ALEKSANDRO STULGINSKIO UNIVERSITETAS

LIETUVOS AGRARINIŲ IR MIŠKŲ MOKSLŲ CENTRAS

Jonas Viškelis

TECHNOLOGINIŲ PRIEMONIŲ IR BIOLOGINIŲ VEIKSNIŲ INTENSYVIUOSE OBELŲ (*MALUS* × *DOMESTICA* BORKH.) SODUOSE ĮTAKA VAISIŲ KOKYBEI

DAKTARO DISERTACIJA

Žemės ūkio mokslai, Agronomija (01A)

Akademija, 2018

Daktaro disertacija rengta 2014–2018 m. Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centro filiale Sodininkystės ir daržininkystės institute pagal Lietuvos Respublikos švietimo ir mokslo ministro 2012 m. vasario 24 d. įsakymu Nr. V-327 suteiktą doktorantūros teisę Aleksandro Stulginskio universitetui su Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centru.

Mokslinis vadovas:

Dr. Darius Kviklys (Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centras, Žemės ūkio mokslai, Agronomija, 01A)

Disertacija ginama Aleksandro Stulginskio universiteto ir Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centro Agronomijos mokslo krypties taryboje.

Pirmininkė:

Dr. Aušra Brazaitytė (Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centras, Žemės ūkio mokslai, Agronomija, 01A)

Nariai:

Prof. dr. Kristina Ramanauskienė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, Biomedicinos mokslai, Farmacija, 08B)

Doc. dr. Jurgita Kulaitienė (Aleksandro Stulginskio universitetas, Žemės ūkio mokslai, Agronomija, 01A)

Dr. Akvilė Viršilė (Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centras, Žemės ūkio mokslai, Agronomija, 01A)

Dr. Dalija Seglina (Latvijos žemės ūkio universitetas, Fiziniai mokslai, Biochemija – 04P)

Disertacija bus ginama viešame Agronomijos mokslo krypties tarybos posėdyje 2018 m. birželio 22 d. 10 val. Aleksandro Stulginskio universiteto Centrinių rūmų posėdžių salėje 217 auditorijoje. Adresas: Aleksandro Stulginskio universitetas, Studentų g. 11, Akademija, LT-53361 Kauno r., Lietuva.

Disertaciją galima peržiūrėti Aleksandro Stulginskio universiteto ir Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centro bibliotekose.

TURINYS

SUMMARY OF DOCTORAL DISSERTATION 4
SANTRUMPOS 33
ĮVADAS 34
1. LITERATŪROS ANALIZĖ 37
1.1. Obels vaisių krūvio reguliavimas 37
1.2. Obels vaisių augimo vietos vaismedžių vainike įtaka vaisių kokybei .. 40
1.3. Obelų konkurencinės įtampos reguliavimo ypatumai 44
1.4. Obelų augumo reguliavimas 45
1.5. Vaismedžių geografinių augimo vietovių įtaka vaisių kokybei 49
2. TYRIMŲ METODAI IR SĄLYGOS 50
2.1. Tyrimų objektas 50
2.2. Tyrimų vieta ir lauko bandymų bendrosios sąlygos 50
2.3. Tyrimų metodai 53
2.4. Naudoti reagentai ir medžiagos 58
2.5. Tyrimo duomenų statistinis įvertinimas 58
3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS 59
3.1. Technologinių priemonių ir biologinių veiksnių įtaka obels vaisių fizikiniams ir fiziologiniams rodikliams 59
3.2. Cheminės sudėties įvairavimas obels vaisiuose 69
3.3. Antrinių fenolinių metabolitų kiekio ir sudėties pokyčių dėsningumai bei antioksidacinis aktyvumas obels vaisiuose 80
3.4. Triterpeninių junginių kokybinės ir kiekybinės sudėties įvairavimas obels vaisiuose 111
IŠVADOS 119
REKOMENDACIJA 121
LITERATŪROS SĄRAŠAS 123
MOKSLINIŲ PUBLIKACIJŲ DISERTACIJOS TEMA SĄRAŠAS 147
PASKELBTŲ PUBLIKACIJŲ KOPIJOS 150

ALEKSANDRAS STULGINSKIS UNIVERSITY

LITHUANIAN RESEARCH CENTRE FOR AGRICULTURE AND FORESTRY

Jonas Viškelis

THE IMPACT OF APPLE-TREE (*MALUS* × *DOMESTICA* BORKH.) MANAGEMENT TECHNOLOGIES AND BIOLOGICAL FACTORS ON FRUIT QUALITY IN INTENSIVE ORCHARDS

SUMMARY OF DOCTORAL DISSERTATION

Agricultural Sciences, Agronomy (01A)

Akademija, 2018

The dissertation was prepared during 2014-2018 at Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry, Institute of Horticulture pursuant to order No. V-327 issued by the Minister of Education and Science on the 24th of February 2012, granting a joint right for Aleksandras Stulginskis University and Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry for provision of doctoral studies.

Scientific supervisor:

Dr. Darius Kviklys (Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry, Agricultural Sciences, Agronomy 01A)

The defence of the doctoral dissertation will be held at the Council of Defence for Agricultural Sciences, Agronomy.

Chairperson:

Dr. Aušra Brazaitytė (Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry, Agricultural Sciences, Agronomy 01A)

Members:

Prof. dr. Kristina Ramanauskienė (Lithuanian University of Health Sciences, Medical Academy, Biomedical Sciences, Pharmacy, 08B)

Assoc. prof. dr. Jurgita Kulaitienė (Aleksandras Stulginskis University, Agricultural Sciences, Agronomy, 01 A)

Dr. Akvilė Viršilė (Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry, Agricultural Sciences, Agronomy 01A)

Dr. Dalija Segliņa (Latvia University of Agriculture, Physical Sciences, Biochemistry – 04P)

The defence of the dissertation will take place at the public meeting of the Council of Agronomy on the 22nd of June 2018, at 10.00 a.m. in room No. 217 of Aleksandras Stulginskis University. Address: Aleksandras Stulginskis University, Studentų st. 11, Akademija, LT-53361, Kaunas distr., Lithuania.

The doctoral dissertation is available at the libraries of Aleksandras Stulginskis University and Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry.

INTRODUCTION

The market for agricultural products is becoming increasingly consumer-oriented. Horticulture is also facing the necessity to manage the processes of fruit supply to consumers, which are aimed at fruit quality optimization and placement of fruit that meet specific quality parameters on the market. Apples are one of the most widely consumed fruits in the world, but so far, the development of their cultivation and apple-tree management technologies have been geared towards higher yields and external fruit quality (size and colour), which is attractive to consumers (Hooge et al., 2017). The quality of apple (*Malus* × *domestica* Borkh.) fruits depends on the genotype, gene expression changes during fruit growth and development, environmental conditions, orchard management technologies, harvesting time, fruit storage, etc. The quality of harvested fruit cannot be improved, at best, it can only be preserved until the apples reach the end consumer. In order to ensure the desired fruit quality, it is important to consider fruit-tree genetic origin, physiological aspects of fruit growth and development and environmental factors.

A complex of technological and biological factors in orchards, including rootstocks, cultivars, rootstock-cultivar combinations, orchard design, growth, crop load and productivity control determines the beginning and stability of fruit-tree growth and development, fruit yield and quality (Lakso et al., 1997; Robinson et al., 2008; Kviklys et al., 2012). It has been found that the inappropriate use of individual orchard management technologies, disturbances due to natural or anthropogenic factors, can cause stress in a fruit-tree and have a decisive influence on the final orchard productivity indicators, fruit quality and nutritional value (Lauri et al., 1997; Tustin et al., 2012; Robinson et al., 2014).

Recently, attention has been focused not only on the external but also on the internal fruit quality, i.e. chemical composition, antioxidant activity and so forth. Apple fruits contain a lot of nutrients and various bioactive compounds. Phenols, as one of the groups of such compounds, have been investigated in Lithuania in the studies on the effects of apple nutrition (Lanauskas et al., 2017) and rootstocks (Kviklys et al., 2014) on the accumulation of phenolic compounds in fruits. In addition, the qualitative and quantitative composition of phenolic compounds was investigated in apple fruits of commercial cultivars grown in Lithuania (Liaudanskas et al., 2015a; Raudonė et al., 2017). However, very little is known about the impacts of orchard management technologies and biological factors on the accumulation of phenolic compounds in apple fruits from various intensive apple orchards as very few studies In Lithuania and abroad have addressed this relevant issue. Research evidence on other bioactive metabolites (such as triterpenes) is even more scarce.

New research on the nutritional and pharmacological value of apples is of paramount importance, particularly in the light of apple overproduction and oversupply on the world market, which has resulted in apple price reduction. New scientific results from the research on the application of modern orchard management technologies exerting influence on fruit quality parameters can markedly increase apple consumption.

Hypothesis. The study hypothesizes that various management technologies of commercial apple-tree orchards (apple-tree crop load, planting distance and growth control), as well as apple genotype, fruit growth location in the canopy and geographical apple-tree location can be used to control and purposefully regulate apple fruit physical characteristics, chemical composition as well as the synthesis of bioactive compounds and produce fruits with higher nutritional value.

Research objective. This study set out to evaluate the impact of orchard management technologies, fruit growth location in the canopy and geographical apple-tree location on the synthesis of bioactive compounds, physico-chemical and physiological parameters of domestic apple (*Malus* × *domestica* Borkh.).

The research tasks. To achieve the research objective, the following tasks were set:

1. Investigate how apple-tree crop load, planting distance and growth control, fruit location in the canopy and geographical apple-tree location determine the colour, firmness, weight and respiration indices of apple fruits.
2. Determine the influence of the applied management technologies, fruit location in the canopy and geographical apple-tree location on the chemical composition of the apple fruit (amounts of total sugar, titratable acidity, soluble solids and dry matter, vitamin C, fructose, sucrose, glucose, sorbitol and malic acid).
3. Identify and assess the regularities of biological factors (fruit location in the canopy and geographical apple-tree location) and applied management technologies for qualitative and quantitative composition of phenolic compounds in apple fruit, and evaluate the contribution of the individual phenolic compounds to the overall antioxidant activity.
4. Investigate and estimate the influence of orchard management technologies and biological factors on the qualitative and quantitative composition of triterpenic compounds in apple fruits.

Propositions to be defended

1. By adjusting the apple-tree crop load and planting distance and taking into account fruit location in the canopy, geographical apple-tree location and the genotype of the cultivar, it is possible to increase the firmness and mass and reduce respiration intensity of apple fruits.
2. Fruit location in the canopy, geographical apple-tree location and the genotype of the cultivar influence the chemical composition (sugar, soluble solids, dry matter and acidity) of apple fruits, and by adjustment of the crop load and apple-tree growth it is possible to control the composition of sugars.

3. Apple-tree crop load, planting distance and growth control, fruit location in the canopy and geographical apple-tree location either stimulate or inhibit the accumulation of various phenolic and triterpenic compounds in fruits.

Originality of the research work.

1. This is the first study to undertake a complex evaluation of the effects of apple-tree crop load, planting distance, growth control and fruit location in the canopy on the internal quality indices of fruit.
2. The study has extended the research spectrum of secondary metabolites in apples. For the first time, the regularities of triterpenic compounds accumulation in response to various orchard management technologies were determined – the genetic origin of the cultivar and geographical location of fruit growth had the greatest effect on the total amount of triterpenic compounds in apple fruit, while betulinic acid content was mostly effected by apple-tree growth control.
3. The present research explored, for the first time, the influence of geographical apple-tree growth location on the fruit quality and accumulation of bioactive compounds in apples – fruit quality is greatly determined by the geographical location of the apple-trees: apples that grow in the north accumulates more bioactive compounds.

Practical relevance of the work. The study evaluated the new aspects of the main management technologies used in modern intensive apple orchards - planting systems, crop rationing, control of apple-tree growth, which are very important in commercial horticulture, especially when dealing with apple overproduction. The study is also valuable from the pharmacological viewpoint, since the biologically active compounds studied in the work have health-benefitting effects on human body. The results of this research are already being introduced in the Lithuanian commercial apple orchards.

Approval of the dissertation work. Seven articles have been published on the topic of the dissertation: 4 publications with a citation index included in the "Clarivate Analytics Web of Science" database, and 3 publications in peer-reviewed journals without a citation index. The main results of the dissertation were presented at 8 national and international conferences (4 oral and 4 poster presentations), published in 4 conference Abstract Books.

Volume and structure of the dissertation. The doctoral dissertation is written in Lithuanian. It consists of 217 pages, 55 tables, and 16 figures. A total of 292 references have been used. The dissertation contains an introduction, a literature review, materials and methods section, results and discussion, conclusions, a list of references, and a list of publications.

MATERIALS AND METHODS

Research object

Fruits of the domestic apple (*Malus* × *domestica* Borkh.).

Experimental site and general conditions of field trials

The studies were performed during 2014-2017 at the Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry, Institute of Horticulture, Laboratory of Biochemistry and Technology and at Lithuanian University of Health Sciences, Medical Academy, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacognosy. Field trials were conducted in 2014-2016 in the experimental orchards of Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry, Institute of Horticulture.

Effect of crop load. Three crop load levels: 4, 8 and 12 fruits per unit of trunk cross-sectional area (fruits cm^{-2} TCSA), were established by hand thinning before flowering in early May at the pink bud stage. Fruitlets remaining after the June drop were counted and thinned according to the crop load level. Apple-trees of the cultivar 'Ligol' on rootstock P 60 were planted at a distance of 3.5 × 1.25 m in 2011. The trial was established in four replicates with two apple-trees per replicate. The experiment was laid out in a completely randomized design. Ten fruits per each tree (20 fruits per replicate) from different canopy places were randomly selected for the analysis at optimum harvest time.

