ISSN 1311-0489 (Print)
ISSN 2367-8364 (Online)

Agricultural Academy

JOURNAL OF MOUNTAIN AGRICULTURE ON THE BALKANS

Volume 22

Number 3, 2019

Published by
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture
Troyan, Bulgaria

AGRICULTURAL ACADEMY, SOFIA, BULGARIA

JOURNAL OF MOUNTAIN AGRICULTURE ON THE BALKANS (JMAB)®

ISSN 1311-0489 (Print); ISSN 2367-8364 (Online)

JOURNAL OF MOUNTAIN AGRICULTURE ON THE BALKANS is a bilingual journal issued six times a year by the Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture (RIMSA) in Troyan, Bulgaria. Its scope includes basic and applied researches relevant to agriculture and stockbreeding in the mountain, hilly and lowland areas in Bulgaria and abroad. JMAB is an international free open access web based scientific journal dedicated to the publication and discussion of high-quality research in the field of Stockbreeding, Forage Production and Grassland Management, Annual and Perennial Plants and General Agriculture. It publishes original scientific papers, overviews and short communications which are doubleblind peer reviewed.

For contributions and subscription information, please contact the Editorial Office:
RIMSA, 281, Vasil Levski Str.
5600 Troyan, Lovech District
Bulgaria
Tel.: +359/670/66914
Mobile: +359/877/743604
E-mail: jma@mail.bg
Website: http://www.rimsa.eu/index.php/journal

ISSN 1311-0489 (Print)
ISSN 2367-8364 (Online)

Agricultural Academy

JOURNAL

OF MOUNTAIN AGRICULTURE

ON THE BALKANS

Volume 22

Number 3, 2019

Published by
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture
Troyan, Bulgaria

Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2019, 22 (3), 132-148 ISSN 1311-0489 (Print)
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan ISSN 2367-8364 (Online)

Влияние на нова технология на отглеждане върху антиоксидантния капацитет и фенолното съдържание на къпина "Чачанска Бестрна"

Жаклина Караклаич-Стаич*, Йелена Томич, Марияна Пешакович, Светлана М. Паунович, Борис Рилак, Мира Милинкович

Изследователски институт по овощарство, Чачак, Република Сърбия

Influence of a New Growing Technology on Antioxidant Capacity and Phenolic Composition of Blackberry 'Čačanska Bestrna'

Žaklina Karaklajić-Stajić*, Jelena Tomić, Marijana Pešaković, Svetlana M. Paunović, Boris Rilak, Mira Milinković

Fruit Research Institute, Čačak, Republic of Serbia
**E-mail: zaklinaks@yahoo.com*

Original scientific paper

Received: 16.04.2019 *Accepted:* 30.05.2019 *Published:* 05.09.2019

РЕЗЮМЕ

Изследването е проведено в къпиново насаждение от "Чачанска Бестрна", създадено по интензивна технология на отглеждане, т.е. с предварително оформени двускатови стрехи (съоръжение за отглеждане под покритие). Като се има предвид, че добивът на сръбски къпини претърпява годишна загуба от около 30% поради сиво гниене причинено от фитопатогенни гъби *Botrytis cinerea* Pers., въвеждането на по-интензивна система за отглеждане е наложително за да се предотврати неблагоприятното въздействие на дъжда и други абиотични фактори, като по този начин се осигури непрекъснат добив и предлагане на плодове с по-добро качество. Тази технология на отглеждане благоприятства по-голямо количество висококачествени плодове, т.е. предотвратява сивото гниене и в

SUMMARY

The investigation was conducted in a 'Čačanska bestrna' blackberry orchard set up using the intensive cultivation technology, i.e. with pre-formed double-sloping eaves (rain-shield).

Considering that the Serbian blackberry yield suffers an annual loss of around 30% due to gray mould caused by the phytopathogenic fungi *Botrytis cinerea* Pers., introduction of more intensive blackberry cultivation systems is imperative in order to prevent adverse action of rain and other abiotic components, thus securing continuous harvest and supply of improved-quality fruits.

This cultivation technology contributes to a higher content of high-quality fruits, i.e. prevention of gray mould, while at the same time securing continual harvesting, същото време осигурява непрекъсната реколта, независимо от условията на околната среда.

Всяка проба от къпините е изследвана за фенолни киселини (протокатехинова, 4-хидроксибензоена, ванилова, елагинова, галова, р-кумаринова, кафеена и ферулова киселини), флавоноиди (кверцетин), антоцианидини (цианидин), общи феноли, общи антоцианини и тролокс еквивалентен антиоксидантен капацитет. Анализът е проведен чрез високоефективна течна хроматография (HPLC) и спектрофотометрични техники. По отношение на установените фенолни съединения, къпините, отглеждани под покритие, отбелязват по-високи стойности на тези компоненти, с изключение на елагиновата киселина. Значително по-висока стойност на общите феноли и общи антоцианини е отчетена в къпини, отглеждани под покритие - 396.44 и 75.85 mg/100 g FW. Не е установено значимо въздействие от интензивната технология на отглеждане върху общия антиоксидантен капацитет, като той варира от 2.68 до 2.70 Тролокс mmol/100 g FW.

Ключови думи: къпини, методи за отглеждане, фенолни киселини, антиоксидантен капацитет

regardless of the environmental conditions.

Each blackberry sample was analysed for phenolic acids (protocatechuic, 4-hydroxybenzoic, vanillic, ellagic, gallic, *p*-coumaric, caffeic, and ferulic acids), flavonoids (quercetin), anthocyanidins (cyanidin), total phenolics, total anthocyanins, and Trolox-equivalent antioxidant capacity. The analysis was conducted using high-performance liquid chromatography (HPLC) and spectrophotometric techniques.

Regarding the identified phenolic compounds, the blackberries grown under the rain-shield recorded higher values of these components, with the exception of the ellagic acid. Significant higher value of the total phenolic and total anthocyanin content recorded in blackberries grown using the rain-shield was 396.44 and 75.85 mg/100 g FW. There was not significant effect of intensive growing technology on total antioxidant capacity in blackberries and ranged from 2.68 to 2.70 Trolox mmol/100 g FW.

Key words: blackberries, cultivation techniques, phenolic acids, antioxidant capacity

УВОД

Благодарение на своите качества, ягодоплодните култури (напр. боровинки, къпини и ягоди) са известни като "супер плодове" в продоволствената и търговска мрежа (Ding et al., 2006; Tulipani et al., 2008). Благодарение на специфичния характер на наличните фитохимикали, ниска калоричност и високо съдържание на фибри и основни микроелементи, плодовете притежават антиоксидантни качества, които спомагат за облекчаване на неблагоприятните ефекти от оксидативния стрес в клетките на организма, като по този начин намаляват риска от хронични заболявания.

INTRODUCTION

Berries (e.g., blueberry, blackberry, and strawberry) are well known as ‘super fruits’ for their potential in the nutraceutical and functional food markets (Ding et al., 2006; Tulipani et al., 2008).

Owing to the specific nature of the present phytochemicals, the low caloric value and the high contents of fibre and essential micro-nutrients, the fruits possess antioxidant qualities that help alleviate adverse effects of the oxidation stress in the cell, thus reducing the risk of chronic disease occurrence.

