

## تأثیر محلول‌پاشی آهن بر الگوی بیان ژن‌های تولیدکننده آنتوسیانین میوه توت‌فرنگی طی مراحل نمو

سعید رضائی<sup>۱\*</sup>، محمد اسماعیل امیری<sup>۱</sup>، عباس بهاری<sup>۲</sup>، فرهنگ رضوی<sup>۱</sup>، مرتضی سلیمانی اقدم<sup>۳</sup> و حسین بیرامی<sup>۴</sup>



<sup>۱</sup> ایران، زنجان، دانشگاه زنجان، دانشکده کشاورزی، گروه علوم باغبانی

<sup>۲</sup> ایران، زنجان، دانشگاه زنجان، پژوهشکده فناوری‌های نوین زیستی

<sup>۳</sup> ایران، قزوین، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی، دانشکده کشاورزی، گروه علوم باغبانی

<sup>۴</sup> ایران، یزد، مرکز ملی تحقیقات شوری یزد، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۹/۰۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۵/۱۰

### چکیده

آنتوسیانین‌ها از جمله ترکیبات مهم در کیفیت میوه توت‌فرنگی هستند که ژن‌های مختلفی در تولید و انباشت این متابولیت‌ها نقش دارند. هدف از این پژوهش محلول‌پاشی آهن، تعیین غلظت بهینه و مطالعه تأثیر آن بر الگوی بیان ژن‌های دخیل در بیوسنتز آنتوسیانین‌ها میوه توت‌فرنگی رقم کاماروسا طی مراحل نمو بود. آزمایش بصورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار اجرا شد. بدین منظور، ابتدا در یک آزمایش مقدماتی بوته‌های توت‌فرنگی با کلات ۱۴٪ آهن در غلظت‌های صفر، ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰، ۱۰۰۰، ۱۲۰۰، ۱۴۰۰، ۱۶۰۰، ۱۸۰۰ و ۲۰۰۰ میکرومول بر لیتر محلول‌پاشی شده و سپس میزان تجمع آنتوسیانین‌ها و بیان ژن‌های دخیل در بیوسنتز آنها در روزهای سه، شش، نه و دوازده روز بعد از محلول‌پاشی ارزیابی گردیدند. طبق نتایج، میوه‌های محلول‌پاشی شده با آهن در غلظت ۱۴۰۰ میکرومول بر لیتر بیشترین میزان تجمع آنتوسیانین را نشان دادند. همچنین، کاربرد غلظت انتخابی آهن موجب تسریع رسیدگی میوه‌ها نیز گردید که در نهایت غلظت ۱۴۰۰ میکرومول بر لیتر به عنوان غلظت بهینه در نظر گرفته شد. افزایش بیان ژن‌های FaSUT<sub>1</sub>، FaMYB<sub>1</sub>، FaPAL، FaCHS<sub>1</sub>، FaMYC<sub>1</sub> به همراه افزایش فعالیت آنزیم PAL و کاهش بیان ژن FaMYC<sub>1</sub> در میوه‌های تیمار شده با کلات ۱۴٪ آهن در غلظت ۱۴۰۰ میکرومول بر لیتر می‌تواند دلیلی بر افزایش تجمع آنتوسیانین باشد. بنابراین، جهت تولید گلخانه‌ای توت‌فرنگی و کشت آن در محیط بدون خاک، طبق نتایج این پژوهش می‌توان غلظت ۱۴۰۰ میکرومول بر لیتر آهن با روش محلول‌پاشی را پیشنهاد نمود.

واژه‌های کلیدی: محلول‌پاشی، کاماروسا، بیان ژن، آنتوسیانین

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۴۹۲۳۵۱۷۴، پست الکترونیکی: Rezaei.s@znu.ac.ir

### مقدمه

روند تغییرات ترکیب‌های پلی‌فنولی و آنتوسیانینی علاقه‌مند کرده است. تولید و انباشت این ترکیبات در میوه‌ها با کاربرد برخی از مواد معدنی نظیر آهن، نیتروژن، روی و فسفر افزایش می‌یابد (۴۲). بنابراین، لازم است طی دوره رشد گیاه طبق اصول علمی نسبت به توصیه کودی اقدام

توت‌فرنگی یکی از میوه‌های بسیار محبوب در سرتاسر جهان می‌باشد که بدلیل غنی بودن از آنتوسیانین‌ها و انواع ویتامین‌ها در تغذیه و سلامت انسان نقش بسزایی دارد (۲۰ و ۵۰). ارزش اقتصادی و تغذیه‌ای توت‌فرنگی بسیاری از محققان را به مطالعه فیزیولوژیکی و مولکولی آن، بویژه

کرد تا عملکرد و کیفیت مطلوبی بدست آید.

آهن عنصر ضروری برای رشد و نمو گیاهان است که نقش مهمی در متابولیسم سلولی دارد. این عنصر در سنتز کلروفیل، زنجیره انتقال الکترون، فتوسنتز و تنظیم فعالیت آنزیم‌های چرخه کالوین نقش دارد (۳۴، ۴۳ و ۴۸). علایم کمبود آهن ابتدا در برگ‌های جوان دیده می‌شود. به همین خاطر، در گیاهان توت‌فرنگی که کمبود آهن دارند، کلروفیل‌ها به مقدار لازم ساخته نمی‌شود که نهایتاً منجر به کاهش کارایی فتوسنتز و افزایش رقابت بین رشد رویشی و زایشی می‌شود. بنابراین، از رشد و عملکرد گیاه کاسته می‌شود (۳ و ۳۴).

مطالعات مختلف نشان داده است که آهن در تولید و ذخیره متابولیت‌های ثانویه از جمله فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها نقش دارد (۳۰). پژوهشگران ثابت کرده‌اند که همبستگی مثبتی بین مصرف آهن و میزان تجمع ترکیبات فنولیکی گیاهان وجود دارد، بطوریکه با تغذیه برگ‌های آهن، مقدار تولید این ترکیب‌ها افزایش می‌یابد (۷). در همین راستا گزارش شده است که میزان عملکرد و کیفیت میوه‌های گلابی از طریق محلول‌پاشی با آهن با غلظت ۲۵۰ پی‌پی‌ام افزایش می‌یابد (۲۴). علاوه بر این، در تحقیقی که در مورد تاثیر کمبود آهن بر روی میوه هلو انجام شده است، مشخص گردیده است که کمبود آهن منجر به کاهش شدید محتوای فنولیکی و آنتوسیانینی میوه‌ها می‌شود (۶). علی‌رغم اینکه بیشتر پژوهش‌ها بطور عمده از جنبه فیزیولوژیکی مورد بررسی قرار گرفته است، در رابطه با شناسایی و بررسی الگوی بیان ژن‌های درگیر در مسیر تولید آنتوسیانین‌ها مطالعات بسیار کمی صورت پذیرفته است. در مسیر تولید آنتوسیانین‌ها و دیگر ترکیبات فنولی چندین ژن نقش موثر دارند که از این قبیل می‌توان به ژن‌های FaTTG1، FaMYC<sub>1</sub>، FaCHS، FaPAL، FaMYB<sub>1</sub>، FaMADS9 و FaSHP اشاره کرد (۱۴، ۲۴، ۳۱ و ۳۶).

ژن FaMYC<sub>1</sub> در تولید پرونوسیانیدین‌ها نقش کلیدی دارد

که در مراحل اولیه رشد میوه توت‌فرنگی بمیزان زیادی بیان می‌شود ولی با شروع رنگ‌گیری میوه و افزایش بیان ژن‌های FaPAL، FaMYB<sub>1</sub>، FaCHS، FaSUT1 و FaPAL پروتوسیانیدین‌های بیشتری به آنتوسیانین تبدیل می‌شوند. بر این اساس مقدار آمینواسیدها، آنتوسیانیدین‌ها و ترکیبات رنگی در مراحل نزدیک به رسیدن توت‌فرنگی افزایش پیدا می‌کند (۵۰). با وجود پژوهش‌هایی که درباره اثر آهن بر عملکردهای مختلف فیزیولوژیکی محصولات باغبانی انجام گرفته است اما تاکنون گزارش مستندی در مورد اثر این عنصر بر روند بیان ژن‌های سنتز کننده متابولیت‌های ثانویه میوه توت‌فرنگی وجود ندارد. بنابراین، هدف از این پژوهش بررسی تاثیر آهن بر الگوی بیان ژن‌های مختلف در مسیر تولید آنتوسیانین‌ها و فلاونوئیدها میوه توت‌فرنگی رقم کاماروسا طی مراحل مختلف نموی در گلخانه بود.

### مواد و روشها

این تحقیق بصورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در یک گلخانه هیدروپونیک شهرک گلخانه‌ای شهر زنجان (بخش خصوصی) با مشخصات جغرافیایی ۱۶۰۲ متر ارتفاع از سطح دریا، طول جغرافیایی ۴۸ درجه و ۳۹ دقیقه، عرض جغرافیایی ۳۶ درجه و ۷۱ دقیقه با رطوبت نسبی ۵۰-۶۰ درصد و میانگین دمای شبانه‌روز ۲۱ درجه سلسیوس در سال ۱۳۹۷ بر روی میوه‌های توت‌فرنگی رقم کاماروسا در طول دوره رشد و نمو اجرا شد.