Effect of fruit location in apple-tree canopy. Investigations were carried out with an apple-tree cultivar 'Ligol' on rootstock P 60 planted at a distance of 4 × 1.25 m in 2002. Orchard row direction was South-North. Four fruit locations in the apple-tree canopy were tested: 1) top of the apple-tree (above 2.3 m), 2) lower inside part of the canopy (bottom) and 3–4) east and west sides of apple-trees. Apples for the last two treatments were harvested at 1.2–1.8 m above the ground. The trial was established in four replicates with four apple-trees per replicate. The experiment was laid out in a completely randomized design. Five fruits per each apple-tree (20 fruits per replicate) from the tested fruit locations in the canopy were randomly selected for the analysis at optimum harvest time

Effect of apple-tree planting distance. Investigations were carried out with an apple-tree cultivar 'Auksis' on rootstock P 60 planted in 2001. Apple-trees were planted at three distances: 1) 3 × 1.50 m, 2) 3 × 1.00 m and 3) 3 × 0.50 m. According to the planting distance, apple-trees were trained as spindles, slender spindles and super spindles. The trial was established in four replicates with five apple-trees per replicate. Ten fruits per each apple-tree from different canopy places were randomly selected at optimum harvest time. From the bulk of 50 fruits from each replication 20 fruits were randomly selected for the analysis.

Effect of apple-tree growth control. Investigations were carried out with an apple-tree cultivar 'Rubin' on rootstock P 60 planted at the distance 4 × 1.5 m in 1999. Four treatments of apple-tree vegetative growth control were established: 1) control, where apple-

trees were maintained according to intensive technologies; 2) apple-tree trunk incision before flowering by chain saw at the level of 20 cm above the ground from one side and 60 cm level from the other side; 3) apple-tree root pruning before flowering 20 cm from the stem and cut to a depth of up to 40 cm on both sides; 4) application of growth regulator prohexadione-calcium (Pro-Ca) at a rate of 2.5 kg ha^{-1} immediately after flowering when new shoots had 5 leaves; 5) summer pruning performed in the middle of August.

Effect of geographical location. Two apple-tree cultivars 'Auksis' and 'Ligol' grown on rootstock B.396 were tested. Fruit samples of each cultivar were collected at the Research Institute of Horticulture located at Skierniewice (51°58′ N, 20°09′ E), Poland, Institute of Horticulture, Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry in Babtai (55°60′ N, 23°48′ E) and at Polli Research Centre (58°67′ N, 25°33′ E), Institute of Agricultural and Environmental Sciences of the Estonian University of Life Sciences. The orchards are located ~400 km apart, at a similar distance from the Baltic Sea. The orchards were planted in the spring of 2005 under a uniform design in three replicates with five apple-trees per replicate. Planting distance was 4 × 1.5 m. Apple-trees were trained as slender spindle. Climate conditions and soil properties differed between the trial locations. In Poland: soil – deep sandy-loam, pH – 6.7, humus – 1.4%, P_2O_5 – 195 mg kg^{-1}, K_2O – 190 mg kg^{-1}, average annual precipitation: 550 mm, average sum of active temperatures: 2550°. In Lithuania: soil – clay loam, pH – 7.3, humus – 2.8%, P_2O_5 – 255 mg kg^{-1}, K_2O – 230 mg kg^{-1}, average annual precipitation – 630 mm, average sum of active temperatures (>10°C) – 2300°. In Estonia: soil – clay loam, pH – 5.3, humus – 2.0%, P_2O_5 – 130 mg kg^{-1}, K_2O – 223 mg kg^{-1}, average annual precipitation – 455 mm, average sum of active temperatures – 1930°. Fifty randomly selected apples were harvested at 1.2 – 1.8 m above the ground from 5 apple-trees from each experimental plot at the optimal harvest time individually established for each cultivar and country.

Research methods

Sample preparation. Each apple was cut in slices and peeled with a semi-automatic peeling and cutting machine AS 4 (Kronen GmbH, Germany). The slices and peels were immediately frozen in a freezer (at −35°C) with air circulation and then lyophilized with a sublimator Zirbus 3 × 4 × 5 (ZIRBUS technology GmbH, Germany) at a pressure of 0.01 mbar (condenser temperature −85°C). The lyophilized apple slices and peels were ground to fine powder with a knife mill GM (Retsch GmbH, Germany). Loss on drying before analysis was determined by drying the apple lyophilizate in a laboratory drying oven to complete evaporation of water and volatile compounds (temperature – 105°C, the difference in weight between measurements – up to 0.01 g) and by calculating the difference in raw material weight before and after drying. The data were recalculated for dry weight (DW) (European Pharmacopoeia, 2010).

Preparation of apple extracts for the determination of phenolic compounds. An amount of 2.5 g of lyophilized apple powder (exact weight) was weighed, added to 30 mL

of ethanol (70%, v/v), and extracted in a Sonorex Digital 10 P ultrasonic bath (Bandelin Electronic GmbH, Germany) for 27 minutes at 45 °C. The extract obtained was filtered through a paper filter; the apple lyophilizate on the filter was washed twice with 10 mL of ethanol (70%, v/v) in a 50 mL flask. The extract was filtered through a membrane filter with a pore size of 0.22 μm (Carl Roth GmbH, Germany).

Preparation of apple extracts for the determination of sugars and malic acid. An amount of 0.5 g of lyophilized apple powder (exact weight) was weighed, added to 50 mL of purified water. Extraction was done for 10 minutes while shaking. The extract was filtered through a membrane filter with a pore size of 0.22 μm (Carl Roth GmbH, Germany).

Preparation of apple extracts for the determination of triterpenic compounds. An amount of 1 g of lyophilized apple peel powder (exact weight) was weighed, added to 10 mL of acetone (100%, v/v), and extracted in a Sonorex Digital 10 P ultrasonic bath (Bandelin Electronic GmbH, Germany) for 10 minutes. The conditions of extraction (type of extraction, duration, temperature, solvent and its concentration) were chosen considering the results of extraction optimization. The extract obtained was filtered through a paper filter; the apple peel lyophilizate on the filter was washed with acetone (100%, v/v) in a 10-mL flask. The extract was filtered through a membrane filter with a pore size of 0.22 μm (Carl Roth GmbH, Germany).

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) method for the determination of phenolic compounds. A Waters e2695 chromatograph equipped with a Waters 2998 photodiode array detector (Waters, USA) was used for the HPLC analysis. Chromatographic separations were carried out by using a YMC-Pack ODS-A (5 μm, C18, 250 × 4.6 mm i.d.) column equipped with a YMC-Triart (5 μm, C18, 10 × 3.0 mm i.d.) pre-column (YMC Europe GmbH, Germany). The column was operated at a constant temperature of 25°C. The volume of the injection was 10 μL. The flow rate was 1 mL/min, and gradient elution was used. The mobile phase consisted of 2% (v/v) acetic acid in water (solvent A) and 100% (v/v) acetonitrile (solvent B). The following conditions of elution were applied: 0–30 minutes, 3–15% B; 30–45 minutes, 15–25% B; 45–50 minutes, 25–50% B; and 50–55 minutes, 50–95% B. The identification of the chromatographic peaks was achieved by the retention times and spectral characteristics (λ=200–400 nm) of the eluting peaks with those of the reference compounds. Dihydrochalcones and flavan-3-ols were quantified at 280 nm, phenolic acids at 320 nm and flavonols at 360 nm.

Determination of antioxidant activity using HPLC-ABTS and HPLC-FRAP post-column assays. The chromatographic separation of extracts was carried out by a Waters e2695 Alliance system (Waters, USA) with a photodiode array detector Waters 2998, applying previously described method. The antiradical and reducing activity in extracts was evaluated using HPLC-ABTS and HPLC-FRAP methods as described by Raudonis et al. (2012). After detection, the eluate was directly mixed with radical cation $ABTS^{\cdot+}$ or FRAP reagent which was supplied to post-column by chromatograph “Beckman programmable

solvent module 126" (Beckman, USA) at constant 0.5 mL/min. flow rate. The reaction between analyte and reagent was carried out at the reaction coil, made out of polyether ether ketone (length 15 m, inner diameter 0.3 mm) under a temperature of 25 °C. Waters 2487 detector was used to register the increase of absorption after the reaction with FRAP (593 nm wave length) or decrease after the reaction with $ABTS^{\cdot+}$ (650 nm wave length).

High Performance Liquid Chromatography method for the determination of triterpenic compounds. A chromatograph Waters 2695 equipped with a detector Waters 2998 PDA (Waters, USA) was used for high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis. Chromatographic separation was managed, chromatograms were recorded, and data were processed with the software Empower® v.3.0 (Waters, USA). Chromatographic separations were carried out by using an ACE® (5 μm, C18, 250 × 4.6 mm) column. The column was operated at a constant temperature of 25°C. The volume of the extract being investigated was 10 μL. The flow rate was 1 mL min-1, and isocratic elution was used. The mobile phase consisted of 88% acetonitrile (solvent A) and 12% water (solvent B). The duration of the analysis was 15 minutes. The identification of the chromatographic peaks was achieved by comparing the retention times and spectral characteristics (λ = 200–400 nm) of the eluting peaks with those of reference compounds. The compounds identified were confirmed by spiking the sample with the standard compound and monitoring the changes in the peak shape and spectral characteristics. For quantitative analysis, a calibration curve was obtained by injection of known concentrations of different standard compounds. The concentrations of triterpenic compounds, identified in the apple peel extracts, were within the limits of calibration curves. Triterpenic compounds were quantified at 205 nm. The concentration of triterpene compounds was calculated based on the peak areas by using standard compounds.

High Performance Liquid Chromatography method for the determination of sugars. The chromatographic analysis was carried out using a hydrophilic interaction liquid chromatography method (HILIC), using the Waters e2695 Alliance chromatographic system (Waters, USA). Chromatographic separation was managed, chromatograms were recorded, and data were processed with the software Empower® v.3.0 (Waters, USA). Chromatographic separations were carried out by using a Shodex SUGAR SZ5532 (150×6.0 mm, particle size 6 μm) column equipped with a Shodex SUGAR SZ-G (10×4.6 mm, particle size 6 μm) pre-column (Shodex Group, Japan). The volume of the injection was 10 μL. The flow rate was 1 mL/min, and gradient elution was used. The mobile phase consisted of water (solvent A) acetonitrile (solvent B). The following conditions of elution were applied: 0–5 minutes, 19% A; 5–20 minutes, 19–30% A; 20–22 minutes, 30% A; and 22–25 minutes, 30–19% A. The column was operated at a constant temperature of 60°C. Detection was made with the evaporative light scattering detector (ELSD) Waters ACQUITY UPLC® ELS Detector (Waters, USA), sprayer temperature – 40 °C, nitrogen gas flow pressure – 25 psi, evaporator temperature – 60 °C. The identification of the chromatographic peaks was

achieved by comparing the retention times and spectral characteristics of the eluting peaks with those of the reference compounds.

High Performance Liquid Chromatography method for the determination of malic acid. The chromatographic analysis was carried out using an ion-exclusion liquid chromatography method, using the Waters e2695 Alliance chromatographic system (Waters, USA). Chromatographic separation was carried out by using a Shodex RSpak KC-118 (300 × 8.0 mm) column equipped with a Shodex RSpak KC-G (50 x 6.0 mm) pre-column (Shodex Group, Japan). The mobile phase consisted of 1 mM (v/v) perchloric acid in water, the volume of the injection was 10 µL and the flow rate was 1 mL/min. The column was operated at a constant temperature of 60 °C. Detection was made with the Waters 2489 UV/Visible (UV/Vis) Detector (Waters, USA) at 210 nm. The identification of the chromatographic peaks was achieved by comparing the retention times and spectral characteristics of the eluting peaks with those of the reference compounds.

Fruit colour measurement. Colour indexes in the space of even contrast colours were measured with a spectrophotometer MiniScan XE Plus (Hunter Associates Laboratory, Inc., USA), and chroma ($C = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$) and hue angle ($h° = \arctan(b^*/a^*)$) were calculated.

Dry matter content was determined gravimetrically by drying apple samples to a constant weight at 105°C.

Fruit respiration rate was measured with a gas analyser EASI-1 (Absoger, France).

Soluble solids were quantified with a digital refractometer PR-32 (Atago Co., Ltd., Japan).

Fruit firmness was determined by the TA.XTPlus texture analyser (Stable Micro Systems, United Kingdom) using the P/2 probe.

Titratable acidity was estimated by titrating with 0.1N NaOH solution to pH 8.2 and was expressed as a percentage of citric acid equivalent.

Ascorbic acid was measured by titration using 2,6-dichlorophenolindophenol sodium salt solution (AOAC, 1990).

The statistical methods of data processing. All the experiments were carried out in triplicate. Means and standard deviations were calculated with STATISTICA 10 StatSoft, Inc., USA) and Excel (Microsoft, USA) software. One-way analysis of variance (ANOVA) along with the posthoc Tukey's HSD test was employed for statistical analysis. Differences were considered to be significant at $p < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Impact of management technologies and biological factors on the physical and physiological characteristics of apple fruit

The quality of fruit is first and foremost determined by the external quality parameters – the colour and size of the fruit (if the taste is not yet known to the consumer). For fruit growers, besides these parameters, it is also important to ensure good transportability of the fruit (it can be determined by measuring fruit firmness) and long-term storage, which can be estimated by determining the respiration rate of fruit (Mangaraj, Goswami, 2008; Fagundes et al., 2013; Choi, Jung, 2014). These quality parameters are determined almost always when evaluating the quality of fruits (Kovač et al., 2010; Winzeler, Schupp, 2011; Unuk et al., 2012).

