پژوهش در علوم باغبانی
Journal of Reserch in Horticultural Science
جلد۱، شماره۲، پاییز و زمستان ۱۴۰۱ (ص۳۳۰-۳۱۷)
Vol. 1, No.2 Autumn and Winter 2022 (317-330)
تارنمای مجله: https://rhsj.areeo.ac.ir
مقاله علمی پژوهشی
10.22092/rhsj.2023.362156.1060

بررسی برهمکنش پایه و رقم بر مقدار برخی عناصر غذایی و ترکیبات فلاونوئیدی برگ درختان سیب (*Malus domestica* Borkh.)

طاهره پروانه[1*]، حسین افشاری[2]، رعنا دستجردی[3] و سمیه ناصری[4]

۱-استادیار،بخش تحقیقات زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان سمنان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شاهرود، ایران
۲- دانشیار، بخش باغبانی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان
۳- استادیار، پژوهشکده میوه‌های معتدله و سردسیری، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
۴- استادیار، بخش تحقیقات علوم مرتع، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان سمنان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شاهرود، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۲/۱۸ **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۲/۴/۱۳

چکیده

این پژوهش به‌منظور بررسی اثر پایه‌های رویشی و مقادیر عناصر غذایی بر برخی از مهم‌ترین ترکیبات فلاونوئیدی در نمونه‌های برگ ژنوتیپ سیب توسرخ بسطام و رقم سیب توسرخ بکران و مقایسه آنها با رقم تجاری رد دلیشز به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح آزمایشی بلوک‌های کامل تصادفی طی دو سال انجام شد. نمونه‌برداری از درختان سه ساله پیوندشده روی پایه‌های M9 و B9 و پایه کلونی ژنوتیپ بکران صورت گرفت و سپس مقادیر عناصر غذایی شامل نیتروژن، فسفر، پتاسیم و کلسیم و برخی از مهم‌ترین فلاونوئیدها از جمله کوئرستین‌ها، کامفرول، روتین و لوتئولین در نمونه‌های برگ با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) اندازه‌گیری شدند. نتایج نشان داد که طی دو سال متوالی مقدار ترکیبات فلاونوئیدی کوئرستین، کوئرستین ۳- رامنوزاید، لوتئولین و کامفرول به طور معنی‌داری تحت تاثیر پایه و پیوندک قرار گرفتند. آنالیز رگرسیون گام به گام نشان داد که مقدار هر یک از عناصر، تاثیر اختصاصی معنی‌داری بر بیوسنتز ترکیبات فلاونوئیدی داشت. همچنین با افزایش سن گیاهان و توسعه ریشه مقدار مجموع ترکیبات فلاونوئیدی در نمونه‌های برگ ارقام و ژنوتیپ‌های پیوندشده روی پایه M9 و پایه کلونی بکران افزایش یافت. نتایج این پژوهش نشان داد که تفاوت‌های ذاتی بین ارقام، تعیین‌کننده مقدار سنتز متابولیت‌های ثانویه است ولی مقدار این ترکیبات با به‌کارگیری پایه‌هایی که از نظر قدرت رشد تفاوت‌های آشکاری دارند یا در جذب و انتقال عناصر غذایی کاراتر هستند، به طور معنی‌داری تحت تاثیر قرار می‌گیرد.

واژگان کلیدی: پایه‌های رویشی، سیب توسرخ، متابولیت‌های ثانویه، عناصر غذایی، کوئرستین.

Interaction of rootstocks and cultivars on some nutrients and flavonoid compounds of apple leaves (*Malus domestica* Borkh.)

Tahereh Parvaneh[1]*, Hossein Afshari[2], Raana Dastjerdi[3] and Somayyeh Naseri[4]

1-Assistant professor, Physiology and Fruit Breeding Department, Agricultural and Natural Resources Research and Education Center of Semnan Province, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Shahrood, Iran
2-Associate Professor, Horticultural Department, Islamic Azad University, Damghan, Iran
3-Assistant professor, Temperate Fruits Research Center, Horticultural Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran
4-Assistant professor, Rangeland Sciences Department, Agricultural and Natural Resources Research and Education Center of Semnan Province, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Shahrood, Iran

Abstract

This study was conducted to investigate the effect of the effect of rootstocks and cultivars on some nutrient and flavonoid compounds in leaf samples of Bastam genotype (BA) and Bekran (BE) cultivar and compare them with flavonoids of Red Delicious cultivar. The experiment was conducted in a factorial way of randomized complete blocks over two years. Sampling of three-year-old trees grafted on M9 and B9 rootstocks and Bekran genotype colony rootstock was done and then the amounts of nutrients including nitrogen, phosphorus, potassium and calcium and some of the most important flavonoids including Quercetin, Kaempferol, Rutin and Luteolin in Leaf samples were measured using high performance liquid chromatography (HPLC). The results of this study showed that during two consecutive years, the amount of flavonoid compounds Quercetin, Quercetin 3-ramenoside, Luteolin, and Kaemferol was affected by rootstock and scion and their interaction. Step-by-step regression analysis showed that the amount of each element had a significant specific effect on the biosynthesis of flavonoid compounds. The total amount of flavonoid compounds in leaf samples of cultivars and genotypes grafted on M9 and Bekran colonies rootstocks increased in the second year. Also, with increasing plant age and root development, the total amount of flavonoid compounds in leaf samples of cultivars and genotypes increased. The results of this research showed that the inherent differences between cultivars determine the amount of synthesis of secondary metabolites, but the amount of these compounds can be increased by using rootstocks that have obvious differences in vigor or are more efficient in absorbing and transporting nutrients.

Keywords: Vegetative Rootstocks, Nutrition, Red flesh apple, Secondary metabolites, Quercetin.

* نویسنده مسئول: par1330@gmail.com

۱- مقدمه

هرساله توجه به محصولاتی که از نظر ترکیبات مفید برای سلامتی غنای بیشتری دارند رو به افزایش است. متابولیت‌های ثانویه بخش جدانشدنی از رژیم غذایی بشر بوده و به خاطر ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی قوی و ضدسرطانی، بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند. این ترکیبات دارای طیف گسترده‌ای از خواص باارزش دارویی مانند مهار رادیکال‌های آزاد، کاربرد به عنوان مکمل‌های استروژنی، ویژگی های ضدالتهابی و ضدپراکسیداسیون چربی هستند (Kang *et al.,* 2003; Lila, 2004; Liu, 2003). در گیاهان، سنتز متابولیت‌های ثانویه نوعی سازگاری جهت مقابله با محدودیت‌های تنش‌زا در محیط چالش‌برانگیز و در حال تغییر برای رشد و نمو آنهاست.

