

ZAKLJUČNO POROČILO
O REZULTATIH OPRAVLJENEGA RAZISKOVALNEGA DELA
NA PROJEKTU V OKVIRU CILJNEGA RAZISKOVALNEGA
PROGRAMA (CRP) »KONKURENČNOST SLOVENIJE 2006 – 2013«

I. Predstavitev osnovnih podatkov raziskovalnega projekta

1. Naziv težišča v okviru CRP:

5. Povezovanje ukrepov za doseganje trajnostnega razvoja

2. Šifra projekta:

V4-0321

3. Naslov projekta:

Fenolni potencial lokalnih kultivarjev sliv in češenj

3. Naslov projekta

3.1. Naslov projekta v slovenskem jeziku:

Fenolni potencial lokalnih kultivarjev sliv in češenj

3.2. Naslov projekta v angleškem jeziku:

Phenol potential of local plum and sweet cherry cultivars

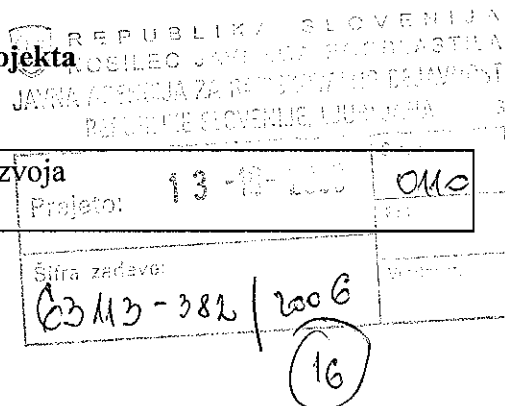
4. Ključne besede projekta

4.1. Ključne besede projekta v slovenskem jeziku:

Slive, češnje, borovnice, lokalne sorte, fenoli, biološka razpoložljivost, analize DNK

4.2. Ključne besede projekta v angleškem jeziku:

Plums, sweet cherries, blueberries, local cultivars, phenols, bioavailability, DNA analysis



5. Naziv nosilne raziskovalne organizacije:

Univerza v Novi Gorici

5.1. Seznam sodelujočih raziskovalnih organizacij (RO):

103 - Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo
1360 - Kmetijsko gozdarska zbornica Slovenije- Kmetijsko gozdarski zavod Nova Gorica
401 - Kmetijski inštitut Slovenije

6. Sofinancer/sofinancerji:

Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano

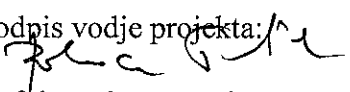
7. Šifra ter ime in priimek vodje projekta:

11539

Doc. dr. Polonca Trebše

Datum: 9.10.2008

Podpis vodje projekta:


prof.dr. Polonca Trebše

Podpis in žig izvajalca:


prof.dr. Danilo Zavrtanik

II. Vsebinska struktura zaključnega poročila o rezultatih raziskovalnega projekta v okviru CRP

1. Cilji projekta:

1.1. Ali so bili cilji projekta doseženi?

- a) v celoti
 b) delno
 c) ne

Če b) in c), je potrebna utemeljitev.

1.2. Ali so se cilji projekta med raziskavo spremenili?

- a) da
 b) ne

Če so se, je potrebna utemeljitev:

2. Vsebinsko poročilo o realizaciji predloženega programa dela¹:

PODPROJEKT 1: FENOLNI POTENCIAL LOKALNIH KULTIVARJEV SLIV IN ČEŠENJ

S predlaganim projektom smo želeli opraviti poglobljeno raziskavo konkurenčnih lastnosti lokalnih kultivarjev češenj in sliv s stališča vsebnosti in antioksidativne učinkovitosti značilnih fenolov. V prejšnjih raziskavah smo ugotovili, da lokalni kultivar češenj Petrovka iz Goriških Brd odlikuje dvakrat večja vsebnost fenolov antocijaninov kot komercialne kultivarje Bing, Stella Compact, Lambert in Napoleon. Vsebnost in antioksidativna učinkovitost fenolov selekcij sorte "Domača češplja" in večine lokalnih sort češenj (Tarčentka, Karnijevka, Vipavka, Kozanka, ipd.) še ni bila raziskana. Na podlagi dejstev o obrambni funkciji fenolov in daljši prisotnosti omenjenih kultivarjev na tem področju domnevamo da te češnje in slive vsebujejo velike količine fenolov. Literatura pravi, da imajo češnje in slive kot sadna vrsta velik antioksidativen potencial (kapacitivnost), ki je posledica fenolnih spojin kot so antocijanini ter hidroksicimetne kisline.

S kromatografsko analizo (reverzno fazna tekočinska kromatografija visoke ločljivosti v kombinaciji z detektorjem s serijo diod in masno spektrometrijo-RP-HPLC-DAD-MS) smo določili profil glavnih fenolov sliv in češenj in ga primerjali s profilom fenolov svetovno znanih kultivarjev sliv in češenj. Češnjam in slivam smo kromatografsko (HPLC-DAD) določili vsebnost glavnih predstavnikov fenolov (hidroksicimetne kisline, antocijani) in tudi njihove antioksidativne lastnosti (skupno), določali pa smo tudi antioksidativne lastnosti posameznih fenolov, ki so značilni za koščarje (razne fenolne kisline, klorogenska kislina). Na ta način smo dobili boljše informacije o kakovosti češenj in sliv. Vzoredno smo izvajali tudi pomološke analize opisa kultivarjev (videz, cvetenje) in druge fizikalno-kemijske analize kakovostnih parametrov plodov češenj in sliv (barva, vsebnost topne suhe snovi, vsebnost skupnih kislin).

REZULTATI PROJEKTA

V raziskavo smo zajeli 10 lokalnih sort češenj (Petrovka, Tarčentka, Karnijevka, Kraljica trga, Napoleonka, Vipavka, Popovka, Črna cepika, Francoska, Vigred in eno komercialno Van) ter 7 sort sliv (5 selekcij sort Domača Češplja: P-1, M-7, SA-10, R-8, P-3 ter sorti Stanly in Agen 707).

Fenole smo iz svežih plodov ekstrahirali z metanolom po naslednjem postopku: vzeli smo 40 g izkoščičenega mesa plodov in ga ekstrahirali z 80 mL ledeno mrzlega metanola 20 min (30 min za slive) pri sobni temperaturi. Tako ekstrakcijo smo na rastlinskem materialu sliv ponovili še 2-x (80 mL metanola, 30 min) in nato ekstrakte združili v skupen ekstrakt. Sama optimizacija metode ekstrakcije fenolov sliv je zahtevala, da analiziramo vsebnost antocijaninov in HCK v različnih stopnjah ekstrakcije sliv z metodo HPLC-DAD (Preglednica 1 v Prilogi 1), ki je bila razvita. Rezultati so pokazali, da se z enostopenjsko ekstrakcijo v povprečju ekstrahira 70 % antocijaninov in kar 90 % HCK, zato smo ekstrakcijo na istem materialu ponovili še dvakrat, da smo dobili celoten izplen. Vse pripravljene metanolne ekstrakte fenolov češenj in sliv smo skoncentrirali pri 35 °C

¹ Potrebno je napisati vsebinsko raziskovalno poročilo, kjer mora biti na kratko predstavljen program dela z raziskovalno hipotezo in metodološko-teoretičen opis raziskovanja pri njenem preverjanju ali zavračanju vključno s pridobljenimi rezultati projekta.

(vakuum, rotavapor) na 25 mL in tako pripravljene vzorčke shranili v zmrzovalniku na -25 °C do analiz, tako HPLC-DAD-MS kot tudi za celokupno antioksidativno učinkovitost (AO).

HPLC-DAD-MS analize so pokazale da, da se različni kultivarji češenj in sliv med seboj ne razlikujejo v vrsti posameznih fenolov, temveč le v njihovi količini. Zato kromatogramski zapis HPLC-DAD ločbe polifenolov češenj in sliv prikazujemo le na primeru češenj cv. Petrovka in sliv cv. Stanley na Sliki 1 v Prilogi 1 tega poročila. Ker smo polifenolne ekstrakte obeh sadnih vrst izpostavili enaki kromatografski ločbi (Preglednica 1, Priloga 1) predstavljamo oba kromatograma na isti Sliki 1 v Prilogi 1, kjer je zelo lepo vidno ujemanje nekaterih kromatografskih vrhov fenolov češenj ter sliv, kar kaže na to, da so v obeh sadnih vrstah prisotni enake HCK in nekateri antocianini, kar smo tudi pričakovali na podlagi podatkov iz literature. Še bolj smo svojo domnevo potrdili, ko smo omenjenim vrhovom izmerili enake UV-Vis spektre.

