به‌زراعی کشاورزی
دوره ۲۲ ■ شماره ۱ ■ بهار ۱۳۹۹
صفحه‌های ۱۶۳-۱۴۹

# همبستگی مقدار عناصر غذایی، فعالیت آنزیم‌های مسیر فنیل پروپانوئید و متابولیت‌های ثانویه در دو ژنوتیپ سیب توسرخ ایرانی و رقم رد دلیشز روی پایه‌های مختلف

طاهره پروانه[۱*]، بهرام عابدی[۲]، غلامحسین داوری‌نژاد[۳]، ابراهیم گنجی‌مقدم[۴]
۱. مربی بخش تحقیقات زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان سمنان (شاهرود)، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، شاهرود، ایران.
۲. استادیار، گروه علوم باغبانی و مهندسی فضای سبز، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
۳. استاد، گروه علوم باغبانی و مهندسی فضای سبز، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
۴. دانشیار بخش تحقیقات زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران.
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۸/۰۴/۲۲ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۰۵/۳۰

## چکیده

به‌منظور بررسی نقش پایه‌های درختان میوه بر مقدار عناصر غذایی موجود در برگ‌های دو ژنوتیپ سیب توسرخ ایرانی و تعیین همبستگی عناصر غذایی با انواع متابولیت‌های ثانویه، این پژوهش در باغ تحقیقاتی بخش علوم باغبانی و مهندسی فضای سبز دانشگاه فردوسی مشهد طی سال های ۹۴ تا ۹۷ انجام شد. پایه‌های مورد استفاده، دو پایه پاکوتاه M9 و B9 و یک پایه کلونی سیب توسرخ بکران بودند که به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح آزمایشی بلوک کامل تصادفی مورد آزمون قرار گرفتند. نتایج این پژوهش نشان داد که پایه بر مقدار نیتروژن و فسفر موجود در برگ دو ژنوتیپ سیب توسرخ و رقم رد دلیشز، و فاکتورهای پایه، پیوندک و برهمکنش پایه و پیوندک بر مقدار پتاسیم، آهن، کلسیم و روی در نمونه‌های برگ تیمارها تأثیر معنی‌داری داشتند. تأثیر پایه B9 بر مقدار تمامی عناصر برگ در همه تیمارها منفی و تأثیر پایه M9 در تمامی موارد مثبت ارزیابی شد. فعالیت آنزیم PAL با عناصر نیتروژن، پتاسیم، کلسیم، آهن و روی همبستگی مثبت معنی‌داری داشت. سنتز آنتوسیانین نیز با مقدار نیتروژن همبستگی مثبت (۰/۴۷) نشان داد. مقدار عناصر پتاسیم، کلسیم و آهن همبستگی بالایی با فعالیت آنزیم UFGT داشتند. مقدار فلاونوئید کل نیز با عناصر کلسیم و روی (به‌ترتیب ۰/۶۴ و ۰/۴۵-) همبستگی معنی‌داری نشان داد. که این تأثیرات را می‌توان به‌دلیل مشارکت تعدادی از این عناصر غذایی به‌عنوان کوفاکتور در فعالیت آنزیم‌ها و یا پیش‌ماده‌های ترکیبات فنلی و متابولیت‌های ثانویه دانست.

**کلیدواژه‌ها:** آنتوسیانین، پایه‌های سیب، سیب توسرخ بکران، فنیل‌آلانین آمونیولیاز، متابولیت‌های ثانویه.

# Correlation of Enzymatic Activity, Phenolic Compounds, and Flavonoids with Amount of Nutrients of Two Iranian Red Flesh Apple Genotypes on Different Rootstocks

Tahereh Parvaneh[1*], Bahram abedi[2], Gholam Hossein Davarynejad[3], Ebrahim Ganji Moghadam[4]
1. Instructor, Horticulture Crops Research Department, Agricultural and Natural Resources Research Center of Semnan Province (Shahrood), AREEO, Shahrood, Iran.
2. Assistant Professor, Department of Horticulture, Agriculture Faculty, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
3. Professor, Department of Horticulture, Agriculture Faculty, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
4. Associate Professor, Horticulture Crops Research Department, Agricultural and Natural Resources Research Center, Khorasan Razavi, AREEO, Mashhad, Iran.
Received: July 13, 2019 Accepted: August 21, 2019

## Abstract

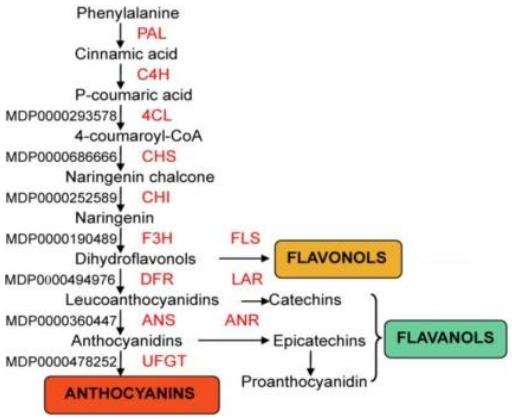
In order to study the role of fruit tree rootstocks on nutrient content in the leaves of two Iranian red flesh apple genotypes and to determine the correlation of nutrients with different secondary metabolites, the present study has been conducted in Research Garden of Horticultural Sciences of Ferdowsi University of Mashhad during 2016-2019. The used rootstocks are two dwarfing rootstocks, M9 and B9, along with one red flesh apple colony rootstock of Bekran; all, tested in a factorial randomized complete block design. Results from this study show that the rootstock has had a significant impact on nitrogen and phosphorus content in leaf samples of two red flesh apple genotypes and red delicious cultivar. Moreover, rootstock, scion, and their interaction have had a significant effect on potassium, iron, calcium, and zinc content of leaf samples. The effect of B9 on the amount of all elements of scion leaves has been negative and the effect of M9, positive in all cases. Results also show that PAL enzyme activity has been positively correlated with nitrogen, potassium, calcium, iron, and zinc. Similarly, anthocyanin synthesis has been positively correlated with nitrogen content (0.47). The experience further demonstrates that the amount of potassium, calcium, and iron are highly correlated with UFGT activity, and that the total flavonoid content is also significantly correlated with calcium and zinc (0.64 and -0.45, respectively). It also shows that these effects could be due to the participation of some of these nutrients as cofactors in enzyme activity and/or precursors of phenolic compounds and secondary metabolites.

**Keywords:** Anthocyanin, apple rootstocks, phenylalanine ammonia lyase (PAL), red flesh apples, secondary metabolites.

* نویسنده مسئول Email: t.parvaneh@areeo.ac.ir

## ۱. مقدمه

در ژرم‌پلاسم سیب انواعی از میوه با گوشت رنگی (قرمز، صورتی، زرد و سبز) وجود دارد. سیب‌های توسرخ با بافت میوه رنگی، علاوه بر فراهم‌آوردن نقاط عطفی در روند تمایز و تنوع و افزایش کیفیت میوه، منابعی با مقادیر مطلوبی از ترکیبات مفید برای سلامتی محسوب می‌شوند (Boyer & Liu, 2004). هم‌چنین، تأثیر این ترکیبات بر مقاومت گیاهان به انواع تنش‌های محیطی، بررسی مؤلفه‌های تأثیرگذار بر مقدار این ترکیبات را ضروری ساخته است. سیب‌های توسرخ از نظر فنوتیپی دارای دو تیپ شناخته‌شده در سراسر دنیا می‌باشند که هر دو فنوتیپ آن در ایران وجود دارند. برگ‌های جوان درختان سیب فنوتیپ نوع ۱، همیشه قرمز رنگ می‌باشد، بررسی رنگ شاخساره به‌عنوان یک شاخص برای شناسایی فنوتیپ نوع ۱ در اوایل بهار و با بررسی برگ‌های جوان کاربرد دارد. شدت رنگ قرمز پوست و گوشت میوه سیب توسرخ در فنوتیپ نوع ۲، معمولاً نسبت به فنوتیپ نوع ۱ کم‌تر بوده و تفرق صفات بیش‌تری را نشان می‌دهد. با توجه به ویژگی های گفته‌شده از ژنوتیپ‌های سیب توسرخ شناسایی‌شده در استان سمنان ژنوتیپ توسرخ بکران دارای فنوتیپ نوع ۱ و ژنوتیپ توسرخ بسطام با رنگ گوشت میوه کم‌تر و شاخساره سبز رنگ دارای فنوتیپ نوع ۲ می‌باشند. در مقایسه با ارقام تجاری، ارقام بومی و قدیمی، طعم و عطر و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی بیش‌تری دارند (Kondo *et al.*, 2002; Pirlak *et al.*, 2003; D'Abrosca *et al.*, 2007; Faramarzi *et al.*, 2014). فراوانی پلی فنل‌ها و مقدار کلسیم در برخی از ژنوتیپ‌های سیب توسرخ (*M. sieversii* f.niedzwetzkyana) حدوداً سه برابر بیش‌تر از برخی ارقام اهلی سیب گزارش شده است (Chen *et al.*, 2014). غلظت آنتوسیانین، فنل کل و خواص آنتی‌اکسیدانی به‌طور معنی‌داری در این ژنوتیپ‌ها نسبت به ارقام تجاری بالاتر است (Chen *et al.*, 2014; Rupasinghe *et al.*, 2010; Chagné *et al.*, 2013). ارتباطات پیچیده‌ای شامل تولید و اختصاص منابع درونی، مقدار متابولیت‌های ثانویه در گیاهان را تنظیم می‌کنند. در این رابطه قدرت رشد پایه تأثیر معنی‌داری بر جذب و مقدار عناصر غذایی موجود در پیوندک‌های سیب می‌گذارد (Aguirre *et al.*, 2001; Fallahi *et al.*, 2001; Webster, 2004). در پایه‌های پاکوتاه‌تر فراوانی آوندهای کوچک‌تر نسبت به پایه‌های پررشد بیش‌تر است. در برخی موارد نیز قابلیت انتقال متفاوت عناصر غذایی شیره گیاهی (Tombesi *et al.*, 2011) و کاهش هدایت هیدرولیکی به‌عنوان مکانیزم احتمالی پاکوتاهی پیشنهاد شده است (Higgs & Jones, 1991). بر همین اساس Aguirre *et al.* (2001) گزارش کردند که پایه‌های پاکوتاه ممکن است یکی از عوامل احتمالی کمبود مواد معدنی در سیب باشند. لذا با توجه به ضرورت تعیین نقش پایه در کیفیت میوه سیب و مؤلفه‌های تأثیرگذار بر آن از جمله متابولیت‌های ثانویه، این پژوهش به بررسی نقش پایه بر مقدار متابولیت‌های ثانویه موجود در نمونه‌های برگی پیوندک به‌عنوان بافت‌های مادر و تأمین‌کننده مواد اولیه مورد نیاز میوه روی چند پایه رایج سیب پرداخته است.




