

بررسی کمی و کیفی ترکیبات فنلی در پوست سیب، رقم گالا

لمیا وجودی مهربانی^۱، محمدرضا دادپور^{۱*}، عباس دل آذر^۲، علی موافقی^۳ و جعفر حاجی لو^۱

^۱ گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز

^۲ گروه فارماکوگنوزی و مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز

^۳ گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تبریز، تبریز

چکیده

بررسی کمی و کیفی ترکیبات فنلی (اسیدهای فنلی، فلاونول‌ها و آنتوسیانین) میوه سیب رقم گالا (Gala) به وسیله کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) از نوع تجزیه‌ای، میکروسکوپ فلورسنس و میکروسکوپ نوربازتابشی در سه مرحله اصلی نمو سیب [۱- مرحله فندق؛ ۲- مرحله میانی نمو میوه (۸۰ روز بعد از تمام گل)؛ ۳- مرحله برداشت تجارتي میوه] انجام شد. نتایج حاصل نشان‌دهنده وجود تفاوت‌های کمی و کیفی در تجمع و میزان فنل‌های اندازه‌گیری شده در طی فصل رشد در پوست سیب رقم گالا بود. میزان آنتوسیانین در طی فصل به تدریج در پوست میوه افزایش یافت و نتایج حاصل از مطالعات HPLC و میکروسکوپی نشان دادند که بیشترین مقدار و تجمع آنتوسیانین در مرحله برداشت تجارتي میوه مشاهده شد. مطالعه HPLC و میکروسکوپی انجام شده نشان داد که بیشترین میزان اسیدهای فنلی در مرحله فندق میوه وجود دارد. با این حال، کاهش شدید در میزان اسیدهای فنلی در مرحله میانی نمو میوه قابل توجه است و در مرحله برداشت تجارتي میوه افزایش در میزان اسیدهای فنلی نسبت به مرحله میانی نمو میوه مشاهده شد. مقایسه داده‌های HPLC و تصاویر میکروسکوپی نشان داد که در مرحله برداشت تجارتي میوه کاهش، شدید در میزان فلاونول‌ها وجود دارد. انطباق تصاویر میکروسکوپی با داده‌های HPLC توانایی میکروسکوپ فلورسنس در مطالعه ترکیبات فنلی موجود در پوست میوه سیب را نشان می‌دهد. مطالعه ترکیبات ذکر شده توسط میکروسکوپ فلورسنس در تطبیق با مطالعات کروماتوگرافی، روشی سریع در شناسایی گروه‌های مختلف ترکیبات فنلی است که می‌تواند به اتخاذ تدابیر صحیح مدیریتی باغ‌ها در ارتباط با افزایش ویژگی‌های کیفی میوه سیب کمک نماید.

واژه‌های کلیدی: آنتوسیانین، ترکیبات فنلی، سیب، کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا، میکروسکوپ فلورسنس

مقدمه

بیوسنتز آنها در پوست میوه سیب و سایر بافت‌های گیاهی، از طریق دو مسیر شیکمیک اسید و استات- مولونات تحت تأثیر مرحله نمو گیاه و فاکتورهای بیرونی انجام می‌گیرد

میوه سیب منبع غنی از ترکیبات فنلی است. ترکیبات فنلی از مهمترین متابولیت‌های ثانویه در گیاهان هستند که

این بررسی، بیشترین تجمع ترکیبات فنلی (روتین، فلاونول گلیکوزید، فلاونول) در پوست میوه وجود داشت. با توجه به اینکه شناسایی ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی در طی فصل رشد به کمک روش‌های کروماتوگرافی مشکل است، لذا در تحقیق حاضر سعی شده است با استفاده از فنون میکروسکوپی (فلورسنس و نوربازتابشی) و کروماتوگرافی (HPLC) روند تغییرات ترکیبات فنلی در پوست میوه سیب مورد بررسی قرار گیرد. انتظار می‌رود که با آگاهی از روند تغییرات ترکیبات فوق‌بتوان ویژگی‌های کیفی میوه را در مقیاس عملی با اعمال روش‌های مدیریتی صحیح به‌زراعی و مدیریت باغ افزایش داد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: میوه سیب، رقم گالا از درختان پیوندی روی پایه مالینگ مرتون ۱۰۶ موجود در شهرستان بستان‌آباد واقع در آذربایجان شرقی تهیه شد. نمونه‌گیری برای مطالعات مورد نظر از سه مرحله اصلی رشد میوه، شامل: ۱- مرحله فندقی؛ ۲- مرحله میانی نمو میوه (۸۰ روز بعد از تمام‌گل) و ۳- مرحله برداشت تجاری میوه انجام شد. نمونه‌گیری به صورت تصادفی از چهار جهت درخت انجام شد. نمونه‌ها بعد از جمع‌آوری بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شدند و گرد و غبار موجود در سطح میوه به کمک آب مقطر شسته و سپس پوست میوه‌ها با حوله تمیز خشک شد. پوست میوه‌ها با چاقوی تیز به صورت خیلی نازک جدا و خشک شد. نمونه‌های خشک شده بعد از آسیاب کردن برای مطالعه فیتوشیمیایی استفاده شدند.

(Santiago *et al.*, 2000; Takos *et al.*, 2006). ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی اغلب در پوست میوه سیب تجمع یافته، و عمده‌ترین آنها اسیدهای فنلی، فلاونول‌ها، کوئرستین گلیکوزید، دی‌هیدروچالکون‌ها، فلاونول و آنتوسیانین هستند (Awad *et al.*, 2001b; Takos *et al.*, 2006) ترکیبات فنلی در گیاهان دارای فعالیت‌های متعددی، از قبیل تنظیم فعالیت‌های نموی و واکنش‌های دفاعی گیاهان در مقابل عوامل زنده و غیر زنده هستند (Khanizadeh *et al.*, 2007; Santiago *et al.*, 2000; Pothavorn, 2008).

روش‌های متعددی برای مطالعه ترکیبات فنلی در گیاهان وجود دارد که عمده‌ترین آنها آنالیز کمی و کیفی ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی با استفاده از روش‌های جداسازی و تعیین ساختار، از قبیل کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا، طیف‌سنجی جرمی، طیف‌سنج رزونانس مغناطیس هسته‌ای (NMR) و کروماتوگرافی لایه‌نازک هستند. بعلاوه، برای آشکارسازی و مکان‌یابی معمولاً از روش‌های متعارف میکروسکوپی (میکروسکوپ نوری، الکترونی، فلورسنس و کونفو کال) استفاده می‌شود (Bae *et al.*, 2006; Rudall and Gaddick, 1994).