Kot je razvidno iz Slike 1 je HPLC-DAD ločba metanolnega ekstrakta češenj in sliv v prvem delu analize (od 0 do 30 minute) pokazala dva opaznejša kromatografska vrhova, označena s številko 1 in 2 (Slika 1, levo; 0-30 min) in enega manjšega, označenega s številko 3. Posneti DAD spektri v območju od 190-600 nm so pokazali izrazitejšo absorbanco pri 320 nm in nič absorbance v območju 520 nm, kar je bil za nas neizpodbiten dokaz, da gre za hidroksicimetne derivate 12. Na podlagi že poznanega HPLC-DAD profila fenolov na koloni C18 v češnjah 4 ter UV-Vis spektrov HCK smo sklepali da vrh 1 pripada neoklorogenski, vrh 2 3'-p-kumarilkini kislin, vrh 3 pa klorogenski kislini. Identiteto slednje smo lahko potrdili tudi s pomočjo standardne spojine. Na žalost za preostali dve HCK, ki sta prisotni tudi v večjih količinah v češnjah in slivah, standardni spojini nista tržno dostopni. V njunem primeru pa smo identiteto določil na podlagi masnih spektrov. Masna spektra kromatografskih vrhov 1 in 2 na sliki 1 sta prikazala ione z m/z razmerji 353, 179, 191 ter 337, 163, 191. Ti podatki so odgovarjali molskim masam neoklorogenske kisline (353) in njenima sestavnima deloma (kavna in kina kislina) ter molskim masam 3'-p-kumarilkine kisline (337) in njenima fragmentoma (p-kumarna kislina in kina kislina). Kromatografski vrhovi označeni s številkami 4-8 pri češnjah in trije vrhovi 4, 5 in 8 pri slivah, ki se nahajajo v drugi polovici kromatografske ločbe (Slika 1, 30-65 min na časovni skali) fenolnih ekstraktov pripadajo skupini antocianinov. Znano je, da samo to skupino polifenolov odlikuje absorbanca v območju med 500-530 nm valovne dolžine 12, kar je lepo razvidno na posnetih spektrih UV-Vis spektrih vseh 5 antocianinov češenj in 3 antocianinov sliv (teh podatkov ne prikazujemo). Na podlagi ujemanja z retencijskimi časi standardnih spojin, posnetih UV-Vis in masnih spektrov smo sklepali, da vrh 4 usteza cianidin-3-glukozidu (m/z razmerje 449), vrh 5 cianidin-3-rutinozidu (m/z razmerje 595) in vrh 6 peonidin-3-glukozidu (slednjega z masno analizo nismo uspeli potrdit, najverjetneje zaradi prenizkih koncentracij v primerjavi z ozadjem). Identiteto preostalih dveh vrhov (7 in 8) smo prepoznali na podlagi ujemanja naših rezultatov s starejšimi podatki iz naše baze o UV-vis karakteristikah in zaporedju elucije na RP-C18 koloni 4, 13, 14 in s podatki iz literature 10, 11 ter spektralnih karakteristike (UV-Vis in MS). Tako smo kromatografska vrhova 7 in 8 prepoznali kot pelargonidin-3-rutinozid (m/z razmerje 579) in peonidin-3-rutinozid (m/z razmerje 609).

Ponovljivost HPLC-DAD metode smo določili z 6-kratnim iniciranjem istega metanolnega ekstrakta češenj in istega metanolnega ekstrakta sliv. Površine spremljanih

kromatografskih vrhov so odstopale od 0,3 do 2 %.

Iz površin vseh določenih antocianinov pri kromatografski analizi smo s pomočjo eksterne kalibracije izračunali skupne antocianine in jih izrazili kot mg cianidin-3-rutinozida/kg sveže mase izkoščičenih (SM) češenj in sliv. Prav tako smo prispevek vseh treh določenih HCK izrazili kot skupne HCK in jih izrazili kot mg klorogenske kisline/kg SM češenj in sliv. Rezultate kvantifikacije predstavljamo na Sliki 2 in Sliki 3 v Prilogi 1 tega poročila.

Rezultati kažejo, da med češnjami po vsebnosti skupnih antocianinov izstopajo briški kultivarji kot so Petrovka, Karnijevka, Tarčentka in Črna Cepika (v povprečju 600 mg/kg SM), kar je 2- do 3-krat več jih je kot v ostalih kultivarjih, kot so Napoleonka, Francoska, Vigred, Van, Kraljica Trga in Vipavka. Kot so pokazale že naše pretekle raziskave, je bilo v tudi v izbranih kultivarjih češenj največ cianidin-3-rutinozida. V sezoni 2007 smo ga v vseh preiskanih sortah določili od 85 do 95 % glede na vse določene antocianine. Cianidin-3-glukozida je bilo mnogo manj, od 3-12 % glede na vse izmerjene antocianine. Ostali trije antocianini, peonidin-3-glukozid, peonidin-3-rutinozid in pelargonidin-3-rutinozid so bili prisotni v mnogo manjših koncentracijah, skupno so predstavljali 2-4 % določenih antocianinov (Preglednica 3, Priloga 1). Med sortami so vidne razlike v posameznem deležu antocianinov, vendar bi morali isti poskus ponoviti več let zaporedoma, da bi lahko te razlike tudi potrdili, da so genetsko pogojene.

Največ skupnih HCK smo določili v češnjah kultivarja Petrovka (800 mg/kg SM) medtem, ko smo v kultivarjih Tarčentka, Van, Napoleonka, Vigred in Vipavka pa od 550 mg/kg SM do 600 mg/kg SM. Najmanjše količine skupnih HCK smo določili v kultvarju Črna cepika (180 mg/kg SM). Kultivarji češenj so se razlikovali v razmerju neoklorogenske in 3'-p-kumarilkine kisline; od 0,42 pri kultvarju Tarčentka do 3,95 pri kultvarju Van. Podobna variranja tega parametra smo opazili v raziskavah prejšnjih let, vendar je večji vzorec sort pokazal, da imajo nekatere sorte podobno razmerje, zato le ni toliko primerno za razlikovanje med sortami, ko smo prvotno domnevali. Klorogenske kisline je bilo v češnjah najmanj, od vseh določenih HCK je predstavljala le 4-6 %.

Če primerjamo Sliko 2 in Sliko 3 v Prilogi 1 lahko vidimo, da se po naših podatkih v slivah nahaja manj HCK in antocianinov kot v češnjah. Največje količine HCK smo določili v tujih kultivarjih kot sta Stanley in Agen (400 mg/kg SM). Različne selekcije Domače češplje (M7, R8, P3, P1 in SA 10) vsebujejo nekoliko manjše koncentracije HCK in opazili smo, da se med seboj tudi razlikujejo po vsebnosti skupnih HCK (150-280 mg/kg SM). Antocianinov smo slivam določili od 16-94 mg/kg SM, pri čemer smo največje vsebnosti določili kultvarju Stanley. Različne selekcije Domače češplje so vsebovale od 28 do 86 mg/kg SM skupnih antocianinov. Kot že omenjeno, smo tako kot v češnjah tudi v slivah določili iste glavne HCK: neoklorogenske kisline je bilo največ, od 84-89 % glede na skupno vsoto HCK, 3'-p-kumarilkine kisline od 7-11 %, klorogenska kislina pa je tako kot v češnjah predstavljala najmanjši delež izmed vseh izmerjenih kislin, od 4-5 %. Večjih razlik v profilu HCK med različnimi kultivarji sliv, kot tudi ne med domačimi in tujimi nismo zasledili. Posamezne selekcije sorte Domača češplja se razlikujejo v količini HCK in antocianinov, vendar so vsebnosti teh fenolov glede na komercialne sorte kot sta Stanley in Agen 707 manjše.

V vseh kultivarjih sliv smo določili 3 antocianine, razen v sorti Agen 707 (svetlo rdeča kožica) (tudi zelo nizka vsebnost antocianinov (16 mg/kg SM) smo zaznali samo dva,

cianidin-3-rutinozid in peonidin-3-rutinozid, drugače v ostalih kultivarjih smo zaznali tudi cianidin-3-rutinozid, poleg prej naštetih. Določen profil antocijaninov se sklada z najnovejšimi podatki iz literature. Razlik v profilu antocijaninov med kultvarji ni bilo, tako znotraj selekcij, kot tudi glede na komercialne sorte. Glede na vse določene antocijanine je bilo v vseh preiskanih vzorcih cianidin-3-glukozida najmanj (2-3 %), sledil je cianidin-3-rutinozid (40-50 %) in nato peonidin-3-rutinozid (50-60 %), ki ga je bilo največ. Ti podatki so pomembni tudi v svetovnem nivoju, kjer le redke publikacije opisujejo profil HCK in antocijaninov v slivah. Zanimivo pa je, da so količine skupnih HCK v slivah v tej raziskavi tudi do 4 - krat večje, kot so opazili drugi (napr. za sorto Stanley), kar lahko pripišemo tudi različnim ekstrakcijskim metodam.