فلاونوئیدها گروهی از متابولیت‌های ثانویه هستند که در بسیاری از گونه‌های گیاهی یافت می‌شوند. نوع و غلظت متابولیت‌های ثانویه تولید شده بستگی به گونه گیاهی، ژنتیک، فیزیولوژی گیاه، مرحله نمو گیاه و فاکتورهای محیطی دارد (Isah, 2019). کامفرول، لوتئولین و کوئرستین از رایج‌ترین ترکیبات فلاونوئیدی موجود در گیاهان هستند (Cao et al., 2010). لوتئولین به عنوان مهم‌ترین فلاون شناسایی‌شده در میوه سیب گزارش شده است (Bars-Cortina *et al.,* 2017). پتوفسکی و همکاران (Petkovšek *et al.,* 2008) روتین را جزء دو فلاونول اصلی برگ سیب گزارش کردند. آنها نشان دادند که برگ‌های رقم سیب مقاوم به لکه سیاه (Venturia inaequalis Cke.) حاوی فلاونوئید بیشتری نسبت به ارقام حساس هستند. آنتونن و همکاران (Anttonen *et al.,* 2003) نیز در ارقام توت فرنگی مقاوم به بیماری مقادیر بالاتری از فلاونوئیدهای کوئرستین و کامفرول را نسبت به ارقام حساس ثبت کردند.

پایه‌ها با تغییر سیستم ریشه و ایجاد تغییر محسوس در گیاه پیوندی بعد از انجام پیوند، بر مقدار جذب و انتقال عناصر غذایی تاثیر می‌گذارند. پایه به عنوان ریشه‌ی جایگزین شده برای پیوندک مستقیما جذب آب و مواد غذایی را تغییر داده و اغلب رشد و فیزیولوژی کل گیاه را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Keller *et al.,* 2001; Zhang *et al.,* 2006). در دسترس‌بودن ریزمغذی‌ها ممکن است بر تولید ترکیبات زیست فعال از طریق تاثیر بر روی مسیرهای بیوسنتزی به عنوان فعال‌کننده آنزیم‌ها تأثیر بگذارد. به‌همین ترتیب، پایه‌های پاکوتاه با مقدار جذب کمتر مواد غذایی می‌توانند علاوه بر رشد بر مقدار متابولیت‌های ثانویه تاثیرگذار باشند. تاثیر پایه روی انباشت مواد فنلی در لیموها(Gil-Izquierdo, 2004)، هلو و زردآلو (Scalzo *et al.,* 2005)، گیلاس (Usenik and Štampar, 2000) و سیب (Mainla *et al*., 2011) گزارش شده‌است.

کیویکلیس و همکاران (Kviklys, 2015) گزارش کردند که ژنوتیپ پایه نقش بسیار مهم‌تری از قدرت رشد گیاه در انباشت مواد فنلی دارد. تسائو و همکاران (Tsao *et al.,* 2003) نیز گزارش کردند که به‌طور معمول نوع رقم، یک فاکتور مهم در تعیین مقدار مواد فنلی در سیب است. سیب‌های توسرخ صفات متمایزی از نظر مقدار آنتوسیانین موجود در گوشت میوه و مقادیر مواد فنلی و فلاونوئیدها دارا هستند که می‌توانند به عنوان مارکرهای فنوتیپی ویژه‌ای در پژوهش‌های بررسی مقدار متابولیت‌های ثانویه مورد استفاده قرار گیرند.

گزارشاتی در مورد تاثیر تنش‌های ناشی از تغذیه نامتعادل نیتروژن، فسفات، پتاسیم و گوگرد بر بیوسنتز فنیل‌پروپانوئیدها و فنل‌ها در چندین گونه گیاهی در دسترس می‌باشد (Chalker-Scott and Fuchigami,

2018; Hassan 2012; Dixon and Paiva 1995)؛ در حالی‌که درشت مغذی هایی مانند کربن و نیتروژن نقش ویژه‌ای در بیوسنتز زیست‌توده و متابولیت‌های ثانویه دارند (Hänsch and Mendel, 2009). نیتروژن ممکن است بر رشد و نمو از طریق متابولیت‌های اولیه و ثانویه تأثیر بگذارد. همچنین می‌توان ارتباطی بین دو مسیر متابولیک از طریق آنزیم فنیل آلانین آمونیولیاز (PAL) متصور دانست که تأثیر آن را بر تولید فلاونوئیدها در گیاهان به دلیل فعالیت بالاتر این آنزیم توضیح می‌دهد (Gifford *et al.,* 2008; Giorgi *et al.,* 2009). کمبود نیتروژن به‌شدت باعث افزایش سطح آنتوسیانین و سایر فلاونوئیدها می‌شود. در برگ‌های گوجه‌فرنگی محتوای آنتوسیانین‌ها و به‌ویژه کوئرستین-۳-O-گلوکوزید کونژوگه، به‌طور مداوم در شرایط کمبود نیتروژن دو تا سه برابر افزایش می‌یابد (Bongue Bartelsman *et al.,* 1995). فسفر نیز به عنوان بخشی از مولکول‌های غنی از انرژی مانند ADP و ATP در متابولیسم اولیه در گیاهان نقش دارد و کمبود آن می‌تواند همراه با کاهش رشد، تولید برخی ترکیبات فلاونوئیدی مانند آنتوسیانین را القا کند (Luciano *et al.,* 2017; Wu *et al.,* 2003). کلسیم، یک عنصر سیگنال‌دهنده است که در بسیاری از مسیرهای انتقال سیگنال در سلول‌های گیاهی نقش دارد و تغییرات مقدار آن بر تولید متابولیت‌های گیاهی بی‌تاثیر نیست. از آنجایی که گیاهان شامل مجموعه‌ای از مسیرهای متابولیک هستند و متغیرهای زیادی در کنترل و پیشبرد این مسیرها دخالت دارند، بررسی تأثیر هر متغیر یا یک عنصر مغذی به تنهایی، در متابولیسم آنها امکان‌پذیر نیست و فقط زمانی که غلظت یک عنصر برای گیاه محدودکننده باشد، می‌توان تاثیر آن را در آستانه‌های بحرانی برای فرایندهای گیاهی بررسی کرد (Fritz *et al.,* 2006).

مطالعه روابط بین تغذیه و متابولیت‌های ثانویه ممکن است به تعیین آستانه‌های موثر بر تنش‌ها در هر گونه گیاهی، پایه و رقم کمک کند. در این پژوهش برای دو سال متوالی مقادیر عناصر غذایی و فلاونوئیدهای مهم موجود در برگ ژنوتیپ‌های پیوندی سیب توسرخ و رقم رددلیشز که در تولید متابولیت‌های ثانویه کارآمد هستند، اندازه‌گیری و مورد بررسی قرار گرفت. سپس با تفسیر ارتباط بین آنها، برخی از جنبه‌های فیزیولوژیکی برای این ترکیبات پیوندی خاص روشن شد.