Къпините се отличават със своите ползи за здравето, поради високото хранително съдържание на фибри, витамин С, витамин К, фолиева киселина и основния минерал манган (Sariburun et al., 2010). Къпината се нарежда на висока позиция сред плодовете също и заради антиоксидантната сила, особено поради високото си съдържание на фенолни съединения, като например елагинова киселина, танини, елагитанини, кверцетин, галова киселина, антоцианини и цианидини (Hager et al., 2008). Полифенолите имат потенциално благоприятно въздействие върху здравето, включително противовъзпалително, антивирусно, антимикробно и антиоксидантно действие (Reyes-Carmona et al., 2005). Антиоксидантната активност е способността за намаляване на образуването на свободни радикали и отстраняване на реактивни кислородни видове (ROS) (Narayana et al., 2001; Liu, 2003).

В следствие на свръхпроизводството от една страна и несигурните перспективи за продажби от друга, средното производство на къпини в Сърбия намаля през последните години до приблизително 12 000 t (разпределено до около 15 000 индивидуални стопанства), като общата площ заета с къпини не надвишава 5 000 ha (Nikolić and Tanović, 2011). В къпиновите насаждения в Сърбия доминират сортове "Чачанска Бестрна" и "Торнфрий" с дял повече от 95%, следвани от "Блек сатин", "Дирксен Торнлес" и някои по-нови сортове, като „Лох Нес“, „Честър Торнлес“, „Трипъл краун“ (Nikolić et al., 2012). "Чачанска Бестрна" се произвежда от 1997 г. и настоящият ѝ дял в сортовия асортимент възлиза приблизително на 50% (Nikolić et al., 2009). Сравнително ниското пазарно търсене на къпини е отчасти поради относително по-ниското качество на плодовете, със значително нападение от сиво гниене (*Botritys cinerea*). Интензификацията в технологията на отглеждане,

Blackberries are notable for their health benefits based on high nutritional contents of dietary fibre, vitamin C, vitamin K, folic acid, and the essential mineral manganese (Sariburun et al., 2010). Blackberries also rank highly among fruits for their antioxidant strength, particularly due to their high contents of phenolic compounds, such as ellagic acid, tannins, ellagitannins, quercetin, gallic acid, anthocyanins, and cyanidins (Hager et al., 2008).

Polyphenols have potentially beneficial effects on health including anti-inflammatory, antiviral, antimicrobial, and antioxidant activity (Reyes-Carmona et al., 2005).

Antioxidant activity is defined as the ability to reduce free radical formation and scavenge reactive oxygen species (ROS) (Narayana et al., 2001; Liu, 2003).

As a consequence of the hyper-production on one side and the uncertain sales prospects on the other side, the average blackberry production in Serbia has declined in recent years to approximately 12,000 t (spread to app. 15,000 individual farms), with the total area under blackberry not exceeding 5,000 ha (Nikolić and Tanović, 2011). The blackberry orchards in Serbia are dominated by the ‘Čačanska Bestrna’ and ‘Thornfree’ cultivars, with more than 95% share, followed by the ‘Black Satin’, ‘Dirksen Thornless’ and some more recent cultivars, such as ‘Loch Ness’, ‘Chester Thornless’, ‘Triple Crown’ (Nikolić et al., 2012). The ‘Čačanska Bestrna’ has been produced since 1997, and its current share in the cultivar assortment amounts to approximately 50 % (Nikolić et al., 2009). The comparatively low market demand for the blackberry has been partly caused by relatively lower fruit quality, with significant presence of grey mould (*Botritys cinerea*). The intensification of the cultivation technology заедно с въвеждане на покритие срещу дъжд, доведе до увеличаване на дела на качествени плодове, т.е. предотвратяване на гниенето, но също така даде възможност да се извършва непрекъсната беритба, независимо от външните условия (Tanović et al., 2012). Освен силното въздействие на вида върху антиоксидантните характеристики на плодовете, трябва да бъдат взети под внимание условията на отглеждане на растенията (околна среда и технология на отглеждане) (Scalzo et al., 2005).

Изследването е насочено към установяване на косвеното въздействие на нов метод за отглеждане (с покритие срещу дъжд) върху биологичната активност на къпиновите плодове, т.е. хранителни и антиоксидантни стойности.

accompanied by the introduction of the rain shield resulted in increasing the share of quality fruits, i.e. prevention of the rot, but it has also made it possible to perform the harvesting in continuity, regardless of the external conditions (Tanović et al., 2012). Apart from the strong impact that the species of fruit has on the anti-oxidant features of the fruit, the cultivation conditions of the plant (environmental and cultivation techniques) must not be neglected (Scalzo et al., 2005).

The research was aimed at establishing the indirect impact of the new cultivation technique (Rain shield) of blackberry on the biological activity of the fruit, i.e. its nutritive and anti-oxidant values.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

1. Посадъчен материал и схема на опита

Изследването е проведено за период от две години (2013–2014 г.) в къпиново насаждение от „Чачанска бестрна“ (Rubus subg. Rubus Watson). Експерименталното насаждение е създадено през 2006 г. Разположено е в Горна Горевница (43°53’N ширина, 20°20’ E дължина, 290 m н.в.) близо до Чачак, Западна Сърбия.

Къпината се засажда на редове, разположени на разстояние 3.0 m един от друг, с вътрередово разстояние от 1.5 m, формира се върху конструкция от 4 тела. Пластмасовите арки са поставени върху съществуващата конструкция и са покрити с фолио (покритие срещу дъжд), с дебелина 150 μ, образуващо чадър. Експериментът е проведен рандомизирано, по блоков метод и включва четири повторения от всеки вариант. През двата сезона са осигурени стандартните за района практики, като торене, борба с плевели и напояване.

2. Определяне на фенолни киселини, флавоноли и антоцианини

Пробите са анализирани чрез

MATERIAL AND METHODS

1. Plant material and experimental design

The investigation was conducted over a two-year period (2013–2014) in a orchard of ‘Čačanska Bestrna’ cultivar of blackberry (Rubus subg. Rubus Watson). The experimental orchard was established in 2006 and was located at Gornja Gorevnica (43° 53’N latitude, 20° 20’ E longitude, 290 m altitude) near Čačak, Western Serbia.

The blackberry were planted in rows spaced 3.0 m apart with plants set at 1.5 m apart in the row, and trained as a four-wire trellis. Plastic arches were placed on the existing trellis structure in the blackberry. The arches were covered using 150 μ thick foil, forming the shape of an umbrella (Rain shield). The trial was conducted using a randomised block design and it included four replications of each treatment. Fertilization, weed control, and irrigation practices standard for the region were provided during both seasons.

2. Determination of Phenolic Acids, Flavonols and Anthocyanins

Samples were analyzed using an

система HPLC от серия Agilent 1260 (Agilent Technologies, Санта Клара, Калифорния, САЩ), свързана със система за обработка на данни ChemStation, като се използва колона ZORBAX Eclipse Plus C18 (4.6 x 150 *mm*, 3,5 *µm* частици). Пробите се приготвят съгласно метода на Hertog et al. (1992). Инжекционният обем е 5 µL с температура 30 ºC. Разтворител А е 1% мравчена киселина, а разтворител В е ацетонитрил. Използван е следният градиент: 0–10 min, 10% от B в A; 10–25 min, 15–50% от B в A; 25–30 min, 50–80% от B в A; 30–32 min, 10% от B в A. Чрез този градиент (дебит 0.5 ml/min) се постига добра чистота и отделяне в пробите от плодове. Използвана е система HPLC с диодно-матричен детектор. Фенолните съединения са установени при 260 *nm*, 280 *nm*, 329 *nm*, 360 *nm* и 520 *nm*. Те са определени според периода на задържане на пика и UV/Vis спектъра, сравнени с тези на стандартите. Количествата на различните фенолни съединения се основават на пикови зони и се изразяват в mg/100 g FW.