بطور کلی رشد و نمو میوه توت‌فرنگی شامل چهار مرحله مختلف رشدی (توت سبز، سفید، صورتی و قرمز) است (۵۰) که محلول‌پاشی میوه‌ها در مرحله اول رشد (توت سبز: تقریباً یک هفته بعد از تشکیل میوه) انجام شد. بمنظور تیمار میوه‌ها از کلات آهن (Fe-EDTA) با نام تجاری فتریلون® (Fetrilon) و درجه خلوص ۱۴٪ استفاده گردید. ابتدا در یک آزمایش مقدماتی جهت تعیین غلظت بهینه، محلول‌پاشی تمام غلظت‌های (صفر -۲۰۰-۴۰۰-

عصاره سانتریفیوژ شده، دو سی سی بافر بورات سدیم با ۵۰۰ میکرولیتر محلول فنیل آلانین ۲۰ میلی مولار داخل لوله آزمایش ریخته و به مدت یک ساعت در حمام آب گرم ۳۷ درجه سلیسیوس قرار داده شد. فعالیت آنزیم با اندازه‌گیری میزان جذب محلول در طول موج ۲۹۰ نانومتر تعیین و بر حسب واحد بر میلی‌گرم پروتئین عصاره آنزیم ( $U\ mg^{-1}\ protein$ ) گزارش شد. برای اندازه‌گیری آنتوسیانین کل آب میوه توت‌فرنگی از روش اختلاف جذب در pH های مختلف استفاده شد (۲۱). جذب نمونه‌ها تهیه شده توسط بافر pH=۱ و pH=۴/۵ توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۵۱۰ و ۷۰۰ نانومتر قرائت و بر حسب میلی‌گرم سیانیدین ۳-گلوکوزید در ۱۰۰ گرم وزن تر میوه بیان شد.

طراحی پرایمرها با استفاده از اطلاعات موجود در دیتابیس NCBI برای ژن‌های توت‌فرنگی با نرم افزار Allele ID و با بکارگیری استراتژی exon junction انجام شد. بمنظور انتخاب برخی از ژن‌های گیاه توت‌فرنگی دخیل در سنتز آنتوسیانین و رسیدگی میوه، جستجو در بانک‌های اطلاعاتی و مقالات انجام گرفت و سپس پرایمرها برای ژن‌های مورد نظر طراحی و از شرکت ماکروژن کره جنوبی تهیه گردید (جدول ۱).

۶۰۰-۸۰۰-۱۰۰۰-۱۲۰۰-۱۴۰۰-۱۶۰۰-۱۸۰۰ و ۲۰۰۰ میکرومول بر لیتر روی بوته‌های توت‌فرنگی (در مرحله اول رشد میوه‌ها) اعمال گردید. محلول‌پاشی فقط یک مرتبه و در هر گیاه تقریباً به میزان ۴۰ میلی‌لیتر در ساعات عصر انجام شد. سپس غلظت ۱۴۰۰ برای تیمار کلات ۱۴٪ آهن بر اساس نتایج گزارش شده توسط رضائی و همکاران (۱۳۹۸) جهت بررسی صفات مورد ارزیابی انتخاب گردید (۳). در هر نوبت از نمونه‌برداری، میوه‌های برداشت شده بعد از قرار دادن در فویل آلومینیومی در ازت مایع منجمد شده و به فریزر ۸۰- درجه سلیسیوس آزمایشگاه پژوهش‌شده فناوری‌های نوین زیستی دانشگاه زنجان منتقل شدند. در این آزمایش صفات اسید کل، محتوای آنتوسیانین کل، فعالیت آنزیم PAL و میزان بیان ژن‌های FaMYB<sub>1</sub>، FaSUT<sub>1</sub>، FaCHS، FaMYC<sub>1</sub>، FaPAL مورد ارزیابی قرار گرفتند.

اندازه‌گیری صفات: اندازه‌گیری اسید کل مطابق با روش‌های استاندارد AOAC تعیین و بصورت درصد بیان گردید (۸). سنجش فعالیت آنزیم PAL با استفاده از روش Zucker (۱۹۶۸) انجام شد (۵۳). بدین صورت که ابتدا دو گرم از بافت میوه با ده میلی‌لیتر بافر بورات سدیم با pH=۸/۸ سپس محلول تهیه شده در دور ۱۲۰۰۰ به مدت ده دقیقه سانتریفیوژ شد. ۵۰۰ میکرولیتر از

جدول ۱- نام ژن‌ها و توالی آغازگرهای استفاده شده در این مطالعه (R: Reverse -F: forward)

نام پرایمر	توالی پرایمر	طول پرایمر	GC%	Tm°C
Genes name	Sequences	Length/bp		
FaSUT1	5- TGTTCGTGTTTGGGTTTTGG-3	20	F 40	54.3
FaSUT1	5-AGTGAGATCAGCAAGGAG-3	18	R 50	53.9
FaActin	5-GGTGTGATGGTTGGGATG-3	18	F 55.6	56.1
FaActin	5-GTAGAAGGTGTGATGCCAAA-3	20	R 55.6	56.1
FaMYB1	5-GGAAGGACAGATAACGAA-3	18	F 44.4	51.6
FaMYB1	5-TTTGGACGAAGAGTAGTG-3	18	R 44.4	51.6
FaPAL	5-GGAGTATTTGGCAAGGGA-3	18	F 50	53.9
FaPAL	5-GGAGTAATGTTGTGGTTGAG-3	18	R 50	53.9
FaMYC1	5-GTGTCTTTCTTCCCTTT-3	18	F 44.4	51.6
FaMYC1	5-TCCTCCTTTCTTCCAATC-3	19	R 47.4	55.2
FaCHS	5-CTCACATTTACCTCCTC-3	18	F 50	53.9
FaCHS	5-TCGTGGCTTCTAACTTCT-3	18	R 44.4	51.6

میزان RNA را برحسب نانوگرم بر میکرولیتر نشان می‌دهد. برای سنجش کیفیت RNA از الکتروفورز ژل آگارز یک درصد در بافر TAE و برای تولید cDNA از کیت (Hyper script cDNA synthesis) ساخت شرکت Geneall استفاده شد و برای ساخت cDNA طبق دستورالعمل، با بکارگیری حداقل یک میکروگرم RNA انجام شد (جدول ۲).

استخراج RNA با استفاده از کیت (RiboEXTM Total RNA isolation) شرکت Geneall کره جنوبی انجام شد. تعیین کمیت و کیفیت RNA استخراجی با استفاده از نانودرآپ و الکتروفورز ژل افقی یک درصد، صورت پذیرفت. سپس سنجش کمیت RNA توسط دستگاه Spectrophotometer (مدل NANODROP 2000) ساخت شرکت (Thermo SCIENTIFIC) انجام گرفت. این دستگاه

جدول ۲- مواد مورد نیاز جهت انجام رونویسی معکوس

حجم	ماده
Volume	Material
5µl	Total RNA
1µl	Oligo
DEPC-treated water	5µl
RT Master	10µl

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS<sub>ver 22</sub> و مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد و ترسیم نمودارها به کمک نرم افزار Excel انجام شد.

واکنش qPCR یا Rael-time PCR در دستگاه Rotor ۶۰۰۰ Gene شرکت QIA ساخت کشور آمریکا با استفاده از کیت 5x eragreen master mix شرکت Salicbiodyne کشور استونی انجام شد. فهرست مواد بکار رفته در واکنش و مقادیر آن‌ها در جدول (۳) و (۴) آورده شده است.

جدول ۳- غلظت و مقادیر حجمی مواد بکار رفته در واکنش Rael-time PCR

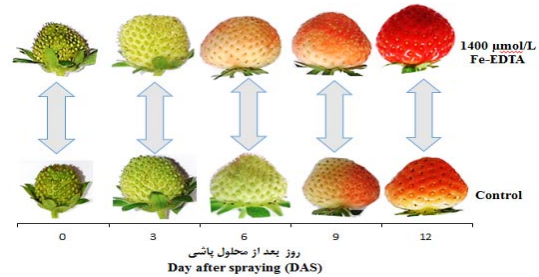
حجم	اجزای واکنش
Volume	Material
4 µl	5x Eva Green qPCR Mix
1 µl	Forward Primer
1 µl	Reverse Primer
3µl	Template cDNA
11 µl	Water, nuclease-free

جدول ۴- برنامه‌ی دمایی - زمانی استفاده شده برای Rael-time PCR

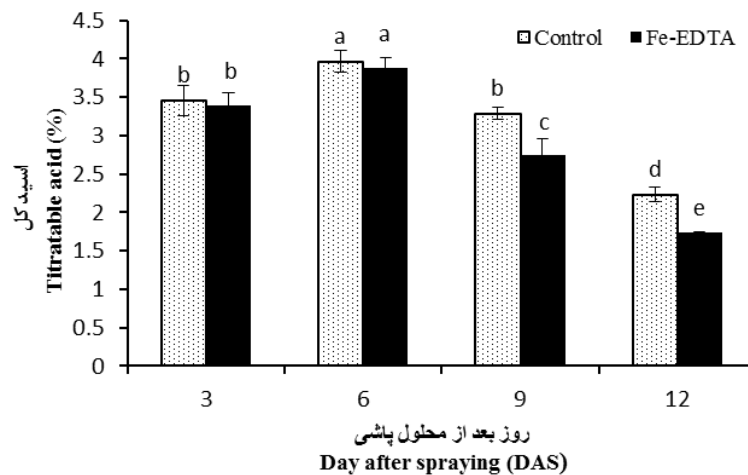
مرحله	تعداد چرخه‌ها	دما (°C)	زمان
Stage	Number of cycles	temperature	time
Initial Denaturation	1	95 Celsius	15 min
Denaturation	45-40	95 Celsius	20 s
Annealing		52-60 Celsius	
Extention		55 Celsius	20 s
Melt	1	99	

## نتایج

نقش آهن در رنگ‌گیری و رسیدگی میوه توت‌فرنگی: نتایج حاصل از بررسی دوره‌های مختلف نمونه‌برداری نشان دهنده آن بود که محلول‌پاشی غلظت ۱۴۰۰ میکرومول بر لیتر آهن موجب تسریع رنگ‌گیری و رسیدگی میوه توت‌فرنگی گردید (شکل ۱).