POMOLOŠKE RAZISKAVE so pokazale, da je bilo leto 2007, ko smo vzorčili svoje plodove je bilo zelo zgodno v smislu dozorevanja. Tako so zorele češnje 8 do 21 dni prej kot v letu 2006. Plodove z največjo povprečno maso plodov smo obrali z dreves sort Popovka, Petrovka in Francoska (9,3-9,1g), ki pa je bila v tem letu slabo obložena. Kljub nizkemu pridelku je sorta Vipavka imela zelo drobne plodove, saj je povprečna masa ploda znašala 5,8g. Drobne plodove (6,2-6,3 g) so imele še sorte Črna cepika, Vigred in Karnjevka. Srednje debele plodove je imela sorta Napoleonka (7,8g) in sorta Kraljica trga (8,0 g). Masa koščic se je gibala v korelaciji z maso ploda. Najbolj debelo koščico je imela sorta Popovka (0,58 g), ki je imela tudi največjo povprečno maso ploda, najbolj drobno koščico (0,32 g) pa sorta Vipavka. Glavnina sort je imelo povprečno maso koščice med 0,50-0,55 g. Največjo čvrstost parenhima je imela sorta Napoleonka (5,7N), najmanjšo pa sorta Vipavka (3,2 N). Ostale sorte so se vrednosti gibale od 5,3 do 4,2N. Sorta Napoleonka je imela visok delež suhe snovi (18,2 %) in hkrati najvišjo vsebnost skupnih kislin (9,18,7 mg/100g) v primerjavi z ostalimi sortami. Najnižji delež suhe snovi je imela sorta Petrovka (14,1%), vrednost skupnih kislin pa sorta Črna cepika (646,9 mg/100g).

Tudi zorenje sort sliv je bilo v letu 2007 precej zgodnejše kot v predhodnem letu. Najdebelejše plodove je imela standardna sorta Stanley (49,7 g), s 35,3 g povprečno maso ploda ji je sledila sorta Agen 707. Selekcije domače slive spadajo med drobnoplodne slive, zato je njihova masa ploda znašala od 20,0g (SA-10) do najdebelejše, ki je dosegla 24,5 g (P-1). Povprečna masa koščic se je gibala od 0,87 g pri selekciji SA-10 do 2,63 g pri sorti Stanley. Trdota plodov se je gibala od 32,2 N do 37,1 N z izjemo selekcije M-7, pri kateri je znašala čvrstost parenhima le 28,0 N. Zelo visoko vsebnost suhe snovi (19,0%) smo namerili pri selekciji M-7. Povprečana vsebnost suhe snovi je znašala od 16,1% do 16,7 %. Najnižja vrednost je bila izmerjena pri P-1 (12,2%). Največjo vsebnost skupnih kislin je bila dobljena pri selekciji SA-10 in je znašala 619,4 mg/100g vzorca.

ANTIOKSIDATIVNE LASTNOSTI FENOLOV ČEŠENJ IN SLIV:

V vzorcih fenolnih ekstraktov češenj in sliv smo določali tudi celokupne antioksidativne učinkovitost s hitro metodo, ki temelji na reakciji med luminolom in vodikovim peroksidom. Ob prisotnosti kovin prehoda (recimo Fe, Cu ali Co) vodikov peroksid oksidira luminol do aminoftalata, ki nastane v vzbujenem elektronskem stanju. Del energije ob prehodu v osnovno stanje se sprosti v obliki svetlobe, ki jo merimo. Reakcija najbolje poteka pri pH okrog 7, zato smo pri eksperimentih uporabljali boratni pufer s pH 7,4. Če je v raztopini poleg luminola prisotna še kakšna spojina, ki se prav tako lahko oksidira z vodikovim peroksidom (recimo antioksidanti kot so fenoli), ima to za posledico zmanjšanje signala svetlobe oksidacije luminola. Zaradi tega imajo umeritvene krivulje

negativen naklon (večja kot je koncentracija antioksidanta v sistemu, manjša je intenziteta izsevane svetlobe). Intenziteta izsevane svetlobe s časom pada, zato je pomembno, koliko časa preteče od trenutka, ko smo v sistem dodali vodikov peroksid do trenutka meritve. To smo rešili na način, da smo merili v večih časovnih intervalih, in sicer 30 s po dodatku peroksida, 60 s po dodatku peroksida, 90 in 120 s po dodatku peroksida. Za izračun smo uporabili umeritveno krivuljo po času, ki najbolj linearno opiše odvisnost med intenziteto svetlobe ter koncentracijo antioksidanta. Vse vrednosti so podane glede na galno kislino, ki smo jo uporabili kot modelni antioksidant (tako kot pri določanju celokupne vsebnosti fenolov z metodo Folin-Ciocalteu).

Rezultate določene celokupne antioksidativne učinkovitosti (AO) smo z linarno regresijo primerjali s kvantificiranimi skupnimi HCK in antocianini, da bi ugotovili povezavo med skupnimi antocianini in HCK ter določeno AO v ekstraktih. Najboljšo korelacijo smo dobili med določeno AO vrednostjo in skupnimi HCK (R vrednost 0,79, $P < 0,01$) v češnjah, kar nakazuje na to, da so HCK v izbranih kultivarjih češenj izjemno močni antioksidanti. Statistična analiza je pokazala, da antocianini češenj najverjetneje ne sodelujejo kot antioksidanti v takem sistemu kot smo ga uporabili v raziskavi, ker z linearno regresijo nismo uspeli zaznati povezave med AO in skupnimi antocianini.

Rezultati primerjave določene AO vrednosti in količine HCK in antocianinov v ekstraktih sliv so pokazali nekoliko slabšo korelacijo med AO in antocianini ($R = 0,52$, $P < 0,05$) in še slabšo pa med HCK in AO ($R = 0,22$, $P > 0,10$). Ti podatki niso v skladu z literaturo, ki navaja HCK sliv kot izjemno učinkovite antioksidante pri oksidaciji LDL in tudi kot lovilce radikalov. Antioksidativni učinek je odvisen tudi od sinergije posameznih fenolov, kar je tudi lahko razlog za slabo korelacijo AO s posameznimi skupinami fenolov. Kot vidimo na Sliki 3 v Prilogi 1 se določene antioksidativne učinkovitosti ne razlikujejo med posameznimi sortami sliv in so tudi primerljive z največjimi vrednostimi, ki smo jih določili v češnjah-obratno pa smo v slivah določili mnogo manjše koncentracije fenolov kot v češnjah. Metanolna ekstrakcija fenolov ni selektivna in možno je, da so pri antioksidativnem delovanju v sistemu z lumninolom in peroksidom delovali tudi drugi fenoli, ki jih v slivah nismo ovrednotili, vendar so v ekstraktih bili prisotni, kot bomo omenili kasneje in zato statistična analiza ni zaznala korelacije med količino antocianinov in HCK ter določeno AO vrednostjo.

Kot smo že navedli, se je pri profiliranju in ovrednotenju glavnih fenolov češenj in sliv izkazalo, da je količinsko izmed vseh fenolov v slivah in češnjah največ HCK, še posebej neoklorogenske kisline (izomera klorogenske kisline). Poleg teh HCK, so LC-MS analize pokazale, da se v češnjah in slivah nahajajo tudi epikatehin, katehin, galna kislina in kavna kislina (ki pa jih v okviru tega projekta nismo ovrednotili). Zato smo se pri študiranju antioksidativnih lastnosti posameznih fenolov, značilnih za koščičarje, usmerili v določanje antioksidativnih lastnosti naslednjih fenolov: klorogenske kisline, p -kumarne, kavne in ferulne kisline in tudi flavan-3-olov kot sta katehin in epikatehin ter hidroksibenzojskih kislin kot so vanilinska kislina, galna kislina in dihidroksibenzojska kislina.

Antioksidativno učinkovitost fenolnih spojin, ki jih najdemo v češnjah in slivah, smo raziskali v prisotnosti hidroksilnih radikalov, ki jih na preprost način dobimo z uporabo Fentonovega reagenta. Tako smo študirali kemijsko kinetiko reakcije posameznih antioksidantov s hidroksilnimi radikali v treh različnih reakcijskih mešanica. Obenem pa

smo to metodo prenesli tudi na realni vzorec, na ekstrakt češenj, kjer smo skušali določiti najbolj učinkovit antioksidant v češnjah v prisotnosti hidroksilnih radikalov in pri fizioloških pogojih s primerjavo konstante razpada posameznih antioksidantov. Za določitev sposobnosti lovljenja prostih radikalov smo uporabili tudi aromatsko hidroksilacijo v prisotnosti NPG. Večino meritev smo opravili na sistemih LC-MS/MS in HPLC.

Rezultati so pokazali, da ima ta najboljše antioksidativne lastnosti kavna kislina in katehin, kot slabše pa so se pokazale vanilinska, ferulna in p-kumarna kislina. Tudi klorogenska kislina se je izkazala kot dober antioksidant, opazili pa smo tudi, da nastaja pri oksidaciji klorogenske kisline s hidroksilnimi radikali razgradni produkt, ki verjetno še vedno uspešno lovi nastale radikale. Kot najboljši lovilec hidroksilnih radikalov se je izkazal katehin.

LC-MS analiza je pokazala, da je testni češnjev ekstrakt vseboval največ klorogenske kisline (najverjetneje je bila to neoklorogenska kislina, ki jo je v češnjah največ). V reakcijski mešanici z železom(III) smo ugotovili, da imata najvišjo konstantno reakcije razpada ravno klorogenska in kavna kislina, dobre antioksidativne lastnosti pa so pokazali tudi katehin, epikatehin in galna kislina.