3. Определяне на общи феноли (TPH)

Съдържанието на общи феноли се определя с помощта на модифициран колориметричен метод Folin-Ciocalteu (Singleton et al., 1999; Liu et al., 2002) и резултатите се изразяват като милиграми еквиваленти на галова киселина на 100 g свежа маса (mg GAE/100 g FW). Смляната проба (4.0 g) се разбърква енергично с 40 ml екстракционен разтвор, състоящ се от метанол и дестилирана вода (80% v/v) и се държи в продължение на 2 часа на тъмно при стайна температура. Сместа се центрофугира два пъти в продължение на 15 *min* при 3500 *rpm*. Супернатантата се филтрира през филтър Minisart с 0.45 µm преди анализ. 40 *µL* от плодови екстракти или стандартен разтвор на галова киселина се смесват с 3.16 ml дестилирана вода, след което

Agilent 1260 series HPLC (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) linked to a ChemStation data handling system, using a ZORBAX Eclipse Plus C18 column (4.6 x 150 *mm*, 3.5 *µm* particles). Samples were prepared according to the method of Hertog et al. (1992). Injection volume was 5 *µL* and the temperature was set at 30 ºC. Solvent A was 1% formic acid and solvent B was acetonitrile. The gradient used was as follows: 0–10 min, 10% of B in A; 10–25 min, 15–50% of B in A; 25–30 *min*, 50–80% of B in A; 30–32 *min*, 10% of B in A. By using this gradient (flow rate 0.5 *ml/min*), a good purity and separation was achieved in fruit samples. The HPLC equipment was used with a diode array detector (DAD). Phenolic compounds were detected at 260 *nm*, 280 *nm*, 329 *nm*, 360 *nm*, and 520 *nm*. Phenolic compounds were identified according to peak retention time and UV/Vis spectra by comparing them with those of the standards. The quantities of the different phenolic compounds were based on peak areas**,** and expressed as *mg/100 g* FW.

3. Determination of Total Phenolics (TPH)

The TPH content was determined using a modified Folin-Ciocalteu colorimetric method (Singleton et al., 1999; Liu et al., 2002) and the results were expressed as milligrams of gallic acid equivalents per 100 *g* of fresh weight (*mg GAE/100 g* FW). Grinded sample (4.0 *g*) was stirred vigorously with 40 *mL* of extraction solution consisting of methanol and distilled water (80% v/v) and was kept for 2 hours in the dark at room temperature. The mixture was centrifuged in two sequential times for 15 *min* at 3500 *rpm*, and supernatant was filtered through a 0.45 *µm* Minisart filter before analysis.

A 40 *µL* of fruit extracts or gallic acid standard solution was mixed with 3.16 *mL* of distilled water whereupon 200 *µL* of Folin-Ciocalteu reagent was added and се добавят реагент Folin-Ciocalteu от 200 µL и се оставя да престои 8 минути, преди да се добави 600 µL 20% разтвор на Na_2CO_3. Разтворът се смесва добре и след 2 часа се определя абсорбция при 765 nm според подходяща празна проба. Данните се отчитат като средни стойности от поне три повторения.

4. Определяне на общи антоцианини (ОА)

Съдържанието на мономерни антоцианинови пигменти във водните екстракти е определено по описания по-рано метод за диференциране на pH (Torre and Barritt, 1977; Liu et al., 2002). Накратко, 20 g смилени плодове се смесват с 40 ml екстрахиращ разтворител (95% етанол/1.5 N HCl, 85:15). Екстрактът се събира чрез филтриране с допълнителни 30 ml разтворител. Остатъкът се накисва с 70 ml екстрахиращ разтворител и екстрактът се събира след 2 часа. Общите екстракти се събират и се довеждат до 200 *mL*. За спектрални измервания при 510 и 700 nm е използван спектрофотометър UV/VIS (PU 8740 UV/VIS, Англия) и 1-сантиметрова кювета за еднократна употреба. Съдържанието на пигмент се изчислява в милиграми цианидин-3-глюкозид на 100 g свежа маса (mg cyn-3-glu/100 g FW), като се използва коефициент на екстинкция от 26 900 L/cm/mol и молекулярно тегло от 449.2 g/mol.

5. Определяне на общ антиоксидантен капацитет

Антиоксидантният капацитет (АК) е определен чрез ABTS анализ според Arnao et al. (1999). Разтвор на ABTS е приготвен прясно чрез добавяне на 5 ml от 4.9 mM разтвор на калиев персулфат към 5 ml от 14 mM разтвор на ABTS. Полученият разтвор се държи в продължение на 16 часа на тъмно при стайна температура (25 ± 1°C). Разтворът се разрежда с метанол, при което се получава абсорбция от 0.700 ± 0.02 при 734 nm, като същият разтвор се използва за антиоксидантен анализ.

allowed to stand for 8 *min* before 600 *µL* of 20% Na_2CO_3 solution was added.

Solution was well mixed and absorbance at 765 nm against an appropriate blank was determined after 2 hours. Data are reported as means for at least three replications.

4. Determination of Total Anthocyanin (TAN)

The monomeric anthocyanin pigment content of the aqueous extracts was determined using the previously described pH-differential method (Torre and Barritt, 1977; Liu et al., 2002). Briefly, 20 *g* of grinded fruit was blended with 40 *mL* of extracting solvent (95% ethanol/1.5 N HCl, 85:15). The extract was collected by filtration with an additional 30 *ml* of solvent washing. The residue was soaked with 70 *mL* of extracting solvent, and the extract was collected after 2h. The total extracts were pooled and brought up to 200 *mL*. A UV/VIS spectrophotometer (PU 8740 UV/VIS, England) and a 1-*cm* path length disposable cell were used for spectral measurements at 510 and 700 *nm*. Pigment content was calculated as milligrams cyanidin-3-glucoside per 100 *g* of fresh weight (*mg cyn-3-glu/100 g* FW) using an extinction coefficient of 26,900 *L/cm/mol* and molecular weight of 449.2 *g/mol*.

5. Determination of the Total Antioxidant Capacity

Antioxidant capacity (TAC) was determined by the ABTS assays according to Arnao et al. (1999). ABTS solution was freshly prepared by adding 5 *ml* of a 4.9 *mM* potassium persulphate solution to 5 *ml* of a 14 *mM* ABTS solution and the resulting solution was kept for 16 h in dark at room temperature (25±1 °C).

This solution was diluted with methanol to yield an absorbance of 0.700 ± 0.02 at 734 *nm* and the same solution was used for the antioxidant assay. One milliliter of

Един милилитър реакционна смес от стандарта и екстрактите съдържа 950 µl разтвор на ABTS и 50 µl от пробите. Разтвор се прави в продължение на 10 секунди и е отчетена абсорбция при 734 nm след 6 минути, като се използва UV/VIS спектрофотометър (PU 8740 UV/VIS, Англия), който се сравнява с контролния разтвор ABTS. Резултатите са изразени като mmol Тролокс еквиваленти/100 g свежа маса (mmol/100 g FW).