Rudall و Gaddick (۱۹۹۴) بیان نمودند که ساده‌ترین و مؤثرترین تکنیک مطالعه حضور اسیدهای فنلی (مشتقات فرولیک اسید) در دیواره‌های سلولی گیاهان تک‌لپه، استفاده از میکروسکوپ فلورسنس ماوراءبنفش است. مطالعات HPLC انجام شده روی ترکیبات فنلی گوشت و پوست ارقام مختلف سیب توسط Khanizadeh و همکاران (۲۰۰۷) نشان‌دهنده وجود تفاوت‌هایی در میزان تجمع ترکیبات پلی‌فنلی در بخش‌های مختلف میوه بود. بر اساس

استخراج ترکیبات پلی فنلی و فلاونوئیدی: به منظور

استخراج ترکیبات فلاونوئیدی (آنتوسیانین و فلاونول) و اسیدهای فنلی روی یک گرم از پوست میوه خشک شده، ده میلی لیتر حلال هگزان افزوده شده و به مدت بیست دقیقه در حمام فراصوت (Ultra Sonic Bath, Power Sonic, در دمای آزمایشگاه عصاره گیری شد. سپس 505, Korea) عصاره هگزانی به وسیله تبخیر در خلأ (Heidolph, Germany) خشک شد. روی عصاره خشک شده مرحله قبلی ۱۰۰ میلی لیتر مخلوط متانول: آب (۱:۱) افزوده شد و سپس به مدت ۲۰ دقیقه در حمام فراصوت قرار گرفت. عصاره‌های حاصل صاف شده، سپس به مدت ده دقیقه در دور ۱۳۰۰۰ در دقیقه سانتیفریوژ (Beckman, J-25 USA) شدند. ۲۰ میکرولیتر از عصاره حاصل برای شناسایی ترکیبات فنلی به وسیله HPLC تجزیه‌ای استفاده قرار گردید.

کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC):

استخراج و شناسایی ترکیبات فلاونوئیدی و اسیدهای فنلی با استفاده از روش تغییر یافته Lata و همکاران (۲۰۰۹) و Khanizadeh و همکاران (۲۰۰۷) انجام شد. روش مورد استفاده امکان شناسایی ترکیبات ذکر شده را در زمان کوتاه (۳۰ دقیقه) فراهم می‌آورد. جداسازی به وسیله سیستم HPLC تجزیه‌ای (Cecil, English) مجهز به پمپ دوگانه (Cecil, 4100)، حذف کننده حباب‌های هوا (Cecil) و آشکارکننده ماوراءبنفش (Cecil, 4201) UV/Vis انجام شد. جداسازی ترکیبات فنلی با استفاده از ستون فاز معکوس (C18) (به طول ۲۵۰ میلی متر و با قطر داخلی ۴/۵ میلی متر با اندازه ذرات ۵ میکرومتر) که به

وسيله ستون محافظ (C18) (به طول ۵ میلی متر با قطر داخلی ۴ میلی متر با اندازه ذرات ۵ میکرومتر) محافظت می‌شد، انجام شد. شناسایی ترکیبات فلاونوئیدی و اسیدهای فنلی در طول موج ۲۸۰ نانومتر انجام شد. برای شناسایی فلاونول‌ها، آنتوسیانین و اسیدهای فنلی از فاز متحرک حاوی ۲٪ استیک اسید در آب (پمپ A) و متانول (پمپ B) استفاده شد. شیب خطی غلظت به کاربرده شده برای حلال متانول حاوی استیک اسید از ۱۰٪ B شروع شد و سپس در طی ۲۰ دقیقه به ۱۰۰٪ رسید. در فاصله زمانی ۲۰ تا ۲۵ دقیقه در این حالت باقی ماند. سپس در طی ۲ دقیقه دوباره به حالت اول خود؛ یعنی ۱۰٪ B رسید، و تا زمان ۳۰ دقیقه در این حالت باقی ماند.

شناسایی و کمی‌یابی ترکیبات پلی فنلی و

فلاونوئیدی: برای شناسایی ترکیبات فلاونوئیدی (آنتوسیانین و فلاونول) و اسیدهای فنلی از مقایسه زمان بازداری (Retention Time) پیک‌های مربوط به ترکیبات استاندارد با ترکیبات حاصل از عصاره پوست استفاده شد. برای به دست آوردن زمان بازداری ترکیبات فلاونوئیدی و اسیدهای فنلی، ترکیبات استاندارد با غلظت ۰/۲ میلی گرم در یک میلی لیتر متانول تهیه گردیدند. سپس برای شناسایی ترکیبات فلاونوئیدی و اسیدهای فنلی عصاره‌ها و حصول به زمان بازداری استاندارد، ۲۰ میکرولیتر از عصاره و استاندارد‌ها به طور جداگانه به دستگاه HPLC آنالیتیکال تزریق شدند. در مواردی که اندازه پیک استاندارد در مقایسه با پیک‌های مجهول بزرگتر بود، محلول استاندارد ۱:۵ تا ۱:۱۰ رقیق گردید و سپس به دستگاه تزریق شد تا اندازه منحنی‌های مجهول و استاندارد قابل مقایسه باشد.

آزمایش‌های میکروسکوپی

آماده‌سازی نمونه‌ها برای مطالعات هیستولوژیک

حذف واکس نمونه‌ها: حذف واکس به منظور

مشاهده بهتر نمونه‌ها در زیر میکروسکوپ با استفاده از روش Gniwotta و همکاران (۲۰۰۵) انجام شد. سپس نمونه‌های به اندازه $0/5 \times 0/5$ سانتی‌متر با استفاده از تیغه تیز از قسمت میانی پوست میوه مطابق روش Bae و همکاران (۲۰۰۶) تهیه شدند.

مشاهده آنتوسیانین‌ها: نمونه‌های تهیه شده به روش

ذکر شده در بالادر داخل پتری‌دیش حاوی آب مقطر قرار گرفت. آنتوسیانین با استفاده از روش میکروسکوپ نوربازتابشی مشاهده شد.

