i nukleinske kiseline, steroidi, alkaloidi i saponini (Haslam, 1986; Chaichi Semsari i sar., 2011; Maheri-Sis i sar., 2011).

Hidrolizujući tanini su vrlo rasprostranjeni u biljnom svetu, a nalaze se u citoplazmi parenhimskih ćelija različitih biljnih organa i veće količine u biljkama igraju važnu ulogu zaštite od štetočina kao repelenti (Barbehenn i Constabel, 2011). Najviše ih ima u nezrelom voću.

Tanini u voću su gorkog ukusa, a osim u voću ima ih i u drugim biljkama i to najčešće u podzemnim organima .

Pomenute grupe tanina se razlikuju po molekularnoj težini i strukturi. Prema hemijskoj strukturi, to su molekuli koji sadrže ugljene hidrate, najčešće D-glukozu, kao centralno jezgro (Min i Hart, 2003). Hidrolizujuće grupe ovih ugljenih hidrata su esterifikovane sa fenolnim grupama, kao što su elaginska kiselina ili galna kiselina (Mangan, 1988; Haslem, 1989). Hidrolizujući tanini se obično nalaze u nižim koncentracijama u biljkama nego kondenzovani. Ova grupa tanina se još može podeliti na galotanine (galna kiselina) i na kafetanini (kafena i kininska kiselina) (Mangan, 1988).

Kondenzovani tanini (proantocijanidini) mogu biti:

- linerane strukture (veza između C4 i C8)
- razgranate strukture (veza između C4 i C6).

Proantocijanidini predstavljaju dimerne kondenzacione proizvode katehina, epikatehina i flavanola. Mogu biti vezani u obliku dimera (amentoflavin) ili polimerni (Popović, 2005) Polimerizacijom flavanola katehina najčešće 2 do 8 monomernih jedinica, nastaju proantocijanidini. Najzastupljeniji tip proantocijanidina u trnjini je tzv. tip A, koji je redak u ostalim biljkama, za razliku od znatno zastupljenijeg tipa B.

Nemaju svi fenoli antibiotsku ulogu, ali zato se njihovom oksidacijom i polimerizacijom stvaraju jedinjenja sa hinonidnim grupama koji stvaraju, tzv. melanine (slične taninima). Melanini daju crnu boju tkivu i predstavljaju čvrstu barijeru koja sprečava dotok neophodnih hranljivih materija za širenje patogena (Beckman i sar., 1974; Lattanzio i sar, 2006).

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Plodovi trešnje u odmaklim fazama sazrevanja podložniji su napadu bolesti. Ako se uzme u obzir da ranije sorte imaju tanju pokožicu, mekše meso i manje su otporne na trulež, dok kasnije sorte imaju deblju pokožicu i tvrđe meso (samim tim su otpornije na trulež), očekivan je kod inficiranih plodova različit sadržaj polifenola, kao i različita antioksidantna aktivnost. Prema literaturnim podacima, gubitkom „zaštitne barijere“ gubi se i otpornost na patogen. Fokus ovog rada je ispitivanje biohemijskog sastava ekstrakata devet odabranih sorti trešnje (u fiziološkoj zrelosti), kao i reakcija plodova trešnje na infekciju fitopatogenom gljivom *Monilinia laxa*. Ispitivanje hemijskog sastava plodova devet odabranih sorti različitog zdravstvenog stanja će ukazati na sličnost, odnosno, razliku u sastavu i sadržaju primarnih i sekundarnih metabolita ispitivanih sorti.

Specifični ciljevi ove disertacije predstavljeni su u sledećem:

- Cilj ovog rada bio je određivanje sadržaja rastvorljivih proteina, kao i aktivnost superoksid dismutaze (SOD), gvajakol-peroksidaze (GPx) i pirogalol-peroksidaze (PPx) u u neinokulisanim (zdravim) i inficiranim plodovima trešnje u fazi fiziološke zrelosti.
- Drugi cilj je bio određivanje integriteta ćelijskih membrana u neinokulisanim (zdravim) i inficiranim plodovima trešnje u fazi fiziološke zrelosti, tj. određivanje intenziteta lipidne peroksidacije.
- Sledeći cilj ovog rada bio je utvrđivanje razlika u primarnom metabolizmu (organske kiseline i šećeri) plodova devet sorti trešnje, kao i razlika između neinokulisanih (zdravih) i inficiranih plodova.
- Potom, cilj je bio identifikacija i određivanje sadržaja ukupnih i pojedinačnih polifenolnih komponenata (neenzimski antioksidantni sistem) neinokulisanih (zdravih) i inficiranih plodova trešnje fitopatogenom gljivom *M. laxa*.

- Sledeći cilj je procena antioksidantnog potencijala, odnosno ukupne neenzimske antioksidantne aktivnosti – DPPH test, FRAP test, ABTS test, TRC test (ukupni redukcionni kapacitet) neinokuliranih (zdravih) i inokuliranih plodova trešnje u fazi fiziološke zrelosti)
- Kao krajnji cilj bilo je testiranje korelacije između enzimskih i neenzimskih antioksidanata i antioksidantnih testova, kako bi se ustanovilo koji od testiranih parametara najviše doprinosi antioksidantnom kapacitetu, tj. antioksidantnoj aktivnosti zdravih i inficiranih plodova.

4. RADNA HIPOTEZA

Predmet ovog istraživanja predstavlja devet sorti trešnje (*Prunus avium* L.) iz različitih grupa zrenja i to: III/VAL (Valerij Čkalov), Burlat, Merchant, Priusadebnaja, Summit, Junska rana, Lionska rana, Sue i Asenova rana. Ispitivan je hemijski sastav i antioksidantna aktivnost zdravih i inficiranih sorti trešnje gljivom *Monilinia laxa* Aderh. i Ruhl.

S obzirom na to da se usled različitih odlika između sorti, kao i usled prisustva patogena očekuju promene u sadržaju proteina, šećera, organskih kiselina, fenola, enzimskih i drugih parametara, fokus ove disertacije usmeren je na ispitivanje uticaja biotičkog stresa kako na enzimske tako i na neenzimske antioksidante. Stoga, pažnja je pored sadržaja fenolnih komponenti usmerena i na praćenje aktivnosti antioksidantnih enzima, na rezultate antioksidantnih testova u zdravim i inficiranim plodovima, u cilju procene sposobnosti biljke da se izbori sa indukovanim stresom i kad je napadnuta od strane gljive.

Svi navedeni parametri su značajni zbog proizvodnje kvalitetnih konzumnih proizvoda ali i za selekciju i oplemenjivanje postojećeg sortimenta, kako bi se dobile tolerantnije sorte na određene patogene ovog popularnog voća.

5. MATERIJAL I METODE

5. 1. Biljni materijal

Biljni materijal korišćen u radu su devet sorti trešnje (*Prunus avium* L.). Sorte koje su korišćene u ovoj disertaciji, kao i njihove karakteristike prikazane su u Tabeli 5. One se međusobno razlikuju po sortimentu, zemlji porekla, periodu zrenja, obliku, masi ploda, boji soka, boji pokožice, boji mesa, čvrstoći mesa, osetljivosti prema pucanju. Uobičajen period zrenja sorte Burlat je 20. maj (Milatović i sar., 2015), i navedena sorta se koristi kao standard za određivanje vremena zrenja plodova.

Pet sorti trešnje spadaju u ranu grupu zrenja: Burlat, zatim Lionska rana i III/VAL (sazrevaju 2 dana nakon Burlata), Asenova rana i Junska rana (sazrevaju 5 dana nakon Burlata).

Dve ispitivane sorte su srednje rane: Merchant (sazreva 7 dana nakon Burlata), Priusadebnaja (sazreva 12 dana nakon Burlata).

Za razliku od prethodnih, dve sorte spadaju u kasnu grupu zrenja: Sue (sazreva 17 dana nakon Burlata), i Summit 14 dana nakon Burlata.

Sorte karakteriše različita boje pokožice koja varira od žute do tamno crvene boje. Žuta boja mesa sa ružičastim rumenilom odlikuje sorte: Priusadebnaja, Sue i Asenova rana. Crvene trešnje su: III/VAL, Burlat, Summit, Lionska rana, Merchant, Junska rana.

Tabela 5. Karakteristike ispitivanih sorti trešnje (Sawada, 1934; Belmans i sar., 1989; Fogle 1961; Yamaguchi i sar., 2002; Demirsoy i Demirsoy, 2004; Milatović i Đurović; 2010) (Objavljeno u Kiprovska i sar., (2018)

Sorta	Zemlja porekla	Period zrenja	Oblik ploda	Prosečna masa zdravog ploda (g)	Boja pokožice	Boja mesa	Boja soka	Čvrstoća ploda	Podložnost pucanju ploda
Burlat	Francuska	rana	bubrežast	7,0	crvena	jarko crvena	crvena	srednje čvrst	osetljiv
III/VAL (V. Čkalov)	Ukrajina	srednje rana	okrugao	8,0	crvena	crvena	crvena	mekan	-
Junska rana	Rusija	rana	okrugao	7,0	crvena	crvena	obojen	srednje čvrst	-
Lionska rana	Francuska	rana	srcast	5,0	crvena	crvena	obojen	srednje čvrst	veoma osetljiv
Priusadebnaja	Ukrajina	srednje rana	izduženo ovalan	7,0	žuto-crvena	jarko žuta	bezbojan	srednje čvrst	otporan
Sue	Kanada	srednje kasna	izduženo ovalan	6,5	žuto-crvena	jarko žuta	bezbojan	srednje čvrst	otporan
Merchant	SAD	srednje rana	izduženo ovalan	8,5	crvena	crvena	obojen	srednje čvrst	veoma osetljiv
Summit	Kanada	srednje kasna	srcast	9,0	crvena	jarko crvena	obojen	srednje čvrst	osetljiv
Asenova rana	Srbija	rana	okrugao-pljosnat	6,5	biserno žuta	beličasto-žuta	bezbojan	srednje čvrst	osetljiv

5. 2. Plan ogleđa

U okviru istraživanja, ogledi su izvođeni na dva načina u periodu od 2013-2015:

- u voćnjaku (na oglednom polju Instituta za voćarstvo i vinogradsrstvo na Rimskim Šančevima)
- u kontrolisanim uslovima (u laboratoriji za fitopatologiju Departmana za fitomedicinu i zaštitu životne sredine Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu; u biohemijskoj laboratoriji Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu; na Departmanu za agronomiju Biotehničkog fakulteta u Ljubljani).

Uzorkovanje zdravih i inficiranih plodova obavljeno je na lokalitetu Rimski Šančevi - Institut za Voćarstvo i vinogradstvo, Poljoprivredni fakultet Novi Sad, (koordinate 45°20'N, 19°51'E) u periodu od 2013-2015 god.

U sve tri ogledne godine je analizirana ocena intenziteta zaraze sorti trešnje na polju, a zdravi i inficirani plodovi su dalje ispitivani u biohemijskoj laboratoriji tokom oglednih 2013., 2014. i 2015. godine.

Veštačka inokulacija plodova i biohemijska analiza istih je vršena tokom 2014. i 2015. godine. HPLC analize vršene su tokom 2013. i 2014. godine.

Rezultati predstavljaju prosek dve, odnosno tri ispitivane istraživačke godine.

5. 3. Fitopatološka istraživanja

Uzorci zdravih plodova trešanja i uzorci sa simptomima mrke truleži sakupljani su tokom trogodišnjeg perioda od 2013. do 2015. godine u zasadu trešnje (*Prunus avium* L.) sa devet različitih sorti. Nakon sakupljanja, zdravi i zaraženi plodovi pakovani su pojedinačno u papirne kese, obeležavani i transportovani do Laboratorije za fitopatologiju Departmana za fitomedicinu i zaštitu životne sredine.

5. 3. 1. Izolacija gljive i veštačka inokulacija (provera patogenosti)

Prirodno inficirani plodovi trešnje (Slika 9 B) kao i zdravi plodovi koji su potom veštački inokulisani, bili u fazi fiziološke zrelosti. Prema Dhingra i Sinclair, (1995) iz sakupljenih inficiranih plodova obavljena je izolacija patogena primenom standardnih fitopatoloških metoda. Na prelazu između zdravog i inficiranog tkiva isecani su sitni fragmenti sterilnim skalpelom. Zbog prisustva saprofitnih mikroorganizama vršena je površinska dezinfekcija fragmenata rastvorom natrijum hipohlorita (2%) - (NaOCl, 1:1 komercijalna varikina) u trajanju od 3 min i preneti na sterilnu PDA podlogu (Muntañola-Cvetković, 1987).

Inokulacija je obavljena bušenjem sterilnom iglom zdravog ploda (Slika 9 A), a potom nanošenjem fragmenata (Slika 9 C) micelije izolata (prečnika 3 mm), uzetih sa ivice kolonija starosti sedam dana odgajenih na PDA podlozi, na prethodno površinski dezinfikovane zdrave plodove. Plod u kontroli je takođe bušen sterilnom iglom, a potom je nanošen fragment sterilne PDA podloge (Hrustić, 2013). Inokulisani plodovi inkubirani su u vlažnoj komori na temperaturi od 24 °C, a pojava simptoma posmatrana je i ocenjivana svakodnevno tokom 4 dana. Ogled je izveden u 5 ponavljanja, sa po 5 plodova po ispitivanoj sorti.

5. 3. 2. Dobijanje čistih kultura monosporijalnih izolata

Zasejane podloge na temperaturi od 24 °C inkubirane u mraku, do pojave kolonija gljiva. Radi dobijanja čistih kultura, nakon pojave micelije (3 dana po izolaciji gljive) fragmenti sa oboda kolonije su presejani na PDA podlogu. Dobijeni monosporijalni izolati su zatim presejani u epruvete sa zakošenom PDA podlogom i nakon razvoja kultura na temperaturi od 24 °C, čuvane u frižideru na temperaturi od 4 °C (Dhingra i Sinclair, 1995; Hrustić, 2013). Izolat M3B5 je korišten za veštačku inokulaciju plodova trešanja, a potom inficirani plodovi za biohemijske analize.



Slika 9. Vestačka inokulacija plodova trešnje (A), simptomi mrke truleži u uslovima prirodne infekcije (B) i simptomi mrke truleži nakon veštačke inokulacije izolatom M3B5 (C)

5. 3. 3. Karakteristike patogena *Monilinia laxa*

Identifikacija vrsta roda *Monilinia* moguća je na osnovu morfoloških makroskopskih osobina kolonija (boja, obod, prisustvo reznjeva, prisustvo sporulacije, pigmetacija) brzine porasta kolonije, oblika kolonija (Byrde i Willetts, 1977; Mordue, 1979; Batra, 1991; van Leeuwen i van Kesteren, 1998; De Cal i Melgarejo, 1999; van Leeuwen i sar., 2002; Lane, 2002) te su stoga navedeni parametri ispitivani kako bi se potvrdilo prisustvo gljive *M. laxa*.

Proučavanje morfoloških odlika obuhvatilo je proučavanje nekih makroskopskih odlika i mikroskopiranje odabranih izolata patogena. Makroskopske morfološke karakteristike svih dobijenih izolata proučavane su nakon inkubacije od 10 dana na PDA podlozi na temperaturi od 22 °C. Posmatrane su karakteristične osobine: boja kolonije, odlike ruba i oblik kolonije, sporulacija. Od mikroskopskih osobina odabranih izolata ispitivan je oblik konidija.

Na PDA podlozi, kod 9 (devet) od 54 (pedeset četiri) izabrana izolata gljive *M. laxa*, praćena je brzina porasta micelije nakon prvog, drugog, trećeg i četvrtog dana. Fragmenti micelije 9 odabranih izolata prečnika 3 mm, uzetih sa ivice sedam dana stare kolonije gljive gajene na PDA podlozi, nanošeni su na PDA podlogu u Petri kutijama prečnika 90 mm i inkubirani sedam dana na temperaturi od 24 °C.

Prečnik kolonije je meren u dva pravca pod pravim uglom i preračunavan je dnevni porast izolata. Ogled je izveden u četiri ponavljanja, a podaci su statistički obrađeni (Hrustić, 2013).

5. 3. 4. Ocene intenziteta zaraze

Na polju i u laboratorijskim uslovima su vršene ocene intenziteta zaraze plodova po sortama. Ocena intenziteta zaraze vršena je ocenama od 0 do 4 (Peterson i sar, 1948) (Tabela 6). Ocnom 0 ocenjivani su plodovi na kojima nisu mogli da se zapaze simptomi zaraze, a ocenom 4 potpuno zaraženi plodovi.

Tabela 6. Skala ocene intenziteta zaraze gljivom *Monilinia laxa*

Ocena inteziteta zaraze	Intenzitet zaraze ploda
0	nema zaraze
1	0-25%
2	25-50%
3	50-75%
4	75-100%

5. 4. Biohemijski pokazatelji analiziranih plodova trešnje na infekciju patogenom *Monilinia laxa*

Plodovi su sakupljani za inokulaciju u fazi fiziološke zrelosti, a biohemijske analize su vršene kako na zdravim, tako i na zaraženim plodovima trešnje.

5. 4. 1. Određivanje sadržaja proteina i aktivnosti antioksidantnih enzima u plodovima trešnje

5. 4. 1. 1. Priprema ekstrakata za određivanje proteina i enzima

Ekstrakti svežeg biljnog materijala (zdravi i zaraženi plodovi) za određivanje proteina i antioksidantnih enzima dobijeni su homogenizacijom 1 g svežeg biljnog materijala u avanu uz dodatak 10 mL 0,1 mol/L KH_2PO_4 pufera (pH 7). Homogenat je, nakon homogenizacije kvantitativno prenet u plastičnu epruvetu. Dobijeni ekstrakti su centrifugirani na 2500 x g, 20 min. Za određivanje proteina i enzima, supernatant je korišćen kao uzorak.

5. 4. 1. 2. Određivanje sadržaja proteina

Sadržaj rastvorljivih proteina određen je metodom po Bradfordu (1976). Ova metoda se zasniva na vezivanju boje Coomassie brilliant blue G-250 za bazne i aromatične ostatke aminokiselina u proteinu. Prema Niketić i Nikolić (2008), boja postoji u tri oblika, kao katjon (crvena), neutralan molekul (zelena) i anjon (plava).

U pH sredini ispod pH 7 dominira protonovana katjonska forma sa maksimumom apsorpcije na 465 nm. Kada se boja veže za protein, prelazi u stabilan neprotonovani oblik plave boje sa maksimumom apsorpcije na $\lambda=595$ nm.

Reakcionu smešu radne probe su činili:

- 1 mL 0,07 mol/L rastvora boje Coomasie brilliant blue G-250 u 3 % HClO_4 20 μL uzorka (ekstrakt svežeg biljnog materijala).

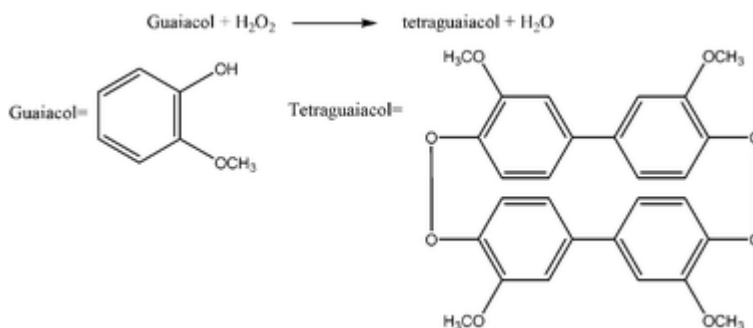
Apsorbanca na $\lambda=595$ nm je očitana nakon 5–30 min. Sadržaj proteina određen je na osnovu kalibracione krive dobijene merenjem različite koncentracije standardnog rastvora albumina (0,007–1,000) mg/mL.

Koncentracija proteina u uzorku izražena je kao mg proteina po gramu svežeg biljnog materijala (mg proteina/g sv.m.).

5. 4. 1. 4. Određivanje aktivnosti gvajakol peroksidaze (GPx)

Aktivnost gvajakol-peroksidaze (GPx, EC 1.11.1.7) u ekstraktima zdravih i zaraženih plodova trešnje određena je metodom po Morkunas i Gmerek (2007).

Reakcioni pufer za merenje aktivnosti GPx sadži 3 mL 20 mM gvajakol i 0,02 mL 3 mM H₂O₂ (pH 5,5). U 3 mL reakcijskog pufera dodano 20 μL enzimskog ekstrakta, čime započinje enzimski reakcija. Porast apsorbancije meren tokom 1 min pri talasnoj dužini od 430 nm. Na porast apsorbance utiče oksidacija gvajakola pri čemu nastaje smeđe obojen proizvod tetragvajakol (Slika 11).



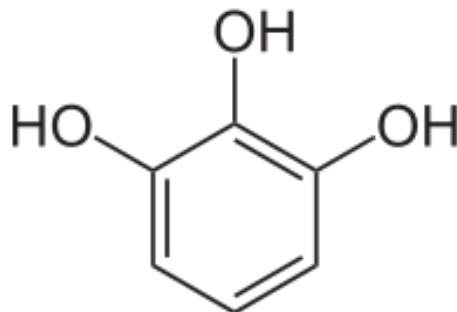
Slika 11. Reakcija oksidacije gvajakola

Svaki je uzorak meren u triplikatu. Apsorbanca je očitavana nakon svakog dodavanja H₂O₂ u intervalu od po 1 min. Aktivnost GPx je izražena kao broj U (μmol GV/min) po 1 mg proteina (U/mg proteina).

5. 4. 1. 5. Određivanje aktivnosti pirogalol peroksidaze (PPx)

Aktivnost pirogalol peroksidaze (PPx, EC 1.11.1.7) u ekstraktima zdravih i zaraženih plodova trešnje određena je metodom po Morkunas i Gmerek (2007).

Ova metoda uključuje merenje sadržaja purpurogalina - proizvoda pirogalolne oksidacije (Slika 12). U ovoj reakciji pirogalol sa vodonik peroksidom daje purpurogalin i 2 molekula H₂O.



Slika 12. Strukturna formula pirogalola

Ekstrakt enzima (0.02 mL) je dodan u reakcionu smešu za analizu koja sadrži 3 mL 180 mM pirogalola i 0,02 mL 2 mM H₂O₂.

Apsorbanca je merena na 430 nm spektrofotometrijski. Aktivnost PPx je izražena kao U po 1 mg proteina (U/mg proteina).

5. 4. 1. 6. Intenzitet lipidne peroksidacije

Kao mera intenziteta lipidne peroksidacije (LP) koristi se količina malondialdehida (MDA) koji je jedan od krajnjih proizvoda enzimske degradacije polinezasićenih masnih kiselina u ćelijama.

Ovaj sekundarni proizvod oksidacije polinenasićene masne kiseline reaguje sa dva molekula tiobarbiturne kiseline (TBA) u prisustvu katalizatora koja daje roze-crvenu boju sa maksimumom apsorbanca na 532 nm (Hodges i sar., 1999).

Ovaj test je popularan zbog jednostavnosti i brzine kojim se može obrađivati veliki broj uzoraka za kratko vreme. Intenzitet LP se meri spektrofotometrijski.

Za ovaj test je korišćen svež biljni materijal – zdravi i zaraženi plodovi trešnje. Plodovi su prvo homogenizovani u avanu sa tučkom i zatim ekstrahovani u 10% trihlorsirćetnoj kiselini (TCA) u odnosu 1:5 (v/v) i centrifugirani na 12000 x g tokom 30 min na 4 °C.

Reakcionu smešu radne probe su činili:

- 0,5 mL supernatanta
- 4,5 mL rastvora za LP

Reakcioni medijum je zagrevan 30 min na 90 °C na vodenom kupatilu, ohlađen na ledu 10 min i centrifugiran 10 min na 1500 x g.

Apsorbancija je merena na 532 nm i intenzitet lipidne peroksidacije je izražen kao nmol MDA/g sveže materije (nmol MDA/g sv.m.).

Rastvori i reagensi:

TCA – trhlorsirćetna kiselina (100 g CCl_3COOH + 500 mL H_2O)

TBA – tiobarbiturna kiselina (1 g TBA + 100 mL 10% HClO_4)

Odnos koji je korišćen pri pravljenju rastvora za LP:

(20% TCA (100 g CCl_3COOH + 500 mL H_2O) : 0,5% TBA (1 g TBA + 100 mL 10 % HClO_4) = 3 : 1)

5. 4. 2. Određivanje sadržaja šećera i organskih kiselina u plodovima trešnje

Ekstrakcija šećera i organskih kiselina je izvedena u pet ponavljanja po sorti (n = 5), s tim da je u svako ponavljanje uključeno deset plodova. Plodovi trešnje su liofilizirani u liofilizatoru (Martin Christ, Germany), zatim su usitnjeni u avanu sa tučkom uz dodatak tečnog azota, nakon čega je odmereno 0,15 g biljnog materijala i dodato 5 ml redestilovane vode (koristeći Ultra-Turrax T-25; Ika-Labortechnik). Rastvori su mešani na mućkalici 30 min na sobnoj temperaturi (Mikulić-Petkovsek i sar., 2012). Nakon ekstrakcije, homogenat je centrifugiran (Eppendorf Centrifuge 5810 R na 12000 x g u trajanju od 7 min na 10 °C), potom filtriran kroz 0,20 µm filter od mešanih celuloznih estara (Macherey-Nagel, Düren, Nemačka) i prebačen u viala.

Analiza primarnih metabolita (20 µL uzorka) izvedena je pomoću tečnog hromatografa visoke efikasnosti (HPLC). Odvajanje šećera izvršeno je pomoću kolone Rezex RCM-monosaharida Ca + (2%) (300 mm x 7,8 mm) od Phenomenex-a, na 65 °C. Mobilna faza je bila redestilovana voda sa brzinom protoka 0,6 mL/min. Ukupno vreme rada je bilo 30 min, a detektor refraktivnog indeksa (RI) korišćen je za detekciju eluiranih ugljenih hidrata (Mikulić-Petkovšek i sar., 2012).

Sadržaj organskih kiselina u plodovima trešnje takođe je analiziran HPLC sistemom. HPLC sistem je opremljen UV detektorom - podešen na 210 nm, uz korišćenje Rezex ROA - organic acid H⁺ (8%) kolone (300 mm x 7,8 mm) - Phenomenex-a. Temperatura kolone je

podešena na 65 °C, a rastvarač za eluiranje je bila 4 mM sumporna kiselina u redestilovanoj vodi (30 min), sa brzinom protoka od 0,6 mL/min (Mikulić-Petkovšek i sar., 2012).

Koncentracija šećera i kiselina za svaku sortu izračunata korišćenjem kalibracione krive odgovarajućih standarda i izražene su g/kg suve mase (s.m.).

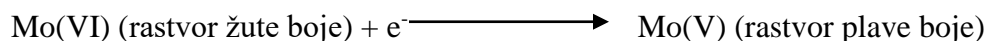
5. 4. 3. Određivanje sadržaja polifenola u plodovima trešnje

5. 4. 3. 1. Priprema ekstrakata za spektrofotometrijsko određivanje polifenola i antioksidantnih testova

Liofilizirani plodovi trešanja (1 g po uzorku) spraseni su pomoću avana i tučka, uz dodatak tečnog azota, i ekstrahovani sa 70% rastvorom acetona (50 mL), odnosno metanola, zatim je prebačen na 60 min u ultrazvučno kupatilo napunjeno ledom. Nakon centrifugiranja (1960 x g 10 min) filtracije kroz membranski filter za špric od poliamida, ekstrakti čuvani u zamrzivaču na temperaturi od -20 °C.

5. 4. 3. 2. Određivanje sadržaja ukupnih fenola

Sadržaj ukupnih fenola određen je spektrofotometrijski pomoću Folin-Ciocalteu reagensa. Ova metoda se zasniva na merenju redukcionog kapaciteta neenzimskih antioksidanata - fenola (Reakcija 4). Fenoli disosuju do fenoksi anjona koji dalje redukuje Folin-Ciocalteu reagens do jona plave boje (Hagerman i sar., 2000; Kroyer, 2004).



Reakcija 4. Mehanizam redukcionog kapaciteta neenzimskih antioksidanata – fenola

Reakcionu smešu radne probe su činili:

- 3,36 mL destilovane vode,
- 200 µL 33% rastvora Folin-Ciocalteu,

- 20 μ L acetonskog ekstrakta ploda trešnje (osim u slepu probu gde je dodato 20 μ l acetona)
- 400 μ L rastvora Na_2CO_3 .

Nakon 60 min očitana je apsorbanca na $\lambda = 720$ nm. Za konstruisanje kalibracione krive korišćena je serija razblaženja galne kiseline u vodi, koja pokriva opseg koncentracije između 0,1 i 1 mg/mL. Sadržaj ukupnih fenola u ispitivanim ekstraktima izražen je kao mg ekvivalenata galne kiseline po g suve mase biljnog materijala (mg GAE/g s.m.).

Rastvori i reagensi:

- a) 20% Na_2CO_3 .
- b) Folin-Ciocalteu reagens (sadrži natrijum-volframat, natrijum-molibdat, brom, 85% H_3PO_4 , conc. HCl, Li_2SO_4).
- c) Standardni rastvor galne kiseline: 1 mg/mL u vodi.

5. 4. 3. 3. Određivanje sadržaja ukupnih tanina

Sadržaj ukupnih tanina određen je postupkom koji se koristi za određivanje ukupnih fenola, a to je postupak Folin-Ciocalteu (Hagerman i sar., 2000; Kroyer, 2004). Najpre je izvršeno uklanjanje tanina njihovom adsorpcijom na nerastvornom matriksu PVPP (polivinilpolipirolidon). Supernatant je dobijen centrifugiranjem (1960 x g 10 min) reakcione smeše koju su činili polivinilpolipirolidona (PVPP) – 0,1 g, 1 mL H_2O i 1 mL acetonskog ekstrakta ploda trešnje.

Reakcionu smešu radne probe su činili:

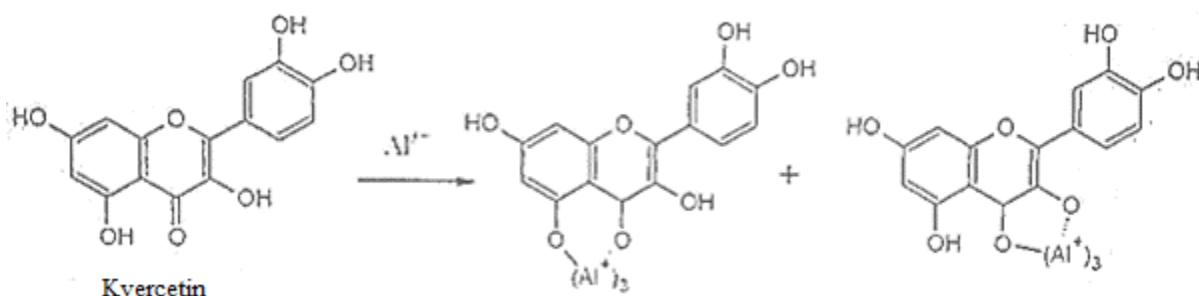
- 3,36 mL destilovane vode,
- 200 μ L 33% rastvora Folin-Ciocalteu,
- 40 μ L supernatanta (osim u slepu probu gde je dodato 20 μ L acetona) i
- 400 μ L rastvora Na_2CO_3 .

Kao i kod određivanja fenola, nakon 60 min očitana je apsorbancija na $\lambda = 720$ nm. Kako su tanini vezani pomoću PVPP (taloženjem) u talogu, određen je sadržaj fenola bez tanina u supernatantu. Iz razlike sadržaja ukupnih fenola i netaninskih fenola dobijen je sadržaj ukupnih tanina u uzorku.

Za konstruisanje kalibracione krive korišćena je serija razblaženja galne kiseline u vodi, koja pokriva opseg koncentracije između 0,1 i 1 mg/mL. Sadržaj ukupnih tanina u ispitivanim ekstraktima izražen je kao mg ekvivalenata galne kiseline po g suve mase biljnog materijala (mg GAE/g s.m.).

5. 4. 3. 4. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida

Sadržaj ukupnih flavonoida u acetonskim ekstraktima plodova trešnje određen je spektrofotometrijski (Markham, 1989). Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida zasniva se na osobini da sa metalima daju odgovarajuće metalo-komplekse. Na Slici 13. je prikazan aluminijum kompleks (Al^{3+} kompleks). Važna odlika ovog kompleksa je lako vezivanje za ukupne flavonoide, pa se sumarni apsorpcijski maksimum lako određuje ovom metodom.



Slika 13. Reakcija helatizacije Al^{3+} sa kvercetinom

Reakcionu smešu radne probe su činili:

- 0,3 mL uzorka (acetonski ekstrakt plodova trešnje),
- 2,5 mL H_2O
- 1 mL rastvora $AlCl_3$ (u slepu probu se dodaje destilovana H_2O).

Nakon mešanja i centrifugiranja 15 min na 1960 x g, apsorbance je očitana na $\lambda=430$ nm. Izračunavanje sledi iz kalibracione krive zavisnosti apsorbance i različitih koncentracija standarda rutina. Kalibraciona kriva je konstruisana pomoću serije razblaženja rutina u 70% acetonu (0,1 do 1 mg/mL). Iz kalibracione krive standarda rutina izračunat je sadržaj flavonoida u ispitivanim ekstraktima i izražen kao mg ekvivalenata rutina po g suve mase biljnog materijala (mg rutina/g s.m.).

5. 4. 3. 5. Određivanje sadržaja kondenzovanih tanina (proantocijanidina)

Sadržaj ukupnih proantocijanidina određen je u acetonskom ekstraktu zdravih i zaraženih plodova trešnje spektrofotometrijski. Metoda se zasniva se na oksidativnoj depolimerizaciji kondenzovanih tanina (proantocijanidina) sa butanol - HCl reagensom (Hagerman, 1995).

Reakcionu smešu radne probe su činili:

- 3 mL butanol-HCl reagens (95/5, v/v), - pomešano 950 mL butanola sa 50 mL cc HCl (37%)
- 0,1 mL feri reagens (2% feri-amonijum sulfat u 2M HCl) i
- 0,4 ml acetonskog ekstrakta, s tim da je u slepu probu dodavan 70% aceton.