شکل ۱- تاثیر غلظت ۱۴۰۰ میکرومول بر لیتر آهن در تسریع رسیدن میوه توت‌فرنگی طی مراحل نموی  
اسید کل: بر پایه نتایج تجزیه واریانس داده‌ها اثر آهن، زمان و اثر برهمکنش بین آنها بر میزان اسید کل توت-



شکل ۲- تاثیر غلظت ۱۴۰۰ میکرومول بر لیتر آهن بر اسید کل میوه توت‌فرنگی طی مراحل نموی  
حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح احتمال پنج درصد آزمون دانکن می‌باشد

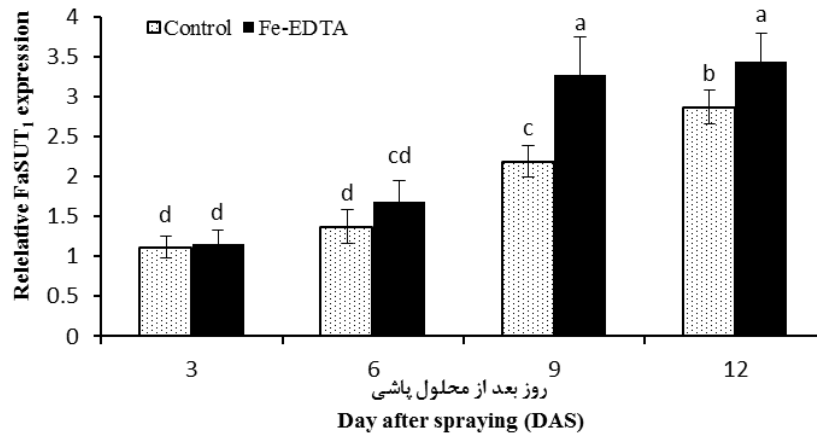
فرنگی در سطح احتمال یک درصد ( $p < 0.01$ ) معنی‌دار بود. طبق مقایسه میانگین داده‌ها، از نظر میزان اسید کل اختلاف معنی‌داری در میوه‌های محلول‌پاشی شده با آهن نسبت به یکدیگر در تمام نوبت‌های بررسی (سه، شش، نه و ۱۲ روز بعد از محلول‌پاشی) مشاهده شد. همچنین، در نمونه‌های تیمار شده با آهن در مقایسه با شاهد، میزان اسید کل در روزهای نهم و دوازدهم بررسی، تفاوت معنی‌داری داشتند ولی در روزهای سوم و ششم آزمایش تفاوتی مشاهده نشد. بیشترین و کمترین میزان اسید کل بترتیب مربوط به نمونه‌های شاهد در روز ششم و نمونه‌های آهن در روز دوازدهم بررسی بود. نمونه‌های شاهد از نظر میزان اسید کل اختلاف معنی‌داری نسبت به یکدیگر طی مراحل مختلف نموی نشان دادند (شکل ۲).

نقش ژن FaSUT<sub>1</sub> در تولید ساکارز و رسیدگی میوه: مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد، در میوه‌های محلول‌پاشی شده با آهن نسبت به یکدیگر فقط روزهای سوم و ششم با روزهای نهم و دوازدهم بررسی تفاوت معنی‌داری از

لحاظ میزان بیان ژن FaSUT<sub>1</sub> وجود داشت ولی بین روز-های سوم و ششم و بین روزهای نهم و دوازدهم نمونه-برداری اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. هرچند که در نمونه‌های آهن، روز دوازدهم بررسی نسبت به روز نهم

نشد. همچنین در نمونه‌های شاهد در همه نوبت‌های نمونه‌برداری به غیر از روز سوم با روز ششم بررسی نسبت به یکدیگر از نظر میزان بیان ژن FaSUT<sub>1</sub> تفاوت معنی‌داری وجود داشت (شکل ۳).

افزایش جزئی مشاهده گردید. میزان بیان ژن FaSUT<sub>1</sub> در میوه‌های تیمار شده با آهن در مقایسه با شاهد در روزهای نهم و دوازدهم آزمایش اختلاف معنی‌داری داشتند ولی در روزهای سوم و ششم بررسی اختلاف معنی‌داری یافت



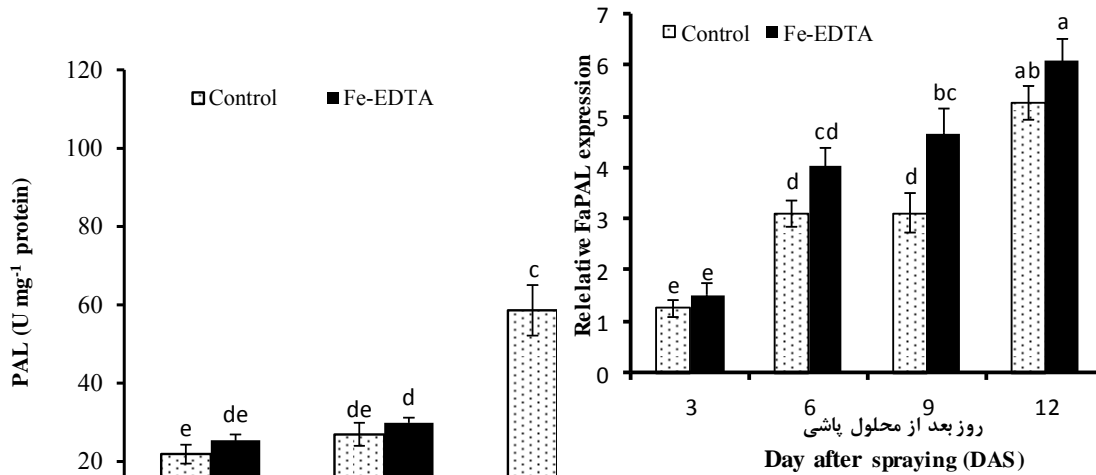
شکل ۳- تاثیر غلظت ۱۴۰۰ میکرومول بر لیتر آهن بر الگوی بیان ژن FaSUT<sub>1</sub> در میوه توت‌فرنگی طی مراحل نموی حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح احتمال پنج درصد آزمون دانکن می‌باشد

از نظر میزان فعالیت PAL بین دو زمان بررسی در روزهای سوم و ششم تفاوت معنی‌داری یافت نشد ولی بین روزهای نهم و دوازدهم در مقایسه با یکدیگر و دیگر زمان‌های بررسی در نمونه‌های شاهد اختلاف معنی‌دار بود (شکل الف-۴).

بر اساس تجزیه واریانس داده‌ها اثر آهن بر میزان بیان ژن FaPAL در سطح احتمال پنج درصد ( $p < 0.05$ ) و اثر زمان و برهمکنش بین آهن و زمان در سطح احتمال یک درصد ( $p < 0.01$ ) معنی‌دار بود. طبق نتایج مقایسه میانگین‌ها، در میوه‌های تیمار شده با آهن نسبت به یکدیگر بین تمام زمان‌های نمونه‌برداری تفاوت معنی‌داری از نظر میزان بیان ژن FaPAL مشاهده شد. همچنین، میوه‌های محلول‌پاشی شده با آهن در مقایسه با نمونه‌های شاهد از نظر میزان بیان ژن FaPAL در همه زمان‌ها بجز زمان اول (روز سوم) بررسی اختلاف معنی‌داری داشتند. در نمونه‌های شاهد نیز نسبت به یکدیگر بجز روز ششم با روز نهم بررسی، در بقیه زمان‌ها اختلاف معنی‌داری یافت شد.

ژن FaPAL و آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیاپاز: یافته‌های حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر آهن، زمان و اثر برهمکنش بین آنها بر میزان فعالیت آنزیم فنیل-آلانین‌آمونیاپاز در سطح احتمال یک درصد ( $p < 0.01$ ) معنی‌دار شد. بر پایه نتایج مقایسه میانگین‌ها، در میوه‌های تیمار شده با آهن نسبت به یکدیگر بین دو زمان بررسی در روزهای سوم و ششم اختلاف معنی‌داری از نظر میزان فعالیت آنزیم PAL مشاهده نشد ولی در روزهای نهم و دوازدهم آزمایش، میزان فعالیت آنزیم PAL نمونه‌های تیمار نسبت به یکدیگر و در مقایسه با نمونه‌های روزهای سوم و ششم محلول‌پاشی شده با آهن بطور معنی‌داری افزایش یافت. همچنین، میوه‌های تیمار شده با آهن در روزهای سوم و ششم بررسی تفاوت معنی‌داری از نظر میزان فعالیت آنزیم PAL نسبت به شاهد نداشتند اما در روزهای نهم و دوازدهم آزمایش در مقایسه با شاهد، میزان فعالیت PAL در نمونه‌های آهن بطور معنی‌داری افزایش نشان داد. هر چند که در نمونه‌های شاهد نسبت به یکدیگر

میزان بیان ژن FaPAL در میوه‌های محلول‌پاشی شده طی نمو میوه‌ها بویژه در مرحله سوم نسبت به شاهد افزایش بیشتری نشان داد (شکل ب-۴).



شکل ۴- تاثیر غلظت ۱۴۰۰ میکرومول بر لیتر آهن (الف) بر میزان فعالیت آنزیم فینیل آلانین آمونیا لایاز و (ب) بیان ژن FaPAL میوه توت‌فرنگی طی مراحل نمو. حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح احتمال پنج درصد آزمون دانکن می‌باشد.

ولی در روزهای سوم و ششم نمونه‌برداری اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید. در نمونه‌های شاهد نیز از نظر میزان آنتوسیانین کل به غیر از روز سوم با روز ششم دوم در بقیه نوبت‌های نمونه‌برداری نسبت به یکدیگر اختلاف معنی‌داری داشتند (شکل الف-۵).