Adjusting crop load in apple trees did not affect colour, firmness and respiration rate of fruits, but the average fruit mass increased in proportion to decreasing crop load – fruits grown in apple-trees with low crop load were up to 25% heavier (fruit weight varied from 171 ± 5.9 g to 213 ± 5.4 g) than fruits from high crop load apple-trees. This can be explained by the increased number of assimilates and the amount of sun light intercepted by each fruit.

Fruit growth location in apple-tree canopy had a significant effect on fruit colour, firmness and average weight. Fruits grown at the top of the canopy had up to 11% harder skin (apple skin firmness varied from 380 ± 9.5 N cm^{-2} in fruits from bottom of canopy to 423 ± 0.4 N cm^{-2} in fruits from top of canopy), up to 35% higher weight (fruit weight varied from 165 ± 22.6 g in fruits from bottom of canopy to 222 ± 30.5 g in fruits from top of canopy), and had better coloration than fruits which were grown at the bottom and inside of the canopy. Fruits that grew on the east and west side of canopy were closer in terms of physical and psychological parameters to fruits that grew on the top of canopy. These results can be explained by the different amount of intercepted sun light and therefore different fruit maturity.

The apple-tree growth control did not have statistically significant effect on fruit colour, firmness, average weight and respiration rate.

The planting distance of apple-trees had no significant impact on fruit colour, firmness and respiration rate, but average fruit weight increased as apple-trees were grown at wider distances. Apple-trees grown at a distance of 1.50 m bore up to 18% heavier fruits than apple-trees grown at a distance of at 0.50 m (average fruit weight varied from 134 ± 7.1 g to 158 ± 7.8 g accordingly). This can be explained by the fact that densely populated apple-trees compete with each other for nutrients, water and sunlight, resulting in lower fruit weight.

The geographical location of the apple-trees had a significant influence on the physical and physiological parameters of apple fruits. The cultivar ‘Auksis’ colours better in the north-eastern region and ‘Ligol’ fruits – in the southern region. The ‘Auksis’ apples were up

to 18% and the 'Ligol' apples up to 11% firmer in the north-eastern region than in the southern region (apple skin firmness varied from 294 ± 22.6 N cm^{-2} to 348 ± 12.1 N cm^{-2} in cultivar 'Auksis' and from 454 ± 14.4 N cm^{-2} to 502 ± 10.7 N cm^{-2} in cultivar 'Ligol'). The apple weight of both cultivars was highest in the southern region: the average weight of the 'Auksis' apples cultivated in Poland was up to 41% higher than that of apples grown in Estonia (average fruit weight varied from 140 ± 0.4 g to 198 ± 5.3 g), and up to 29% for the 'Ligol' cultivar (average fruit weight varied from 188 ± 9.6 g to 243 ± 8.7 g). This can be accounted for by the warmer climate and the increased amount of intercepted sun light. The fruit respiration rate among the cultivars was the opposite: the cultivar 'Auksis' had lower respiration rate when cultivated in the north-eastern region (in Poland, the apple respiration rate was about 29% higher than that of apples from Estonia – it varied from 2.4 ± 0.10 mg $CO_2 \cdot Kg \cdot h^{-1}$ to 3.1 ± 0.25 mg $CO_2 \cdot Kg \cdot h^{-1}$), and cultivar 'Ligol' had lower respiration rate in the southern region (apple respiration rate in Estonia was about 62% higher than that in apples from Poland – it varied from 2.1 ± 0.19 mg $CO_2 \cdot Kg \cdot h^{-1}$ to 3.4 ± 0,07 mg $CO_2 \cdot Kg \cdot h^{-1}$). This could be accounted for by the different genetic origin of these cultivars and the gene expression in the respective climatic conditions.

Geographical apple-tree growing location had the greatest impact on fruit firmness, average weight and respiration rate, and fruit location in the canopy had the greatest influence on fruit colour indices. Depending on the biological factors and management technologies used, fruit skin firmness can be increased by up to 18%, the firmness of the apple flesh and the average fruit weight by up to 41% and the fruit respiration rate can be reduced by up to 38%.

Changes in the chemical composition of apple fruit

Another fruit quality factor, which is important to both consumers and growers, is fruit chemical composition, particularly soluble solids and sugar content, acidity and their ratio, which determines fruit taste. These quality parameters are estimated almost always when evaluating the fruit quality (Kviklienė et al., 2006; Goliáš et al., 2008; Mziou et al., 2009; Petkovšek et al., 2009). Soluble solids content is also important for fruit respiration rate and weight loss, which affect fruit storage performance (Farooq et al., 2012; Fagundes et al., 2013). Compared with other fruits, ascorbic acid (vitamin C) is low in apples, but, given the high consumption of apples, this indicator is also often evaluated in scientific studies (Varming et al., 2013).

The chemical composition of fruits was evaluated by determining total sugar content, soluble solids, ascorbic acid content, titratable acidity and dry matter. Since sugars and acidity are important indicators of the organoleptic characteristics of the fruit, the qualitative and quantitative composition of sugars and malic acid was evaluated additionally. Malic acid is dominant in apples (Campeanu et al., 2009) and is closely related to titratable acidity (Markowski et al., 2009). Nour et al. (2010) found that malic acid in the 'Red Boskoop' apple amounted to 1993.7 mg per 100 g^{-1}, while citric acid and ascorbic acid totalled as little

as 16.3 and 18.7 mg per 100 g^{-1} accordingly, therefore, we did not investigate other organic acids in this work.

The regulation of crop load in apple-trees did not affect the chemical composition of apples. Although there was no significant difference in total sugars content in the examined apple fruits; however, the content of individual sugar varied between the investigated treatments. Apple fruits, cultivated on the largest crop load (12 fruits cm^{-2} TCSA) apple-trees accumulated up to 49% more glucose in comparison to fruits that grew on the lowest crop load apple-trees (4 fruits cm^{-2} TCSA). Sucrose and sorbitol levels followed the opposite trend: with increasing crop load, the content of these sugars decreased. The sucrose content of apple fruits grown on the lowest crop load apple-trees was up to 29% and sorbitol up to 23% higher than those of fruits grown on heavy crop load apple-trees. More detailed data are presented in Table 1. These results can be explained by the increased number of assimilates received by each fruit.

Table 1. Crop load effect on apple sugar, sorbitol and malic acid composition, mg g^{-1} DW (cv. 'Ligol', average 2014-2016)

Compound	Crop load in apple-tree, fruits cm^{-2} TCSA		
	4	8	12
Fructose	446.9 ± 22.35^{a}	463.8 ± 23.19^{a}	477.5 ± 23.88^{a}
Glucose	75.6 ± 3.78^{c}	92.1 ± 4.61^{b}	112.5 ± 5.62^{a}
Sucrose	289.9 ± 14.49^{a}	244.9 ± 12.25^{b}	224.8 ± 11.24^{b}
Sorbitol	26.2 ± 1.31^{a}	22.0 ± 1.10^{b}	21.3 ± 1.06^{b}
Malic acid	41.4 ± 2.07^{a}	41.6 ± 2.08^{a}	39.2 ± 1.96^{a}

Note. The different letters in the same line indicate statistically significant differences between the individual compounds in the apple samples ($p < 0.05$).

Fruit location in the apple-tree canopy had a significant influence on the chemical composition of the fruits. Apples grown on the outer parts of the canopy (top, east and west sides) accumulated by up to 6% higher sugar and soluble solids content and up to 12% lower acidity compared to apples that grew at the bottom of the canopy. The amount of sorbitol in the fruits from the bottom of the apple-tree canopy was by up to 34% lower than in fruits from other parts of the canopy. The amount of glucose showed the opposite trend: apples from the bottom of the canopy had by up to 23% more glucose than fruits from other canopy locations. Malic acid was by up to 14% higher in fruits from the bottom and east side of the canopy. Data are presented in Table 2. These results can be explained by the different amount of intercepted sun light and therefore different fruit maturity in different canopy locations.

Table 2. Effect of fruit position in tree on apple sugar, sorbitol and malic acid composition, mg g^{-1} DW (cv. 'Ligol', average 2014-2016)

Compound	Fruit position in apple-tree canopy			
	Bottom	Top	East	West
Fructose	505.6 ± 25.28 [a]	447.2 ± 22.36 [a]	460.6 ± 23.03 [a]	493.9 ± 24.69 [a]
Glucose	101.6 ± 5.08 [a]	82.9 ± 4.15 [b]	87.5 ± 4.38 [b]	90.3 ± 4.52 [ab]
Sucrose	229.2 ± 11.46 [a]	260.6 ± 13.03 [a]	256.4 ± 12.82 [a]	251.5 ± 12.57 [a]
Sorbitol	15.4 ± 0.77 [c]	23.2 ± 1.16 [a]	18.9 ± 0.95 [b]	23.4 ± 1.17 [a]
Malic acid	45.8 ± 2.29 [a]	40.2 ± 2.01 [b]	42.7 ± 2.14 [ab]	40.1 ± 2.01 [b]

Note. The different letters in the same line indicate statistically significant differences between the individual compounds in the apple samples ($p < 0.05$).

Apple-tree growth control did not affect chemical composition of apples, only the difference between some individual sugars in two trial treatments was observed. Apple-tree spraying with prohexadione calcium resulted in about 22% higher glucose content, and summer pruning gave up to 21% increase in sorbitol content in fruits compared to the control treatment (Table 3). This can be explained by the change in distribution of assimilates between apple-tree organs and the reduction of leaf area.

Table 3. Effect of tree growth control on apple sugar, sorbitol and malic acid composition, mg g^{-1} DW (cv. 'Rubin', average 2015-2016)

Compound	Apple-tree growth control treatments				
	Control	Trunk incision	Root pruning	Pro-Ca	Summer pruning
Fructose	432.3 ± 21.61[a]	433.0 ± 21.65 [a]	431.2 ± 21.56 [a]	463.2 ± 23.16 [a]	418.9 ± 20.94 [a]
Glucose	84.0 ± 4.20[b]	95.8 ± 4.79 [ab]	87.6 ± 4.38 [b]	102.2 ± 5.11 [a]	84.5 ± 4.22 [b]
Sucrose	276.9 ± 13.84[ab]	270.4 ± 13.52 [ab]	276.7 ± 13.84 [ab]	241.9 ± 12.10 [b]	288.7 ± 14.44 [a]
Sorbitol	27.9 ± 1.39[b]	30.3 ± 1.51 [ab]	28.5 ± 1.42 [b]	26.4 ± 1.32 [b]	33.7 ± 1.69 [a]
Malic acid	45.9 ± 2.29[ab]	49.7 ± 2.49 [a]	43.3 ± 2.16 [b]	43.6 ± 2.18 [b]	41.0 ± 2.05 [b]

Note. The different letters in the same line indicate statistically significant differences between the individual compounds in the apple samples ($p < 0.05$).

Apple-tree planting distance did not have statistically significant effect on the chemical composition and sugar content in apples.

Geographical apple-tree growth location had effect on the chemical composition of apples for the 'Auksis' cultivar: the highest amounts of sugar and soluble solids were found in apples grown in Lithuania, while the lowest amounts were identified in Estonia. The qualitative composition of sugars shows that fruits grown in Lithuania had by up to 50% more sucrose, but by about 11% less glucose. In Poland, apples accumulated by up to 21% more sorbitol than in other investigated locations (Table 4). Geographical apple-tree growth location for the 'Ligol' cultivar had no effect on fruit chemical composition. Malic acid content in apples from Poland was by up to 30% lower than in fruits grown in other investigated regions (Table 5). These results can be explained by the genetic origin of these cultivars, different vegetation periods and the uneven amount of intercepted sun light.

Table 4. Effect of geographical apple-tree growing location on apple sugar, sorbitol and malic acid composition, mg g^{-1} DW (cv. 'Auksis', average 2015-2016)

Compound	Geographical location		
	Poland	Lithuania	Estonia
Fructose	474.2 ± 23.71^{a}	463.2 ± 23.16^{a}	473.4 ± 23.67^{a}
Glucose	118.7 ± 5.93^{a}	103.6 ± 5.18^{b}	116.7 ± 5.83^{ab}
Sucrose	182.3 ± 9.11^{b}	218.6 ± 10.93^{a}	145.6 ± 7.28^{c}
Sorbitol	50.3 ± 2.51^{a}	43.8 ± 2.19^{b}	41.6 ± 2.08^{b}
Malic acid	40.4 ± 2.02^{a}	40.7 ± 2.03^{a}	40.6 ± 2.03^{a}

Note. The different letters in the same line indicate statistically significant differences between the individual compounds in the apple samples ($p < 0.05$).

Table 5. Effect of geographical apple-tree growing location on apple sugar, sorbitol and malic acid composition, mg g^{-1} DW (cv. 'Ligol', average 2015-2016)

Compound	Geographical location		
	Poland	Lithuania	Estonia
Fructose	475.7 ± 23.78^{a}	458.1 ± 22.90^{a}	461.9 ± 23.10^{a}
Glucose	92.2 ± 4.61^{a}	83.7 ± 4.18^{a}	94.8 ± 4.74^{a}
Sucrose	258.7 ± 12.94^{a}	265.7 ± 13.28^{a}	234.4 ± 11.72^{a}
Sorbitol	26.3 ± 1.31^{a}	20.4 ± 1.02^{b}	23.5 ± 1.18^{a}
Malic acid	32.8 ± 1.64^{b}	46.7 ± 2.34^{a}	45.3 ± 2.27^{a}

Note. The different letters in the same line indicate statistically significant differences between the individual compounds in the apple samples ($p < 0.05$).