Epruvete se nakon mešanja postavljane na ključalo vodeno kupatilo 60 min (osim epruvete slepe probe koje nisu zagrevane). Nakon hlađenja, apsorbance su očitane na $\lambda=550$ nm. Izračunavanje je sledilo iz kalibracione krive zavisnosti apsorbance i različitih koncentracija standarda leukoantocijanidina. Količina proantocijanidina izražena je u mg leukoantocijanidina po g suve mase biljnog materijala (mg leukoantocijanidina/g s.m.).

5. 4. 3. 6. Određivanje sadržaja ukupnih antocijanina

Određivanje sadržaja ukupnih antocijanina izvodi se pH diferencijalnom metodom (Cheng i Breen, 1991). Princip ove metode zasniva se na osobini antocijanina da menjaju svoju strukturu pri promeni pH sredine. Pri tome dolazi do promene apsorpcionog spektra. Pri pH vrednosti 1,0 su crveno obojeni (u obliku oksonijum jona), a pri pH 4,5 bezbojni (poluketalni oblik).

Reakcionu smešu radne probe su činili:

- 400 µL acetonsog ekstrakta je pomešano sa puferom 1 (3 mL) u jednoj epruveti i
- 400 µL ekstrakta sa puferom 2 (3 mL) u drugoj epruveti. Nakon 20 min inkubacije, apsorbance su izmerene pomoću spektrofotometra na 520 nm i 700 nm (zbog korekcije zamućenja).

Reagensi:

1. 0,025 mol/L kalijum-hloridni pufer, pH = 1,0
2. 0,4 mol/L natrijum-acetatni pufer, pH = 4,5.

Koncentracija ukupnih antocijanina u uzorku izračunava se kao ekvivalent cijanidin-3-glukozida (C3G).

5. 4. 3. 7. Određivanje sadržaja polifenolnih komponenti

Liofilizirani plodovi trešnje su usitnjeni u avanu sa tučkom uz dodatak tečnog azota, nakon čega je odmereno 0,15 g biljnog materijala i ekstrahovano sa 3 mL metanola koji sadrži 3% (v/v) mravlje kiseline i 1% (w/v) 2,6-di-terc-butil-4-metilfenola (BHT) u ultrazvučnom kupatilu sa ledom u trajanju 1 h. BHT je dodat da bi se sprečila oksidacija.

Ekstrakti su zatim centrifugirani 10 min na 10.000 x g (na 10 °C). Svaki supernatant je filtriran kroz poliamidni filter Chromafil AO-20/25 (Macherey-Nagel, Düren, Nemačka) i prebačen u u viala pre injektiranja u HPLC sistem Thermo Finnigan Surveior (Thermo Scientific, San Jose, SAD) sa DAD detektorom.

Spektri jedinjenja su zabeleženi između 200 i 600 nm, a hromatogrami su snimljeni na 280, 350 i 530 nm. Upotrebljena je kolona Gemini C18 (150 × 4.6 mm 3 µm; Phenomenex, Torrance, SAD) na temperature od 25 °C. Eluenti su bili 0,1% mravlja kiselina u redestilovanoj vodi (faza A) i 0,1% mravlja kiseline u acetonitrilu (faza B).

Uzorci su eluirani prema linearnom gradijentu od 5% do 20% B u prvih 15 min, praćen linearnim gradijentom od 20% do 30% B tokom 5 min, zatim izokratičnom smešom 5 min, nakon čega sledi linearni gradijent od 30% do 90% B u trajanju od 5 min, a zatim izokrasku mešavinu 15 min pre nego što se vrati u početne uslove (Wang i sar., 2002).

Količina injekta iznosila je 20 μL i protok 0.6 mL/min. Svi predstavljeni rezultati fenolnih komponenti identifikovani su pomoću HPLC-Finnigan MS detektora i instrumenta LCK Deca KSP MAKS (Thermo Finnigan, San Jose, CA) sa elektrosprejskim interfejsom (ESI).

U pogledu polifenola, elektrosprejski interfejs funkcioniše na dva načina: pozitivni jonski režim (za antocijanine) i negativni (druge fenolne grupe i cijanogeni glikozidi) jonski režim.

Analize su sprovedene korišćenjem potpunog MSⁿ skeniranja (skenirano za m/z - 110 do 1500). Kolona i hromatografski uslovi bili su identični onima koji su korišćeni za HPLC-DAD analizu. Zapremina ubrizgavanja je bila 10 μL , a protok održavan na 0,6 mL/min. Kapilarna temperatura bila je 250 °C, gasni omotač i pomoćni gas karakterisao je 60 i 15 jedinica, izvorni napon je bio 3 kV za negativnu jonizaciju, a 4 kV za pozitivnu jonizaciju i normalizovana energija sudara bila je između 20-35%.

Spektralni podaci su razrađeni pomoću softvera Excalibur (Thermo Scientific). Identifikacija jedinjenja potvrđena je upoređivanjem vremena zadržavanja i njihovih spektara, dodavanjem standardnog rastvora uzorku kao i fragmentacijom. Koncentracije fenolnih jedinjenja su izračunate iz vršnih područja uzorka i odgovarajućih standarda i izražene u mg/kg suve materije (s.m.) ploda trešnje. Za jedinjenja koja nemaju standarde, kvantifikacija je izvršena korišćenjem sličnih jedinjenja kao standarda.

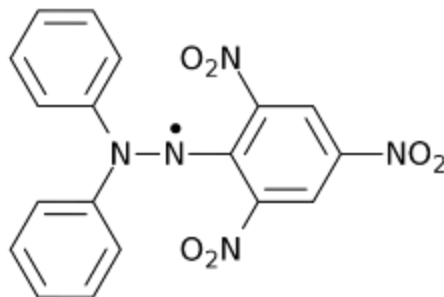
Uzorci bez BHT su pripremljeni uporedo, i u njima je određen sadržaj ukupnih fenola po već pomenutoj metodi Folin-Ciocalteu, kako bi se uporedio sadržaj sa prethodno utvrđenim acetonskim ekstraktom. Sadržaj ukupnih fenola izražen je kao ekvivalent galne kiseline (GAE) u mg/kg s.m.

5. 4. 4. Određivanje antioksidantnog kapaciteta ekstrakata plodova trešnje

5. 4. 4. 1. Određivanje neutralizacije DPPH[•] radikala

Metoda se zasniva na određivanju antioksidativne aktivnosti pomoću stabilnog slobodnog radikala 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH, C₁₈H₁₂N₅O₆, M = 394,33) (Slika 14). Princip DPPH

metode je da antioksidanti reaguju sa slobodnim DPPH radikalom (rastvor obojen ljubičasto) i prevode ga u bezbojni DPPH-H (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) (Ramalakshmi i sar., 2009). Step en obezbojavanja ukazuje na antioksidativni potencijal ekstrakata. DPPH rastvor u reakciji sa supstancom koja može da donira atom vodonika dovodi do gubitka ljubičaste boje.



Slika 14. Strukturna formula molekula DPPH

Ova metoda je brza, jednostavna, jeftina i široko se koristi za merenje sposobnosti jedinjenja da deluju kao slobodni radikali ili donori vodonika, kao i da procene antioksidativnu aktivnost hrane (Prakash, 2001; Sendra i sar., 2006). Antioksidantna analiza drugim metodama može biti ograničena na ona jedinjenja koja su rastvorljiva u odabranim rastvaračima. Prema Prior i sar., 2005, DPPH metoda se može koristiti u vodenim i nepolarnim organskim rastvaračima i može se koristiti za ispitivanje hidrofilnih i lipofilnih antioksidanata .

Reakcionu smešu radne probe su činili:

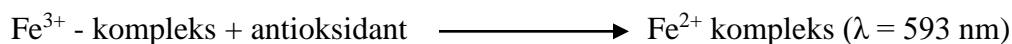
- 3 mL DPPH reagensa i 60 μ L acetonskog ekstrakta

Nakon 30 min očitana je apsorbanc na $\lambda = 517$ nm. Aktivnost uklanjanja DPPH-radikala izražena je u % neutralisanih radikala.

5. 4. 4. 2. Ispitivanje redukcion e sposobnosti ekstrakata FRAP metodom

FRAP test je korišćen za određivanje sadržaja određenih supstanci u krvnoj plazmi, ali je kasnije našao primenu i za određivanje antioksidativnog kapaciteta biljnih ekstrakata (Magalhaes i sar., 2008; Benzie i Strain, 1996). Doniranjem elektrona od strane antioksidanta dolazi do redukcije kompleksa feri-tripiridiltriazina [Fe^{3+} -TPTZ] do intezivnog plavog kompleksa fero-tripiridiltriazina [Fe^{2+} -TPTZ] pri malim pH vrednostima (Reakcija 5). Reakcija se

spektrofotometrijski prati na 593 nm (maksimum apsorpcije redukcionog proizvoda) (Benzie i Strain, 1996; Huang i sar., 2002)



Reakcija 5. Redukcija gvožđa u prisustvu antioksidanta

Reakcionu smešu radne probe su činili:

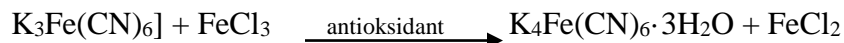
- 3 mL FRAP reagensa i
- 60 μL uzorka (acetonski ekstrakt).

Rastvori i reagensi: 300 mmol/L acetatni pufer pH=3,6. (Rastvor 1), 10 mmol/L TPTZ (tripiridiltriazin) u 40 mmol/L HCl. (Rastvor 2), 20 mmol/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ u H_2O . (Rastvor 3). FRAP reagens se dobija mešanjem tri rastvora u odnosu 10 : 1 : 1.

Apsorbance su očitane na $\lambda = 593$ nm. Redukcioni potencijal izračunat je na osnovu kalibracione krive standardnog rastvora Troloxa (1 mg/mL), konstruisane pomoću serije razblaženja Troloxa u vodi. Rezultat je izražen kao mg ekvivalenata troloxa po g svežeg biljnog materijala (mg Troloxa/g sv.m.).

5. 4. 4. 3. Ispitivanje ukupne redukcione moći ekstrakata (TRC test)

Test ukupne redukcione moći ekstrakata, TRC test je određen metodom po Oyaizu (1986). Ovaj metod se zasniva na sposobnosti antioksidanata da redukuju Fe (III) heksacijanat u Fe (II) heksacijanat (reakcija sa metalnim jonima) koji dovodi do povećanja apsorbanse reakcionih smeša. Kalijum fericijanid u reakciji sa gvožđe (III) hloridom pod dejstvom antioksidanta daje kalijum ferocijanid i gvožđe (II) hlorid (reakcija 6).



Reakcija 6. Redukcija Fe (III) heksacijanata u Fe (II) heksacijanat

Reakcionu smešu radne probe su činili:

- 100 μL ekstrakta acetona
- 2 mL 1% rastvora $\text{K}_3 [\text{Fe} (\text{CN})_6]$,
- fosfatni pufer i

- H₂O.

Smeša je inkubirana na 50 °C, 30 min, zatim je dodat rastvor trihlorsirćetne kiseline (10%) i FeCl₃. Apsorbanca dobijenih smeša je merena na talasnoj dužini 700 nm. Redukcioni potencijal izračunat je na osnovu kalibracione krive standardnog rastvora Troloxa, konstruisane pomoću serije razblaženja Troloxa u vodi 1 mg/mL. Rezultati su izraženi kao mg ekvivalenta Troloxa/g sveže materije (mg Troloxa/g sv.m.).

Rastvori i reagensi:

Kalijum - fericijanid (1% w/v),

Fosfatni pufer (0,2 M, pH 6,6),

Trihlorsirćetna kiselina (10%),

Gvožđe hlorid (0,1%),

Standardni rastvor Trolox-a: 1 mg/mL u vodi.

5. 4. 4. 4. Ispitivanje sposobnosti neutralizacije ABTS^{•+} radikala

Za procenjivanje antioksidantnog kapaciteta, pored DPPH metode korišćena i ABTS metoda. Obe metode karakteriše “prikupljanje” slobodnih radikala, jer su njihovi mehanizmi delovanja slični. Važna osobina ABTS-a je da se dobro rastvara kako u vodi tako i u organskim rastvaračima i reaguje relativno brzo.

DPPH metoda nije uvek precizna, posebno kada biljni materijal sadrži antocijanine, što nije slučaj sa ABTS testom, naročito kada se apsorpcija meri na 734 nm (Arnao, 2000). Antioksidativna aktivnost u uzorcima izražava se u mg ekvivalentima Troloxa (mg Troloxa/mL). Dobija se tako što su koncentracije dobijene na osnovu kalibracione krive Troloxa pomnožene sa faktorom razblaženja.

Sposobnost ekstrakata ispitivanih biljnih vrsta da neutrališu radikal-katjon β,β'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline), ABTS^{•+}, merena je prema metodi Re i sar. (1999).

Reakcionu smešu radne probe su činili:

- 3 mL ABTS reagensa i

-100 μL acetonskog uzorka.

Apsorbance su očitane na $\lambda = 734$ nm. Kalibraciona kriva je konstruisana pomoću serije razblaženja Troloxa u vodi, 0,01 do 0,50 mg/mL počevši od osnovnog rastvora. Aktivnost uklanjanja ABTS^{•+} radikala izražena je u mg ekvivalenata Troloxa po g sveže biljne matere (mg Troloxa/g sv.m.).

Rastvori i reagensi:

- a) ABTS^{•+} je dobijen u reakciji 7,4 mmol/L vodenog rastvora β, β' -azino-bis-(3etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) (ABTS^{•+}) sa 2,6 mmol/L K₂S₂O₈ u mraku na sobnoj temperaturi, u trajanju od 12 h.
- b) Standardni rastvor Trolox-a.

5. 5. Statistička obrada podataka

Podaci su statistički obrađeni pomoću programa Statistika for Windows verzija 13. Urađena je analiza varijanse (ANOVA), a značajnost razlika među ispitivanim sortama testirana je korišćenjem Duncan testa, dok je razlika između zdravog i inficiranog ploda testirana *t*-testom za sve analizirane parametre. Razlika je smatrana statistički značajnom za nivo značajnosti $P < 0,05$. Vrednosti su bile izražene kao srednja vrednost \pm standardna greška. Međusobna zavisnost pojedinačnih antioksidanata i antioksidantnih testova analizirana je pomoću standardne korelacione analize, a rezultati su prikazani koeficijentom korelacije (*r*). Značajnost korelacije testirana je *t*-testom ($P < 0,05$).

6. REZULTATI I DISKUSIJA

6. 1. Fitopatološka istraživanja

6. 1. 1. Simptomi mrke truleži (*Monilinia laxa*)

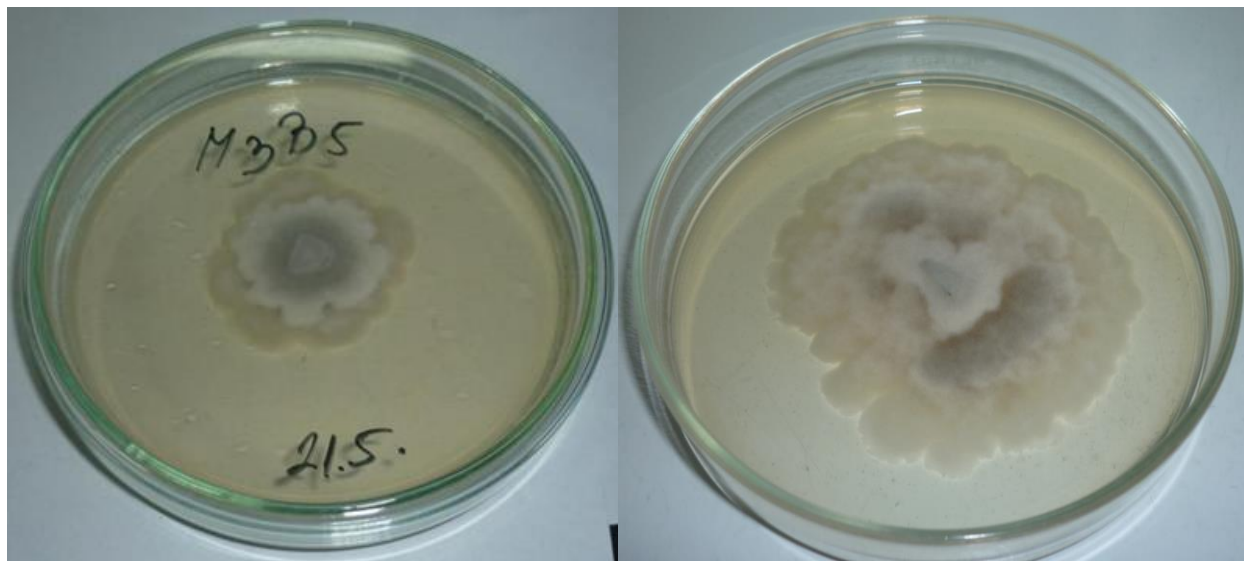
Svi plodovi inficirani gljivom *M. laxa* i u prirodnoj infekciji i u uslovima veštačke inokulacije pokazivali su znake truleži. Kod zaraženih sorti meso ploda je bilo mekše u odnosu na zdrave. Plesan ploda mogla se videti na mestima infekcije, uglavnom u obliku okruglih “ispupčenja”, koja su prekrivala plod u potpunosti ili delimično. Pege su se formirale koncentrično sa razvojem bolesti, a u uslovima viših temperatura vazduha i vlažnosti vazduha, mrka trulež pokrivala je čitav plod. Tipično, patogen prodire u pukotine na pokožici (Hrustić i sar., 2012), međutim infekcija se razvijala i na zdravim plodovima koji su bili u kontaktu sa zaraženim. Trogodišnje istraživanje je pokazalo da zaraženi plodovi otpadaju, postaju truli ili se samo osuše i ostanu na granama tokom zime. Gljiva prezimljava u obliku micelije u “mumijama” ili u zaraženim grančicama. Lokalno, konidije (Slika 16) igraju ključnu ulogu u razvoju inicijalnih infekcija i njihovog širenja. Kao što je već napomenuto, apotecije i askusi sa askosporama, tj. savršeni stadijum se retko javlja u prirodnim uslovima (Balaž i sar, 2012).

6. 1. 2. Provera patogenosti

Patogenost izolata proverena je svih 9 sorti trešnje inokulacijama plodova u fiziološkoj zrelosti. Kao negativna kontrola, korišćeni su takođe plodovi navedenih sorti inokulisani na isti način - fragmentom sterilne podloge.

Provera patogenosti izolata *M. laxa* izvršena je primenom veštačke inokulacije sa biljke domaćina sa kojih su izolovan patogen. Izolat M3B5 (Slika 15) je dva dana nakon inkubacije na temperaturi od 24 °C prouzrokovalo trulež tkiva svetlo smeđe boje, karakterističan za rod *Monilinia*. Od mesta inokulacije trulež se širila zahvatajući kako pokožicu, tako i mezokarp ploda. Nekrotirane površine su u završnoj fazi oboljenja prekrivene sivkastom prevlakom konidiofora i konidija parazita. Na plodovima koji su inokulisani sterilnim fragmentom PDA podloge (negativna kontrola) nije došlo do pojave simptoma truleži niti je bilo kakvih drugih promena.

Sa inokulisanih plodova obavljena je reizolacija patogena i reizolati su upoređeni sa izolatom korišćenim za inokulaciju. Dobijeni reizolati po izgledu kolonije i morfologiji reproduktivnih tvorevina u potpunosti su odgovarali izvornom izolatu čime je potvrđena patogenost izolata i ispunjeni Kohovi postulati. Uočena je razlika u intenzitetu zaraze na plodovima trešnje inokulisanim gljivom *M. laxa*, kao i porast micelije u zavisnosti od sorte sa koje potiče izolat.



Slika 15. Izolat M3B5 na PDA podlozi

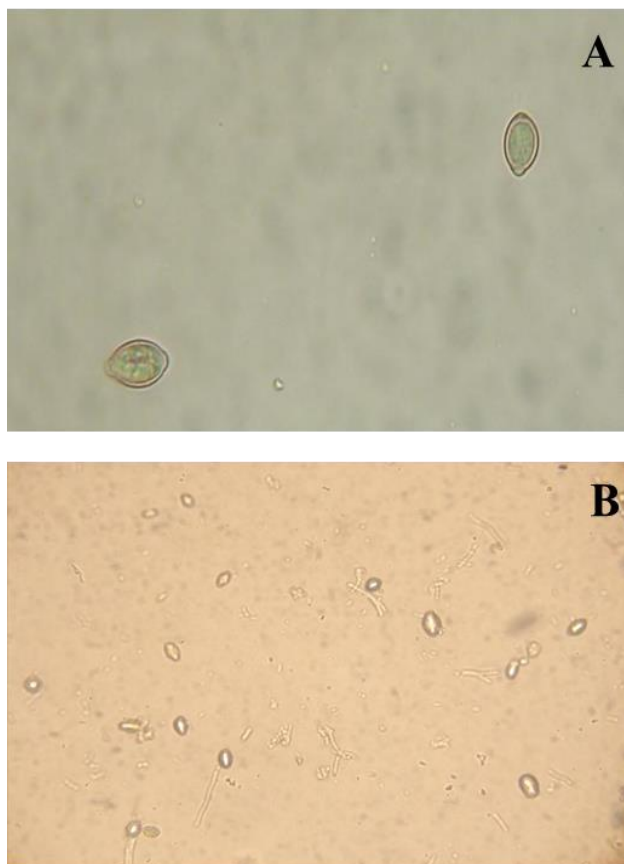
6. 1. 3. Karakteristike patogena *Monilinia laxa*

Sa svih ispitivanih sorti dobijeno je ukupno 54 izolata (sa svake sorte po 6). Hrustić, (2013) je došla do rezultata da se kod koštičavih voćaka u prirodnoj infekciji gljiva *M. laxa* u odnosu na druge vrste roda *Monilinia* (*M. fructigena*, *M. fructicola*) javlja u najvećem procentu. Razni autori su došli do zaključka da je identifikacija vrsta roda *Monilinia* moguća na osnovu morfoloških makroskopskih osobina kolonija (boja, obod, prisustvo režnjeva, prisustvo sporulacije, pigmentacija), kao i brzine porasta kolonije (Byrde i Willetts, 1977; Mordue, 1979; Batra, 1991; Van Leeuwen i van Kesteren, 1998; De Cal i Melgarejo, 1999; van Leeuwen i sar., 2002; Lane, 2002). U skladu sa istraživanjima navedenih autora, neki od parametara su ispitivani kako bi se potvrdilo prisustvo gljive *M. laxa*.

Dobijeni izolati sa svih sorti trešnje su obrazovali kolonije koje su bile sivkasto obojene, dok je vazдушna micelija bila oskudno razvijena na podlozi (Slika 15). Karakterističan je bio neravnomeran porast kolonija i njihov talasast obod. Na naličju Petri kutija kolonije su ispoljile

blagu pigmetaciju u vidu braonkaste boje. Svi izolati gljive *M. laxa* su obrazovali kolonije sličnog izgleda kao i izolati koje su opisali autori (Vasić, 2016; Hrustić, 2013; Batra, 1991; van Leeuwen i van Kesteren, 1998; van Leeuwen i sar., 2002; Lane, 2002). Na plodovima inokulisanim izolatima *M. laxa* nije došlo do formiranja spora.

Pored makroskopskih odlika, istraživane su i mikroskopske osobine. Posmatranjem dobijenih izolata i inficiranih plodova trešnje došlo se do zaključka da odabrani izolati *Monilinia* spp. obrazuju hijalinske, jednoćelijske konidije sedam dana posle zasejavanja. Konidije (Slika 16 A, B) su limunastog do ovalnog oblika, jednoćelijske kakve obrazuje *M. laxa*. Ove rezultate su potvrdili (Hrustić, 2013; Balaž i sar, 2012; Vasić, 2016).



Slika 16. Mikroskopski snimak konidija gljive *M. laxa* pod uveličanjem 10x40 (A) i mikroskopski snimak konidija gljive *M. laxa* pod uveličanjem 10x25 (B) - BTC mikroskop (Objavljeno u Kiprovska i sar., (2018))

Na temperaturi od 24 °C izolati različitih vrsta sa trešnje ispoljili su statistički značajnu razliku u brzini rasta kolonije ($P < 0,05$) (Tabela 7). Izolati vrste *M. laxa* imali su različit dnevni

porast u zavisnosti od sorte trešnje sa kojih je izolovana gljiva. Porast micelije je meren nakon 2, 4, 6 i 8 dana od momenta zasejavanja na hranljivu PDA podlogu. Na osnovu Tabele 7. može se zapaziti da izolati imaju brz porast na PDA podlozi. Razlike u porastu koje se mogu zapaziti između ispitivanih izolata su zbog reznjevitog izgleda kolonija prilikom merenja (Vasić, 2016). Nakon četvrtog dana najmanji porast je imao izolat M2Sum1 sa sorte Summit, dok je najveći porast imao izolat M2J1 sa sorte Junska rana. Šestog dana moglo se zapaziti da se prečnik micelije srazmerno povećavao u odnosu na četvrti dan. Osmog dana se moglo zapaziti da je porast micelije bio veći u odnosu na prethodna merenja, ali nije bilo statistički značajnih razlika u dužini prečnika između izolata.

Najniži prosečni porast micelije je zabeležen sa sorte III/VAL M3V2 (6,16 mm/dan), dok najviši izmeren sa sorte Burlat (M3B5) (7,25 mm). Dobijeni rezultati su približni istraživanju Vasića (2016), ako se uzme u obzir da je prosečan dnevni porast micelije izolata gljive *M. laxa* sa jabuke bio 8 mm (od 6,25-9,75 mm/dan), i sa trešnje 6,52 do 9,48 mm/dan (Hrustić, 2013).

Tabela 7. Merenje porasta micelije 9 izolata dobijenih sa različitih sorti trešnje na PDA podlozi. Različita slova pored prosečnih vrednosti ukazuju na to da su proseci statistički značajno različiti

Duncan test; variable Prečnik micelije posle 4 dana (Spreadsheet1) Homogenous Groups, alpha = 0,05000 Error: Between MS = 0,00636; 0,03091; 0,08485 df = 22,000

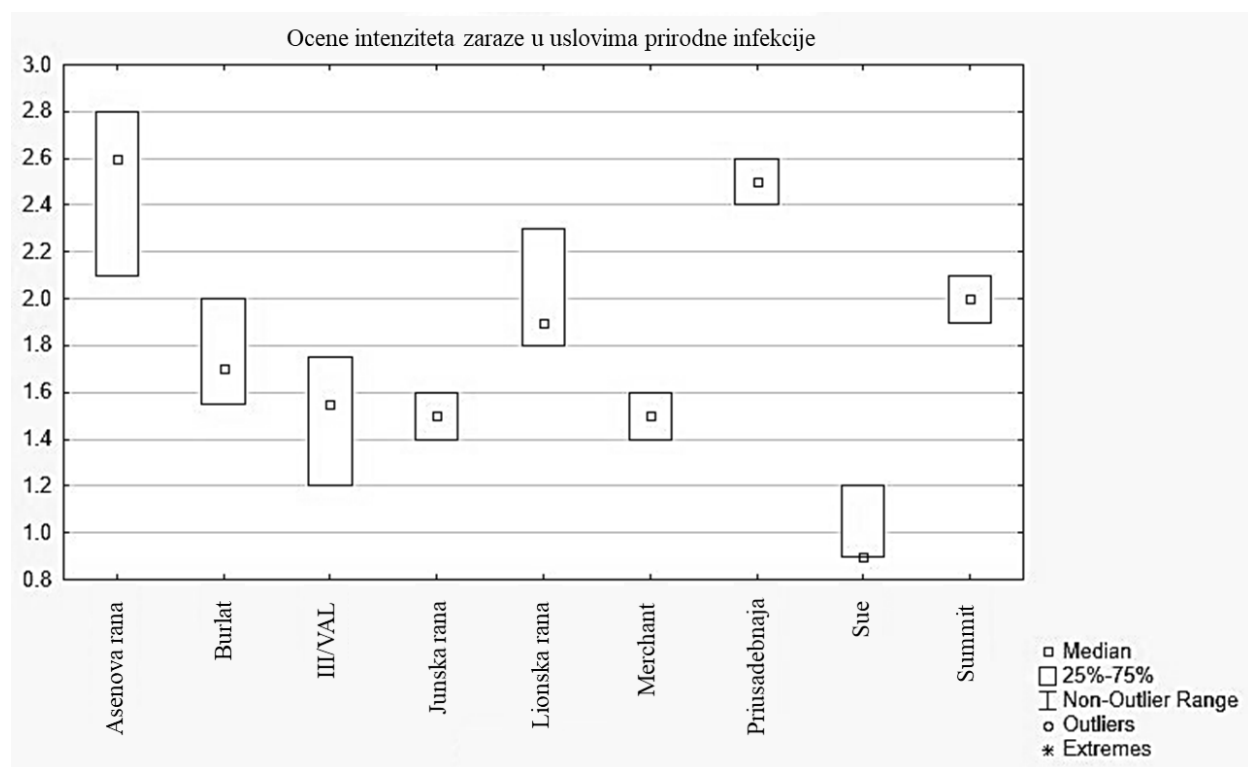
IZOLAT	Prečnik micelije nakon 2 dana (mm)	Prečnik micelije nakon 4 dana (mm)	Prečnik micelije nakon 6 dana (mm)	Prečnik micelije nakon 8 dana (mm)
Kontrola	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a
Summit izolat 1/1 (M2Sum1)	8,70±0,65 ^a	19,30±1,85 ^a	38,30±0,34 ^a	54,70±0,49 ^{abcd}
Merchant izolat 1/1 (M1M3)	9,20±0,81 ^a	19,30±1,78 ^a	36,30±0,32 ^a	49,30±0,51 ^a
Lionska izolat 1/1 (M1L1)	9,60±0,90 ^a	19,70±1,70 ^a	39,30±0,37 ^{ab}	54,30±0,51 ^{abc}
III/VAL izolat 1/1 (M3V2)	10,00±1,10 ^{ab}	20,70±1,97 ^{ab}	37,30±0,35 ^a	50,70±0,49 ^{ab}
Asenova rana izolat 1/1 (M1A2)	10,20±0,97 ^{ab}	20,70±1,88 ^{ab}	38,30±0,36 ^a	51,70±0,48 ^{ab}
Priusodebnaja izolat 1/1 (M2P4)	10,50±1,01 ^{ab}	20,70±1,99 ^{ab}	38,30±0,37 ^a	56,00±0,53 ^{bcd}
Sue izolat 1/1 (M2S3)	11,00±1,00 ^b	21,30±2,11 ^{bc}	39,30±0,41 ^{ab}	54,30±0,45 ^{abc}
Burlat izolat 1/1 (M3B5)	11,30±1,12 ^b	22,30±2,05 ^c	44,70±0,42 ^c	58,00±0,55 ^{cd}
Junska rana izolat 1/1 (M2J1)	12,00±0,92 ^b	24,30±2,25 ^d	43,70±0,41 ^c	51,30±0,50 ^{ab}

6. 1. 4. Ocene intenziteta zaraze

6. 1. 4. 1. Ocene intenziteta zaraze u prirodnoj infekciji

Istraživanja su pokazala da je kod koštičavih voćaka od 3 najznačajnije vrste roda *Monilinia*, *M. laxa* u prirodnoj infekciji gljiva zastupljena u 96,34% slučajeva, dok je zastupljenost ostalih vrsta roda *Monilinia* znatno manja: *M. fructigena* 2,44% slučajeva, *M. fruticola* 1,22% slučajeva (Hrustić, 2013).

U zavisnosti od vremena zrenja određene sorte, vršene su ocene intenziteta zaraze u uslovima prirodne infekcije (stepen zaraze 0-4). Inficirani plodovi (po 20 sa svakog stabla) je uzorkovano, ocenjivano, i nakon toga je uzeta prosečna ocena intenziteta zaraze za svaku sortu (Graf. 1).



Graf. 1. Ocena intenziteta zaraze plodova trešnje gljivom *M. laxa* u uslovima prirodne infekcije

U uslovima prirodne infekcije su se mogle zapaziti različite ocene intenziteta zaraze (Graf 1.), što je i očekivano s obzirom da se radi o različitim pomološkim odlikama sorti kao i o različitom periodu zrenja plodova. Najveći intenzitet zaraze zabeležen je kod ranijih sorti

zrenja i to kod sorti Priusadebnaja i Asenova rana, sa najvećim intenzitetom zaraze, ocena (2,5) kao i kod sorti Lionska rana i Summit, ocena (2). Istraživanja su pokazala da sorte ranijeg vremena zrenja imaju mekše meso ploda u odnosu na kasnije sorte (Iezzoni i sar., 1991). Utvrđeno je da su sorte trešnje sa debljom kutikulom manje podložne pucanju ploda (Demirsoy i Demirsoy, 2004), u skladu s tim i mogućnošću za pojavu infekcije (Holb, 2006). Čvrstoća ploda je u pozitivnoj korelaciji sa vremenom zrenja ploda (Fogle, 1961). Najniži intenzitet zaraze zapažen je kod sorte Sue koja je ocenjena ocenom (1), što je i očekivano s obzirom da se radi o kasnijoj sorti zrenja koju karakteriše deblja kutikula.

6. 1. 4. 2. Ocene intenziteta zaraze u uslovima veštačke inokulacije

4 dana uzastopno, ocenjivan je intenzitet zaraze od 0-4 (Peterson i sar., 1948). Rezultati istraživanja su pokazali da plodovi sa oštećenom kutikulom pokazuju veću osetljivost na prouzrokovaca mrke truleži – *M. laxa* (Holb, 2008). U ovom radu su se mogle zapaziti statistički značajne razlike u intenzitetu zaraze između sorti. Najveće razlike između sorti su zabeležene trećeg dana nakon veštačke inokulacije.

Prvog dana nakon veštačke inokulacije najveći intenzitet zaraze mogao se videti na sortama Sue, Asenova rana, Burlat i III/VAL (Tabela 8). Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu zapažena je na plodu trešnje sorte III/VAL.

Dva dana nakon veštačke inokulacije mogla se zapaziti drugačija situacija u odnosu na prethodni i nulti dan. Najveći intenzitet zaraze gljivom *M. laxa*, mogao se zapaziti na plodu trešnje sorte Burlat. Iako je ovo bio plod na kojem je zabeležen najviši intenzitet zaraze, nije bilo statistički značajnih razlika u odnosu na druge sorte (Tabela 8). U odnosu na kontrolu, ocene intenziteta zaraze na plodovima su bile statistički značajne.