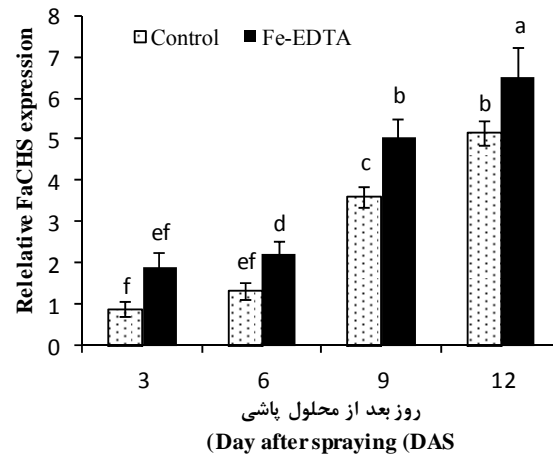
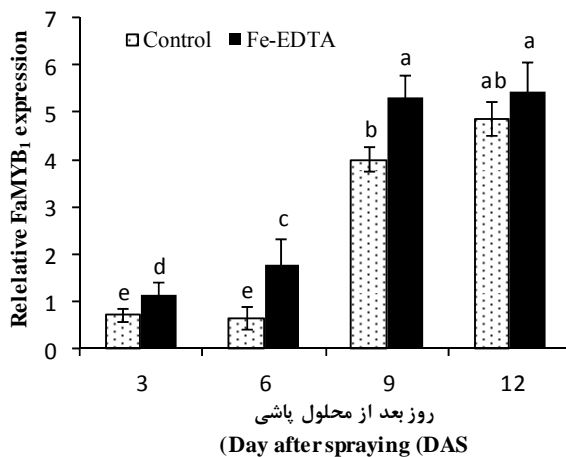
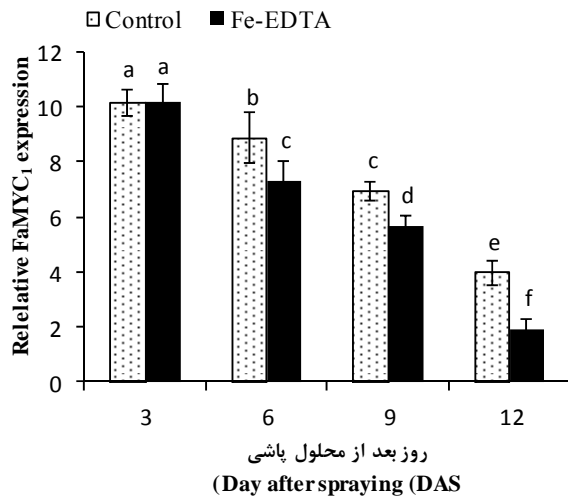
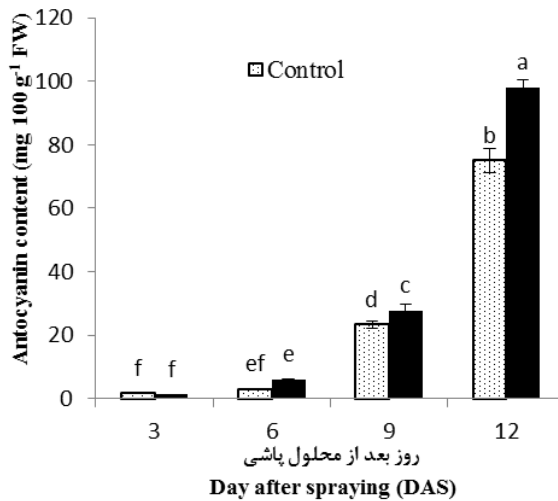
نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر آهن و زمان آزمایش در سطح احتمال یک درصد ( $p < 0.01$ ) و اثر برهمکنش بین آهن و زمان نمونه‌برداری در سطح احتمال پنج درصد ( $p < 0.05$ ) بر میزان بیان ژن FaMYC<sub>1</sub> میوه توت‌فرنگی معنی‌دار بود. طبق مقایسه میانگین داده‌ها، میزان بیان ژن FaMYC<sub>1</sub> در طول زمان آزمایش در هر دو نمونه‌های آهن و شاهد کاهش یافت بطوریکه بیشترین و کمترین میزان بیان ژن FaMYC<sub>1</sub> به ترتیب در نوبت‌های اول و چهارم (روزهای سوم و دوازدهم) بررسی مشاهده گردید. بر این اساس در میوه‌های محلول‌پاشی شده با آهن و شاهد در همه نوبت‌های نمونه‌برداری (روزهای سوم، ششم، نهم و دوازدهم) در مقایسه با یکدیگر از نظر میزان

بیشترین میزان بیان ژن FaPAL مربوط به نمونه تیمار شده با آهن در نوبت چهارم و کمترین آن مربوط به نمونه شاهد در نوبت اول آزمایش بود بطوریکه با تاثیرگذاری آهن

آنتوسیانین کل و ژن‌های FaMYC<sub>1</sub>، FaMYB<sub>1</sub>، FaCHS: طبق یافته‌های حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها مشخص گردید اثر آهن، زمان و برهمکنش بین آنها بر میزان آنتوسیانین کل در سطح احتمال یک درصد ( $p < 0.01$ ) معنی‌دار شد. مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد، میزان آنتوسیانین کل تمامی نمونه‌های محلول‌پاشی شده با آهن در همه نوبت‌های بررسی (روزهای سوم، ششم، نهم و دوازدهم) در مقایسه با یکدیگر اختلاف معنی‌داری داشتند بطوریکه میزان آن در روز دوازدهم بررسی بطور معنی‌داری بیشتر از روز نهم، در روز نهم بطور معنی‌داری بیشتر از روز ششم و در نهایت روز ششم بطور معنی‌داری بیشتر از روز سوم بررسی بود. جالب توجه بود که میزان آنتوسیانین کل آهن و شاهد در روزهای نهم و دوازدهم آزمایش نسبت به روزهای سوم و ششم بررسی افزایش قابل ملاحظه‌ای داشت. طبق نتایج، میزان آنتوسیانین کل در میوه‌های تیمار شده با آهن در مقایسه با شاهد، فقط در روزهای نهم و دوازدهم بررسی تفاوت معنی‌داری داشت

(روز سوم) بررسی در بقیه نوبت‌ها اختلاف معنی‌داری وجود داشت (شکل ب-۵).

بیان ژن FaMYC<sub>1</sub> تفاوت معنی‌داری داشتند. در نمونه‌های تیمار شده با آهن نسبت به نمونه‌های شاهد بجز نوبت اول



شکل ۵- تاثیر غلظت ۱۴۰۰ میکرومول بر لیتر آهن بر (الف) آنتوسیانین کل و بیان ژن‌های FaMYC<sub>1</sub> (ب)، FaMYB<sub>1</sub> (ج) و FaCHS (د) میوه توت‌فرنگی طی مراحل نمو. حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح احتمال پنج درصد آزمون دانکن می‌باشد.

نمو میوه توت‌فرنگی همواره افزایش یافت. در میوه‌های تیمار شده با آهن نسبت به یکدیگر بجز نوبت سوم با چهارم (روزهای نهم و دوازدهم بررسی) در بقیه زمان‌های آزمایش اختلاف معنی‌داری از نظر میزان بیان ژن FaMYB<sub>1</sub> وجود داشت. همچنین، در نمونه‌های محلول-

طبق تجزیه واریانس داده‌ها، اثر آهن و زمان نمونه‌برداری بر میزان بیان ژن FaMYB<sub>1</sub> در سطح احتمال یک درصد ( $p < 0.01$ ) و اثر برهمکنش بین آنها در سطح احتمال پنج درصد ( $p < 0.05$ ) معنی‌دار بود. مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که میزان بیان ژن FaMYB<sub>1</sub> در طول دوره رشد و



را کشف کردند؛ بدین صورت که در اثر مصرف آهن، مقدار کلروفیل‌ها، فتوسنتز و رشد رویشی گیاه بیشتر شده و باعث افزایش سطح کربن‌گیری و در نتیجه بیشتر شدن میزان ماده خشک تولیدی گیاه می‌شود (۱ و ۷). در نتیجه تسریع رسیدگی میوه‌ها با محلول‌پاشی آهن را می‌توان بدلیل افزایش فتوسنتز و تغذیه بهتر میوه‌ها بعنوان مهمترین مخازن جذب کربوهیدرات‌ها دانست.

**اسید کل:** شاخص مهمی در تعیین رسیدگی میوه می‌باشد که میزان آن با رسیدن میوه کاهش می‌یابد. در اکثر میوه‌ها مطابق با نتایج بدست آمده از این تحقیق، مقدار اسیدهای آلی در مراحل اولیه رشد افزایش و سپس همزمان با رسیدن محصول بتدریج کاهش می‌یابد. کاهش میزان اسید کل در طول دوره رسیدن محصول بمیزان TSS، سرعت تنفس و تجزیه شدن اسیدها ارتباط دارد (۴). در توت فرنگی اسید سیتریک، اسید غالب در مرحله قبل از رسیدن میوه بشمار می‌رود که همزمان با رسیدن میوه مقدار این اسید سریعاً کاهش یافته و در زمان برداشت بحد اقل مقدار خود می‌رسد (۱۳). طبق نتایج این پژوهش، کاربرد آهن باعث تسریع رسیدگی میوه توت‌فرنگی گردید و از آنجایی که میزان اسید کل میوه همگام با رسیدن میوه کاهش می‌یابد بنابراین، بنظر می‌رسد دلیل اصلی کاهش اسید کل بویژه در میوه‌های محلول‌پاشی شده، تجزیه شدن زودتر آن باشد.

**نقش ژن FaSUT<sub>1</sub> در تولید ساکارز و رسیدگی میوه:** میوه توت‌فرنگی حاوی قندهایی مانند گلوکز، فروکتوز و ساکارز است که مقادیر این قندها به عواملی نظیر رقم، شرایط اقلیمی و تغذیه گیاه بستگی دارد (۴). ساکارز رایج‌ترین شکل کربوهیدرات‌ها در بین مواد فتوسنتزی است که از محل تولید (برگ) بسمت مصرف (میوه) از طریق بافت آبکش منتقل می‌شود. قبلاً تصور عموم بر این بود که هورمون‌ها از جمله آبسزیک اسید عامل اصلی رسیدن میوه هستند. اما امروزه کشف شده است که علی‌رغم نقش

پاشی شده با آهن در مقایسه با شاهد در همه نوبت‌های نمونه‌برداری بجز مرحله چهارم (روز دوازدهم) بررسی تفاوت معنی‌داری یافت شد. در نمونه‌های شاهد نیز از نظر میزان بیان ژن FaMYB<sub>1</sub> نسبت به یکدیگر فقط اختلاف بین روزهای سوم و ششم بررسی با روزهای نهم و دوازدهم معنی‌داری شد (شکل ج-۵).