PODPROJEKT 2:

ANTIOKSIDANTI GOZDNIH IN GOJENIH BOROVRTIC KOT PREVENTIVNI DODATEK K HRANI

V okviru projekta smo poglobili znanje o slovenskem avtohtonem jagodičju (borovnice – *Vaccinium myrtillus* L.) v primerjavi z ameriškimi gojenimi borovnicami (*Vaccinium corymbosum* L.). Na ta način želimo v slovenskem prostoru neposredno vplivati na povečanje interesa za uživanje in gojenje teh sadnih vrst, ki so ob ustrezni urejenosti trga ekonomsko zelo donosne. Jagodičje v svetu vse bolj pridobiva na veljavi kot pomemben del človekove zdrave prehrane. Vse pogosteje ga uporabljajo kot dodatek k prehrani in celo v terapevtske namene. V sklopu raziskovalnega projekta smo na osnovi morfologije rastlin, pomoloških lastnosti plodov in genetskih parametrov ugotovili diverziteto med posameznimi tipi naših avtohtonih in gojenih borovnic. Hkrati pa smo v borovnicah določili vsebnost skupnih polifenolov, skupnih antocianov. Na ta način smo določili njihovo prehransko vrednost glede na vsebnost antioksidantov. Določili smo tudi profil posameznih spojin iz skupine antocianov tako v divjih, kot v gojenih borovnicah. Profil je genetsko pogojena lastnost, ki smo jo primerjali z rezultati genetskih analiz.

PREDSTAVITEV RASTIŠČ IN ANALIZA MORFOLOŠKIH PARAMETROV RASTLIN

Na osnovi Gradiva za Atlas flore Slovenije (Jogan, 2001) smo odbrali devet območij, na katerih uspevajo gozdne borovnice (Gorenjska, Goričko, Javornik na Primorskem, Okolica Celja, Okolica Ljubljane, Osilnica, Pohorje, Pokljuka, Škofjeloško hribovje). Območja so enakomerno razpršena po celi Sloveniji. Borovnice zaradi ugodnih pedoloških in klimatskih razmer uspevajo povsod, z izjemo ravninskega dela Prekmurja, Bele krajine in obalno kraškega pasu na Primorskem. Na vsakem območju smo odbrali od 6 do 11 lokacij, ki so bile medsebojno oddaljene najmanj 2 km. Iz posamezne lokacije, ki

je merila vsaj 10 m² smo za genetske analize odbrali do 5 vzorcev na lokacijo, za analize prehranske vrednosti pa en vzorec na posamezno lokacijo. Ameriške borovnice sorte Bluecrop smo vzorčili v Kolekcijsko poskusnem nasadu Kmetijskega inštituta Slovenije na Drenovem griču na Ljubljanskem barju. Osnovne morfološke lastnosti rastlin smo spremljali na osnovi gradiva UPOV (International union for the protection of new plant varieties (*Vaccinium corymbosum* L., *Vaccinium myrtillus* L.)). Spremljali smo rast borovnic (pokončna, grmasta, plezajoča), višino (nizka, srednja, visoka), širino listov (ozek, srednji, širok), velikost cvetov (majhen, srednji, velik) intenzivnost cvetenja (zelo šibko, šibko, srednje, močno, zelo močno), pridelek (brez pridelka, majhen, srednji, visok, zelo visok), čas brstenja (zgodaj, srednje, pozno), začetek cvetenja (zelo zgodaj, zgodaj, srednje, pozno, zelo pozno) in čas zorenja (zelo zgodaj, zgodaj, srednje, pozno, zelo pozno).

Večina rastišč (85 %) je bila senčnih, kjer so borovnice uspevale kot podrast v smrekovo bukovih ali smrekovo kostanjevih gozdovih. Nekaj rastišč je bilo iz resav in grmišč (Habitatni tipi Slovenije, 2004). Ugotovili smo, da je bila rast borovnic na večini lokacij grmasta (40,4 %) ali plezajoča (40,4 %). Rastline so bile nizke (48,3%) ali srednje visoke (16,8 %). Listi so bili pri večini rastlin srednje široki (98 %). Cvetnega nastavka ni imelo 8 % rastlin. Majhno intenziteto cvetenja je imelo 55 % rastlin, srednjo pa 32,6 % rastlin. Brez pridelka je bilo kar 58,4 % rastlin, majhen pridelek pa 23,5 % rastlin. 56,7 % plodov je bilo srednje velikih, 27% pa majhnih. Začetek brstenja, cvetenja in zorenja je bil na vseh lokacijah zgoden, z izjemo ene lokacije na Pohorju, kjer je zorenje izrazito zaostajalo za ostalimi lokacijami. Izjeme so bile opažene še na Območju Osilnice, kjer je po obliki listov izstopalo eno rastišče. Po velikosti plodov sta izstopali rastišči v okolici Ljubljane in okolici Celja. Za omenjena odstopanja, razen širine listov na območju Osilnice, obstajajo razlage, ki so povezane z zunanji dejavniki ali tlemi na rastišču (založenost tal z hranili).

GENETSKE ANALIZE

Biotska raznovrstnost rastlin je nedvomno posledica ekoloških dejavnikov (klima, tla, lega). V raziskavi smo s pomočjo molekularnih metod ugotavljali raznovrstnost med avtohtonimi tipi borovnic. Naredili smo genetske analize v vzorcih mladih listov gozdnih borovnic. Genetske analize so bile narejene s pomočjo mikrosatelitskih markerjev. DNA smo izolirali iz mladih listov 378 vzorcev iz devetih območij, pri čemer smo za vsako območje vzeli med 28-52 vzorcev na 11 različnih lokacijah. Enajst mikrosatelitskih markerjev, ki so bili razviti za gojene ameriške borovnice, smo vključili v analizo. Od 11 markerjev, ki smo jih uporabili v analizi, je bilo 9 uporabnih, ker so bili polimorfni. Z uporabo prvih dveh markerjev (CA169F in Na824) nismo dobili razlik, namnoženi profili so bili monomorfni. Z markerji CA794F, Na800 in Na1040 smo namnožili več kot en alel. Ostalih šest markerjev (CA23F, CA112F, CA344F, VCC_12, VCC_J9 in VCC_K4) je visoko polimorfnih, saj smo z njihovo pomočjo namnožili od 4 (CA23F) do 27 (VCC_K4) alelov (na lokus). Teh šest markerjev smo uporabili za ugotavljanje genetske raznolikosti populacije gozdnih borovnic med regijami in znotraj preiskovanih regij v Sloveniji. Ugotovili smo, da se gozdne borovnice v Sloveniji lahko tretirajo kot ena populacija, saj je bila stopnja razlikovanja med regijami manj kot 5 %. Glavni del genetske raznolikosti (82 %) se nahaja znotraj lokacije (Priloga 2, Slika 1).

PREHRANSKA VREDNOST

Informacije o količini polifenolov ki jih ljudje zaužijemo so še vedno samo delne. V marcu 2003 so Američani začeli postavljati podatkovno bazo, v kateri objavljajo podatke o koncentraciji polifenolov v različnih živilih (USDA). Obstajajo podatkovne baze za vsebnost in profil polifenolnih spojin v divjih in tudi gojenih borovnicah. Naša skupina pa je prva v Sloveniji pridobila podatke o slovenskih borovnicah. Določili smo vsebnost skupnih polifenolov in skupnih antocianinov v divjih gozdnih borovnicah iz različnih slovenskih regij in jih primerjali z gojenimi ameriškimi borovnicami. Vzorci borovnic so bili pobrani v času zrelosti junija in julija 2007, zamrznjeni ter shranjeni na temperaturi -20 °C do ekstrakcije.

Razvili smo metodo ekstrakcije vzorcev in metodo čiščenja ekstraktov borovnic s pomočjo ekstrakcije na trdni fazi. Skupne polifenole in skupne antociane smo določili spektrofotometrično. Povprečna koncentracija skupnih polifenolov (izraženih kot galna kislina v g/kg borovnic) v slovenskih gozdnih borovnicah je 5,01 g/kg, v gojenih ameriških pa 1,79 g/kg (Priloga 2, Slika 2). Povprečna koncentracija skupnih antocianov (izraženih kot cianidin-3-glukozid v g/kg borovnic) v slovenskih gozdnih borovnicah je 10,95 g/kg, v gojenih ameriških pa 2,47 g/kg (Priloga 2, Slika 3). Kar je pomembno iz stališča Slovenije, je tudi ugotovitev, da povprečna koncentracija antocianov v slovenskih gozdnih borovnicah presega vrednosti antocianov v gozdnih borovnicah iz drugih držav, kjer poročajo o koncentracijah skupnih antocianov med 3,0 in 3,4 g/kg (izraženih kot cianidin-3-glukozid). Ugotovili smo, da slovenske gozdne borovnice vsebujejo precej več antocianov v primerjavi z gojenimi ameriškimi borovnicami in da predstavljajo pomemben vir antocianov za človeka.