U odnosu na prethodne slučajeve (prvi i drugi dan nakon veštačke inokulacije), trećeg dana nakon veštačke inokulacije mogle su se zapaziti različite ocene intenziteta zaraze između sorti koje su inokulisane. U odnosu na kontrolu, bilo je statistički značajnih razlika između sorti (Tabela 8). Intenzitet zaraze bio je najniži kod sorte Merchant (ocena 1,4). Najveći intenzitet zaraze pronađen kod sorte Burlat (ocena 3,4), iako su literaturni podaci pokazali da je ova sorta u oplemenjivanju izdvojena kao potencijalni roditelj i donor gena otpornosti na gljivu *M. laxa* (Iezzoni i sar., 1991). Sorte III/VAL i Priusadebnaja takođe su pokazali visok intenzitet infekcije.

Četriri dana nakon veštačke inokulacije moglo se zaključiti da su svi plodovi inokulisani izolatom M3B5 delimično do potpuno bili zaraženi gljivom *M. laxa*. Posmatrano u celini, između plodova nije bilo statistički značajnih razlika.

Tabela 8. Ocene intenziteta zaraze kod 9 sorti trešnje u uslovima veštačke inokulacije izolatom M3B5. Različita slova pored prosečnih vrednosti ukazuju na to da su proseci statistički značajno različiti

Duncan test; razvoj simptoma posle jednog dana od inokulacije (Spreadsheet3) Homogenous Groups, alpha = 0,05000 (Non-Exhaustive Search) Error: Between MS = ,06667, df = 72,000

Sorta inokulisanog ploda	Izolat kojim je inokulisan plod	Razvoj simptoma posle jednog dana od inokulacije	Razvoj simptoma posle dva dana od inokulacije	Razvoj simptoma posle tri dana od inokulacije	Razvoj simptoma posle četiri dana od inokulacije
Kontrola	sterilna podloga	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a
Junska rana	M3B5	0,00±0,00 ^a	1,20±0,10 ^{bc}	2,20±0,18 ^{bcd}	3,80±0,30 ^b
Summit	M3B5	0,00±0,00 ^a	1,20±0,10 ^{bc}	2,60±0,24 ^{cdef}	4,00±0,40 ^b
Priusadebnaja	M3B5	0,00±0,00 ^a	1,40±0,12 ^{bc}	3,00±0,22 ^{de}	4,00±0,38 ^b
Merchant	M3B5	0,00±0,00 ^a	1,20±0,10 ^{bc}	1,40±0,10 ^b	3,40±0,30 ^b
Lionska rana	M3B5	0,00±0,00 ^a	1,00±0,08 ^b	1,80±0,16 ^{bc}	3,40±0,30 ^b
Sue	M3B5	0,20±0,00 ^{ab}	1,20±0,10 ^{bc}	2,40±0,22 ^{bcd}	4,00±0,38 ^b
Asenova rana	M3B5	0,20±0,01 ^{ab}	1,20±0,10 ^{bc}	2,80±0,26 ^{cde}	4,00±0,40 ^b
Burlat	M3B5	0,20±0,00 ^{ab}	1,60±0,14 ^{bc}	3,40±0,28 ^e	3,80±0,30 ^b
III/VAL (Valerij Čkalov)	M3B5	0,40±0,00 ^b	1,20±0,10 ^{bc}	3,00±0,22 ^{de}	4,00±0,40 ^b

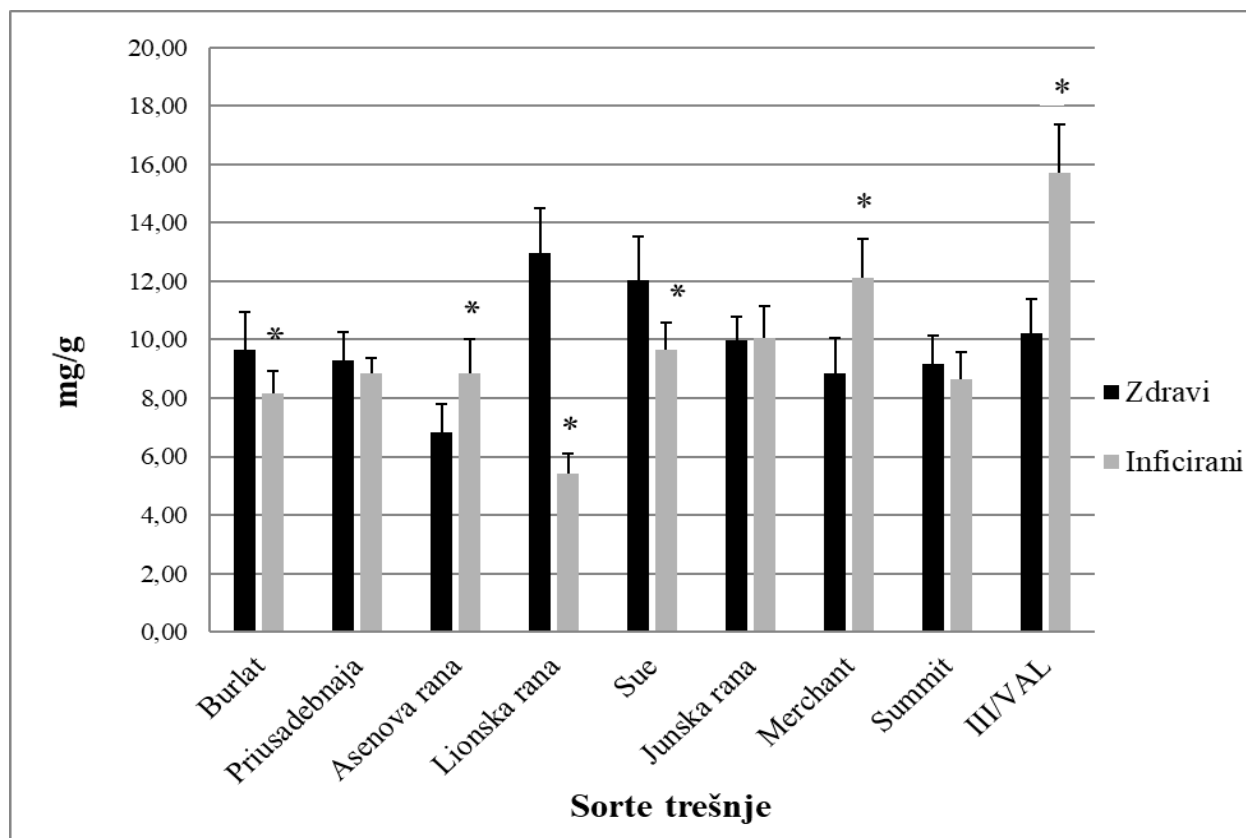
6. 2. Biohemijaski pokazatelji odgovora plodova trešnje na infekciju patogenom *M. laxa*

6. 2. 1. Fitohemijaska analiza enzimskih antioksidanata i intenzitet lipidne peroksidacije

6. 2. 1. 1. Sadržaj rastvorljivih proteina u plodovima trešnje

Sadržaj rastvorljivih proteina u plodovima ispitanih sorti kretao se od 5,42 do 15,74 mg/g. Najviši sadržaj proteina je meren u sortama zaraženih plodova III/VAL (15,74 mg/g), dok je najmanji sadržaj proteina izmeren u plodu sorte Lionska rana u uslovima zaraze (5,42 mg/g). U plodovima sorti Junska Rana, Priusadebnaja i Summit (Graf. 2) nije bilo statistički značajnih razlika u ukupnom sadržaju proteina između zdravih i zaraženih plodova. Prosečan sadržaj proteina u zdravom plodu trešnje iznosi 11 mg/g (USDA National Nutrient Database, 2018). Sorte koje su pokazale niži sadržaj proteina u uslovima infekcije bile su Burlat,

Lionska rana, Prusadebnaja, Sue i Summit. Suprotna situacija je ustanovljena kod ostale četiri sorte.

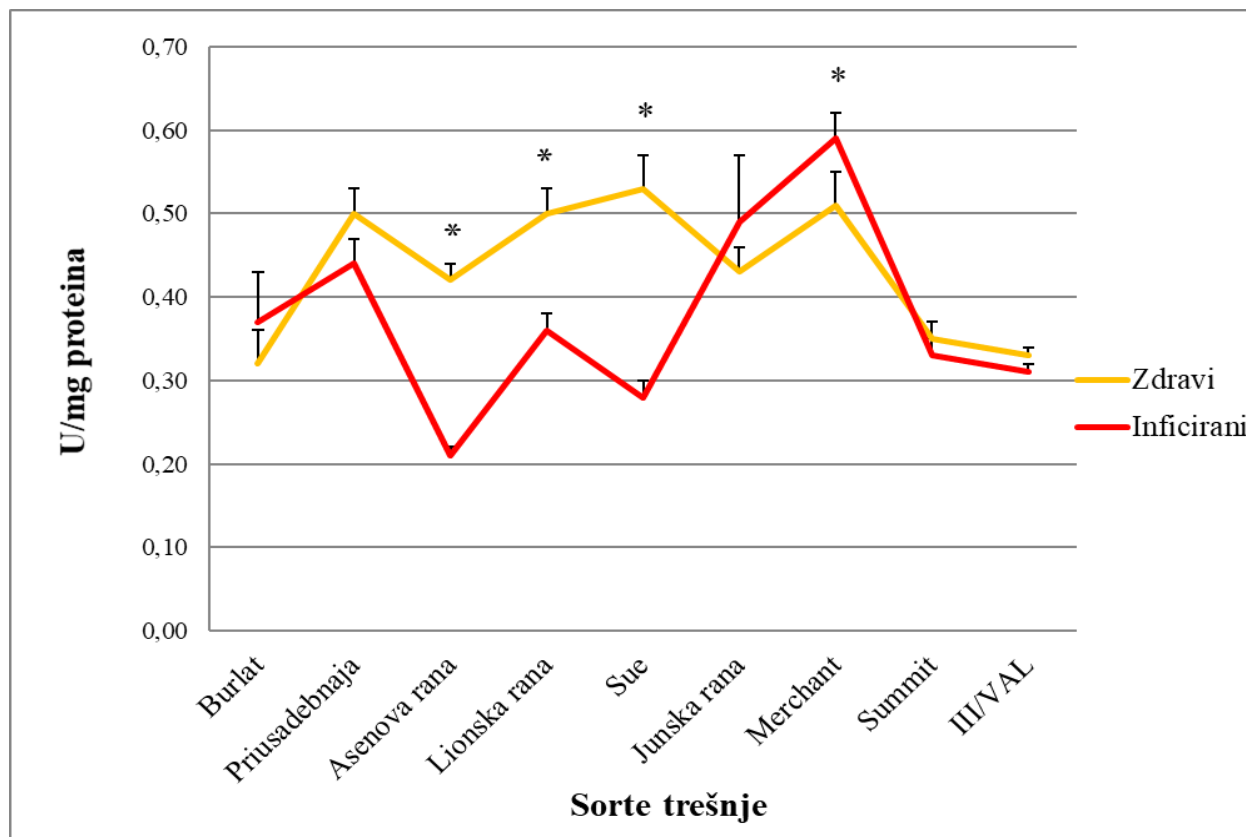


Graf. 2. Sadržaj rastvorljivih proteina u zdravim i inficiranim plodovima trešnje. Rezultati izraženi u mg/g su predstavljeni kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija. Podaci označeni * značajno se razlikuju za $P < 0.05$

6. 2. 1. 2. Aktivnost antioksidantnih enzima u plodovima trešnje

6. 2. 1. 2. 1. Aktivnost pirogalol peroksidaze (PPx) u plodovima trešnje

Aktivnost pirogalol peroksidaze (PPx) kod zdravih plodova trešnje varirala od 0,32 do 0,53 U/mg proteina, dok se kod inficiranih kretala od 0,21 do 0,59 U/mg proteina (Graf. 3). Najniža aktivnost je zabeležena kod zaraženih plodova sorte Asenova rana, dok je najveća aktivnost zabeležena u zaraženom plodu Merchant. Niža aktivnost ovog enzima je ustanovljena kod većine sorti koje su ispitivane u uslovima infekcije, što može ukazati na povećanu proizvodnju ROS-a, koja nije mogla biti neutralizovana od strane biljke.

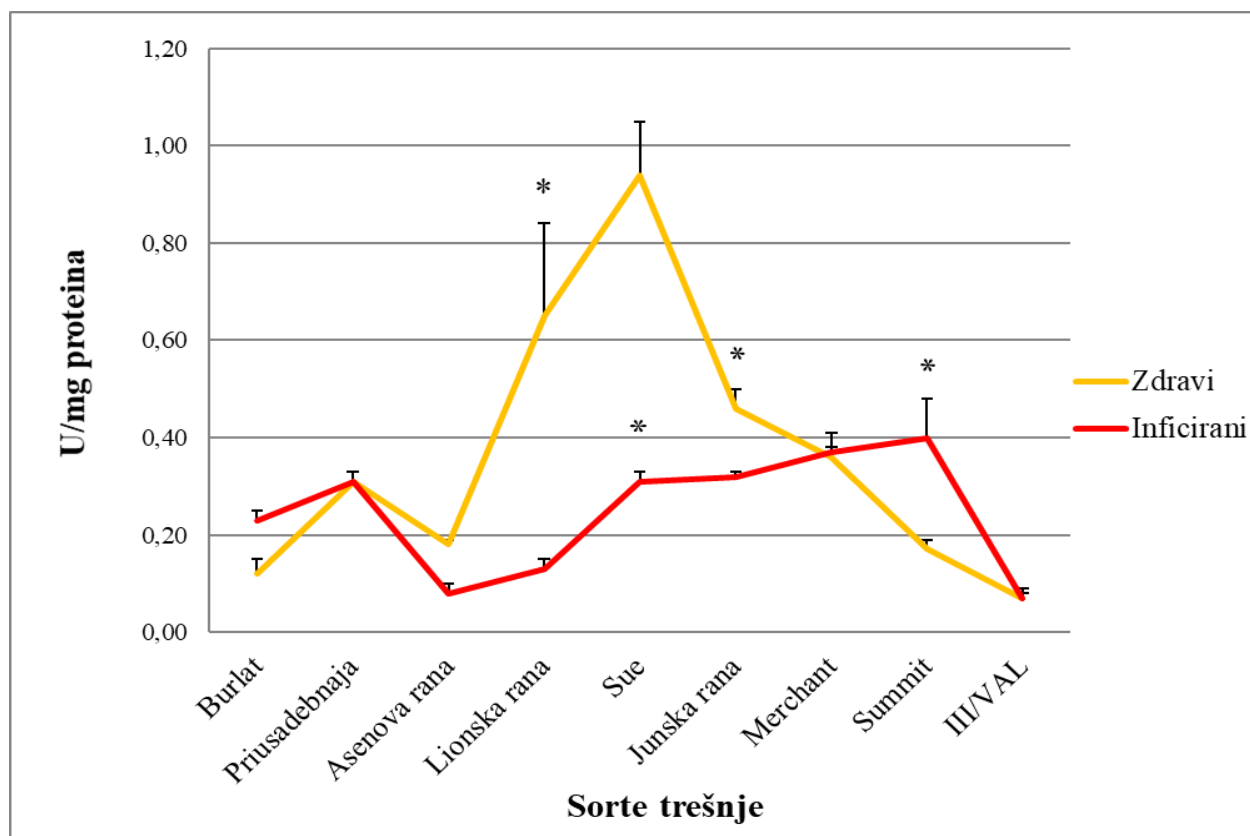


Graf. 3. Aktivnost pirogalol peroksidaze (PPx) u zdravim i inficiranim plodovima trešnje. Rezultati izraženi u U/mg proteina su predstavljani kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija. Podaci označeni * značajno se razlikuju za $P < 0.05$

6. 2. 1. 2. 2. Aktivnost gvajakol peroksidaze (GPx) u plodovima trešnje

Povećana aktivnost gvajakol-peroksidaze (GPx) zabeležena je u plodovima sorti Burlat i Summit nakon infekcije, s tim da kod Burlata nije bilo statistički značajnih razlika u odnosu na zdrav plod. Kod inficiranih plodova genotipova Asenova rana, III/VAL, Merchant i Priusadebnaja nije utvrđena statistički značajna razlika u aktivnosti enzima u poređenju sa zdravim plodovima (Graf. 4). Štajner i sar. (2006, 2008) su došli do zaključka da različiti oblici biotičkog ili abiotičkog stresa povećavaju aktivnost peroksidaza. U drugim ispitivanim sortama, aktivnost ovog enzima se smanjila u prisustvu patogena *M. laxa*. Najniža aktivnost enzima u odnosu na sve ostale sorte zabeležena je kod plodova sorte III/VAL, iako je u uslovima infekcije ova sorta pokazala najveći sadržaj proteina u poređenju sa ostalim proučavanim sortama. Peroksidaza utiče na promenu ukusa, boje, teksture i hranljive

vrednosti plodova (Filis i sar., 1985), uključujući promene u procesu sazrevanja (Miesle i sar., 1991). Kiprovska, (2013) je istraživala uticaj fitopatogenih gljiva na aktivnost enzima GPx i došla do zaključka da je u listu kukuruza pod uticajem gljive *S. sclerotiorum* značajno povećana aktivnost ovog enzima. Takođe je u listovima šećerne repe uočena povećana aktivnost ovog enzima pod uticajem fitopatogene gljive *R. solani*, dok kod soje pod uticajem gljive *R. solani* nije bilo statistički značajnih razlika u enzimskoj aktivnosti u odnosu na kontrolu.

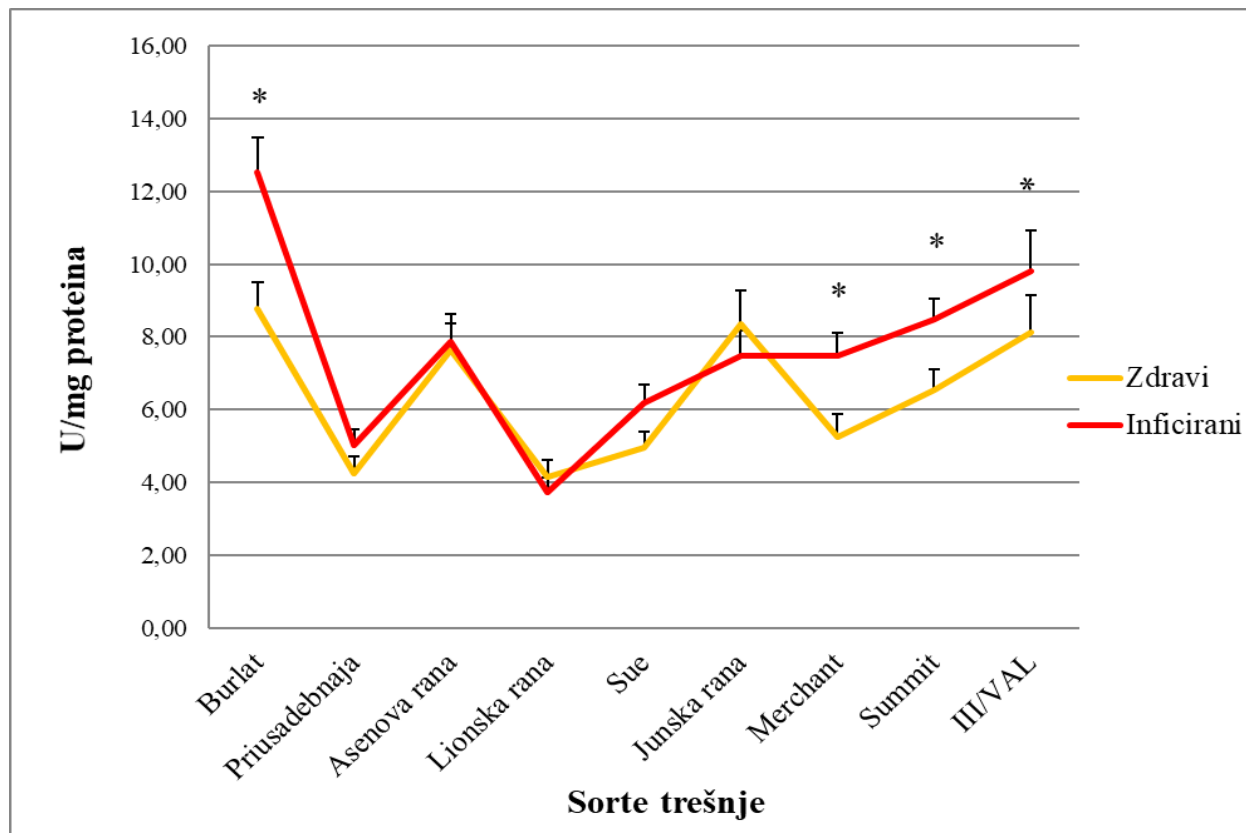


Graf. 4. Aktivnost gvajakom peroksidaze (GPx) u zdravim i inficiranim plodovima trešnje. Rezultati izraženi u U/mg proteina su predstavljeni kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija. Podaci označeni * značajno se razlikuju za $P < 0.05$

6. 2. 1. 2. 3. Aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u plodovima trešnje

U ispitivanim sortama, aktivnost SOD se kretala od 3,74 do 12,52 U/mg proteina. Najniža aktivnost SOD-a je zabeležena u inficiranim plodovima sorte Lionska Rana, a najviše

u zaraženim plodovima sorte Burlata (Graf. 5). Posmatrano u celini, povećana aktivnost SOD-a većinom je preovladavala u uslovima infekcije, što je i očekivano s obzirom da su istraživanja pokazala da je aktivnost ovog enzima intenzivnija u uslovima delovanja biotičkog i abiotičkog činioca (Barna i sar, 2003; Ždrero-Pavlović, 2017.) Pored toga što ovaj enzim direktno utiče na uklanjanje slobodnih radikala, takođe delimično utiče na otpornost, tako što povećava toleranciju biljaka na stanje stresa (Perl et al., 1993; Allen et al., 1997). Povećana aktivnost ovog enzima u zaraženim plodovima primećena je kod genotipova Asenova Rana, Burlat, III/VAL, Merchant, Priusadebnaja, Sue i Summit (statistički značajne razlike – Burlat, III/VAL, Merchant, Summit), dok je kod sorti Junska Rana i Lionska Rana zabeležena suprotna situacija, ali razlike nisu bile statistički značajne.



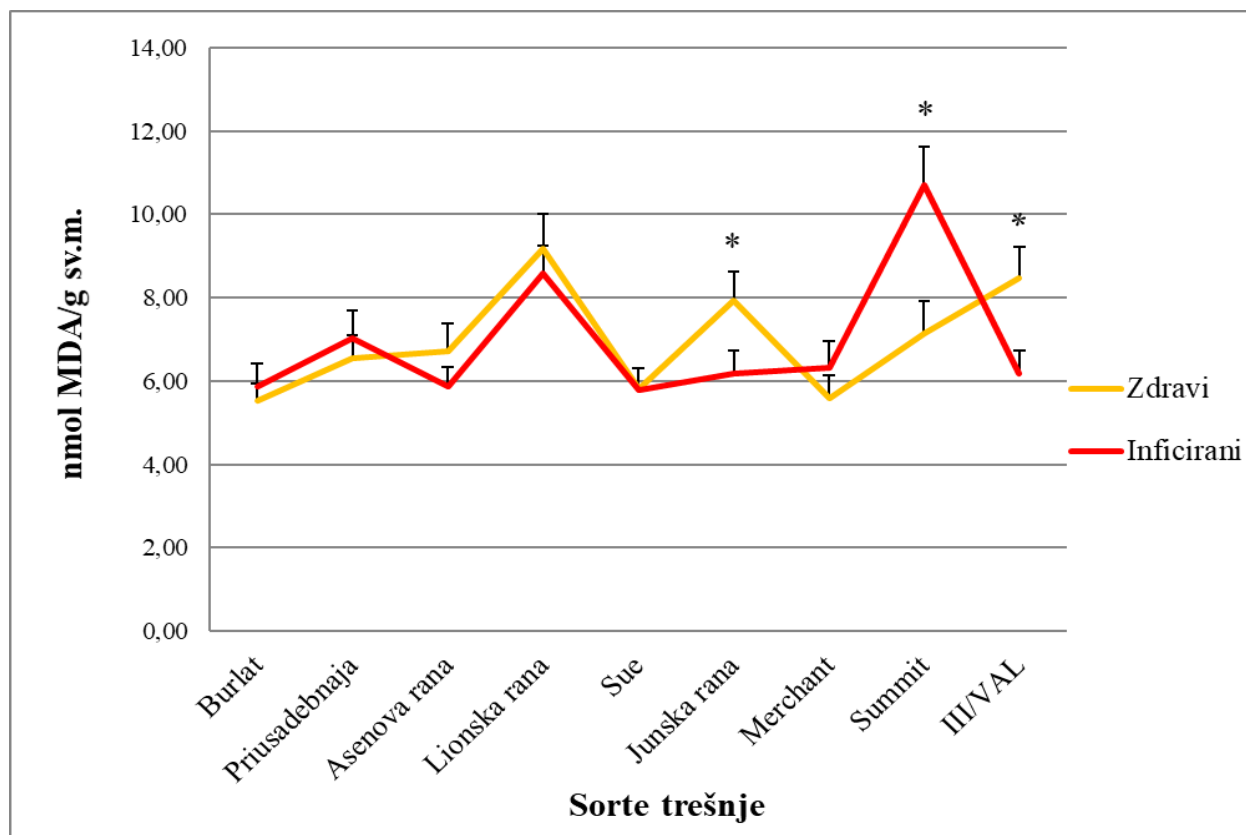
Graf. 5. Aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u zdravim i inficiranim plodovima trešnje. Rezultati izraženi u U/mg proteina su predstavljeni kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija. Podaci označeni * značajno se razlikuju za $P < 0.05$

Baker (1976) je istraživao aktivnost SOD u plodovima voća i povrća, u različitim fazama zrenja. Vrednosti su iznosile za paradajz 19,60-19,80 U/mg proteina, bananu 3,60-3,80 U/mg proteina, avokado 30,40-38,50 U/mg proteina, i jabuku 3,20-4,00 U/mg proteina.

6. 2. 1. 3. Intenzitet lipidne peroksidacije u plodovima trešnje

Stepen intenziteta LP kretao se od 5,52 - 9,17 nmol MDA/g sv.m. u zdravim do 5,76-10,76 nmol MDA/g sv.m. u zaraženim plodova (Graf. 6). U plodovima trešnje sorti Burlat, Merchant, Priusadebnaja i Summit inficiranih gljivom *M. laxa* zabeleženo je povećanje intenziteta lipidne peroksidacije, s tim da je jedino kod sorte Summit razlika bila statistički značajna (10,76 nmol MDA/g sv.m.) - 50,34% više u odnosu na zdrav plod. U inficiranim plodovima genotipova Asenova rana, Junska rana i III/VAL zabeleženo je smanjenje intenziteta lipidne peroksidacije, dok sorta Sue nije pokazala statistički značajnu razliku intenziteta LP u poređenju sa zdravim plodovima. Proces LP se smatra markerom oksidativnog stresa u ćelijskim membranama koji su rezultat ROS indukcije (Petersen i sar., 1999). Istraživanja su pokazala da prisustvo gljive *Sclerotinia sclerotiorum*, koja po sistematskom mestu potiče iz iste porodice kao gljiva *M. laxa*, takođe indukuje povećanje LP u biljkama soje nakon infekcije (Malenčić i sar., 2010). Singh i sar. (2012) su ispitivali "klimakterično ponašanje" plodova sorti šljive izazvane branjem i skladištenjem različitih na intenzitet lipidne peroksidacije. Rezultati su pokazali da je kod većine sorti tokom zrenja i skladištenja bila povišena peroksidacija lipida.

Većina plodova ranih sorti zrenja pokazuje niže nivoe LP u uslovima infekcije kakve su Junska rana, Asenova rana, III/VAL, Burlat. Yang i sar. (2008) su istraživali intenzitet lipidne peroksidacije plodova banana u različitim periodima zrenja, tj. razmekšavanja ploda. Intenzitet lipidne peroksidacije varirao je od 4,64 do 51,78 nmol MDA/g sv.m. u zavisnosti od dana skladištenja.



Graf. 6. Intenzitet lipidne peroksidacije u zdravim i inficiranim plodovima trešnje. Rezultati izraženi u nmol malonil dialdehid/g sveže materije (nmol MDA/g sv.m.) su predstavljani kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija. Podaci označeni * značajno se razlikuju za $P < 0.05$

6. 2. 1. 4. Analiza varijanse enzimskih antioksidanata i intenziteta lipidne peroksidacije

Gljivična infekcija kod plodova nije značajno uticala na sadržaj proteina posmatrano u celini (Tabela 9), ali su sorte trešnje bile značajan izvor varijacije. Posmatrajući različite plodove u uslovima infekcije moglo se zapaziti da nije bilo korelacije između enzimske aktivnosti i sadržaja proteina, ali je zato u zdravim plodovima enzimska aktivnost bila u korelaciji sa sadržajem proteina. Prema ANOVA, na aktivnost lipidne peroksidacije (LP), aktivnost pirogolol peroksidaze (PPx), gvajakol peroksidaze (GPx), superoksid-dismutaze (SOD) i na sadržaj proteina u plodovima trešnje, značajno su uticali karakteristika sorte, prisustvo bolesti i interakcija ova dva faktora. Rezultati Malenčića i sar. (2010) su pokazali da je uticaj fitopatogenih gljiva na biljke značajan, a manifestuje se u promenama antioksidantne enzimske aktivnosti, koja se razlikovala među genotipovima. Navedeni rezultati podržavaju

značaj enzimskih antioksidanata u odloženom starenju i potencijalnoj otpornosti biljaka na biotički stres. Low i Merida (1996) su prvi došli do zaključka da je produkcija ROS najintenzivnija u interakciji biljaka sa gljivama, bakterijama i virusima, a samim tim je u uslovima infekcije povećana aktivnost antioksidantnih enzima (Barna i sar., 2003; Perl i sar., 1993; Allen i sar., 1997).

Tabela 9. Analiza varijanse sadržaja ukupnih proteina (SP), intenziteta lipidne peroksidacije (LP), aktivnosti superoksid dismutaze (SOD), gvajakol peroksidaze (GPX), pirogalol peroksidaze (PPX)

Parametar		Suma kvadrata	Stepeni slobode	Sredina stepena slobode	F	Sig. (nivo značajnosti)
Intenzitet lipidne peroksidacije (LP) (nmol MDA/g sv m.)	Između grupa	72,63	8	9,08	8.31***	0,00
	Unutar grupa	49,13	45	1,09		
	Total	121,76	53			
Sadržaj ukupnih proteina (SP) mg/g	Između grupa	108,47	8	13,56	2.89***	0,01
	Unutar grupa	211,09	45	4,69		
	Total	319,56	53			
Aktivnost pirogalol peroksidaze (PPx) (U/mg proteina)	Između grupa	0,30	8	0,04	7.20***	0,00
	Unutar grupa	0,24	45	0,01		
	Total	0,54	53			
Aktivnost gvajakol peroksidaze (GPx) U/mg proteina	Između grupa	1,34	8	0,17	5.92***	0,00
	Unutar grupa	1,27	45	0,03		
	Total	2,61	53			
Aktivnost superoksid-dismutaze (SOD) U/mg proteina	Između grupa	217,36	8	27,17	20.29***	0,00
	Unutar grupa	60,26	45	1,34		
	Total	277,62	53			

Svi rezultati HPLC analiza koji slede objavljeni su od strane kandidata sa ostalim autorima, u istom ili modifikovanom obliku, u radu Kiprovski i sar. (2018).

6. 2. 2. HPLC analiza sadržaja primarnih metabolita u plodovima trešnje

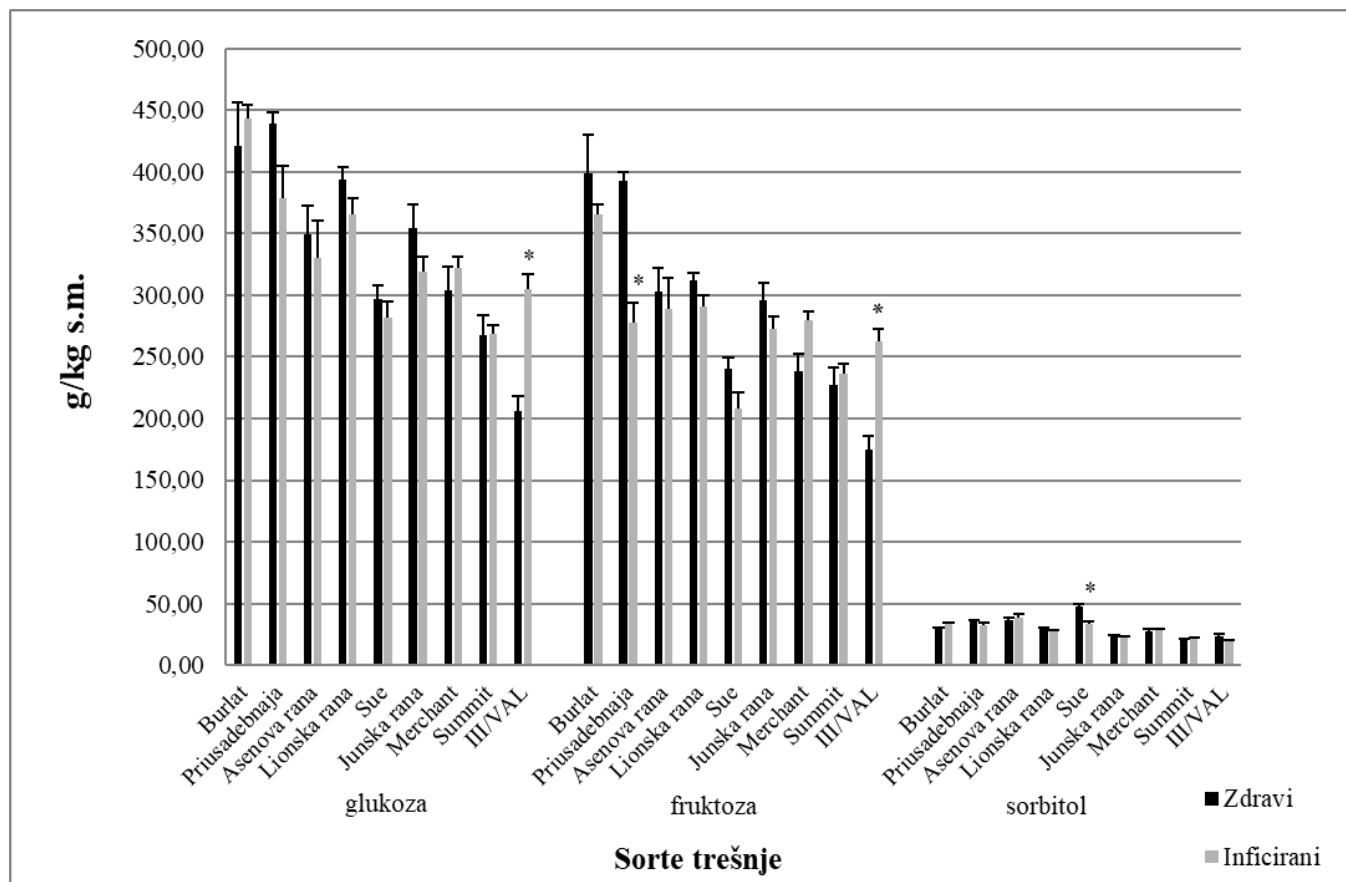
6. 2. 2. 1. Sadržaj šećera u plodovima trešnje

Plodovi trešnje imaju umerenu količinu ugljenih hidrata, naročito prostih šećera (glukoza, fruktoza, saharoza i šećerni alkohol - sorbitol) i organskih kiselina (jabučna, limunska, ćilibarna, mlečna i oksalna) (Serrano i sar., 2005; Usenik i sar., 2008; Usenik i sar., 2010; McCune i sar., 2011; Serradilla i sar., 2011; Ballistreri i sar., 2013; Pacifico i sar., 2014). Istraživanja su pokazala da je, iako se neke sorte trešnje razlikuju u pomološkim

osobinama, zabeležena slaba korelacija između boje ploda i nutritivnih svojstava (Willson i Whelan 1990).