۲- مواد و روش‌ها

این پژوهش به‌منظور بررسی اثر پایه‌های رویشی و مقادیر عناصر غذایی بر ترکیبات فلاونوئیدی با نمونه‌برداری از درختان سه ساله پیوندی شامل ژنوتیپ سیب توسرخ بسطام (Ba)، رقم بکران (Be) و رقم تجاری رد دلیشز روی پایه‌های M9 و B9 و پاجوش رقم توسرخ بکران به عنوان پایه (Be) در سال‌های ۱۳۹۷ و ۱۳۹۸ از باغ تحقیقاتی گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد. در سال اول آزمایش و در طول فصل رشد، هیچ تیمار کودی استفاده نشد. پس از مرحله رشد رویشی سریع و زمان توقف رشد (مرداد ماه) از برگ‌های بالغ موجود در قسمت میانی شاخه، نمونه‌های برگی تهیه شدند. در سال دوم آزمایش، و برای ایجاد اختلاف محسوس در مقادیر عناصر غذایی دردسترس گیاهان، تغذیه درختان با ۱۰۰ گرم کود کامل NPK (20:20:20) برای هر درخت و محلول‌پاشی با یک کود میکرو (۲ گرم در هزار) شامل عناصر ریزمغذی مانند آهن، کلسیم و روی انجام شد. نمونه‌برداری از برگ و بافت‌های رویشی در اواخر مرداد ماه (پس از مرحله رشد سریع و زمان توقف رشد رویشی سالانه) انجام گرفت. برگ‌ها پس از جمع‌آوری در کیسه‌های پلاستیکی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به

آزمایشگاه منتقل شدند.

۲-۱- اندازه‌گیری ترکیبات فلاونوئیدی

برگ‌ها با متانول (۲۰ میلی‌لیتر) حاوی ۱% ۲،۶-دی-ترت-بوتیل-۴-متیل فنل (BHT) به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب سرد و با استفاده از فراصوت استخراج شدند. BHT برای جلوگیری از اکسیداسیون به نمونه‌ها اضافه شد. پس از سانتریفیوژ کردن در ۱۰ هزار دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، مایع رویی از طریق فیلتر غشایی ۰/۴۵ میکرومتر فیلتر شد. ترکیبات فلاونوئیدی با استفاده از سیستمHPLC,Unicam-crystal-200 آشکارساز آرایه دیودی در ۳۵۰ نانومتر آنالیز شدند. مقدار تزریق ۱۰ میکرولیتر بود. ستون مورد استفاده (Phenomenex Gemini C18 (150x4.60 میلی‌متر بود که در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد کار می‌کرد. حلال‌های شستشوA(اسید فسفریک آبی ۰,۰۱ مولار) و B ((متانول ۱۰۰ درصد) بودند. نمونه‌ها با توجه به گرادیان خطی شسته شدند. سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه بود. شناسایی ترکیبات از طریق مقایسه زمان‌ها و طیف‌های ماند و همچنین با افزایش استانداردها به دست آمد. غلظت ترکیبات فنلی از نواحی پیک، محاسبه و به صورت میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن تر بیان شد (Colaric *et al.* 2005, Petkovsˇek *et al*. 2008).

۲-۲- اندازه‌گیری عناصر غذایی

به‌منظور اندازه‌گیری عناصر نیتروژن، فسفر، پتاسیم وکلسیم در برگ ارقام مورد نظر، مقدار ۰/۳ گرم از نمونه خشک و آسیاب‌شده گیاهی 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 (H2SO4) به آن افزوده شد؛ پس از آن ۶ گرم اسید سالیسیلیک (C7H6O3) به محلول افزوده شد) به نمونه گیاهی افزوده شده و سپس با دقت تکان داده تا کاملا با یکدیگر مخلوط شدند و نمونه گیاهی با اسیدها تماس یافت. محلول به مدت ۲۴ ساعت در این شرایط نگهداری شد. پس از آن، دمای نمونه به ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد افزایش داده شد و پس از خنک شدن ۵ قطره آب اکسیژنه (H2O2) ۳۰ درصد به آن افزوده شد. سپس دوباره با استفاده از حرارت، دمای نمونه تا ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت تا تبخیر صورت گرفته و بخار سفید مشاهده شد. پس از خنک شدن بالن ژوژه، دوباره ۵ قطره آب اکسیژنه به نمونه اضافه گردید. مجددا حرارت دادن آغاز شد و این روند تا بی‌رنگ شدن نمونه‌ها ادامه یافت. پس از خنک شدن نمونه‌ها، ۱۰ سی‌سی آب مقطر به آن‌ها افزوده شد. نمونه حاصل با تکان دادن کاملا مخلوط شده و در نهایت به حجم رسانیده و صاف شد. مقدار عناصر نیتروژن با روش کجلدال، پتاسیم و کلسیم با روش نشر شعله‌ای و عنصر فسفر با روش اولسن اندازه‌گیری شدند.

۲-۳- تجزیه آماری

آزمایش به صورت فاکتوریل بر پایه طرح بلوک کامل تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. عامل اول پایه در ۳ سطح شامل پایه‌های پاکوتاه M9 ،B9و پاجوش رقم سیب توسرخ بکران (Be) و عامل دوم رقم پیوندک در۳ سطح شامل سیب توسرخ بکران (Be) و سیب توسرخ بسطام (Ba) و رقم تجاری رد دلیشز (Red) بود. برای تعیین تاثیر عناصر غذایی بر مقدار ترکیبات فلاونوئیدی در برگ سیب از آنالیز رگرسیون گام به گام استفاده شد. آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار (SPSS, Inc., Chicago, Illinois) SPSS -16.0 انجام شد. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون دانکن و در سطح احتمال ۵ درصد صورت گرفت.

۳- نتایج

۳-۱- اندازه‌گیری ترکیبات فلاونوئیدی

-کوئرستین‌ها

آنالیز داده‌ها در سال اول آزمایش نشان داد که پایه، پیوندک و برهمکنش آنها بر مقدار کوئرستین‌ها در بافت‌های رویشی تیمارها تأثیر معنی‌داری داشتند (جدول ۱). در بین ترکیبات پیوندی در سال اول، بیشترین مقدار کوئرستین-ها در ترکیب پیوندی Ba/M9 و کمترین مقدار کوئرستین‌ها در ترکیب پیوندی Be/M9 ثبت شد (جدول ۲). حال آنکه در سال دوم آزمایش فقط برهمکنش پایه و پیوندک بر مقدار کوئرستین‌ها معنیدار بود. بدین‌ترتیب بیشترین مقدار کوئرستین‌ها در ترکیب پیوندی Be/M9 و کمترین مقدار آن در ترکیب پیوندی Be/B9 ثبت شد (جدول۳).

-کوئرستین ۳- رامنوزاید

در سال اول آزمایش، پایه و برهمکنش پایه و پیوندک بر میزان کوئرستین ۳- رامنوزاید و در سال دوم فقط برهمکنش پایه و پیوندک در نمونه‌های برگی سیب تأثیر معنی‌داری داشتند. در سال اول بیشترین مقدار کوئرستین ۳- رامنوزاید در ترکیب پیوندی Ba/Be و کمترین مقدار آن در ترکیب پیوندی RED/B9 مشاهده شد (جدول ۲)، و در سال دوم بیشترین مقدار کوئرستین ۳-رامنوزاید در ترکیب پیوندی RED/M9 و کمترین مقدار آن در ترکیب پیوندی Ba/M9 ثبت شد (جدول۳).