Hkrati pa smo razvili in optimizirali HPLC/DAD metodo za določitev profila posameznih spojin antocianov v slovenskih gozdnih in ameriških gojenih borovnicah. Profil antocianov v borovnicah karakterizira sorto in je dopolnil rezultate genetskih analiz. V okviru rezultatov genetskih analiz smo ugotovili, da se naše avtohtone borovnice genetsko ne razlikujejo. Rezultate so potrdili tudi deleži posameznih antocianov v borovnicah, vzorčenih na različnih regijah. Deleži so med regijami zelo podobni, hkrati pa se bistveno razlikujejo od deležev posameznih antocianov v ameriških borovnicah (Priloga 2, Slika 4).

BIOLOŠKA RAZPOLOŽLJIVOST POLIFENOLOV BOROVNIC-ZDRAVSTVENA IZHODIŠČA

Problematika polifenolov je, da njihova biološka razpoložljivost in njihovi antioksidativni učinki v samem organizmu še vedno niso povsem poznani. Nadgradili smo študije učinkovitosti absorpcije antocianov v različne telesne organe. Ker se antociani na slovenskem in tujem trgu zelo veliko pojavljajo kot prehranska dopolnila (npr. Fitokaps borovnica, Visio balance-‘hrana za oči’, Blueberry-Eyebright, Koromanin™...), je študija farmakokinetike antocianov zelo pomembna. Ugotovili smo, da se antociani iz plazme po absorpciji koncentrirajo v ledvicah, medtem ko sicer vstopajo v jetra, vendar so v jetrih v ravnovesju s plazemsko koncentracijo (Vanzo s sod., 2008). Ledvica so izjemno pomemben organ za izločanje tako polifenolnih spojin, kot tudi zdravil; njihova hkratna uporaba lahko vpliva na farmakokinetiko zdravil (npr. plazemsko razpolovno dobo, bioučinkovitost itd).

3. Izkoriščanje dobljenih rezultatov:

3.1. Kakšen je potencialni pomen² rezultatov vašega raziskovalnega projekta za:

- a) odkritje novih znanstvenih spoznanj;
- b) izpopolnitev oziroma razširitev metodološkega instrumentarija;
- c) razvoj svojega temeljnega raziskovanja;
- d) razvoj drugih temeljnih znanosti;
- e) razvoj novih tehnologij in drugih razvojnih raziskav.

3.2. Označite s katerimi družbeno-ekonomskimi cilji (po metodologiji OECD-ja) sovpadajo rezultati vašega raziskovalnega projekta:

- a) razvoj kmetijstva, gozdarstva in ribolova - Vključuje RR, ki je v osnovi namenjen razvoju in podpori teh dejavnosti;
- b) pospeševanje industrijskega razvoja - vključuje RR, ki v osnovi podpira razvoj industrije, vključno s proizvodnjo, gradbeništvom, prodajo na debelo in drobno, restavracijami in hoteli, bančništvom, zavarovalnicami in drugimi gospodarskimi dejavnostmi;
- c) proizvodnja in racionalna izraba energije - vključuje RR-dejavnosti, ki so v funkciji dobave, proizvodnje, hranjenja in distribucije vseh oblik energije. V to skupino je treba vključiti tudi RR vodnih virov in nuklearne energije;
- d) razvoj infrastrukture - Ta skupina vključuje dve podskupini:
 - transport in telekomunikacije - Vključen je RR, ki je usmerjen v izboljšavo in povečanje varnosti prometnih sistemov, vključno z varnostjo v prometu;
 - prostorsko planiranje mest in podeželja - Vključen je RR, ki se nanaša na skupno načrtovanje mest in podeželja, boljše pogoje bivanja in izboljšave v okolju;
- e) nadzor in skrb za okolje - Vključuje RR, ki je usmerjen v ohranjanje fizičnega okolja. Zajema onesnaževanje zraka, voda, zemlje in spodnjih slojev, onesnaženje zaradi hrupa, odlaganja trdnih odpadkov in sevanja. Razdeljen je v dve skupini:
- f) zdravstveno varstvo (z izjemo onesnaževanja) - Vključuje RR - programe, ki so usmerjeni v varstvo in izboljšanje človekovega zdravja;
- g) družbeni razvoj in storitve - Vključuje RR, ki se nanaša na družbene in kulturne probleme;
- h) splošni napredek znanja - Ta skupina zajema RR, ki prispeva k splošnemu napredku znanja in ga ne moremo pripisati določenim ciljem;
- i) obramba - Vključuje RR, ki se v osnovi izvaja v vojaške namene, ne glede na njegovo vsebino, ali na možnost posredne civilne uporabe. Vključuje tudi varstvo (obrambo) pred naravnimi nesrečami.

² Označite lahko več odgovorov.

3.3. Kateri so **neposredni rezultati** vašega raziskovalnega projekta glede na zgoraj označen potencialni pomen in razvojne cilje?

FENOLNI POTENCIAL LOKALNIH KULTIVARJEV SLIV IN ČEŠENJ

Ovrednotili smo razlike v profilu in količini fenolov posameznih sort češenj in sliv ter prvič opisali količine fenolov v nekaterih sortah češenj in sliv značilnih za Slovenijo. Rezultati so pokazali, da poleg sorte Petrovka tudi druge domače sorte odlikujejo velike količine fenolov, tako antocianinov kot HCK, medtem ko selekcije sorte Domača češplja v povprečju odlikujejo manjše količine fenolov kot komercialne sorte sliv.

Ugotovili smo, da se tudi selekcije Domače češplje med seboj razlikujejo v količini glavnih fenolov HCK in antocianinov. Na podlagi naših rezultatov bi lahko v kmetijstvu pospeševali ohranjanje sort, ki imajo več fenolov, ker je to pomembno za prepoznavnost Slovenije. Plodovi sliv selekcij Domača češplja imajo majhne plodove, vendar smo največjo suho snov določili selekciji poimenovani M-7, ki je izmed vseh selekcij vsebovala največ HCK in antocianinov, pa tudi antioksidativna učinkovitost celokupnega fenolnega ekstrakta je bila zelo velika, primerljiva z največjo, določeno pri češnjah.

Z metodami določanja antioksidativne učinkovitosti posameznih fenolov in skupnega ekstrakta smo pokazali, da so HCK (predvsem neoklorogenska kislina), glavni fenoli koščičarjev kot so češnje in slive, zelo dobri lovileci prostih radikalov in antioksidanti. Primerjava določenih antioksidativnih vrednosti ekstrakta fenolov sliv in češenj je pokazala, da so v slivah verjetno prisotni tudi drugi fenoli, kot sta epikatehin in katehin, ki verjetno sodelujejo pri antioksidativnem učinku, ki smo ga določili z našo metodo.

Razvili smo nove analitske metode za ovrednotenje antioksidantov v češnjah in slivah, ki bodo omogočale spremljanje vsebnosti fenolov češenj in sliv tudi v bodoče, kajti za pravo sliko o fenolnem potencialu je potrebna večletna spremljava zaradi sezonske variabilnosti fenolov.

ANTIOKSIDANTI GOZDNIH IN GOJENIH BOROVIKOT KOT PREVENTIVNI DODATEK V ZDRAVI PREHRANI

Ovrednotili smo morfološke in pomološke razlike med posameznimi populacijami gozdnih borovnic. Z omenjeno raziskavo smo ugotovili razlike v vsebnosti antioksidantov polifenolov med populacijami gozdnih borovnic znotraj populacij razširjenih v Sloveniji. Rezultate smo primerjali s standardno sorto gojenih ameriških borovnic. Tako smo ovrednotili prehransko vrednost borovnic slovenskega izvora.

Z analizo DNA posameznih tipov in sort smo ugotovili gensko strukturo in razlike med njimi. Ugotovili smo, da so naše gozdne borovnice gensko precej homogene.

Razvili smo nove analitske metode za ovrednotenje antioksidantov v borovnicah, ki bodo omogočile spremljanje vsebnosti polifenolov tudi v bodoče.

3.4. Kakšni so lahko **dolgoročni rezultati** vašega raziskovalnega projekta glede na zgoraj označen potencialni pomen in razvojne cilje?

Začeli smo z vzpostavitvijo monitoringa, ki bo omogočil pridobitev natančne podatkovne baze agronomskih parametrov skupaj s prehranskimi vrednostmi za različne tipe borovnic, češenj in sliv, ki so značilne za Slovenijo. Na ta način lahko vplivamo na prehranjevalne navade ljudi in ustvarimo podatkovno zbirko za razvoj funkcionalne hrane in prehranskih dodatkov.

S podatki o vsebnosti antioksidantov fenolov in njihovih antioksidativnih lastnosti smo opisali prehransko vrednost izbranih lokalnih kultivarjev češenj in sliv in na ta način podprli njihovo trženje. Dolgoročno bi lahko z ustrezno predstavitvijo rezultatov kmetom

lahko vzpodbudili vračanje lokalnih kultivarjev v sadovnjake in s tem ohranjanje krajinskih značilnosti Slovenije. Pomenili pa bi tudi dopolnilno ponudbo slovenskih avtohtonih pridelkov, kar bi pripomoglo k prepoznavnosti in večji konkurenčnosti Slovenije v Evropskem in svetovnem pogledu.