After complex evaluation of management technologies applied and biological factors, the geographical apple-tree growing location for 'Auksis' apple cultivar was determined to have the greatest impact on apple total sugar content, sucrose, soluble solids, titratable

acidity and malic acid content. Fruit location in the canopy had the greatest influence on the amount of sorbitol and dry matter, while glucose content in fruits was most strongly influenced by controlling the apple-tree crop load. Depending on the biological factors and management technologies applied, total sugar content in apples can be increased by up to 9%, glucose by up to 49%, sucrose by up to 50%, sorbitol by up to 52%, soluble solids by up to 8%, dry matter by up to 6% and the amount of malic acid can be reduced by up to 30%. Ascorbic acid and fructose content in apples was not affected by biological factors and management technologies applied.

Changes in the content and composition of secondary phenolic metabolites and antioxidant activity in apple fruit

Phenolic compounds are beneficial to the human body due to their antioxidant properties, and apples are a good source of these compounds (Eberhardt et al., 2000; Wolfe et al., 2003; Sun, Liu, 2008; Liu et al., 2009). Different amounts of phenolic compounds accumulate in the flesh and skin of the apple (Raudonė et al., 2017). In apple skin, the concentration of phenolic compounds is several times higher than in flesh, and flavonoid quercetin glycosides are found only in the skin (Awad et al., 2000; Chinnici et al., 2004; Łata, Tomala, 2007; Drogoudi et al., 2008).

Research of biologically active compounds, especially phenols, in apples is limited to the evaluation of different cultivars (Lee et al., 2003; Tsao et al., 2003; Wojdyło et al., 2008; Vieira et al., 2009; Liaudanskas et al., 2015), organic and integrated growing systems (Hecke et al., 2006), light (Awad et al., 2001a; Drogoudi, Pantelidis, 2011; Feng et al., 2014) and some of apple-tree stress factors such as drought, pathogens or soil salinity (Treutter, 2010) effect on the accumulation of phenolic compounds in apples. We also conducted research to evaluate the effects of fruit tree nutrition (Lanauskas et al., 2017), rootstocks (Kviklys et al., 2014; 2017) and vegetation period (Liaudanskas et al., 2016) on the accumulation of phenolic compounds in apples, and the detailed results of these studies can be found in the articles included in the annexes to this work. The amount of phenolic compounds should also be evaluated when fruit is intended for further processing. Due to the strong phenolic compounds reaction with tannins and macromolecules, such as proteins and polysaccharides, phenols stimulate the formation of sediment and influence the parameters of juice transparency (Siebert et al., 1996).

As apples are one of the most widely consumed fruits in the world and fruit growers use various technological and biological means to ensure optimum fruit quality and yield, it is important to evaluate how such management practices affect the accumulation of phenolic compounds in fruits, since to date, there are very few studies addressing this issue and the findings obtained are rather inconsistent and contradictory.

The following phenolic compounds of different groups were identified and quantified in the apple extracts: quercetin glycosides (hyperoside, isoquercitrin, rutin, reynoutrin, avicularin, quercitrin), flavan-3-ol (procyanidin B1, procyanidin B2, procyanidin C1, (+)-

catechin, (-)-epicatechin), phloridzin and chlorogenic acid. We also investigated the effect of individual phenolic compounds on the overall antioxidant activity of apple fruits.

We also optimized the conditions for extraction of phenolic compounds - flavonoids, for widely grown apple cultivars in Lithuania (Liaudanskas et al., 2018). Ultrasonic extraction of apple flavonoids was modelled using the Response Surface Methodology (RSM) by choosing a three-level and three-factor central composite design. Three optimizable parameters were chosen to obtain the highest yield of flavonoids extracted from lyophilized apples: temperature (X_1), extraction time (X_2) and ultrasound power (X_3). After regression analysis of the experimental data for the predicted response Y (for the dependent variable - the total amount of flavonoids mg g^{-1} DW), we obtained the square polynomial equation (1), which marks the encoded variables (X_1, X_2 and X_3):

$$Y = 6.86 + 0.49X_1 + 0.83X_2 + 0.29X_3 - 1.08X_1^2 - 1.47X_2^2 + 0.30X_3^2 - 0.071X_1X_3 + 0.013X_2X_3 \quad (1)$$

Based on the compiled model, the obtained results suggest that the highest theoretical yield of phenolic compounds extraction (6.69 mg g^{-1} DW) was when samples had been extracted for 27 min. at 45 ºC using 480W ultrasonic power.

Crop load regulation in apple-trees had a significant effect on the composition of phenolic compounds in apples. With the increase in crop load, the total amount of phenolic compounds in the apples also increased (Fig. 1). Apple fruits, cultivated on the highest crop load (12 fruits cm^{-2} TCSA) apple-trees accumulated by up to 23% more phenolic compounds in comparison to fruits that grew on the lowest crop load apple-trees (4 fruits cm^{-2} TCSA). With increasing crop load, higher radical scavenging activity (up to 32% - from 3.94 TE_{ABTS}, µmol/g to 5.20 TE_{ABTS}, µmol/g) and up to 61% (from 3.60 TE_{FRAP}, µmol/g to 5.80 TE_{FRAP}, µmol/g) higher radical reducing activity were observed. These results could be explained by the increased stress of apple-trees at heavier crop loads.

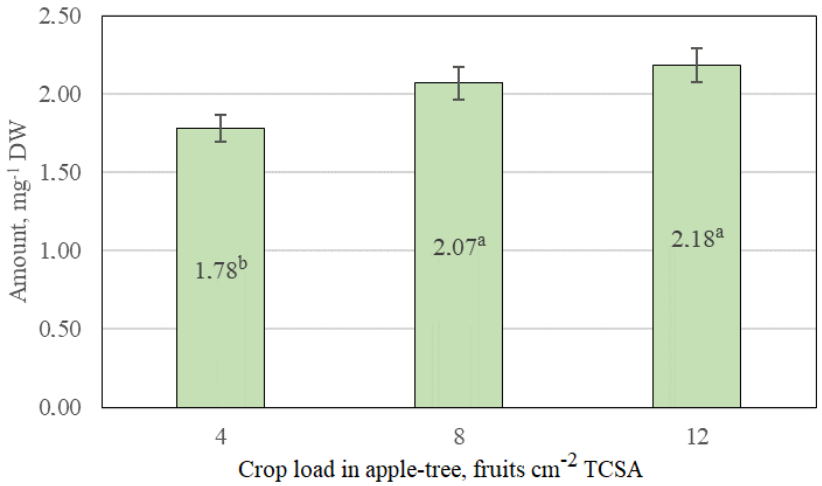


Figure 1. Total amount of investigated phenolic compounds (mg g^{-1}) in apples from apple-trees with different crop load (cv. 'Ligol', average 2014-2016)

Fruit growing location in the apple-tree canopy also had a significant influence on the composition of phenolic compounds in apples: fruits that grew at the top of the canopy accumulated 1.7 times more quercetin glycosides (from 0.184 ± 0.009 mg g^{-1} DW to 0.499 ± 0.025 mg g^{-1} DW) and by up to 15% more flavan-3-ols (from 0.863 ± 0.043 mg g^{-1} DW to 0.994 ± 0.05 mg g^{-1} DW), compared to fruits that grew in the apple-tree inner canopy. The total amount of phenolic compounds in fruits that grew in the top of the canopy was by up to 24% higher than in fruits grown in other locations of the canopy (Fig. 2). Apples from top of the canopy had higher radical scavenging activity (up to 31% - from 4.20 TE_{ABTS}, µmol/g to 5.48 TE_{ABTS}, µmol/g) and up to 33% (from 4.26 TE_{FRAP}, µmol/g to 5.66 TE_{FRAP}, µmol/g) higher radical reducing activity. These results can be explained by the different amount of intercepted sun light in different canopy locations.

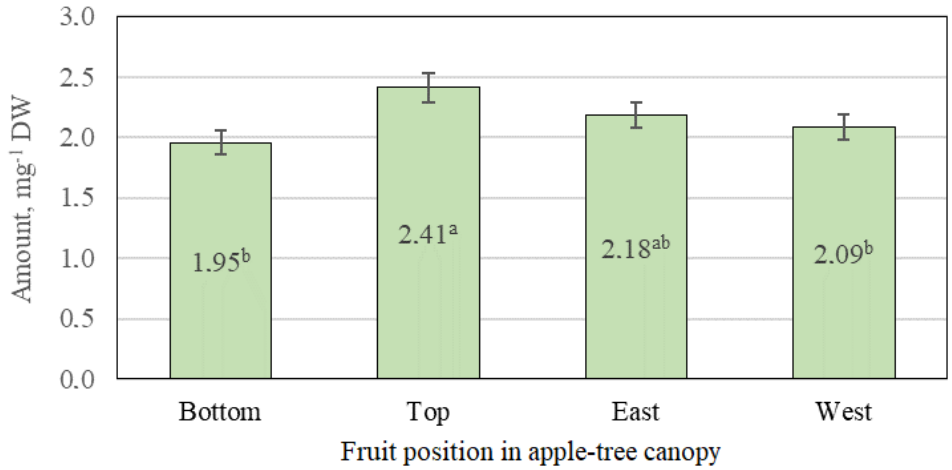


Figure 2. Total amount of investigated phenolic compounds (mg g^{-1}) in apples picked from different positions of apple-tree canopy (cv. 'Ligol', average 2014-2016)

Apple-tree growth control had a significant effect on the composition of phenolic compounds in apples. Root pruning and summer pruning increased the amount of quercetin glycosides accumulating in apples by up to 27% (from 0.376 ± 0.019 mg g^{-1} DW to 0.478 ± 0.024 mg g^{-1} DW), while the use of prohexadione-calcium reduced the amount of these compounds in fruits by about 29% (from 0.376 ± 0.019 mg g^{-1} DW to 0.268 ± 0.013 mg g^{-1} DW). The total amount of investigated phenolic compounds was about 24% lower in the apples that had been sprayed with prohexadione-calcium compared to the control (from 1.729 ± 0.086 mg g^{-1} DW to 1.307 ± 0.065 mg g^{-1} DW). Root pruning showed the opposite trend, it increased total phenolic compounds amount in apples by up to 9% in (Fig. 3). This trend was also observed in the radical scavenging and radical reducing activity of apple fruits. These results can be explained by apple-tree response to stress – root pruning is likely to cause great stress for the apple-tree, and the use of calcium prohexadione significantly reduced the synthesis of these compounds in fruits by optimizing the balance between vegetative and generative development.

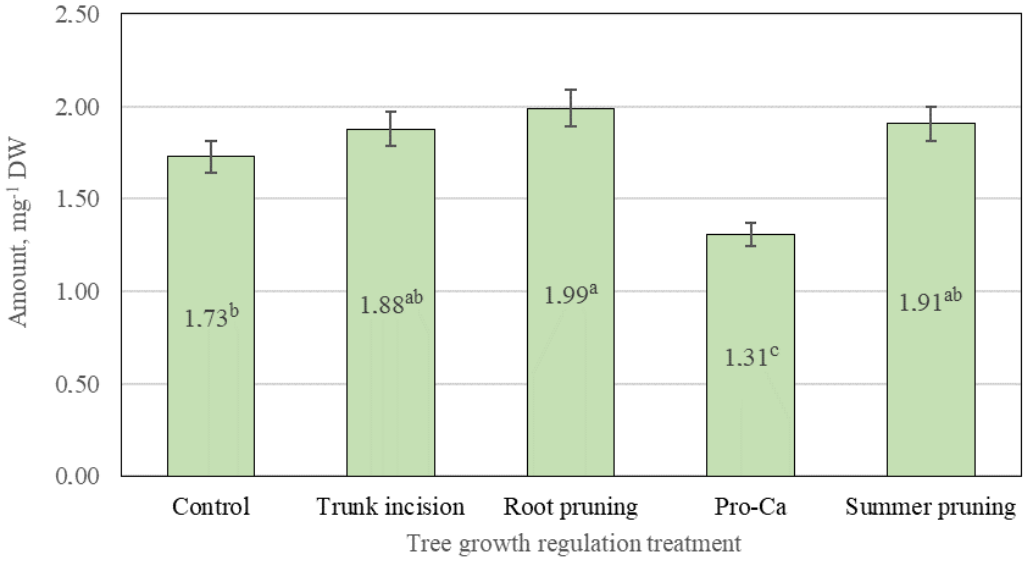


Figure 3. Total amount of investigated phenolic compounds (mg g^{-1} DW) in apples picked from different apple-trees, using various tree growth control treatments (cv. 'Rubin', average 2015-2016)

The apple-tree planting distance did not affect the total amount of phenolic compounds in apples, only a slight trend was observed suggesting that with increasing apple-tree density, the amount of phenolic compounds also increased slightly (Fig. 4). Radical scavenging activity in apples was not significantly different, but radical reducing activity was by up to 24% lower in fruits picked from apple-trees planted at the widest distance. Slightly lower content of phenolic compounds in fruits can be explained by the competitive stress of apple-trees when they were planted most densely.

