

Promene u sadržaju fenolnih jedinjenja u listovima suncokreta nakon inokulacije uzročnikom plamenjače

- Originalni naučni rad -

Nataša RADOVANOVIĆ, Mira PUCAREVIĆ, Siniša JOCIC i
Dejana SAFTIĆ-PANKOVIĆ
Naučni institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad

Izvod: U ovom radu korišćene su dve izogene linije suncokreta koje se razlikuju po prisustvu Pl6 gena za otpornost prema plamenjači. U fazi prvog para listova izvršena je inokulacija biljaka suspenzijom zoospora *Plasmopara halstedii*. U uzorcima uzetim od dva do 96 h nakon inokulacije, analiziran je sadržaj fenolnih jedinjenja u metanolnim ekstraktima iz zamrznutih listova suncokreta (UV-VIS i HPLC analiza). Konstitutivni nivo fenolnih jedinjenja, kao i njihova akumulacija nakon inokulacije su veći kod osetljive nego kod otporne izogene linije. Najveći doprinos akumulaciji fenolnih jedinjenja 24 h nakon inokulacije kod osetljive linije imaju hlorogena, ferulična kiselina i eskulin, a kod otporne linije hlorogena kiselina i eskulin. Kod otporne linije postoji trend akumulacije skopoletina.

Ključne reči: Fenolna jedinjenja, *Helianthus annuus*, otpornost, *Plasmopara halstedii*.

Uvod

Česta fiziološka reakcija biljaka na infekciju gljivama je povećanje sinteze fenolnih jedinjenja koja se akumuliraju kao inducibilni nisko-molekularni proizvodi. U biljkama je do danas identifikovano više stotina fenolnih jedinjenja, a u familiji *Asteraceae*, kao odgovor na biotički i abiotički stres, iz grupe fenolnih jedinjenja se akumuliraju velike količine hidroksikumarina, *Prats i sar.*, 2002.

Kod suncokreta hidroksikumarini skopoletin i ajapin su opisani kao fitoaleksini, *Tal i Robeson*, 1986a,b, i aleopatska jedinjenja koja se nakupljaju kao odgovor na gljivičnu i parazitsku infekciju biljaka, *Prats i sar.*, 2003, 2006, *Serghini i sar.*, 2001, *Tal i Robeson*, 1986a,b, napad insekata, mehaničku povredu, *Olson i Roseland*, 1991, i tretiranje sa abiotičkim elicitorima kao što su saharoza i bakar (II)

hlorid CuCl_2 , **Gutiérrez i sar.**, 1995. Skopoletin i skopolin su otkriveni u neznatnim količinama i u neinficiranom tkivu, dok ajapin nije otkriven kao komponenta neinficiranih biljaka, **Tal i Robeson**, 1986b. Između različitih genotipova suncokreta pronađene su razlike s obzirom na njihovu sposobnost za sintezu kumarina, **Gutiérrez i sar.**, 1996. Međutim, studije u kojima se sposobnost genotipova suncokreta za sintezu kumarina dovodi u vezu sa većom otpornošću prema bolestima su malobrojne, a najčešće se upoređuju genotipovi koji se međusobno razlikuju po mnogim morfološko-fiziološkim osobinama. U ovom radu koristili smo model sistem u kojem se upoređuje sadržaj fenolnih jedinjenja nakon inokulacije dve izogene linije suncokreta sa prouzrokovatelem plamenjače (*Plasmopara halstedii* (Farlow) Barlese & de Toni). Odabrane linije se razlikuju po malom broju gena među kojima je najvažniji Pl6 gen za otpornost prema plamenjači, **Panković i sar.**, 2004.

Materijal i metode

U radu su korištene dve izogene linije suncokreta, NS-H-26R koja ima Pl6 gen i otporna je prema plamenjači, i NS-H-26S koja je osetljiva na plamenjaču. Nakon površinske sterilizacije (10% natrijum hipohlorit, 5 min) seme je inkubirano na vlažnom filter papiru u termostatu na 25°C u trajanju od 24 do 48 sati. Naklijalo seme sa dužinom radikule oko 1 cm je premešteno u plastične tepsije u smeši treseta i peska (3V:1V). Biljke su gajene u klima komori na svetlosti 10 000-12 000 luxa (16 h dan), temperaturi 17-19°C i vlažnosti vazduha 70%, **Tourvieille de Labrouche i sar.**, 2000. Eksperiment je izvršen u dve varijante koje su označene kao Oglad 1. i Oglad 2. U prvom ogledu prvi put smo proverili otpornost dve izogene linije na inokulaciju biljaka suspenzijom zoospora *P. halstedii*, **Tourvieille de Labrouche i sar.**, 2000. Ocena otpornosti se vrši 12 dana posle inokulacije. Prema literaturnim podacima do akumulacije kumarina dolazi znatno ranije, pa je zbog toga izvršen i Oglad 2 u kojem su uzorci uzimani u opsegu od dva do 96 sati nakon inokulacije.