مواد رنگ آمیزی

رنگ آمیزی با دی فنیل بوریک اسید ۲- آمونیا

اتیل استر (NA) برای مشاهده فلاونول‌ها و

اسیدهای فنلی: رنگ آمیزی نمونه‌ها مطابق روش Kladnik و همکاران (۲۰۰۴) انجام شد؛ با این تفاوت که در تحقیق انجام شده از نمونه‌های تازه گیاهی به عوض نمونه‌های آبدگیری شده استفاده شد.

رنگ آمیزی بافت‌ها با کلرید آهن برای مشاهده

تانن‌ها: از کلرید آهن برای رنگ آمیزی تانن‌ها مطابق روش Rangari (۲۰۰۷) استفاده شد.

میکروسکوپ فلورسنس: برای مکان‌یابی و توزیع

آنتوسیانین‌ها و سایر ترکیبات فنلی در پوست میوه سیب از فنون نوین میکروسکوپی بر پایه بهبود عمق میدان (Dadpour et al., 2008) بهره‌گیری شد. در این روش می‌توان در

تعیین کمی‌ت ترکیبات فلاونوئیدی و اسیدهای فنلی با استفاده از روش اندازه‌گیری سطح زیرمنحنی و مقایسه با استانداردهای مربوطه انجام گرفت. زمان بازداری ترکیبات استاندارد مورد استفاده برای کمی‌ت‌یابی ترکیبات پلی‌فنلی و فلاونوئیدی به ترتیب زیر بود: پارا-کوماریک اسید $13'/23''$ گالیک اسید $6'/51''$ ، فرولیک اسید $13'/53''$ ، کافئیک اسید $11'/57''$ ، ترانس-۲-هیدروکسی سینامیک اسید $15'/27''$ ، اپی کتچین $11'$ ، کتچین $9'/38''$ و سیانیدین-۳-گالاکتوزید $11'/13''$.

ترکیبات استاندارد و حلال‌های مورد استفاده:

پاراکوماریک اسید، (-) - اپی کتچین، سیانیدین-۳-گالاکتوزید و گالیک اسید از شرکت Sigma خریداری شدند. کافئیک اسید، فرولیک اسید، ترانس-۲-هیدروکسی سینامیک اسید و (+) کتچین از شرکت Sigma Aldrich تهیه شدند. استونیتریل، ان-هگزان و فرمیک اسید از شرکت Merck و متانول از شرکت Caledon خریداری شد.

در این آزمایش، تجزیه واریانس داده‌های حاصل از تیمارها (مراحل نموی میوه) و صفات (ترکیبات) که در دو تکرار (دو بار تزریق) به دست آمده بودند، از طریق تجزیه و تحلیل یک طرفه انجام گردید. مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ صورت گرفت. برای این منظور، از بسته نرم‌افزاری SPSS استفاده شد.

سانتی گراد و دمای روزانه ۲۴-۳۰ درجه سانتی گراد بود که محدوده دمایی مناسبی برای بیوستز آنتوسیانین ها است.

فلاونول ها یا تانن ها: نتایج نشان داد که با نمو میوه بر میزان فلاونول ها در پوست میوه افزوده شد، اما درست قبل از رسیدن میوه میزان فلاونول ها در پوست میوه کاهش یافت. بیشترین میزان فلاونول ها در مرحله میانی نمو میوه مشاهده شد ($P \leq 0.05$). در این مرحله فلاونول ها (کتچین و اپی کتچین) ۵۰٪ از کل ترکیبات فنلی را شامل بود. کاهش در میزان فلاونول ها در مرحله برداشت تجاری میوه در ارتباط با کاهش شدید در محتوای اپی کتچین بود، که میزان آن در مرحله برداشت میوه نسبت به مرحله فندقی تا ۳ برابر کاهش نشان داد (شکل ۱). میزان کتچین در مرحله میانی نمو میوه بیشتر از مراحل فندقی و برداشت میوه بود (شکل ۱). اپی کتچین و گالیک اسید (اسید فنلی) از پیش سازهای مهم تانن های متراکم هستند که تغییر مقدار ترکیبات فوق به نوسان هایی در میزان تانن های متراکم مربوط است.

اسیدهای فنلی: نتایج نشان دهنده وجود تغییراتی در میزان اسیدهای فنلی ($P \leq 0.05$) موجود در پوست میوه بود (شکل ۲). اسیدهای فنلی در مرحله فندقی میوه ۵٪، در مرحله میانی نمو میوه ۳٪ و در مرحله برداشت میوه ۴٪ از کل ترکیبات فنلی را شامل می شدند. میزان گالیک اسید به ترتیب در مرحله فندقی و میانی نمو میوه ۶ و ۱۳٪ و در مرحله برداشت میوه ۲٪ از اسیدهای فنلی کل را به خود اختصاص می داد. میزان کافئیک اسید در پوست گالا در مرحله برداشت، بیشتر از میزان آن در مرحله فندقی بود و کمترین میزان آن در مرحله میانی رشد مشاهده گردید

کنار بهبود عمق میدان دید میکروسکوپی، کانال های چندگانه فلورسنس را در یک تصویر هم آوری نمود و از این راه داده های کاملی را به دست آورد. در این راستا، پس از انجام رنگ آمیزی، نمونه در یک پتری دیش پلاستیکی سیاه رنگ که با آب مقطر (به منظور جلوگیری از چروکیدگی) پُر شده بود، جایگیری گردید. از میکروسکوپ فلورسنس اولمپوس BX51 در چهار پرتو برانگیخته ۳۷۰، ۴۷۰، ۵۱۰-۵۵۰ و ۵۶۰-۶۱۰ نانومتر بهره گیری شد. برداشت تصویر با دوربین خنک شونده بسیار حساس (توانایی جداسازی ۱۶ میلیون رنگ در نور کم) انجام پذیرفت و در قالب بندی TIFF در حالت RGB (۱۲ بیت به ازای هر کانال) ذخیره شد. فرآوری و پردازش تصویرهای برداشت شده با نرم افزار ImageJ صورت گرفت.