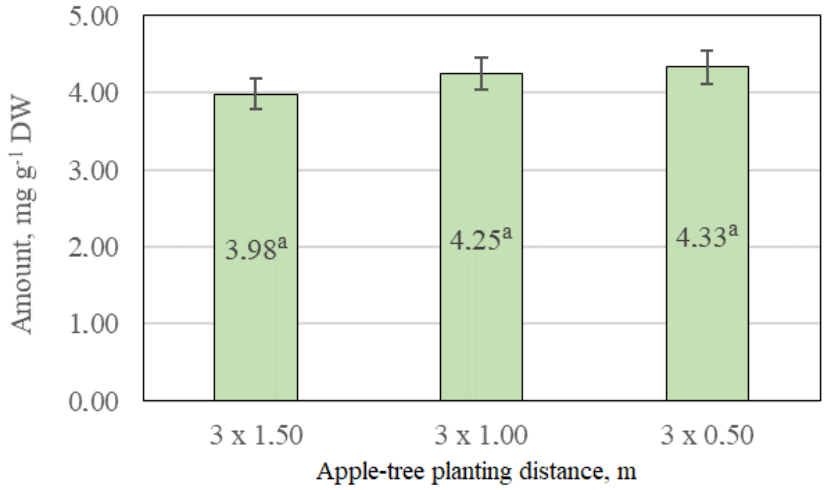


Figure 4. Total amount of investigated phenolic compounds (mg g^{-1}) in apples picked from apple-trees with different growing distance (cv. 'Auksis', average 2015-2016)

Geographical apple-tree growing location influenced the composition of phenolic compounds in apples. The amount of quercetin glycosides in the 'Auksis' apples tended to increase when fruits were growing in orchards in the north-east direction. Apples grown in Poland accumulated by up to 56% lower amount of these compounds than apples grown in Estonia (it varied from 0.630 ± 0.031 mg g^{-1} DW to 0.275 ± 0.014 mg g^{-1} DW). Flavan-3-ols, phloridzin and chlorogenic acid also tended to increase in the same trend. This trend is also clearly reflected in the total amount of investigated phenolic compounds (Fig. 5). 'Auksis' apples grown in Estonia had 2.5 times more phenolic compounds than apples grown in Poland. Also, these apples grown in Estonia, had up to 3.3 times higher radical scavenging (from 4.97 TE_{ABTS}, µmol/g to 16.33 TE_{ABTS}, µmol/g) and radical reducing (from 6.77 TE_{FRAP}, µmol/g to 20.78 TE_{FRAP}, µmol/g) activity than fruits grown in Poland.

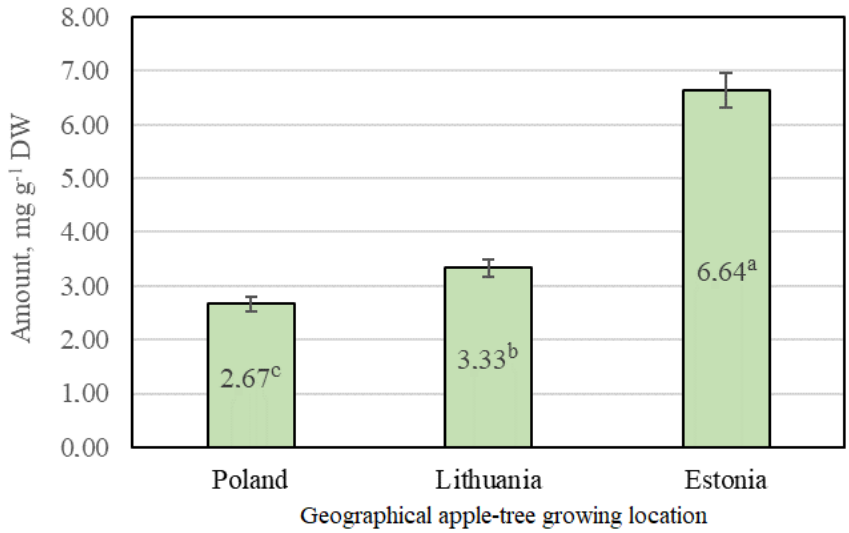


Fig. 5. Total amount of investigated phenolic compounds (mg g^{-1} DW) in apples grown in different geographical locations (cv. 'Auksis', average 2015-2016)

The amount of phenolic compounds for the 'Ligol' cultivar was also the highest in apples grown in Estonia - here they accumulated about twice as much phenols as in Poland or Lithuania (Fig. 6). Radical scavenging and radical reducing activity for the 'Ligol' cultivar was also the highest in Estonia - up to 1.8 times higher than in Poland or Lithuania. The results of these phenolic compounds and their antioxidant activity and the differences between the cultivars can be explained by the different origins of these cultivars and different gene expression in the respective climatic conditions. Due to the least favourable growth conditions for apple-trees in Estonia, these apple-trees accumulated the highest amount of phenolic compounds in both cultivars. This can be explained by the apple-tree response to the stress caused by adverse climatic conditions.

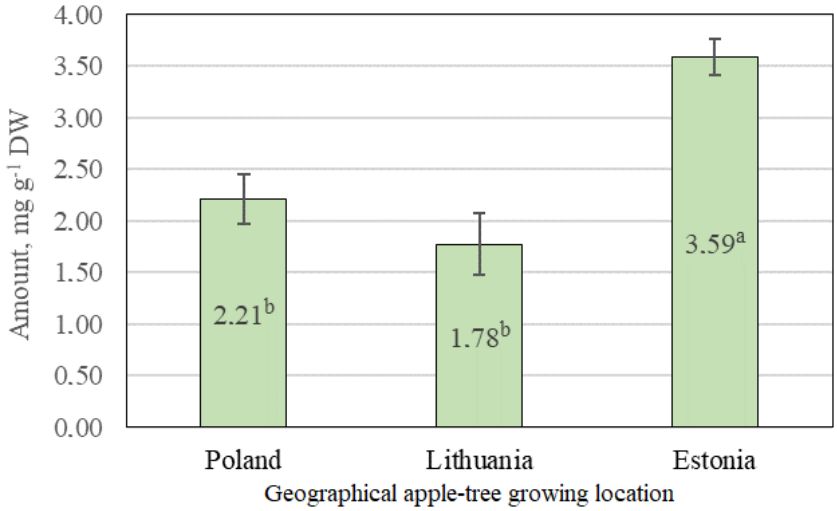


Fig. 6. Total amount of investigated phenolic compounds (mg g^{-1} DW) in apples grown in different geographical locations (cv. 'Ligol', average 2015-2016)

Summarizing the obtained data, it can be inferred that the fruit growth location in apple-tree canopy had the greatest impact on the amount of quercetin glycosides accumulated in apples, while flavan-3-ols, phloridzin and chlorogenic acid were mostly affected by the geographical apple-tree growth location. Depending on the biological factors and applied management technologies, the amount of quercetin glycosides in apples can be increased by up to 2.7 times, flavan-3-ol content by up to 3 times, phloridzin by up to 2.4 times, chlorogenic acid by up to 2.2 times, and the total amount of investigated phenolic compounds by up to 2.5 times.

The variation of qualitative and quantitative composition of triterpenic compounds in apple fruit

Triterpenes are well known for their pharmacological properties, such as: antibacterial (Fontanay et al., 2008), anti-inflammatory (Liu, 2005; Ikeda et al., 2008), anti-HIV (Kashiwada et al., 2000), antitumor (Young et al., 1995), hepatoprotective (Kim et al., 2004; Saravanan et al., 2006), anti-hyperlipidemic (Somova et al., 2003) and antidiabetic (Teodoro et al., 2008; Jang et al., 2009). Despite the importance of these properties, triterpene compounds in apples are still under-researched. Triterpenes are a large group belonging to the terpenoid compounds. Corosolic, betulinic, oleanolic and ursolic acids are typical representatives of pentacyclic triterpenes and they are widely distributed in the plant kingdom and in food products (Jäger et al., 2009; Guinda et al., 2010; Romero et al., 2010; González-Castejón, Rodriguez-Casado, 2011; Mazumder et al., 2011; Muffler et al., 2011). Oleanolic and ursolic acids are found in the waxes of fruit and leaves (Qi et al., 2006; Koch, Ensikat, 2008).

Our study quantified the four triterpenic compounds: corosolic, betulinic, oleonolic and ursolic acids, which are the most common triterpenes found in apple peel. However, a total of thirteen triterpenoids have been identified in apple peel (He, Liu, 2007). The highest concentrations, found in apple peel, were of oleonolic and ursolic acids (Cefarelli et al., 2006; Jäger et al., 2009), which agrees with the findings of our study.

Crop load regulation in apple-trees had effect on the accumulation of triterpenic compounds in apples. Apples grown in apple-trees with a heavy crop load had by up to 17% higher amount of investigated triterpene compounds (Table 6). This could be explained by the lower sun light interception by the canopy, as the amount of triterpene compounds in fruits decreases with direct sun light.

Table 6. Effect of crop load on triterpene composition in apples, mg g^{-1} DW (cv. 'Ligol', average 2015-2016)

Compound	Crop load in apple-tree, fruits cm^{-2} TSCA		
	4	8	12
Corosolic acid	1.48 ± 0.074^{b}	1.48 ± 0.038^{b}	1.70 ± 0.085^{a}
Betulinic acid	0.10 ± 0.005^{b}	0.11 ± 0.003^{b}	0.17 ± 0.008^{a}
Oleonolic acid	1.81 ± 0.090^{b}	1.97 ± 0.049^{b}	2.29 ± 0.115^{a}
Ursolic acid	8.78 ± 0.439^{b}	8.93 ± 0.226^{b}	10.13 ± 0.506^{a}

Note. The different letters in the same line indicate statistically significant differences between the individual compounds in the apple samples ($p < 0.05$).

Fruit growth location in the apple-tree canopy also affected the accumulation of triterpenic compounds – apples picked from the inner canopy had by up to 14% higher amount of individual triterpene compounds than apples picked from the top or west side of apple-tree (Table 7). This can be explained by the different formation of the fruit wax, when apples are shaded or sun-exposed, which directly affects the accumulation of triterpenic compounds.

Table 7. Effect of fruit position in tree on triterpene composition in apples, mg g^{-1} DW (cv. 'Ligol', average 2015-2016)

Compound	Fruit position in apple-tree canopy			
	Bottom	Top	East	West
Corosolic acid	1.44 ± 0.072^{a}	1.25 ± 0.063^{b}	1.34 ± 0.067^{ab}	1.41 ± 0.071^{ab}
Betulinic acid	0.14 ± 0.007^{a}	0.10 ± 0.005^{c}	0.12 ± 0.006^{b}	0.09 ± 0.004^{c}
Oleonolic acid	2.13 ± 0.107^{a}	1.89 ± 0.095^{ab}	1.95 ± 0.098^{ab}	1.77 ± 0.088^{b}
Ursolic acid	10.05 ± 0.502^{a}	8.65 ± 0.433^{b}	8.90 ± 0.445^{ab}	8.65 ± 0.432^{b}

Note. The different letters in the same line indicate statistically significant differences between the individual compounds in the apple samples ($p < 0.05$).

Apple-tree growth control resulted in up to 14% lower amount of triterpenic compounds in apples when trunk incisions were applied to apple-trees. Root pruning, summer pruning and use of prohexadione-calcium affected only betulinic acid content in fruits. It increased by up to 72% in comparison with fruits from the control apple-trees, but it did not have significant effect on the total triterpene content in apples (Table 8). This interaction between trunk incision and lower triterpene content could be explained by altered distribution of assimilates between different apple-tree organs.

Table 8. Effect of tree growth control on triterpene composition in apples, mg g^{-1} DW (cv. 'Rubin', average 2015-2016)

Compound	Tree growth control treatments				
	Control	Trunk incision	Root pruning	Pro-Ca	Summer pruning
Corosolic acid	1.33 ± 0.067^{a}	1.15 ± 0.057^{b}	1.32 ± 0.066^{ab}	1.29 ± 0.064^{ab}	1.42 ± 0.071^{a}
Betulinic acid	0.19 ± 0.009^{d}	0.15 ± 0.008^{e}	0.27 ± 0.014^{b}	0.24 ± 0.012^{c}	0.32 ± 0.016^{a}
Oleonolic acid	2.10 ± 0.105^{abc}	1.85 ± 0.093^{c}	2.13 ± 0.107^{ab}	2.02 ± 0.101^{bc}	2.35 ± 0.118^{a}
Ursolic acid	9.06 ± 0.453^{a}	7.70 ± 0.385^{b}	9.00 ± 0.450^{a}	8.81 ± 0.441^{ab}	9.63 ± 0.482^{a}

Note. The different letters in the same line indicate statistically significant differences between the individual compounds in the apple samples ($p < 0.05$).

Apple-tree planting distance did not affect either the amount of corosolic acid or the ursolic acid in apple fruits. Fruits from apple-trees that had been planted at the widest distance accumulated by up to 34% more betulinic acid, and conversely, the amount of oleonolic acid was by up to 25% higher in apples from most densely planted apple-trees. This quantitative difference between individual compounds led to the fact that the total amount of triterpenic compounds was not significantly different (Table 9).

Table 9. Effect of apple-tree planting distance on triterpene composition in apples, mg g^{-1} DW (cv. 'Auksis', average 2015-2016)

Compound	Apple-tree planting distance, m		
	3 x 1.50	3 x 1.00	3 x 0.50
Corosolic acid	0.40 ± 0.020^{a}	0.42 ± 0.021^{a}	0.43 ± 0.022^{a}
Betulinic acid	0.22 ± 0.011^{a}	0.16 ± 0.008^{b}	0.17 ± 0.008^{b}
Oleonolic acid	2.05 ± 0.103^{b}	2.34 ± 0.117^{ab}	2.57 ± 0.129^{a}
Ursolic acid	9.71 ± 0.486^{a}	10.77 ± 0.539^{a}	10.86 ± 0.543^{a}

Note. The different letters in the same line indicate statistically significant differences between the individual compounds in the apple samples ($p < 0.05$).

Geographical apple-tree growing location had effect on accumulation of triterpenic compounds in apples. The apple cultivar 'Auksis', grown in Poland had by up to 28% lower amount of triterpenic compounds than fruits grown in other investigated locations (Table 10). A similar was observed for 'Ligol' cultivar, but the difference was not statistically significant (Table 11). These results can be accounted for by the different amount of intercepted sun light, different origins of these cultivars and different gene expression in the respective climatic conditions.