6. Статистически анализ

Всички тестове са извършени в три повторения и резултатите се представят като средна ± стандартна грешка на средната (SE). Разликите между средните стойности са сравнени чрез тест на Дънкан за многопосочно сравнение с двупосочен дисперсионен анализ (ANOVA), използвайки статистически компютърен пакет MSTAT-C (Michigan State University, East Lansing, MI, USA). Разлики със *p* стойности ≤ 0.05 се считат за незначителни.

reaction mixture of standard and extracts comprised 950 *µl* of ABTS solution and 50 *µl* of the samples. This solution was wortexed for 10 sec and the absorbance was recorded at 734 *nm* after 6 min using UV/VIS spectrophotometer (PU 8740 UV/VIS, England) which was compared with the control ABTS solution. The results were expressed as mmol Trolox equivalents per 100 *g* of fresh matter (*mmol/100 g* FW).

6. Statistical analysis

All tests were performed in triplicate and the results are presented as mean ± standard error of mean (SE). Differences between mean values were compared by Duncan's Multiple Range test in two-way analysis of variance (ANOVA) using MSTAT-C statistical computer package (Michigan State University, East Lansing, MI, USA). Differences with *p* values of ≤ 0.05 were considered insignificant.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Фенолни киселини, флавоноли и антоцианини

Таблица 1 показва профила на свободните фенолни киселини, установени в къпинови плодове на сорт "Чачанска Бестрна". В плодовете са установени и количествено определени димер на галова киселина, елагова киселина, четири хидроксибензоени киселини, включително протокатехинова, 4-хидроксибензоена, ванилова и галова киселина, както и три хидроксицинаминови киселини, включително *p*-кумаринова, кафеена и ферулова киселина (Таблица 1).

RESULTS AND DISCUSSION

1. Phenolic Acids, Flavonols and Anthocyanins

Table 1 shows the profile of free phenolic acids determined in fruit of 'Čačanska Bestrna' blackberry.

The dimer of gallic acid-ellagic acid, four hydroxybenzoic acids, including protocatechuic, 4-hydroxibenzoic, vanillic and gallic acids, as well as three hydroxycinnamic acids, including p-coumaric, caffeic and ferulic acids, were identified and quantified in the fruit (Table 1).

Таблица 1. Съдържание на фенолни киселини в къпинови плодове на сорт „Чачанска Бестрна“

Table 1. Phenolic acids content in fruit of ‘Čačanska Bestrna’ blackberry

Фенолни киселини Phenolic acids (mg/100 g FW)	Под покритие Rain shield		Стандартно Standard		Ср. стойности по години Mean of growing year		Ср. ст. по метод на отглеждане Mean of cultivation techniques	
	2013	2014	2013	2014	2013	2014	Под покритие Rain shield	Стандартно Standard
протокатехинова Protocatechuic	1.52±0.17 a	1.82±0.15 a	1.29±0.71 a	0.97±0.21 a	1.67±0.12 a	1.13±0.34 b	1.41±0.33 a	1.39±0.22 a
4-хидроксибензоена 4-hydroxybenzoic	0.36±0.01 a	0.46±0.09 a	0.46±0.09 a	0.41±0.06 a	0.41±0.05 a	0.43±0.05 a	0.44±0.04 a	0.41±0.05 a
Vanillic	1.04±0.54 a	1.02±0.33 a	0.78±0.14 a	0.39±0.02 a	1.03±0.28 a	0.58±0.11 b	0.91±0.26 a	0.70±0.20 a
Елагинова/Ellagic	6.94±0.92 a	6.88±1.12 a	3.39±1.03 a	6.00±0.29 a	6.91±0.65 a	4.70±0.76 b	5.16±1.01 b	6.44±0.55 a
Галова/Gallic	2.79±0.13 a	2.56±0.59 a	3.38±0.46 a	2.89±0.11 a	2.68±0.28 b	3.14±0.24 a	3.09±0.25 a	2.73±0.28 a
p-кумаринова *p*-coumaric	0.67±0.18 a	0.59±0.05 a	0.33±0.19 a	0.40±0.02 a	0.63±0.08 a	0.37±0.09 b	0.51±0.14 a	0.50±0.05 a
Кафеена/Caffeic	0.37±0.02 a	0.33±0.04 a	0.43±0.05 a	0.41±0.01 a	0.35±0.02 a	0.42±0.02 a	0.40±0.03 a	0.37±0.03 a
Ферулова/Ferulic	0.39±0.02 a	0.33±0.01 a	0.41±0.06 a	0.38±0.01 a	0.37±0.02 a	0.40±0.03 a	0.41±0.04 a	0.36±0.01 a

Средните стойности за всяко анализирано съединение във всеки ред (третиране и взаимодействие) следвани от същата малка буква, нямат значима разлика според тест на Дънкан за многопосочно сравнение ($P \leq 0.05$)

For each analysed compound mean values within each row (in the treatment and interaction) followed by the same small letter are not significantly different according Duncan's Multiple Range test ($P \leq 0.05$)

FW – свежо тегло на плода/fresh weight of fruit

Фенолните киселини подложени на дисперсионен анализ, показват значително влияние на годината на отглеждане върху съдържанието на ванилова и елагинова киселина. Съдържанието на протокатехинова, 4-хидроксибензоена, ванилова и галова киселина варира от 0.97±0.21 до 1.82±0.15, 0.36±0.01 до 0.46±0.09, 0.39±0.02 до 1.04±0.54 и съответно 2.56±0.59 до 3.38±0.46 *mg/100 g* FW. Сравнението на различните методи на отглеждане показа, че съдържанието на хидроксибензоени киселини е по-високо при отглеждане на къпини под покритие срещу дъжд. По-високо съдържание на хидроксибензоени киселини, с изключение на протокатехинова и галова киселини е установено през втората година.

Съдържанието на *p*-кумаринова, кафеена и ферулинова киселини варира съответно от 0.33±0.19 до 0.67±0.18, 0.33±0.04 до 0.43±0.05 и 0.33±0.01 до 0.41±0.06 *mg/100 g* FW. По-високо съдържание на хидроксицинамични киселини е установено при къпини отглеждани под покритие срещу дъжд, през втората година. Годината на отглеждане не повлиява значително върху съдържанието на цианидин (Таблица 2).

Phenolic acids subjected to analysis of variance showed significant effect of growing year on content vanillic and ellagic acids.

The content of protocatechuic, 4-hydroxibenzoic, vanillic and gallic acids ranged from 0.97±0.21 to 1.82±0.15, 0.36±0.01 to 0.46±0.09, 0.39±0.02 to 1.04±0.54 and 2.56±0.59 to 3.38±0.46 *mg/100 g* FW, respectively.

The comparison of the different cultivation techniques treatments showed that contents of hydroxybenzoic acids were higher in Rain shield treatment. Higher contents of hydroxybenzoic acids, except protocatechuic and gallic acids were recorded in the second growing year.

The content of *p*-coumaric, cafeic and ferulic acids ranged from 0.33±0.19 to 0.67±0.18, 0.33±0.04 to 0.43±0.05 and 0.33±0.01 to 0.41±0.06 *mg/100 g* FW, respectively. Higher contents of hydroxycinnamic acids were recorded in blackberries subjected to the Rain shield cultivation techniques, in the second growing year. The growing year significantly affected content of cyanidin (Table 2).