-کامفرول

نتایج تجزیه واریانس داده‌های این پژوهش نشان داد که پایه، پیوندک و برهمکنش آنها بر مقدار کامفرول در نمونه-های برگی تیمارها تأثیر معنی‌داری داشته است (جدول ۱). در برهمکنش پایه و پیوندک، بیشترین مقدار کامفرول ثبت شده مربوط به تیمار Ba/B9 و کمترین مقدار مربوط به RED/M9 بود (جدول ۲). در سال دوم آزمایش نیز برهمکنش پایه و رقم بر مقدار کامفرول نمونه‌ها تاثیر معنی‌داری داشت. بیشترین مقدار کامفرول در ترکیب پیوندی Be/M9 و کمترین مقدار در ترکیب پیوندی Ba/M9 مشاهده شد (جدول ۳).

-روتین

نوع پایه و برهمکنش پایه و پیوندک بر غلظت ترکیب فلاونوئیدی روتین در برگ سیب تأثیر معنی‌داری داشتند. در بین ترکیبات پیوندی مورد مطالعه بیشترین مقدار روتین در ترکیب پیوندی رقم RED/M9 و کمترین مقدار در بافت‌های رویشی RED/Be اندازه‌گیری شد (جدول ۲). در سال دوم آزمایش هیچ‌کدام از تیمارهای پایه، پیوندک و برهمکنش آنها بر مقدار ترکیب فلاونوئیدی روتین تاثیر معنی‌داری نداشت (جدول ۳).

-لوتئولین

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که در سال اول آزمایش، رقم پیوندک و برهمکنش پایه و پیوندک بر میزان لوتئولین در نمونه‌های برگ تیمارهای مورد مطالعه تأثیر معنی‌داری داشتند (جدول ۱). بیشترین مقدار لوتئولین در ترکیب پیوندی Be/B9 و کمترین مقدار آن در RED/B9 مشاهده شد (جدول۲). در سال دوم آزمایش برهمکنش پایه و پیوندک بر مقدار لوتئولین نمونه‌ها در برگ سیب تاثیر معنی‌دار داشت و بیشترین مقدار لوتئولین در ترکیب پیوندی RED/M9 و کمترین مقدار در ترکیب پیوندی Be/B9 مشاهده شد (جدول ۳).

جدول ۱- تجزیه واریانس تأثیر ترکیبات پیوندی، سال و برهمکنش آنها بر مقدار عناصر پرمصرف،کلسیم و ترکیبات فلاونوئیدی موجود در برگ

منابع تغییرات	درجه آزادی	نیتروژن	فسفر	پتاسیم	کلسیم	کوئرستین ۳- رامنوزاید	روتین	لوتئولین	کوئرستین	کامفرول
ترکیب پیوندی (پایه * پیوندک)	۸	۲۱۰۹۹۵*	۸۹۱۰۳*	۳۲۸۹۴۵*	۴/۱۵۷۰*	۱۸/۶۱۵*	۳/۱۴۸۶*	۱/۳۸۴۲*	۴/۹۲۳۹*	۸/۴۱۸۳*
تکرار	۲	۲۵۰۴ns	۲۸۲۰ns	۱۱۷۹۹ns	۰/۲۲۱۸ns	۰/۱۱۳ns	۰/۲۶۳۴ns	۰/۲۱۱۱ns	۰/۰۴۷۷ns	۰/۰۵۰۳ns
ترکیب پیوندی * تکرار	۱۶	۵۳۵۲ns	۱۲۴۵ns	۹۵۷۰ns	۰/۱۰۲۳ns	۲/۳۶۳ns	۰/۴۲۱۵*	۰/۲۲۷۹ns	۰/۷۸۹۸ns	۰/۵۶۶۸ns
سال	۱	۱۱۵۷۸۷*	۷۵۰۳۶۳*	۷۲۰۶۰۵*	۰/۹۵۵۱*	۱۲/۰۴۶*	۰/۰۱۱۹ns	۲۴/۲۰۰۴*	۱/۲۷۸۸ns	۱۶/۰۸۳۰*
ترکیب پیوندی * سال	۸	۱۴۲۳۰۴*	۱۵۸۹۴*	۱۰۳۶۵۶*	۰/۴۸۴۷*	۵/۱۳۱*	۳/۱۲۹۳*	۸۴۸۰*	۵/۹۸۵۰*	۴/۸۲۴۴*
خطا	۱۸	۸۹۳۸	۱۲۲۶	۷۶۰۲	۰/۱۱۹۴	۱/۸۳۰	۰/۱۳۷۴	۰/۲۷۴۳	۷۷۰۲	۰/۴۷۷۸

* معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد

جدول ۲- تاثیر برهمکنش پایه و پیوندک بر مقدار ترکیبات فلاونوئیدی در برگ سیب (سال اول)