**شکل ۱. نمای کلی از مسیر فنیل پروپانوئید در گیاهان**

## ۲. مواد و روش‌ها

این پژوهش به‌منظور بررسی فعالیت آنزیمی، ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها و عناصر غذایی دو ژنوتیپ سیب توسرخ ایرانی روی پایه‌های مختلف و مقایسه آن با رقم تجاری رد دلیشز در سال‌های ۱۳۹٤ تا ۱۳۹۷ در باغ تحقیقاتی گروه علوم باغبانی و فضای سبز دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد. پایه‌های M9 و B9 و پاجوش سیب توسرخ بکران در سال اول پژوهش با فاصله کاشت ۱×۱ مترمربع کشت شدند. خاک محل کاشت دارای بافت لومی بوده و آبیاری به‌روش جوی و پشته در دوره‌های پنج تا هفت روزه انجام شد. در تیرماه سال دوم، پیوندک‌های ژنوتیپ توسرخ بکران و ژنوتیپ توسرخ بسطام و رقم رد دلیشز تهیه و پیوندها انجام شدند. در سال سوم آزمایش، پس از مرحله رشد رویشی سریع و زمان توقف رشد (مردادماه) از برگ‌های بالغ موجود در قسمت میانی شاخه، نمونه‌های برگی تهیه شدند. نمونه‌ها پس از جمع‌آوری در کیسه‌های پلاستیکی قرار داده شده و در دمای چهار درجه سانتیگراد جهت اندازه‌گیری ویژگی‌های موردنظر به آزمایشگاه منتقل شدند.

### ۲. ۱. تهیه عصاره گیاهی

حدود پنج گرم از نمونه گیاهی توسط ٤۰ میلی‌لیتر بافر هپس[1] (۵۰ میلی‌مولار با PH =۷/۵+ دو میلی‌مولار دیتیوریتریتول[2]) در دمای چهار درجه سانتی‌گراد با استفاده از هاون هموژنیزه شد. محلول حاصل با سرعت ۱۹۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ده دقیقه سانتریفیوژ گردید. پس از آن محلول شفاف بالایی دوباره به‌مدت یک دقیقه با سرعت ۱۹۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول شفاف بالایی به‌منظور اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها استفاده گردید (Ju *et al.*, 1995).

### ۲. ۲. ویژگی‌های ارزیابی‌شده

#### ۲. ۲. ۱. آنزیم PAL

فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیولیاز (PAL)[3] با استفاده از روش Zucker (1965) که توسط McCallum & Walker (1990) تغییر یافته است، اندازه‌گیری گردید. ترکیب حاوی ۸۷۵ میکرولیتر بافر بورات ۰/۰٦ مولار و ۲۵۰ میکرولیتر آنزیم خالص آماده شد. واکنش با افزودن ۲۵۰ میکرولیتر ال- فنیل‌آلانین ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ترکیب شروع شد. تیوب‌های حاوی ترکیب آماده شده در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد. در پایان ۱۲۵ میلی‌لیتر تریفلورواستیک اسید[4] (۳۵ درصد W/V) به ترکیب افزوده شد. پس از آن تیوب‌ها به‌مدت پنج دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. فعالیت آنزیم PAL با استفاده از اندازه‌گیری مقدار تولید سینامیک اسید پس از یک ساعت ثبت گردید.

#### ۲. ۲. ۲. آنزیم UFGT

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم یودی پی- گلوکوز: فلاونوئید ۳- او- گلیکوزیل ترانسفراز (UFGT)[5] با استفاده از روش Gerats *et al.* (1984) تعیین گردید. در ابتدا ترکیبی حاوی ٤۰ تا ۱۳۰ میکرولیتر عصاره آنزیم، یک میلی‌مولار UDP- گالاکتوزید در ۲۰ میکرولیتر از یک محلول ۳۳۰ PM از کوئرستین در متانول و عصاره بافر (جهت افزایش حجم محلول به ۲۰۰ میکرولیتر) تهیه شد. حجم نهایی نمونه ۲۰۰ میکرولیتر بود. نمونه‌های آماده‌شده به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در

1. Hepes (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
2. Dithioerithritol
3. Phenylalanine ammonia lyase
4. trifluoroacetic acid
5. UDP-glucose: flavonoid 3-*O*-glucosyltransferase

پایان ۸۰۰ میکرولیتر از محلول حاوی کلروفورم و متانول (نسبت ۱:۲ با یک درصد هیدروژن کلراید) به نمونه افزوده شد. نمونه با سرعت ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۳۰ ثانیه سانتریفیوژ گردید. در قسمت دوفاز محلول، فلاونوئیدها در فاز ٤۰۰ میکرولیتر بالایی قرار گرفتند. محصولات واکنش، با استفاده از کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا[1] مجهز به ستون C18 در Unicom جدا شدند. از ترکیب استیک اسید: متانول: آب به‌ترتیب با نسبت ٦٥:٢٥:١٠ به‌عنوان حلال استفاده گردید. کوئرستین و گالاکتوزید آن، کوئرستین-۳-گالاکتوزید در طول موج ٢٥٤ نانومتر تشخیص داده شدند. سرعت جریان سه میلی‌لیتر بر دقیقه بود. زمان بازدارندگی[2] برای کوئرستین-۳- گالاکتوزید ۲/۳ دقیقه و برای آگلیکن[3] ٤/۳ دقیقه ثبت شد. غلظت کوئرستین-۳-گالاکتوزید در مقایسه با سطح پیک محلول استاندارد کوئرستین-۳-گالاکتوزید تعیین شد. پروتئین آنزیم با استفاده از روش Bradford(1976) تعیین شد.

**۲. ۲. ۳. آنتوسیانین**

به‌منظور سنجش میزان آنتوسیانین در گیاه از روش Giusti & Wrolstad (2001) استفاده شد، به این ترتیب که ۰/۱ گرم از نمونه‌های برگی به‌همراه ۱۰ میلی‌لیتر متانول اسیدی (شامل ۹۹ درصد متانول و یک درصد اسید کلریدریک) ساییده شد. سپس عصاره حاصل به‌مدت ۱۰ دقیقه در ٦۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد و برای ٢٤ ساعت در تاریکی و در یخچال نگهداری شد. مقدار ۰/٤ میلی‌لیتر از عصاره گیاهی تهیه‌شده در لوله‌های جداگانه ریخته شده و پس از آن مقدار ۳/٦ میلی‌لیتر کلرید پتاسیم ۰/۰۲۵۲ مول (pH=۱) و ۳/٦ میلی‌لیتر سدیم استات ۰/٤ مول (pH=٤/٥) به‌طور جداگانه به لوله‌های آزمایش حاوی عصاره گیاهی افزوده شد. پس از مخلوط‌شدن مواد و عصاره گیاهی، قرائت نمونه آماده‌شده به‌ترتیب در طول موج ٥١٠ و ۷۰۰ نانومتر انجام شد.

$$A= (A510 - A700)_{ph=1} - (A510 - A700)_{ph=4.5}$$

پس از انجام محاسبات، به‌منظور تعیین دقیق میزان آنتوسیانین برحسب میلی‌گرم آنتوسیانین (معادل سیانیدین-۳- گلوکوزید) در گرم وزن تر نمونه از فرمول زیر استفاده شد.

$$TMA = ((A \times MW \times DF \times 100)/(\varepsilon \times l))$$

A510 جذب نمونه در طول موج ٥١٠ نانومتر و A700 جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۰۰ نانومتر، MW: وزن مولکولی سیانیدین ۳- گلوکوزید، DF: ضریب رقت، ε: جذب مولی و l: طول سل بر حسب سانتی‌متر بود.