Analizirani plodovi sorti trešnje sadržali su tri redukovana šećera: glukoza, fruktoza i sorbitol. Nije postojala značajna razlika u sadržaju redukujućih šećera u poređenju zdravih i zaraženih plodova, osim kod sorte Priusadebnaja i III/VAL, koji su pokazali značajno smanjenje u uslovima infekcije, u odnosu na zdrave. Takođe, zaraženi plodovi sorte Sue pokazali su niži sadržaj sorbitola u poređenju sa zdravim (Graf. 7). Istraživanja su pokazala da sadržaj glukoze različitih sorti trešnje iznosi između 55-123 g/kg sv.m., sadržaja fruktoze između 44-101,5 g/kg sv.m. i sadržaja saharoze između 35-12,5 g/kg sv.m. (Girard i Kopp, 1998; Usenik i sar., 2008). Sadržaj šećera u ispitivanim sortama iznosio je: glukoza 205-439 i 268-443 g/kg s.m., fruktoza 175-398,9 i 208,6-365,8 g/kg s.m. i sorbitola 20-47,6 i 19,2-38,6 g/kg s.m. kod zdravih i zaraženih plodova.

Da bi se širio i razvijao se, biljni patogen mora osigurati izvor organskog ugljenika iz biljke. Iako se regulisanje odbrambenih odgovora intenzivno istražuje decenijama, manje se zna o efektima fitopatogene infekcije na primarni metabolizam (Berger i sar., 2007). Usenik i Marn (2016), su došli do zaključka da je tokom zaraze biljnim virusom zabeleženo smanjenje šećera u plodovima šljive.



Graf. 7. Sadržaj glukoze, fruktoze, i šećernog alkohola sorbitola u zdravim (Z) i inficiranim (I) plodovima trešnje. Podaci izraženi u g/kg s.m. su predstavljeni kao aritmetička sredina ± standardna devijacija. Rezultati označeni * značajno se razlikuju za $P < 0.05$

6. 2. 2. 2. Sadržaj organskih kiselina u plodovima trešnje

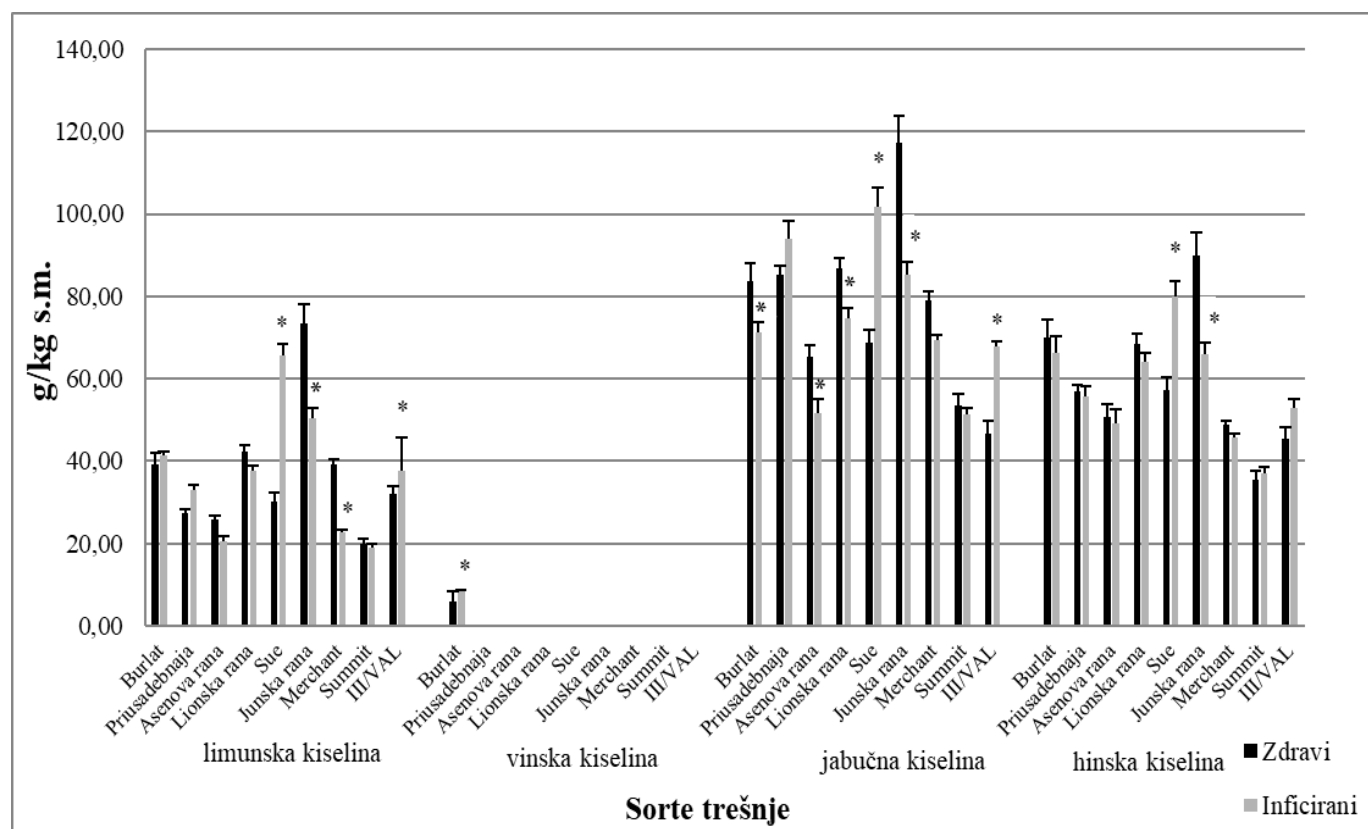
Iako sadržaj organskih kiselina kod trešanja varira u zavisnosti od sorte, njihova koncentracija takođe ima značajnu ulogu po pitanju ukusa voća tako što utiče na uravnoteženost između kiselina i šećera. Kod voća i povrća, uglavnom je slučaj da organske kiseline postoje slobodne ili u obliku drugih jedinjenja kao što su soli, estri ili glikozidi (Cemeroglu i sar., 1986).

Usenik i sar. (2008) ispitivali su sadržaj primarnih metabolita u 13 sorti trešnje i istraživanje je pokazalo da se sadržaj jabučne, limunske i fumarne kiseline kretao između 3,53-8,12 g/kg sv.m., 0,11-0,54 g/kg sv.m. i 0,97-7,56 g/kg sv.m. Navedeni istraživači su došli do zaključka da je jabučna kiselina dominantna organska kiselina kod svih ispitanih 13

sorti trešnje, što je potvrđeno sličnim rezultatima dobijenim u drugim publikacijama (Girard i Kopp, 1998; Usenik i sar., 2010; Serradilla i sar., 2011).

Organske kiseline detektovane u ispitivanih sortama trešnje su bile limunska, jabučna, hinska, šikimska i fumarna, dok je Burlat imao i vinsku kiselinu, a njen sadržaj je značajno uvećan nakon infekcije (Graf. 8).

U zdravim plodovima trešnje, najniži sadržaj limunske i hinske kiseline (Graf. 8) zabeležen je u zdravim plodovima sorte Summit (19,9 g/kg s. m. limunska kiselina i 35,4 g/kg s.m. hinska kiselina), dok je najviši sadržaj limunske (73,3 g/kg s.m.), jabučne (117,2 g/kg s.m.) i hinske kiseline (89,8 g/kg s.m.) zabeležen u plodu sorte Junska rana. Najniži sadržaj jabučne kiseline identifikovan je kod sorte III/VAL (46,8 g/kg s.m.)



Graf. 8. Sadržaj limunske, vinske, jabučne i hinske kiseline u zdravim i inficiranim plodovima trešnje. Rezultati izraženi u g/kg s.m. su predstavljeni kao aritmetička sredina ± standardna devijacija. Podaci označeni * značajno se razlikuju za $P < 0.05$

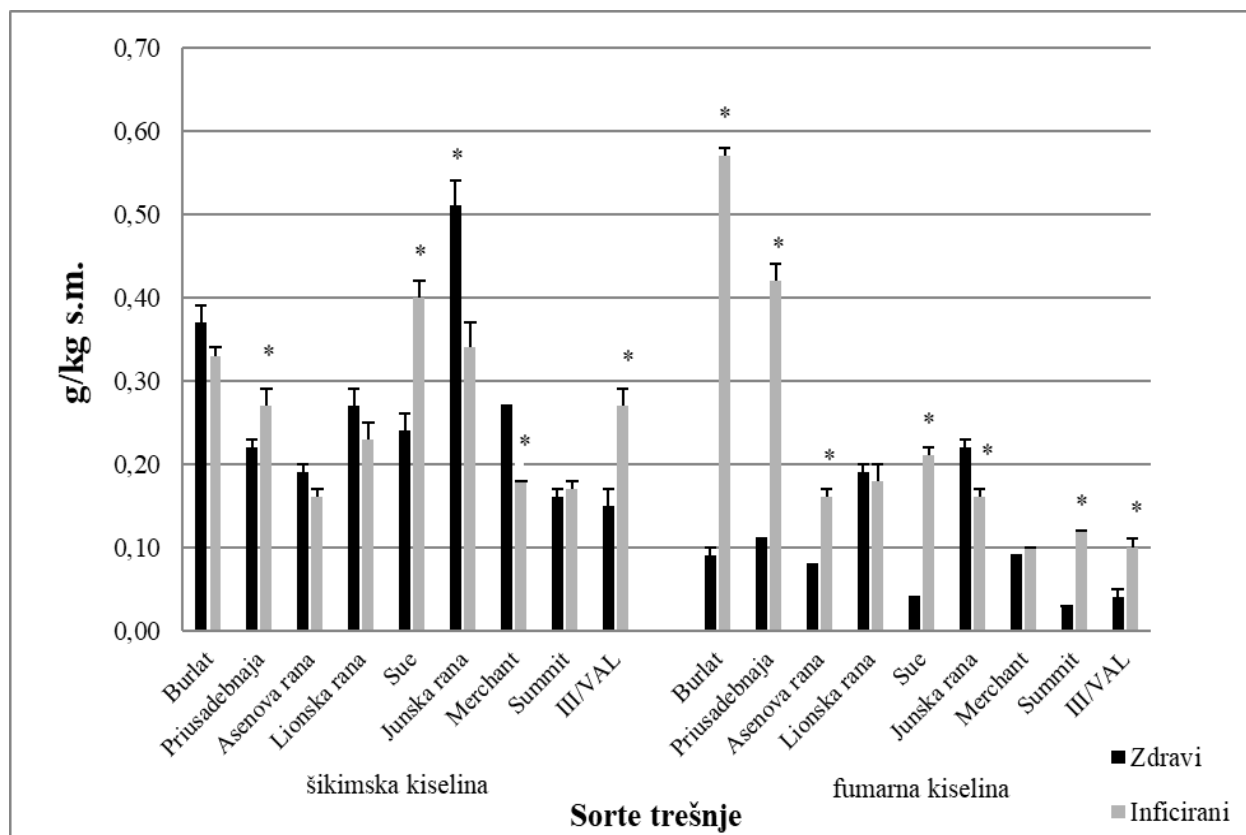
U uslovima infekcije ploda trešnje najniži sadržaj limunske (19 g/kg s.m.), jabučne (51,2 g/kg s.m.) i hinske kiseline (37 g/kg s.m.) zabeležen je u sorti Summit, dok je najviši sadržaj istih kiselina zabeležen u sorti Sue – limunska (65,5 g/kg s.m.), jabučna (101,7 g/kg s.m.) i hinske (79,9 g/kg s.m.).

Vinska kiselina identifikovana je jedino u plodu sorte Burlat (6 g/kg s.m. u zdravom plodu i 8,4 g/kg s.m. u inficiranom plodu).

Kod sorte Junska rana i Merchant značajno je smanjen sadržaj organskih kiseline nakon infekcije, dok su Sue i III/VAL reagovala na infekciju akumulacijom organskih kiselina, posebno fumarne kiseline (5 i 2,5 puta, tim redom). Ako se izuzme sorta Junska rana, sve druge sorte su povećale sadržaj fumarne kiseline kod zaraženih plodova (Graf. 9).

Najniži sadržaj šikimske kiseline zabeležen je u zdravom plodu sorte III/VAL (0,15 g/kg s.m.), dok je najviši sadržaj (0,51 g/kg s.m.) zabeležen u zdravom plodu sorte Junska rana.

Za razliku od šikimske kiseline, sadržaj fumarne kiseline je bio najniži u zdravom plodu sorte Summit (0,03 g/kg s.m.), dok je najviši bio zabeležen u inficiranom plodu sorte Burlat (0,57 g/kg s.m.).



Graf. 9. Sadržaj šikimske i fumarne kiseline u zdravim i inficiranim plodovima trešnje. Rezultati izraženi u g/kg s.m. su predstavljeni kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija. Podaci označeni * značajno se razlikuju za $P < 0.05$

6. 2. 3. Fitohemijska analiza sekundarnih metabolita

6. 2. 3. 1. Sadržaj ukupnih fenola u plodovima trešnje

Istraživanja su pokazala da se u prisustvu patogena fenoli nakupljaju na mestu infekcije (Britton, 1983; Dixon i Paiwa, 1995, Malenčić i sar., 2012), tj. sadržaj fenola u biljnim delovima u uslovima stresa je veći u odnosu na one biljke koje nisu pretrpele stres. Akumulaciju fenolnih jedinjenja u plodovima kivija inficiranih gljivom *Botritis cinerea* ustanovio je Wurms (2005). Otpornost na trulež ploda koju prouzrokuje gljiva *M. fructicola* kod breskve (*Prunus persica* L.) bila je povezana s brojnim faktorima koji između ostalog uključuju povećanje nivoa fenolnih i drugih biohemijskih jedinjenja (Gradziel i sar., 2003).

Kod acetonskih ekstrakata sadržaj ukupnih fenola u ispitivanim sortama se kretao od 3,53-6,50 mg GAE/g. s.m. u zdravim plodovima i od 3,03-9,02 mg GAE/g s.m. u zaraženim

(Graf. 10). Dve sorte su pokazale značajno veći sadržaj fenola u zaraženim plodovima i to rane sorte zrenja III/VAL i Lionska rana. Posmatrano u celini, kod svih ispitivanih sorti je bilo statistički značajnih razlika između zdravih i zaraženih plodova, osim kod sorti Junska rana i Summit kod kojih nije bilo značajnih razlika u uslovima infekcije u odnosu na zdrave.

Ispitivanje sadržaja ukupnih fenola u metanolnim ekstraktima kod većine sorti su pokazali sličnu situaciju u poređenju sa acetonskim. Ispitivani plodovi imali su sadržaj ukupnih fenola koji se kretao u rasponu od 2,63 do 6,02 mg/g s.m. u zdravim plodovima i od 2,11 do 5,07 mg GAE/g s.m. u zaraženim plodovima (Graf. 10). Infekcija je statistički značajno uticala na ukupan sadržaj polifenola u plodovima Burlat, Asenova rana, Junska rana i Merchant.

Posmatrano u celini, acetonski ekstrakti su pokazali veći sadržaj ukupnih fenola u plodovima trešnje. Razlika u pogledu ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja u zavisnosti od ekstrakcionog sredstva je posledica različite polarnosti korišćenih rastvarača koji selektivno ekstrahuju pojedina fenolna jedinjenja (Chirinos i sar., 2007; Mane i sar., 2007; Spigno i sar., 2007).

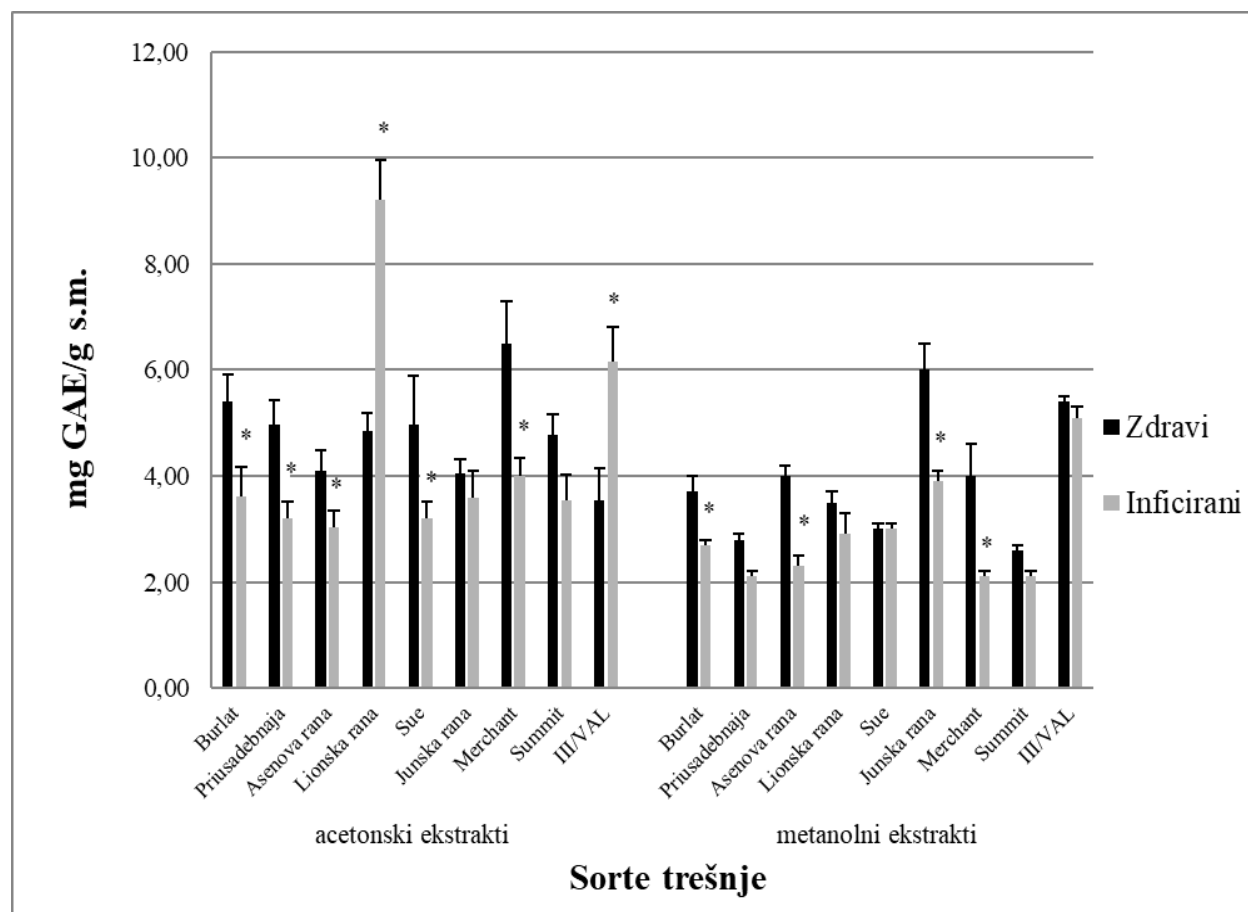
Istraživanja su pokazala da je aceton efikasniji rastvarač od metanola za ekstrakciju ukupnih fenola i flavonoida. Stojanović, (2015) je istraživala sadržaj metanolnih i acetonskih ekstrakata raznih voćnih vrsta. Pri tome je došla do rezultata da je najmanji sadržaj ukupnih fenola određen u ekstraktima metanola, a najveći u ekstraktima acetona.

Neka istraživanja su pokazala da je pšenica gajena u uslovima infekcije reagovala slično na napad patogena kao većina ispitivanih sorti trešnje. U bolesnim listovima pod uticajem gljive *Ustilago tritici* je sadržaj fenola za 31,75% bio niži nego kod zdravih biljaka (Tehmina i sar., 2012). Takođe, pod uticajem drugog patogena (*Alternaria triticina*) sadržaj fenola se smanjivao sa napretkom bolesti (Tyagi i sar., 1998). Što se tiče koštičavih voćnih vrsta, rezultati su pokazali da je smanjenje koncentracije pojedinih fenolnih jedinjenja u epidermisu ploda breskve u korelaciji sa povećanjem osetljivosti na patogena *Monilinia fructicola* (Bostock et al., 1999).

Mahmood i sar. (2013) su ispitivali promene ukupnih fenola u sortama trešnje u različitim fazama zrenja i sadržaj se kretao od 1,76-6,87 mg GAE/g s.m. u tri faze zrelosti. Drugi izvori su pokazali da se sadržaj fenola kretao od 1,01-5,57 mg/g (Skrzyński i sar.,

2016), 0,76-3,01 mg GAE/g s.m. (Prvulović i sar., 2012). Goncalves i sar. (2004) su došli do rezultata da se ukupan sadržaj fenola u sortama trešnje kretao od 0,06 do 2,30 mg GAE/g.

Nakon inokulacije fitopatogenom gljivom *R. solani*, u korenu biljaka soje i kukuruza, kao i u listu biljaka šećerne repe došlo je do statistički značajno povećane akumulacije fenola, dok se u listu soje i korenu šećerne repe njihov sadržaj značajno smanjio (Kiprovska, 2013).

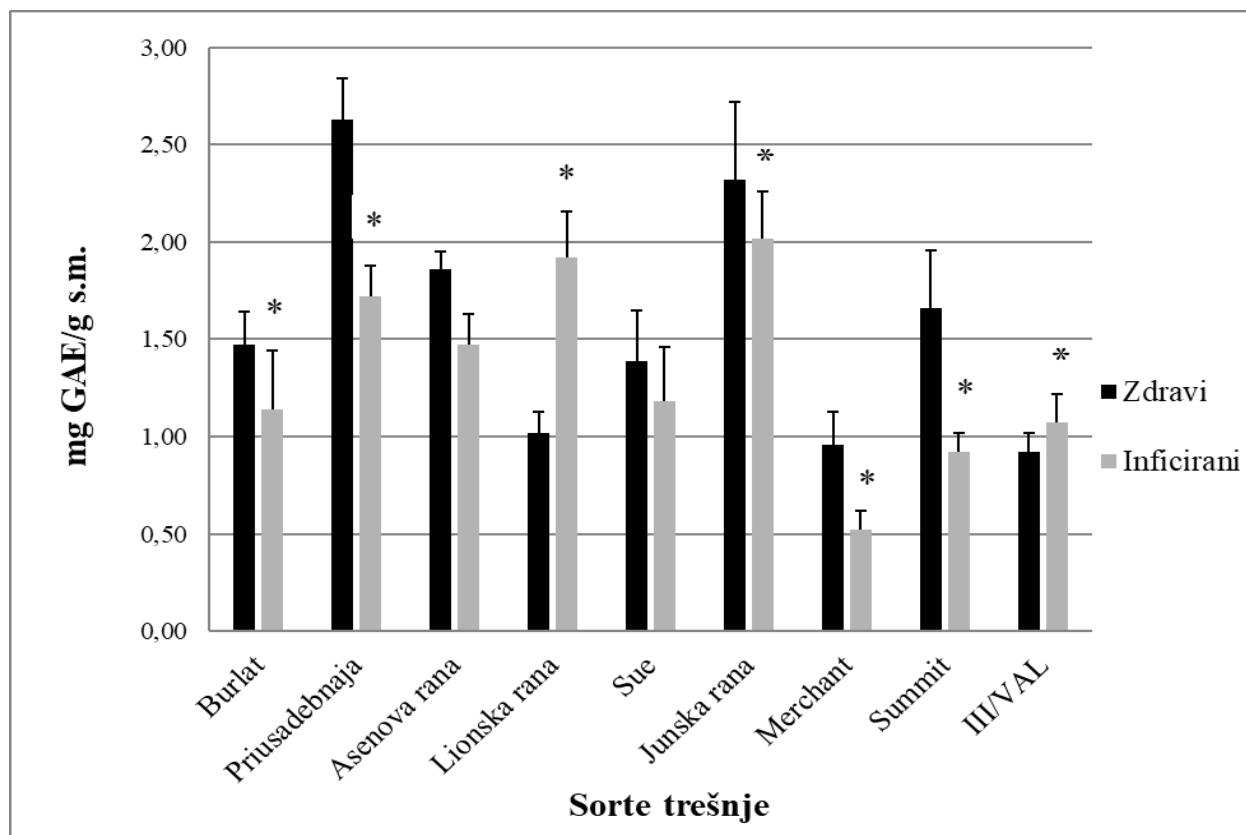


Graf. 10. Sadržaj ukupnih fenola u zdravim i inficiranim plodovima trešnje. Rezultati izraženi u mg ekvivalenta galne kiseline/g suve materije (mg GAE/g s.m.) su predstavljeni kao aritmetička sredina ± standardna devijacija. Podaci označeni * značajno se razlikuju za $P < 0.05$

6. 2. 3. 2. Sadržaj ukupnih tanina u plodovima trešnje

Koncentracija tanina varira u zavisnosti od genotipa biljke, stadijuma razvoja i faktora spoljne sredine (Prvulović i sar., 2011). Sadržaj ukupnih tanina u zdravim plodovima trešnje se kretao u rasponu od 0,96 do 2,63 mg GAE/g. s.m. dok se u zaraženim kretao od 0,52-2,02 mg GAE/g s.m. Većina ispitanih sorti pokazala je niži sadržaj tanina u zaraženim plodovima

kao i kod fenola, u odnosu na zdrave plodove (Graf. 11). Ova povezanost trenda promene fenola i tanina kod svih ispitivanih sorti je očekivana, s obzirom na to da tanini predstavljaju jednu od najznačajnijih grupa u sklopu fenolnih jedinjenja (Chung i sar., 1998). Najviši sadržaj ukupnih tanina zabeležen je u zdravom plodu sorte Priusadebnaja (2,63 mg GAE/g. s.m.), dok je najniži izmeren u zaraženom plodu sorte Merchant (0,52 mg GAE/g. s.m.). Iako je imala najnižu ocenu fitopatogenosti trećeg dana nakon inokulacije, sorta Merchant je veoma osetljiva na pucanje ploda (indeks pucanja > 50.1) (Milatović i Đurović, 2010), a samim tim i na napad bolesti (Holb, 2006). Rane sorte zrenja Lionska Rana i III/VAL su imale veći sadržaj tanina u uslovima infekcije. Najveće razlike između zdravih i zaraženih plodova u pogledu koncentracije tanina zabeležene su kod ranijih sorti zrenja Lionska rana, Merchant, Priusadebnaja i kod srednje kasne sorte Summit. Prvulović i sar. (2012) su ispitivali sadržaj ukupnih tanina u različitim sortama trešanje, i on se kretao od 0,32-0,75 mg GAE/g sv.m. Istraživanja su pokazala da tanini imaju značajnu ulogu u kontrolisanju širenja hifa gljiva tako što vrše inhibiciju ekstracelularnih enzima (hidrolaza koje proizvode gljiva) – (celulaze, pektinaze, ksilanaze). Pomoću navedenih enzima, gljive razgrađuju pektin i uzrokuju razmekšavanje, potom i maceraciju ćelija biljke domaćina (Scalbert, 1991; Lattanzio i sar., 2006). Ovo se može objasniti sporijim propadanjem plodova trešnje nakon inokulacije fitopatogenom gljivom, na primer, sorta Merchant je imala nižu ocenu patogenosti trećeg dana nakon infekcije (1,4), dok je sorta Burlat nakon istog perioda imala ocenu (3,8).



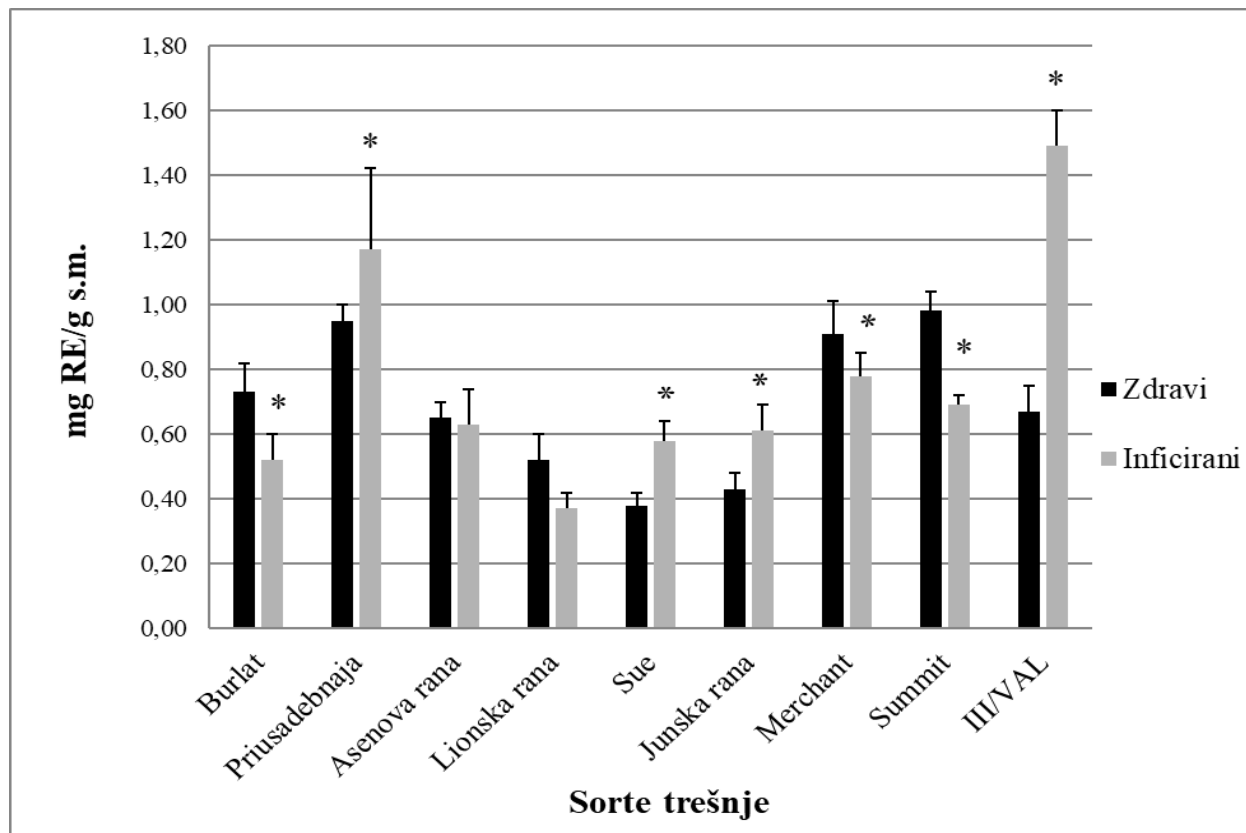
Graf. 11. Sadržaj ukupnih tanina u zdravim i inficiranim plodovima trešnje. Rezultati izraženi u mg ekvivalenta galne kiseline/g suve materije (mg GAE/g s.m.) su predstavljeni kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija. Podaci označeni * značajno se razlikuju za $P < 0.05$

6. 2. 3. 3. Sadržaj ukupnih flavonoida u plodovima trešnje

Flavonoidi predstavljaju grupu sekundarnih biomolekula koji igraju veoma važnu ulogu u otpornosti biljaka prema fitopatogenim mikroorganizmima. Oni su “hvatači” ROS, koji se proizvode od strane patogena i biljke kao rezultat infekcije (Blount i sar., 1992; Dai i sar., 1996).