Odpira se velika možnosti preventivne in terapevtske uporabe ekstraktov borovnic tudi v Sloveniji. Iz tega razloga je potrebno klasificirati slovenske tipe borovnic, na način, kot ga imajo države članice EU. Rezultate bodo lahko uporabili z namenom promoviranja proizvodov ter za izdelavo brošur oz. tehničnih tabel, ki jih bodo lahko uporabili v promociji tako na slovenskem, kot tudi na tujem trgu.

Pričakovani rezultati obeh podprojektov so in bodo diseminirani v strokovnih publikacijah in v znanstvenih publikacijah z mednarodnim faktorjem vpliva.

Raziskovalno delo v predlaganem projektu se pokriva s cilji Evropske unije, kjer sta zdravje in varna hrana eni izmed glavnih smernic. Iz tega razloga bodo rezultati pomembni tudi za boljšo konkurenčnost Slovenije v EU.

3.5. Kje obstaja verjetnost, da bodo vaša znanstvena spoznanja deležna zaznavnega odziva?

- a) v domačih znanstvenih krogih;
- b) v mednarodnih znanstvenih krogih;
- c) pri domačih uporabnikih;
- d) pri mednarodnih uporabnikih.

3.6. Kdo (poleg sofinancerjev) že izraža interes po vaših spoznanjih oziroma rezultatih?

Prehrambena in farmacevtska industrija (Fructal, Lek, Krka), Svetovalna služba KGZS

3.7. Število diplomantov, magistrov in doktorjev, ki so zaključili študij z vključenostjo v raziskovalni projekt?

1 diplomant

4. Sodelovanje z tujimi partnerji:

4.1. Navedite število in obliko formalnega raziskovalnega sodelovanja s tujimi raziskovalnimi inštitucijami.

Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Trieste, via L. Giorgeri 1, 34127 Trieste, Italy. Bilateralni raziskovalni projekt BI-IT/05-08-031.

4.2. Kakšni so rezultati tovrstnega sodelovanja?

Skupno raziskovalno delo na področju določanja polifenolov v hrani in njihove biološke razpoložljivosti. Objava skupnih znanstvenih publikacij s faktorjem vpliva.

5. Bibliografski rezultati³ :

Za vodjo projekta in ostale raziskovalce v projektni skupini priložite bibliografske izpise za obdobje zadnjih treh let iz COBISS-a) oz. za medicinske vede iz Inštituta za biomedicinsko informatiko. Na bibliografskih izpisih označite tista dela, ki so nastala v okviru pričujočega projekta.

³ Bibliografijo raziskovalcev si lahko natisnete sami iz spletne strani:<http://www.izum.si/>

6. Druge reference⁴ vodje projekta in ostalih raziskovalcev, ki izhajajo iz raziskovalnega projekta:

PUBLIKACIJE, NASTALE V OKVIRU PROJEKTA:

Podprojekt 1:

Strokovni članek

MOZETIČ, B., FAJT, N., KOČAR, D., TREBŠE, P. Češnje kot vir zdravja. Sad (Krško), let. 19, št. 7/8, str. 3-4. [COBISS.SI-ID 921595]

Prispevek na konferenci v obliki predavanja:

MOZETIČ, B., FAJT, N., KOMEL, E., KOČAR, D., STRLIČ, M., TREBŠE, P. Določanje vsebnosti fenolov v slivah in češnjah = Determination of plums and sweet cherry phenols. V: GLAVIČ, Peter (ur.), BRODNJAK-VONČINA, Darinka (ur.). Slovenski kemijski dnevi 2008, Maribor, 25. in 26. september 2008 : [zbornik referatov]. Maribor: Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 2008, str. 1-8. [COBISS.SI-ID 959227]

Mentor diplomskega dela dr. Strlič Matija:

KRIVEC, Aleksandra. Določitev pomembnejših fenolnih antioksidantov v češnjah in njihova učinkovitost : diplomsko delo. Ljubljana: [A. Krivec], 2007. 49 f., tabele, graf. prikazi. [COBISS.SI-ID 28966405]

Predavanje na tuji univerzi:

KOČAR, Drago. Determination of antioxidants and biogenic amines by LC-MS-MS : [Karadeniz Technical University, Trabzon, Turkey, 3. 10. 2008]. Trabzon, 2008. [COBISS.SI-ID 29862149]

Članek v pripravi: MOZETIČ, Branka, FAJT, Nikita, KOMEL, Erika, KOČAR, Drago, STRLIČ, Matija, TREBŠE, Polonca. Polyphenol diversity of local sweet cherry and plum cultivars from Slovenia

Podprojekt 2:

Može Š., Koron D., Vanzo A. 2008. Antocianini v slovenskih gozdnih borovnicah. Slovenski kemijski dnevi 2008, Maribor, 25 in 26. september 2008.

Rezultate o vsebnosti antocianov v slovenskih borovnicah smo prvič javno predstavili na Slovenskih kemijskih dnevih v Mariboru.

Članek: Vanzo A, Terdoslavich M, Brandoni A, Torres AM, Vrhovsek U, Passamonti S. Uptake of Grape Anthocyanins into the Rat Kidney and the Involvement of Bilirubin Translocase. Mol Nutr. & Food Res 2008; on-line published Manuscript.

V objavi smo navedli, da so doseženi rezultati nastali v okviru tega raziskovalnega projekta in da je za njegovo izvajanje zagotovil sredstva financer.

⁴ Navedite tudi druge raziskovalne rezultate iz obdobja financiranja vašega projekta, ki niso zajeti v bibliografske izpise, zlasti pa tiste, ki se nanašajo na prenos znanja in tehnologije.

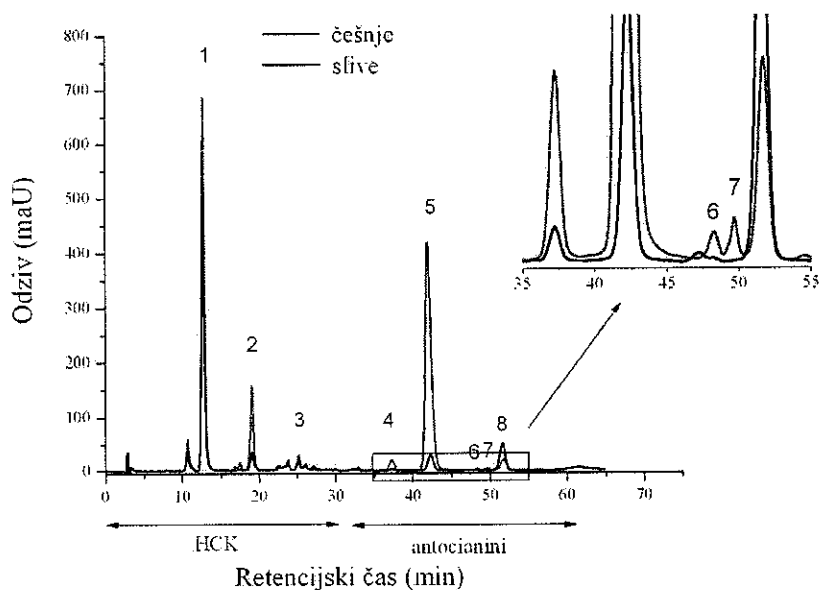
Navedite tudi podatke o vseh javnih in drugih predstavitev projekta in njegovih rezultatov vključno s predstavitvami, ki so bile organizirane izključno za naročnika/naročnike projekta.

PUBLIKACIJE V PRIPRAVI: (v objavah bomo navedli, da so doseženi rezultati nastali v okviru tega raziskovalnega projekta in da je za njegovo izvajanje zagotovil sredstva financer):

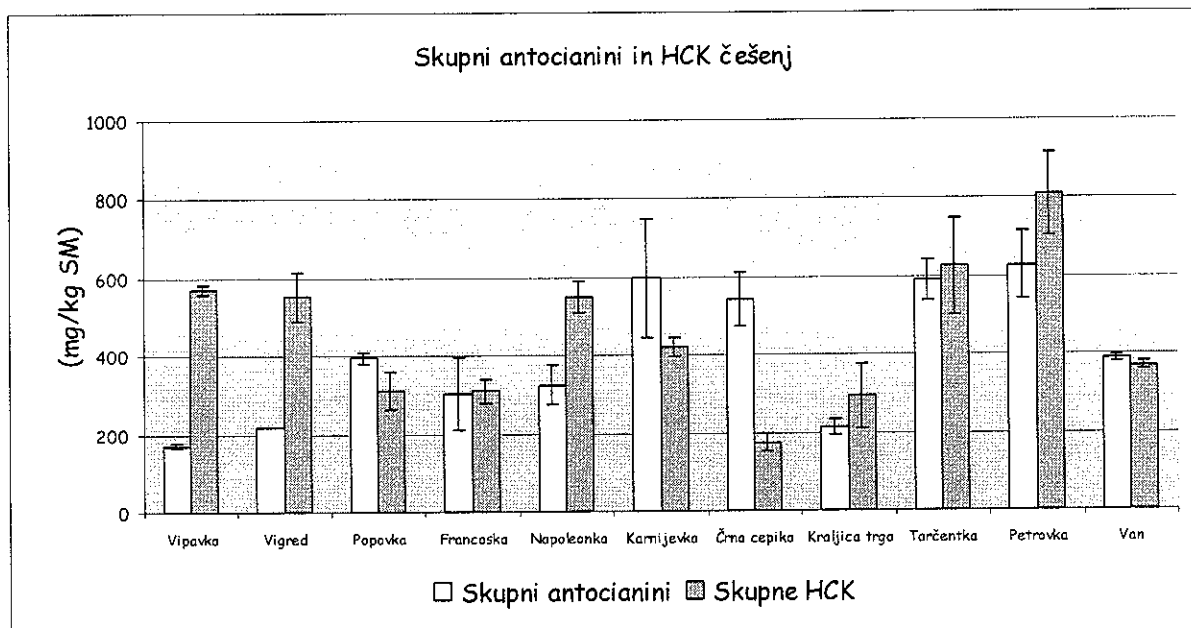
A1-članek: Tatjana Kavar, Vladimir Meglič, Andreja Vanzo and Darinka Koron. Genetic diversity and natural population structure of bilberry from Slovenia.