**۲. ۲. ٤. فنل کل**

مقدار ترکیبات فنلی در برگ‌های گیاه با استفاده از روش فولین سیکالتو تعیین شد. دو گرم از بافت تازه برگ در نیتروژن مایع خیسانده و له شد و به آن سه میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد افزوده شد. نمونه‌ها در داخل میکروتیوب به‌مدت یک شب در دمای چهار درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس نمونه‌ها با سرعت ۱۰۰۰ دور دقیقه به‌مدت دو دقیقه سانتریفیوژ شدند. ماده شفاف رویی به‌منظور اندازه‌گیری ترکیبات فنولیک استفاده گردید. مخلوطی از ۱۳۵ میکرولیتر آب مقطر، ۷۵۰ میکرولیتر معرف فولین سیکالتو رقیق‌شده به نسبت ۱:۱۰ و ٦۰۰ میکرولیتر سدیم کربنات ۷/۵ درصد به ۵۰ میکرولیتر عصاره حاوی ترکیبات فنولیک در داخل میکروتیوپ ۱/۵ میلی‌لیتری افزوده شد. پس از ترکیب‌شدن مواد، نمونه در دمای ٤٥ درجه سانتی‌گراد در حمام آب داغ به‌مدت ۱۵ دقیقه نگهداری شد. پس از

1. High Performance Liquid Chromatography system crystal-200
2. Retention time
3. Aglycone

خنک‌شدن نمونه‌ها در دمای اتاق قرائت نمونه در طول موج ۷٦۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر صورت گرفت. جهت صفرکردن دستگاه در طول موج مورد نظر از استون ۸۰ درصد (v/v) استفاده شد. منحنی استاندارد با استفاده از گالیک اسید (یک میلی‌گرم بر گرم گالیک اسید در استون ۸۰ درصد (v/v)) تهیه شد.

**۲. ۲. ۵. اسیدهای فنلی**

برگ‌های تازه سیب در دمای اتاق خشک شده و سپس پودر گردید. استخراج با استفاده از متانول ۸۰ درصد و تکان دادن دائم به‌مدت ٤۸ ساعت انجام شد. ماده گیاهی باقی‌مانده با استفاده از صافی از محلول حذف شد. عصاره خام، تبخیر شده و دوباره در دی‌متیل سولفواکسید[1] به‌صورت محلول و به غلظت نهایی ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در آمد. عصاره با استفاده از حلال‌های فاز متحرک A (۰/۰۵ درصد فرمیک اسید محلول) و B (متانول) رقیق شدند. غلظت نهایی محلول دو میلی‌گرم بر لیتر بود. نمونه‌ها و استانداردها با استفاده از HPLC آنالیز شد. پنج میکرولیتر از نمونه‌ها به درون سیستم تزریق گردید. ترکیبات بر روی آشکارساز سریع Zorbax Eclipse XDB-C18 (۵۰ میلی‌متر × ٤/٦ میلی‌متر، ۱/۸ میکرومتر) در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد جدا شد. از آشکارساز حساس به نور استفاده شد. بررسی در ۳۰۰ نانومتر انجام شد. سرعت جریان فاز متحرک یک میلی‌لیتر بر دقیقه بود (Orčić *et al.*, 2014).

**۲. ۲. ٦. ترکیبات فلاونوئیدی**

مقدار یک گرم از نمونه تازه برگ توسط ترازو وزن شده و با استفاده از ۲۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد عصاره‌گیری شد. باقیمانده نمونه‌های گیاهی با استفاده از کاغذ واتمن فیلتر شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از نمونه به‌همراه سه میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۳ میلی‌لیتر سدیم نیترات پنج درصد در داخل میکروتیوب مخلوط شدند. محلول حاصل به‌خوبی مخلوط گردیده و به‌مدت پنج دقیقه در دمای اتاق نگهداری گردید. سپس به آن ۰/٦ میلی‌لیتر آلومینیوم کلرید ده درصد افزوده شد. بعد از شش دقیقه، دو میلی‌لیتر سدیم هیدروکسید یک مولار به آن افزوده شد. در پایان با استفاده از آب مقطر و به‌منظور رقیق‌سازی حجم محلول به ده میلی‌لیتر افزایش یافت. قرائت نمونه‌ها در طول موج ۵۱۰ نانومتر صورت گرفت (Karadeniz *et al.*, 2005).

**۲. ۲. ۷. عناصر غذایی**

به‌منظور اندازه‌گیری عناصر نیتروژن، فسفر، پتاسیم، کلسیم، آهن و روی مقدار ۰/۳ گرم از نمونه گیاهی با استفاده از ترازو وزن شده و به بالن ژوژه ۲۵۰ میلی‌لیتری منتقل گردید. سپس ۲/۳ میلی‌لیتر از مخلوط اسیدها (۱۸ میلی‌لیتر آب در داخل ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته شده و ۱۰۰ میلی‌لیتر سولفوریک اسید غلیظ به آب آن افزوده شد؛ پس از آن شش گرم اسید سالیسیلیک به محلول افزوده شد) به نمونه گیاهی افزوده شده و پس از آن با دقت تکان داده تا کاملاً با یکدیگر مخلوط شده و نمونه گیاهی با اسید تماس یابد. محلول به‌مدت ٢٤ ساعت در این شرایط نگهداری شد. پس از آن دمای نمونه به ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد افزایش داده شده و پس از خنک‌شدن، پنج قطره آب اکسیژنه (۳۰ درصد) به آن افزوده شد. سپس با استفاده از حرارت دمای نمونه تا ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد افزایش یافته تا تبخیر انجام شده و بخار سفید مشاهده گردد. پس از خنک‌شدن بالن ژوژه دوباره پنج قطره آب اکسیژنه به نمونه افزوده شد. مجدداً حرارت‌دادن آغاز شد و این روند تا بی‌رنگ‌شدن نمونه‌ها ادامه یافت. پس از خنک‌شدن نمونه‌ها ده سی‌سی آب به آنها افزوده شد. نمونه حاصل با تکان‌دادن، کاملاً مخلوط شده و در

1. DMSO

نهایت به حجم رسانیده و صاف شدند. مقدار نیتروژن با روش کجلدال، فسفر با روش نشر شعله‌ای و عناصر کم‌مصرف با استفاده از دستگاه جذب اتمی قرائت شد.

### ۲. ۳. تجزیه آماری

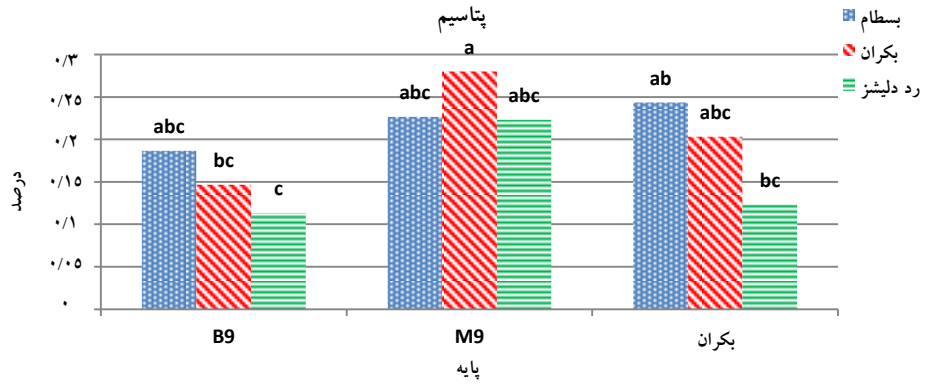
این آزمایش به‌صورت فاکتوریل بر پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار انجام شد. عامل اول، پایه در سه سطح، شامل پایه‌های پاکوتاه B9، M9 و پاجوش سیب توسرخ بکران و عامل دوم، رقم پیوندک در سه سطح، شامل ژنوتیپ‌های سیب توسرخ بکران و سیب توسرخ بسطام و رقم تجاری رد دلیشز بود. آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS-16.0[1] انجام شد و مقایسه میانگین داده‌ها در سطح پنج درصد با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن صورت گرفت.