پایه/ پیوندک	نیتروژن (میلی‌گرم بر کیلوگرم)	فسفر (میلی‌گرم بر کیلوگرم)	پتاسیم (میلی‌گرم بر کیلوگرم)	کلسیم (میلی‌گرم بر کیلوگرم)	کوئرستین ۳-رامنوزاید (میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن‌تر)	کوئرستین (میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن‌تر)	روتین (میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن‌تر)	لوتئولین (میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن‌تر)	کامفرول (میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن‌تر)
BA/B9	۱۹۱۲/۰±۷۸/۴۴f	۸۳۲±۳۲/۴۲f	۱۸۶۹/۷±۶۲/۴۴de	۵/۷۴±۰/۰۹۰c	۴/۱۴±۰/۱۸d	۵/۷۲±۰/۱۷bc	۲/۵۱±۰/۰۸d	۱/۲±۰/۰۶e	۷/۴۳±۰/۱۹a
BE/B9	۲۵۵۴/۵±۱۳۱/۵abc	۱۲۷۸/۵±۲۳/۵ab	۲۲۰۸±۱۲۴bc	۵/۷۷±۰/۰۶۵c	۶/۲۳±۰/۲۳c	۶/۰۴±۰/۳۵b	۴/۵۵±۰/۲۳bc	۱/۹۵±۰/۱۱a	۵/۹۲±۰/۲۳c
RED/B9	۲۱۱۴/۰±۰/۰۰cf	۹۸۲±۰/۰۰c	۱۷۲۰±۰/۰۰c	۴/۲۵±۰/۰۰c	۲/۸۳±۰/۳۲e	۶/۹۳±۰/۱۴a	۱/۹۱±۰/۳۲d	۱/۲±۰/۰۶e	۵/۲۰±۰/۱۳d
BA/M9	۲۲۸۶/۰±۶۱/۲۴de	۱۰۴۶/۳±۲۸/۸۸de	۲۲۶۴±۷۱/۱۰bc	۶/۴۱±۰/۰۶۱b	۳/۳۳±۰/۰۹e	۶/۹۴±۰/۱۳a	۴/۱۳±۰/۸۴bc	۱/۶۶±۰/۰۵bc	۴/۴۲±۰/۰۹e
BE/M9	۲۶۸۲/۰±۴۸/۰۴ab	۱۳۲۶±۲۱/۱۷a	۲۸۳۳±۶۰/۲۹a	۶/۳۹±۰/۰۷۱b	۷/۳۵±۰/۲۱b	۳/۰۱±۰/۰۸e	۵/۱۲±۰/۱۰ab	۱/۵۶±۰/۰۶cd	۳/۳۴±۰/۱۱f
RED/M9	۲۸۸۴/۰±۴۹/۸۶a	۱۱۹۶/۳±۳۲/۲۰bc	۲۲۳۱±۳۶/۹۶bc	۵/۵۲±۰/۰۳۱c	۷/۲۲±۰/۲۰b	۳/۱۷±۰/۰۷e	۵/۹۳±۰/۱۴a	۱/۶۶±۵/۰۵bc	۲/۵۴±۰/۰۱g
BA/BE	۲۵۲۰//۰±۷۷/۷۸bcd	۹۸۸±۲۵/۷۸de	۲۴۴۰±۸۵/۹۵b	۷/۱۱±۰/۰۵۰a	۸/۹۰±۰/۲۶a	۴/۵۱±۰/۱۱d	۳/۸۶±۰/۱۱c	۱/۳۶±۰/۰۴e	۳/۱۵±۰/۱۱f
BE/BE	۲۱۲۵/۰±۲۹/۷۲cf	۱۰۸۲±۲۰/۱۳cde	۲۰۴۴±۶۶/۶۱cd	۵/۱۲±۰/۰۳۸d	۴/۱۲±۰/۱۸d	۵/۵۱±۰/۱۵c	۲/۳۲±۰/۰۹d	۱/۸۰±۰/۰۸ab	۶/۷۴±۰/۱۷b
RED/BE	۲۲۵۹/۵±۷۵/۵de	۱۱۱۰±۵۱cd	۱۸۷۵±۵۹/۵de	۴/۹۷±۰/۰۸۰d	۶/۲۳±۰/۲۳c	۴/۰۴±۰/۲۹c	۴/۰۴±۰/۲۲c	۱/۳۹±۰/۰۹de	۴/۵۱±۰/۱۶e

مقادیر شامل میانگین± خطای استاندارد (n=۳). حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها هستند ($P < ۰.۰۵$). بسطام (BA)، بکران(BE) و ردلیشز (RED)

جدول ۳- تاثیر برهمکنش پایه و پیوندک بر مقدار ترکیبات فلاونوئیدی در برگ سیب (سال دوم)

پایه/پیوند ک	نیتروژن (میلی‌گرم بر کیلوگرم)	(میلی‌گرم فسفر بر کیلوگرم)	(میلی‌گرم پتاسیم بر کیلوگرم)	کلسیم (میلی‌گرم بر کیلوگرم)	کوئرستین ۳-رامنوزاید (میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن‌تر)	روتین (میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن‌تر)	لوتئولین (میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن‌تر)	کامفرول (میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن‌تر)	کوئرستین (میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن‌تر)	تغییرات نسبت به سال اول (میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن‌تر)
BA/B9	۲۱۰۶/۳±۳۷/۶۹d	۷۰۹/۷±۳۶/۰۸e	۱۹۳۶/۷±۹۰/۷۸ab	۵/۸۹±۰/۴۳ab	۵/۱۷±۰/۴۱ab	۳/۶۳±۰/۱۷a	2.89±0.12ab	۶/۸۱±۰/۳۲ab	۵/۴۳±۰/۳۷abc	۳/۰۴
BE/B9	۲۳۳۴±۱۵/۰۴ab	۹۴۰±۱۰/۸۲ab	۲۰۱۴/۷±۱۱/۸۵abcd	۴/۹۲±۰/۰۵۹bcd	۶/۲۹±۰/۱۰ab	۴/۱۸±۰/۰۴a	1.29±0.043b	۵/۱۶±۰/۸۱b	۳/۱۲±۰/۰۲c	-۲/۰۰
RED/B9	۲۳۱۷±۰/۵۷bc	۸۶۹±۰/۰۰de	۱۷۵۹±۰/۰۰cd	۴/۳۳±۰/۰۰cd	۵/۱۸±۰/۳۹ab	۳/۶۲±۰/۱۷a	2.42±0.44bc	۶/۲۸±۰/۴۶ab	۴/۹۲±۰/۴۵abc	-۰/۸۶
BA/M9	۲۰۹۸±۱۶/۲۹d	۷۳۴±۹/۷۱cd	۱۹۲۰±۱۶/۶۵bcd	۶/۱۲±۰/۰۴۵ab	۴/۶۴±۰/۱۳b	۳/۳۹±۰/۰۳a	2.65±0.52abc	۴/۳۸±۰/۱۱b	۴/۳۸±۰/۱۱abc	۵/۸۴
BE/M9	۲۵۲۴/۵±۱۲/۵a	۱۰۰۴±۸/۰۰a	۲۲۱۹/۵±۱۴/۵a	۶/۲۶±۰/۱۱a	۶/۶۴±۱/۲۶ab	۴/۴۸±۰/۴۶a	4.02±0.35a	۷/۸۲±۰/۸۳a	۶/۳۸±۰/۲۸a	۴/۲۷
RED/M9	۲۲۴۰±۱۵/۷۲cd	۸۳۵±۱۱/۷۹cd	۱۶۸۶±۱۵/۵e	۶/۳۸±۰/۰۶۴d	۹/۱۳±۲/۴۹a	۳/۵۲±۰/۶۷a	3.30±0.54ab	۴/۵۸±۰/۷۰b	۵/۷۴±۱/۵۶abc	۱/۶۷
BA/BE	۲۱۳۶/۳±۶۶/۸۷d	۷۷۷/۳±۹/۳۹de	۲۰۰۶±۱۱/۱۹abc	۶/۳۸±۰/۵۵a	۴/۸۸±۰/۵۷ab	۴/۰۷±۰/۸۵a	3.31±0.48ab	۶/۵۱±۱/۰۸ab	۵/۰۰±۰/۶۸abc	۹/۷۶
BE/BE	۲۴۰۸±۱۳/۱۰ab	۹۷۵±۷/۵۱a	۲۰۸۲±۱۳/۸۹ab	۵/۴۰±۰/۰۴۳abc	۷/۴۴±۲/۵۲ab	۳/۸۷±۰/۲۶a	3.32±0.45ab	۳۶ab۵/۴۹±۰/	۵/۹۱±۱/۲۴bc	۲/۳۸
RED/BE	۲۳۳۹/۳±۷۶/۱۶bc	۸۷۵/۳±۲۵/۱۲bc	۱۷۸۰±۳۴/۳۶de	۵/۵۸±۰/۴۲cd	۵/۵۸±۰/۸۱ab	۳/۸۷±۰/۰۸a	2.63±0.69abc	۵/۰۲±۱/۴۱b	۳/۵۶±۰/۹۹۶bc	۱/۲۹