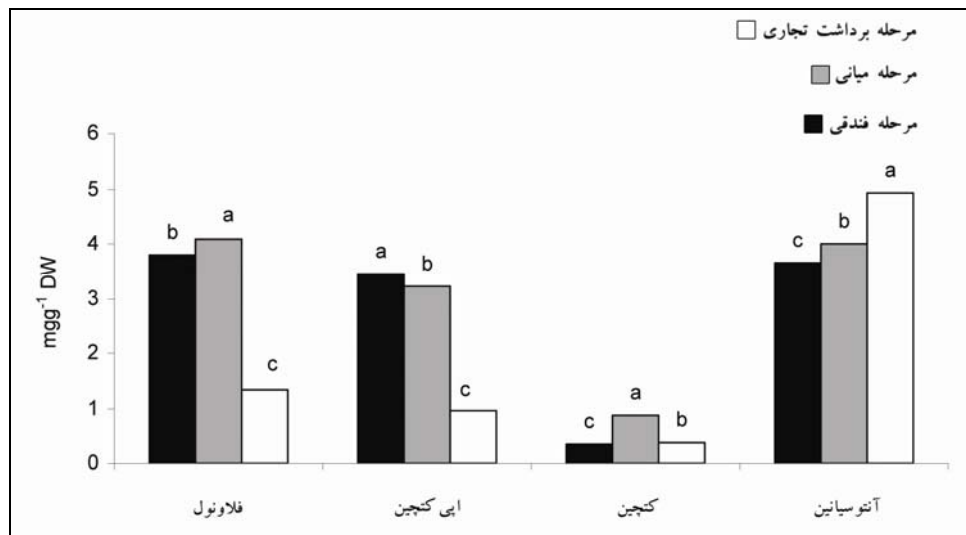
نتایج

نتایج حاصل از مطالعه HPLC

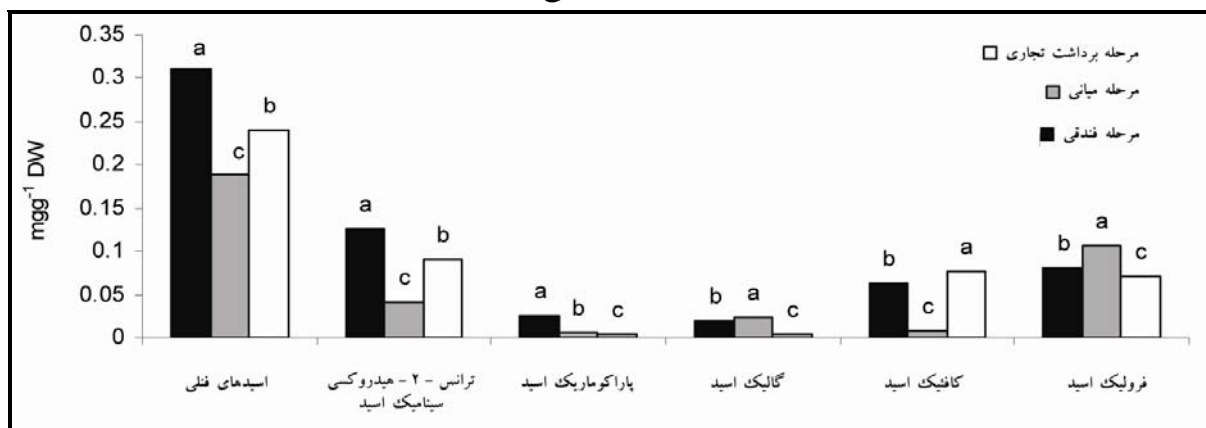
آنتوسیانین ها: نتایج نشان دهنده وجود تفاوت های کمی در میزان آنتوسیانین در طی فصل رشد در پوست سیب رقم گالا بود. حداکثر تجمع آنتوسیانین ها در پوست سیب در مرحله برداشت تجاری میوه مشاهده شد (شکل ۱) ($P \leq 0.05$). افزایش تدریجی در میزان آنتوسیانین پوست سیب گالا بویژه در مرحله میانی نمو میوه (۸۰ روز بعد از تمام گل) شاید در ارتباط با شرایط آب و هوایی منطقه استان آباد باشد. با توجه به داده های هواشناسی (داده ها نشان داده نشده است) مشخص شده است که از مرداد ماه به بعد در منطقه استان آباد متوسط دمایی شبانه ۱۸ درجه

کل اسیدهای فنلی هر مرحله را شامل می‌شد. میزان فرولیک اسید در مرحله میانی رشد میوه بیشتر از مراحل ابتدایی و نهایی نمو میوه بود (شکل ۲).

(شکل ۲). ترانس-۲-هیدروکسی سینامیک اسید فراوانترین اسید فنلی مشاهده شده در پوست سیب گالا به غیر از مرحله میانی نمو میوه بود (شکل ۲) که میزان آن در مرحله فندق میوه ۵/۸٪ و در مرحله برداشت میوه ۳۷٪ از



شکل ۱- تغییرات آنتوسیانین و فلاونول‌های (کتچین و ای سی کتچین) موجود در پوست سیب گالا در طی فصل رشد. حروف موجود در ستون‌ها نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین مراحل مختلف نمو برای هر ترکیب در سطح احتمال ۵٪ بر مبنای آزمون دانکن است.



شکل ۲- تغییرات اسیدهای فنلی موجود در پوست سیب گالا در طی فصل رشد. حروف موجود در ستون‌ها نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین مراحل نمو مختلف برای هر ترکیب در سطح احتمال ۵٪ بر مبنای آزمون دانکن است.

پوست سیب دیده شد (شکل ۳- ستون ۱ ردیف ۳). در مرحله فندق (شکل ۳- ستون ۱ ردیف ۱) و میانی نمو میوه (ستون ۱ ردیف ۲) تجمع آنتوسیانین در داخل سلول مشاهده شد، اما به تدریج با نمو میوه، آنتوسیانین در