## ۳. نتایج و بحث

نتایج این پژوهش نشان داد که فقط پایه بر مقدار نیتروژن و فسفر موجود در نمونه‌های برگ دو ژنوتیپ سیب توسرخ و رقم رد دلیشز و فاکتورهای پایه، پیوندک و برهمکنش پایه و پیوندک بر مقدار پتاسیم، آهن، کلسیم و عنصر روی در برگ سیب تأثیر معنی‌داری داشتند (شکل‌های ۱، ۲، ۳ و ٤). Sotiropoulos (2006) گزارش کرد که پایه‌ها بر مقدار نیتروژن، فسفر و پتاسیم برگ‌های رقم گلدن دلیشز پیوندی تأثیر داشتند اما بر غلظت عناصر میکرو برگ‌های پیوندک تأثیر معنی‌داری نداشتند. Malakoti & Tabatabaei (2001) نیز گزارش کردند که برگ‌های رقم دلباراستیوال[2] روی پایه MM111 از میزان نیتروژن بالاتری برخوردار بوده و میزان کلروفیل بیش‌تری داشتند. در بررسی‌های Talaei (1989) میزان نیتروژن برگ رقم دلباراستیوال روی پایه B9 کمتر از دو پایه دیگر بود که با نتایج این پژوهش و گزارش Jones (1971) در مورد کم‌بودن غلظت نیتروژن در پایه‌های پاکوتاه، مطابقت داشت. نتایج این پژوهش با یافته‌های Abdalla *et al.* (1982) مبنی بر این‌که مقدار نیتروژن، فسفر، پتاسیم و آهن در ژنوتیپ‌های پاکوتاه، بیش‌ترین و در ارقام پررشد کم‌ترین مقدار بود، مغایرت داشت که به‌نظر می‌رسد مقدار جذب عناصر غذایی بیش‌تر به ژنتیک پایه و مکانیزم پاکوتاهی مربوط باشد. در آزمایش Moharrami *et al.* (2011) پایه M9 در مقایسه با پایه‌های پررشد، دارای نیتروژن کم‌تر و آهن بیش‌تری بود درحالی‌که از نظر جذب فسفر، پتاسیم، کلسیم و روی، اختلاف معنی‌داری با دیگر پایه‌های مورد آزمون نشان نداده است. ولی نتایج این پژوهش نشان داد که پایه M9 از نظر جذب تمامی عناصر مورد بررسی نسبت به دو پایه دیگر برتری داشت. به این ترتیب می‌توان چنین نتیجه گرفت که پایه M9 از نظر جذب عناصر غذایی تفاوت چندانی با پایه‌های قوی و پررشد نداشته و مکانیزم‌های دیگری در پاکوتاهی آن دخیل هستند، لذا می‌توان این پایه را پایه‌ای پاکوتاه و متمایز دانست که قابلیت بالقوه‌ای برای تولید میوه‌هایی با کیفیت بالاتر نسبت به پایه B9 داراست. پاجوش بکران از نظر جذب عناصر معدنی حد متوسطی بین دو پایه دیگر بود و پایه B9 با دارابودن مواد فنلی و فلاونوئیدی بیش‌تر علاوه بر پاکوتاهی می‌تواند پتانسیل مقاومت بیش‌تری به انواع تنش‌های محیطی و سرما داشته باشد.

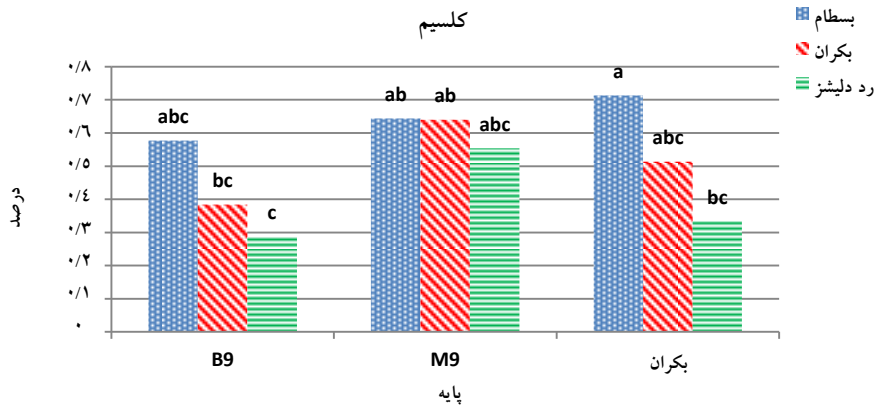
مشابه نتایج این پژوهش، تحقیقات Fallahi *et al.* (2001) در رقم "فوجی" روی پایه‌های M9، M26 EMLA و M106 EMLA و M111 EMLA نشان داد که پایه‌ها تأثیر معنی‌داری بر مقادیر عناصر کلسیم و روی داشته و Rom *et al.* (1991) نیز در رقم "استارک اسپور دلیشز" روی پایه‌های M27 EMLA و MAC9 گزارش کردند که پایه‌ها تأثیر معنی‌داری بر میزان غلظت عناصر پتاسیم و کلسیم داشتند.

1. Chicago, Illinois SPSS, Inc.,
2. Delbarstival



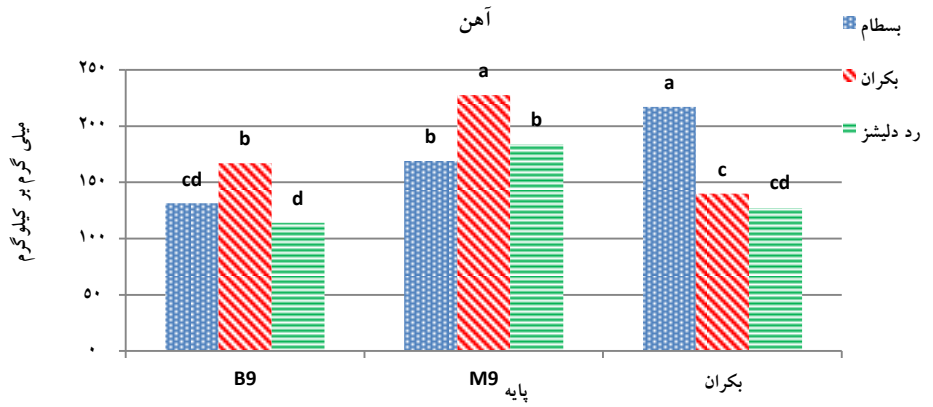

**شکل ۲. اثر متقابل پایه و پیوندک بر مقدار پتاسیم در برگ‌های دو ژنوتیپ سیب توسرخ و رقم رد دلیشز**

(حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد براساس آزمون دانکن است.)



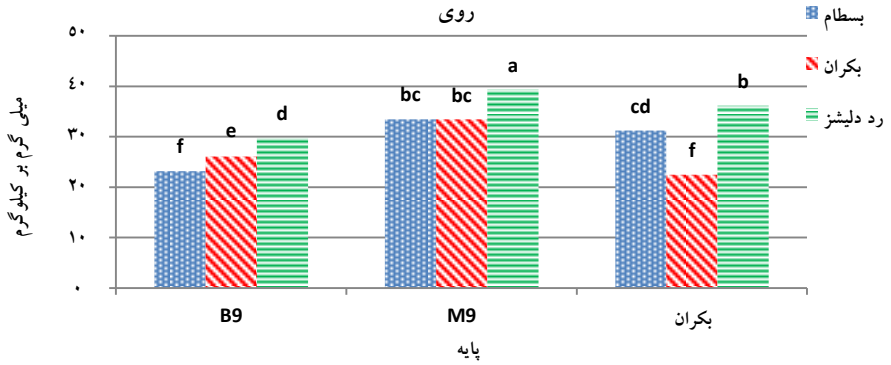

**شکل ۳. اثر متقابل پایه و پیوندک بر مقدار کلسیم در برگ‌های دو ژنوتیپ سیب توسرخ و رقم رد دلیشز**

(حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد براساس آزمون دانکن است.)




**شکل ٤. اثر متقابل پایه و پیوندک بر مقدار عنصر آهن در برگ‌های دو ژنوتیپ سیب توسرخ و رقم رد دلیشز**

(حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد براساس آزمون دانکن است.)




**شکل ۵. اثر متقابل پایه و پیوندک بر مقدار عنصر روی در برگ‌های دو ژنوتیپ سیب توسرخ و رقم رد دلیشز**
**(حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد براساس آزمون دانکن است.)**

Moharrami *et al.* (2011) تأثیر معنی‌دار پایه‌های M9، MM111 و MM106 بر مقدار کلسیم، آهن و روی در نمونه‌های برگ سیب رقم دلباراستیوال را گزارش نمودند. آنها افزایش میزان آهن برگ را به قدرت رشد رویشی بالای درختان نسبت دادند. حال آن‌که نتایج Fallahi *et al.* (2001) و Moharrami *et al.* (2011) در مورد تأثیر پایه‌ها بر مقادیر نیتروژن و فسفر با یافته‌های این پژوهش در مورد معنی‌دارنبودن تأثیر پایه‌ها بر مقادیر این عناصر مطابقت ندارد. هم‌چنین، تفاوت‌های ناشی از تأثیر رقم بر مقدار عناصر غذایی موجود در نمونه‌های برگ نشان داد که ژنوتیپ توسرخ بکران با دارابودن بیش‌ترین مقدار عناصر نیتروژن، فسفر، پتاسیم و آهن برگ در جایگاه اول قرار داشت درحالی‌که نمونه برگ ژنوتیپ توسرخ بسطام دارای بیش‌ترین مقدار عنصر کلسیم و برگ‌های رقم رد دلیشز دارای بیش‌ترین مقدار عنصر روی بودند (شکل‌های ۱، ۲، ۳ و ٤). نتایج این پژوهش با یافته‌های Chen *et al.* (2014) در مورد مقدار بیش‌تر کلسیم در ارقام سیب توسرخ نسبت به برخی ارقام اهلی و تجاری سیب نیز مطابقت داشت.

### ۳. ۱. تعیین کمی تأثیر پایه بر مقدار عناصر غذایی

نتایج این پژوهش نشان داد که تأثیر پایه B9 بر مقدار تمامی عناصر نمونه برگ پیوندک‌های سیب در همه تیمارها منفی بود، به‌عبارت دیگر پایه باعث کاهش مقدار عناصر غذایی برگ شد. برخلاف این، تأثیر پایه M9 در تمامی موارد مثبت بوده و باعث افزایش مقدار عناصر غذایی نمونه‌های برگی شد درحالی‌که تأثیر پایه بکران بر مقدار عناصر غذایی نمونه‌های برگ ژنوتیپ بسطام مثبت و در ژنوتیپ سیب توسرخ بکران و رقم رد دلیشز، بجز برای عنصر روی، برای دیگر عناصر تأثیر منفی داشت (جدول‌های ۱ تا ٦). این موضوع با توجه به پاکوتاه‌تربودن پایه B9 نسبت به پایه M9 قابل‌توجیه می‌باشد و با پژوهش‌های Talaei (1989) مطابقت داشت.