Table 10. Effect of geographical apple-tree growing location on triterpene composition in apples, mg g^{-1} DW (cv. 'Auksis', average 2015-2016)

Compound	Geographical location		
	Poland	Lithuania	Estonia
Corosolic acid	0.29 ± 0.015^{b}	0.48 ± 0.024^{a}	0.49 ± 0.024^{a}
Betulinic acid	0.11 ± 0.005^{b}	0.13 ± 0.006^{a}	0.10 ± 0.005^{b}
Oleonolic acid	1.41 ± 0.070^{b}	2.10 ± 0.105^{a}	1.96 ± 0.098^{a}
Ursolic acid	7.08 ± 0.354^{b}	9.68 ± 0.484^{a}	9.54 ± 0.477^{a}

Note. The different letters in the same line indicate statistically significant differences between the individual compounds in the apple samples ($p < 0.05$).

Table 11. Effect of geographical apple-tree growing location on triterpene composition in apples, mg g^{-1} DW (cv. 'Ligol', average 2015-2016)

Compound	Geographical location		
	Poland	Lithuania	Estonia
Corosolic acid	1.17 ± 0.059^{b}	1.55 ± 0.078^{a}	0.91 ± 0.046^{c}
Betulinic acid	0.12 ± 0.006^{b}	0.15 ± 0.008^{a}	0.13 ± 0.007^{b}
Oleonolic acid	1.89 ± 0.095^{b}	2.24 ± 0.112^{a}	2.31 ± 0.115^{a}
Ursolic acid	9.63 ± 0.481^{a}	9.57 ± 0.479^{a}	10.10 ± 0.505^{a}

Note. The different letters in the same line indicate statistically significant differences between the individual compounds in the apple samples ($p < 0.05$).

The genetic origin of the cultivar and geographical location of fruit growth had the greatest effect on the amount of corosolic, oleonolic and ursolic acids in apple fruit, while betulinic acid content was influenced by apple-tree growth control. Depending on the biological factors and management technologies applied, the amount of corosolic acid in the apple fruit can be increased by up to 70%, betulinic acid by up to 2.1 times, oleonolic acid by up to 50%, ursolic acid by up to 37%, and the total investigated triterpene content by up to 39%.

CONCLUSIONS

1. Crop load regulation in apple-trees is an effective management tool for modelling fruit quality parameters. By reducing crop load, apple weight increases by up to 25%. At heavy crop load, apples contained up to 49% more glucose, up to 23% more phenolic and up to 17% more triterpenic compounds, they also had up to 32% higher radical scavenging and up to 61% higher radical reducing activity.

2. Apple fruits grown at the top of apple-tree canopy had up to 11% firmer skin, up to 35% higher weight, had better colour indices, accumulated up to 6% more sugar, up to 24% more phenolic compounds, and up to 12% less organic acids, also exhibited 31% higher radical scavenging and 33% higher radical reducing activity, compared to apples, that grew at the bottom of apple-tree canopy. These fruits had up to 14% higher triterpenic compounds content. There were no significant differences in the main fruit quality parameters among the fruits grown in east and west sides of the canopy, except for acidity, which was by up to 15% higher in fruits from the west side.

3. Different apple-tree growth control treatments affected only synthesis of bioactive compounds but did not have any effect on fruit colour, firmness, weight, respiration rate and general chemical composition. Root pruning and summer pruning increased the accumulation of quercetin glycosides in apples by up to 27%. The use of prohexadione-calcium resulted in by up to 24% lower amount of total phenolic compounds, but root pruning had the opposite effect – it increased the amount of these compounds in apples by about 9%. Trunk incision of apple-trees caused by up to 14% lower amount of triterpene compounds in apples.

4. Of all investigated management technologies, apple-tree planting distance had the least impact on the apple fruit quality. By decreasing the distance between apple-trees, only fruit weight increased significantly (by up to 18%), but other fruit quality factors did not depend on the apple-tree growing density.

5. Geographical apple-tree growth location due to different agroclimatic conditions (sum of active temperatures, soil type, etc.) affected all apple fruit quality indices, but their variation was also determined by the genotype of the cultivar. The apples of ‘Auksis’ cultivar were more intensively coloured in the north-eastern region, while the apples of ‘Ligol’ – in the southern region. The highest amount of sugars and soluble solids for cultivar ‘Auksis’ was found in the apples grown in Lithuania, while the lowest – in Estonia, but there were no significant differences when compared with ‘Ligol’ cultivar. The both cultivars in Poland bore up to 41% heavier fruit with up to 18% lower flesh firmness, compared to apples grown in Estonia. The further the north the apple-trees grow, the more phenolic compounds apple fruits accumulate – in Estonia, in both apple

cultivars, their amount was up to 2.5 times higher, and the radical scavenging and radical reducing activity in these fruits was by as many as up to 3.3 times higher.

6. A complex evaluation of the effects of orchard management technologies and biological factors on the changes in apple fruit quality indicators revealed fruit chemical composition to be the most stable one. The application of various orchard management technologies resulted in the most significant quantitative and qualitative changes in bioactive compounds.

A LIST OF SCIENTIFIC PUBLICATIONS ON THE TOPIC OF THE DISSERTATION

Articles in periodical scientific publications with a citation index according to Clarivate Analytics Web of Science

1. **Viškelis J.**, Uselis N., Liaudanskas M., Janulis V., Bielicki P., Univer T., Lepsis J., Kviklys D. 2018. Triterpenic acid content in the fruit peel of *Malus* × *domestica* Borkh. depends on the growing technology. Zemdirbyste-Agriculture, 105(1): 71–78.
2. Liaudanskas M., Zymonė K., **Viškelis J.**, Janulis V. 2018. Optimisation of the extraction of flavonoids from apples using response surface methodology. Italian Journal of Food Science, 30(1): 89-101.
3. Lanauskas J., Kviklys D., Liaudanskas M., Janulis V., Uselis N., **Viškelis J.**, Viškelis P. 2017. Lower nitrogen nutrition determines higher phenolic content of organic apples. Horticultural Science (Prague), 44: 113-119.
4. Raudone L., Raudonis R., Liaudanskas M., **Viskelis J.**, Pukalskas A., Janulis, V. 2016. Phenolic Profiles and Contribution of Individual Compounds to Antioxidant Activity of Apple Powders. Journal of Food Science, 81: C1055–C1061.

Articles in periodical scientific publications according to other databases

1. **Viškelis J.**, Kviklys D. 2017. Vaisių krūvio reguliavimas vaismedžiuose (apžvalga). Sodininkystė ir daržininkystė, 36(1-2): 30-42.
2. Kviklys D., Liaudanskas M., **Viškelis J.**, Buskienė L., Lanauskas J., Uselis N., Janulis V. 2017. Composition and concentration of phenolic compounds of ‘Auksis’ apple grown on various rootstocks. Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B, 71(3): 144–149.
3. Liaudanskas M., Brunevičiūtė R., Gaivelytė K., **Viškelis J.**, Viškelis P., Kviklys D., Janulis V. 2016. Seasonal variation of qualitative and quantitative composition of phenolic compounds and antioxidant activity in apple (*Malus domestica* Borkh.) fruits. International Journal of Biochemistry Research & Review, 14(3): 1-13.

Participation in conferences

1. **Viškelis J.**, Liaudanskas M., Kviklys D. 2017. Quantitative and qualitative differences of bioactive compounds in apples (cv. 'Auksis') grown in different geographical locations. The International Conference of Young Scientists "Young Scientists for Advance of Agriculture", November 16, 2017, Vilnius, Lithuania.
2. **Viškelis J.**, Uselis N., Liaudanskas M., Janulis V., Kviklys D. Effect of apple-tree vegetative growth regulation on accumulation of fruit triterpenic and phenolic compounds. 4th North and East European Congress on Food, September 10-13, 2017, Kaunas, Lithuania.
3. Butkevičiūtė A., Liaudanskas M., **Viškelis J.**, Raudonis R., Viškelis P., Kviklys D., Janulis V. Obuolių triterpeninių junginių kokybinės ir kiekinės sudėties vertinimas, taikant validuotą efektyviosios skysčių chromatografijos metodiką. Dvidešimt trečioji tarptautinė mokslinė-praktinė konferencija "Žmogaus ir gamtos sauga 2017", May 3-5, 2017, Kaunas, Lithuania.
4. **Viškelis J.**, Liaudanskas M., Kviklys D. 2016. Quantitative differences of bioactive compounds in apples picked from different positions of an apple-tree. The International Conference of Young Scientists "Young Scientists for Advance of Agriculture", November 10, 2016, Vilnius, Lithuania.
5. Kviklys D., Liaudanskas M., **Viškelis J.**, Buskienė L., Lanauskas J., Uselis N., Janulis V. 2016. Composition and content of phenolic compounds of 'Auksis' apple on various rootstocks. 3rd international scientific conference "Sustainable Fruit Growing: From Plant to Product", August 17-19, 2016, Ryga, Latvija
6. **Viškelis J.**, Bobinaitė R., Urbonavičienė D., Kviklys D. Qualitative description of apples cv. 'Ligol' picked from various positions of tree. 1st international conference on the scientific actualities and innovations in horticulture 2016 (SAIH 2016), June 2-3, 2016, Kaunas, Lithuania.
7. Butkevičiūtė A., Liaudanskas M., **Viškelis J.**, Raudonis R., Viškelis P., Kviklys D., Janulis V. Triterpeninių junginių kokybinės ir kiekinės sudėties įvairavimas Lietuvoje auginamų skirtingų veislių obuolių ėminiuose. Dvidešimt antroji tarptautinė mokslinė-praktinė konferencija "Žmogaus ir gamtos sauga 2016". May 4-6, 2016, Kaunas, Lithuania.
8. Liaudanskas M., **Viškelis J.**, Kviklys D. Variation of qualitative and quantitative composition of phenolic compounds of the apple cultivars grown in Lithuania. The 6th International Pharmaceutical Conference "Science and practice 2015", November 5-6, 2015, Kaunas, Lithuania.

A SHORT PROFILE OF THE CANDIDATE

Jonas Viškelis was born on October 14, 1986 in Kaunas. From 2005 to 2011 he studied at Kaunas University of Technology, Faculty of Informatics. In 2009, he graduated with a bachelor's degree in informatics, and in 2011 he received a master's degree in informatics engineering. During the 2014-2018 period, he completed a PhD course in the Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry, Institute of Horticulture. In 2016, J. Viškelis had an internship at Institute of Horticulture, Latvia University of Agriculture in Dobele, Latvia. Since 2011 he has been employed as a junior researcher at the Institute of Horticulture, Laboratory of Biochemistry and Technology.

ALEKSANDRO STULGINSKIO UNIVERSITETAS

LIETUVOS AGRARINIŲ IR MIŠKŲ MOKSLŲ CENTRAS

Jonas Viškelis

TECHNOLOGINIŲ PRIEMONIŲ IR BIOLOGINIŲ VEIKSNIŲ INTENSYVIUOSE OBELŲ (*MALUS* × *DOMESTICA* BORKH.) SODUOSE ĮTAKA VAISIŲ KOKYBEI

DAKTARO DISERTACIJA

Žemės ūkio mokslai, Agronomija (01A)

Akademija, 2018

SANTRUMPOS

ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenztiazolin-6-sulfono rūgštis) (angl. *2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)*)
ESC	Efektyvioji skysčių chromatografija
FRAP	Geležies redukcijos antioksidacinė galia (angl. *Ferric reducing antioxidant power*)
IAA	Indėlis į antioksidacinį aktyvumą
KSP	Kamieno skerspjūvio plotas
LAMMC SDI	Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centro filialas Sodininkystės ir daržininkystės institutas
Pro-Ca	Kalcio proheksadionas
SM	Sausoji masė
TE	Trolokso ekvivalentas
TPTZ	2,4,6-tripiridil-s-triazinas
PTFE	Politetrafluoretilenas
v/v	Tūrių santykis

ĮVADAS

Žemės ūkio produktų rinka vis labiau tenkina vartotojų poreikius. Sodininkystei irgi kilo poreikis valdyti vaisių pateikimo vartotojui procesus, kuriais siekiama optimizuoti kokybę, tiekti rinkai tam tikrus kokybės rodiklius atitinkančius vaisius. Obuoliai yra vieni iš labiausiai pasaulyje vartojamų vaisių, tačiau iki šiol jų auginimo ir obelų sodų priežiūros technologijų vystymas buvo nukreiptas į didesnį derlių ir išorinę vaisių kokybę (dydį bei spalvą), kuri yra patraukli vartotojams (Hooge et al., 2017). Naminės obels (*Malus* × *domestica* Borkh.) vaisių kokybė priklauso nuo genotipo, genų raiškos pokyčių vaisių augimo ir vystymosi metu, aplinkos klimato sąlygų, technologinių priemonių taikymo derančio sodo priežiūros metu, derliaus nuėmimo laiko, vaisių laikymo sąlygų ir kt. Nuskintų vaisių kokybė negerėja, geriausiu atveju pavyksta tik ją išlaikyti, kol obuoliai pasiekia galutinį vartotoją. Siekiant garantuoti norimą vaisių kokybę, svarbu atsižvelgti į vaismedžių genetinę kilmę, vaisių augimo ir vystymosi fiziologijos ir aplinkos veiksnių aspektus.

Technologinių ir biologinių elementų kompleksas soduose – poskiepiai, veislės, poskiepių – įskiepių deriniai, sodo konstrukcijos, derėjimo, vaisių krūvio ir produktyvumo kontrolė – lemia vaismedžių derėjimo pradžią ir pastovumą, derliaus dydį ir vaisių kokybę (Lakso et al., 1997; Robinson et al., 2008; Kviklys ir kt., 2012). Nustatyta, kad netinkamas technologinių priemonių sodo priežiūros metu taikymas, nepalankūs gamtiniai ar antropogeniniai veiksniai, gali sukelti stresinę vaismedžių būseną ir turėti lemiamą įtaką galutiniams sodo produktyvumo rodikliams, vaisių kokybei ir maistinei vertei (Lauri et al., 1997; Tustin et al., 2012; Robinson et al., 2014).