بر پایه نتایج تجزیه واریانس، اثر آهن بر میزان بیان ژن FaCHS در سطح احتمال پنج درصد ( $p < 0.05$ ) و اثر زمان و برهمکنش بین آهن و زمان نمونه‌برداری در سطح احتمال یک درصد ( $p < 0.01$ ) در طول دوره رسیدن میوه توت‌فرنگی معنی‌دار شد. طبق یافته‌های حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها مشخص گردید در نمونه‌های تیمار شده با آهن در همه نوبت‌های بررسی (روزهای سوم، ششم، نهم و دوازدهم) نسبت به یکدیگر و در مقایسه با نمونه‌های شاهد بجز نوبت اول (روز سوم) در بقیه نوبت‌های بررسی از نظر میزان بیان ژن FaCHS اختلاف معنی‌داری وجود داشت. در نمونه‌های شاهد نیز در مقایسه با یکدیگر به غیر از نوبت اول با نوبت دوم نمونه‌برداری، در بقیه روزهای بررسی تفاوت معنی‌داری از نظر میزان بیان ژن FaCHS مشاهده شد (شکل د-۵).

## بحث و نتیجه‌گیری

**نقش آهن در رنگ‌گیری و رسیدگی میوه توت‌فرنگی:**

آهن برای تولید پروتئین‌هایی که پیش‌نیاز ساخت کلروفیل هستند، مورد نیاز بوده و کمبود آن باعث کاهش کلروفیل در گیاه می‌شود که این امر موجب کاهش فتوسنتز، مواد ساکارزی و رشد گیاه می‌شود (۱ و ۳۴). طبق مطالعات، کاربرد آهن باعث افزایش رنگیزه‌های فتوسنتزی و بدنبال آن افزایش کربوهیدرات کل و تحریک انتقال کربوهیدرات‌ها از برگ‌های گیاه به میوه‌ها می‌شود که به این ترتیب به بهبود رشد و نمو میوه کمک می‌کند (۵). افزون بر این، محققان همبستگی مثبتی بین غلظت آهن و عملکرد گیاهان

ترانس سینامیک اسید را کاتالیز می‌نماید که اولین مرحله در ساخت فنیل پروپانویدها بوده و منجر به تولید متابولیت‌های ثانویه مانند فنل‌ها، لیگنین‌ها، آنتوسیانین‌ها و فلاونوئیدها می‌گردد (۹).

طبق بررسی پژوهشگران، میزان فعالیت آنزیم PAL به دلیل کم بودن سوبسترای اولیه مورد نیاز و تراکم بالای سبزینه‌ها در مرحله سبز و سفید رنگی میوه توت‌فرنگی بسیار پایین است ولی همزمان با پیشرفت رشد، تجزیه شدن سبزینه‌ها و قرمز شدن میوه افزایش می‌یابد (۱۱). در حقیقت بدلیل فعالیت پایین آنزیم PAL است که میزان فلاونوئیدها و فنول‌ها در مراحل اولیه رشد میوه کم می‌باشد. فلاونوئیدها و فنول‌ها مسئول برخی از ویژگی‌های حسی مرتبط با کیفیت میوه‌ها نظیر طعم، رنگ و بو هستند (۴۴) که بدنبال بیشتر شدن فعالیت آنزیم PAL میزان تولید این متابولیت‌ها نیز افزایش می‌یابد. در همین راستا ارتباط مستقیم و مثبت آنزیم TPAL در تولید و انباشت فلاونوئیدها در پرتقال-خونی (۳۸)، توت‌فرنگی (۳۸) و بلوبری (۵۲) تایید شده است.

علاوه بر این، محققان بیان کرده‌اند که محلول‌پاشی گیاهان توت‌فرنگی با غلظت ۱۰ میکرومولار آهن در طول فصل رشد موجب فعالیت بیشتر آنزیم PAL گردید (۴۰). در انگور نیز تغذیه برگ‌ها با غلظت‌های ۰/۲۲ و ۰/۳۳ گرم در لیتر آهن منجر به افزایش فعالیت آنزیم PAL و بیشتر شدن میزان تجمع فلاونوئیدها نسبت به نمونه‌های شاهد شد (۴۳). که یافته‌های این پژوهش نیز مطابق با آن نتایج بود. از آنجایی که آهن جزو ساختاری برخی از اجزای آنزیم‌ها و زنجیره انتقال الکترون در میتوکندری و کلروپلاست است، کمبود آن باعث اختلال در حالت عادی انتقال الکترون، عملکرد آنزیم‌ها، فتوسنتز و در نهایت کاهش رشد می‌شود (۱۰ و ۳۴). در نتیجه مصرف آهن با افزایش میزان فتوسنتز و بهبود رشد گیاه سبب فراهم ساختن مواد اولیه

ساکارز در کیفیت میوه، این متابولیت می‌تواند بعنوان پیام‌رسان در تنظیم رسیدن میوه و برخی از فرآیندها نقش داشته باشد (۱۳ و ۳۵). بعنوان مثال، ساکاروز می‌تواند بعنوان مولکول پیام‌رسان در میزان جذب عناصر ایغای نقش کند (۱۲). علاوه بر این، گزارش شده است که ساکارز بیان برخی از ژن‌ها را کنترل می‌کند (Teng et al., 2005). در تولید ساکارز پروتئین‌های مختلفی دخالت دارند که ژن FaSUT<sub>1</sub> بطور مستقیم نقش تولید آن را در میوه توت‌فرنگی بر عهده دارد (۲۶). پژوهشگران نشان دادند که با بیشتر شدن بیان ژن FaSUT<sub>1</sub> علاوه بر افزایش میزان ساکارز، موجب تسریع رسیدن میوه توت‌فرنگی هم شده بود (۲۶).

مطابق با این گزارش، در مطالعه حاضر آهن علاوه بر افزایش چشمگیر بیان این ژن FaSUT<sub>1</sub> در مرحله صورتی رنگ میوه، باعث تسریع رسیدن میوه‌ها هم گردید. دلیل افزایش مواد ساکارزی در گیاهان در اثر محلول‌پاشی آهن را می‌توان به افزایش میزان سبزینه برگ نسبت داد (۲۸). همچنین، تاثیر آهن در افزایش مقدار ساکارز بدلیل نقش این عنصر در افزایش فتوسنتز است و از آنجایی که یکی از تولیدات مهم در فتوسنتز، قند می‌باشد (۱۵) در نتیجه افزایش فتوسنتز باعث افزایش ساکارز، تغذیه بهتر میوه‌ها و در نهایت تسریع رسیدگی میوه توت‌فرنگی می‌شود. این مطالعه نشان داد که ساکارز نقش مهمی در تنظیم بلوغ و رسیدن میوه توت‌فرنگی ایفا می‌کند.

#### الگوی بیان ژن FaPAL و تاثیر آن بر فعالیت آنزیم

**فنیل آلانین آمونیا لیااز:** همانطور که در شکل (۱) مشاهده می‌شود رشد و نمو میوه توت‌فرنگی رقم "کاماروسا" را می‌توان به مراحل توت سبز، سفید، صورتی و قرمز تقسیم کرد. این مراحل نشان‌دهنده تغییرات در ساختار سبزینه‌ها، تفاوت در مراحل نموی، سطح ترکیب‌های فنولیکی و فعالیت آنزیم PAL است (۵۰). آنزیم PAL بعنوان آنزیم کلیدی در متابولیسم فنیل پروپانویدها، تبدیل فنیل آلانین به

آنزیم PAL و آنزیم‌های مرتبط با ساخت ترکیب‌های فلاونوئیدی میوه می‌گردد.

افزون بر این، آنزیم PAL نه تنها در تولید آنتوسیانین‌ها و فلاونوئیدها نقش کلیدی دارد بلکه در سیستم پیام‌رسانی و فعال نمودن ژن‌های دفاعی و عوامل رونویسی نیز پروتئین مهمی بشمار می‌رود (۵۰). گزارشات حاکی از آن است که افزایش بیان ژن FaPAL مبنای فعالیت آنزیم PAL می‌باشد. به همین دلیل بیان پایین ژن FaPAL منجر به کاهش فعالیت آنزیم PAL و تولید فلاونوئیدها می‌گردد. بطور مثال، در گیاهان تراریخت شده توتون که بیان ژن PAL در آنها با دست‌ورزی کم شده بود، میزان فلاونوئید و لیگنین کمتری در مقایسه با گیاهان شاهد داشتند (۴۵). همچنین، نقش مثبت ژن FaPAL در تحریک و تولید متابولیت‌های ثانویه نظیر فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها در میوه توت‌فرنگی مورد بررسی و تایید قرار گرفته است، به نحوی که با کاهش میزان بیان ژن FaPAL تولید فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها نیز کاهش یافت (۲۶).