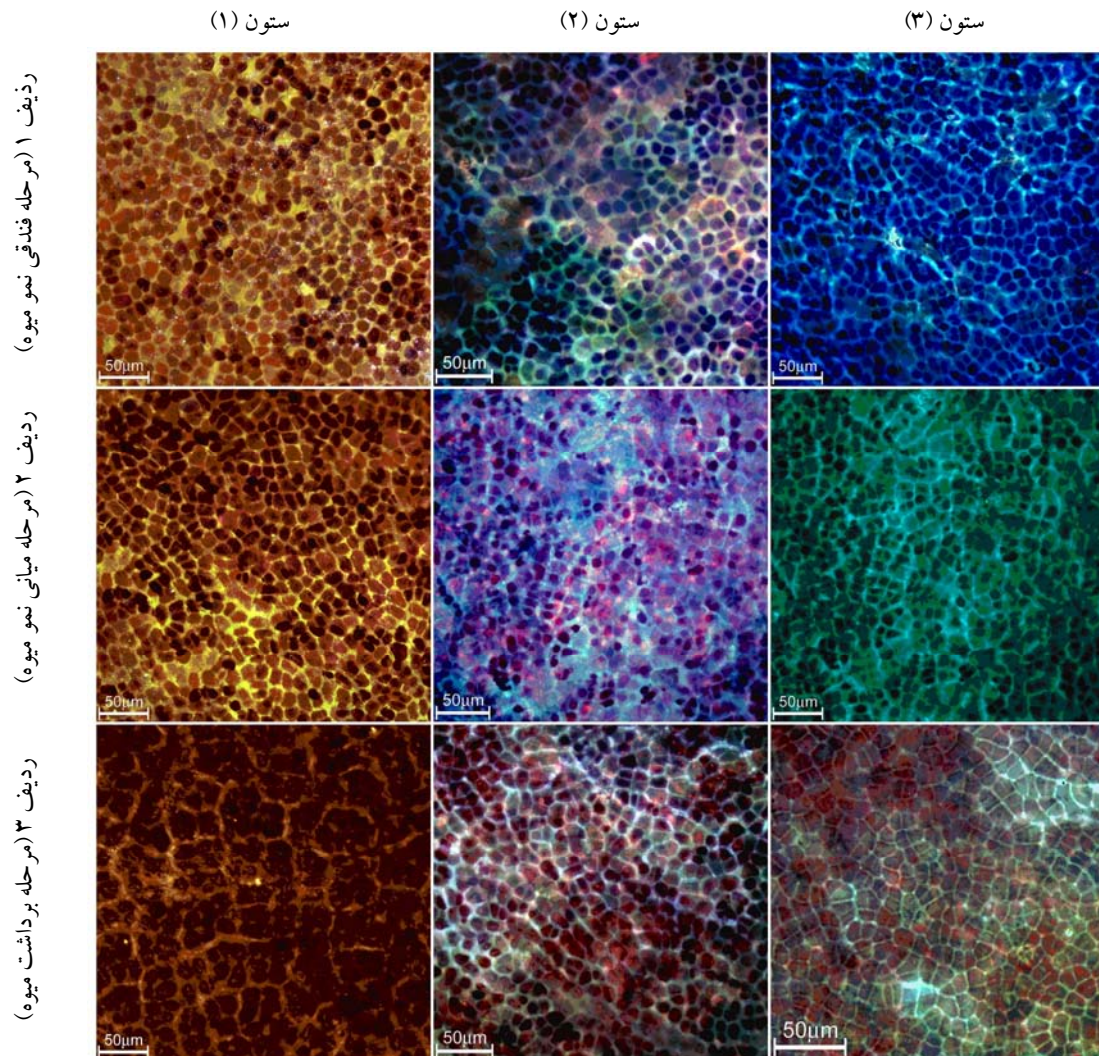
نتایج حاصل از مطالعات میکروسکوپی

تصاویر میکروسکوپی نشان‌دهنده افزایش تدریجی میزان آنتوسیانین در طی فصل رشد در پوست سیب گالا بود. حداکثر تجمع آنتوسیانین در مرحله برداشت میوه در

اسیدهای فنلی، مخصوصاً کافئیک اسید (فلورسنس آبی روشن) و ترانس - ۲ - هیدروکسی سینامیک اسید (فلورسنس سبز روشن) نسبت به مرحله میانی رشد میوه افزوده شد، اما از تجمع فرولیک اسید، گالیک اسید و پاراکوماریک اسید کاسته شد (شکل ۳ - ستون ۳ ردیف ۲). فلورسنس آبی مشاهده شده در مرحله فندق میوه نشان‌دهنده تجمع تانن‌های قابل هیدرولیز (کتچین، اپی کتچین و گالیک اسید) در اطراف دیواره‌های سلولی و داخل سلول بود (شکل ۳ - ستون ۳ ردیف ۱). اپی کتچین از پیش‌سازهای مهم تانن‌های متراکم در سلول‌های گیاهی است و حداکثر تجمع این ترکیب در سلول‌های گیاهی در مرحله فندق (فلورسنس آبی مشاهده شده در شکل ۳ ستون ۳ ردیف ۱) و میانی نمو میوه سیب (فلورسنس سبز مشاهده شده در شکل ۳ (ستون ۳ ردیف ۲) مشاهده شد و به تدریج با نمو میوه از تجمع تانن‌های قابل هیدرولیز کاسته و بر تجمع تانن‌های متراکم افزوده شد. فلورسنس سبز مشاهده شده در اطراف دیواره‌های سلولی و در داخل سلول، دلیل بر افزایش این مواد در سلول‌های پوست سیب بود (شکل ۳ - ستون ۳ ردیف ۲). فلورسنس سبز مشاهده شده در مرحله برداشت میوه نشان‌دهنده کاهش تجمع تانن‌های متراکم (مخصوصاً کاهش شدید در تجمع اپی کتچین در پوست میوه نسبت به مرحله فندق میوه) و استقرار آنها در دیواره‌های سلولی پوست سیب بود (شکل ۳ - ستون ۳ ردیف ۳).

واکوتل‌های سلول‌های مستقر در خوشه‌های سلولی تمرکز یافت (ستون ۱ ردیف ۳). تصاویر میکروسکوپی نشان‌دهنده تغییراتی در میزان ترکیبات فلاونوئیدی و اسیدهای فنلی موجود در پوست سیب گالا در طی فصل رشد بود. همان گونه که شکل ۳ (ستون ۲ ردیف ۲) نشان می‌دهد، بیشترین تجمع فلاونول‌ها (فلورسنس آبی) در مرحله میانی نمو میوه دیده شد و به طرف مرحله برداشت میوه کاهش جزئی در تجمع فلاونوئیدها مشاهده گردید. در این مرحله از رشد میوه از تجمع اسیدهای فنلی در پوست میوه نسبت به مرحله فندق میوه کاسته شد (شکل ۳ - ستون ۳ ردیف ۲).