Paskutiniu metu daugiau dėmesio pradėta skirti, ne tik išorinei, bet ir vidinei vaisių kokybei, t.y. cheminei sudėčiai, antioksidacinėms ir antiradikalinėms savybėms ir pan. Obuoliai turi daug maistinių medžiagų ir įvairių bioaktyviųjų junginių. Fenoliai, kaip vienas iš tokių junginių grupių, buvo ištirti ir Lietuvoje vykdytuose tyrimuose, kuriuose buvo tiriama obelų mitybos poveikio (Lanauskas ir kt., 2017) ir poskiepių (Kviklys ir kt., 2014) įtaka vaisiuose susikaupiantiems fenoliniams junginiams. Fenolinių junginių kokybinė ir kiekybinė sudėtis buvo ištirta Lietuvoje auginamuose verslinių veislių obelų vaisiuose (Liaudanskas ir kt., 2015a; Raudonė ir kt., 2017). Tačiau intensyviuose obelų soduose naudojamų įvairių technologinių priemonių ir biologinių veiksnių įtaka fenolinių junginių kaupimuisi obuoliuose tyrinėta mažiau arba visai netyrinėta nei Lietuvoje, nei visame pasaulyje. Kitų bioaktyviųjų metabolitų (pvz. triterpenų) obuoliuose tyrimų yra atlikta dar mažiau.

Nauji obuolių mitybinės ir farmakologinės vertės nustatymo tyrimai ypač svarbūs, kai susiduriama su pertekliniu obuolių auginimu pasaulio rinkoje ir vaisių kainų mažėjimu. Nauji moksliniai rezultatai gauti taikant šiuolaikines sodų priežiūros technologijas, darančias poveikį vaisių kokybės parametrams, gali žymiai padidinti obuolių vartojimą.

Hipotezė. Tikėtina, jog, taikant įvairias technologines verslinių obelų sodų priežiūros priemones (vaisių krūvio, obelų konkurencinės įtampos ir augumo reguliavimą) bei atsižvelgiant į obels genotipą, vaisių augimo vietą vainike ir geografinę vaismedžių augimo vietą, galima kontroliuoti ir tikslingai reguliuoti obels vaisių fizikinius rodiklius, cheminę sudėtį bei bioaktyviųjų junginių sintezę ir užauginti geresnės maistinės vertės vaisius.

Tyrimų tikslas. Įvertinti technologinių sodo priežiūros priemonių, vaisių augimo vietos vainike bei geografinės vaismedžių augimo vietos įtaką naminės obels (*Malus x domestica* Borkh.) vaisių bioaktyviųjų junginių sintezei, fiziko-cheminiams ir fiziologiniams rodikliams.

Tyrimų uždaviniai

1. Ištirti, kaip vaisių krūvio, obelų konkurencinės įtampos bei augumo reguliavimas, vaisių vieta vainike bei geografinė augimo vietovė lemia obels vaisių spalvos, tvirtumo, masės bei kvėpavimo rodiklius.
2. Nustatyti taikomų technologinių priemonių, vaisių vietos vainike bei vaismedžių geografinės augimo vietos įtaką obels vaisių cheminei sudėčiai (bendram cukrų kiekiui, titruojamajam rūgštingumui, tirpioms sausosioms ir sausosioms medžiagoms, vitamino C, fruktozės, sacharozės, gliukozės, sorbitolio ir obuolių rūgšties kiekiui).
3. Nustatyti ir įvertinti biologinių veiksnių (vaisių vietos vainike bei vaismedžių geografinės augimo vietos) ir naudotų technologinių priemonių dėsningumus obels vaisiuose besikaupiančių fenolinių junginių kokybinei ir kiekybinei sudėčiai, įvertinti šių individualių fenolinių junginių indėlį į bendrą antioksidacinį aktyvumą.
4. Ištirti ir įvertinti technologinių sodo priežiūros priemonių ir biologinių veiksnių įtaką obels vaisiuose esančių triterpeninių junginių kokybinei ir kiekybinei sudėčiai.

Ginamieji teiginiai

1. Reguliuojant vaisių krūvį ir vaismedžių konkurencinę įtampą, atsižvelgiant į vaisių augimo vietą vainike, geografinę vaismedžių augimo vietą bei veislės genotipą, galima padidinti obels vaisių tvirtumą, masę, sumažinti kvėpavimo intensyvumą.
2. Įvertinant vaisių augimo vietą obels vainike, geografinę vaismedžių augimo vietą bei veislės genotipą, galima paveikti obels vaisių cheminę sudėtį (cukrų, tirpių sausųjų ir sausųjų medžiagų bei rūgštingumo kiekius), o reguliuojant vaisių krūvį bei vaismedžių augumą – ir cukrų sudėtį.

3. Obels vaisių krūvio, vaismedžių augumo ir konkurencinės įtampos reguliavimas, vaisių augimo vieta vainike bei geografinė vaismedžių augimo vieta skatina arba slopina įvairių fenolinių bei triterpeninių junginių kaupimąsi vaisiuose.

Mokslinis naujumas.

1. Pirmą kartą kompleksiškai įvertinta vaisių krūvio, vaismedžių augumo bei konkurencinės įtampos reguliavimo bei vaisių augimo vietos vainike, įtaka vaisių vidinės kokybės rodiklių raiškai.
2. Praplėstas antrinių metabolitų tyrimų spektras obuoliuose – pirmą kartą taikant technologines sodo priežiūros priemones nustatyti triterpeninių junginių kaupimosi dėsningumai – didžiausią poveikį bendram triterpeninių junginių kiekiui obels vaisiuose turėjo veislės genetinė kilmė ir geografinė vaisių augimo vieta, o betulino rūgšties kiekiui – vaismedžių augumo reguliavimas.
3. Pirmą kartą įvertinta geografinės vaismedžių augimo vietos įtaka vaisių kokybės parametrams bei bioaktyviųjų junginių kaupimuisi obels vaisiuose ir nustatyta, jog vaisių kokybę lemia geografinė vaismedžių augimo vieta: šiauriau užaugę obelų vaisiai sukaupia daugiau bioaktyviųjų junginių.

Praktinė darbo reikšmė. Naujais aspektais įvertintos pagrindinės technologinės priemonės šiuolaikiniuose intensyviuose obelų soduose – sodinimo sistemos, derliaus normavimas, vaismedžių augumo reguliavimas – yra labai svarbios verslinei sodininkystei, ypač kai užauga perteklinis obuolių derlius. Šie tyrimai vertingi ir farmakologine prasme, nes darbe tirti junginiai turi įtakos ir sveikatinančiajam, farmakologiniam poveikiui. Darbo tema parengta rekomendacija, tyrimų rezultatai jau diegiami pramoniniuose Lietuvos obelų soduose.

Tyrimų rezultatų aprobavimas. Disertacijos tema paskelbti 7 straipsniai: 4 straipsniai leidiniuose, referuojamuose ir turinčiuose citavimo indeksą duomenų bazėje „Clarivate Analytics Web of Science“ ir 3 publikacijos paskelbtos recenzuojamuose leidiniuose be citavimo indekso. Pagrindiniai disertacijos rezultatai ir teiginiai pristatyti 8 Lietuvos ir tarptautinėse konferencijose (4 žodiniai ir 4 stendiniai pranešimai) bei 4 konferencijų santraukų leidiniuose.

Darbo struktūra ir apimtis. Disertacija parašyta lietuvių kalba, jos apimtis 217 puslapių. Ją sudaro santrauka anglų kalba, įvadas, literatūros analizė, tyrimų sąlygos ir metodai, tyrimų rezultatai, išvados, literatūros ir mokslinių publikacijų disertacijos tema sąrašai. Disertacijoje yra 16 paveikslų, 55 lentelės, naudoti 292 literatūros šaltiniai.

1. LITERATŪROS ANALIZĖ

1.1. Obels vaisių krūvio reguliavimas

Obels vaisių krūvio reguliavimas yra pagrindinė priemonė norimai vaisių kokybei, susijusiai su keliamais rinkos reikalavimais, valdyti. Informacija apie obels vaisių krūvio bei derliaus kiekio reguliavimą ir vaisių brandą skynimo metu yra ypač svarbi augintojams, siekiant išlaikyti optimalų derliaus ir norimos vaisių kokybės santykį. Vaisių krūvis paprastai yra apibrėžiamas santykiu tarp vaisių kiekio ir lapų ploto, santykiu tarp vaisių kiekio ir kamieno skerspjūvio ploto (KSP) arba vainiko tūrio. Vaisių kiekis vaismedžiuose turi didelį poveikį šių vaismedžių fotosintezės veiklai ir augimui ateinančiais metais (Byers, 2003). Vaisių krūvio reguliavimo (retinimo) laikas ir intensyvumas, keičiant vaismedžio vaisių ir lapų santykį, yra plačiai tyrinėjamas jau daug metų. Šiais tyrimais siekiama padidinti vaismedžių produktyvumą, išlaikant optimalų vaisių dydį ir kokybę, ir valdyti vaismedžių derėjimo periodiškumą. Optimizuotas vaisių krūvis, atsižvelgiant į auginamas veisles, sodinimo sistemas, aplinkos veiksnius ir kt., gali padidinti finansinę grąžą vaismedžių augintojams (Treder, 2010). Obels žiedų ar užuomazgų retinimas yra būtina sąlyga norint subrandinti aukštos kokybės, veislei būdingo dydžio ir spalvos obels vaisius (Blanke, 2006), turinčius geresnes skonio savybes (cukrų ir rūgščių kiekis bei jų santykis), pakankamai transportabilius ir ilgai išsilaikančius.

Aplinkos veiksniai, darantys įtaką obels vaisių krūviui. Abiotiniai veiksniai iš esmės daro įtaką vaisių derliui ir kokybei, ypač svarbi yra šviesa ir aplinkos temperatūra. Saulės šviesos kiekis ir vyraujančios temperatūros skiriasi nuo geografinės vietovės klimato sąlygų. Potencialiai didesnį sodų derlių lemiantys veiksniai yra vidutinė aplinkos temperatūra, saulėtų valandų skaičius ir ilgas vegetacijos laikas. Šviesa yra svarbiausias veiksnys, reguliuojantis vaismedžio fotosintetinį potencialą, todėl reguliuojant vaisių krūvį ant vaismedžio reikia atsižvelgti į sodo apšvietimo sąlygas.

Šaltos žiemos, pavasario šalnos ir žemos pavasario temperatūros turi didelį neigiamą poveikį būsimam obelų vaisių krūviui, kuris savo ruožtu lemia būsimą derlių. Obels vaismedžiai yra jautriausi temperatūros pokyčiams žydėjimo ir ankstyvojoje vaisių augimo stadijose (Palmer et al., 2003). Šaltis žydėjimo laikotarpiu gali stipriai pažeisti žiedus ir taip gerokai sumažinti vaisių derlių. Lakso (1994) ir Warrington ir kiti (1999) nustatė, kad temperatūros pokyčiai vaisių augimo laikotarpiu, ypač ląstelėms dalijantis tuoj pat po žydėjimo, neigiamai veikia potencialų vaisių dydį.

Streso poveikį obelų augimui ir vystymuisi dėl vandens trūkumo, kai nepatenkinami vaismedžio vandens poreikiai, gana plačiai tyrė daugelis mokslininkų (Landsberg, Jones, 1981; Jones et al., 1985; Lakso, 1994; Behboudian, Mills, 1997). Augaluose vykstantys fiziologiniai procesai, susiję su augimu dalijantis ląstelėms, yra labai jautrūs vandens trūkumui. Jis, priklausomai nuo jo dydžio ir trukmės, gali sumažinti žiedų skaičių, vaisių augimo tempą, vaismedžio derlingumą, vaisių kokybę (Lakso, 1994). Vandens deficitas vėlesniuose vaismedžio augimo tarpsniuose turi mažesnį neigiamą poveikį vegetatyviniam

obelų augimui ir vaisių derliui, tačiau gali slopinti vaisių augimą, dėl to sumažėja patys vaisiai (Behboudian, Mills, 1997).

Vaismedžių augimas ir vaisių dydis bei kiekis taip pat priklauso nuo angliavandenių apykaitos tarp fotosintetinančių lapų bei kitų vegetatyvinių ir generatyvinių augalo organų (Flore, Lakso, 1989; Lakso, 1994). Angliavandenių paskirstymas į augančius vaisius turi didelę reikšmę tolesniam vaisių krūviui ant vaismedžio bei pačių vaisių kokybei. Pagrindinius obelų angliavandenių išteklius suvartoja vaisiai, todėl nuo vaisių krūvio, žydėjimo laiko, žiedų padėties ant šakų ir vaismedžio priklauso vaisių augimas (Callesen 1988; Palmer et al., 1997; Ferree et al., 2001). Mažesnis vaisių krūvis didina angliavandenių prieinamumą, taigi dėl sukaupiamo didesnio tirpių sausųjų medžiagų kiekio didėja vaisių augimo greitis ir vaisių masė (Klages et al., 2001; Greer et al., 2002). Šie vaisių krūvio ir vaisių augimo bei dydžio dėsningumai yra išsamiai aprašyti mokslinėje literatūroje (Assaf et al., 1982; Erf, Proctor, 1987; Forshey, Elfving, 1989; Koike et al., 1990; Jones et al., 1997; Palmer et al., 1997; Wünsche et al., 2000). Žiedų retinimas 5–35 % padidina obuolių ląstelių skaičių ir 4–10 % – pačių ląstelių dydį. Asimiliatų tiekimo apribojimas, kai angliavandenių kiekis vaisių vystymosi metu yra nepakankamas (pvz., kai vaisių krūvis yra didelis), slopina ląstelių susidarymą užuomazgose, skatina užuomazgų kritimą ir taip pat nulemia mažesnę vaisiaus masę. Šie aspektai yra visapusiškai ištirti daugelio mokslininkų (Schneider, 1977; Ferree, Palmer 1982; Kondo, Takahashi, 1987; Lakso et al., 1989; Byers et al., 1991; Lakso, Corelli-Grappadelli, 1993).