### ۳. ۲. همبستگی مقدار عناصر غذایی، فعالیت آنزیم‌ها و تولید متابولیت‌های ثانویه

بدون شک مسیر فنیل پروپانوئید یکی از چندین مسیر شگفت‌انگیز در فیزیولوژی درختان میوه است. پیش‌ماده‌های کربنی براساس برنامه‌های ژنتیکی تعریف‌شده در فیزیولوژی هر ژنوتیپ به یکی از چندین شاخه مسیر فنیل پروپانوئید هدایت شده و منجر به تولید مواد خاصی می‌شوند که ادامه زندگی و بقا را برای گیاه آسان‌تر می‌کند.

جدول ۱. تأثیر پایه بر مقدار نیتروژن (درصد) در برگ دو ژنوتیپ سیب توسرخ و رقم رد دلیشز

| پیوندک | نیتروژن در برگ پیوندک | ترکیب پیوندی | نیتروژن در برگ ترکیب پیوندی | تغییر |
|---|---|---|---|---|
| بسطام | ۰/۲۲±۰/۰۱[b] | بسطام/B9 | ۰/۱۹±۰/۰۱ | −۰/۰۳ |
| | | بسطام/M9 | ۰/۲۳±۰/۰۱ | ۰/۰۱ |
| | | بسطام/بکران | ۰/۲۵±۰/۰۱ | ۰/۰۳ |
| بکران | ۰/۲٤±۰/۰۰[a] | بکران/B9 | ۰/۱۷±۰/۰۹ | −۰/۰۷ |
| | | بکران/M9 | ۰/۲۷±۰/۰۱ | ۰/۰۳ |
| | | بکران/بکران | ۰/۲۱±۰/۰۰ | −۰/۰۳ |
| رد دلیشز | ۰/۲۵±۰/۰۲[a] | رد دلیشز/B9 | ۰/۱٤±۰/۰۷ | −۰/۱۱ |
| | | رد دلیشز /M9 | ۰/۲۹±۰/۰۰ | ۰/۰٤ |
| | | رد دلیشز/بکران | ۰/۱۵±۰/۰۸ | −۰/۱۰ |

جدول ۲. تأثیر پایه بر مقدار فسفر (درصد) در برگ دو ژنوتیپ سیب توسرخ و رقم رد دلیشز

| پیوندک | فسفر | ترکیب پیوندی | فسفر در برگ ترکیب پیوندی | تغییر |
|---|---|---|---|---|
| بسطام | ۰/٤۲±۰/۰۲[c] | بسطام/B9 | ۰/۳٦±۰/۰۱ | −۰/۰٦ |
| | | بسطام/M9 | ۰/٤٦±۰/۰۱ | ۰/۰٤ |
| | | بسطام/ بکران | ۰/٤۳±۰/۰۱ | ۰/۰۱ |
| بکران | ۰/۵۳±۰/۰۲[a] | بکران/B9 | ۰/۳۷±۰/۲۰ | −۰/۱۱ |
| | | بکران/M9 | ۰/۵۸±۰/۰۱ | ۰/۱۰ |
| | | بکران/ بکران | ۰/٤۷±۰/۰۱ | −۰/۰۱ |
| رد دلیشز | ۰/٤۹±۰/۰۲[b] | رد دلیشز/B9 | ۰/۲۹±۰/۱٤ | −۰/۰۹ |
| | | رد دلیشز /M9 | ۰/۵۲±۰/۰۱ | ۰/۱٤ |
| | | رد دلیشز/ بکران | ۰/۳۲±۰/۱٦ | −۰/۰٦ |

جدول۳. تأثیر پایه بر مقدار پتاسیم (درصد) در برگ دو ژنوتیپ سیب توسرخ و رقم رد دلیشز

| پیوندک | پتاسیم در برگ پیوندک | ترکیب پیوندی | پتاسیم در برگ ترکیب پیوندی | تغییر |
|---|---|---|---|---|
| بسطام | ۰/۲۲±۰/۰۱[b] | بسطام/B9 | ۰/۱۹±۰/۰۱ | −۰/۰۳ |
| | | بسطام/M9 | ۰/۲۳±۰/۰۱ | ۰/۰۱ |
| | | بسطام/ بکران | ۰/۲٤±۰/۰۱ | ۰/۰۲ |
| بکران | ۰/۲٤±۰/۰۱[a] | بکران/B9 | ۰/۱۵±۰/۰۷ | −۰/۰٦ |
| | | بکران/M9 | ۰/۲۸±۰/۰۱ | ۰/۰۷ |
| | | بکران/ بکران | ۰/۲۰±۰/۰۱ | −۰/۰۱ |
| رد دلیشز | ۰/۲۰±۰/۰۱[b] | رد دلیشز/B9 | ۰/۱۱±۰/۰۵ | −۰/۰٤ |
| | | رد دلیشز /M9 | ۰/۲۲±۰/۰۰ | ۰/۰۷ |
| | | رد دلیشز/ بکران | ۰/۱۲±۰/۰٦ | −۰/۰۳ |

جدول ٤. تأثیر پایه بر مقدار کلسیم (درصد) در برگ دو ژنوتیپ سیب توسرخ و رقم رد دلیشز

| پیوندک | کلسیم در برگ پیوندک | ترکیب پیوندی | کلسیم در برگ ترکیب پیوندی | تغییر |
|---|---|---|---|---|
| بسطام | ٠/٦٤±٠/٠٢[a] | بسطام/B9 | ٠/٥٨±٠/٠١ | -٠/٠٦ |
| | | بسطام/M9 | ٠/٦٤±٠/٠١ | ٠/٠٠ |
| | | بسطام/ بکران | ٠/٧١±٠/٠٠ | ٠/٠٧ |
| بکران | ٠/٥٨±٠/٠٢[b] | بکران/B9 | ٠/٣٨±٠/١٩ | -٠/١٣ |
| | | بکران/M9 | ٠/٦٤±٠/٠١ | ٠/١٣ |
| | | بکران/ بکران | ٠/٥١±٠/٠١ | ٠/٠٠ |
| رد دلیشز | ٠/٥١±٠/٠٢[c] | رد دلیشز/B9 | ٠/٢٩±٠/١٤ | -٠/١٠ |
| | | رد دلیشز /M9 | ٠/٥٥±٠/٠٠ | ٠/١٦ |
| | | رد دلیشز/ بکران | ٠/٣٣±٠/١٧ | -٠/٠٦ |

جدول ٥. تأثیر پایه بر مقدار آهن (میلی‌گرم بر کیلوگرم) در برگ پیوندک‌های دو ژنوتیپ سیب توسرخ و رقم رد دلیشز

| پیوندک | آهن در برگ پیوندک | ترکیب پیوندی | آهن در برگ ترکیب پیوندی | تغییر |
|---|---|---|---|---|
| بسطام | ١٧٢/٤٤±١٣/٠٩[a] | بسطام/B9 | ١٣١/٣٣±٨/١٠ | -٤١/١١ |
| | | بسطام/M9 | ١٦٩/٠٠±٥/٦٩ | -٣/٤٤ |
| | | بسطام/ بکران | ٢١٧/٣٣±١٠/٦٩ | ٤٤/٥٦ |
| بکران | ١٧٩/٦٢±١٥/٢٠[a] | بکران/B9 | ١٦٧/٠٠±١١/٠٠ | -١١/٢٢ |
| | | بکران/M9 | ٢٢٧/٦٧±٨/٠١ | ٤٩/٤٥ |
| | | بکران/ بکران | ١٤٠/٠٠±٧/٧٧ | -٣٨/٢٢ |
| رد دلیشز | ١٥٣/٣٣±١٤/٠٦[b] | رد دلیشز/B9 | ١١٤/٠٠±٠/٠٠ | -٢٧/٦٧ |
| | | رد دلیشز /M9 | ١٨٤/٠٠±٤/١٦ | ٤٢/٣٣ |
| | | رد دلیشز/ بکران | ١٢٧/٠٠±٦/٠٠ | -١٤/٦٧ |

جدول ٦. تأثیر پایه بر مقدار عنصر روی (میلی‌گرم بر کیلوگرم) در برگ پیوندک‌های دو ژنوتیپ سیب توسرخ و رقم رد دلیشز

| پیوندک | روی در برگ پیوندک | ترکیب پیوندی | روی در برگ ترکیب پیوندی | تغییر |
|---|---|---|---|---|
| بسطام | ٢٩/٢٦±١/٦٦[b] | بسطام/B9 | ٢٣/١٤±١/٠٤ | -٦/١٢ |
| | | بسطام/M9 | ٣٣/٤٥±١/٠٣ | ٤/١٩ |
| | | بسطام/ بکران | ٣١/١٩±١/٢٥ | ١/٩٣ |
| بکران | ٢٧/٤٧±١/٨٥[b] | بکران/B9 | ٢٦/٠٨±١/٣٣ | -١/٢٤ |
| | | بکران/M9 | ٣٣/٤١±٠/٥٢ | ٦/٠٩ |
| | | بکران/ بکران | ٢٢/٤٦±٠/٥٧ | ٤/٨٦ |
| رد دلیشز | ٣٦/٦٩±١/٥٧[b] | رد دلیشز/B9 | ٢٩/٧٦±٠/٠٠ | -٥/٣٣ |
| | | رد دلیشز/M9 | ٣٩/٣٤±٠/٧٥ | ٤/٢٥ |
| | | رد دلیشز/ بکران | ٣٦/١٨±٠/٥٩ | ١/٠٩ |