Sadržaj ukupnih flavonoida kretao se od 0,33 do 0,98 mg RE/g s.m. u zdravim plodovima trešnje, dok je u zaraženim plodovima sadržaj flavonoida varirao između 0,37 i 1,51 mg RE/g s.m. (Graf. 12). U četiri od devet ispitivanih sorti značajna razlika je utvrđena u sadržaju flavonoida između zdravih i zaraženih plodova (III/VAL, Junska rana, Sue, Summit). Kod sorti Asenova rana i Merchant nije bilo statistički značajne razlike u sadržaju flavonoida između zdravih i zaraženih plodova. Sorta Sue, koja ima nizak indeks pucanja ploda, se u oplemenjivanju voćaka koristi kao “donor gena” za otpornost na pucanje ploda (Iezzoni i sar.,

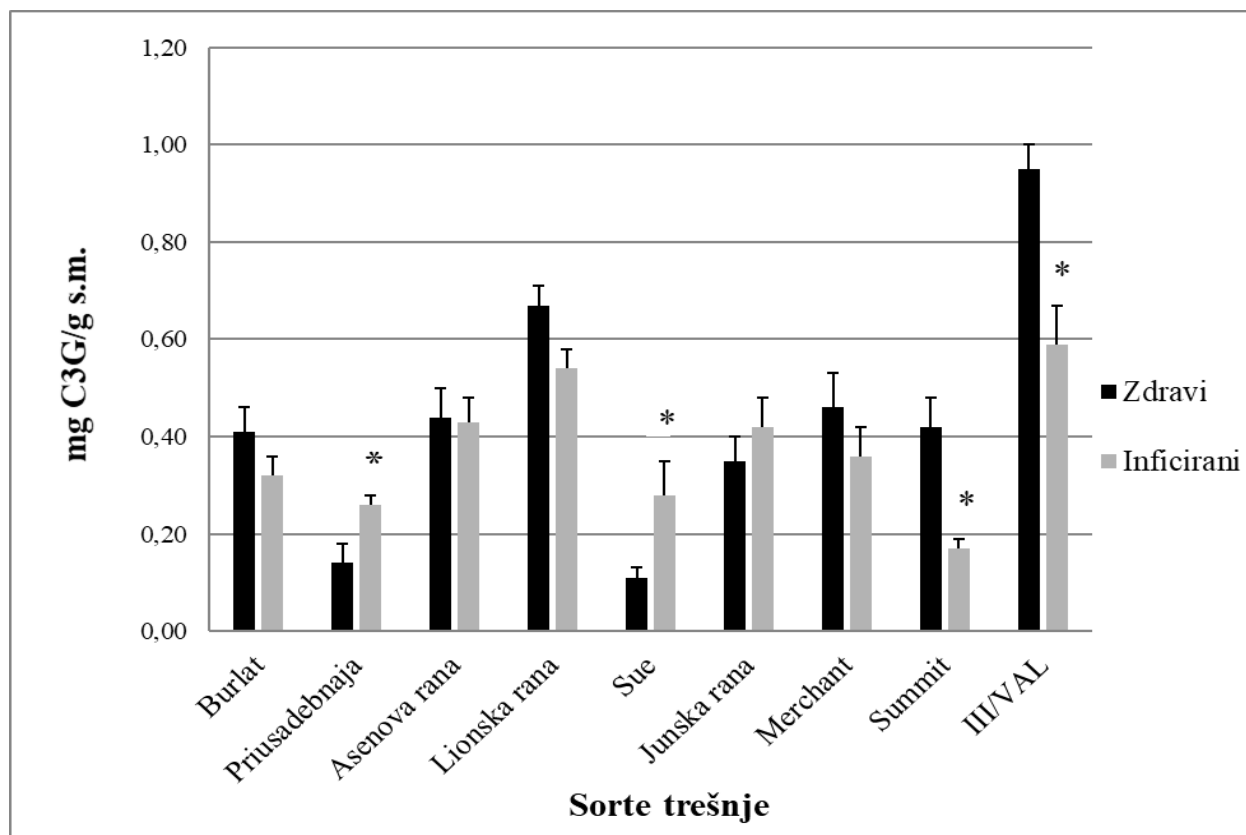
1991; Sansavini i Lugli, 2008), a samim tim i na trulež. Istraživanja su pokazala da su flavonoidi inkorporirani u ćelijske zidove nekrotičnih ćelija (Beckman i sar., 2000), što su u ovom slučaju pokazale sorte Sue (52% veći sadržaj u uslovima infekcije), Priusadebnaja (23% veći sadržaj u uslovima infekcije), i Junska rana (42% veći sadržaj u uslovima infekcije), III/VAL (2,2 puta veći sadržaj u uslovima infekcije) što je u skladu sa istraživanjima (Britton, 1983; Dixon i Paiva, 1995; Malenčić i sar., 2012; Medić Pap i sar., 2014; Blount i sar, 1992; Dai i sar., 1996). Sorta III/VAL koju karakteriše veoma intenzivna boja soka, mesa i pokožice ploda je pokazala najveći sadržaj flavonoida u uslovima infekcije u odnosu na druge sorte. Sadržaj flavonoida u različitim sortama trešnje se kretao od 0,42-1,54 mg/g s.m. (Prvulović i sar., 2011), 0,49 – 0,7 mg/g s.m (Prvulović i sar., 2012), 0,1 – 0,49 mg/g s.m. (Skrzyński, 2016).



Graf. 12. Sadržaj ukupnih flavonoida u zdravim i inficiranim plodovima trešnje. Rezultati izraženi u mg ekvivalenta rutina/g suve materije (mg RE/g s.m.) su predstavljeni kao aritmetička sredina ± standardna devijacija. Podaci označeni * značajno se razlikuju za $P < 0.05$

6. 2. 3. 4. Sadržaj ukupnih antocijanina u plodovima trešnje

Sadržaj antocijanina u zdravim i inficiranim plodovima trešnje kretao se u rasponu od 0,11-0,95 mg C3G/g s.m. (Graf. 13). Najviši sadržaj ukupnih antocijanina izmeren je u zdravom plodu sorte III/VAL (0,95 mg C3G/g s.m.), zatim u plodu Lionska rana (0,67 mg C3G/g s.m.) i Merchant (0,46 mg C3G/g s.m.). Najmanji sadržaj ukupnih antocijanina zabeležen je u zdravom plodu sorte Priusadebnaja (0,11 mg C3G/g s.m.). Ukupan sadržaj antocijanina bio je veći u plodovima sorti koje karakteriše tamnija boja pokožice ploda, što je i očekivano s obzirom na to da je ova grupa polifenola “odgovorna” za boju ploda (Skrzyński, 2016; Gao i Mazza, 1995). Kod većine sorti, ukupni sadržaj antocijanina je bio niži u inficiranim plodovima, osim kod sorti Junska rana, Priusadebnaja i Sue kod kojih je sadržaj bio viši u uslovima infekcije. Istraživanja su pokazala da je sadržaj antocijanina kod različitih sorti trešnje u rasponu od 0,35-0,69 mg C3G/g s.m. (Prvulović i sar., 2011), 0,28–1,08 mg/g sv.m. (Skrzyński i sar., 2016). Sadržaj antocijanina može se kretati od 0,82 do 2,97 mg/g za trešnje tamnije pokožice i mesa ploda i od 0,02 do 0,41 mg/g za trešnje svetlije boje pokožice i mesa (Gao i Mazza, 1995). Dobijeni rezultati su u skladu sa istraživanjima Gao i Mazza (1995), Skrzyński i sar. (2016), Prvulović i sar. (2011).

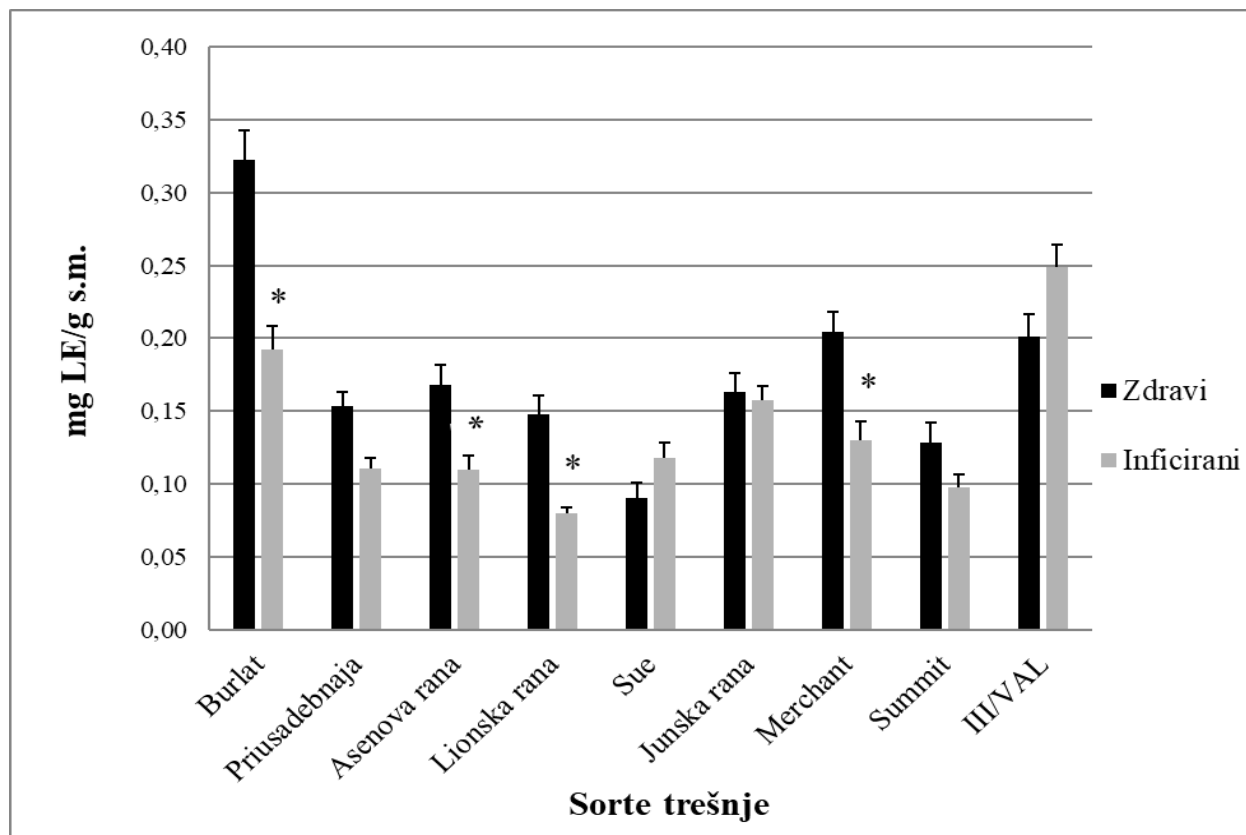


Graf. 13. Sadržaj ukupnih antocijanina u zdravim i inficiranim plodovima trešnje. Rezultati izraženi u mg cijanidin 3-glukozida/g suve materije (mg C3G/g s.m.) su predstavljeni kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija. Podaci označeni * značajno se razlikuju za $P < 0.05$

6. 2. 3. 5. Sadržaj proantocijanidina u plodovima trešnje

Sadržaj proantocijanidina u zdravim plodovima se kretao od 0,09 do 0,32 mg LE/g s.m. dok su se u uslovima infekcije vrednosti kretale od 0,08 do 0,25 mg LE/g s.m. (Graf. 14). Najviše vrednosti ukupnih proantocijanidina zabeležene su kod sorti crvene boje soka (Burlat i III/VAL), dok su niže vrednosti zabeležene u sortama sa bezbojnim sokom kakve su Sue, Priusadebnaja i Asenova rana. Plodovi sa svetlocrvenom do svetlonarandžastom bojom soka su pokazale prosečne vrednosti proantocijanidina očitanih kod sorti koje karakteriše tamno crveni i sorti bezbojnog soka, a to su Merchant, Junska rana, Lionska rana. Kao i kod ostalih polifenola, kod većine sorti zabeležen je niži sadržaj proantocijanidina u odnosu na plodove u uslovima infekcije. Kod sorte III/VAL u uslovima infekcije sadržaj proantocijanidina je bio veći za 23,7% u odnosu na zdrav plod. Sorta Sue je, takođe pokazala veći sadržaj ovih polifenola u oslovima infekcije (30,4% u odnosu na zdrav plod). Po literaturnim podacima

sadržaj ukupnih proantocijanidina u trešnjama iznosi oko 0,08 mg/g (Gu i sar., 2004)., 0,20 mg/g (Kelley i sar., 2006), u kupini 0,30 mg/g, malini 0,27 mg/g, kajsiji 0,16 mg/g (Gu i sar., 2004).



Graf. 14. Sadržaj ukupnih proantocijanina u zdravim i inficiranim plodovima trešnje. Rezultati izraženi u mg ekvivalenta leukoantocijanidina/g suve materije (mg LE/g s.m.) su predstavljeni kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija. Podaci označeni * značajno se razlikuju za $P < 0.05$

Ova jedinjenja pokazuju veoma visoku antiradikalnu aktivnost zahvaljujući hidroksilnim grupama koje su potencijalni donori vodonika. Takođe, povećanje stepena polimerizacije povećava efikasnost proantocijanidina protiv različitih vrsta radikala (Heim i sar, 2002). Struktura ovih polimera je verovatno odgovorna za jaču antiradikalnu aktivnost proantocijanidina u poređenju sa ostalim fenolima (Jakobek i sar., 2008). Hebert i sar, 2002. su ispitivali uticaj ekstrahovanih proantocijanidina iz plodova jagode na rast micelije gljive *B. cinerea*. Rezultati su pokazali inhibiciju ovog fitopatogena na hranljivoj podlozi pod uticajem ispitivanog ekstrakta.

6. 2. 3. 6. Analiza varijanse polifenolnih komponenti

U Tabeli 10. su prikazani rezultati analize varijanse između sorti trešanja u odnosu na 5 parametara ispitivanja. Prema nivou značajnosti $P < 0,05$, može se zaključiti da je bilo statistički značajnih razlika između sorti u odnosu na parametre ispitivanja.

Tabela 10. Analiza varijanse polifenolnih komponenti: sadržaj ukupnih fenola (mg GAE/g s.m.), sadržaj ukupnih tanina (mg GAE/g s.m.), sadržaj ukupnih flavonoida (mg RE/g s.m.), sadržaj ukupnih antocijanina, (mg C3G/g s.m.), sadržaj ukupnih proantocijanidina (mg LE/g s.m.)

Parametar		Suma kvadrata	Stepeni slobode	Sredina stepena slobode	F	Sig. (nivo značajnosti)
Sadržaj ukupnih fenola (mg GAE/g s.m.)	Između grupa	52,79	8	6,60	3,86***	0,002
	Unutar grupa	76,94	45	1,71		
	Total	129,74	53			
Sadržaj ukupnih tanina (mg GAE/g s.m.)	Između grupa	11,26	8	1,41	10,76***	0,000
	Unutar grupa	5,88	45	0,13		
	Total	17,14	53			
Sadržaj ukupnih flavonoida (mg RE/g s.m.)	Između grupa	2,76	8	0,35	8,84***	0,000
	Unutar grupa	1,76	45	0,04		
	Total	4,52	53			
Sadržaj ukupnih antocijanina (mg C3G/g s.m.)	Između grupa	1,64	8	0,21	18,06***	0,000
	Unutar grupa	0,51	45	0,01		
	Total	2,15	53			
Sadržaj ukupnih proantocijanidina (mg LE/g s.m.)	Između grupa	13,35	8	16,68	12,49***	0,000
	Unutar grupa	6,02	45	1,34		
	Total	19,36	53			

Istraživanja su pokazala da na hemijski sastav plodova mogu da utiču genetički faktori, faktori spoljne sredine, tehnologija proizvodnje kao i uslovi skladištenja (Borguini i Da Silva Torres, 2009). Sorte trešnje različito reaguju na trulež ploda, pri čemu su plodovi sa debljom pokožicom manje osetljivi od plodova sa tanjom pokožicom (Holb, 2006). Selekcija, uzgoj manje osetljivih sorti na trulež smanjuju rizik od pojave bolesti (Brown i Wilcox, 1989). Sorte trešnje ispoljile su različit odgovor na patogena kako u uslovima veštačke inokulacije tako i u prirodnoj infekciji.

Prema ANOVA, na sadržaj ukupnih fenola, ukupnih tanina, ukupnih flavonoida, ukupnih antocijanina, ukupnih proantocijanidina u plodovima ispitivanih genotipova trešnje značajno su uticali: sorta, prisustvo patogena, kao i interakcija ova dva faktora. Rezultati Malenčića i sar. (2010) pokazali su da se uticaj fitopatogenih gljiva na biljke manifestuje u povećanju

sadržaja fenola i promenama antioksidantne enzimske aktivnosti, koja se razlikuje u zavisnosti od osobina genotipa.

6. 2. 3. 7. HPLC analiza sadržaja sekundarnih metabolita u plodovima trešnje

Tabela 11. Lista izolovanih flavonoida i njihovih masenih spektrometrijskih podataka u plodovima trešnje. Negativni jonski režim (M^- (m/z)) je korišćen za skeniranje polifenolnih komponenti, osim za antocijanine gde je primenjivan pozitivni jonski režim M^+ (m/z)

	M^- (m/z) \rightarrow MSn
derivati hidroksicimetne kiseline	
neohlorogenske kiseline	353 \rightarrow 191,179,135
hlorogenska kiselina	337 \rightarrow 163
dikafeoil hinska kiselina	515 \rightarrow 191
3-kumaroilhinska kiselina	353 \rightarrow 191, 179
4- kumaroilhinska kiselina	337 \rightarrow 173
3-feruloihinska kiselina	367 \rightarrow 193
Flavanoli	
procijanidin dimer	577 \rightarrow 407, 451, 425, 289
procijanidin trimer	865 \rightarrow 695, 407, 289, 577
Cijanogeni glikozidi	
Amigdalín	456 \rightarrow 323
Flavoni	
apigenin-ramnozid	
Flavanoni	
naringenin-heksozid 1	433 \rightarrow 271
naringenin-heksozid 2	433 \rightarrow 271
naringenin-heksozid 3	433 \rightarrow 271
Flavonoli	
kvercetin-glukozid 1	463 \rightarrow 301
kvercetin-3-glukozid 2	463 \rightarrow 301
kvercetin-3-glukozid 3	463 \rightarrow 301
kvercetin-3-rutinoside	609 \rightarrow 301
kemferol-glukozid 1	755 \rightarrow 593/447/285
kemferol-glukozid 2	755 \rightarrow 593/447/285
kemferol-rutinozid	593 \rightarrow 285
izoramnetin-rutinozid	623 \rightarrow 315
Antocijanini	
	M^+ (m/z) \rightarrow MSn
cijanidin-glukozid	449 \rightarrow 287

cijanidin-rutinozid	595→449/287
peonidin-3-glukozid	463→301
peonidin-3-rutinozid	609→463/301
5-karboksipirano-cijanidin-3-rutinozid	663→517/355

Ukupno 26 različitih polifenolnih jedinjenja izolovani su i identifikovani HPLC metodom (Tabela 11).

Šest identifikovanih jedinjenja pripadala su derivatima hidroksicimetne kiseline. Od flavanola identifikovani su dve grupe jedinjenja: procijanidin dimeri i procijanidin trimeri. Što se tiče cijanogenih glikozida identifikovan je samo amigdalinalin. Od flavanona identifikovano je jedinjenje apigenin-ramnozid, a od flavanona tri naringenin heksozida. Ukupno osam jedinjenja je identifikovano iz podgrupe flavonola, a pet antocijanina je identifikovano u zdravim i zaraženim trešnjama.

6. 2. 3. 7. 1. Sadržaj hidroksicimetnih kiselina u plodovima trešnje

Fenolne kiseline čine veliku grupu fenola, uključujući široko rasprostranjene hidroksibenzoeve i hidroksicimetne kiseline. Ranija istraživanja su pokazala biocidno, tj. antibakterijsko delovanje fenolnih kiselina protiv bakterija (Baydar i sar., 2004) i gljiva (Asiegbu, 2000; Ahn i sar., 2005) in vitro.

Analiza fenolnih kiselina pokazala je prisustvo derivata hidroksicimetne kiseline (Tabela 11 i 12), od kojih je najzastupljenije jedinjenje bila neohlorogenska kiselina, čiji je sadržaj bio značajno smanjen u zaraženim plodovima kod većine sorti osim kod sorti Lionska rana i III/VAL (Tabela 12).

Sorta III/VAL reagovala je na prisustvo patogena značajnom akumulacijom svih detektovanih derivata hidroksicimetne kiseline u odnosu na većinu drugih sorti kod kojih je infekcija značajno uticala tako što je smanjila sadržaj navedenih derivata (Tabela 12). Ova promena u uslovima infekcije pokazuje slabiju otpornost na patogen.

Sorte Lionska rana i Merchant su imale beznačajnu količinu sadržaja feruloilhinske kiseline u zdravim plodovima, ali se sadržaj povećao nakon infekcije. Ne postoje podaci o učešću feruloilhinske kiseline na otpornost patogena kod trešnje, međutim u biljkama duvana (*Nicotiana tabacum*) je najveći porast u koncentraciji feruloilhinskih kiselina

zabeležen 108 h nakon inokulacije virusom mozaika duvana (120 mg/g sv.m.) (Tangui i sar., 1972). Sadržaj hlorogenske kiseline različitih sorti trešnje kretao se između 6-26,1 mg/kg (Usenik i sar., 2008), 1,7-29,7 mg/kg (Ballistreri i sar., 2013), 19-62 mg/kg (Jakobek i sar., 2009) i sadržaj rutina kretao se između 20,6-57,8 mg/kg (Usenik i sar., 2008); 7-87 mg/kg (Sugavara i Igarashi, 2008). Prema autorima (Schovankova i Opatova, 2011), hlorogenska kiselina i epikatehin su značajna fenolna jedinjenja koja se akumuliraju na mestu infekcije.

Tabela 12. Derivati hidroksicimetnih kiselina u zdravim (Z) i inficiranim (I) plodovima trešnje. Rezultati izraženi u mg/kg s.m. su predstavljeni kao aritmetička sredina ± standardna devijacija. Podaci označeni * značajno se razlikuju za P<0.05

DERIVATI HIDROKSICIMETNIH KISELINA	neohlorogenska kiselina	hlorogenska kiselina	dikafeoil- hinska kiselina	3- kumaroilhins ka kiselina	4- kumaroilhinska kiselina	3-feruloilhinska kiselina
<i>Sorta</i>	$\bar{X} \pm Se$	$\bar{X} \pm Se$	$\bar{X} \pm Se$	$\bar{X} \pm Se$	$\bar{X} \pm Se$	$\bar{X} \pm Se$
Burlat Z	988,4±225,7	33,2±8,6	0,58±0,07	15,4±3,4	0,56±0,18	92,3±10,4
Burlat I	248,1±14,4*	12,9±0,9*	0,12±0,01*	16,7±0,8	0,27±0,03*	84,9±13,3
Priusadebnaja Z	1202,5±214,5	30,3±5,2	0,18±0,00	30,1±5,8	0,87±0,19	170,1±12,0
Priusadebnaja I	241,0±57,5*	8,9±2,4*	0,08±0,00*	12,8±3,0*	0,16±0,04*	119,6±6,6
Asenova rana Z	2801,9±589,5	190,7±17,4	0,42±0,01	122,2±4,2	7,65±0,43	189,6±10,5
Asenova rana I	1141,6±53,7*	63,9±7,1*	0,09±0,00*	81,5±2,0*	2,51±0,10*	104,1±5,8*
Lionska Z	598,6±238,4	38,4±22,3	0,20±0,01	36,1±19,4	0,93±0,51	93,1±24,7
Lionska I	810,3±39,4*	28,1±1,5	0,17±0,01	28,8±1,4	0,71±0,05	105,3±7,3*
Sue Z	2127,3±198,2	88,0±4,0	0,32±0,01	45,2±4,6	2,66±0,09	0,0±0,0
Sue I	725,3±133,4*	24,8±4,1*	0,28±0,07	26,1±4,0*	0,76±0,15*	118,3±9,6*
Junska rana Z	6919,9±331,5	201,3±13,7	0,78±0,05	33,7±2,1	11,33±0,74	222,2±54,1
Junska rana I	3746,7±246,5*	100,9±1,3*	0,45±0,01*	19,8±0,8	5,07±0,19*	142,5±7,3*
Merchant Z	2012,9±111,6	54,1±3,1	0,30±0,01	50,3±3,4	2,48±0,23	0,0±0,0
Merchant I	611,6±45,3	14,6±1,5*	0,15±0,01*	20,3±1,7*	0,67±0,06*	139,1±21,2*
Summit Z	908,5±47,5	55,6±3,3	0,49±0,03	28,5±1,3	0,87±0,04	180,3±19,5
Summit I	284,7*±35,5*	13,0±1,6*	0,19±0,01*	14,0±1,8	0,20±0,04*	146,7±18,4
III/VAL Z	1116,6±74,6	33,2±2,5	0,28±0,02	19,7±1,2	0,80±0,08	488,3±29,7
III/VAL I	1947,4±413,2*	66,7±15,1*	0,57±0,08*	49,9±9,9*	2,17±0,70*	330,8±36,2*

U nekim istraživanjima promene u koncentraciji i profilu fenolnih kiselina primećene tokom razvoja ploda bile su u korelaciji sa nivoima otpornosti prema određenim bolestima. Bostock i sar. (1999) su došli do rezultata da je pad u koncentraciji hlorogenske i kafene kiseline u epidermisu ploda breskve (*Prunus persica* L) bio u korelaciji sa povećanjem osetljivosti bolesti na *M. fructicola* Vint. (Med).

6. 2. 3. 7. 2. Sadržaj flavanona u plodovima trešnje

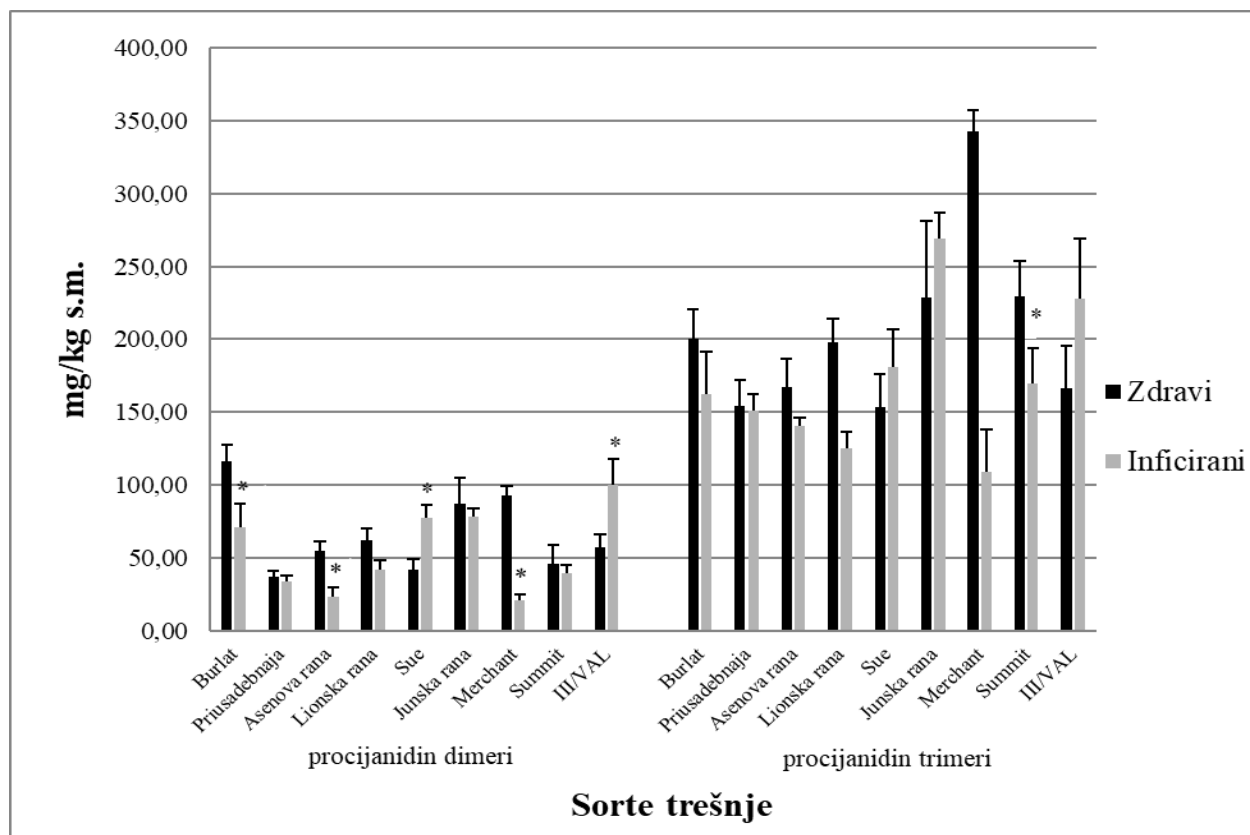
Što se tiče sadržaja flavanona u ispitivanim sortama trešnje, otkrivena su tri naringenin-heksozida, a njihov sadržaj se smanjio u uslovima infekcije kod većine ispitanih sorti, izuzev kod sorti Priusadebnaja, Sue i III/VAL (Tabela 11 i 13). Istraživači su takođe detektovali tri naringenin-heksozida i to u divljoj trešnji i višnji (magrivi) (Mikulić-Petrovsek i sar., 2016).

Tabela 13. Sadržaj flavanona u zdravim (Z) i inficiranim (I) plodovima trešnje. Rezultati izraženi u mg/kg s.m. su predstavljeni kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija. Podaci označeni * značajno se razlikuju za $P < 0.05$

	Status	Burlat	Priusadebnaja	Asenova rana	Lionska rana	Sue	Junska rana	Merchant	Summit	III/VAL
naringenin heksozid 1	Z	6,2 \pm 1,6	3,1 \pm 0,2	2,8 \pm 0,4	7,8 \pm 0,9	2,8 \pm 0,8	11,0 \pm 1,3	7,6 \pm 0,3	3,4 \pm 1,0	5,1 \pm 0,6
	I	5,1 \pm 0,6*	4,5 \pm 0,3*	2,2 \pm 0,3	5,0 \pm 0,7*	5,1 \pm 0,5*	7,8 \pm 0,4*	1,9 \pm 0,6*	3,3 \pm 0,3	11,4 \pm 1,6*
naringenin heksozid 2	Z	26,1 \pm 3,5	6,2 \pm 1,9	8,8 \pm 2,0	24,4 \pm 4,2	10,4 \pm 2,5	26,5 \pm 7,4	24,6 \pm 2,1	10,9 \pm 2,5	12,6 \pm 3,5
	I	28,6 \pm 5,1	26,2 \pm 2,1*	10,2 \pm 2,0*	13,5 \pm 3,3*	24,5 \pm 5,9*	27,2 \pm 4,1	7,3 \pm 3,4*	5,6 \pm 0,9*	23,5 \pm 8,5*
naringenin heksozid 3	Z	26,8 \pm 4,0	2,7 \pm 0,2	4,7 \pm 1,1	18,5 \pm 3,2	6,9 \pm 1,3	19,2 \pm 3,4	11,6 \pm 0,7	5,8 \pm 1,9	9,5 \pm 2,3
	I	8,3 \pm 2,2*	4,3 \pm 1,3*	2,0 \pm 0,4*	10,9 \pm 1,5*	22,2 \pm 4,6*	14,1 \pm 2,5	6,2 \pm 1,2*	3,3 \pm 0,7*	21,7 \pm 10,6*

6. 2. 3. 7. 3. Sadržaj flavanola u plodovima trešnje

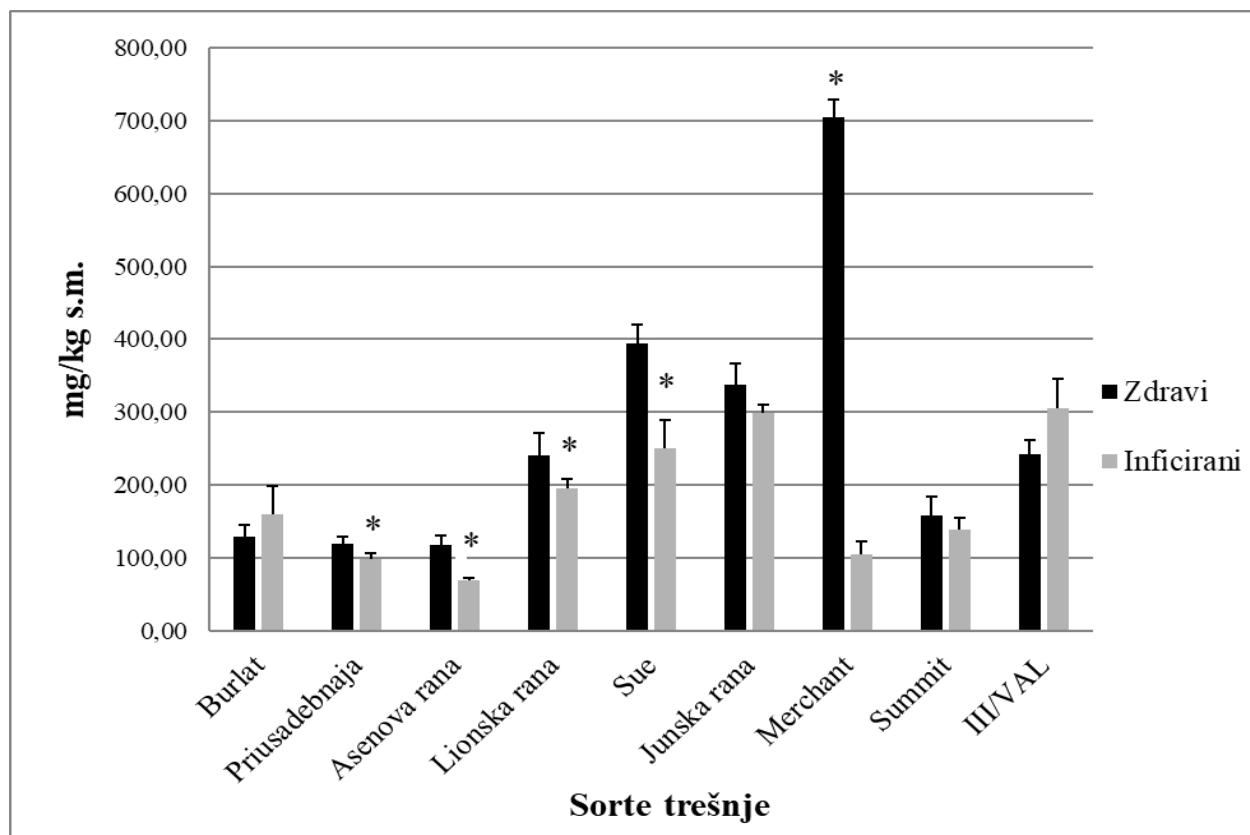
Kada su u pitanju flavan-3-oli (flavanoli), utvrđeno je da je epikatehin glavni predstavnik. Takođe, istrživanja su pokazala da su manje količine katehina, prisutne u plodovima trešnje (Macheix i sar., 1990; Goncalves i sar., 2004). Procijanidin dimeri i trimeri su prisutni flavanoli u ispitivanim uzorcima (Graf. 15). Sadržaj procijanidin dimera se kretao od 37,5 do 106,2 mg/kg u zdravim plodovima i od 20,8 do 100,5 mg/kg u inficiranim plodovima. Sve sorte odgovorile na infekciju smanjenjem sadržaja procijanidina dimera, međutim sorta III/VAL je pokazala dvostruko povećanje nakon infekcije. Procijanidin trimeri su imali sličan trend povećanja u zaraženim plodova kod sorte III/VAL.