مقادیر شامل میانگین± خطای استاندارد (n=3). حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها هستند($P < 0.05$). بسطام (ba)، بکران(be) و ردلیشز(red)

۳-۲- نتایج آنالیز رگرسیون گام به گام

در تعیین مقدار کوئرستین کل در سال اول، نیتروژن و پتاسیم در آنالیز رگرسیون گام به گام وارد مدل شدند. نیتروژن به تنهایی ۳۸% و نیتروژن و پتاسیم با هم ۴۷% از مقدار لوتئولین برگ را توجیه کردند. در سال دوم کوئرستین کل فقط تحت تاثیر مقدار نیتروژن قرار گرفت و ۳۱ % تغییرات مقدار این فلاونوئید با مقدار نیتروژن برگ توجیه شد (جدول ۴). به همین ترتیب، ۶۴% از تغییرات مقدار روتین در برگ سیب‌های توسرخ و رقم رددلیشز در سال اول تحت تاثیر مقدار نیتروژن برگ قرار گرفت. آنالیز رگرسیون گام به گام نشان داد که در سال اول آزمایش مقدار کوئرستین ۳ – رامنوزاید به مقدار عناصر نیتروژن، کلسیم و پتاسیم بستگی داشت. بدین ترتیب که ۵۳% از تغییرات مقدارکوئرستین۳- رامنوزاید توسط نیتروژن، ۶۹% توسط دو عنصرنیتروژن و کلسیم و ۷۴% تغییرات توسط سه عنصر نیتروژن، کلسیم و پتاسیم توجیه شدند (جدول ۴). در تعیین مقدار کامفرول برگ، تنها عنصر نیتروژن وارد مدل شد و حدود ۶۰% از تغییرات آن را در نمونه‌های برگ سیب توجیه کرد؛ در حالی که در سال دوم، مقدار کامفرول تحت تاثیر مقدار فسفر برگ بود و ۲۴% از تغییرات آن به مقدار فسفر برگ بستگی داشت (جداول ۳ و ۴). در سال اول مقدار لوتئولین تحت تاثیر عنصر فسفر قرار گرفت به نحوی که ۳۹% از تغییرات لوتئولین برگ با مقدار فسفر قابل توجیه بود. در سال دوم نمونه‌برداری نیز لوتئولین تحت تاثیر مقدار نیتروژن قرار گرفت و ۱۹% تغییرات لوتئولین را مقدار نیتروژن برگ توجیه کرد.

جدول ٤- متغیرهایی که در توجیه مقدار ترکیبات فلاونوئیدی برگ سیب وارد مدل شدند (سال اول)

متغیر وابسته	مدل	متغیر وارد شده به مدل	ضریب تعیین تعدیل شده*	Sig	B	β	T
کوئرستین -۳ رامنوزاید (میلی‌گرم/۱۰۰ گرم وزن‌تر)	۱	نیتروژن	۰/۵۳	۰/۰۰	۰/۰۰۵	۰/۷۴۱	۵/۵۱۲
	۲	نیتروژن	۰/۶۹	۰/۰۰	۰/۰۰۴	۰/۵۶۶	۴/۸۴۲
		کلسیم			۱/۱۴۳	۰/۴۵۲	۳//۸۶۲
	۳	نیتروژن	۰/۷۴	۰/۰۰	۰/۰۰۴	۰/۵۶۴	۵/۲۵۳
		کلسیم			۱/۲۷۰	۰/۵۰۲	۴/۵۷۷
		پتاسیم			۰-/۰۰۱	۰/۰۲۴	۲-/۳۱۶
روتین (میلی‌گرم/۱۰۰ گرم وزن‌تر)	۱	نیتروژن	۰/۶۴	۰/۰۰	۰/۰۰۴	۰-/۸۱۰	۶/۹۱۵
لوتئولین (میلی‌گرم/۱۰۰ گرم وزن‌تر)	۱	فسفر	۰/۳۹	۰/۰۰	۰/۰۰۱	۰/۶۴۵	۴/۲۲۱
کوئرستین (میلی‌گرم/۱۰۰ گرم وزن‌تر)	۱	نیتروژن	۰/۳۸۵	۰/۰۰	۰-/۰۰۳	۰-/۶۳۹	۴-/۱۵۸
	۲	نیتروژن	۰/۴۷۷	۰/۰۰	۰-/۰۰۴	۰-/۶۶۵	۴-/۶۷۶
		پتاسیم			۰/۰۰۲	۰/۳۳۰	۲/۳۲۲
کامفرول (میلی‌گرم/۱۰۰ گرم وزن‌تر)	۱	نیتروژن	۰/۵۸۹	۰/۰۰	۰-/۰۰۴	۰-/۷۷۸	۶-/۱۸۷

* ضریب تعیین تعدیل‌شده مشخص می‌کند که چه مقدار از واریانس متغیر وابسته، به متغیرهای مستقل مربوط است. در این رابطه مقدار تولید هر ترکیب فلاونوئیدی، متغیر وابسته (Y) است و عناصر، متغیرهای مستقل (X) هستند. β ضریب متغیر مستقل یا ضریب تاثیر رگرسیونی استانداردشده (B) سهم نسبی هر متغیر مستقل را در تبیین تغییرات متغیر وابسته مشخص می‌کند. هر چه مقدار ضریب بتای یک متغیر بیشتر باشد، نقش آن متغیر در پیش‌بینی تغییرات متغیر وابسته بیشتر است. ε خطای رابطه رگرسیونی و T : (آزمون فرض ضرایب) هر چه مقدار T بزرگ‌تر باشد، فرض صفر بودن ضریب، ضعیف‌تر شده و نقش آن متغیر در مدل بیشتر است. با استفاده از رابطه $Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \ldots \varepsilon + \beta_n x_n$ می توان مقدار متغیر وابسته را براساس متغیرهای مستقل برآورد نمود.

جدول ۵- متغیرهایی که در توجیه مقدار ترکیبات فلاونوئیدی برگ سیب وارد مدل شدند (سال دوم)

متغیر وابسته	مدل	متغیر وارد شده به مدل	ضریب تعیین تعدیل شده*	Sig	B	β	T
لوتئولین (میلی‌گرم/۱۰۰ گرم وزن‌تر)	۱	نیتروژن	۰/۱۹	۰/۰۱۳	۰-/۰۰۳	۰-/۴۷۳	۲-/۶۸۵
کوئرستین (میلی‌گرم/۱۰۰ گرم وزن‌تر)	۱	نیتروژن	۰/۳۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۶	۰/۵۸۲	۳-/۵۸۱
کامفرول (میلی‌گرم/۱۰۰ گرم وزن‌تر	۱	فسفر	۰/۲۴	۰/۰۰۵	۰-/۰۰۷	۰-/۵۲۱	۳-/۰۵۵

٤- بحث

بررسی رفتار ترکیبات پیوندی از نظر تولید مقدار متابولیت‌های ثانویه، با توجه به تعداد زیاد عوامل تاثیرگذار بر سنتز این ترکیبات پیچیده است. در حالی‌که تفاوت‌های ذاتی بین ارقام مختلف گیاهی سبب اختلافاتی در مقدار متابولیت‌های ثانویه موجود در آنها می شود (Mainla *et al.,* 2011). پایه‌ها نیز با تاثیر بر سیستم ریشه و با تکیه بر توانمندی‌شان در جذب و انتقال عناصر غذایی بر مقدار فلاونوئیدها در گیاهان موثر هستند.