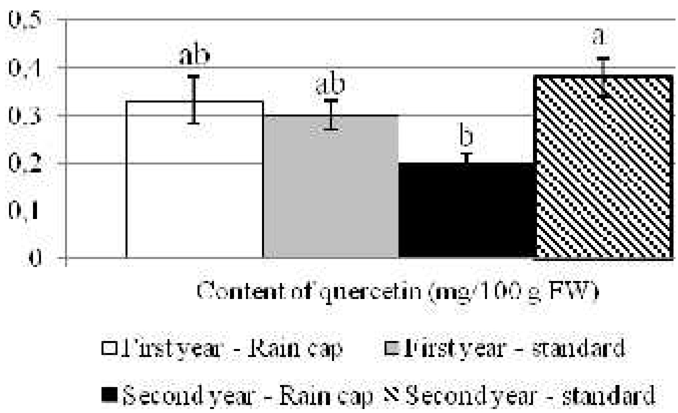
Таблица 2. Съдържание на флавоноли и антоцианидини в къпинови плодове на сорт „Чачанска Бестрна“
Table 2. Flavonols and anthocyanidins content in fruit of ‘Čačanska Bestrna’ blackberry

Третиране Treatment		Флавоноли Flavonols	Антоцианидини Anthocyanidins (mg/100 g FW)
		Кверцетин/Quercetin	Цианидин/Cyanidin
Година на отглеждане Growing year (A)	Първа/First	0.29±0.04 a	3.65±0.07 b
	Втора/Second	0.32±0.03 a	5.06±0.62 a
Методи на отглеждане Cultivation techniques (B)	Под покритие срещу дъжд/Rain cap	0.34±0.04 a	4.87±0.68 a
	Стандартно/Standard	0.27±0.03 a	3.83±0.13 a
ANOVA			
A		ns	∗
B		ns	ns
A × B		∗	ns

Стойностите във всяка колона следвани от същата малка буква нямат значими разлики при *p≤0.05* според тест на Дънкан за многопосочно сравнение / Values within each column followed by the same small letter are insignificantly different at the *p≤0.05* by Duncan’s Multiple Range test
ns – без значими разлики / non significant differences
FW – свежо тегло / fresh weight.

Ефектът на взаимодействие на годината на отглеждане и методите доведоха до значителни разлики в съдържанието на кверцетин (Фигура 1). Съдържанието на кверцетин и цианидин варира съответно от 0.27±0.04 до 0.34±0.03 и 3.65±0.07 до 4.87±0.68 *mg/100 g* FW, и е по-високо при къпини, отглеждани под покритие срещу дъжд. Освен това се установи, че съдържанието на кверцетин и цианидин е по-високо през втората година.

The interaction effect of the growing year and cultivation techniques produced significant differences in the content of quercetin (Figure 1). The quercetin and cyanidin contents ranged from 0.27±0.04 to 0.34±0.03 and 3.65±0.07 to 4.87±0.68 *mg/100 g* FW, respectively and were higher in blackeberries undergoing the Rain shield treatments. It was also observed that the quercetin and cyanidin contents were higher in the second growing year.



Фиг. 1. Съдържание на кверцетин (A x B)
Fig. 1. Content of quercetin (AòB)

Анализът на ефекта на взаимо-

The analysis of the interaction

действие между годината на отглеждане и методите посочва, че съдържанието на кверцетин е най-високо при стандартните методи за култивиране (0.38 ± 0.04 mg/100 g FW) през втората година и най-ниско при отглеждане под покритие (0,20 ± 0.02 mg/100 g FW) през същата година.

2. Общ антиоксидантен капацитет, общи феноли и антоцианини

Дисперсионният анализ показва значителното въздействие на годината на отглеждане върху антиоксидантния капацитет и общи феноли, докато методите за отглеждане значително повлияват върху общите феноли (Таблица 3). Ефектът на взаимодействие на годините на отглеждане и методите показа значителни разлики между антиоксидантния капацитет и общите феноли (Фигура 2).

effect of the growing year and cultivation techniques inferred that the quercetin content was highest in standard cultivation techniques (0.38±0.04 *mg/100 g* FW) during the second year, and lowest with the Rain shield (0.20±0.02 *mg/100 g* FW) in the same year.

2. Total Antioxidant Capacity, Total Phenolics and Anthocyanin

Analysis of variance showed significant effect of growing year on TAC and TPH whereas the cultivation techniques significantly affected the TPH (Table 3).

The interaction effect of growing year and cultivation techniques showed significant differences among the TAC and TPH (Figure 2).

Таблица 3 Общ антиоксидантен капацитет, общи антоцианини и феноли в къпинови плодове на сорт „Чачанска Бестрна“

Table 3. Total antioxidant capacity, total anthocyanins and phenolic content in fruit of blackberry 'Čačanska Bestrna'

Treatment		Общи феноли TPH	Общи антоцианини TAN	Общ антиоксидантен капацитет TAC
		mg/100 g FW		Trolox, mmol/100 g FW
Година Growing year (A)	Първа/First	373.99±32.12 a	70.22±2.55 a	2.92±0.05 a
	Втора/Second	327.68±12.33 b	69.80±3.23 a	2.46±0.06 b
Методи на отглеждане Cultivation techniques (B)	Под покритие Rain cap	396.44±23.69 a	75.85±1.56 a	2.68±0.16 a
	Стандартно Standard	305.24±2.29 b	64.17±0.92 b	2.70±0.05 a
A		*	ns	*
B		*	*	ns
A × B		*	ns	*

Стойностите във всяка колона следвани от същата малка буква нямат значими разлики при *p≤0.05* според тест на Дънкан за многопосочно сравнение / Values within each column followed by the same small letter are insignificantly different at the *p≤0.05* by Duncan's Multiple Range test

ns – без значими разлики / non significant differences

FW – свежо тегло / fresh weight.

Антиоксидантният капацитет, общите феноли и антоцианините в къпините варират съответно от 2.46±0.06 до 2.92±0.05 Тролокс *mmol/100 g* FW, 305.24±2.29 до 396.44±23.69 и съответно 64.17±0.92 до 75.85±1.56 mg/100 g

The TAC, TPH and TAN in blackberries ranged from 2.46±0.06 to 2.92±0.05 Trolox *mmol/100 g* FW, 305.24±2.29 to 396.44±23.69 and 64.17±0.92 to 75.85±1.56 *mg/100 g* FW, respectively. The higher chemical

FW. По-високи химически показатели на антиоксидантния капацитет, общи феноли и антоцианини, са отчетени през първата година. Сравнявайки различните технологии за отглеждане, може да се направи заключение, че по-висок антиоксидантен капацитет е отчетен при покритието против дъжд, докато стандартните методи за отглеждане са дали по-високи общи феноли и антоцианини.