Graf. 15. Sadržaj flavanola (procijanidin dimera i procijanidin trimera) u zdravim i inficiranim plodovima trešnje. Rezultati izraženi u mg/kg s.m. su predstavljani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija. Podaci označeni * značajno se razlikuju za $P < 0.05$

6. 2. 3. 7. 4. Sadržaj flavona u plodovima trešnje

Od flavona identifikovan je apigenin-ramnozid i njegov sadržaj u uslovima infekcije je bio smanjen (Graf. 16), osim kod sorti crvene pokožice, mesa i soka ploda koji su karakteristični za sorte Burlat i III/VAL, gde je zabeležen porast. Najveći sadržaj ovog flavona zabeležen je u zdravom plodu sorte Sue, dok je najniži sadržaj zabeležen u zaraženom plodu sorte Asenova rana. Sorte trešnje koje karakteriše svetlija boja soka imale su viši sadržaj identifikovanog flavona u odnosu na ostale ispitivane sorte.



Graf. 16. Sadržaj flavona (apigenin-ramnozid) u zdravim (Z) i inficiranim (I) plodovima trešnje. Rezultati izraženi u mg/kg s.m. su predstavljeni kao aritmetička sredina ± standardna devijacija. Podaci označeni * značajno se razlikuju za $P < 0.05$

6. 2. 3. 7. 5. Sadržaj flavonola u plodovima trešnje

Derivati kvercetina i kemferola, kao i izoramnetin-rutinozida su detektovani flavonoli u ispitivanim sortama (Tabela 14). Sorte Sue i III/VAL u uslovima infekcije akumulirale su derivate kvercetina i kemferol-heksozida za razliku od drugih sorti kod kojih je zabeležen pad navedenih derivata. Sadržaj kemferol-rutinozida je bio najviši u plodovima III/VAL nakon infekcije (75,6 mg/kg s.m.), za razliku od drugih inficiranih plodova u kojima je zabeleženo smanjenje sadržaja kemferol-rutinozida (7,2-41,9 mg/kg s.m.). Nakon infekcije u plodovima sorti Priusadebnaja, Sue i III/VAL (Tabela 14) detektovan je porast sadržaja izoramnetin-rutinozida (1,3-2,5 puta). Prema nekim autorima (Goetz i sar., 1999; Wurms i sar., 2003; Terry i sar., 2004) fenilpropanoidi, uključujući i flavonole i hidroksicimetne kiseline, mogu učestvovati u “pružanju” otpornosti na *Botritis* kod nekih biljnih vrsta.

Tabela 14. Sadržaj flavonola u zdravim (Z) i inficiranim (I) plodovima trešnje. Rezultati izraženi u mg/kg s.m. su predstavljeni kao aritmetička sredina ± standardna devijacija. Podaci označeni * značajno se razlikuju za $P < 0.05$

FLAVONOLI	kvercetin-3-heksozid			kvercetin-3-rutinozid	kemferol-heksozid		kemferol-rutinozid	izoramnetin-rutinozid
	1	2	3		1	2		
Sorta	$\bar{X} \pm Se$	$\bar{X} \pm Se$	$\bar{X} \pm Se$	$\bar{X} \pm Se$	$\bar{X} \pm Se$	$\bar{X} \pm Se$	$\bar{X} \pm Se$	$\bar{X} \pm Se$
Burlat Z	6,5±0,7	897,3±99,0	841,9±86,8	2645,9±276,9	18,1±2,1	4,8±1,2	32,3±3,5	6,4±0,8
Burlat I	5,3±1,0	455,9±30,5*	129,6±14,2*	383,0±27,7*	10,9±1,3*	3,9±0,4	7,2±0,8*	3,9±0,6*
Priusadebnaja Z	5,0±0,6	327,5±13,4	95,2±4,4	902,2±18,2	9,9±0,7	2,4±0,2	37,0±0,8	1,8±0,1
Priusadebnaja I	4,9±0,4	271,3±10,5*	77,9±8,7	405,4±17,6*	9,1±0,6	3,5±0,2*	21,0±0,9*	2,3±0,5*
Asenova rana Z	5,5±0,6	402,9±18,5	132,6±10,8	811,6±26,3	7,4±0,8	2,2±0,3	15,8±0,9	2,3±0,3
Asenova rana I	4,6±0,2	295,2±8,0*	51,2±4,5*	237,8±11,8*	5,4±0,2	1,7±0,2*	8,2±0,4*	1,5±0,2*
Lionska Z	6,5±0,5	857,3±22,4	197,4±12,3	2132,4±62,5	17,2±1,0	6,1±0,7	46,5±1,9	5,5±0,9
Lionska I	4,1±0,4	699,4±35,8*	164,6±10,5	2037,0±91,3	13,1±0,9	3,9±0,5*	41,9±2,0	3,9±0,6*
Sue Z	5,0±0,7	458,8±19,6	100,6±7,9	1141,3±36,2	8,8±0,9	2,2±0,6	48,5±1,5	2,6±0,2
Sue I	5,9±0,8	908,7±20,4*	197,1±13,4*	1768,8±41,7*	17,6±1,1*	4,0±0,4*	25,5±0,9*	6,6±0,5*
Junska rana Z	7,5±1,7	999,5±61,7	513,0±44,9	2393,3±139,1	19,7±2,6	8,6±1,1	39,1±3,0	5,4±0,8
Junska rana I	8,8±0,6	634,5±9,7*	446,0±10,6*	1539,0±13,2*	15,0±0,6*	6,1±0,3*	23,7±0,5*	4,3±0,2*
Merchant Z	11,2±0,5	573,5±20,1	252,8±9,7	2154,4±79,6	15,7±0,5	5,9±0,2	50,0±1,9	3,7±0,1
Merchant I	3,6±0,9*	212,5±27,7*	65,3±12,3*	428,5±39,1*	5,9±1,1*	1,5±0,5*	15,3±1,7*	1,3±0,2*
Summit Z	7,5±0,8	782,5±41,3	159,4±15,2	1194,4±77,1	16,4±1,2	2,7±0,8	25,9±1,9	3,9±0,9
Summit I	5,5±0,8	535,8±30,0*	109,3±9,1*	756,5±42,4*	11,6±1,0*	2,5±0,3	20,0±1,1	2,9±0,2*
III/VAL Z	5,4±0,9	615,8±36,4	634,1±33,1	3745,5±192,9	11,1±1,3	4,0±0,5	37,7±2,2	4,1±0,5
III/VAL I	7,4±1,4	1695,7±208,6*	708,0±92,0*	4929,2±610,4*	28,1±3,4*	8,9±1,2*	75,6±9,3*	7,7±1,2*

6. 2. 3. 7. 6. Sadržaj antocijanina u plodovima trešnje

Najzastupljeniji fenoli u plodovima trešnje su antocijanini (Mozetič i sar., 2002; Goncalves i sar., 2004; Usenik i sar., 2008). Različiti antocijanini mogu imati značajno različite hemijske ili fiziološke osobine, međutim glavni antocijanini ne moraju nužno biti biološki najaktivnija jedinjenja (Wu i Prior, 2005).

Gao i Mazza (1995) su došli do rezultata da se ukupan sadržaj antocijanina kretao od 820 do 2970 mg/kg s.m. u trešnjama koje karakteriše tamnija pokožice i od 20 do 410 mg/kg s.m. u trešnjama svetlije pokožice, što je u skladu sa rezultatima. Cijanidin-3-O-rutinozid, cijanidin-3-O-glukozid, peonidin-3-O-rutinozid su antocijanini najčešće identifikovani u plodovima *P. avium* (Gao i Mazza, 1995; Goncalves i sar., 2007; Usenik i sar., 2010, Serradilla i sar., 2011, Ballistreri i sar.,

2013). U ovom istraživanju, najveći sadržaj od ukupnih polifenola imali su derivati cijanidina (Tabela 15).

Kod sorti Burlat, Junska rana, Merchant, Summit i III/VAL u najvišim koncentracijama bio je zastupljen cijanidin-glukozid, dok su manje koncentracije zabeležene kod sorti Priusadebnaja i Asenova rana u uslovima infekcije. Kod zdravih plodova navedenih sorti nije bilo prisustva ovog antocijanina.

Zdravi plodovi Priusadebnaja, Asenova rana i Lionska rana su imale značajne koncentracije cijanidin-rutinozida (170-1059,6 mg/kg).

Derivati peonidina (peonidin-glukozid i peonidin-rutinosid), kao i sadržaj 5-karbokspirano-cijanidin-rutinozida uglavnom su bili smanjeni u uslovima infekcije (Tabela 15).

Tabela 15. Sadržaj antocijanina u zdravim (Z) i inficiranim (I) plodovima trešnje. Rezultati izraženi u mg/kg s.m. su predstavljeni kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija. Podaci označeni * značajno se razlikuju za $P < 0.05$

<i>ANTOCIJANINI</i>	cijanidin-glukozid	cijanidin-rutinozid	peonidin-3-glukozid	peonidin-3-rutinozid	5-karbokspirano-cijanidin-3-rutinozid
Sorta	$\bar{X} \pm Se$	$\bar{X} \pm Se$	$\bar{X} \pm Se$	$\bar{X} \pm Se$	$\bar{X} \pm Se$
Burlat Z	5736,2 \pm 703,8	2447,0 \pm 322,7	13,6 \pm 4,9	35,5 \pm 10,4	29,9 \pm 4,0
Burlat I	262,5 \pm 16,2*	199,9 \pm 11,5*	3,9 \pm 0,8*	15,8 \pm 1,6*	15,7 \pm 2,2*
Priusadebnaja Z	0,0 \pm 0,0	170,1 \pm 8,2	2,6 \pm 0,6	1,8 \pm 0,4	7,0 \pm 1,5
Priusadebnaja I	4,5 \pm 1,6*	11,0 \pm 2,0*	0,3 \pm 0,2*	0,3 \pm 0,2*	1,5 \pm 0,9*
Asenova rana Z	0,0 \pm 0,0	250,8 \pm 19,6	1,3 \pm 0,4	0,6 \pm 0,3	2,1 \pm 0,5
Asenova rana I	10,4 \pm 3,4*	27,1 \pm 4,2*	0,8 \pm 0,5*	0,8 \pm 0,5	2,5 \pm 1,5
Lionska Z	0,0 \pm 0,0	1059,6 \pm 55,9	3,0 \pm 1,2	6,3 \pm 3,0	13,5 \pm 4,1
Lionska I	0,0 \pm 0,0	1267,8 \pm 38,7	1,9 \pm 0,3*	1,4 \pm 0,7*	10,6 \pm 2,7
Sue Z	67,7 \pm 20,9	220,0 \pm 5,8	1,9 \pm 0,6	1,3 \pm 0,9	4,9 \pm 1,6
Sue I	0,0 \pm 0,0*	956,3 \pm 21,6*	2,7 \pm 0,8*	3,5 \pm 1,3*	10,6 \pm 0,4*
Junska rana Z	3174,8 \pm 170,3	0,9 \pm 0,5	1,8 \pm 0,6	18,1 \pm 1,4	0,1 \pm 0,0
Junska rana I	3763,9 \pm 45,3	0,9 \pm 0,0	2,2 \pm 0,1*	21,8 \pm 1,5*	0,3 \pm 0,2
Merchant Z	2346,4 \pm 70,4	0,4 \pm 0,2	1,1 \pm 0,2	5,1 \pm 0,6	0,2 \pm 0,0
Merchant I	84,3 \pm 6,2*	0,1 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0*	0,1 \pm 0,0*	0,0 \pm 0,0*
Summit Z	1588,2 \pm 49,8	1,3 \pm 0,5	1,5 \pm 0,3	5,7 \pm 0,5	0,3 \pm 0,1
Summit I	782,9 \pm 12,8*	0,8 \pm 0,3*	0,9 \pm 0,2*	3,7 \pm 0,5*	0,4 \pm 0,1
III/VAL Z	26572,4 \pm 245,7	5,7 \pm 0,3	22,1 \pm 0,2	38,8 \pm 7,9	1,4 \pm 0,4
III/VAL I	3496,7 \pm 953,9*	1,9 \pm 1,5*	4,3 \pm 1,1*	16,7 \pm 1,2*	0,6 \pm 0,1*

6. 2. 3. 7. 7. Sadržaj cijanogenih glikozida (amigdalina) u plodovima trešnje

Cijanogeni glukozidi se biosintetizuju iz aminokiselina, te je obezbeđivanje prekursora za biosintezu ovih sekundarnih biomolekula važno kod mladih tkiva, koja su slabija od zrelih tkiva i imaju veću potrebu za odbranom od patogena (Del Cueto i sar., 2017).

U cijanogene glikozide koje proizvodi trešnja spadaju prunasin i amigdalin. U ispitivanih devet sorti, i kod zdravih biljaka, i u uslovima infekcije, detektovan je amigdalin (Tabela 16). Pored toga što je prisutan u nekim vegetativnim delovima, prisutan je u plodu i u koštici trešnje (Nahrstedt, 1972).

Amigdalin se akumulira u kasnijem fazama formiranja i zrenja ploda (Sanchez-Perez i sar., 2008).

Sadržaj cijanogenih glikozida - amigdalina se u zdravim plodovima trešnje kretao od 87,2 mg/kg (Summit) do 8927,9 mg/kg (Asenova rana), dok se u uslovima infekcije kretao od 38,4 mg/kg (Summit) do 337,8 mg/kg (Junska rana).

Tabela 16. Sadržaj amigdalina u zdravim (Z) i inficiranim (I) plodovima trešnje. Rezultati izraženi u mg/kg s.m. su predstavljeni kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija. Podaci označeni * značajno se razlikuju za $P < 0.05$

Status	Burlat	Priusadebnaja	Asenova rana	Lionska rana	Sue	Junska rana	Merchant	Summit	III/VAL(Valerij Čkalov)
Z	109,3 \pm 30,1	197,7 \pm 41,6	8927,9 \pm 3434,1	3167,4 \pm 2670,9	159,7 \pm 41,9	562,7 \pm 45,1	106,0 \pm 17,9	87,2 \pm 4,2	240,9 \pm 51,7
I	83,8 \pm 5,8*	47,2 \pm 12,7*	219,6 \pm 14,4*	122,6 \pm 4,5*	97,3 \pm 13,1*	337,8 \pm 50,3*	84,0 \pm 0,9*	38,4 \pm 4,8*	216,7 \pm 82,6

Razlog nižeg sadržaja cijanogenih glikozida u uslovima infekcije može biti oslobađanje toksičnog cijanovodonika tj. razgradnja amigdalina, koja se dešava nakon oštećenja ćelije (Del Cueto i sar., 2017), u ovom slučaju, u napadu patogena. U ovom procesu bioaktivacije amigdalin se razlaže do mandelonitrila i glukoze (Kuroki i Poulton, 1987; Li i sar., 1992; Zheng i Poulton, 1995; Zhou i sar., 2002; Sanchez-Perez i sar., 2008), koji nije detektovan primenjenim metodom ekstrakcije.

6. 2. 4. Antioksidantni kapacitet plodova trešnje

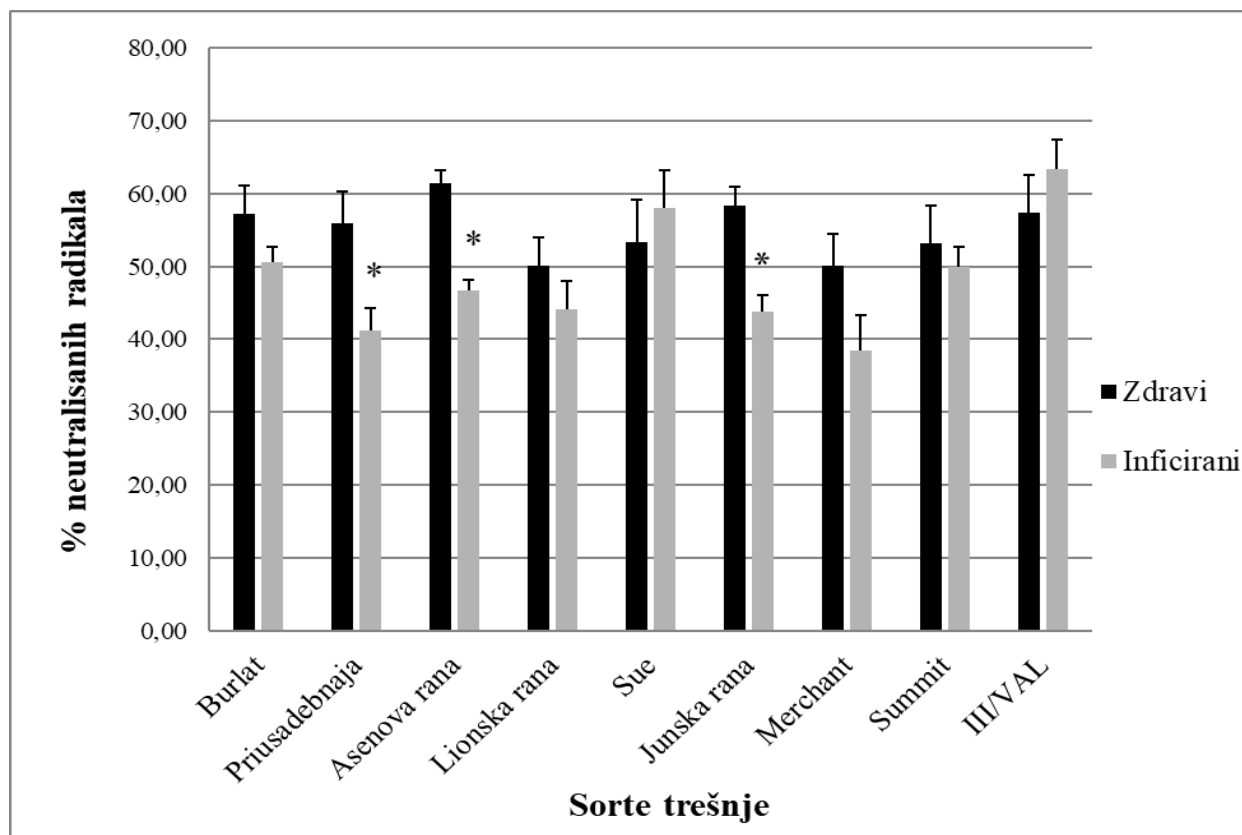
6. 2. 4. 1. Ispitivanje neutralizacije DPPH - radikala

DPPH test karakteriše način na koji može da se proceni antioksidantna sposobnost ispitivanog uzorka. Istraživanje se zasniva na praćenju obezbojavanja, odnosno smanjenju apsorbanse DPPH rastvora, što karakteriše antioksidantnu sposobnost uzorka, tj. njegovu sposobnosti da radikalu DPPH preda atom vodonika i na taj način ga deaktivira.

S obzirom na to da trešnju karakteriše bogastvo polifenola, tj. neenzimskih antioksidanata, DPPH metodu odlikuje lak i brz način da se utvrdi antioksidantna aktivnost zdravih i zaraženih plodova trešnje.

Dve od devet ispitivanih sorti imale su antioksidantnu aktivnost veću u uslovima infekcije u odnosu na zdrave plodove (Graf. 17). Najveća DPPH antioksidativna aktivnost zabeležena je u inficiranom plodu trešnje III/VAL (63,53% neutralizovanih radikala). Ostale ispitivane sorte pokazale su veću antioksidantnu aktivnost u zdravim plodovima. Najniža antioksidantna aktivnost je pokazana u zaraženim plodovima sorte Merchant (38,55% neutralizovanih radikala). Procenat DPPH neutralizovanih radikala u ekstraktima plodova trešnje zabeležen je u nezrelim plodovima (44,32%), delimično zrelih (53,83%) i u potpuno zrelih plodovima (72,99%) (Mahmood i sar., 2013).

Fazio i sar. (2013) su ispitivali antioksidantnu aktivnost u bobicama zove i plodovima kupine. Plodovi kupine su imali veću antioksidantnu aktivnost, jer su prirodno bogatije fenolima.



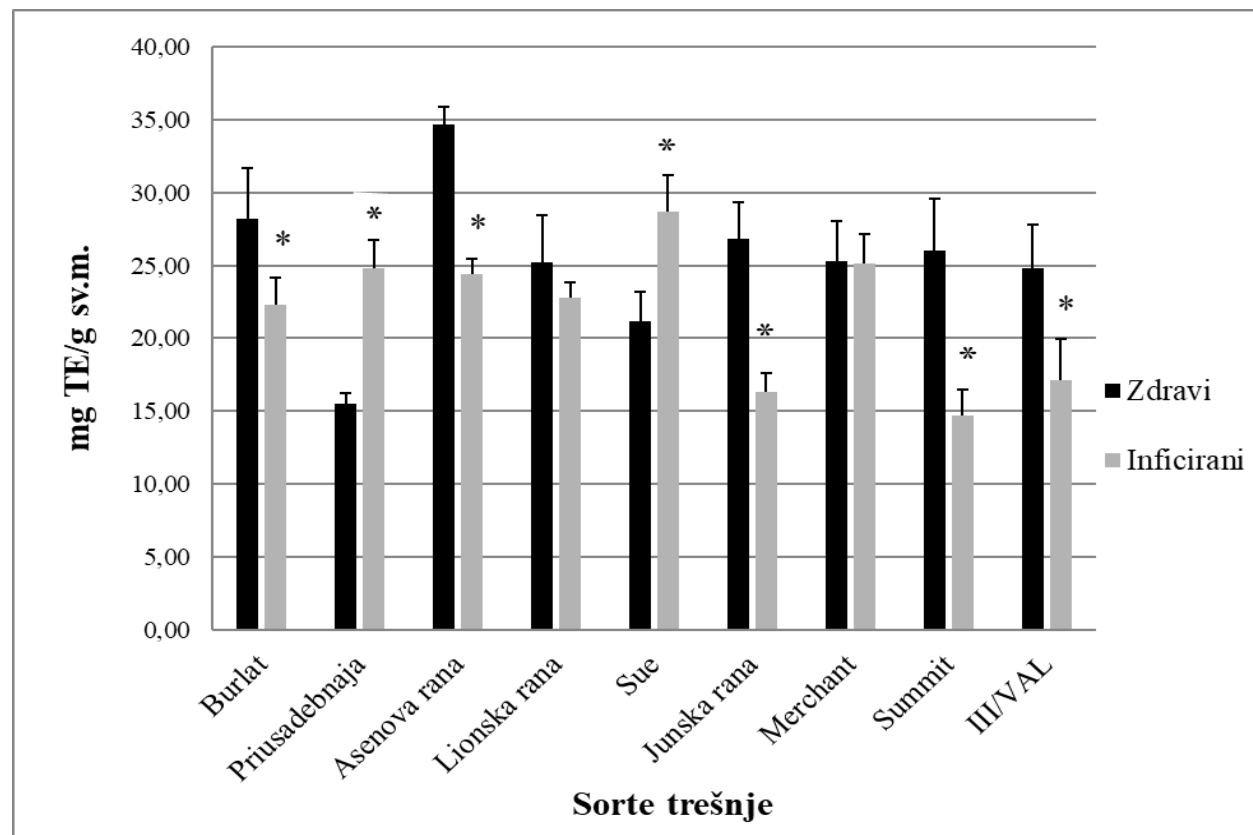
Graf. 17. DPPH aktivnost u zdravim i inficiranim plodovima trešnje. Rezultati izraženi kao % neutralisanih radikala su predstavljeni kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija. Podaci označeni * značajno se razlikuju za $P < 0.05$

6. 2. 4. 2. Ispitivanje redukcione sposobnosti ekstrakata FRAP metodom

Sposobnost ekstrakta da smanji *in vitro* kompleksno vezane Fe^{3+} na Fe^{2+} predstavlja redukcioni kapacitet ekstrakta. Istraživači su predstavili aproksimaciju u kojoj je kapacitet redukcije jednak antioksidantnom kapacitetu ekstrakta (Benzie i Strain, 1996). Vrednosti FRAP testa ukazuju na veći kapacitet redukcije u acetonskim ekstraktima zdravih plodova trešnje u odnosu na zaražene (Graf. 18). Vrednosti FRAP su se kretale od 15,48 do 33,69 mg TE/g sv.m. u zdravim i 14,72 do 28,68 mg TE/g sv.m. u zaraženim plodovima. Sorte Sue i Priusadebnaja su pokazale veći kapacitet redukcije u uslovima infekcije. Studije su takođe pokazale da listovi topole izloženi stresu izazivaju veći kapacitet redukcije Fe katjona (Kebert i sar., 2011).

Kumar i sar. (2013) su istraživali uticaj fitopatogene bakterije na FRAP aktivnost kod 3 genotipa pirinča u 3 perioda infekcije. U prvim fazama FRAP aktivnost je bila viša u svim

genotipovima u odnosu na kontrolu, dok su u kasnijim fazama razvoja bolesti vrednosti FRAP bile niže u odnosu na početnu fazu.

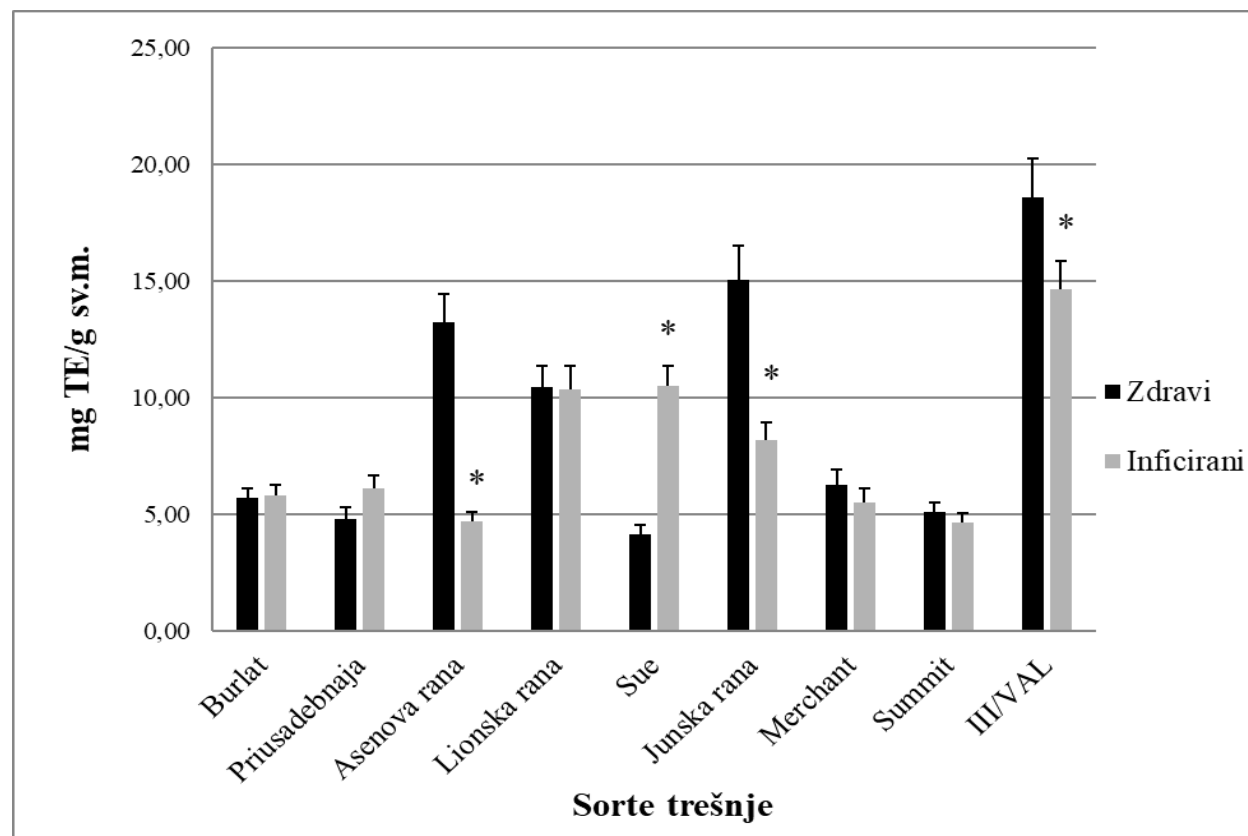


Graf. 18. FRAP aktivnost u zdravim i inficiranim plodovima trešnje. Rezultati izraženi kao mg ekvivalenata Troloxa/g sveže materije (mg TE/g sv.m.) su predstavljeni kao aritmetička sredina ± standardna devijacija. Podaci označeni * značajno se razlikuju za $P < 0.05$

6. 2. 4. 3. Ispitivanje redukcione sposobnosti ekstrakata TRC metodom

Ukupna redukciona sposobnost ekstrakata ili TRC metoda (total reducing power) se zasniva na principu povećanja apsorbance reakcionih smeša (Oiaizu, 1986), s tim da navedeno povećanje ukazuje na povećanu antioksidantnu aktivnost. Kao što je prikazano na Graf. 19., vrednosti TRC su varirale od 4,14-18,58 mg TE/g sv.m. u zdravim plodovima i 4,67-14,63 mg TE/g sv.m. u inficiranim plodovima. Najveća TRC aktivnost je zabeležena u acetonskom ekstraktu zdravog ploda sorte III/VAL (18,58 mg TE/g sv.m.), dok je najniži zabeležen u ekstraktu zdravog ploda sorte Sue (4,14 mg TE/g sv.m.). Većina ekstrakata zdravih plodova trešnje sa crvenom pokožicom pokazala je veći TRC u odnosu na one za žutom pokožicom. Sorte Sue i Priusadebnaja su pokazale veću

aktivnost TRC u uslovima infekcije. Liu i sar. (2014) su ispitivali antioksidantnu TRC vrednosti u 110 plodova voća i povrća. Vrednosti su se kretale od 0,08 do 21,72 mg/g sv.m. Parikh i sar., (2016) došli su do rezultata da je ekstrakt ploda *Manilkara hekandra* (tropsko zimzeleno drvo) rezultirao vrednošću TRC od 30,25 mg TE/g sv.m.



Graf. 19. TRC aktivnost u zdravim i inficiranim plodovima trešnje. Rezultati izraženi kao mg ekvivalenata troloxa/g sveže materije (mg TE/g sv.m.) su predstavljeni kao aritmetička sredina ± standardna devijacija. Podaci označeni * značajno se razlikuju za $P < 0.05$

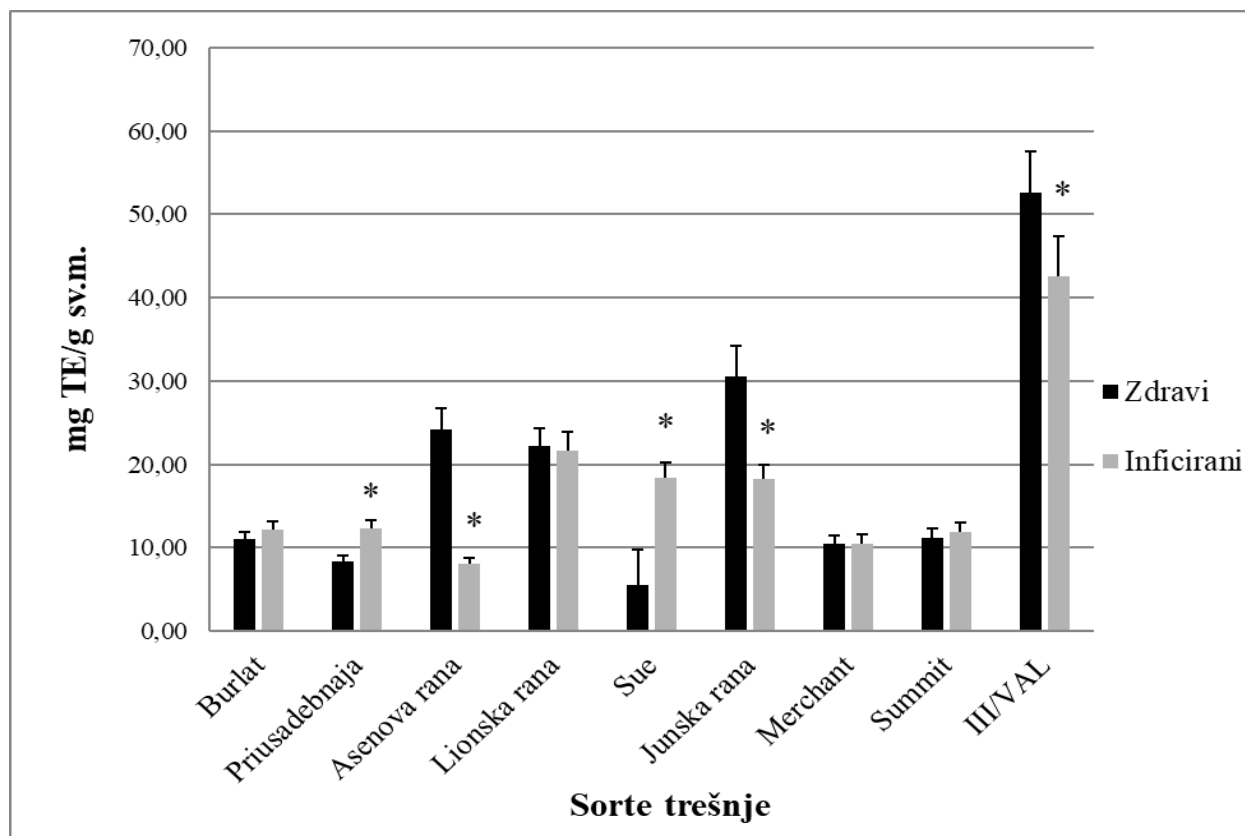
6. 2. 4. 4. Ispitivanje sposobnosti neutralizacije ABTS^{•+} radikala

U slučajevima kada su prisutni antocijanini u biljci, DPPH metoda nije dovoljno precizna, što nije slučaj sa ABTS testom, posebno kada se apsorpcija meri na 734 nm (Arnao, 2000).