مقایسه فلورسنس حاصل از نمونه‌های پوست و استانداردهای ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی رنگ‌آمیزی شده با NA نشان داد که در مرحله فندق میوه (شکل ۳ - ستون ۲ ردیف ۱) فلورسنس نارنجی مایل به صورتی به دلیل حضور آنتوسیانین در پوست میوه بوده و فلورسنس سبز - آبی مشاهده شده به دلیل حضور اسیدهای فنلی، مخصوصاً پاراکوماریک اسید، فرولیک اسید، گالیک اسید (از پیش‌سازهای تانن)، ترانس - ۲ - هیدروکسی سینامیک اسید و کافئیک اسید بود. در اواسط فصل رشد اثری از آنتوسیانین در سلول مشاهده نشد (شکل ۳ - ستون ۲ ردیف ۲). در این مرحله بر تجمع فرولیک اسید و گالیک اسید نسبت به مرحله فندق میوه افزوده شد. بعلاوه، کاهش شدید در تجمع برخی اسیدهای فنلی، از قبیل کافئیک اسید، ترانس - ۲ - هیدروکسی سینامیک اسید و پاراکوماریک اسید نسبت به مرحله فندق میوه دیده شده و بیشترین میزان فلورسنس آبی - سبز مشاهده شده در این مرحله به دلیل حضور کتچین (فلاونول‌ها) در سلول بود (ستون ۲ ردیف ۲). در مرحله برداشت میوه، بر میزان



شکل ۳- روند تغییرات ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی در سه مرحله نموی در پوست میوه؛ سیب رقم گالا

آنتوسیانین‌ها و فلورسنس سبز- آبی به دلیل حضور اسیدهای فنلی در پوست میوه است؛ ردیف ۲- فلورسنس آبی- سبز نشان‌دهنده حضور فلاونول‌ها در پوست میوه؛ ردیف ۳- فلورسنس آبی و سبز روشن نشانه حضور اسیدهای فنلی در مرحله برداشت تجاری میوه.

ستون ۳- روند تغییرات ترکیبات فلاونولی رنگ آمیزی شده با $FeCl_3$ ، ردیف ۱- فلورسنس آبی نشان‌دهنده حضور تانن‌های قابل هیدرولیز در پوست میوه؛ ردیف ۲- فلورسنس سبز در اطراف دیواره‌های سلولی پوست میوه

ستون ۱- روند تغییرات آنتوسیانین در طی فصل رشد: ردیف ۱- تجمع آنتوسیانین در سلول‌های منفرد پوست میوه، ردیف ۲- افزایش تدریجی در میزان آنتوسیانین نسبت به مرحله اول رشد میوه؛ ردیف ۳- افزایش شدید در میزان آنتوسیانین‌ها و استقرار آنها در سلول‌های موجود در خوشه‌های سلولی.

ستون ۲- روند تغییرات ترکیبات فلاونوئیدی و اسیدهای فنلی رنگ آمیزی شده با NA، ردیف ۱- فلورسنس نارنجی مایل به صورتی نشان‌دهنده حضور

(شب‌های خنک و روزهای گرم همراه با تابش بالا) در طی اواسط فصل رشد در منطقه مذکور باشد.

فلاونول‌ها یا تانن‌های متراکم: تانن‌های متراکم

سیب اکثراً پلیمر پروآنتوسیانیدین‌ها هستند (Takos *et al.*, 2006). در پوست سیب سیس و ترانس فلاوان-۳-اول‌ها همان کتچین و اپی‌کتچین‌ها هستند که به عنوان واحدهای آغازشگر بیوستنز تانن‌های متراکم عمل می‌کنند (Awad *et al.*, 2001a). بررسی‌های انجام شده توسط Rangari (۲۰۰۷) نشان داد که دو گروه از تانن‌ها با کلرید آهن واکنش نشان می‌دهند: ۱- تانن‌های قابل هیدرولیز که محلول در آب هستند و بر اثر رنگ‌آمیزی با کلرید آهن به رنگ آبی دیده شدند؛ ۲- تانن‌های متراکم که بر اثر رنگ‌آمیزی با کلرید آهن به رنگ سبز دیده شدند. چنین به نظر می‌رسد که استقرار تانن‌های متراکم در مرحله برداشت میوه سیب گالا به دلیل رسوب این ترکیبات بر اثر ایجاد پیوند با پروتئین‌های موجود در دیواره‌های سلولی باشد که با یافته‌های Takos و همکاران (۲۰۰۶) و Fournand و همکاران (۲۰۰۶) مطابقت دارد. تصاویر میکروسکوپی شکل ۳ (ستون ۳ ردیف‌های ۱ و ۲) نشان داد که در مرحله فندقی و میانی نمو میوه، سیب ترکیبات تاننی موجود در داخل سلول فرم مشخصی نداشته، در داخل سیتوپلاسم سلول و اطراف دیواره‌های سلولی پراکنده‌اند. Alemanno و همکاران (۲۰۰۳) در بررسی‌های خود روی گل‌های کاکائو بیان نمودند که ترکیبات تاننی به صورت بی‌شکل و یا کروی در تمام بافت‌های اپیدرمی و پارانشیمی گیاهان مورد مطالعه دیده شدند.

نتایج حاصل از آزمایش‌های (میکروسکوپی و HPLC) انجام شده نشان داد که با نمو میوه بر میزان فلاونول‌ها در پوست میوه افزوده شد، اما درست قبل از رسیدن میوه میزان

به دلیل حضور تانن‌های متراکم در پوست میوه؛ ردیف ۳- فلورسنس سبز نشان‌دهنده وجود تانن‌های متراکم در پوست میوه در مرحله برداشت تجاری میوه است.

بحث

آنتوسیانین‌ها: نتایج حاصل از آزمایش‌های HPLC و میکروسکوپی نشان‌دهنده وجود روند تدریجی در افزایش میزان آنتوسیانین‌ها در طی فصل رشد در پوست سیب گالا بود. حداکثر تجمع آنتوسیانین در مرحله برداشت میوه در سلول‌های اپیدرمی سیب مشاهده شد که با یافته‌های Lister و همکاران (۱۹۹۴)، Santiago و همکاران (۲۰۰۰) و Alemanno و همکاران (۲۰۰۳) در این خصوص مطابقت دارد. افزایش تدریجی در میزان آنتوسیانین‌های پوست (مخصوصاً در مرحله میانی نمو میوه) در طی فصل رشد، شاید در ارتباط با شرایط آب و هوایی منطقه بستان آباد باشد. نتایج حاصل از این آزمایش با نتایج حاصل از آزمایش‌های Reay و Lancaster (۲۰۰۱) و Yuri و همکاران (۲۰۰۹) در خصوص اثر اختلاف دمایی در بیوستنز آنتوسیانین مطابقت دارد. Takos و همکاران (۲۰۰۶) بیان نمودند که دو مرحله در بیوستنز آنتوسیانین‌ها وجود دارد: ۱- در مراحل اولیه نمو میوه (۱۸ تا ۴۸ روز بعد از تمام‌گل)؛ ۲- در هنگام رسیدن میوه (۱۳۴ روز بعد از تمام‌گل). کاهش در میزان آنتوسیانین‌ها در مراحل میانی نمو میوه به دلیل رقیق شدن این ترکیبات بر اثر رشد سریع میوه است، اما در تحقیق حاضر (نتایج حاصل از آزمایش‌های میکروسکوپی و HPLC) کاهش در میزان آنتوسیانین در مرحله میانی نمو میوه دیده نشد که شاید دلیل آن، وجود شرایط محیطی مناسب برای بیوستنز آنتوسیانین