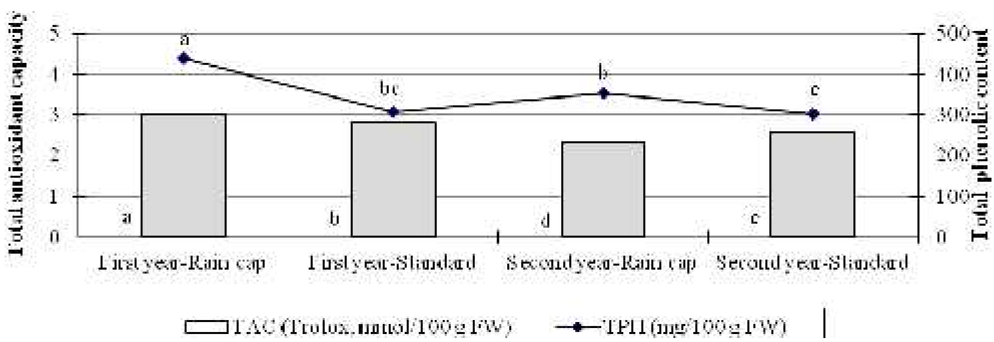
Анализът на ефекта на взаимодействие на годината на отглеждане и методите на култивиране (Фигура 2) посочва, че антиоксидантният капацитет и общи феноли са най-високи при покритието против дъжд през първата година (3.02 ± 0.13 Тролокс, mmol/100 g FW; и съответно 439.41 ± 29.62 mg/100 g FW). Антиоксидантният капацитет е най-нисък при отглеждане под покритие през втората година (2.33 ± 0.04 Тролокс, *mmol/100 g* FW), докато общите феноли са най-малко при стандартните методи на отглеждане през същата година (301.89 ± 3.54 mg/100 g FW).

parameters, TAC, TPH and TAN were recorded in the first growing year.

Comparing the different cultivation techniques treatments, it can be concluded that higher TAC was recorded in Rain cap, whereas the standard cultivation techniques produced higher TPH and TAN.

The analysis of interaction effect of growing year and cultivation techniques (Figure 2) inferred that TAC and TPH were highest in Rain shield during first year (3.02±0.13 Trolox, *mmol/100 g* FW; 439.41±29.62 *mg/100 g* FW, respectively).

TAC was lowest in Rain shield during second year (2.33±0.04 Trolox, *mmol/100 g* FW), whereas TPH was lowest in standard cultivation techniques in the same year (301.89±3.54 *mg/100 g* FW).



Фиг. 2. Общ антиоксидантен капацитет и съдържание на общи феноли (AòB)
Fig. 2. Total antioxidant capacity and content of total phenolic (AòB)

* Малките букви представят незначими разлики при *p≤0.05* според тест на Дънкан за многопосочно сравнение / The same small letters represents not significant differences at *P≤0.05* by Duncan's Multiple Range test

Фенолните съединения са основен дневен хранителен компонент в пресните плодове и зеленчуци, които подпомагат защитата и функцията на основни клетъчни елементи срещу

Phenolic compounds are an essential daily dietary component of fresh fruit and vegetables which aids in the protection and function of essential cellular constituents against oxidative окислителните увреждания, свързани с различни етиологии на неврологични и хронични заболявания (Scalbert et al., 2005). Ягодоплодните плодове (включително видове *Rubus*) съдържат високо съдържание на няколко класа фенолни съединения, включително фенолни киселини, антоцианини и флавоноли (Kahkonen et al., 2001; Proteggente et al., 2002). В литературата е открито голямо различие във фенолното съдържание за различните сортове къпини.

Киселините, открити в къпините в настоящото изследване – протокатехинова, 4-хидроксибензоена, ванилова, елагинова, галова, *p*-кумаринова, кафеена и ферулова, представляват значително по-малък брой фенолни киселини от резултатите, получени от Zadernowski et al. (2005), които установяват двадесет фенолни киселини в къпините. Нашите резултати показват, че нивата на елагинова, кафеена и ферулова киселина при къпините са по-ниски от посочените от Sellappan et al. (2002). За разлика от нашите резултати, Clark e al. (2002) наблюдават по-големи количества елагинова киселина при къпините. Като цяло нивата на свободна елагинова киселина, наблюдавани при къпината, са доста ниски в това проучване и тяхното откриване вероятно е резултат от киселинни продукти на хидролиза при разпадането на елагитанин (Mullen et al., 2002).

Терминът ’флавоноид’ се отнася до флавоноли и флавони, като кверцетинът е най-разпространен (Erlund, 2004) в растителния свят, като например при плодове, зеленчуци, ядки, семена, цветя и кората (Kris-Etherton et al., 2002). Кверцетинът е изследван по-задълбочено от другите флавоноиди, не само заради изобилието му, но и защото се установява, че проявява антиоксидантно, антикарциногенно, противовъзпалително, антиагрегационно и съдоразширяващо въздействие (Erlund, 2004; Kahkonen et al., 2001). Milivojević et al. (2011) посочват, че не е установ-

damage associated with various etiologies of neurological and chronic diseases (Scalbert et al., 2005). Berry fruit (including *Rubus* species) contain high concetrations of several classes of phenolic compounds, including phenolic acids, anthocyanins, and flavonols (Kahkonen et al., 2001; Proteggente et al., 2002). A high variation of phenolic contents of blackberry cultivars was found in the literature.

The acids discovered in the blackberries in our study - the protocatechuic, 4-hydroxybenzoic, vanillic, ellagic, gallic, *p*-coumaric, caffeic and ferulic acids, represent a significantly lower number of phenolic acids than the one presented in the results obtained by Zadernowski et al. (2005), who identified twenty phenolic acids in blackberries. Our results show that ellagic acid, caffeic acid, and ferulic acid levels were lower than those reported in blackberry Sellappan et al. (2002). As opposed to our results, Clark e al. (2002) observed higher quantities of ellagic acid in blackberris. In general, free ellagic acid levels observed in blackberry are quite low in this study, and their detection is probably the result of acid hydrolysis products of ellagitannin breakdown (Mullen et al., 2002).

The term flavonoid refers to flavonols and flavones, with quercetin being the most abundant (Erlund, 2004) and widespread throughout the plant being found in fruit, vegetables, nuts, seeds, flowers, and bark (Kris-Etherton et al., 2002).

Quercetin has been studied more thoroughly than other flavonoids, not only because of its abundance, but because it has been reported to exhibit antioxidative, anticarcinogenic, anti-inflammatory, anti-aggregatory, and vasodilating effects (Erlund, 2004; Kahkonen et al., 2001). Milivojević et al. (2011) reported that вен кверцетин в нито една от пробите на къпина в тяхното проучване, но няколко проучвания вече съобщават за наличието на кверцетинови гликозиди в къпините (Bilyk и Sapers, 1986; Siriwoharn et al., 2004), което също е потвърдено от резултатите, получени в настоящото изследване. Нашите резултати показват, че съдържанието на кверцетин в къпините е по-високо от резултатите на Clark et al. (2002). Съдържанието на кверцетин и цианидин е по-високо през втората година, което може да е свързано с генетични различия, зрялост при прибиране на реколтата, методи на култивиране, различни екстракционни и лабораторни методи (Clark et al., 2002). Wang и Lin (2000) съобщават, че делфинидин, цианидин, пеларгонидин, малвидин и пеонидин са основните антоцианини, открити в ягодоплодните видове. Известно е, че различни фитохимични компоненти, включително флавоноиди, фенилпропаноиди и фенолни киселини, са отговорни за антиоксидантния капацитет в плодовете и зеленчуците (Rice-Evans and Miller, 1986). Garcia-Alonso et al. (2004) посочват, че най-висок антиоксидантен капацитет (според TEAC) е установен при райска ябълка (406 µmol/g), къпина (192 µmol/g), боровинка (187 µmol/g) и ягодово дърво (163 µmol/g). Pantelidis et al. (2007) посочват, че къпините от сорт „Хул Торнлес“ притежава най-висок антиоксидантен капацитет от изследваните сортове малини, къпини, червен касис, цариградско грозде и дрян.