ABTS katjon radikal (ABTS^{•+}) se često koristi pored DPPH radikala za određivanje sposobnosti jedinjenja da predaju vodonikov atom slobodnim radikalima (Re i sar., 1999).

Od svih ekstrakta ispitivanih sorti trešnje (Graf. 20) najveća antioksidantna aktivnost je utvrđena kod sorte III/VAL (52,53 mg TE/g sv.m.) dok je sorta Sue imala najnižu antioksidantnu

aktivnost (5,56 mg TE/g sv.m.). U uslovima infekcije, III/VAL je imala nižu ABTS aktivnost, dok je slučaj kod sorte Sue bio suprotan (više vrednosti u uslovima infekcije). Rezultati istraživanja su pokazali sledeću antioksidantnu aktivnost ekstrakata plodova dve sorte divlje trešnje merene ABTS testom, sorta B: 4,99 mg/g i sorta R: 48,64 mg/g (Petković i sar., 2014).



Graf. 20. ABTS aktivnost u zdravim i inficiranim plodovima trešnje. Rezultati izraženi kao mg ekvivalenata Troloxa/g sveže materije (mg TE/g sv.m.) su predstavljani kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija. Podaci označeni * značajno se razlikuju za $P < 0.05$

6. 2. 4. 5. Analiza varijanse antioksidantnih testova

Prema nivou značajnosti $P < 0,05$, može se zaključiti da je bilo statistički značajnih razlika između sorti u odnosu na vrednosti antioksidantnih testova (Tabela 17).

U zavisnosti od hemijske prirode, biljke različito reaguju na abiotički ili biotički stres, jer imaju različit sastav antioksidanata u zavisnosti od faktora spoljne sredine. Prema tome dejstvo činioca iz okruženja na biljku, a samim tim i na ispitivani antioksidant daje različit rezultat za svaki od navedenih antioksidantnih testova. Da bi se mogla sa sigurnošću proceniti antioksidantna

aktivnost ispitivanog ekstrakta, potrebno je izvršiti više antioksidantnih testova jer dobijeni rezultati mogu često da budu u slaboj korelaciji (Bernaert i sar, 2012). Četiri korišćena testa u ovom radu se često koriste za procenu antioksidantne aktivnosti biljnih ekstrakata. Viši sadržaj fenola, flavonoida i antocijanina je u direktnoj vezi sa povećanom antioksidantom aktivnošću (Genskowsky i sar, 2016). Vrednosti antioksidantnih testova su bile niže kod većine sorti, što je i očekivano s obzirom da su i vrednosti polifenola (neenzimskih antioksidanata) bile niže u inficiranim plodovima.

Tabela 17. Analiza varijanse antioksidantnih testova: DPPH test, FRAP test, TRC test, ABTS test

Parametar		Suma kvadrata	Stepeni slobode	Sredina stepena slobode	F	Sig. (nivo značajnosti)
DPPH test (% neutr radikala) – sv.m.	Između grupa	1113,35	8	139,17	3,21***	0,01
	Unutar grupa	1948,23	45	43,29		
	Total	3061,58	53			
FRAP test (mg Troloxa/g sv.m.)	Između grupa	467,03	8	58,38	2,41***	0,03
	Unutar grupa	1091,57	45	24,26		
	Total	1558,60	53			
TRC test (ukupni redukcion kapacitet) (mg Troloxa/g sv.m.)	Između grupa	705,24	8	88,16	14,80***	0,00
	Unutar grupa	267,97	45	5,96		
	Total	973,21	53			
ABTS test (mg Troloxa/g sv.m.)	Između grupa	7003,49	8	875,44	37,38***	0,00
	Unutar grupa	1054,00	45	23,42		
	Total	8057,50	53			

6. 2. 4. 6. Korelacije između antioksidanata i antioksidantnih testova

Analizom dobijenih rezultata ustanovljena je pozitivna korelacija između sadržaja polifenolnih komponenti i antioksidantnih testova (Tabela 18). Posmatrano u celini, najjača korelacija je ustanovljena između antocijanina i antioksidantnih testova, i to ABTS ($r=0,82$; $P<0,05$) i TRC testa ($r=0,79$; $P<0,05$). Slaba korelacija je ustanovljena između ukupnih tanina i antioksidantnih testova (ABTS i TRC). Kod enzimskih antioksidanata je zabeležena slična situacija. Aktivnost SOD je bila u pozitivnoj korelaciji sa svim ispitivanim antioksidantnim testovima. Aktivnosti peroksidaza (gvajakol i pirogalol) su bile u slabijoj korelaciji sa antioksidantnim testovima. Najjača korelacija zabeležena je između pirogalol peroksidaze i DPPH radikalnog testa ($r=0,76$; $P<0,05$). Prema Milenković-Anđelković (2015), visoka DPPH aktivnost u plodovima sugeriše da su fenolna jedinjenja barem delimično odgovorna za uklanjanje DPPH radikala.

Tabela 18. Korelacije između antioksidanata (neenzimskih, enzimskih) i antioksidantnih testova. Podaci označeni * pokazuju da su parametri u pozitivnoj korelaciji za $P < 0.05$

	Polifenoli i enzimi (antioksidanti)	Antioksidantni testovi			
		DPPH	FRAP	ABTS	URK
Neenzimski antioksidanti	Fenoli	0,70*	0,68*	0,49*	0,57*
	Tanini	0,62*	0,58*	0,31	0,42
	Antocijanini	0,60*	0,58*	0,82*	0,79*
	Flavonoidi	0,67*	0,52*	0,49*	0,48*
	Proantocijanidini	0,79*	0,70*	0,57*	0,61*
Enzimski antioksidanti	SOD	0,78*	0,66*	0,57*	0,60*
	gvajakol	0,42	0,37	0,03	0,10
	pirogalol	0,76*	0,74*	0,34	0,47

7. ZAKLJUČAK

Na osnovu rezultata dobijenih fitohemijskom analizom i ispitivanjem antioksidantnog kapaciteta plodova trešnje u uslovima infekcije gljivom *Monilinia laxa* Aderh. i Ruhl., mogu se izvesti sledeći zaključci:

Prema testu procene bolesti, sorte se mogu podeliti u dve grupe otpornosti na ispitivanog patogena:

U prirodnoj infekciji:

- a) do 50% obolelog tkiva: sorte Sue, Merchant, Junska rana, III/VAL, Burlat, Lionska rana.
- b) više od 50% obolelog tkiva: sorte Summit, Priusadebnaja, Asenova rana

U uslovima veštačke inokulacije:

- a) do 50% obolelog tkiva: sorte Merchant, Lionska rana, Junska rana i Sue
- b) više od 50% obolelog tkiva: sorte Summit, Asenova rana, Priusadebnaja, III/VAL i Burlat.

Prisustvo gljive *M. laxa* je statistički značajno uticalo na primarne metabolite, enzimsku aktivnost, sekundarne metabolite i antioksidantni kapacitet plodova trešnje.

Enzimaska aktivnost je u uslovima infekcije bila povećana kod većine sorti.

Enzimski i neenzimski antioksidanti su u većini slučajeva bili u pozitivnoj korelaciji sa antioksidantnim testovima.

Kod većine sorti značajno je smanjen sadržaj organskih kiseline nakon infekcije, s tim da su sorte Sue i III/VAL reagovale na infekciju akumulacijom organskih kiselina, posebno fumarne kiseline. Za razliku od svih ispitivanih sorti jedino je vinska kiselina detektovana u plodu sorte Burlat.

Kod većine sorti je došlo do smanjenja sadržaja polifenolnih komponenti u uslovima infekcije osim kod sorti III/VAL i Lionska rana kod kojih je u uslovima infekcije zabeležen porast u sadržaju ukupnih fenola i ukupnih tanina.

Sadržaj ukupnih flavonoida je bio različit u zavisnosti od sorti, ali većina ranijih sorti zrenja je pokazala veći sadržaj u uslovima infekcije. Kod sorta Sue zabeležen je za 52% veći sadržaj u uslovima infekcije, zatim kod sorte Priusadebnaja (za 23% veći sadržaj), kod Junske rane (za 42% veći sadržaj), III/VAL (2,2 puta veći sadržaj).

Od svih fenolnih kiselina, čiji se sadržaj smanjio kod zaraženih plodova, uočava se da su sorte Merchant, Lionska rana i Sue akumulirale samo 3-feruloihinsku kiselinu.

Kod sorte Sue zabeležena je značajna sinteza procijanidin dimera, naringenin-heksozida, većine flavonola i antocijanina.

Slično tome, sorte Lionska rana i Junska rana su značajno povećavale sadržaj većine antocijanina u uslovima infekcije, ali ni u zdravim ni u inficiranim plodovima sorte Lionska rana nije detektovan cijanidin glukozid.

Sorta III/VAL je akumulirala većinu utvrđenih fenolnih jedinjenja, izuzev 3-feruloihinske kiseline i antocijanina.

Imajući u vidu dobijene rezultate, 3-feruloihinska kiselina, flavonoli i antocijanini mogu se smatrati ključnim jedinjenjima od značaja za suzbijanje bolesti.

Ako se literaturni i dobijeni podaci o podložnosti na mehaničke povrede i otpornosti na patogena uporede sa fitopatološkim i biohemijaskim rezultatima, uočava se da morfologija pokožice (kutikule) nije ključni faktor otpornosti plodova prema patogenu *M. laxa*.

Ispitivanje u oplemenjivanju, tj. selekciju sorti kao potencijalnog roditelja i donora gena otpornosti na *Monilinia laxa* treba usmeriti i prema "metabolizmu" fenolih jedinjenja.

8. LITERATURA

1. Abuja, P. M., Albertini, R. (2001): Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clin. Chim. Acta*, 306: 1–17.
2. Agrios, G. N. (2005): *Plant Pathology*. Elsevier Academic Press, London.
3. Ahn, Y. J., Lee, H. S., Oh, H. S., Kim, H. T., Lee Y. H. (2005): Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. *J. Agric. Food Chem.*, 46: 2123–2129.
4. Allen, R. D., Well, R. P., Schake, S.A. (1997): Use of transgenic plants to study antioxidant defenses. *Free Radic. Biol. Med.*, 23: 473–479.
5. Angin, D. (2014): Production and characterization of activated carbon from sour cherry stones by zinc chloride. *Fuel*, 115: 804-811.
6. Arnao, M.B. (2000): Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practice case. *Trends Food Sci. Tehnol.*, 11: 419–421.
7. Arsenijević, M. (1997): *Bakterioze biljaka*. S – Print, Novi Sad.
8. Asiegbu, F.O. (2000): Effects of carbohydrate, ethanol and selected cell wall phenolics on in vitro growth and necrotrophic fungi –*Heterobasidion annosum* and *Fusarium avenaceum*. *J. Basic Microbiol.*, 3: 139-148.
9. Bais, H. P., Walker, T. S., Kennan, A. J., Stermitz, F. R., Vivanco, J. M. (2003): Structure-dependent phytotoxicity of catechins and other flavonoids: Flavonoid conversions by cell-free protein extracts of *Centaurea maculosa* (spotted knapweed) roots. *J. Agric. Food Chem.*, 51: 897-901.
10. Baker, J. E. (1976): Superoxide dismutase in ripening fruits. *Plant Physiol.*, 58: 644- 647.
11. Balaž, J. (2000): *Monilia spp.* kao parazit voćaka. *Biljni lekar*, 2-3: 155-162.
12. Balaž, J., Ognjanov, V., Iličić, R., Grahovac, M. (2012): Važnije mikoze i bakterioze trešnje. *Biljni lekar*, 4:316-334.
13. Ballistreri, G., Continella, A., Gentile, A., Amenta, M., Fabroni, S., Rapisarda, P. (2013): Fruit quality and bioactive compounds relevant to human health of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars grown in Italy. *Food Chem.*, 140: 630-638.
14. Barbehenn, V., Peter Constabel, P. (2011): Tannins in plant-herbivore interactions. *Phytochemistry*, 13: 1551-1565.
15. Barna, B., Fodor, J., Pogany, M., Kiraly, Z. (2003): Role of reactive oxygen species and antioxidants in plant disease resistance. *Pest Manag. Sci.*, 59 (4): 459-464.
16. Batra, L. R. (1991): *World Species of Monilinia (Fungi): Their Ecology, Biosystematics and Control*, Berlin Germany.
17. Batra, L. R., Harada, Y. (1986): A field record of apothecia of *Monilinia fructigena* in Japan and its significance. *Mycologia*, 78: 913-917.
18. Baydar, N. G., Ozkan, G., Sagdic, O. (2004): Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) extracts. *Food Control*, 15: 335-339.
19. Beckman, C. H, Mueller, V. C., Mace, M. E. (1974): The stabilization of artificial and natural cell wall membranes by phenolic infusion and its relation to wilt disease resistance. *Phytopathology*, 64: 1214-1220.

20. Beckman, C. H. (2000): Phenolic-storing cells: Keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 57: 101–110.
21. Beker, U., Dertli, H., Duranoglu-Gulbayur, D., Cakan, R. D. (2010): Study of cherry stones as a precursor in the preparation of low cost carbonaceous adsorbent. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, 32: 1004-1015.
22. Belitz, H.D., Grosch, W., Schieberle, P. (2009): *Food Chemistry.*, Springer-Verlag Ed. 436, Berlin Heidelberg.
23. Belmans, K., Keulemans, J., Bronchart, R. (1989): Sensibilitévariétale á l'éclatement chez les cerises-douces. *Revue de l'Agriculture*, 42: 155–162
24. Benzie, I. F. F., i Strain, J. J. (1996): The Ferric Reducing Ability of Plasma (Frap) as a Measure of "Antioxidant Power": The Frap Assay. *Anal. Biochem.*, 239: 70-76.
25. Berger, S., Sinha, A.K., Roitsch, T. (2007): Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant-pathogen interactions. *J. Exp. Bot.*, 58: 4019–4026.
26. Bernaert, N., De Paepe, D., Bouten, C., De Clercq, H., Stewart, D., Van Bockstaele, E., De Loose, M., Van Droogenbroeck, B. (2012): Antioxidant capacity, total phenolic and ascorbate content as a function of the genetic diversity of leek (*Allium ampeloprasum var. porrum*). *Food Chem.*, 134(2): 669–677.
27. Blagojević, R., Božić, V. (2012): Tehnologija proizvodnje trešnje. Kancelarija za program podrške u privatnom sektoru za podršku sektoru voćarstva i bobičastog voća u Južnoj Srbiji, Niš.
28. Blando, F., Gerardi, C., Nicoletti, I. (2004): Sour cherry (*Prunus cerasus* L.) anthocyanins as ingredients for functional foods. *J. Biomed. Biotechnol.*, 5: 253-258.
29. Blount, J. W., Dixon, R. A., Paiva, N. L. (1992): Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.) XVI. Antifungal activity of medicarpin and its biosynthetic precursors; implications for the genetic manipulation of stress metabolites. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 41: 333–349.
30. Borguni, R. G., Da Silva tores E. A. F. (2009): Tomatoes and tomato products as dietary sources of antioxidants. *Food Rev. Int.*, 25(4): 313-325
31. Bostock, R. M., Wilcox, S. M., Wang, G., Adaskaveg, J. E. (1999): Suppression of *Monilinia fructicola* cutinase production by peach fruit surface phenolic acids. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 54:37-50.
32. Bradford, M. M. (1976): A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Dye Binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248–254
33. Brand, W. (2010): Increasing hesperetin bioavailability by modulating intestinal metabolism and transport. Doctoral Thesis Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.
34. Britton, G. (1983): *The biochemistry of natural pigments.* Cambridge University Press, Cambridge, UK.
35. Brown, S. K., Wilcox W. F. (1989): Evaluation of cherry genotypes for resistance to fruit infection by *Monilinia fructicola* (Wint.) Honey. *HortScience*, 24: 1013–1025.

36. Byrde, R. J. W., Willets, H. J. (1977): The brown rot fungi of fruits: Their biology and control. Perg. Press, Oxford.
37. Cemeroglu, B., Acar, J. (1986): Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi. Gıda Teknolojisi Derneği. 6: 29-30.
38. Chaichi S., M., Maheri, N., Sadaghian, M., Eshratkhah, B., Hassanpour S. (2011). Effects of administration of industrial tannins on nutrient excretion parameters during naturally acquired mixed nematode infections in Moghani sheep. J. Am. Sci., 7 (6): 245-248.
39. Chelikani, P., Fita, I., Loewen, P. C. (2004): Diversity of structures and properties among catalases. Cell. Mol. Life Sci., 61 (2): 192—208.
40. Chen, H., Zuo, Y., (2007): Identification of flavonol glycosides in American cranberry fruit, Food Chem., 4: 1357-1364.
41. Cheng, G., Breen, P. (1991): Activity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and concentrations of anthocyanins and phenolics in developing strawberry fruit. J. Am. Soc. Hortic. Sc., 116: 865-869
42. Chirinos R., Rogez H., Campos D., Pedreschi R., Larondelle Y. (2007): Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Trapaeolum tuberosum* Ruiz and Pavon) tubers, Sep. Purif. Tech., 55: 217-225.
43. Chung, K. T., Wong, T. Y., Wei, C. I., Huang, Y. W., Lin, Y. (1998): Tannins and human health: a review. Department of Microbiology and Molecular Cell Sciences. University of Memphis, TN 38152, USA.
44. Colarič, M., Veberič, R., Solar, A., Hudina, M. Stampar, F. (2005): Phenolic acids, syringaldehyde, and juglone in fruits of different cultivars of *Juglans regia* L. J. Agric. Food Chem. 53: 6390-6396.
45. Cowling, B. E., Horsfall, G. J. (1980): Prologue: How plants Defend Themselves. In : Horsfall, G. J., Cowling, B. E. Plant Disease and Advanced Treatise, V 1-16, Academic Press. Inc.
46. 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. Physiol. Mol. Plant Pathol., 49: 285–306.
47. Davies, K. J. A. (2000): Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. IUBMB Life, 50:279–289.
48. De Cal, A., Melgarejo, P. (1999): Effects of long-wave UV light on *Monilinia* growth and identification of species. Plant Disease, 83: 63-65.
49. Del Caro, A., Piga, A. (2008): Polyphenol composition of peel and pulp of two Italian fresh fig fruits cultivars (*Ficus carica* L.). Eur. Food Res. Technol., 226: 715-719.
50. Del Cueto, J., Ionescu, I. A., Pičmanová, M., Gericke, O., Motawia, M. S., Olsen, C. E., Campoy, J. A., Dicenta, F., Møller, B. L., Sánchez-Pérez, R. (2017): Cyanogenic glucosides and derivatives in almond and sweet cherry flower buds from dormancy to flowering. Front. Plant Sci., 8: 800.
51. Delledonne, M. (2005): NO news is good news for plants. Curr. Opin. Plant Biol., 8: 390-396.

52. Demirsoy, L., Demirsoy, H. (2004): The epidermal characteristics of fruit skin of some sweet cherry cultivars in relation to fruit cracking. *Pak. J. Bot.*, 36: 725–731.
53. Dhingra, O. D., Sinclair, J. B. (1995): *Basic Plant Pathology Methods*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, USA.
54. Dinant, S., Bonnemain, J. L., Girousse, C., Kehr, J. (2010). Phloem sap intricacy and interplay with aphid feeding. *C. R. Biol.*, 333: 504–515.
55. Dixon, R. A., Paiva, N. L. (1995): Stress-induced phenylpropanoid metabolism, *The Plant Cell*, 7: 1085-1097.
56. Dixon, R., Xie, Y., Sharma, S. (2005): Proanthocyanidins – a final frontier in flavonoid research? *New Phytol.*, 165 (1): 9–28.
57. Dolenc, K., Štampar, F. (1997): An investigation of the application and conditions of analyses of HPLC methods for determining sugars and organic acids in fruits. *Research Reports Biotechnical Faculty University of Ljubljana*. 69: 99-106.
58. Dorman, H. J. D., Peltoketo, A., Hiltunen, R., Tikkanen, M. J. (2003): Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. *Food Chem.*, 83:255–262.
59. Elstner, F. E., Schemp, H., Preibisch, G., Hippeli, S., Osswald, W. (1994): Biological sources of free radicals. In: *Free radicals in the environment, medicine and toxicology* (Eds. H. Nohl, H. Esterbauer, C. Rice-Evans), Richelieu Press, London, UK, 13-45.
60. Eltayeb, E. A., Roddick, J. G. (1984): Changes in the alkaloid content of developing fruits of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). I. Analysis of cultivars and mutants with differing ripening characteristics. *J. Exp. Bot.*, 35:252-260.
61. Fang, F., Li, J. M, Pan, Q. H., Huang, W. D. (2007): Determination of red wine flavonoids by HPLC and effect of aging. *Food Chem.*, 1: 428-433.
62. Fazio, A., Plastina, P., Meijerink, J., Witkamp, R. F., Gabriele, B. (2013): Comparative analyses of seeds of wild fruits of *Rubus* and *Sambucus* species from Southern Italy: Fatty acid composition of the oil, total phenolic content, antioxidant and anti-inflammatory properties of the methanolic extracts. *Food Chem.*, 140(4): 817–824.
63. Fazzari, M., Fukumoto, L., Mazza, G., Livrea, M.A., Tesoriere, L., Di Marco, L. (2008): In vitro bioavailability of phenolic compounds from five cultivars of frozen sweet cherries (*Prunus avium* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 56: 3561-3568.
64. Fialová, R., Navrátil, M., Válková, P., Lauterer, P., Kocourek, F., Poncarová-Voráčková, Z., (2004): Epidemiology of European stone fruit yellows phytoplasma in the Czech Republic. *Acta Hort.* 657: 483-487.
65. Filis, B., Sauvage, F. X., Nicolas, J. (1985): Tomato peroxidases, purification and some properties. *Sci. Aliments*, 5: 217-232.
66. Fogle, H. W. (1961): Inheritance of some fruit and tree characteristics in sweet cherry crosses. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 78: 76–85.
67. Gao, L., Mazza, G. (1995): Characterization, quantitation and distribution of anthocyanins and colorless phenolics in sweet cherries. *J. Agric. Food Chem.*, 43: 343-346.

68. Gavrilović, V., Milijašević, S. (2004). Etiological study of cherry and plum bud necrosis. (Book of Abstracts V Kongres on Plant Protection, Zlatibor, Serbia, 144.
69. Genskowsky, E., Puente, L. A., Pérez-Álvarez, J. A., Fernández-López, J., Muñoz, L. A., Viuda-Martos, M. (2016): Determination of polyphenolic profile, antioxidant activity and antibacterial properties of maqui [*Aristotelia chilensis* (Molina) Stuntz] a Chilean blackberry. *J. Sci. Food Agric.*, 96: 4235–4242.
70. Gibert, C., Chadoeuf, J., Nicot, P., Vercambre, G., Genard, M., Lescourret, F. (2009): Modelling the effect of cuticular crack surface area and inoculum density on the probability of nectarine fruit infection by *Monilinia laxa*. *Plant Pathology*, 58: 1021-1031.
71. Gil, M. I., Holcroft, D. M., Kader, A. A. (1997): Changes in strawberry anthocyanins and other phenoles in response to carbon dioxide treatment. *J. Agric. Food Chem.*, 5: 1662-1667.
72. Girard, B., Kopp, T. G. (1998). Physicochemical characteristics of selected sweet cherry cultivars. *J. Agric. Food Chem.*, 46: 471-476.
73. Girotti, A.W. (1985): Mechanisms of lipid peroxidation. *J. Free Radic. Biol. Med.*, 1: 87–95.
74. Göbel, C., Feussner, I., Roshal, S. (2003): Lipid peroxidation during the hypersensitive response in Potato in the absence of 9-Lipoxygenases. *J. Biol. Chem.*, 278: 52834–52840.
75. Goetz, G., Fkyerat, A., Metais, N., Kunz, M., Tabacchi, R., Pezet, R., Pont, V. (1999): Resistance factors to grey mould in grape berries: identification of some phenolic inhibitors of *Botrytis cinerea* stilbene oxidase. *Phytochemistry*, 52: 759–767.
76. Goncalves, B., Landbo, A. K., Knudsen, D. (2004): Effect of ripeness and postharvest storage on the phenolic profiles of cherries (*Prunus avium* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 52: 523-530.
77. Goncalves, B., Landbo, A. K., Knudsen, D., Silva, A. P., Moutinho-Pereira, J., Rosa, E., Meyer, A. S. (2004): Effect of Ripeness and Postharvest Storage on the Phenolic Profiles of Cherries (*Prunus avium* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 52: 523-530.
78. Goncalves, B., Silva, A. P., Moutinho-Pereira, J., Bacelar, E., Rosa, E. Meyer, A.S. (2007): Effect of ripeness and postharvest storage on the evolution of colour and anthocyanins in cherries (*Prunus avium* L.). *Food Chem.*, 103: 976-984.
79. Gradziel, T. M., Bostock, R. M., Adaskaveg, J. E. (2003): Resistance to brown rot disease in peach is determined by multiple structural and biochemical components. *Acta Hort.*, 622: 347-352.
80. Gu, L., Kelm, M. A., Hammerstone, J. F., Beecher, G., Holden, J., Haytowitz, D., Gebhardt, S., Prior, R. L. (2004): Concentrations of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption. *J. Nutr.*, 134(3): 613-617.
81. Gutteridge, J. M. (1995): Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin. Chem.*, 41:1819-1828.
82. Hagerman, A. E. (1995): Acid butanol assay for proanthocyanidins. In: *Tannin Analysis* (Hagerman AE). Department of Chemistry, Miami University, Miami, USA.
83. Hagerman, A., Harvey-Mueller, I., Makkar, H.P.S. (2000): *Quantification of Tannins in Tree Foliage – a Laboratory Manual*. FAO/IAEA, Vienna, Austria.
84. Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (1995): The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radic. Biol. Med.*, 18:125–126.

85. Halliwell, B., Gutteridge J. M. C. (2007): Free radicals in biology and medicine. 4. Oxford, Clarendon.
86. Halliwell, B., Chirico, S. (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am. J. Clin. Nutr.*, 57:715-724.
87. Haslam, E. (1986): Hydroxybenzoic acid and the enigma of gallic acid. In: Conn, E.E. (ed.). *The Shikimic Acid Pathway. Rec. Adv. Phytochemistry*, 20: 163-200.
88. Haslam, E. (1989): *Plant Polyphenols - Vegetable Tannins Revisited*. Camb. University Press, Cambridge, UK.
89. Hassanpour, S., Sadaghian, M., MaheriSis, N., Esharatkah Chaichi Semsari, M. (2011): Effect of condensed tannin on controlling faecal protein excretion in nematode-infected sheep: In vivo study. *J. Am. Sci.*, 7:896-900.
90. Hayyan, M., Hashim, M. A., Al Nashef, I. M. (2016): Superoxide Ion: Generation and Chemical Implications. *Chem. Rev.*, 116 (5): 3029–3085. .
91. Hebert, C., Charles, M. T., Gauthier, L., Willemot, C., Khanizadeh, S., Cousineau, J. (2002): Strawberry proanthocyanidins: Biochemical markers for *Botrytis cinerea* resistance and shelf-life predictability. *Acta Hort.*, 567: 659–662.
92. Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., Bobilya, D. J. (2002): Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.*, 13: 527-584.
93. Hodges, D. M., Delong, J. M., Forney, C. F., Prange, R. K. (1999): Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, 207: 604-611.
94. Holb, I. J. (2003): The brown rot fungi of fruit crops (*Monilia spp.*): Important features of their biology. *Int. J. Hortic. Sci.*, 9: 3-4, 23-36.
95. Holb, I. J. (2006): Possibilities of brown rot management in organic stone fruit production in Hungary. *Int. J. Hortic. Sci.*, 12: 87-91.
96. Holb, I. J. (2008): Brown rot blossom blight of pome and stone fruits: symptom, disease cycle, host resistance, and biological control. *Int. J. Hortic. Sci.*, 14: 15-21.
97. Hong, C., Holtz, B. A., Morgan, D. P., Michailides. T. J. (1997): Significance of thinned fruit as a source of the secondary inoculum of *Monilinia fructicola* in California nectarine orchards. *Plant Dis.*, 81: 519-524.
98. Hrustić, J. (2013): Karakterizacija vrsta roda *Monilinia* patogena koštičavih voćaka u Srbiji i osetljivost na fungicide. Doktorska disertacija. Poljoprivredni fakultet, Beograd - Zemun.
99. Hrustić, J., Mihajlović, M., Grahovac, M., Delibašić, G., Bulajić, A., Krstić, B., Tanović, B. (2012): Genus *Monilinia* On Pome And Stone Fruit Species. *Pestic. Phytomed. (Belgrade)*, 27(4): 283–97.
100. Hudina, M., Štampar, F. (2009): Effect of a postbloom naphthaleneacetic acid thinning spray and hand thinning on quality and quantity of pear fruit (*Pyrus communis L.*) cv. Harrow Sweet. *Can. J. Plant Sci.*, 89(6): 1109-1116.
101. Iezzoni, A., Schmidt, H., Albertini, A. (1991): Cherries. In: J.N. Moore and J.R. Ballington (eds.), *Genetic Resources of Temperate Fruit and Nut Crops. Acta Hort.* 290: 111–173.

102. Iličić, R. (2016): Bakteriozno sušenje trešnje (*Prunus avium* L.). Doktorska disertacija. Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.
103. Ivanović, M., Ivanović, M. (2017): Bolesti voćaka i vinove loze. Poljoprivredni fakultet Beograd.
104. Jackson, R. S. (2000): Wine science, principles and applications. Accademic press, New York.
105. Jakobek, L., Šeruga, M., Novak, I., Medvidović-Kosanović, M., Lukačević, I., (2008): Antioksidacijska aktivnost polifenola iz borovnice i jagode. *Pomologia Croatica*, 14 (1): 13-26.
106. Jakobek, L., Šeruga, M., Voća, S., Šindrak, Z., Dobričević, N. (2009): "Flavonol and phenolic acid composition of sweet cherries (cv. Lapins) produced on six different vegetative rootstocks". *Sci. Hortic.*, 123: 23-28.
107. Jodee, L. J., Sanjeewa, G. R., Felicia, S., Mary, A. S., Elvira, G. M., (2011): Citrus Flavonoids Luteolin, Apigenin, and Quercetin Inhibit Glycogen Synthase Kinase- 3bEnzymatic Activity by Lowering the Interaction Energy Within the Binding Cavity. *J. Med. Food*, 14(4): 325–333.
108. Jones, A. L., Sutton, T. B. (1996): Diseases of tree fruits in the East. Michigan State University Extension East Lansing, MI, USA.
109. Joseph, M. O., Eloon, I. Z., George, W.B., David, F. R., Kiyoto, V., Jerry, K.U. (1995): Compendium of stone fruit diseases. American Phytopathological Society, St. Paul, MN, USA.
110. Jwa, N., Agrawal, G. K., Tamogami, S., Yonekura, M., Han, O., Iwahashi, H., Rakwal, R. (2006): Role of defense/stress-related marker genes, proteins and secondary metabolites in defining rice self-defense mechanisms. *Plant Physiol. Biochem.*, 44:261–273.
111. Kebert, M., Trudić B., Stojnić, S., Orlović, S., Štajner, D., Popović, B., Galić, Z. (2011): Estimation Of Antioxidant Capacities Of Poplar Clones Involved In Phytoremediation Processes. *Strepow International Workshop, Andrevlje Novi Sad, Serbia*. 273-280.
112. Kelley, D. S., Rasooly, R., Jacob, R. A., Kader, A. A, Mackey, B. E. (2006): Consumption of Bing sweet cherries lowers circulating concentrations of inflammation markering healthy men and women. *Journal Nutr.*, 136(4): 981–986.
113. Kirkpatrick, B. C., Uyemoto, J. K., Purcell, A. H. (2008): X – disease. (in: Compendium of stone fruit diseases. eds. Ogawa., J. M., Zehr, E. I., Bird, G. W., Ritchie, D. F., Uriu, K., Ujemoto, J.K.57-58). APS Press
114. Kim, D. O., Heo, H. J., Kim, Y. J., Yang, H. S., Lee, C. Y. (2005): Sweet and sour cherry phenolics and their protective effects on neuronal cells. *J. Agric. Food Chem.*, 53: 9921-9927.
115. Kim, D. O., Jeong, S. W., Lee, C. Y. (2003): Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chem.*, 81: 321-326.
116. Kiprovski, B. (2013): Biohemijske i agronomske karakteristike biljaka soje, kukuruza i šećerne repe inokulisanih korisnim i štetnim mikroorganizmima. Doktorska disertacija. Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.
117. Kiprovski, B., Borković, B., Malenčić, Đ., Veberič, R., Stampar, F., Mikulič Petrovsek, M. (2018): Postharvest changes in primary and secondary metabolites of sweet cherry cultivars induced by *Monilinia laxa*. *Postharvest Biol. Technol.*, 144: 46-54.