در پژوهش‌های دیگری که طی دوره رسیدن میوه توت‌فرنگی انجام گرفت نتایج نشان داد با تغییر رنگ میوه و نزدیک شدن به مرحله رسیدگی، میزان فعالیت آنزیم PAL و بیان ژن FaPAL به طور معنی‌داری افزایش یافت (۱۸ و ۵۱) که یافته‌های این تحقیق همسو با آن نتایج بود. در نتیجه می‌توان این گونه بیان کرد که آنزیم PAL در پدیدار شدن رنگ قرمز میوه هم نقش دارد. در اثبات این موضوع، محققان گزارش کردند که متوقف کردن فعالیت آنزیم PAL با یک ترکیب بازدارنده (L- $\alpha$ -aminoxy-B-phenylpropionic acid) طی مراحل نمو، موجب شد رنگ قرمز میوه توت‌فرنگی پدیدار نشود (۱۱). اما نکته حایز اهمیت این است که تنها تعداد بسیار محدودی از گزارشات در مورد تاثیر آهن بر بیان ژن TPAL وجود دارد. با این وجود محلول‌پاشی ۲۳ میکرومولار آهن در انگور بیان ژن VvPAL را در میوه‌ها موقع برداشت افزایش

داد (۱۰). آنچه که در این پژوهش قابل توجه است، مشابه بودن الگوی بیان ژن FaPAL و فعالیت آنزیم PAL می‌باشد بطوریکه افزایش بیان ژن FaPAL، افزایش فعالیت آنزیم PAL را در پی داشت. در نتیجه می‌توان چنین اظهار نمود که آهن با تسریع و افزایش سوخت و ساز واکنش-های مربوط به رشد و فعالیت آنزیم‌های رشدی و آنتی-اکسیدانی گیاهان، باعث افزایش بیان ژن FaPAL و فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیلایز طی مراحل نمو میوه توت-فرنگی شده است.

**آنتوسیانین کل و میزان بیان ژن‌های درگیر در مسیر بیوستز آن:** شواهد روز افزونی مبنی بر تاثیرات مثبت فلاونوئیدها در سلامتی انسان وجود دارد که آنتوسیانین‌ها یکی از مهمترین مشتقات این ترکیب‌ها هستند. آنتوسیانین‌ها ترکیب‌هایی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا هستند که کیفیت تغذیه‌ای محصولات را افزایش می‌دهند (۲ و ۳۰). به مانند فعالیت آنزیم PAL، میزان آنتوسیانین‌ها نیز در ابتدای رشد و نمو میوه توت‌فرنگی خیلی کم است ولی همزمان با شروع رنگ‌گیری و افزایش فعالیت آنزیم PAL، تجمع آنها افزایش پیدا می‌کند (۱۱ و ۲۶). طبق شکل (۶) تولید و انباشت آنتوسیانین‌ها در میوه‌ها و سبزی‌ها بطور مستقیم توسط آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیلایز صورت می‌پذیرد. بیوستز آنتوسیانین‌ها از طریق مسیر فلاونوئید است که با پیش ماده فنیل‌آلانین شروع می‌شود. آنتوسیانین تولید شده از مسیر فنیل‌پروپانویید/فلاونوئید مسئول رنگ‌گیری میوه است که ژن‌های مختلفی در این مسیرها نقش دارند و هر ژن وظیفه خاصی بر عهده دارد (۳۶ و ۴۲).

پژوهشگران دریافتند تا زمانی که فعالیت آنزیم PAL شروع نشده است هیچ آنتوسیانینی در سیب (۲۹) و انگور (۲۷) ساخت و تجمع نمی‌یابد. در واقع تولید آنتوسیانین‌ها وابسته به فعالیت آنزیم PAL می‌باشد که میزان فعالیت این آنزیم در مراحل اولیه رشد میوه خیلی کم است ولی با رشد و نمو میوه رفته رفته بیشتر می‌شود (۴۲). افزون بر

پیام (۴۹) می‌باشد. مشخص شده است که ژن‌های  $FaMYB_1$ ،  $FaCHS$  و  $FaMYC_1$  از ژن‌های کلیدی در تولید آنتوسیانین‌ها بشمار می‌روند (۲، ۱۶ و ۱۹). مطالعات روز افزون سبب شناسایی این ژن‌ها در مسیر ساخت آنتوسیانین گیاهانی مانند برنج (۲) سیب (۱۷ و ۳۳)، انگور (۵۱)، هلو، زردآلو، بادام، آلو، گلابی (۳۱) و توت‌فرنگی شده است (۲۶ و ۵۰).

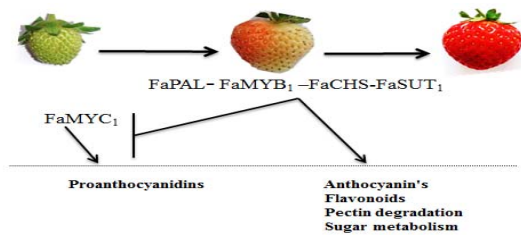
$MYB$  یکی از بزرگترین و کلیدی‌ترین خانواده عوامل رونویسی در گیاهان است که مطابق انتظار ژن  $FaMYB_1$  به طور اختصاصی در تولید آنتوسیانین برنج (۲) توت-فرنگی (۵۰) و انگور (۱۰) نقش دارد. این ژن با افزایش بیان ژن‌های  $FaCHS$  و  $FaPAL$  موجب تولید این متابولیت ثانویه در توت‌فرنگی می‌شود (۲۶ و ۵۰). در ذرت نیز ژن  $MYB$  بعنوان فعال‌کننده بیوسنتز فلاونوئیدها عمل می‌کند (۲۲).

ژن  $MYB$  تنها ژن تولیدکننده آنتوسیانین‌ها نیست،  $FaMYC_1$  یکی دیگر از ژن‌های دخیل در مسیر ساخت آنتوسیانین‌ها می‌باشد. این ژن در تولید پرونوسیانیدین‌ها نقش کلیدی دارد که به نوعی پیش‌ماده آنتوسیانین‌ها بشمار می‌روند. ژن  $FaMYC_1$  در ابتدای رشد و نمو میوه توت-فرنگی بمیزان زیادی بیان می‌شود اما با شروع رنگ‌گیری و افزایش میزان ساکارز میوه از تولیدش کاسته می‌شود (۲۶). در این تحقیق مصرف آهن باعث کاهش بیشتر بیان این ژن طی نمو میوه گردید، در مقابل با افزایش بیان ژن‌های مورد مطالعه ( $FaMYB_1$ ،  $FaCHS$  و  $FaPAL$ )، تولید آنتوسیانین‌ها را سرعت بخشید. علاوه بر این، محققان با بررسی اثر محلول‌پاشی غلظت‌های ۱۸۴ میکرومولار کلات آهن در انگور به این نتیجه رسیدند که غلظت ۱۸۴ میکرومولار بیشترین تاثیر را در افزایش بیان ژن  $VvCHS$  در میوه‌ها در زمان برداشت داشت (۴۳). ژن  $CHS$  (چالکون سنتتاز) باعث تبدیل ترکیب چالکون به فلاوانون و لوکوسیانیدین می‌شود. آنچه که نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد این

این، کاربرد برخی از مواد معدنی مثل آهن موجب بهبود تولید و انباشت آنتوسیانین‌ها در میوه‌های قرمز رنگ می‌گردد. بعنوان نمونه، طی آزمایشی که در مورد تاثیر کمبود آهن بر روی توت‌فرنگی و پرتقال انجام گرفت، گزارش گردید که کمبود آهن باعث کاهش میزان آنتوسیانین می‌شود (۴۱). در مقابل محلول‌پاشی بوته‌های انگور با غلظت-های ۰/۲۲ و ۰/۳۳ گرم در لیتر کلات آهن ( $Fe-EDDHA$ ) (۴۳) و توت‌فرنگی با غلظت ۱۰ میکرومولار کلات آهن ( $Fe-EDTA$ ) (۴۰) در طول فصل رشد منجر به افزایش معنی‌داری آنتوسیانین کل میوه‌های تیمار شده نسبت به شاهد شد. در تحقیق دیگری بیان شده است که تغذیه گیاهان توت‌فرنگی با آهن میزان آنتوسیانین کل بالایی را به همراه داشت (Nestby et al., 2005). همچنین، Caramanico و همکاران (۲۰۱۷) با بررسی اثر محلول‌پاشی غلظت‌های (صفر، ۲۳، ۴۶، ۹۲ و ۱۸۴) میکرومولار کلات آهن در انگور به این نتیجه رسیدند که غلظت ۴۶ بیشترین تاثیر را در افزایش محتوای آنتوسیانین کل میوه‌ها در زمان برداشت داشت که با نتایج حاصل از این پژوهش مطابقت دارد. از آنجایی که اثر آهن از طریق تأثیر و تنظیم فشار اسمزی باعث انتقال بهتر عناصر به نقاط مختلف و رشد بهتر و سریع‌تر گیاه می‌شود و سطح فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیا لایز را بیشتر می‌کند در نتیجه ساخت و محتوای آنتوسیانین‌ها افزایش می‌یابد (۳۴).

با توجه به تأثیر مثبت آنتوسیانین‌ها بر سلامت انسان و نیز بازار پسنندی این نوع میوه‌ها، بررسی مکانیزم‌های مولکولی آن امروزه بسیار حائز اهمیت است. گیاهان دارای طیف وسیعی از ژن‌های  $FaMYB_1$ ،  $FaCHS$  (chalcone synthase) و  $FaMYC_1$  می‌باشند که نقش‌های بسیار متنوعی در عملکرد گیاهان دارند. چندین مطالعه از نقش-های این عوامل رونویسی صورت گرفته است که مهمترین این عمل‌ها شامل کنترل متابولیت‌های ثانویه بویژه فلاونوئیدها و آنتوسیانین (Groetwold et al., 1994)، تنظیم اندام‌زایی سلول (۳۹) و دخالت در مسیرهای انتقال

سفید به صورتی). (۳) و در نهایت واکنش‌های متقابل این ژن‌ها منجر به تسریع رسیدن میوه منجر شد.