В настоящото проучване, антиоксидантният капацитет на къпините като цяло е по-нисък спрямо отчетения от Moyer et al. (2002), Siriwoharn et al. (2004) и Clark et al. (2002). Всъщност, растения, отглеждани при прохладни дневни и нощни температури, като цяло имат най-нисък антиоксидантен капацитет (Wang, 2007).

Сравнението на различията в общите феноли и антиоксидантния

quercetin was not detected in any of the blackberry samples in their study, but several studies have already reported the presence of quercetin glycosides in blackberries (Bilyk and Sapers, 1986; Siriwoharn et al., 2004), which has also been confirmed by the results obtained in our study. Our results show that content of quercetin was higher than those reported in blackberry Clark et al. (2002).

The contents of quercetin and cyanidin were higher in second growing year, which may be related to genetic differences, maturity at harvest, cultural practices, different extraction and laboratory methods employed (Clark et al., 2002). Wang and Lin (2000) reported that delphidin, cyanidin, pelargonidin, malvidin, and peonidin are the major anthocyanins found in berries.

Various phytochemical components, including flavonoids, phenylpropanoids, and phenolic acids are know to be responsible for TAC in fruits and vegetables (Rice-Evans and Miller, 1986). Garcia-Alonso et al. (2004) reported that the greatest TAC obtained by TEAC method were persimmon (406 *µmol/g*), blackberry (192 *µmol/g*), blueberry (187 *µmol/g*) and strawberry-tree fruit (163 *µmol/g*). Pantelidis et al. (2007) reported that blackberry ‘Hull Thornless’ gave the highest TAC of the examined cultivars of raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries.

In this study the TAC of blackberries was generally lower than the reported by Moyer et al. (2002), Siriwoharn et al. (2004) and Clark et al. (2002). Namely, plants grown in cool day and night temperatures generally had the lowest antioxidant capacity (Wang, 2007).

The comparison of the differences in TPH and TAN related to the growing капацитет показват, че те са по-високи през първата, отколкото през втората година на отглеждане, което предполага, че вегетационният сезон, климатът и регионът оказват влияние върху антиоксидантната сила на къпините (Sellapan et al., 2002). В проучване, проведено от Wang и Lin (2000), общото съдържание на феноли в ягодоплодните култури и листа варира от 91 до 338 *mg/100 g* FW. Нашите резултати разкриха по-високо съдържание на общи феноли в сорт "Чачанска Бестрна" отколкото в резултатите от Milivojević et al. (2011) за същия сорт при сходни агроекологични условия. От друга страна, Benvenuti et al. (2004) съобщават, че съдържанието на общи феноли в някои сортове къпина без бодли, отглеждани в Италия, варира от 192.8 до 351.7 mg/100 g FW, което е подобно на резултатите от настоящото проучване.

Съдържанието на антоцианин в къпините е сравнимо с други плодове (Skrede and Wrolstad, 2002), а Wang и Lin (2000) показват, че антиоксидантният капацитет на къпините е силно свързан със съдържанието на антоцианинов пигмент. Въпреки това, много фактори като гени, почвен тип, светлина, температура и агрономични условия влияят върху антоцианиновия състав в растенията (Hosseinian et al., 2007). Нашите резултати показват, че съдържанието на антоцианини е подобно на посоченото в резултатите на Benvenuti et al. (2004).

Въпреки това, дори когато съществуват добри експериментални доказателства, резултатите трябва да се тълкуват с повишено внимание по отношение на ползите за човешкото здраве, тъй като полифенолите могат да имат ограничена бионаличност и могат да се метаболизират в голяма степен (Duthie et al., 2003).

year revealed that these were higher in the first than in the second year, suggesting that the growing season, climate and region have an influence on the antioxidant power of blackberries (Sellapan et al., 2002). In the study conducted by Wang and Lin (2000) the total TPH content of berries and leaves varied from 91 to 338 *mg/100 g* of FW.

Our results revealed a higher TPH content in 'Čačanska Bestrna' blackberry than that reported by Milivojević et al. (2011) for the same cultivar under similar agro-ecological conditions.

On the other hand, Benvenuti et al. (2004) reported that content of TPH in some thornless blackberry cultivars grown in Italy ranged from 192.8 to 351.7 *mg/100 g* FW, which is similar to the results of our study.

The anthocyanin content of blackberries compares favourably with other fruits (Skrede and Wrolstad, 2002), and Wang and Lin (2000) have shown that TAC of blackberries is highly correlated with the anthocyanin pigment content. However, many factors such as genes, soil type, light, temperature, and agronomic conditions affect anthocyanin composition in plants (Hosseinian et al., 2007). Our results show that the TAN contents were similar to those reported in the thornless blackberry Benvenuti et al. (2004).

However, even when good experimental evidence exists, results need to be interpreted with caution in relation to human health benefits, as polyphenols may have limited bioavailability and may also be extensively metabolised (Duthie et al., 2003).

ИЗВОДИ

Настоящото проучване показва, че къпините са богат източник на

CONCLUSIONS

The present study indicates that blackberries are a rich source of natural естествени антиоксиданти и че интензификацията на технологията на отглеждане допринася за увеличаване на съдържанието на полифеноли. От друга страна, общото съдържание на феноли и антиоксидантната активност варира при различните екологични условия, използвани в настоящото проучване.

Консумацията на къпини може да осигури добър източник на антиоксиданти, които имат потенциал за употреба в разработването на хранителни съставки, полезни за човешкото здраве.

antioxidants and that intensification of the cultivation technology of blackberry contributes to an increase in the polyphenol contents. On the other hand, total phenolic content and antioxidant activity varied among the different ecological conditions used in this study.

Consumption of blackberries can provide a good source of antioxidants, and therefore they may have potential for use in the development of food ingredients that are beneficial to human health.

БЛАГОДАРНОСТИ

Настоящето проучване е част от проект № 31093, финансиран от Министерството на образованието и науката на Република Сърбия. Изразяваме искрената си благодарност за подкрепата.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study is the part of the project No. 31093 financed by Ministry of Education and Science of the Republic of Serbia. We hereby express our sincere gratitude for the support.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Arnao, M.B., A. Cano and M. Acosta**, 1999. Methods to measure the antioxidant activity in plant material. A comparative discussion. *Free Radical Research Communication*, 32, 89–96.
2. **Benvenuti, S., M. Pellati, M. Melegari and D. Bertelli**, 2004. Polyphenols, anthocyanins, ascorbic acid, and radical scavenging activity of *Rubus*, *Ribes*, and *Aronia*. *Journal of Food Science*, 69, 164–169.
3. **Bilyk, A. and G.M. Sapers**, 1986. Varietal differences in the quercetin, kaempferol, and myricetin contents of highbush blueberry, cranberry, and thornless blackberry fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34, 585–588.
4. **Clark, J.R., L. Howard and S. Talcott**, 2002. Antioxidant activity of blackberry genotypes. *Acta Horticulturae*, 585, 475–480.
5. **Ding, M., , R. Feng, S.Y. Wang, L. Bowman, Y. Lu, Y. Qian, V. Castranova, B.H. Jiang and X. Shi**, 2006. Cyanidin-3-glucoside, a natural product derived from blackberry, exhibits chemopreventive and chemotherapeutic activity. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 17359–17368.
6. **Duthie, G.G., P.T. Gardner and J.A.M**. **Kyle**, 2003. Plant polyphenols: are they the new magic bullet? *Proceeding of the Nutrition Society*, 62, 559–603.
7. **Erlund, I.,** 2004. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research*, 24, 851–874.
8. **Garsia-Alonso, M., S. Pascual-Teresa, C. Santos-Buelga and J.C. Rivas-Gonzalo**, 2004. Evaluation of the antioxidant properties of fruits. *Food Chemistry*, 84, 13–18.
9. **Hager, T.J., L.R. Howard, R. Liyanage, J.O. Lay and R.L. Prior**, 2008. Ellagitannin composition of blackberry as determined by HPLC-ESI-MS and MALDI-TOF-MS. *Journal of* Agricultural *and Food Chemistry*, 56, 661–669.