نتایج این پژوهش نشان داد که در طی دو سال آزمایش برهمکنش پایه و پیوندک اثر معنی‌داری بر مقدار تمامی ترکیبات فلاونوئیدی (بجز روتین) داشت. بیشترین و کمترین مقدار کوئرستین ها در سال اول روی ترکیبات پیوندی با پایه یکسان (M9) مشاهده شد که بیانگر تاثیر تعیین‌کننده رقم در سال اول آزمایش بود؛ در حالی که در سال دوم آزمایش، کمترین و بیشترین مقدار کوئرستین ها در ترکیبات پیوندی با رقم یکسان (سیب توسرخ بکران) ثبت شد که این موضوع نشان‌دهنده نقش تعیین‌کننده پایه بر مقدار کوئرستین‌ها در سال دوم می‌باشد.

مقدار بیوسنتز مجموع ترکیبات فلاونوئیدی در سال دوم به‌جز دو مورد پیوندک‌های بکران و ردلیشز روی پایه B9، افزایش یافت. برخلاف این، کیویکلیس و همکاران (Kviklys *et al.*, 2015) غلظت‌های معنی‌دار بالاتری از فلوریدزین، کوئرستین و کوئرستین گالاکتوزید روی پایه‌های خیلی پاکوتاه گزارش کردند. فاستر و همکاران (Foster *et al.,* 2017) با تکیه بر نتایج حاصل از آنالیز توالی‌یابی RNA مشخص کردند که در پایه های پاکوتاه، مسیر فنیل پروپانوئید گرایشی به سمت بیوسنتز فلاونوئید و دورشدن از بیوسنتز لیگنین نشان می‌دهد. با وجود این چندین گزارش نشان می‌دهد که وضعیت تغذیه نیز ممکن است متابولیسم ثانویه در گیاهان را تحت تأثیر قرار دهد(Awad *et al.,* 2000; Keski-Saari & Julkunen-Tiitto, 2003; Rühmann & Treutter, 2003). آگویر و همکاران (Aguirre *et al.,* 2001) گزارش کردند که درختان پیوند شده روی پایه M9 در جذب نیتروژن کاراتر بودند. وکیویکلیس و همکاران (Kviklys *et al.,* 2015) نشان دادند که مقدار کوئرستین-۳-رامنوزید در پایهM9 ، ۱/۲۲ برابر بیشتر از رویال گالا بود. در این پژوهش نیز در سال اول آزمایش، مقدار تمامی ترکیبات فلاونوئیدی مورد بررسی به طور معنی‌داری با عناصر غذایی همبستگی داشتند (جدول ۴)؛ در سال دوم نیز مقادیر کوئرستین، لوتئولین و کامفرول با مقدار نیتروژن و فسفر همبستگی معنی‌داری نشان دادند (جدول ۵). این موضوع بر نقش پایه با تاثیر بر قدرت جذب و انتقال عناصر غذایی در تولید متابولیت‌های ثانویه تاکید می‌کند. عواد و همکاران

(Awad *et al*., 2000) نیز همبستگی منفی بین نیتروژن و سیانیدین-۳-گالاکتوزید پوست سیب و غلظت کل فلاونوئیدها یافتند. احمد و همکاران (Ahmad *et al.,* 2016) افزایش قابل توجهی در محتوای فلاونوئیدها در گیاهان تحت تنش کادمیوم که با کلسیم و پتاسیم به صورت جداگانه و یا به صورت ترکیبی عرضه شده بودند، مشاهده کردند. براساس نتایج این پژوهش و با استفاده از آزمون T مشخص شد که با ادامه فرآیند رشد و نمو ریشه و افزایش قدرت جذب آب و مواد غذایی و به تبع آن اندام‌های هوایی در سال دوم مقدار سنتز این ترکیبات با افزایش سن گیاه، افزایش معنی‌داری یافته است (جدول ۲ و ۳).

با توجه به نتایج پژوهش‌هایی که تاکید بر افزایش مقدار ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی در گیاهان تحت تنش دارند، می‌توان چنین نتیجه گرفت که تا وقتی شرایط بدون تنشی برای رشد گیاه برقرار است تفاوت‌های ذاتی بین ارقام، تعیین‌کننده مقدار سنتز متابولیت‌های ثانویه است؛ ولی با به‌کارگیری پایه‌هایی که از نظر قدرت رشد تفاوت‌های آشکاری دارند یا در جذب و انتقال عناصر غذایی کاراتر هستند، مقدار متابولیت‌های ثانویه به طور معنی‌داری تحت تاثیر این عوامل قرار می‌گیرد و با ادامه تنش، گیاه تولید چنین ترکیباتی که نقش محافظتی و دفاعی دارند را بیشتر ترجیح می‌دهد.

سپاسگزاری:

نویسندگان مقاله از سازمان تحقیقات کشاورزی - مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان سمنان (شاهرود) و دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان برای تامین مالی هزینه‌های این پژوهش قدردانی می‌نمایند.

تضاد و تعارض منافع: نویسندگان هر گونه تعارض و تضاد منافع اعم از تجاری و غیر تجاری و شخصی را که در ارتباط مستقیم یا غیر مستقیم با اثر منتشر شده است رد می نمایند.

منابع

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.

Ahmad, P., Abdel Latef, A. A., Abd_Allah, E. F., Hashem, A., Sarwat, M., Anjum, N. A., & Gucel, S. (2016). Calcium and potassium supplementation enhanced growth, osmolyte secondary metabolite production, and enzymatic antioxidant machinery in cadmium-exposed chickpea (Cicer arietinum L.). *Frontiers in Plant Science*, 7, 513.

Akula, R., & Ravishankar, G. A. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant signaling & behavior*, 6(11), 1720-1731.

Anttonen, M., Hukkanen, A., Tiilikkala, K., & Karjalainen, R. (2002, August). Benzothiadiazole induces defence responses in berry crops. In *XXVI International Horticultural Congress: Berry Crop Breeding, Production and Utilization for a New Century 626* (pp. 177-182).

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.

Bars-Cortina, D., Macia, A., Iglesias, I., Romero, M. P., & Motilva, M. J. (2017). Phytochemical profiles of new red-fleshed apple varieties compared with traditional and new white-fleshed varieties. *Journal of agricultural and food chemistry*, 65(8), 1684-1696.