فلورسنس آبی مشاهده شده در نمونه‌های گیاهی *Johnsonia lupulina* بدون رنگ آمیزی (قرار دادن نمونه در آب خالص) و رنگ آمیزی شده با هیدروکسید آمونیوم نشان‌دهنده حضور فرولیک اسید متصل به دیواره‌های سلولی است (Rudall and Gaddick, 1994; Hoerner and Weissenbock, 2003). از طرف دیگر، فلورسنس (آبی - سبز) مشاهده شده در مرحله میانی نمو، میوه احتمالاً به دلیل حضور کتچین (فلاونول) در سلول است که با یافته‌های Wuyts (۲۰۰۶) در مورد ریشه موز مطابقت دارد.

نتیجه‌گیری کلی

در این مطالعه سعی شد تا مکان‌یابی بافتی و الگوی تجمع برخی ترکیبات فنلی در مراحل مختلف نمو میوه سیب‌گالا با استفاده از روش‌های میکروسکوپی (نوربازتابشی و فلورسنس) و کروماتوگرافی بررسی شود. استفاده از روش‌های میکروسکوپی فوق در تلفیق با روش‌های کروماتوگرافی روشی مطمئن در شناسایی ترکیبات فنلی نسبت به استفاده منفرد از روش‌های کروماتوگرافی بود. برای مطالعه موفقیت آمیز ترکیبات فنلی گیاهان ابتدا باید مکان قرارگیری آنها در بافت‌های گیاهی بررسی گردد که دست‌یابی به این مهم با استفاده از روش‌های میکروسکوپی مقدور است. روش‌های میکروسکوپی در تعیین کمی ترکیبات فنلی موجود در گیاهان ناتوانند و لذا برای رفع این مشکل باید از روش‌های کروماتوگرافی توأم با روش‌های میکروسکوپی بهره جست. از آنجایی که ترکیبات فنلی نقش مهمی در ویژگی‌های چشایی (رنگ، طعم و مزه) میوه‌های تازه برداشت شده دارند و بیوستتزی این ترکیبات، مخصوصاً آنتوسیانین در مرحله برداشت میوه از دیدگاه تجاری در سیب‌حایز

فلاونول‌ها در پوست میوه کاهش شدیدی نشان داد. نتایج حاصل از آزمایش حاضر با یافته‌های Takos و همکاران (۲۰۰۶) در خصوص کاهش میزان تانن‌های متراکم در سیب رقم Crisp red یافته‌های Lister و همکاران (۱۹۹۴) در سیب رقم Granny Smith مطابقت دارد. کاهش در میزان تانن‌های متراکم به دلیل رقیق شدن این ترکیبات بر اثر رشد میوه و افزایش در میزان آنتوسیانین است (Fournand et al., 2006; Takos et al., 2006; Hanlin and Downey, 2009).

اسیدهای فنلی: نتایج مطالعات میکروسکوپی و

HPLC نشان داد که بیشترین میزان اسیدهای فنلی در مرحله ابتدایی نمو میوه سیب دیده شد و با پیشرفت فصل رشد، از میزان اسیدهای فنلی موجود در پوست میوه کاسته شد. در مرحله برداشت میوه افزایش دوباره در میزان اسیدهای فنلی مشاهده گردید. Awad و همکاران (۲۰۱۱a) بیان نمودند که در سیب ارقام Elstar و Jonagold مقدار اسیدهای فنلی در اوایل فصل بالا بوده و در مرحله رسیدن میوه مقدار ترکیبات فوق ثابت بود. فلورسنس نارنجی مایل به صورتی مشاهده شده در شکل ۳ (ستون ۲ ردیف ۱) به دلیل حضور آنتوسیانین در پوست میوه بود که با فلورسنس مشاهده شده در گیاه جو توسط Hoerner و Weissenbock (۲۰۰۳) مطابقت دارد. فلورسنس سبز - آبی مشاهده شده به دلیل حضور اسیدهای فنلی (پارا‌کوماریک اسید، فرولیک اسید و کافئیک اسید) بود. چنین به نظر می‌رسد که فرولیک اسید و پارا‌کوماریک اسید از ترکیبات فنلی متصل به دیواره‌های سلولی بوده، پیش‌ماده بیوستتزی لیگنین باشند (Rudall and Gaddick, 1994; Pothavorn, 2008).

سپاسگزاری

از آقای نامور به دلیل همکاری در تهیه نمونه‌های مورد نیاز، از خانم دکتر اثنی‌عشری و خانم دکتر بامداد به جهت همکاری در آنالیز نمونه‌ها، و از آقای دکتر مطلبی آذر که تجزیه آماری این آزمایش را تقبل نمودند، بی نهایت تشکر می‌گردد. از معاونت پژوهشی دانشگاه تبریز به دلیل تأمین بخشی از هزینه‌های آزمایش حاضر کمال تشکر به عمل می‌آید.

اهمیت است، لذا شناخت دقیق این ترکیبات و مکان‌یابی آنها در طی فصل رشد به مدیریت دقیق باغ‌ها کمک خواهد کرد تا با ایجاد تغییراتی در مدیریت باغ (هرس، آبیاری، کود دهی، کیسه‌گذاری میوه‌ها، استفاده از پایه‌های مناسب، استفاده از پوشش‌های انعکاسی نور و ...) بتوان بیوستن این ترکیبات را در میوه‌ها افزایش داد.