شکل ۷- تاثیر ژن‌های مختلف طی مراحل نمو میوه توت‌فرنگی

**نتیجه‌گیری کلی:** اعمال آهن و تاثیر آن بر خصوصیات و فعالیت ژن‌های رشد و نمو میوه توت‌فرنگی به غلظت و روش کاربرد آن بستگی دارد. طبق نتایج تحقیق، محلول-پاشی کلات آهن با غلظت ۱۴۰۰ میکرومول بر لیتر موجب تسریع رسیدگی میوه گردید. علاوه بر این، بر اسیدیته کل، آنتوسیانین کل، فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز و بیان ژن‌های FaSUT<sub>1</sub>, FaMYC<sub>1</sub>, FaMYB<sub>1</sub>, FaCHS و FaPAL تاثیر معنی‌دار ولی بر pH عصاره میوه‌ها تاثیر معنی‌داری نداشت. مصرف آهن باعث افزایش ۱۹/۶ درصدی آنتوسیانین کل، ۲۸/۲ درصدی فعالیت آنزیم PAL و کاهش ۹/۷ درصدی اسیدیته کل در مقایسه با شاهد شد. بنابراین، با انتخاب غلظت بهینه آهن، می‌توان علاوه بر تسریع رسیدگی میوه و امکان عرضه زودتر محصول به بازار، بهبود ارزش تغذیه‌ای میوه توت‌فرنگی را نیز همراه داشت.

است که با نزدیک شدن به مرحله رسیدگی میوه، میزان بیشتری از پرونوسیانیدین‌ها به آنتوسیانین‌ها تبدیل می‌شود. به همین علت تجمع آنتوسیانین‌ها و ترکیب‌های موثر در رنگ میوه در مراحل نزدیک به رسیدن توت‌فرنگی افزایش می‌یابد (۵۰). در سال‌های اخیر نقش و عملکرد ژن‌های تنظیم کننده تولید آنتوسیانین‌ها در برخی گیاهان به صورت اختصاصی مورد بررسی قرار گرفته است. بطور مثال، در گوجه‌فرنگی و توت‌فرنگی خاموش کردن ژن‌های SiCHS و SiCHI (chalcone isomerase) بطور قابل توجهی موجب متوقف شدن ساخت آنتوسیانین‌ها شد (۲۵). در کل می‌توان چنین بیان نمود که کاربرد برگی آهن با افزایش الگوی بیان ژن‌های دخیل در بیوسنتز آنتوسیانین‌ها، ساخت و انباشت این ترکیب ارزشمند را بهبود بخشید ولی هنوز ژن‌های زیادی در مسیر تولید آنتوسیانین بررسی نشده است، لذا تحقیقات آزمایشگاهی بیشتری در این زمینه مورد نیاز است.

بطور خلاصه (شکل ۷) بررسی ژن‌های مورد مطالعه نشان می‌دهد که: (۱) بیان ژن FaMYC<sub>1</sub> که مسئول تولید پروآنتوسیانین‌ها است در مرحله اول رشد میوه زیاد است (یعنی در مرحله سبز میوه). (۲) با رنگ‌گیری میوه میزان بیان ژن‌های FaSUT<sub>1</sub>, FaMYB<sub>1</sub>, FaCHS و FaPAL افزایش یافت که سبب تولید بیشتر ساکارز، آنتوسیانین و دیگر ترکیبات فلاونوئیدی گردید (یعنی در مرحله انتقال از

## منابع

- ۱- اصل محمدی، ز، محمدحانی، ن، و ثروتی، م. ۱۳۹۹. اثر محلول‌پاشی آهن و روی بر برخی صفات بیوشیمیایی گیاه آویشن باغی (*Thymus vulgaris* L.) تحت کمبود نیتروژن. مجله پژوهش‌های گیاهی. انتشار بصورت آنلاین از ۲۵ خرداد ۱۳۹۹.
- ۲- حقی، ر، فاضلی، آ، احمدی خواه، ا، و شریعتی، و. ۱۴۰۰. شناسایی ژن‌های دخیل در تجمع رنگیزه‌های آنتوسیانین و پروآنتوسیانیدین در بافتهای مختلف ۲۸۲ رقم برنج با استفاده از نقشه‌یابی ارتباطی در مقیاس ژنوم. مجله پژوهش‌های گیاهی، ۳۴ (۲): ۳۸۴-۳۶۹.
- ۳- رضائی، س، امیری، م، ا، بهاری، ع، رضوی، ف، و سلیمانی اقدم، م. ۱۳۹۸. تاثیر کلات آهن بر فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز و خواص آنتی‌اکسیدانی میوه توت‌فرنگی رقم کاماروسا طی مراحل نمو، تغذیه گیاهان باغی، دوره ۲، شماره ۲، صص ۱۶-۳۲.
- ۴- طباطبائی، س. ج.، ۱۳۹۳. اصول تغذیه معدنی گیاهان. تبریز: انتشارات دانشگاه تبریز.

- 5- Alvarez-Fernaandez, A., Paniagua, P., Abadia, J., and Abadia, A. 2003. Effects of Fe deficiency chlorosis on yield and quality in peach (*Prunus persica* L. Batsch). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 5738-5744.
- 6- Alvarez-Fernandez, A., Carlos Melgar, J., Abadia, J., and Abadi, A. 2011. Effects of moderate and severe iron deficiency chlorosis on fruit yield, appearance and composition in pear (*Pyrus communis* L.) and peach (*Prunus persica* (L.) Batsch). *Environmental and Experimental Botany*. 71: 280-286.
- 7- Amaliotis, D., Velemis, D., Bladenopoulou, S. and Karapetsas, N. 2002. Leaf nutrient levels of strawberries (cv.Tudla) in relation to crop yield. *Acta Horticulturae*. 567: 447-450.
- 8- AOAC. Latimer, G.E. and Horwitz, W. 2012. Official methods of analysis. *Association of Official Analytical Chemists*, International, (19 th ed.) Canada.
- 9- Bagal, U.R., Leebens mack, H., Walter, W., and Dean, F. 2012. The phenylalanine ammonia lyase (PAL) gene family shows a gymnosperm specific lineage. *BMC Genomics*. 13(3): 1471-2164.
- 10- Caramanico, L., Rustioni, L. and De-Lorenzis, G. 2017. Iron deficiency stimulates anthocyanin accumulation in grapevine apical leaves. *Plant physiology and biochemistry*. 119: 286-293.
- 11- Cheng, G.W. and Breen, P.J. 1991. Activity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and concentrations of anthocyanins and phenolics in developing strawberry fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 116(5): 865-869.
- 12- Chiou, T.J., and Bush, D.R. 1998. Sucrose is a signal molecule in assimilate partitioning. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 95: 4784-4788.
- 13- Dalchau, N., BaeK, S.J., Briggs, H.M., Robertson, F.C., Dodd, A.N., Gardner, M.J., Stancombe, M.A., Haydon, M.J., Stan, G.B., and Gonc-alves, J.M. 2011. The circadian oscillator gene GIGANTEA mediates a long-term response of the Arabidopsis thaliana circadian clock to sucrose. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 108: 5104-5109.
- 14- Daminato M, Guzzo F, Casadoro G. 2013. A SHATTERPROOF-like gene controls ripening in non-climacteric strawberries, and auxin and abscisic acid antagonistically affect its expression. *Journal of Experimental Botany*. 64: 3775- 3786.
- 15- Davarpanah, S., Akbari, M., Askari, M.A., Babalar, M., and Naddaf, M.E. 2013. Effect of iron foliar application (Fe-EDDHA) on quantitative and qualitative characteristics of pomegranate CV. "Malas-e-Saveh". *World of Sciences Journal*. 179-187.
- 16- Du, H., Zhang, L., Liu, L., Tang, X. F., Yang, W.J., Wu, Y.M., Huang, Y.B., and Tang, Y.X. 2009. Biochemical and molecular characterization of plant MYB transcription factor family. *Biochemistry*. 74: 1-11.
- 17- Espley, R.V., Hellens, R.P., Putterill, J., Stevenson, D.E., Kutty-Amma, S., and Allan, A. C. 2007. Red colouration in apple fruit is due to the activity of the MYB transcription factor MdMYB10. *The Plant Journal*. 49: 414-427.
- 18- Galli, V., Borowski, J.M., Perin, E.C., da Silva-Messias, R., Labonde, J., dos Santos Pereira, I., dos Anjos Silva, S.D. and Rombaldi, C.V. 2015. Validation of reference genes for accurate normalization of gene expression for real time-quantitative PCR in strawberry fruits using different cultivars and osmotic stresses. *Gene*. 554(2): 205-214.
- 19- Gantet, P., and Memelink, J. 2002. Transcription factors: tools to engineer the production of pharmacologically active plant metabolites. *Trends in Pharmacological Sciences*. 23: 563-569.
- 20- Giampieri, F., Tulipani, S., Alvarez-Suarez, J.M., Quiles, J., Mezzetti, L.B., and Battino, M. 2012. The strawberry: composition, nutritional quality and impact on human health. *Nutrition*. 28: 9-19.
- 21- Giusti, M.M., and Wrolstad, R.E. 2001. Characterization and measurement of anthocyanin by UV-visible spectroscopy. P: 1-13. In wrolstad RE and Schwartz SJ (Ed) Current Protocols in Food Analytical Chemistry. John Wiley and Sons, New York.
- 22- Gonda, T. 1998. The MYB on coprotein. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 30: 547-551.
- 23- Grotewold, E., Drummond, B.J., Bowen, B., and Peterson, T. 1994. The MYB-homologous P gene controls phlobaphene pigmentation in maize floral organs by directly activating a flavonoid biosynthetic gene subset. *Plant Cell*. 76: 543-553.
- 24- Hamouda, H.A., El-Dahshouri, M.F., Hafez, O.M., and Zahran, N.G. 2015. Response of Le conte pear performance, chlorophyll content and active iron to foliar application of different iron