توجیه این‌که هر عنصر مستقیماً بر فعالیت کدام آنزیم، واکنش و محصول این مسیر تأثیر می‌گذارد، نیاز به بررسی‌های دقیق‌تری دارد. هم‌چنین، پایه‌های متفاوت عناصر خاصی را ترجیح می‌دهند که با ساخت ترکیبات ویژه‌ای می‌توانند در برابر انواع تنش‌ها مؤثر باشند. عناصر غذایی کم‌مصرف به‌صورت کوفاکتور در ساختن ترکیبات بیوشیمیایی مانند آنزیم‌های گوناگون، هورمون‌های گیاهی، پروتئین‌ها و خصوصاً ترکیبات فنلی در گیاهان شرکت می‌کنند (Sobhana *et al.*, 2000). نتایج این پژوهش نشان داد که فعالیت آنزیم PAL با عناصر نیتروژن، پتاسیم، کلسیم، آهن و روی همبستگی مثبت معنی‌داری دارد (جدول ۷). معمولاً در گیاهان با کمبود نیتروژن افزایش فعالیت آنزیم PAL رخ می‌دهد (Matros *et al.*, 2006). نیتروژن پایین به‌دلیل محدودیت تولید پروتئین سبب افزایش فنیل‌آلانین می‌شود، از این‌رو فنیل‌آلانین بیش‌تری برای تولید متابولیت‌های ثانویه در دسترس است. Strissel *et al.* (2005) نیز کاهش فعالیت آنزیم PAL و فلاونوئیدها را در برگ‌های جوان سیب که به آنها کود نیتروژن بالا عرضه شده بود، مشاهده کردند. افزایش فعالیت آنزیم PAL در شرایط کوددهی بالای پتاسیم نیز توسط Wei *et al.* (1990) در گل داوودی[1] مشاهده شد. افزایش بیان ژن PAL توسط Li *et al.* (2009) در ذرت زمانی که در معرض مقادیر بالایی از پتاسیم قرار گرفتند، مشاهده شد که ممکن است به‌دلیل نقش پتاسیم در فعال‌سازی آنزیم باشد. افزایش فنل کل و بیوسنتز فلاونوئیدها با افزایش عرضه کودهای پتاسیمی ممکن است به‌دلیل نقش پتاسیم به‌عنوان کوفاکتور در فعالیت آنزیم PAL باشد. برخلاف نظر Tan (1980)، Ibrahim *et al.* (2011) گزارش کردند که با افزایش بیش‌تر پتاسیم موجود فعالیت آنزیم PAL افزایش یافته و بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه افزایش می‌یابد. نتایج این پژوهش نشان داد که مقدار عناصر پتاسیم، کلسیم و آهن همبستگی بالایی با فعالیت آنزیم UFGT دارند. مقدار فلاونوئید کل نیز با عناصر کلسیم و روی (به‌ترتیب ۰/٦٤ و ۰/٤٥-) همبستگی معنی‌داری نشان داد. سنتز آنتوسیانین نیز با مقدار نیتروژن همبستگی مثبت (۰/٤٧) نشان داد (جدول ۷). برخلاف نتایج این پژوهش Awad *et al.* (2000) همبستگی منفی بین نیتروژن و غلظت سیانیدین- ۳- گالاکتوزید و فلاونوئید مشاهده کردند. Dedaldechamp *et al.* (1995) گزارش کردند که در کشت سوسپانسیون سلولی با کاهش مقدار نیتروژن و فسفر، مقدار آنتوسیانین افزایش یافت. این در حالی است که در پژوهش Pirie & Mullins (1976) و Sakamoto *et al.* (1994) با افزودن نیتروژن به سوسپانسون‌های سلولی، مقدار آنتوسیانین کاهش یافت. نتایج این پژوهش مشابه گزارش‌هایی است که کمبود نیتروژن، افزایش آنتوسیانین و ارغوانی‌شدن را در پی داشته است. در مورد فسفر با این‌که در پژوهش‌های بسیاری اشاره شده که میزان بالای آنتوسیانین در گیاه نشانه کمبود فسفر است (Nozzolillo *et al.*, 1990; Close *et al.*, 2000)، ولی همبستگی معنی‌داری بین آنتوسیانین و فسفر مشاهده نشد (جدول ۷). محدودیت نیتروژن نسبت به کاهش فسفر تأثیر بیش‌تری بر افزایش مقدار فلاونول ها دارد. Bongue-Bartelsman & Phillips (1995) گزارش کردند که در شرایط تنش نیتروژن غلظت فلاونول ها سه تا چهار بار افزایش یافت. تصور می‌شود که رشد گیاه در شرایط کمبود نیتروژن همراه با تولید متابولیت‌های ثانویه بیش‌تری باشد. تئوری تعادل کربن/ عناصر غذایی پیشنهاد می کند که زمانی‌که عناصر غذایی کاهش می‌یابند سبب به‌وجودآمدن یک نسبت بالای کربن به مواد غذایی شده و ممکن است سبب کاهش رشد شوند درحالی‌که فتوسنتز هنوز ادامه دارد و منجر به تجمع کربوهیدرات به مقدار بیش‌تر از نیاز رشدی می‌شود.

1. *Chrysanthemum morifolium*

جدول ۷. همبستگی بین مقدار عناصر مختلف و فعالیت آنزیم‌های PAL و UFGT، فنل و فلاونوئید کل و آنتوسیانین در نمونه‌های برگ دو ژنوتیپ سیب توسرخ و رقم رد دلیشز