Oglad 1. - U fazi prvog para listova, 12 dana posle setve izvršena je inokulacija biljaka suspenzijom zoospora *P. halstedii* ($40-70 \times 10^3$ zoosporangija/mililitar). Biljke su prenete u mrak i obezbeđena im je 100% relativna vlažnost, da bi se stimulisala sporulacija gljive na kotiledonima. Dvanaest dana nakon inokulacije ocenjena je otpornost biljaka, posle čega su uzorci listova zamrznuti u tečnom azotu. Uzorci su ekstrahovani u 100% metanolu (10 mg sveže mase/3ml metanola) u toku 30 minuta na 60°C, **Cerović i sar.**, 2002. Nakon centrifugiranja supernatant je prečišćen sa n-heksanom i posle uparavanja u vakuum koncentratoru talog je rastvoren u metanolu.

Oglad 2. - Biljke su gajene u identičnim uslovima kao u prvom ogledu. U fazi prvog para listova izvršena je inokulacija suspenzijom spora *P. halstedii*, dok su kontrolne biljke tretirane sa vodom. Grupni uzorci, sastavljeni od listova sa četiri biljke u četiri ponavljanja, su uzeti 2, 4, 12, 24, 48 i 96 sati nakon tretmana sa inokulisanih i kontrolnih biljaka. Uzorci zamrznuti u tečnom azotu su ekstrahovani u

100% metanolu, u toku 30 minuta na 60°C. Apsorbancije fenolnih jedinjenja iz metanolnih ekstrakata izmerene su spektrofotometrijski (UV-VIS i HPLC-om).

Merenja na HPLC-u. - Metanolni ekstrakti iz 24-og sata nakon inokulacije su analizirani hromatografski uz korišćenje šest standarda na osnovu čega je izračunat sadržaj fenolnih jedinjenja u ispitivanim tretmanima. Korišten je tečni hromatograf Agilent 1100, koji je opremljen detektorom sa nizom dioda (DAD) i automatskim injektorom za tečne uzorke. Talasna dužina detektora je 280 nm, a referentna 600 nm. Kolona je tipa Agilent ODS Hypersil, dužine 200 mm unutrašnjeg prečnika 2,1 mm, kataloški broj 79916OD-572. Mobilna faza A je 5% rastvor CH₃COOH u vodi, a mobilna faza B je metanol. Eluiranje je vršeno gradijentom 7-80%, uz protok 0,5 ml/min i injekcionu zapreminu od 5 µl. Kao standardi korišteni su skopoletin, eskulin, hlorogena, kafeična i cinamična kiselina (Sigma Aldrich Chemie) i ferulična kiselina (Fluka Chemie).

Svi rezultati statistički su obrađeni analizom varijanse dvofaktorijalnog ogleda sa ponavljanjima. Značajnost razlika srednjih vrednosti ispitivanih tretmana analizirana je testom najmanje značajne razlike (LSD test).

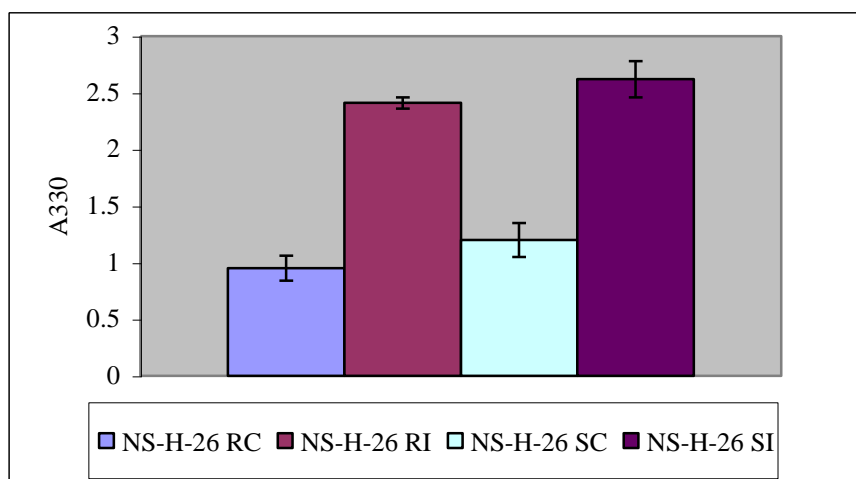
Rezultati i diskusija

Prema literaturnim podacima 10 do 14 dana nakon inokulacije plamenjačom kod osetljivih biljaka ispoljavaju se tipični simptomi bolesti tj. hloroza listova sa sporulacijom na naličju listova, *Tourvieille de Labrouche i sar.*, 2000. U našem ogledu kod biljaka osetljive linije (NS-H-26S) ispoljili su se tipični simptomi bolesti 12 dana posle inokulacije, što nije bio slučaj sa biljkama otporne linije (NS-H-26R).