- sources under the newly reclaimed soil conditions. *International Journal of Chemistry Technology Research*. 8(4):1446-1453.
- 25- Jia, H., Jiu, S., Zhang, C., Wang, C., Tariq, P., Liu, Z., Wang, B., Cui, L. and Fang, J. 2016. Abscisic acid and sucrose regulate tomato and strawberry fruit ripening through the abscisic acid stress ripening transcription factor. *Plant biotechnology journal*. 14(10): 2045-2065.
- 26- Jia, H., Wang, Y., Sun, M., Li, B., Han, Y., Zhao, Y., Li, X., Ding, N., Li, C., and Ji, W. 2013. Sucrose functions as a signal involved in the regulation of strawberry fruit development and ripening. *New Phytologist*. 198: 453-465.
- 27- Kataoka, I., Kubo, A., Sugiura, Y., and Tomana. T. 1983. Changes in L-phenylalanine ammonia-lyase activity and anthocyanin synthesis during berry ripening of three grape cultivars. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*. 52: 273-279.
- 28- Kazemi, M. 2013. Effects of Zn, Fe and their Combination Treatments on the growth and yield of tomato. *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences*. 3(1): 109-114.
- 29- Kubo, Y., Taira, S., and Ishio. S. 1988. Color development of 4 apple cultivars grown in the southwest of Japan, with special reference to fruit bagging (in Japanese). *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*. 57: 191-199.
- 30- Landi, L., Feliziani, E. and Romanazzi, G., 2014. Expression of defense genes in strawberry fruits treated with different resistance inducers. *Journal of agricultural and food chemistry*. 62: 3047-3056.
- 31- Li, D., Li, L., Luo, Z., Mou, W., Mao, L. and Ying, T. 2015. Comparative transcriptome analysis reveals the influence of abscisic acid on the metabolism of pigments, ascorbic acid and folic acid during strawberry fruit ripening. *PLoS One*. 10(6): 137-149.
- 32- Lin-Wa, K., Bolitho, K., Grafton, K., Kortstee, A., and Karunairetnam, S. 2010. An R2R3 MYB transcription factor associated with regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway in Rosaceae. *BMC Plant Biology*. 10:3-17.
- 33- Mahmoudi, E., Soltani, M.B., Yadollahi A., and Hosseini, E. 2012. Independence of color intensity variation in red flesh apples from the number of repeat units in promoter region of the MdMYB10 gene as an allele to MdMYB1 and MdMYBA. *Iranian Journal of Biotechnology*. 10: 153-160.
- 34- Marschner, H., 2011. Mineral nutrition of higher plants. *Academic press*. New York, 889 p.
- 35- Martinez-Noel, G.M., Tognetti, J.A., Salerno, G.L., Wiemken, A., and Pontis, H.G. 2009. Protein phosphatase activity and sucrose-mediated induction of fructan synthesis in wheat. *Planta*. 230: 1071-1079.
- 36- Medina-Puche, L., Cumplido-Laso, G., Amil-Ruiz, F., Hoffmann, T., Ring, L., Rodriguez-Franco, A., Caballero, J., Schwab, W., Munoz-Blanco, J., and Blanco-Portales, R. 2014. MYB<sub>10</sub> plays a major role in the regulation of flavonoid/ phenylpropanoid metabolism during ripening of *Fragaria* × *ananassa* fruits. *Journal of Experimental Botany*. 65: 401-417.
- 37- Nestby, R., Lieten, F., Pivot, D., Lacroix, C.R. and Tagliavini, M. 2005. Influence of mineral nutrients on strawberry fruit quality and their accumulation in plant organs: a review. *International Journal of Fruit Science*. 5(1): 139-156.
- 38- Olsson, M.E., Ekvall, J.M., Gustavsson, K., Nilsson, J., Pillai, D., Sjöholm, I., Svensson, U., Akesson, B., and Nyman, M. 2004. Antioxidants, low molecular weight carbohydrates, and total antioxidant capacity in strawberry (*Fragaria* × *ananassa*): effects of cultivar, ripening, and storage. *Agriculture Food Chemistry*. 52: 2490-2498.
- 39- Oppenheimer, D.G., Herman, P. L., Sivakumaran, S., Esch, J., and Marks, M.D. 1991. A myb gene required for leaf trichome differentiation in Arabidopsis is expressed in stipules. *Plant Physiology*. 67: 483-493.
- 40- Pestana, M., P.J. Correia, T. Saavedra, F. Gama and A. Abadia. 2012. Amarilis de Varennes development and recovery of iron deficiency by iron resupply to roots or leaves of strawberry plants. *Plant Physiology*. 53: 1-5.
- 41- Pestana, M., Varennes, A.D., Miguel, M.G. and Correia, P.J. 2010. Consequences of iron deficiency on fruit quality in citrus and stawberry. *Sapientia-Universidade do Algarve*. 25: 193-201.
- 42- Pestana, M., Varennes, A.D., Miguel, M.G., and Correia, P.J. 2010. Consequences of iron deficiency on fruit quality in citrus and stawberry. *Environmentally friendly and safe technologies for quality of fruit and vegetables*. 90-94.

- 43- Schaart, J., Dubos, C., Romero-de la Fuente, I.V., Houwelingen, A., De Vos, R., Jonker, H., Xu, W., Routaboul, M., Lepiniec, L., and Bovy, A. 2013. Identification and characterization of MYB-bHLH-WD40 regulatory complexes controlling proanthocyanidin biosynthesis in strawberry (*Fragaria×ananassa*) fruits. *New Phytologist*. 197: 454-467.
- 44- Shi, P., Song, C., Chen, H., Duan, B., Zhang, Z. and Meng, J. 2018. Foliar applications of iron promote flavonoids accumulation in grape berry of *Vitis vinifera* cv. Merlot grown in the iron deficiency soil. *Food chemistry*. 253: 164-170.
- 45- Shoji, T. 2007. Polyphenols as natural food pigments: changes during food processing. *American Journal of Food Technology*. 2: 570-581.
- 46- Stotz, H.U., Thomson, J.G., Wang, Y. 2009. Plant defensins Defense, development and application. *Plant Signaling and Behavior*. 4: 1010-1012.
- 47- Taiz, L., and Zeiger, E. 2006. Secondary metabolites and plant defense. *Plant physiology*. 4: 315-344.
- 48- Teng, S., Keurentjes, J., Bentsink, L., Koornneef, M., and Smekens, S. 2005. Sucrosespecific induction of anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis* requires the MYB75/PAP1 gene. *Plant Physiology*. 139: 1840-1852.
- 49- Terry, N. 1980. Limiting factors in photosynthesis. *Plant Physiol*. 65: 114-120.
- 50- Urao, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, S., and Shinozaki, K. 1993. An *Arabidopsis* myb homolog is induced by dehydration stress and its gene product binds to the conserved MYB recognition sequence. *Plant Cell*. 5: 1529-1539.
- 51- Vallarino, J.G., Osorio, S., Bombarely, A., Casañal, A., Cruz-Rus, E., Sánchez-Sevilla, J.F., Amaya, I., Giavalisco, P., Fernie, A.R., Botella, M.A. and Valpuesta, V., 2015. Central role of Fa GAMYB in the transition of the strawberry receptacle from development to ripening. *New Phytologist*. 208(2).482-496.
- 52- Walker, A.R., Lee, E., Bogs, J., McDavid, D.A.J., Thomas, M.R., and Robi, S.P. 2007. White grapes arose through the mutation of two similar and adjacent regulatory genes. *The Plant Journal*. 49: 772-785.
- 53- Wang, K., Jin, P., Cao, S., Shang, H., Yang, Z., and Zheng, Y. 2009. Methyl jasmonate reduces decay and enhances antioxidant capacity in chine bay berries. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 57: 5809-5815.
- 54- Zucker, M., 1968. Sequential induction of phenylalanine ammonia-lyase and a lyase-inactivating system in potato tuber disks. *Plant Physiology*. 43: 365-374.



## Effect of foliar iron application on anthocyanin genes expression during of developmental stages in strawberry fruit

Rezaei S.<sup>1</sup>, Amiri M.E.<sup>1</sup>, Bahari A.<sup>2</sup>, Razavi F.<sup>1</sup>, Soleimani Aghdam M.<sup>3</sup> and Beyrami H.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, I.R. of Iran

<sup>2</sup>Dept. of Agronomy Science in Research, Institute of Modern Biological Techniques, University of Zanjan, Zanjan, I.R. of Iran

<sup>3</sup>Dept. of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Imam Khomeini International University, Qazvin, I.R. of Iran

<sup>4</sup>National Salinity Research Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Yazd, I.R. of Iran

### Abstract

Anthocyanins are important compounds for strawberry fruit quality, and can be influenced by supply of nutrients such as iron. Different genes are involved in the production and accumulation of this Anthocyanins. Strawberry is the fruit with the highest production among berries with a global production of over nine million tons (FAOSTAT 2017). There is insufficient information concerning the use of Fe-EDTA in this plant. Therefore, the present work aims to gain a better understanding of the effect of iron supply on anthocyanins genes expression in strawberry fruit. The experiment was factorial based on a randomized complete block design with three replications. Experimental factor was consisted of iron chelate (Fe-EDTA) in 0 (control) and 1400  $\mu\text{mol/L}$  levels. This experiment was carried out at research institute of modern biological techniques, university of Zanjan, Zanjan, Iran in 2018. At the end of experiments the strawberry fruits were harvested to measure the quality and genes expression. Finally, data analysis was done using SPSS 22 and means were compared by Duncan's multiple range tests at 5% level of probability. Results showed that anthocyanin total, PAL enzyme activity, and gene expression (FaSUT<sub>1</sub>, FaMYB<sub>1</sub>, FaPAL, FaCHS) were significantly increased by iron treatment in comparison to the controls. In contrast, titratable acid and expression of FaMYC<sub>1</sub> were significantly decreased. But it had no significant effect on pH. In addition to the above results, application of 1400  $\mu\text{mol/L}$  iron accelerated fruit ripening for several days. The main reasons for the effect of treatment can be related to the increase iron content in plant, decrease in competition between vegetative and reproductive growth, as well as better photosynthetic efficiency. This basic iron sources is considered to be important for strawberry fruit quality and production since they not only provide nutrients for fruit and plant growth, but also accelerate fruit ripening in strawberry plant. The experiments clearly demonstrated the beneficial effects of foliar Fe-EDTA application on anthocyanins are compounds of strawberry fruits. Our result suggest that strawberry sugar content, anthocyanins content, and transcriptions of genes involved in anthocyanin biosynthesis were correlated with Fe supply concentrations.

**Key words:** Anthocyanins, Gene expression, Sugar, Iron