| | ۱ | ۲ | ۳ | ٤ | ٥ | ٦ | ۷ | ۸ | ۹ | ۱۰ | ۱۱ | ۱۲ | ۱۳ | ۱٤ | ۱٥ | ۱٦ | ۱۷ | ۱۸ | ۱۹ | ۲۰ | ۲۱ | ۲۲ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ۱ آنزیم PAL | ۱ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ۲ آنزیم UFGT | ۰/۵۹** | ۱ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ۳ فنل کل | -۰/٤۳* | -۰/۲۱ | ۱ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ٤ فلاونوئید کل | ۰/۱۲ | ۰/٦۷** | -۰/۰۱ | ۱ | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ٥ آنتوسیانین | ۰/۷۰** | ۰/۹۲** | -۰/۲٦ | ۰/٥۹** | ۱ | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ٦ کوئرستین-۳-رامنوزاید | ۰/٦۷** | ۰/٤۸* | -۰/۳۳ | ۰/۳٦ | ۰/٦۷** | ۱ | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ۷ روتین | ۰/۷۲** | ۰/۲٥ | -۰/۲۰ | ۰/۱۲ | ۰/٤۹* | ۰/٦۳** | ۱ | | | | | | | | | | | | | | | |
| ۸ لوتئولین | ۰/۲٤ | -۰/۰۲ | ۰/۱٥ | ۰/۲٦ | ۰/۱۳ | ۰/۰٤ | ۰/۳۸ | ۱ | | | | | | | | | | | | | | |
| ۹ کوئرستینها | ۰/٥۱** | -۰/٦۰ | ۰/۳۱ | ۰/۰٥ | ۰/۳۹ | -۰/۷۷** | ۰/٦٥** | -۰/۱۰ | ۱ | | | | | | | | | | | | | |
| ۱۰ کامفرول | -۰/۸۲** | -۰/۳٥ | ۰/۱۷ | ۰/۱۸ | -۰/٥٤** | -۰/٦۹** | ۰/۷٤** | -۰/۰٤ | ۰/٦۱** | ۱ | | | | | | | | | | | | |
| ۱۱ وراتیک | ۰/۷۸** | ۰/۳۷ | -۰/٤٦* | ۰/۰۷ | ۰/٥٤** | ۰/۸٦** | ۰/۷٤** | ۰/۱۰ | -۰/۷۱** | -۰/۸۲** | ۱ | | | | | | | | | | | |
| ۱۲ فرولیک اسید | -۰/۸٤** | -۰/٤۰ | ۰/۱٤ | ۰/۰٤ | -۰/٥۹** | -۰/۷٥** | -۰/۸۲** | -۰/۲۰ | ۰/٦۳** | ۰/۹۷** | -۰/۸٦** | ۱ | | | | | | | | | | |
| ۱۳ کوماریک | ۰/٤۸* | ۰/۹۱** | -۰/۳٦ | ۰/٥۱* | ۰/۷٤** | ۰/۳۱ | ۰/۰٦ | ۰/۳۲ | ۰/۰۸ | -۰/۲٤ | ۰/۲۲ | -۰/۲۳ | ۱ | | | | | | | | | |
| ۱٤ کافئیک اسید | ۰/۱۹ | ۰/۹۰ | -۰/۳۸ | ۰/۲۸ | ۰/۰۱ | -۰/۱۲ | ۰/۰۲ | ۰/۳۷ | -۰/۰۳ | ۰/۳٦ | -۰/۱۳ | ۰/۲۲ | ۰/۰۷ | ۱ | | | | | | | | |
| ۱٥ کلرژنیک اسید | ۰/۱۸ | ۰/۷٥** | -۰/۰۹ | ۰/٤۳* | -۰/٥۷** | ۰/۲۱ | -۰/۱۲ | -۰/٤۰ | ۰/۲۹ | -۰/۱۸ | ۰/۱۱ | -۰/۱۳ | ۰/۸۳** | -۰/۳۹ | ۱ | | | | | | | |
| ۱٦ هموژنتیستیک | ۰/۱٥ | -۰/۳۹ | ۰/۲۱ | -۰/۲٦ | -۰/۰۸ | ۰/۳۷ | ۰/٥٦** | ۰/٤٤* | -۰/٦۸** | -۰/٤ | ۰/٤۲* | -۰/٤۸* | -۰/٦٥** | -۰/۱۰ | -۰/٦٦** | ۱ | | | | | | |
| ۱۷ نیتروژن | ۰/۷۸** | ۰/۲۰ | ۰/۰۱ | -۰/۰٦ | ۰/٤۷* | ۰/۷٤** | ۰/۸۱** | ۰/۳۹ | -۰/۷۰** | -۰/۸۲** | ۰/٦۲** | -۰/٥۸** | ۰/۱٦ | ۰/۲۳ | -۰/۰۷ | ۰/۳۸ | ۱ | | | | | |
| ۱۸ فسفر | ۰/۲۷ | -۰/۱۸ | ۰/۳٤ | -۰/۰۹ | ۰/۱۱ | ۰/۳۹ | ۰/٦٥** | ۰/٦۲** | -۰/٥۳** | -۰/٤۷* | ۰/٤٦* | -۰/٤٤* | -۰/۱۰ | ۰/۱۹ | -۰/۲٤ | ۰/٥۳** | ۰/۷۰** | ۱ | | | | |
| ۱۹ پتاسیم | ۰/٤٤* | ۰/٥۰* | ۰/۱٦ | ۰/۲٦ | ۰/۷۳** | ۰/٦۷** | ۰/٥۹** | ۰/۲٥ | -۰/٦۱** | -۰/٦۰** | ۰/٥۱** | -۰/٥۰* | ۰/۳۳ | ۰/۱۸ | ۰/۱۳ | ۰/۲۸ | ۰/٦٤** | ۰/٦۰** | ۱ | | | |
| ۲۰ کلسیم | ۰/٥۲* | ۰/۹٤** | -۰/۱٥ | ۰/٦٤** | ۰/۹٥** | ۰/٦٤** | ۰/۳۷ | ۰/۰٤ | -۰/۳۰ | -۰/٤۱* | ۰/٤٤* | -۰/۳٦ | ۰/٦۱** | ۰/۲۷ | ۰/۳۸ | -۰/۰۹ | ۰/۳۱ | ۰/۰۱ | ۰/٦۷** | ۱ | | |
| ۲۱ آهن | ۰/٦۱** | ۰/٦۳** | -۰/۰٤ | ۰/۳۲ | ۰/۷۹** | ۰/۸۳** | ۰/٦۱** | ۰/۲۰ | -۰/٦۷** | -۰/٦۹** | ۰/٦٦** | -۰/۷٥** | ۰/٤۰ | -۰/۱٦ | ۰/۳۲ | ۰/۳٥ | ۰/٦۹** | ۰/٤٥* | ۰/۸٦** | ۰/۷۸** | ۱ | |
| ۲۲ روی | ۰/۷۳** | ۰/۱۲ | -۰/۱۱ | -۰/٤٥* | ۰/۳۱ | ۰/٤۱* | ۰/۷۱** | -۰/۰۱ | -۰/٤٦* | -۰/۸۸** | ۰/٦۸** | -۰/۸٤** | ۰/۱۰ | -۰/۳۱ | ۰/۰٤ | ۰/۳۷ | ۰/٦۸** | ۰/٤۱* | ۰/۳۳ | ۰/۱٦ | ۰/٤۲* | ۱ |

* و **: اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال خطای پنج و یک درصد.

اعتقاد بر این است که این ساختارهای کربوهیدراتی برای فراهم‌ساختن پیش‌ماده‌های اضافی برای تولید متابولیت‌های ثانویه مبتنی بر کربن مانند تانن‌ها و مواد فنلی مورد استفاده قرار می‌گیرند. در دسترس‌بودن مواد غذایی فراوان‌تر، به گیاه اجازه می‌دهد تا نیتروژن بیش‌تری علاوه بر آن‌چه که برای رشد اولیه نیاز دارد در گیاه تجمع یابد.

افزایش تولید فنل کل و فلاونوئیدها با افزایش سطوح پتاسیم ممکن است به‌دلیل افزایش کربوهیدرات‌های غیرساختاری به‌دلیل نقش پتاسیم در تحریک فعالیت‌های فتوسنتزی و افزایش انتقال کربوهیدرات‌ها به قسمت‌های مختلف گیاه باشد. این افزایش انتقال به‌طور غیرمستقیم بیوسنتز فنل کل و فلاونوئیدها را در لابیسیا پامیلا[1] که با کود پتاسیم تیمار شده بود، افزایش داد (Ibrahim *et al*., 2012).

## ٤. نتیجه‌گیری

پژوهش حاضر شواهد روشنی را در مورد محتوای مواد فنلی و فلاونوئیدهای موجود در برگ دو ژنوتیپ سیب توسرخ ایرانی فراهم کرد و نشان داد که این ترکیبات و فعالیت آنزیم‌های مهم PAL و UFGT در مسیر تولید متابولیت‌های ثانویه چگونه با مقدار عناصر غذایی و نوع پایه تحت تأثیر قرار می گیرند. با در نظر گرفتن نتایج این پژوهش و گزارش‌های دیگر پژوهش‌گران می‌توان چنین نتیجه گرفت که در بیش‌تر پژوهش‌های انجام‌شده سطوح اولیه عناصر در گیاه و آستانه کمبود این عناصر در گیاهان در نظر گرفته نشده است، به‌نظر می‌رسد همبستگی مقدار عناصر نیتروژن و پتاسیم در گیاه بیش‌تر به مقدار موجود آن عنصر در بافت های گیاهی و آستانه کمبود آن مربوط باشد. چنان‌چه مقدار عنصر در حد بهینه باشد با افزایش مقدار آن، فعالیت آنزیم‌ها و تولید متابولیت‌های ثانویه کاهش می‌یابد و هرگاه برای رسیدن به حد بهینه عناصر نیتروژن و پتاسیم نیاز به مقادیر بیش‌تری از این عناصر غذایی باشد با افزایش مقدار آنها فعالیت آنزیم‌ها و تولید متابولیت‌های ثانویه نیز افزایش می‌یابد.

## ٥. تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

## ٦. منابع


Abdalla, O. A., Khatamian, H. & Miles, N.W., (1982). Effect of rootstocks and interstems oncomposition of ‘Delicious’ apple leaves. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, *107*, 730-733.

Aguirre, P. B., Al-Hinai, Y. K., Roper, T. R. & Krueger, A. R. (2001). Apple tree rootstock and fertilizer application timing affect nitrogen uptake. *HortScience*, 36(7), 1202-1205. https://doi.org/10.21273/HORTSCI.36.7.1202

Awad, M. A., de Jager, A. & van Westing, L. M. (2000). Flavonoid and chlorogenic acid levels in apple fruit: characterisation of variation. *Scientia Horticulturae*, 83(3-4), 249-263. https://doi.org/10.1016/S0304-4238(99)00124-7

Bongue Bartelsman, M. & Phillips, D. A. (1995). Nitrogen stress regulates gene expression of enzymes in the flavonoid biosynthetic pathway of tomato [anthocyane]. Plant Physiology and Biochemistry. (France)

Boyer, J. & Liu, R.H. (2004). Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutrition Journal*, 3(1), 5. https://doi.org/10.1186/1475-2891-3-5

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annual Biochemystry*, 72, 248.

Chagné, D., Lin-Wang, K., Espley, R. V., Volz, R. K., How, N. M., Rouse, S., Brendolise, C., Carlisle, C.M., Kumar, S., De Silva, N., Micheletti, D. & Micheletti, D. (2013). An ancient duplication of apple MYB transcription factors is responsible for novel red fruit-flesh phenotypes. *Plant Physiology*, 161(1), 225-239. https://doi.org/10.1104/pp.112.206771

Chen, X. S., Zhang, J., Liu, D. L., Ji, X. H., Zhang, Z. Y., Zhang, R., Mao, Z.Q., Zhang, Y.M., Wang, L.X. & Li, M. (2014). Genetic variation of F1 population between Malus sieversii f. neidzwetzkyana and apple varieties and evaluation on fruit characters of functional apple excellent strains. *Scientia Agricultura Sinica*, *47*(11), 2193-2204.


1. *Labisia pumila* Benth .