منابع

- Alemanno, L., Ramos, T., Gargadenc, A., Andary, C. and Ferriere, N. (2003) Localization and identification of phenolic compounds in *Theobroma cacao* L. somatic embryogenesis. *Annals of Botany* 92: 613-623.
- Awad, M. A., Jager, A. D. and Wagenmakers, P. S. (2001b) Effects of light on flavonoids and chlorogenic acid levels in the skin of 'Jonagold' apple. *Scientia Horticulturae* 88:289-298.
- Awad, M. A., Jager, A. D., Plas, L. H. and Krol, A. R. (2001a) Flavonoid and chlorogenic acid changes in skin of 'Elstar' and 'Jonagold' apples during development and ripening. *Scientia Horticulturae* 90: 69-83.
- Bae, R. N., Kim, K. W., Kim, T. C. and Lee, S. K. (2006) Anatomical observation of anthocyanin rich cell in apple skins. *HortScience* 41(3):733-736.
- Dadpour, M. R., Grigorian, W., Nazemieh, A. and Valizadeh, M. (2008) Application of epillumination light microscopy for study of floral ontogeny in fruit trees. *International Journal of Botany* 4(1): 49-55.
- Fournand, D., Vicens, A., Sidhoum, L. and Marc, J. (2006) Accumulation and extractability of grape skin tannins and anthocyanins at different advanced physiological stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (19): 7331-7338.
- Gniwotta, F., Vogg, G., Gartmann, V., Carver, T. L. W., Riederer, M. and Jetter, R. (2005) What do microbes encounter at the plant surface? Chemical composition of Pea leaf cuticular waxes. *Plant Physiology* 139: 519-530.
- Hanlin, R. L. and Downey, M. O. (2009) Condensed tannin accumulation and composition in skin of shiraz and Cabernet Sauvignon grapes during berry development. *American Journal of Enology and Viticulture* 60: 13-23.
- Hoerner, S. R. and Weissenbock, G. (2003) Contribution of phenolic compounds to the UV-B screening capacity of developing barley primary leaves in relation to DNA damage and repair under elevated UV-B levels. *Phytochemistry* 4: 243-255.
- Khanizadeh, S., Ding, L., Tsao, R., Rekika, D., Yang, R., Charies, M. T., Vigneault, C. and Rupasinghe, H. P. (2007) Phytochemical distribution among selected advanced apple genotypes development for fresh market and processing. *Journal of Agriculture, Food, and Environmental Sciences* 1(2). Retrieved from: <http://www.scientificjournals.org/journals2007/articles/1266pdf>.
- Kladnik, A., Chamusco, K., Dermastia, M. and Chourey, P. (2004) Evidence of programmed cell death in post-phloem transport cells of the maternal pedicel tissue in developing caryopsis of maize. *Plant Physiology* 136: 3572-3581.

- Lata, B., Trampczynska, A and Paczesna, J. (2009) Cultivar variation in apple peel and whole fruit phenolic composition. *Scientia Horticulturae* 121: 176- 181.
- Lister, C. E. Lancaster, J. E. Sutton, K. H. Walker, J. R. L. (1994) Developmental changes in the concentration and composition of flavonoids in skin of a red and a green apple cultivar. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 64(2): 155-161.
- Pothavorn, P. (2008) Sap phenolic compositions in some bananas in Thailand. M.Sc Thesis, Mahidol University, Thailand.
- Rangari, V. (2007) Pharmacognosy: Tannin containing drugs. Retrieved from <http://nsdi.niscair.res.in/bitstream/123456789/591/1/revised+tannin+containing+drugs.pdf>
- Reay, P. F. and Lancaster, J. E. (2001) Accumulation of anthocyanins and quercetin glycosides in 'Gala' and 'Royal Gala' apple fruit skin with UV-B-visible irradiation: modifying effects of fruit maturity, fruit side, and temperature *Scientia Horticulturae* 90: 57-68.
- Rudall, P. J and Gaddick, L. R. (1994) Investigation of presence of phenolic compounds in monocotyledonous cell walls using UV fluorescence microscopy. *Annals of Botany* 74: 483-491.
- Santiago, L. J., Ricardo, P. and Oliveira, D. (2000) Compartmentation of phenolic compounds and phenylalanine ammonia-lyase in leaves of *Phyllanthus tenellus* Roxb. and their induction by copper sulphate. *Annals of Botany* 86: 1023-1032.
- Takos, A. M., Ubi, B. E., Robinson, S. P. and Walker, A. R. (2006) Condensed tannin biosynthesis gene are regulated separately from other flavonoid biosynthesis genes in apple fruit skin. *Plant Science* 170: 487-499.
- Wuyts, N. (2006) Interaction between plant parasitic nematodes and plant secondary metabolism, with emphasis on phenylpropanoids in roots. Ph.D. Thesis. Katholieke University, Belgium.
- Yuri, J., Neira, A., Quilodran, A., Motomura, Y. and Palomo, I. (2009) Antioxidant activity and total phenolics concentration in apple peel and flesh is determined by cultivar and agro-climatic growing regions in Chile. *Journal of food, Agriculture and Environment* 7: 513-517.

Quantitative and qualitative investigation of phenolic compounds in Gala apple peel

Lamia Vojodi Mehrabani ¹, Mohammad Reza Dadpour ^{*1}, Abbas Delazar ², Ali Movafeghi ³
and Jafar Hadjilou ¹

¹ Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz

² School of Pharmacy and Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences

³ Department of plant Biology, Faculty of Natural Science, University of Tabriz, Tabriz

Abstract

Quantitative and qualitative study of phenolic compounds (phenolic acids, flavanols and anthocyanins) in peel of Gala apple were implemented using analytical HPLC, fluorescence microscopy and epi-illumination light microscopy at three different growing stages [1- fruit early growing stage 2- mid-stage of fruit development (80 days after full bloom) 3- during commercial harvest time]. The results showed qualitative and quantitative differences between diverse growing stages regarding the content and accumulation of phenolic compounds. HPLC and microscopic studies showed that anthocyanin content of peel increased progressively during season. Microscopic data revealed that the highest anthocyanin accumulation occurred at the commercial harvest time. Our results showed that phenolic acids content decreased till mid-season but then, after their content had increasing pattern until commercial harvest time. Microscopic pictures verified this claim as well. Simultaneous comparison of HPLC and microscopy of derived data showed that flavanol content of peel increased towards mid season. In contrast, a drastic decline was recorded for flavanols during commercial harvest time. Comparative survey of microscopic and chromatographic data indicated that the great potential of fluorescence microscopy for study of phenolic compounds in apple peels. In brief, integrated study of phenolic compounds by means microscopic and chromatographic techniques is fast and easy methods for identification and quantification of phenolic compounds leading to accurate conclusion regarding elevation of apple fruit quality criteria.

Key words: Anthocyanin, Phenolic compounds, Apple, HPLC, Fluorescence microscopy

* Correspong Author: dadpour@tabrizu.ac.ir