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).*

Cao, J., Chen, W., Zhang, Y., Zhang, Y., & Zhao, X. (2010). Content of selected flavonoids in 100 edible vegetables and fruits. *Food science and technology research*, 16(5), 395-402.

Chalker-Scott, L., & Fuchigami, L. H. (2018). The role of phenolic compounds in plant stress responses. *In Low temperature stress physiology in crops* (pp. 67-80). CRC press.

Colaric, M., Stampar, F., & Hudina, M. (2006). Changes in sugars and phenolics concentrations of Williams pear leaves during the growing season. *Canadian Journal of Plant Science,* 86(4), 1203-1208.

Dixon, R. A., & Paiva, N. L. (1995). Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The plant cell*, 7(7), 1085.-1097.

Foster, T. M., McAtee, P. A., Waite, C. N., Boldingh, H. L., & McGhie, T. K. (2017). Apple dwarfing rootstocks exhibit an imbalance in carbohydrate allocation and reduced cell growth and metabolism. *Horticulture research*, 4: 17009.

Fritz, C., Palacios-Rojas, N., Feil, R., & Stitt, M. (2006). Regulation of secondary metabolism by the carbon–nitrogen status in tobacco: nitrate inhibits large sectors of phenylpropanoid metabolism. *The Plant Journal*, 46(4), 533-548.

Gifford, M. L., Dean, A., Gutierrez, R. A., Coruzzi, G. M., & Birnbaum, K. D. (2008). Cell-specific nitrogen responses mediate developmental plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(2), 803-808.

Gil-Izquierdo, A., Riquelme, M. T., Porras, I., & Ferreres, F. (2004). Effect of the rootstock and interstock grafted in lemon tree (*Citrus limon* (L.) Burm.) on the flavonoid content of lemon juice. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(2), 324-331.

Giorgi, A., Mingozzi, M., Madeo, M., Speranza, G., & Cocucci, M. (2009). Effect of nitrogen starvation on the phenolic metabolism and antioxidant properties of yarrow (Achillea collina Becker ex Rchb.). *Food Chemistry*, 114(1), 204-211.

Hagen, S. F., Borge, G. I. A., Bengtsson, G. B., Bilger, W., Berge, A., Haffner, K., & Solhaug, K. A. (2007). Phenolic contents and other health and sensory related properties of apple fruit (Malus domestica Borkh., cv. Aroma): Effect of postharvest UV-B irradiation. *Postharvest Biology and Technology*, 45(1), 1-10.

Hänsch, R., & Mendel, R. R. (2009). Physiological functions of mineral micronutrients (cu, Zn, Mn,

Fe, Ni, Mo, B, cl). *Current opinion in plant biology*, 12(3), 259-266.

Harborne, J. B., & Williams, C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55(6), 481-504.

Hassan, A. (2012). Effects of mineral nutrients on physiological and biochemical processes related to secondary metabolites production in medicinal herbs. *Med Arom Plant Sci Biotechnol*, 6(1), 105-110.

Isah, T. (2019). Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. *Biological research*, 52. 39.

Kang, S. Y., Seeram, N. P., Nair, M. G., & Bourquin, L. D. (2003). Tart cherry anthocyanins inhibit tumor development in ApcMin mice and reduce proliferation of human colon cancer cells. *Cancer letters*, 194(1), 13-19.

Keller, M., Kummer, M., & Vasconcelos, M. C. (2001). Reproductive growth of grapevines in response to nitrogen supply and rootstock. *Australian journal of grape and wine research*, 7(1), 12-18.

Keski-Saari, S., & Julkunen-Tiitto, R. (2003). Resource allocation in different parts of juvenile mountain birch plants: effect of nitrogen supply on seedling phenolics and growth. *Physiologia Plantarum*, 118(1), 114-126.

Kviklys, D., Liaudanskas, M., Janulis, V., Viškelis, P., Rubinskienė, M., Lanauskas, J., & Uselis, N. (2015). Rootstock genotype determines phenol content in apple fruits. *Plant, Soil and Environment,* 60(5), 234-240.

Lila, M. A. (2004). Anthocyanins and human health: an in vitro investigative approach. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2004(5), 306-313.

Liu, R. H. (2003). Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *The American journal of clinical nutrition*, 78(3), 517-520.

Luciano, Á. J., Irineo, T. P., Virginia, O. V. R., Feregrino-Pérez, A. A., Hernández, A. C., & Gerardo, G. G. R. (2017). Integrating Plant Nutrients and Elicitors for Production of Secondary Metabolites, Sustainable Crop Production and Human Health: A Review. *International Journal of Agriculture & Biology*, 19(3), 391-402.

Mainla, L., Moor, U., Karp, K., & Puessa, T. (2011). The effect of genotype and rootstock on polyphenol composition of selected apple cultivars in Estonia. *Zemdirb. Agric,* 98, 63-70.

Petkovšek, M. M., Stampar, F., & Veberic, R. (2008). Increased phenolic content in apple leaves infected with the apple scab pathogen. *Journal of Plant Pathology*, 49-55.

Rühmann, S., & Treutter, D. (2003). Effect of N-nutrition in apple on the response of its secondary metabolism to prohexadione-Ca treatment. *European Journal of Horticultural Science*, 68(3), 152-159.

Scalzo, J., Politi, A., Pellegrini, N., Mezzetti, B., & Battino, M. (2005). Plant genotype affects total antioxidant capacity and phenolic contents in fruit. *Nutrition*, 21(2), 207-213.

Sotiropoulos, T. E. (2008). Performance of the apple (Malus domestica Borkh) cultivar Imperial Double Red Delicious grafted on five rootstocks. *Horticultural Science*, 35(1), 7.

Tsao, R., Yang, R., Young, J. C., & Zhu, H. (2003). Polyphenolic profiles in eight apple cultivars using high-performance liquid chromatography (HPLC). *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(21), 6347-6353.

Usenik, V., & Štampar, F. (2000). Influence of various rootstocks for cherries on p-coumaric acid, genistein and prunin content and their involvement in the incompatibility process. *Gartenbauwissenschaft*, 65(6), 245-250.

van der Sluis, A. A., Dekker, M., Verkerk, R., & Jongen, W. M. (2000). An improved, rapid in vitro method to measure antioxidant activity. Application on selected flavonoids and apple juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 48(9), 4116-4122.

Wu, P., Ma, L., Hou, X., Wang, M., Wu, Y., Liu, F., & Deng, X. W. (2003). Phosphate starvation triggers distinct alterations of genome expression in Arabidopsis roots and leaves. *Plant physiology,* 132(3), 1260-1271.

Zhang, Z., Sun, A., Cong, Y., Sheng, B., Yao, Q., & Cheng, Z. M. (2006). Agrobacterium-mediated transformation of the apple rootstock Malus micromalus Makino with the Rol C gene. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant,* 42, 491-497.