A1-članek: Andreja Vanzo, Špela Može, Tatjana Kavar and Darinka Koron. Anthocyanins in Slovenian Bilberries.

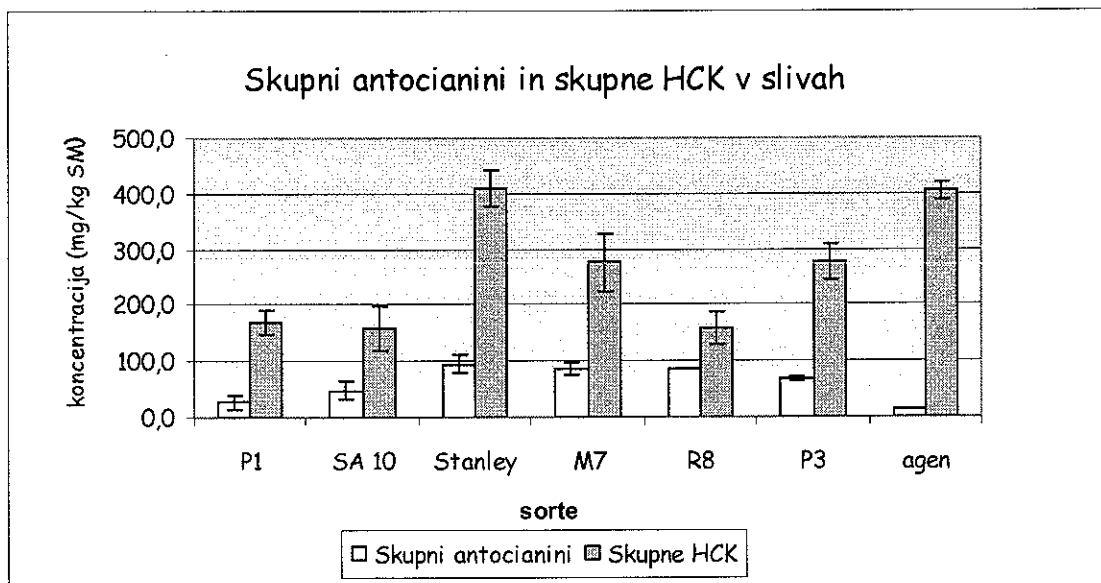
PRILOGA 1:



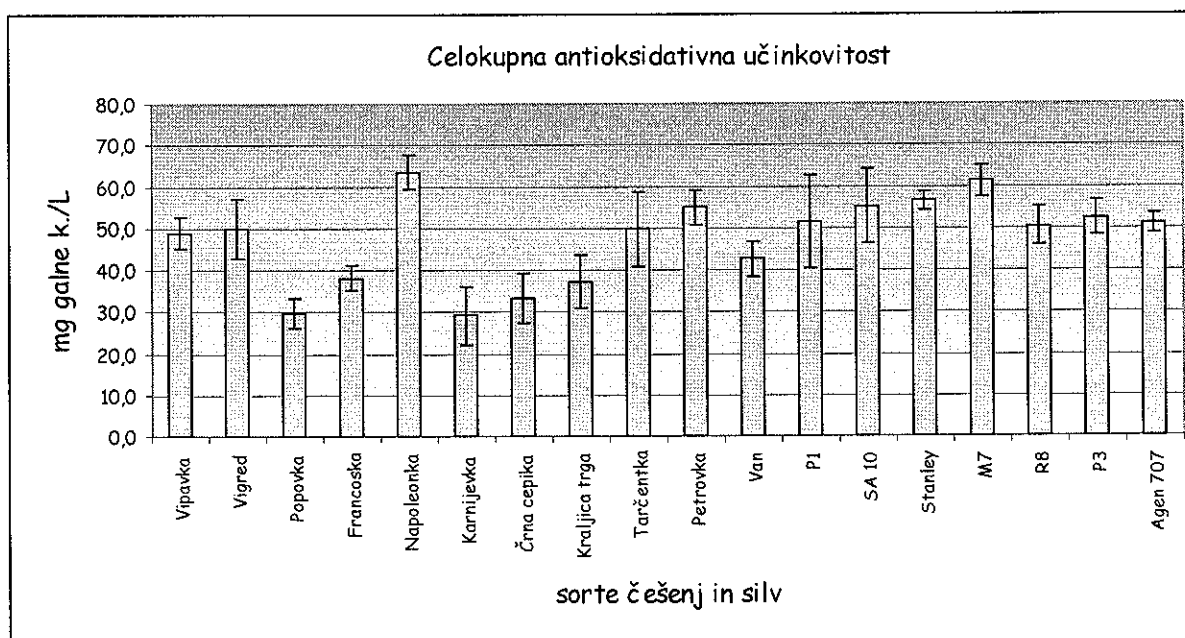
Slika 1: HPLC-DAD ločba metanolnega ekstrakta polifenolov češenj in sliv, spremljana pri 320 nm (0-30 min kromatografske analize) in 520 nm (30-65 min kromatografske analize). Številke označujejo naslednje spojine: 1: neoklorogenska kislina; 2: 3'-*p*-kumarilkina kislina; 3: klorogenska kislina; 4: cianidin-3-glukozid; 5: cianidin-3-rutinozid; 6: peonidin-3-glukozid; 7: pelargonidin-3-rutinozid; 8: peonidin-3-rutinozid.



Slika 2: Skupni antocianini (kot mg cianidin-3-rutinozida/kg SM) in skupne HCK različnih kultivarjev češenj (kot mg klorogenske kisline/kg SM) (povprečne vrednosti in SD, N = 3).



Slika 2: Skupni antocianini (kot mg cianidin-3-rutinozida/kg SM) in skupne HCK različnih kultivarjev sliv (kot mg klorogenske kisline/kg SM) (povprečne vrednosti in SD, N = 3).



Slika 3: Rezultati določanja celokupne AO v ekstraktih fenolov češenj in sliv v mg GALNE KISLINE/L (povprečne vrednosti in SD, N = 3).

Preglednica 1: HPLC-DAD analitski pogoji določanja antocianinov in HCK v češnjah in slivah.

Inštrument	HP 1100
Kolona	Luna Phenomenex C18 (150 x 2 mm, 3µm)
Pretok	0,15 ml/min
Volumen iniciranja	10 µL
Detekcija	DAD, 320 nm in 520 nm
Mobilna faza	A = metanojska kislina v vodi 2,2 %; B = metanol HPLC grade
Temperatura	25°C
Gradientna ločba	0 min (12 % B), 15 min (20 % B), 35 min (27 % B), 50 min (35 % B), 52-65 min (12 % B)

Preglednica 2: Sestava antocianinov in HCK sliv (N = 3).

	v % glede na vse določene antocianine						
	P1	SA 10	Stanley	M7	R8	P3	agen 707
cianidin-3-glukozid	4,7%	4,7%	2,0%	4,8%	4,5%	6,0%	nd
cianidin-3-rutinozid	32,8%	32,8%	46,8%	38,1%	38,2%	40,5%	52,7%
peonidin-3-rutinozid	62,5%	62,5%	51,3%	57,1%	57,3%	53,5%	47,3%

	v % glede na vse določene HCK						
	P1	SA 10	Stanley	M7	R8	P3	agen 707
neoklorogenska	85,1%	85,1%	87,1%	87,2%	83,7%	86,7%	88,9%
3'- <i>p</i> -kumarilkina	8,9%	8,9%	8,6%	7,4%	11,0%	8,8%	6,7%
klorogenska	6,0%	6,0%	4,3%	5,4%	5,3%	4,5%	4,4%
neoklorogenska/3- <i>p</i> -kumarilkina	9,20	9,20	10,36	11,97	7,66	9,84	13,45

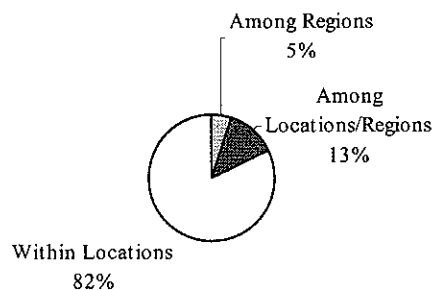
Preglednica 3: Sestava antocianinov in HCK česenj (N = 3).