Fenolna jedinjenja u metanolu imaju maksimalne apsorbcije u oblasti talasnih dužina od 240 do 330 nm, *Cerović i sar.*, 2002. Maksimum apsorbcije UV spektara naših uzoraka bio je na 330 nm (A₃₃₀). U analiziranim uzorcima pre inokulacije u osetljivoj liniji A₃₃₀ su značajno veće nego u otpornoj liniji (Grafikon 1). Dvanaest dana nakon inokulacije A₃₃₀ je značajno veća kao što se i očekuje, jer je poznato da se akumulacija fenolnih jedinjenja povećava sa starošću biljaka, *Gutiérrez i sar.*, 1995, tako da je u ovom slučaju povećanje A₃₃₀ rezultat i razvoja listova i odgovora na inokulaciju.

U drugom ogledu je proučavana vremenska zavisnost A₃₃₀ u opsegu 2-96 sati posle inokulacije. Kontrolne biljke su bile tretirane sa vodom. Kao odgovor na inokulaciju dolazi do porasta A₃₃₀ kod obe linije suncokreta (Tabela 1). Kod otporne linije već od 2 h pa sve do 12 h posle inokulacije, zabeležen je značajan porast A₃₃₀ kod inokulisanih biljaka u odnosu na kontrolu. Kod osetljive linije značajan porast se javlja u periodu od 4 do 24 h posle inokulacije. Kod svih uzoraka A₃₃₀ raste u funkciji vremena, sa prolaznim padom u tački 24 h nakon inokulacije.

Tal i Robeson, 1986b, su ustanovili da do akumulacije kumarina skopoletina dolazi već 18 h nakon inokulacije stabljike suncokreta sa patogenom gljivom (*Alternaria helianthi* (Hausf.) Tub. et Nish.). U istom ogledu utvrđen je porast *J. Sci. Agric. Research/Arh. poljopr. nauke* 67, 240 (2006/4), 79-86



Grafikon 1. Srednje vrednosti apsorbancija na 330 nm (A_{330}) ispitivanih biljaka ($n=8$) iz Oglada 1 dvanaest dana posle inokulacije: NS-H-26 RC otporna linija kontrola, NS-H-26 RI otporna linija inokulisana, NS-H-26 SC osetljiva linija kontrola, NS-H-26 SI osetljiva linija inokulisana ($LSD_{0,05}=0,17$)

The average absorbance at 330 nm (A_{330}) of examined plants ($n=8$) in the Experiment 1 twelve days after inoculation: NS-H-26 RC resistant line control, NS-H-26 RI resistant line inoculated, NS-H-26 SC susceptible line control, NS-H-26 SI susceptible line inoculated ($LSD_{0,05}=0.17$)

ajapina tek 48 h posle inokulacije. U našem ogledu značajna razlika u reakciji otporne i neotporne linije javlja se prvi put 24 h nakon inokulacije (Tabela 1). U analiziranim uzorcima 24 h nakon inokulacije, najveći sadržaj je izmeren za

Tabela 1. Srednje vrednosti apsorbancija na 330 nm u funkciji vremena nakon inokulacije ispitivanih biljaka suspenzijom zoospora *P. halstedii* iz Oglada 2 ($n=4$)

The Average Absorbance at 330 nm in the Function of the Time after Inoculation of Examined Plants with the Suspension of *P. halstedii* Zoospores in the Experiment 2 ($n=4$)

Genotip ^a Genotype ^a	Sati nakon inokulacije (h) - Hours after inoculation (h)						
	2	4	12	24	48	72	96
NS-H-26 SC	0,253	0,244	0,309	0,236	0,372	0,359	0,415
NS-H-26 SI	0,268	0,32*	0,366*	0,299*	0,385*	0,388*	0,445*
NS-H-26 RC	0,224	0,222	0,286	0,229	0,332	0,313	0,331
NS-H-26 RI	0,256*	0,27*	0,307*	0,234	0,338	0,331*	0,348
LSD 0,05	0,026	0,033	0,019	0,021	0,017	0,017	0,028

^aSC - osetljiva linija kontrola; SI - osetljiva linija inokulisana; RC - otporna linija kontrola; RI - otporna linija inokulisana. Značajne razlike između inokulisanih i kontrolnih uzoraka na osnovu LSD testa obeležene su zvezdicama.