Close, D.C., Beadle, C.L., Brown, P.H. & Holz, G.K. (2000). Cold-induced photoinhibition affects establishment of Eucalyptus nitens (Deane and Maiden) Maiden and Eucalyptusglobulus Labill. Trees, 15(1), 32-41. https://doi.org/10.1007/s004680000070

Ibrahim, M., Jaafar, H., Karimi, E. & Ghasemzadeh, A. (2012). Primary, secondary metabolites, photosynthetic capacity and antioxidant activity of the Malaysian Herb Kacip Fatimah (*Labisia pumila* Benth) exposed to potassium fertilization under greenhouse conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(11), 15321-15342. https://doi.org/10.3390/ijms131115321

D'Abrosca, B., Pacifico, S., Cefarelli, G., Mastellone, C. & Fiorentino, A. (2007). 'Limoncella'apple, an Italian apple cultivar: Phenolic and flavonoid contents and antioxidant activity. *Food Chemistry*, 104(4), 1333-1337. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.073

Dedaldechamp, F., Uhel, C. & Macheix, J. J. (1995). Enhancement of anthocyanin synthesis and dihydroflavonol reductase (DFR) activity in response to phosphate deprivation in grape cell suspensions. Phytochemistry, 40(5), 1357-1360. https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)00480-U

Faramarzi, Sh., Yadollahi, A., Hajnajari, H., Shojaeean, A. & Damyar, S. (2014). Study of morphological characteristics of Iranian red-fleshed apples vs. some Iranian landraces and commercial cultivars. *Journal of Crops Improvement*, 16 (1)1-10. (in Persian)

Fallahi, E., Chun, I. J., Neilsen, G. H. & Colt, W. M. (2001). Effects of three rootstocks on photosynthesis, leaf mineral nutrition, and vegetative growth of "BC-2 Fuji" apple trees. Journal of Plant Nutrition, 24(6), 827-834. https://doi.org/10.1081/PLN-100103776

Gerats, A.G.M., Bussard, J., Coe, E.H. & Larson, R. (1984). Influence of B and Pl on UDPG: Flavonoid-3-O-glucosyltransferase in *Zea mays* L. *Biochemical Genetics*, 22(11-12), 1161-1169. https://doi.org/10.1007/BF00499639

Giusti, M.M. & Wrolstad, R.E. (2001). Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. In: Wrolstad, R.E. (Ed.), Current Protocols in Food Analytical Chemistry. John Wiley & Sons, New York. Unit F1. 2.1-13. https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0102s00

Higgs, K.H. & H.G. Jones. (1991). Water relations and cropping of apple cultivars on a dwarfing rootstock in response to imposed drought. *Journal of Horticultural Sciences*, 66, 367-379. https://doi.org/10.1080/00221589.1991.11516164

Jones, O.P. (1971). Effects of rootstocks and interstocks on the xylem sap composition in apple trees: effects on nitrogen, phosphorus, and potassium content. *Annuals of Botany*, 35(4), 825-836. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a084526

Ju, Z., Liu, C. & Yuan, Y. (1995). Activities of chalcone synthase and UDPGal: flavonoid-3-o-glycosyltransferase in relation to anthocyanin synthesis in apple. *Scientia Horticulturae*, 63(3-4), 175-185. https://doi.org/10.1016/0304-4238(95)00807-6

Karadeniz, F., Burdurlu, H. S., Koca, N. & Soyer, Y. (2005). Antioxidant activity of selected Ruits and vegetables grown in Turkey. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 29, 297-303.

Kondo, S., Tsuda, K., Muto, N. & Ueda, J. E. (2002). Antioxidative activity of apple skin or flesh extracts associated with fruit development on selected apple cultivars. *Scientia Horticulturae*, 96(1-4), 177-185. https://doi.org/10.1016/S0304-4238(02)00127-9

Li, W., He, P. & Jin, J. (2009). Potassium influenced phenylalanine ammonia-lyase, peroxidases and polyphenol oxidases in Fusarium graminearum infected maize (*Zea mays* L.). Proceedings of the International Plant Nutrition Colloquium XVI; Davis, CA, USA.

Malakoti, M. J. & Tabatabaei, S. J. (2001). Innovative Approaches to Balanced Nutrition of Fruit Tree. Sana Publications, Tehran, Iran. 654 pp. (in Persian)

Matros, A., Amme, S., Kettig, B., Buck-Sorlin, G. H., Sonnewald, U. W. E. & Mock, H. P. (2006). Growth at elevated $CO_2$ concentrations leads to modified profiles of secondary metabolites in tobacco cv. SamsunNN and to increased resistance against infection with potato virus Y. Plant, Cell & Environment, 29(1), 126-137. https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01406.x

McCallum, J.A. & Walker, J.R.L. (1990). Phenolic biosynthesis during grain development in wheat: changes in phenylalanine ammonia-lyase activity and soluble phenolic content. *Journal of Cereal Science*, 11, 35-49. https://doi.org/10.1016/S0733-5210(09)80179-3.

Moharrami R., Rabiei V., Amiri M.E. & Azimi M.R. (2011). Rootstock Effects on some Charateristics of Apple cv. Delbarstival. *Seed and Plant Improvement Journal*, 27(3), 323-337. (in Persian)

Nozzolillo, C., Isabelle, P. & Das, G. (1990).

Seasonal changes in the phenolic constituents of jack pine seedlings (*Pinus banksiana*) in relation to the purpling phenomenon. *Canadian Journal of Botany*, 68(9), 2010-2017. https://doi.org/10.1139/b90-263

Orčić, D., Francišković, M., Bekvalac, K., Svirčev, E., Beara, I., Lesjak, M. & Mimica-Dukić, N. (2014). Quantitative determination of plant phenolics in Urtica dioica extracts by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometric detection. *Food Chemistry*, 143, 48-53. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.097

Pirie, A. & Mullins, M. G. (1976). Changes in anthocyanin and phenolics content of grapevine leaf and fruit tissues treated with sucrose, nitrate, and abscisic acid. *Plant Physiology*, 58(4), 468-472. DOI: https://doi.org/10.1104/pp.58.4.468

Pirlak, L., Güleryüz, M., Aslantaş, R. & Eşitken, A. (2003). Promising native summer apple (*Malus domestica*) cultivars from north-eastern Anatolia, Turkey. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 31(4), 311-314. https://doi.org/10.1080/01140671.2003.9514266

Rom, C. R., Rom, R. C., Autio, W. R., Elfving, D. C. & Cline, R. A. (1991). Foliar nutrient content of "Starkspur Supreme Deliciouse" on nine clonal apple rootstocks. *Journal of Fruit Varieties*, 45, 252-263.

Rupasinghe, H. P. V., Huber, G. M., Embree, C. G. & Forsline, P. L. (2010). Red-fleshed apple as a source for functional beverages. *Canadian Journal of Plant Science*, 90, 95-100. https://doi.org/10.4141/CJPS09057

Sakamoto, K., Iida, K., Sawamura, K., Hajiro, K., Asada, Y., Yoshikawa, T. & Furuya, T. (1994). Anthocyanin production in cultured cells of Aralia cordata Thunb. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 36(1), 21-26. https://doi.org/10.1007/BF00048311

Sobhana, P., Thomsa, M., Krishnakumar, R. & Jacob, J. (2000). Can there be possible genetic conflict between genetically divergent rootstocks and scions in bud grafted plants. In National Symposium on Recent Trends in Plant Science Research, University of Kerala, Trivandrum, India.

Sotiropoulos, T.E. (2006). Performance of the apple cultivar "Golden Delicious" grafted on five rootstocks in Northern Greece. *Agronomy and Soil Science*, 52, 347-352. https://doi.org/10.1080/03650340600612532

Strissel, T., Halbwirth, H., Hoyer, U., Zistler, C., Stich, K. & Treutter, D. (2005). Growth-promoting nitrogen nutrition affects flavonoid biosynthesis in young apple (*Malus domestica* Borkh.) leaves. *Plant Biology*, 7(06), 677-685. DOI: 10.1055/s-2005-872989

Talaei, A. R. (1989). Physiology of Temperate Zone Fruit Trees. University of Tehran Publications. Tehran, Iran. 423 pp. (in Persian)

Tan, S.C. (1980) Phenylalanine ammonia-lyase and the phenylalanine ammonia-lyase inactivating system: effects of light, temperature and mineral deficiencies. *Australian Journal of Plant Physiology*, 7, 159-167. https://doi.org/10.1071/PP9800159

Tombesi, S., Almehdi, A. & DeJong, T.M. (2011). Phenotyping vigour control capacity of new peach rootstocks by xylem vessel analysis. *Scientia Horticulturae*, 127(3), 353-357. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.11.007

Webster, A.D. (2004). Vigour mechanisms in dwarfing rootstocks for temperate fruit trees. *Acta Horticulturae*, 658, 29-41. 10.17660/ActaHortic.2004.658.1

Wei, H., Tye, L., Bresnick, E. & Birt, D. F. (1990). Inhibitory effect of apigenin, a plant flavonoid, on epidermal ornithine decarboxylase and skin tumor promotion in mice. *Cancer Research*, 50(3), 499-502.

Ibrahim, M. H., Jaafar, H. Z., Rahmat, A. & Rahman, Z. A. (2011). Effects of nitrogen fertilization on synthesis of primary and secondary metabolites in three varieties of kacip Fatimah (*Labisia pumila* Blume). *International Journal of Molecular Sciences*, 12(8), 5238-5254. doi: 10.3390/ijms12085238.

Zucker, M. (1965). Induction of phenylalanine deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue. *Plant Physiology*, 40(5), 779-784. doi: 10.1104/pp.40.5.779.