	v % glede na vse določene antocianine										
	Vigred	Vipavka	Popovka	Francoska	Napoleonka	Karnijevka	Črna cepika	Kraljica trga	Tarčentka	Petrovka	Van
Cianidin-3-glukozid	2,7%	4,7%	7,8%	7,0%	6,6%	10,4%	6,4%	6,4%	8,7%	11,9%	4,5%
Cianidin-3-rutinozid	96,1%	92,5%	90,5%	91,3%	87,8%	84,8%	88,1%	91,7%	89,9%	86,5%	90,0%
Peonidin-3-glukozid	nd.	0,6%	0,5%	0,5%	0,7%	0,6%	0,4%	0,5%	0,3%	0,4%	0,4%
Pelargonidin-3-	0,5%	0,5%	0,3%	0,4%	0,6%	0,4%	0,6%	0,4%	0,4%	0,5%	0,6%
Peonidin-3-rutinozid	0,7%	1,7%	0,9%	0,9%	4,4%	3,9%	4,5%	1,0%	0,8%	0,6%	4,5%

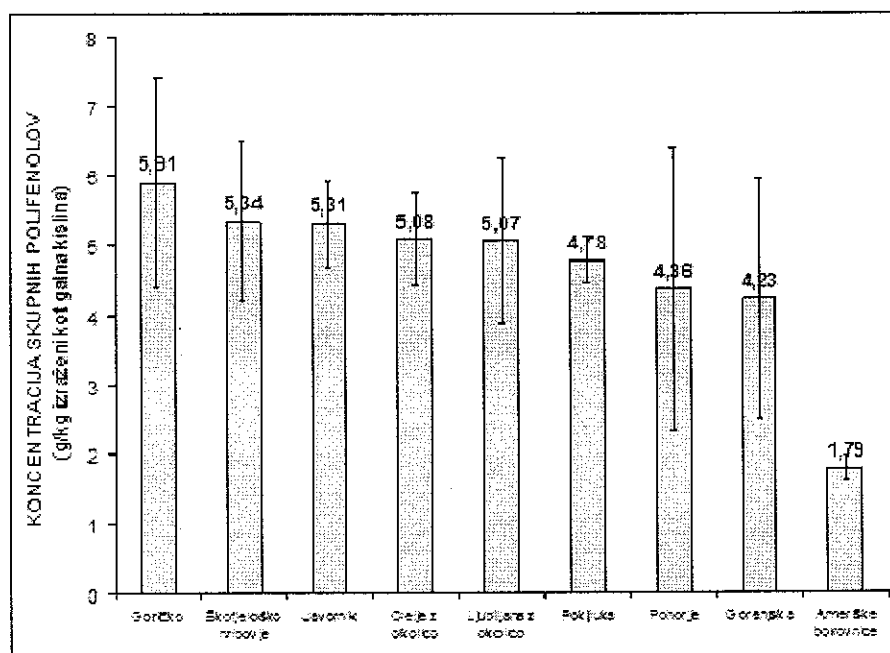
	v % glede na vse določene HCK										
	Vigred	Vipavka	Popovka	Francoska	Napoleonka	Karnijevka	Črna cepika	Kraljica trga	Tarčentka	Petrovka	Van
neoklorogenska	33,3%	39,4%	33,3%	30,0%	30,2%	28,8%	41,3%	29,5%	27,8%	73,8%	73,9%
3'- <i>p</i> -kumarilkina	62,2%	55,0%	60,6%	65,1%	65,2%	66,1%	53,4%	65,2%	67,0%	22,5%	21,5%
klorogenska	4,6%	5,7%	6,0%	4,9%	4,6%	5,0%	5,4%	5,3%	5,2%	3,7%	4,5%
neoklorogenska/3- <i>p</i> -kumarilkina	0,53	0,72	0,55	0,46	0,46	0,44	0,77	0,45	0,42	3,28	3,43

PRILOGA 2:

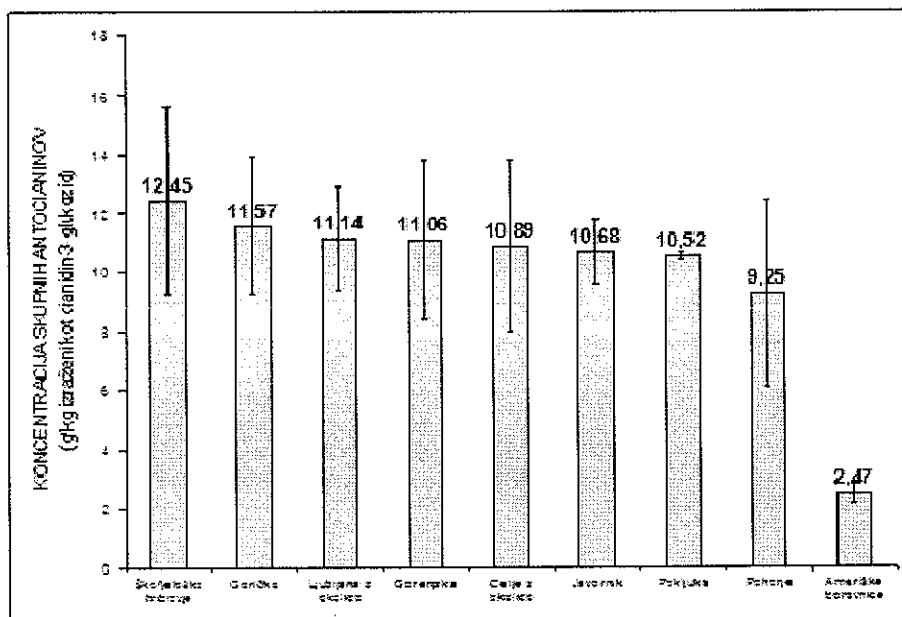
Percentages of Molecular Variance



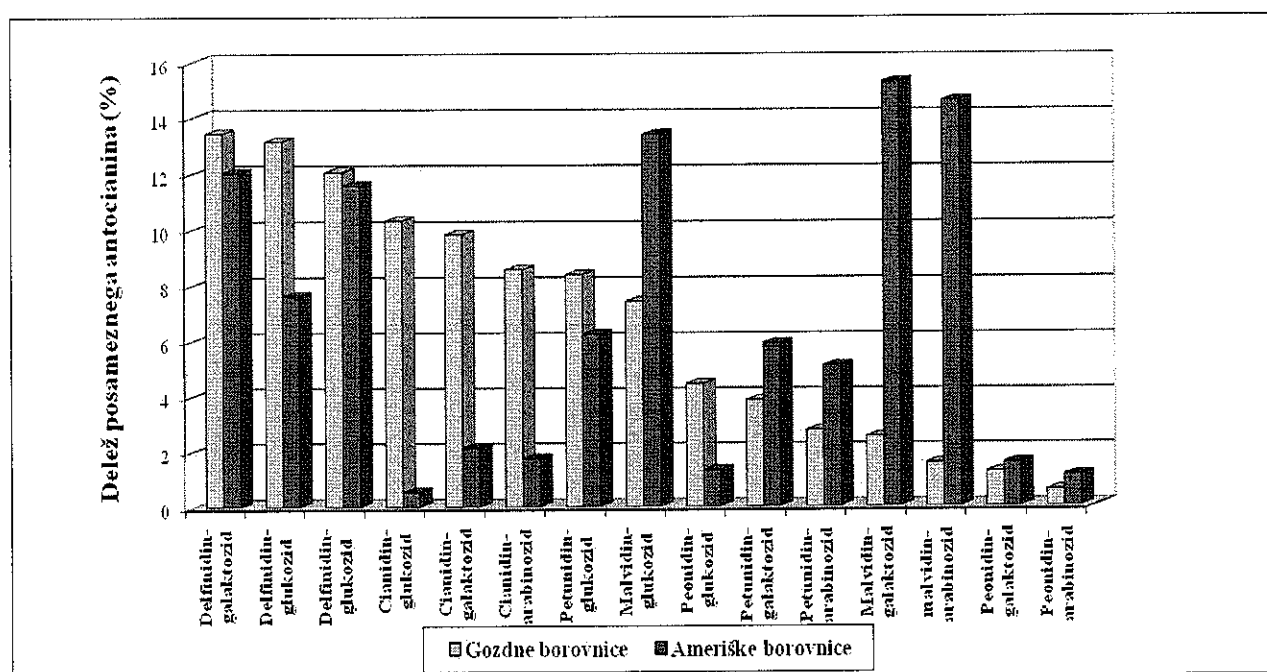
Slika 1: Rezultati analize varianc molekularnih podatkov (AMOVA) v odstotkih.



Slika 2: Povprečne koncentracije skupnih polifenolov v slovenskih gozdnih borovnicah (8 rastišč) in v gojenih ameriških borovnicah.



Slika 3: Povprečne koncentracije skupnih antocianov v slovenskih gozdnih borovnicah (8 rastišč) in v gojenih ameriških borovnicah.



Slika 4: Delež (profil) posameznih antocianov v gozdnih in v ameriških borovnicah v odstotkih.