^aSC-susceptible line control; SI-susceptible line inoculated; RC-resistant line control; RI-resistant line inoculated. Significant differences between control and inoculated samples, based on the LSD test, are marked with asterisks.

hlorogenu kiselinu (80-214 µg/g sveže mase - SM), pa zatim feruličnu (11,5-31,7 µg/g SM) i cinamičnu kiselinu (7,0-9,9 µg/g SM), eskulin (1,1-8,0 µg/g SM) i kafeičnu kiselinu (0,22-0,26 µg/g SM) (Tabela 2.). Koncentracija skopoletina je varirala od 0,1 do 0,15 µg/g SM što je u saglasnosti sa rezultatima, **Prats i sar.**, 2006.

Hlorogena, ferulična, cinamična i kafeična kiselina, koje su u našim uzorcima sačinjavale prosečno 80%, 12%, 5% i 0,15%, od ukupnog sadržaja merenih fenolnih jedinjenja (Tabela 2), se smatraju prekursorima skopoletina i ajapina, **Cabello-Hurtado i sar.**, 1998. Kod inokulisanih biljaka osetljive linije je došlo do akumulacije svih ispitivanih fenolnih jedinjenja osim cinamične kiseline i skopoletina. Kod otporne linije postoji trend akumulacije svih fenolnih jedinjenja ali je do značajnog porasta došlo samo u slučaju kafeične kiseline. Poređenjem kontrola vidi se da kod osetljive linije postoji značajno veći sadržaj svih fenolnih jedinjenja osim kafeične kiseline i skopoletina. Akumulacija skopoletina, skopolina i ajapina je u literaturi povezivana sa otpornošću prema gljivičnim bolestima suncokreta, **Prats i sar.**, 2003, 2006, **Tal i Robeson**, 1986b. U našim uzorcima 24 h posle inokulacije nije došlo do značajne akumulacije skopoletina, ali kod otporne linije postoji trend akumulacije ovog hidroksikumarina. U ovom radu nismo određivali količinu skopolina, tj. glikozidnog derivata skopoletina, i ajapina, jer komercijalni standardni nisu na raspolaganju. **Prats i sar.**, 2006, su pokazali da je sadržaj skopolina u listovima suncokreta i do 40 puta veći od sadržaja skopoletina. U daljem radu trebalo bi ispitati i količinu skopolina. Takođe treba ispitati i druge vremenske intervale posle inokulacije, jer su npr. **Brandle i Spring**, 2003, pokazali da do značajnog porasta skopoletina u lisnim isečcima suncokreta dolazi tek 162 h nakon prodiranja zoospora *P. halstedii* u tkivo inokulisanih biljaka.

Zaključak

Naši rezultati ukazuju da su konstitutivni nivoi fenolnih jedinjenja, kao i njihova akumulacija u listu suncokreta posle inokulacije suspenzijom zoospora *P. halstedii* veći kod osetljive nego kod otporne izogene linije. Najveći doprinos akumulaciji fenolnih jedinjenja 24 h nakon inokulacije kod osetljive linije imaju hlorogena, ferulična kiselina i eskulin, a kod otporne linije hlorogena kiselina i eskulin. Kod otporne linije postoji trend akumulacije skopoletina.

Da bi se naš model sistem mogao primeniti za tumačenje otpornosti suncokreta prema plamenjači, na osnovu sadržaja i sastava fenolnih jedinjenja, potrebno je ispitati promene sadržaja pojedinačnih fenolnih jedinjenja i u drugim vremenskim intervalima posle inokulacije biljaka.

Literatura

Brandle, V.F. and **O. Spring** (2003): Pathogen-induzierte Stressreaktionen der Sonnenblume. *Gesunde Pflanze* **55** (1): 21-27.