118. Kroyer, G. T. (2004): Red clover extract as antioxidant active and functional food ingredient. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 5(1): 101-105.
119. Kukrić, Z., Jašić, M., Samelak, I. (2013): Biohemija hrane – biološki aktivne komponente, Tehnološki fakultet Banja Luka.
120. Kumar, A., Gul, M. Z., Zeeshan, A., Bimolata, W., Qureshi, I. A. Ghazi, I. A. (2013): Differential antioxidative responses of three different rice genotypes during bacterial blight infection. *Austr. J. Crop Sci.*, 7(12): 1893-1900.
121. Kuroki, G. W., Poulton, J. E. (1987): Isolation and characterization of multiple forms of prunasin hydrolase from black cherry (*Prunus serotina* Ehrh.) seeds. *Arch. Biochem. Biophys.*, 255 19–26. 10.1016/0003-9861(87)90290-6
122. Lane, C. R. (2002): A synoptic key for differentiation of *Monilinia fructicola*, *M. fructigena* and *M. laxa*, based on examination of cultural characters. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 32: 489-493.
123. Larena, I., Torres, R., De Cal, A., Liñán, M., Melgarejo, P., Domenichini, P., Bellini, A., Mandrin, J. F., Ochoa De Eribe, X., Usall, J. (2005): Biological control of postharvest brown rot (*Monilinia* spp.) of peaches by field applications of *Epicoccum nigrum*. *Biol. Control*, 32: 305-310.
124. Lattanzio, V., Lattanzio, V. M. T., Cardinali, A. (2006): Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. In: *Phytochemistry Advances in Research* (Imperato F). Research Signpost, India, 23–67.
125. Lee, J. (2013): Proanthocyanidin A2 purification and quantification of American cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) products. *J. Funct. Foods*, 1: 144-153.
126. Lee, J., Finn, C. E. (2007): Anthocyanins and other polyphenolics in American elderberry (*Sambucus canadensis*) and European elderberry (*S. nigra*) cultivars. *J. Sci. Food Agric.*, 87(14): 2665–2675.
127. Leucuta, S., Vlase, L., Gocan, S., Radu, L., Fodorea, C. (2005): Determination of phenolic compounds from *Geranium sanguineum* by HPLC, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 28: 3109-3117.
128. Li, C. P., Swain, E., Poulton J. E. (1992): *Prunus serotina* amygdalin hydrolase and prunasin hydrolase purification, N-terminal sequencing, and antibody production. *Plant Physiology*, 100: 282–290. 10.1104/pp.100.1.282.
129. Liu, C., Zhao, Y., Li, X., Jia, J., Chen, Y., Hua, Z. (2014): Antioxidant capacities and main reducing substance contents in 110 fruits and vegetables eaten in China. *Food Nutr. Sci.*, 5: 293–307.
130. Liu, L., Shan, S., Zhang, K., Ning, Z. Q., Lu X. P., Cheng, Y. Y. (2008): Naringenin and hesperetin, two flavonoids derived from *Citrus aurantium* up-regulate transcription of adiponectin. *Phytother. Res.*, 22(10): 1400–1403.
131. Low, P. S., Merida, J. R. (1996): The oxidative burst in plant defense: Function and signal transduction. *Physiol. Plant.*, 96: 533–542.

132. Maccarone, E., Maccarrone, A., Rapisarda, P. (1985): Stabilization of anthocyanins of blood orange fruit juice, *J. Food Sci.*, 50: 901-904.
133. Macheix, J. J., Fleuriot, A., Billot, J. (1990): *Fruit phenolics*. CRC Press, Boca Raton, FL.
134. Magalhaes, L. M., Segundo, M. A., Reis, S., Lima, J. L. (2008): Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Anal. Chim. Acta*, 613: 1-19.
135. Maheri-Sis, N., Chaichi Semsari, M., Eshratkiah, B., Sadaghian, M., Gorbani, A., Hassanpour, S. (2011): Evaluation of the effects of Quebracho condensed tannin on faecal egg counts during naturally acquired mixed nematode infections in Moghani sheep. *Ann. Biol. Res.*, 2 (2): 170-174.
136. Mahmood, T., Anwar, F., Bhatti, I. A., Iqbal, T. (2013): Effect of maturity on proximate composition, phenolics and antioxidant attributes of cherry fruit. *Pak. J. Bot.*, 45(3): 909-914.
137. Malenčić, Đ., Kevrešan, S., Popović, M., Štajner D., Popović, B., Kiproviski, B., Đurić, S. (2012): Cholic acid changes defense response to oxidative stress in soybean induced by *Aspergillus niger*. *Cent. Eur. J. Biol.*, 7 (1): 132-137.
138. Malenčić, Đ., Kiproviski, B., Popović, M., Prvulović, D., Miladinović, J., Đorđević, V. (2010): Changes in antioxidant systems in soybean as affected by *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. *Plant Physiol. Biochem.*, 48: 903–908.
139. Malenčić, Đ., Popović, M., Miladinović, J. (2003): Stress tolerance parameters in different genotypes of soybean. *Biol. Plant.*, 46(1): 141-143.
140. Mandal, S., Mitra, A., Mallick, N. (2008): Biochemical characterization of oxidative burst during interaction between *Solanum lycopersicum* and *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 72: 56–61.
141. Mangan, J. L. (1988): Nutritional effects of tannins in animal feeds. *Nutr. Res., Reviews*. 1: 209-231.
142. Mane, C., Souquet J. M., Olle, D., Verries, C., Veran, F., Mazerolles, G., Cheynier, V., Fulcrand, H. (2007): Optimization of simultaneous flavanol, phenolic acid, and anthocyanin extraction from grapes using and experimental design: application to the characterization of champagne grape varieties. *J. Agric. Food Chem.*, 55: 7224-7233.
143. Markham, K. R. (1989): Flavones, flavonols and their glycosides. In: *Methods in Plant Biochemistry 1* (Dey PM, Harborne JB). Academic Press, London.
144. Mccune, L. M., Kubota, C., Stendell-Hollis, N. R., Thomson, C. A. (2011): Cherries and health: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 51: 1–12.
145. Medić–Pap, S., Maširević, S., Prvulović, D. (2014): Phenolic compounds and antioxidant activity of sunflower hybrids inoculated with broomrape. *Studia Ubb Chemia*, LIX 3: 7-16.
146. Miesle, T. J., Proctor, A., Lagrimini, L. M. (1991): Peroxidase activity, isoenzymes, and tissue localization in developing highbush blueberry fruit. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 115: 827-830.
147. Mikulic-Petkovsek, M., Schmitzer, V., Slatnar, A., Stampar, F., Veberic, R. (2012): Composition of sugars, organic acids, and total phenolics in 25 wild or cultivated berry species. *J. Food Sci.* 77(10): C1064-C1070.

148. Mikulic-Petkovsek, M., Slatnar, A., Stampar, F., Veberic, R. (2010): The influence of organic/integrated production on the content of phenolic compounds in apple leaves and fruits in four different varieties over a 2-year period. *J. Sci. Food Agric.*, 90: 2366–2378.
149. Mikulic-Petkovsek, M., Stampar, F., Veberic, R., Sircelj, H. (2016): Wild Prunus Fruit Species as a Rich Source of Bioactive Compounds. *J. Food Sci.*, 81(8):1928-1937.
150. Milatović, D., Đurović, D. (2010): Osetljivost Sorti Trešnje Prema Pucanju Ploda. *Voćarstvo*, 44: 115-121.
151. Milatović, D., Đurović, D. (2010): Osetljivost sorti trešnje prema pucanju ploda. *Voćarstvo*, 44 (171-172): 115-121.
152. Milatović, D., Nikolić, M., Miletić; N. (2011): Trešnja i višnja. Naučno voćarsko društvo Srbije, Čačak
153. Milatović, D., Nikolić, M., Miletić; N. (2015): Trešnja i višnja. Drugo dopunjeno izdanje. Naučno voćarsko društvo Srbije, Čačak
154. Milenković-Andjelković, S. A., Andjelković, M. Z., Radovanović, A. N., Radovanović, B. C., Nikolić, V. (2015): Phenol composition, DPPH radical scavenging and antimicrobial activity of Cornelian cherry (*Cornus mas*) fruit and leaf extracts. *Hem. Ind.*, 69 (4) 331–337.
155. Miletić, N., Tamaš N. (2011): Zaštita višnje i trešnje od prouzrokovala biljnih bolesti i štetočina. U: Zbornik radova “Inovacije u voćarstvu”, Milanović (ed.), Beograd, Srbija: Poljoprivredni fakultet, Beograd: 133-144.
156. Min, B. R., Hart, S. P. (2003): Tannins for suppression of internal parasites. *J. Anim. Sci.*, 81: 102-109.
157. Mišić, P. (2002). Posebno oplemenjivanje voćaka. Beograd: Partenon.
158. Monties, B. (1989): Lignins, in: *Methods in plant biochemistry*, Dey P. M., Harborne J. B., (Eds.) Acad. Press, London, UK, 113-157
159. Mordue, J. E. M. (1979): *Sclerotinia laxa*, CMI Description of Pathogenic Fungi and Bacteria. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, No 616.
160. Morkunas, I., Gmerek, J. (2007): The possible involvement of peroxidase in defense of yellow lupine embryo axes against *Fusarium oxysporum*. *J. Plant Physiol.*, 164: 185–194.
161. Mozetič, B., Trebše, P., Hribar, J. (2002): Determination and quantitation of anthocyanins and hydroxycinnamic acids in different cultivars of sweet cherries (*Prunus avium* L.) from Nova Gorica region (Slovenia). *Food Technol. Biotechnol.*, 40: 207–212.
162. Mratinić, E., Kojić, M. (1998): Samonikle vrste voćaka Srbije. Institut za istraživanja u poljoprivredi „Srbija”, Beograd.
163. Muntanola-Cvetković, M. (1987): Opšta mikologija. NIRO Književne novine, Beograd.
164. Myburg, A. A., Lev-Yadun, S., Sederoff, R. R. (2001): Xylem Structure and Function. eLS. Wiley Interscience Publisher, New York.. doi: 10.1038/npg.els.0001302
165. Nahrstedt, A. (1972): Zur cyanogenese von *Prunus avium*. *Phytochemistry*, 11: 3121–3126. 10.1016/S0031-9422(00)86360-8.
166. Navrátil, M., Válová, P., Fialová, R., Petrová, K., Poncarová, Vorácková Z., Fránová, J., Nebesárová, J., Karesová, R. (2001): Survey for stone fruit phytoplasmas in the Czech Republic. *Acta Hort.* 550:377-382.

167. Niketić, V., Nikolić, M. (2008): Uputstva za vežbe iz biohemije proteina i nukleinskih kiselina (za studente II godine biohemije). Beograd.
168. Nikolić, M. (2018): Marketing orijentacija kao determinanta konkurentnosti proizvođača voća i voćnih sokova u Republici Srbiji. Doktorska disertacija. Ekonomski fakultet Niš.
169. Nikolić, D., Keserović, Z., Magazin, N., Paunović, S., Miletić, R., Nikolić, M., Milivojević, J. (2012): Stanje i perspektive razvoja voćarstva u Srbiji. 14. kongres voćara i vinogradara Srbije sa međunarodnim učešćem. 3 – 22.
170. Nikolić, M. (2000): Višnja i trešnja. Draganić, Beograd.
171. Nikolić, M., Cerović, R., Milenković, S. (1999): Noviji aspekti proizvodnje trešnje. Zbornik naučnih radova PKB Agroekonomik, 5, 2: 7-18.
172. Ninkovski, I. (1998): Trešnja. Savremeni načini podizanja i iskorišćavanja. IP POTEZ – UNO, Beograd.
173. Nizamuddin, A. (1987): NADPH-dependent and O₂-dependent lipid peroxidation. Biochem. Educ., 15(2): 58–62.
174. Obradović, A., Kuzmanović, N., Čalić, A., Gašić, K., Ivanović, M. (2010): Bakterioze i fitoplazmoze koštičavih voćaka. Biljni lekar, 38 (4-5):323-338.
175. Ogawa, J. M., Zehr, E. I., Bird, W. (1995): Brown rot. In: Ogawa, J.M., Zehr, E.I., Bird, G.W., Ritchie, D.F., Uriu, K., Uyemoto, J.K. (eds). Compendium of Stone Fruit Diseases. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
176. Ognjanov, V., Ljubojević, M., Pečurica, A., Čalić, M., Mladenović, E., Čukanović, J. (2011): Vegetative and reproductive characteristics of new sweet cherry cultivars. In: Proceedings of the 3rd Conference „Innovations in Fruit Production.“ (Milatović, D., Ed.), ISHS, Belgrade, 153 - 163.
177. Ohshima, H., Yoshie, Y., Auriol, S., Gilbert, I. (1998): Antioxidant and Pro-oxidant Action of Flavonoids: Effects on DNA Damage Induced by Nitric Oxide, Peroxynitrite and Nitroxyl Anion. Free Rad. Biol. Med., 25: 1057-1065.
178. Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan J. A., Deemer, E. K., (2002): Analysis of Antioxidant Activities of Common Vegetables Employing Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays:A Comparative Study. J. Agric. and Food Chem., 50: 3122-3128.
179. Oyaizu, M. (1986): Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. Jpn. J. Nutr., 44:307–315.
180. Pacifico, S., Di Maro, A., Petriccione, M., Galasso, S., Piccolella, S., Di Giuseppe, A. M. A., Scortichini, M. Monaco, P. (2014): Chemical composition, nutritional value and antioxidante properties of autochthonous *Prunus avium* cultivars from campania region. Food Res. Int., 64: 188–199.
181. Pantelidis, G. E., Vasilakakis, M., Manganaris, G. A., Diamantidis, G. (2007): Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid content in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries. Food Chem., 3: 777-778.

182. Parikh, B., Shukla, Y. M., Patel, V. H. (2016): Nutritional Profile of an Underutilized Indian Fruit: Rayan Manilkara hexandra (Roxb.) Dubard Indian Journal of Agricultural Biochemistry, 29(1): 51-53.
183. Passardi, F., Theiler, G., Zamocky, M., Cosio, C., Rouhier, N., Teixera, F., Dunand, C. (2007): PeroxiBase: the peroxidase database. Phytochemistry, 68 (12): 1605-1611.
184. Perl, A., Perl-Treves, R., Galili, S., Aviv, D., Shalgi, E., Malkin, S., Galun, E. (1993): Enhanced oxidative-stress defense in transgenic potato overexpressing tomato Cu, Zn superoxide dismutase. Theor. Appl. Genet., 85: 568–576.
185. Petersen, D. R., Reichard, J., Kolaja, K. L., Hartley, D. (1999): 4-Hydroxynonenal and malondialdehyde hepatic protein adducts in rats treated with carbon tetrachloride: immunochemical detection and lobular localization. Toxicol. Appl. Pharm., 161: 23-33.
186. Peterson, R. F., Champbell, A. B., Hannah, A. E. (1948): A diagrammatic scale for estimating rust intensity of leaves and stem of cereals. Peterson, R. F. C. 26: 496-500.
187. Petković, B., Matoš, S., Gorgi, N., Kukrić, Z. (2014): Analysis of antioxidant activity of different species of wild cherry *Prunus avium* L. Glo. Adv. Res. J. Agric. Sci., 3(5): 128-135.
188. Petri, G., Krawczyk, U., Kery, A. (1997): Spectrophotometric and Chromatographic Investigation of Bilberry Anthocyanins for Quantification Purposes. Microchem. J., 55: 12-23.
189. Popović, M. (2001): Biohemija biljaka., Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.
190. Popović M., Malenčić Đ. (2006): Aktivni principi ukrasnog bilja. Poljoprivredni fakultet Novi Sad.
191. Popović, B., Štajner, D. (2008): Oksidativni stres kod biljaka. Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.
192. Prakash, A. (2001): Antioxidant activity. Med. Lab. Anal. Prog., 19(2):1–6.
193. Prior, R. L., Wu, X., Schaich, K. (2005): Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. J. Agric. Food Chem., 53:4290–4302. doi: 10.1021/jf0502698.
194. Prvulović, D., Malenčić, Đ., Popović, M., Ljubojević, M., Ognjanov, V. (2011): Antioxidant properties of sweet cherries (*Prunus avium* L.) – role of phenolic compounds. ICABBBE - International Conference on Agricultural, Biosystems, Biotechnology, Biological Engenering, Venice, Italy. World Academy of Science, Engenering and Technology. 1149-1152.
195. Prvulović, D., Popović, M., Malenčić, Đ., Ljubojević, M., Barać, G., Ognjanov, V. (2012): Phenolic content and antioxidant capacity of sweet and sour cherries, Studia UBB Chemia, 57 (4):175-181.
196. Quint, P., Reutzel, R., Milulski, R., McKenna, R., Silverman, D. N. (2006): Crystal structure of nitrated human manganese superoxide dismutase: mechanism of inactivation. Free Radic. Biol. Med., 40 (3): 453-458
197. Quiroga, M., Guerrero, C., Botella, M. A., Barceló, A., Amaya, I., Medina, M. I., Alonso, F. J., De Forchetti, S. M., Tigier, H., Valpuesta, V. (2000): A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. Plant Physiology, 122:1119–1128.

198. Ram, V., Bhardwaj, L. N. (2004): Stone fruit diseases and their management. In: Disease of fruits and vegetables, Volume II, (Naqvi S.A.M.H., ed.) Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 485-510.
199. Ramalakshmi, K., Mohan Rao, J. L., Takano-Ishikawa, Y., Goto, M. (2009): Bioactivities of low-grade green coffee and spent coffee in different in vitro model systems, *Food Chem.*, 115: 79–85
200. Ramful, D., Tarnus, E., Aruoma, O. I., Bourdon, E., Bahorun, T. (2011): Polyphenol composition, vitamin C content and antioxidant capacity of Mauritian citrus fruit pulps. *Food Res. Int.*, 7: 2088-2099.
201. Rasoli, I. (2011): Phytochemicals – Bioactives and Bioavailability and Impact of Health; Chapter 5, Yan Li, Paxton JW (ed) Oral Bioavailability and Disposition of Phytochemicals. Intech. Shanghai.
202. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A. Pannala, A., Rice-Evans, C. (1999): Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.*, 26 (9–10): 1231–1237.
203. Republički zavod za statistiku Srbije (2012): Baza podataka statistike poljoprivrede.
204. Robards, K., Prenzler, P.D., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W. (1999): Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem.*, 66: 401-436.
205. Robbins, R. J. (2003): Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. *J. Agric. Food Chem.*, 51(10): 2866-2887.
206. Ruidavets, J., Teissedre, P., Ferrières, J., Carando, S., Bougard, G., Cabanis, J. (2000): Catechin in the Mediterranean diet: vegetable, fruit or wine? *Atherosclerosis*, 153 (1): 107—17.
207. Sabanadzović, S., Abou Ghanem-Sabanadzović, N., Rowhani A., Grant J.A., Uyemoto J.K. (2005): Detection of Cherry virus A, Cherry necrotic rusty mottle virus and Little cherry virus 1 in California orchards. *J. P. Pathol.*, 87: 173–177.
208. Sánchez-Pérez, R., Jorgensen, K., Olsen, C. E., Dicenta, F., Moller, B. L. (2008): Bitterness in almonds. *Plant Physiology*, 146: 1040–1052.
209. Sansavini, S., Lugli, S. (2008): Sweet cherry breeding programs in Europe and Asia. *Acta Hort.*, 795:41-57.
210. Santos-Gomes, P. C., Seabra, R. M., Andrade, P. B., Fernandes-Ferreira, M. (2002): Phenolic antioxidant compounds produced by in vitro shoots of sage (*Salvia officinalis* L.). *Plant Sci.* 162: 981-987.
211. Sawada, E. (1934): A physical consideration of the mechanism of fruit cracking of sweet cherries. *Trans. Sapporo Natl. Hist. Soc.*, 13:365–376.
212. Scalbert, A. (1991): Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*. 30(12): 3875-3883.
213. Scandalios, J. G., Guan, L., Polidoros, A. N. (1997): Catalases in plants: gene structure, properties, regulation, and expression. In: Scandalios J. G. (ed.), *Oxidative Stress and the*

Molecular Biology of Antioxidant Defenses, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 343–406.

214. Schovánková, J., Opatová, H. (2011): Changes in phenols composition and activity of phenylalanine-ammonia lyase in apples after fungal infections. *Hort. Sci.*, 38: 1–10.
215. Sendra, J. M., Sentandreu, E., Navarro, J. L. (2006): Reduction kinetics of the free stable radical 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•) for determination of the antiradical activity of citrus juices. *Eur. Food Res. Technol.*, 223: 615–624. doi: 10.1007/s00217-005-0243-3.
216. Serradilla, M. J., Lozano, M., Bernalte M. J., Ayuso, M. C., López-Corrales, M., González-Gómez, D. (2011): Physicochemical and bioactive properties evolution during ripening of ‘Ambrunés’ sweet cherry cultivar. *LWT-Food Sci. Tech.*, 44: 199–205.
217. Serrano, M., Diaz-Mula, H.M., Zapata, P.J., Castillo, S., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Valverde Juan, M., Valero, D. (2009): Maturity Stage at Harvest Determines the Fruit Quality and Antioxidant Potential after Storage of Sweet Cherry Cultivars *J. Agric. Food Chem.*, 57: 3240-3246.
218. Serrano, M., Guillen, F., Martínez-Romero, D., Castillo, S., Valero, D., (2005): Chemical constituents and antioxidant activity of sweet cherry at different ripening stages. *J. Agric. Food Chem.*, 53: 2741-2745.
219. Singh, P., Singh, Z., Swinny, E. (2012): Climacteric level during fruit ripening influences lipid peroxidation and enzymatic and non-enzymatic antioxidative systems in Japanese plums (*Prunus salicina* Lindell). *Postharvest Biol. Technol.*, 65: 22-32.
220. Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R. M. (1999): Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent, In: Packer, L. (Ed.), *Oxidants and Antioxidants*, Pt A. Elsevier Academic Press Inc, San Diego. 152-178.
221. Skrzyński, J., Leja, M., Gonkiewicz, A., Banach, P. (2016): Cultivar effect on the sweet cherry antioxidant and some chemical attributes. *Folia Horticulturae*, 28/1: 95-102.
222. Spigno, G., Tramelli, L., De Faveri D. M. (2007): Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *J. Food Eng.*, 81: 200 – 208.
223. Sredojević, Z. (2011): Ekonomska evaluacija proizvodnje trešnje i višnje u Srbiji. Zbornik radova III savetovanja Inovacije u voćarstvu „Unapređenje proizvodnje trešnje i višnje”, Beograd.
224. Statistički godišnjak Republike Srbije (2011). Republički zavod za statistiku, Beograd.
225. Stintzing, F. C., Stintzing, A. S., Carle, R., Frei, B., Wrolstad, R. E. (2002): Color and antioxidant properties of cyanidin-based anthocyanin pigments. *J. Agric. Food Chem.*, 50: 6172–6181.
226. Stojanović, B. (2015): Hemijski sastav i antioksidativna aktivnost metanolnih i acetonskih ekstrakata pulpe i kore odabranih vrsta voća sa područja Jugoistočne Srbije. Doktorska disertacija. Prirodno matematički fakultet, Niš.

227. Stojković, M. (2014): Antioksidativna aktivnost, fenolni i mineralni sastav biljnih vrsta: *Geranium Macrorrhizum* L., *Allium Ursinum* L., *Stachys Germanica* L. i *Primula Veris* L. Doktorska disertacija. Prirodno matematički fakultet, Niš.
228. Strack, D. (1997): Phenolic metabolism. In: Dey PM, Harborne JB, eds. *Plant Biochemistry*. London, UK. Academic Press. 387–416.
229. Sugawara, T., Igarashi, K. (2008): Cultivar variation and anthocyanins and rutin content in sweet cherries (*Prunus avium* L.). *J. Jpn. Soc. Food Sci.*, 55: 239–249.
230. Sultana, B., Anwar, F. (2008): Flavonols (kaempferol, quercetin, myricetin) contents of selected fruits, vegetables and medicinal plants. *Food Chem.*, 3: 879-884.
231. Škerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Hraš, A. R., Simonic, M., Knez, T. (2005): Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chem.*, 2: 191-198.
232. Štajner, D., Milić-Demarino, N., Canadanović-Brunet, J., Stajner, M., Popović, B. M. (2006): Screening for antioxidant properties of *Allium giganteum*. *Fitoterapia*. 77 (4): 268-270.
233. Štajner, D., Popović, B. M., Canadanović-Brunet, J., Stajner, M. (2008): Antioxidant and scavenger activities of *Allium ursinum*. *Fitoterapia*. 79 (4):303-5.
234. Štampar, F., Solar, A., Hudina, M., Veberič, R., Colarič, M. (2006): Traditional walnut liqueur - cocktail of phenolics. *Food Chem.*, 95: 627-63.
235. Šutić, D. (1987): Fiziologija i anatomija bolesnih biljaka. Nolit, Beograd.
236. Tainer, J. A., Getzoff, E. D., Beem, K. M., Richardson, D. C. (1982): Determination an analysis of the 2 A-structure of copper, zinc superoxide dismutase. *J. Mol. Biol.*, 160 (2): 181-271.
237. Tanguy, J., Martin, C. (1972): Phenolic compounds and the hypersensitive reaction in *Nicotiana tabacum* infected with tobacco mosaic virus. *Phytochemistry*, 11:19–28.
238. Tapas, A. R., Sakarkar, D. M., Kakde, R. B. (2008): Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. *Trop. J. Pharm. Res.*, 7(3): 1089- 1099.
239. Tehmina, A., Sabin, F., Sana, A. (2012): Physiological changes in wheat during development of loose smut. *Trop. Plant Pathol.*, 37(2): 102-107.
240. Terry, L. A., Joyce, D. C., Adikaram, N. K. B., Khambay, B. P. S. (2004): Preformed antifungal compounds in strawberry fruit and flower tissues. *Postharvest Biol. Technol.*, 31: 201–212.
241. Tomás-Barberán, F. A., Espin, J. E: (2001): Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *J. Sci. Food Agric.*, 81 (9): 853-876.
242. Tumbas, V. (2010): Antiradikalska i antiproliferativna aktivnost ekstrakata odabranih biljaka iz familije *Rosaceae* i *Ericaceae*. Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Novi Sad.
243. Tyagi, M., Kayastha, M. A., Sinha, B. (1998): The role of phenolics and peroxidase to *Alternaria triticinain* bread wheat. *J. Agron. Crop Sci.*, 181: 29-34.
244. USDA Food Composition Databases Software developed by the National Agricultural Library (2018).

245. Usenik, V., Fabčić, J., Stampar, F. (2008): Sugars, organic acids, phenolic composition and antioxidant activity of sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Food Chem.*, 107: 185–192.
246. Usenik, V., Fabric, J. Stampar, F. (2008): Sugars, Organic Acids, Phenolic Composition and Antioxidant Activity of Sweet Cherry (*Prunus avium* L.). *Food Chem.*, 107: 185-192.
247. Usenik, V., Fajt, N., Mikulić-Petkovšek, M., Slatnar, A., Stampar, F., Veberič, R. (2010): Sweet cherry pomological and biochemical characteristics influenced by rootstock. *J. Agric. Food Chem.*, 58: 4928–4933.
248. Usenik, V., Marn, M. V. (2016): Sugars and organic acids in plum fruit affected by *Plum pox virus* *J. Sci. Food Agric.*, 97(7): 2154-2158.
249. Van Leeuwen, G. C. M., van Kesteren, H. A. (1998): Delineation of the three brown rot fungi of fruit crops (*Monilinia* spp.) on the basis of quantitative characteristics. *Can. J. Bot.*, 76: 2042-2050.
250. Van Leeuwen, G. C. M., Baayen, B. P., Holb, I. J., Jeger, M. J. (2002): Distinction of the Asiatic brown rot fungus *Monilia polystroma* sp. nov. from *M. fructigena*. *Mycol. Res.*, 106: 441-51.
251. Vasić, M. (2016): Karakterizacija *Monilinia* spp. patogena plodova jabuke u Srbiji i različiti aspekti njihove kontrole. Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet Beogradu.
252. Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K., Swings, J. (1995): Reclassification of *Xanthomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45:472-489.
253. Valiunas, D., Jomantiene, R., Davis, R.E. (2005): A 'Candidatus Phytoplasma asteris'–related phytoplasma associated with cherry little leaf disease represents a new subgroup, 16SrI-Q. *Phytopathology* 95: S106.
254. Veberič, R., Slatnar, A., Jakopič, J., Štampar, F., Mikulič Petkovšek, M. (2012): Primary and secondary metabolites in fruits. 14th Serbian congress of fruit and grapevine producers with international participation. 55-62. Vrnjačka Banja.
255. Veličković, J. (2013): Hemijska analiza i antioksidativna aktivnost ekstrakata odabranih biljnih vrsta bogatih fenolnim jedinjenjima. Doktorska disertacija, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Nišu.
256. Voća, S., Dobričević, N., Habun, T., Čmelik, Z., Družić, J. (2008): Glukoza, fruktoza i saharoza u plodovima trešanja, *Pomologica Croatica*, 14(2): 93-100.
257. Wallace G., Fry, S.C. (1994): Phenolic compounds of the plant cell wall. *Int. Rev. Cytol.*, 151: 229–267.
258. Wang, S.Y. (2006): Effect of Pre-harvest Conditions on Antioxidant Capacity in Fruits. *Acta Hort.*, 712.
259. Wang, S.Y., Zheng, W., Galletta, G. J. (2002): Cultural system affects fruit quality and antioxidant capacity in strawberries. *J. Agric. Food Chem.*, 50: 6534-6542.
260. Willekens, H., Chamnongpol, S., Davey, M., Schraudner, M., Langebartels, C., Van Montagu, M., Inze, D., Van Camp, W. (1997): Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defense in C3 plants. *EMBO J.*, 16: 4806–4816.
261. Willson, M. F., Whelan, C. J. (1990): The evolution of fruit color in fleshy-fruited plants. *Am. Nat.*, 136:790-809.

262. Wu, X., Prior, R. L. (2005): Systematic identification and characterization of anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in common foods in the United States: fruits and berries. *J. Agric. Food Chem.*, 53(7): 2589-2599.
263. Wurms, K.V. (2005): Susceptibility to *Botrytis cinerea*, and curing induced responses to lytic enzymes and phenolics in fruit of two kiwifruit (*Actinidia*) cultivars. *N. Z. J. Crop. Hortic. Sci.*, 33: 25-35.
264. Wurms, K.V., George, M. P., Lauren, D. R. (2003): Involvement of phenolic compounds in host resistance against *Botrytis cinerea* in leaves of the two commercially important kiwifruit (*Actinidia chinensis* and *A. deliciosa*) cultivars. *N. Z. J. Crop Hortic. Sci.*, 31: 221–233.
265. Yamaguchi, M., Sato, I., Ishiguro, M.. (2002): Influences of epidermal cell sizes and flesh firmness on cracking susceptibility in sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars and selections. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.*, 71:738–746.
266. Yang, Z., Su, X., Prasad, K. N., Yang, B., Cheng, G., Chen, Y., Yang, E., Jiang, Y. (2008): Oxidation and peroxidation of postharvest banana fruit during softening. *Pak. J. Bot.*, 40(5): 2023-2029.
267. Ždero-Pavlović, R. (2017): Biohemijški mehanizmi otpornosti klonova topole (*Populus spp.*) na vodni stres. Doktorska disertacija. Prirodno-matematički fakultet Novi Sad.
268. Zheng, L., Poulton, J. E. (1995): Temporal and spatial expression of amygdalin hydrolase and (R)⁺ mandelonitrile lyase in black cherry seeds. *Plant Physiol.*, 109: 31–39.
269. Zhou, J., Hartmann, S., Shepherd, B. K., Poulton, J. E. (2002): Investigation of the microheterogeneity and aglycone specificity-conferring residues of black cherry prunasin hydrolases. *Plant Physiol.*, 129: 1252–1264.
270. Zhu, S. F., Hadidi, A., Lee, I. M., Gundersen, D. E., Zhang, C. L. (1998): Characterization of the phytoplasmas associated with cherry lethal yellows and jujube witches' broom disease in China. *Acta Hortic.* 472:701–707.
271. http://www.wikiwand.com/sl/Reaktivna_kisikova_spojina
272. <https://vrijeschoolpedagogie.com/2015/05/page/2/>

9. BIOGRAFIJA

Dipl. inž. - master Boško Borković je rođen 20. 08. 1987. u Bačkoj Palanci. Osnovnu školu je završio odličnim uspehom u mestu Nova Gajdobra 2002. godine, a gimnaziju u Bačkoj Palanci, 2006.

Poljoprivredni fakultet u Novom Sadu, smer za fitomedicinu je upisao školske 2006/2007. godine. Osnovne studije završio je za 3 godine i 9 meseci (prvi u svojoj generaciji) jula 2010. godine sa prosečnom ocenom 8,20. Diplomski rad je odbranio iz predmeta Fiziologija biljaka na temu „Fiziološko biohemijaska promene kod krastavca pod dejstvom naftnih kiselina“, sa ocenom 10.

Diplomske akademske studije - master upisao je 2010/2011. godine, studijski program Zemljište i ishrana biljaka (modul Fiziologija biljaka). Studije završava za nepunu godinu (septembra 2011. godine) sa prosečnom ocenom 10,00. Iz nastavnog predmeta Ishrana biljaka odbranio je master rad na temu „Akumulacija i distribucija neophodnih elemenata kod krastavca pod dejstvom naftnih kiselina“ sa ocenom 10 pred komisijom u sastavu: prof. dr Ivana Maksimović (mentor), prof. dr Slavko Kevrešan i prof. dr Slobodanka Pajević.

Odlukom predmetnog nastavnika, a potom i odlukom NN veća u školskim 2010/2011. i 2011/2012 bio je angažovan na izvođenju laboratorijskih vežbi iz predmeta koji pripadaju UNO Fiziologija i ishrana biljaka na radnom mestu saradnik u nastavi. Tokom osnovnih studija, novembra 2009. godine učestvovao je na Međunarodnoj smotri studentskih radova, a tokom master studija, juna 2011. na Međunarodnom simpozijumu Društva za Fiziologiju biljaka Srbije, gde je osvojio nagradu za najuspešniji poster skupa.

Školske 2011/2012. godine upisuje doktorske studije na Poljoprivrednom fakultetu u Novom Sadu, odsek Agronomija. Sve predmete predviđene planom i programom doktorskih studija položio je sa prosečnom ocenom 9,90. Bio je stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije tokom školskih 2011/2012. i 2012/2013. godine. U svojstvu stipendiste - doktoranta bio je angažovan na projektu pod nazivom „Stvaranje slabobujnih podloga za trešnju i višnju i razvijanje intenzivne tehnologije gajenja na principima održive poljoprivrede“ - (MPNTR - 31038), u okviru laboratorije predmeta Biohemija biljaka, na Poljoprivrednom fakultetu, Univerziteta u Novom Sadu.

Objavio je kao autor ili koautor 13 naučnih publikacija, od kojih su 2 rada sa SCI liste.

Od februara 2013. godine je zaposlen u kompaniji Agrogrnja doo. u svojstvu stručnog konsultanta iz oblasti fitomedicine.

Govori i služi se engleskim jezikom. Oženjen je i živi u Bačkoj Palanci.