10. **Hertog, M.G.L., P.C.H. Hollman and D.P. Venema**, 1992. Optimization of quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in fruits and vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 1591–1598.
11. **Hosseinian, F.S, W. Li, A.W. Hydamaka, A. Tsopmo, L. Lowry, J. Friel and T. Beta**, 2007. Proanthocyanidin profile and ORAC values of Manitoba berries, chokecherries, and seabuckthorn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (17), 6970–6976.
12. **Kahkonen, M.P., A.I. Hopia and M. Heinonen**, 2001. Berry phenolics and their antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4076–4082.
13. **Kris-Etherton, P., D.D. Hecker, A. Bonanome, S.M. Coval, A.E. Binkoski, K.F. Hilpert, A.E. Griel and T.D. Etherton**, 2002. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *The American Journal of Medicine*, 113, 711–882.
14. **Liu, M., X.Q. Li, C. Weber, C.Y. Lee, J. Brown and R.H. Liu**, 2002. Antioxidant and antiproliferative activities of raspberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2926–2930.
15. **Liu, R.H.**, 2003. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *American Journal* of *Clinical Nutrition*, 78, 17–20.
16. **Milivojević, J., V. Maksimović, M. Nikolić, J. Bogdanović, R. Maletić and D. Milatović**, 2011. Chemical and antioxidant properties of cultivated and wild *Fragaria* and *Rubus* berries. *Journal of Food Quality*, 34, 1–9.
17. **Moyer, R., K.E. Hummer, C. E. Finn, B. Frei and R. E. Wrolstad,** 2002. Anthocyanins, Phenolics, and Antioxidant Capacity in Diverse Small Fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes. Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 519−525.
18. **Mullen, W., J. Mcginn, M.E.J. Lean, M.R. Maclean, P. Gardner, G.G. Duthie, T. Yokota and A. Crozier**, 2002. Ellagitannins, flavonoids, and other phenolics in red raspberries and their contribution to antioxidant capacity and vasorelaxation properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5191–5196.
19. **Narayna, K.R., M.S. Reddy, M.R. Chaluvadi and D.R. Krishna**, 2001. Bioflavonoids classification, pharmalogical, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology*, 33, 2–16.
20. **Nikolić, D., Z. Keserović, N. Magazin, S. Paunović, R. Miletić, M. Nikolić and J.Milivojević**, 2012. Condition and development prospects of fruit growing in Serbia. In: Proceedings of the 14th Serbian Congress of Fruit and Grapevine Producers with International Participation, Vrnjačka Banja, Serbia, 9-12 November, pp. 3–22.
21. **Nikolić, M., J. Milivojević and A. Leposavić**, 2009. Berry production in Serbia-present and future. Programme and abstracts, COST 863 Workkshop 'The new biotehnology applied in berry fruits', 16.
22. **Nikolić, M. and B. Tanović**, 2011. *Rubus* and *Ribes* industry in Serbia as a production model for developing countries. Book of Abstracts of X International *Rubus* & *Ribes* Symposium, Zlatibor, Serbia, pp. 127.
23. **Pantelidis, G.E., M. Vasilakakis, G.A. Manganiris and G. Diamanidis**, 2007. Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries. *Food Chemistry*, 102, 777–783.
24. **Proteggente, A.R., A.S. Panala, L. Paganga, E. Buren, S. Wagner, F. Wiseman, C. Dacombe and C.A. Rice-Evans**, 2002. The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their their phenolic and vitamin C

composition. *Free Radical Research*, 36, 217–233.
25. **Reyes-Carmona, J., G. G. Yousef, R.A. Martinez-Peniche and M.A. Lila**, 2005. Antioxidant capacity of fruit extracts of blackberry (*Rubus* sp.) produced in different climatic regions. *Journal of Food Science*, 70, 497–503.
26. **Rice-Evans, C. and N.J. Miller**, 1986. Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Society Transactions*, 24, 790–795.
27. **Sariburun, E., S. Sahin, C. Demir, C. Türkben and V. Uylaşer**, 2010. Phenolic content and antioxidant activity of raspberry and blackberry cultivars. *Journal of Food Science*, 75, 328–335.
28. **Scalbert, A., C. Manach, C. Morand and C. Remesy**, 2005. Dietary polyphenols and the prevention of disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 287–306.
29. **Scalzo J., A. Politi, N. Pellegrini, B. Mezzeti and M. Battino**, 2005. Plant genotype affects total antioxidant capacity and phenolic contents in fruit. *Nutrition*, 2, 207–213.
30. **Sellaappan, S., C.C. Akoh and G. Krewer**, 2002. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-Grown Blueberries and Blackberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2432–2438.
31. **Singleton, V. L., R. Orthofer and R. M. Lamuela-Raventos**, 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152–178.
32. **Siriwoharn, T. and R.E. Wrolstad**, 2004. Characterization of phenolics in Marion and Evergreen blackberries. *Journal of Food Science*, 69, 233–240.
33. **Skrede, G. and R.E. Wrolstad**, 2002. Flavonoids from berries and grapes. In: Shi J., Mazza G., Le Maguer M., editors. Functional foods, vol. 2. Biochemical and processing aspects. Boca Raton, Fla.: CRC Press. pp. 71–133.
34. **Tanović, B., Ž. Karaklajić-Stajić, M. Nikolić, J. Luković and R. Miletić**, 2012. Influence of new growing technology on some production characteristics of blackberry 'Čačanska bestrna'. Book of Abstracts of I International Symposium and XVII Scientific conference of Agronomists of Republic of Srpska, Trebinje, Republic of Srpska, pp. 174.
35. **Torre, L.C. and B.H. Barritt**, 1977. Quantitative evaluation of *Rubus* fruit anthocyanin pigments. *Journal of Food Science*, 42, 488–490.
36. **Tulipani, S., B. Mezzetti, F. Capocasa, S. Bompadre, J. Beekwilder, C.H.R. de Vos, E. Capanoglu, A. Bovy and M. Battino**, 2008. Antioxidants, phenolic compounds, and nutritional quality of different strawberry genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 696–704.
37. **Wang, S.Y.**, 2007. Antioxidant capacity and phenolic contentof berry fruits as affected by genotype, preharvest conditions, maturity, and handling. In: Zhao Y. (ed.): Berry Fruit: Value-added Products for Health Promotion. Taylor and Francis Group. Boca Raton, pp. 147–186.
38. **Wang, S.Y. and H.S. Lin**, 2000. Antioxidant activity in fruit and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and development stage. *Journal of Agricultural* and *Food Chemistry*, 48, 140–146.
39. **Zadernowski, R., M. Naczk and J. Nesterowicz**, 2005. Phenolic acid profiles in some small berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2118–2124.