- Cabello-Hurtado, F., F. Durst, J.V. Jorriin** and **D. Werck-Reichhart** (1998): Coumarin in *Helianthus tuberosus*: Characterization, induced accumulation and biosynthesis. *Phytochemistry* 49: 1029-1036.
- Cerović, Z.G., A. Ounis, A. Cartelat, G. Latouche, Y. Goulas, S. Meyer** and **I. Moya** (2002): The use of chlorophyll fluorescence excitation spectra for the non-destructive *in situ* assessment of UV-absorbing compounds in leaves. *Plant, Cell & Environ.* 25: 1663-1676.
- Gutiérrez, M.C., R. Edwards, M. Tena, F. Cabello, K. Serghini** and **J. Jorriin** (1996): The production of coumarin phytoalexins in different plant organs of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *J. Plant Physiol.* 149: 261-266.
- Gutiérrez, M.C., A. Parry, M. Tena, J. Jorriin** and **R. Edwards** (1995): Abiotic elicitation of coumarin phytoalexins in sunflower. *Phytochemistry* 38: 1185-1191.
- Olson, M.M. and C. R. Roseland** (1991): Induction of the coumarins scopoletin and ayapin in sunflower by insect-feeding stress and effects of coumarins on the feeding on sunflower beetle (*Coleoptera: Chrysomelide*). *Environ. Entomol.* 20: 1166-1172.
- Panković, D., S. Jocić, N. Lačok, Z. Sakač** and **D. Škorić** (2004): The use of PCR-based markers in the evaluation of resistance to downy mildew in NS-breeding material. *Helia* 27 (40): 142-158.
- Prats, E., M. E. Bazzalo, A. Leon** and **J.V. Jorriin** (2003): Accumulation of soluble phenolic compounds in sunflower capitula correlates with resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Euphytica* 132: 321-329.
- Prats, E., M. E. Bazzalo, A. Leon** and **J.V. Jorriin** (2006): Fungitoxic effect of scopolin and related coumarins on *Sclerotinia sclerotiorum*. A way to overcome sunflower head rot. *Euphytica* 147: 451-460.
- Prats, E., D. Rubiales** and **J. Jorriin** (2002): Acibenzolar-S-methyl-induced resistance to sunflower rust (*Puccinia helianthi*) is associated with an enhancement of coumarins on foliar surface. *Phys. Mol. Plant Path.* 60: 155-162.
- Serghini, K., A. Perez de Luck, M. Castejon-Munoz, L. Garcia-Torres** and **J. V. Jorriin** (2001): Sunflower (*Helianthus annuus* L.) response to broomrape (*Orobancha cernua* Loefl.) parasitism: induced synthesis and excretion of 7-hydroxylated simple coumarins. *J. Exp. Bot.* 364: 2227-2234.
- Tal, B.** and **D. J. Robeson** (1986a): The induction by fungal inoculation of ayapin and scopoletin biosynthesis in *Helianthus annuus*. *Phytochemistry* 25: 77-79.
- Tal, B.** and **D. J. Robeson** (1986b): The metabolism of sunflower phytoalexins ayapin and scopoletin. Plant-fungus interaction. *Plant Physiol.* 82: 167-172
- Tourvieille de Labrouche, D., M. Ducher, J. Philippon, C. Meliala** and **P. Walser** (2000): Les methods d'analyse du mildiou. In: Le mildiou du tournesol, ed. CETIOM, INRA, Paris, France, pp. 53-56.

Primljeno: 18.06.2006.

Odobreno: 07.12.2006.

* *
*

Changes in the Content of Phenolic Compounds in Sunflower Leaves after Inoculation with the Causal Agent of Downy Mildew

- Original scientific paper -

Nataša RADOVANOVIĆ, Mira PUCAREVIĆ, Siniša JOCIĆ and
Dejana SAFTIĆ-PANKOVIĆ
Institute of Field and Vegetable Crops, Novi Sad

Summary

Two nearly isogenic lines of sunflower, resistant and susceptible to downy mildew, due to the presence/absence of the Pl6 gene, were used in this study. Inoculation with the suspension of *Plasmopara halstedii* zoospores, was done on the plants in the phase of first pair of leaves. In the samples taken from 2nd to 96th h after inoculation, content of phenolic compounds in methanolic extracts from frozen leaves were analysed (UV-VIS and HPLC analysis). A constitutive level of phenolic compounds, as well as, their accumulation after the inoculation were higher in the susceptible than in the resistant isogenic line. Chlorogenic, ferulic acid and esculin had the highest contribution to the phenolic compound accumulation 24 h after the inoculation in the susceptible line, while only the chlorogenic acid and esculin accumulated in the resistant line. Also, there was a trend of scopoletin accumulation in the resistant line.

Received: 18/06/2006

Accepted: 07/10/2006

Adresa autora:

Dejana SAFTIĆ-PANKOVIĆ

Naučni institut za ratarstvo i povrtarstvo

Maksima goprkog 30

21000 Novi Sad

Srbija

E-mail: dejanapa@ifvcns.ns.ac.yu