Obelys formuoja daug žiedų, tačiau vėliau jų negali aprūpinti reikalingomis mitybinėmis medžiagomis iki visiškos vaisių brandos. Sodininkystės praktikoje, siekiant pagerinti vaisių kokybę ir padidinti vaismedžių produktyvumą bei pagerinti vaisių kokybę, dažnai taikomas derliaus normavimas pašalinat dalį žiedų ar užuomazgų. Optimaliam derliui išauginti obelims yra būtini apie 7 % žiedų (Untiedt, Blanke, 2001). Vaismedžiai dažnai užmezga per daug vaisių, todėl atsiranda poreikis taikyti efektyvius vaisių krūvio reguliavimo metodus. Vienas vaisių krūvio reguliavimo pranašumų yra tas, jog sumažinamas vaisių kiekis, tačiau tokiu būdu didinama vidutinė vaisių masė ir pasiekiama tinkama rinkai vaisių kokybė (Forshey, Elfving, 1977; Palmer et al., 1997). Kitas vaisių krūvio reguliavimo pranašumas yra tas, jog skatinama žiedinių pumpurų indukcija. Tai garantuoja pastovų kasmetį derlių (McArtney et al., 1996; Tromp, 2000; Neilsen, Dennis, 2000; Hampson, Kemp, 2003). Vaisių kiekio mažinimas vaismedyje iš esmės didina lapų ploto ir vaisių santykį, todėl daugiau asimiliatų tenka likusiems vaisiams. Obels vaisių krūvis gali būti reguliuojamas taikant cheminius preparatus (hormoninius augimo reguliatorius), nudeginant žiedus trąšomis ar retinant rankomis.

Obels vaisių vystymasis. Reguliuojant vaisių krūvį yra optimizuojamas vaisių dydis, tačiau tai sąlygoja mažesnį kiekybinį derlių. Santykinai mažas vaisių krūvis ant vaismedžio lemia maksimalų veislės ir poskiepio genetiškai nulemtą vaisių dydį.

Anksti retinant didelius vaisius vedančių veislių obelis, kad vaisiai neperaugtų, paliekamas didesnis vaisių kiekis žiedyne. Dėl subalansuoto retinimo vaisiai vienodžiau vystosi, todėl sumažėja mažų ir didelių vaisių proporcija ant vaismedžio (Link, 2000).

Birželinis užuomazgų kritimas (angl. *June-drop*) priklauso nuo pradinio vaisių krūvio ant obels ir gali vykti dėl angliavandenių trūkumo vaisių augimo metu, ypač esant didesniam vaisių krūviui ankstyvajame vaisių raidos etape. Wünsche ir Palmer (1997), atlikdami tyrimą, obelų žiedus išretino palikdami 540, 310 ir 180 vnt. ant vaismedžio. Rezultatai parodė, kad skirtinguose variantuose subrendusių vaisių kiekis ant vaismedžio buvo atitinkamai 340, 260 ir 160 vnt. Nustatyta, jog labiausiai vaisių kiekis sumažėjo esant didžiausiam vaisių krūviui.

Vaisių masė skynimo metu paprastai atvirkščiai koreliuoja su vaisių krūviu: masė didžiausia tada, kai vaisių krūvis mažiausias, t. y. kai yra mažiausia konkurencija tarp pačių vaisių, kai yra didžiausias vaismedžio lapų ir vaisių skaičiaus santykis (Hansen, 1969; Palmer et al., 1997). Wünsche ir Palmer (1997), Wünsche ir kitų (2000) atlikti tyrimai parodė, jog dėl žiedų retinimo paliekant mažą vaisių krūvį ‘Braeburn‘ obelų veislės vaisiai buvo 50 % sunkesni, palyginti su vaisiais tų vaismedžių, ant kurių buvo palikta daugiau žiedų.

Obels vaisių kokybė. Vaisių krūvio įtakos organoleptiniams vaisių kokybės parametrams (tirpių sausųjų medžiagų kiekiui, rūgštingumui ir vaisių tvirtumui) tyrimų rezultatai yra prieštaringi. De Salvador ir kiti (2006) ir Meland (2009) tyrimai rodo, jog tirpių sausųjų medžiagų kiekio, rūgštingumo ir vaisių minkštimo tvirtumo parametrai didėja didėjant vaismedžio vaisių krūviui. Šiuo tyrimu nustatyti vaisių minkštimo tvirtumo rezultatai sutampa ir su anksčiau atliktų tyrimų rezultatais, kurie rodo, jog vaisiaus minkštimo tvirtumas neigiamai koreliuoja su vidutine vaisiaus mase (Johnson, 1994). Kitų mokslininkų tyrimai rodo priešingą tendenciją – didelis vaisių krūvis (daugiau negu 10 vaisių/KSP) sąlygojo mažesnį vaisių nusispalvinimą, tvirtumą, rūgštingumą bei mažesnę tirpių sausųjų medžiagų ir krakmolo sintezę (Robinson, Watkins, 2003). Esant dideliam vaisių krūviui, vaisiai gali mažiau nusispalvinti dėl sumažėjusio asimiliatų kiekio, tenkančio kiekvienam vaisiui. Šiai išvadai pritaria ir Wright su kolegomis (2006). Kitų mokslininkų tyrimų rezultatai rodo, jog vaisių krūvio reguliavimas neturi įtakos vaisių kokybės parametrams: vaisių tvirtumui (Castro et al., 2015), tirpių sausųjų medžiagų kiekiui bei rūgštingumui (Radivojevic at al., 2014). Remiantis tokiais prieštaringais rezultatais, galima teigti, kad, norint išauginti optimalų obuolių derlių, svarbiausia yra nustatyti optimalų vaisių krūvį vaismedžiui, atsižvelgiant į veislės ir poskiepio genotipą, geografinės vietovės klimato sąlygas, atskirų metų meteorologines sąlygas, naudojamas technologines priemones sodo priežiūros metu ir kt.

Vaisių krūvio reguliavimas turi įtakos besikaupiančio vaisiuose kalcio ir kalio kiekiams, tačiau magnio kiekio vaisiuose reikšmingai neveikia (Ferguson, Watkins, 1992). Pastebėta, jog vaismedžiai, kurių vaisių krūvis mažas, veda didesnius vaisius su mažesniu kalcio, bet didesniu kalio kiekiu. Tai kelia didesnę vaisių fiziologinių pažeidimų, susijusių

su kalcio trūkumu, riziką. Ferguson ir Watkins (1992) nustatė, jog vaisiuose, skintuose nuo vaismedžių, kurių vaisių krūvis didelis, kalcio ir kalio santykis buvo didesnis. Yra žinoma, jog dėl didesnio kalio ir mažesnio kalcio kiekio obuoliai anksčiau sunoksta, trumpėja jų laikymosi trukmė.

Fenoliniai junginiai yra naudingi žmogaus organizmui dėl jų antioksidacinių savybių, o obuoliai yra geras šių junginių šaltinis (Eberhardt et al., 2000; Wolfe et al., 2003; Sun, Liu, 2008; Liu et al., 2009). Obuolių minkštime ir odelėje kaupiasi skirtingi fenolinių junginių kiekiai (Raudonė ir kt., 2017). Odelėje fenolinių junginių koncentracija kelis kartus didesnė nei minkštime, taip pat odelėje randama flavonoido kvercetino glikozidų, kurių nėra minkštime (Awad et al., 2000; Wolfe et al., 2003; Chinnici et al., 2004; Łata, Tomala, 2007; Drogoudi et al. 2008). Nustatyta, kad auginamos vienodomis sąlygomis skirtingų veislių obelys vedė vaisius, kuriuose fenolinių junginių sudėtis buvo itin skirtinga (Lee et al. 2003; Tsao et al., 2003; Łata, Tomala, 2007; Drogoudi et al., 2008; Wojdyło et al., 2008; Vieira et al., 2009). Auginant perdirbti skirtus vaisius, fenolinių junginių kiekį taip pat reikėtų įvertinti. Dėl stiprios fenolinių junginių reakcijos su taninais bei makromolekulėmis, tokiomis kaip baltymai ir polisacharidai, fenoliai skatina nuosėdų susidarymą ir daro įtaką sulčių skaidrumo parametrams (Siebert et al., 1996).

Awad ir kiti (2001b) nustatė, kad tuo atveju, kai vaisių kiekis vaismedyje kito nuo 50 iki 200 vnt., chlorogeno rūgšties koncentracija ir bendras flavonoidų kiekis vaisiuose nesiskyrė. Tačiau Stopar ir kiti (2002) nustatė, jog vaismedžio vaisių krūvio mažinimas nuo 157 iki 30 vnt. skatino didesnį bendro polifenolių kiekio kaupimąsi obuoliuose nuo 1 300 iki 1 680 mg kg^{-1}, atitinkamai. Bendro polifenolių kiekio skirtumus vaisiuose sąlygojo sukaupti didesni atskirų junginių – chlorogeno rūgšties, katechino ir epikatechino – kiekiai.

Reguliuojant vaisių krūvį, galima sudaryti tolygesnį visų vaismedžio vaisių apšvietimą. Tai lemia didesnę antocianinų kiekio sintezę vaisiuose (Awad et al., 2000; Jakopic et al., 2009). Saulės apšviestoje vaisiaus vietoje (raudonos spalvos odelė) susikaupia didesni kvercetino ir cianidino glikozidų kiekiai (Arakawa et al., 1999; Awad et al., 2001a, b; Jakopic et al., 2009; Ju et al., 1996; Wang et al., 1997).

Taigi, nors tyrimų šia tema atlikta daug, tačiau, mūsų žiniomis, tyrimų, kuriuose kompleksiškai būtų įvertinta obels vaisių krūvio reguliavimo vaismedžiuose įtaka cheminei sudėčiai ir bioaktyviųjų junginių kaupimuisi vaisiuose, atlikta dar nebuvo.

1.2. Obels vaisių augimo vietos vaismedžių vainike įtaka vaisių kokybei

Obels vaisių vieta vaismedžio vainike apsprendžia vaisių išorinę ir vidinę kokybę dėl mikroklimato kaitos vainiko viduje, kas savo ruožtu sąlygoja skirtingus biocheminius procesus vaismedyje ir vaisiuose (Robinson et al., 1983; Morales et al., 2000). Obels vaisiai iš išorinės vainiko dalies sukaupia daugiau cukrų, tirpių sausųjų ir sausųjų medžiagų (Feng et al., 2014). Šie vaisiai taip pat yra saldesni, o tai palankiai vertina vartotojai. Išorinėje vainiko dalyje esantys vaisiai gauna žymiai didesnį saulės radiacijos kiekį, palyginus su vaisiais iš vainiko vidaus, tačiau tokie vaisiai yra labiau pažeidžiami temperatūros ir šviesos

sukeliamų defektų (Janssen et al., 1998). Vaisiai esantys išorinėje vainiko dalyje, nuo tokių sąlygų apsisaugo reguliuodami antocianinų, karotinoidų, askorbo rūgšties ir fenolinių junginių sintezę odelėje, siekiant sumažinti reaktyvių deguonies rūšių žalą fotosintetinančioms augalų ląstelėms (Ma, Cheng, 2003). Vainiko vietos įtaka vaisių odelės pigmentacijai gali turėti tiek teigiamą tiek neigiamą poveikį, priklausomai nuo veislės.

Vainiko mikroklimatas. Sausųjų medžiagų kaupimasis ir sudėtis vaisiuose kinta priklausomai nuo vaismedžio vainike gaunamo šviesos kiekio (Coombs et al., 1985). Tai gali turėti didelę reikšmę įvairiems obuolių kokybės aspektams. Vaismedžio vainiko mikroklimatas (šviesa, temperatūra, vėjo greitis, drėgmė) priklauso nuo lapų kiekio ir pasiskirstymo vainike ir jų sąveikos su supančios aplinkos klimatu (Smart, 1985). Pagrindiniai du rodikliai, kurie stipriai kinta vainiko viduje, yra šviesa ir temperatūra. Vaismedžio vainiko mikroklimatas kinta nuo vidinės vainiko dalies link išorinės, bei nuo apačios link viršūnės (Sansavini, Corelli, 1992; Morales et al., 2000). Veiksminga šviesos sklaida į vainiko vidų siekia apie 1 metrą ir vaismedžio vainikas vidutiniškai gauna apie 35% saulės šviesos (Jackson, 1970). Vaisiai esantys vainiko viduje gali gauti nuo vos 2% (33 μmol m^{-2} s^{-1}) visos saulės šviesos, iki 54% (962 μmol m^{-2} s^{-1}), išorinėse vainiko dalyse (Fouché et al., 2010). Vaisių odelės temperatūra iš viršutinės vainiko dalies vidutiniškai būna 5 °C aukštesnė, negu vaisiuose iš vidinės vainiko dalies, kuri būna lygi aplinkos temperatūrai (Fouché et al., 2010). Be to, vaisiams tenkančios saulės šviesos kiekis taip pat priklauso nuo įvairių vaismedžio vainiko formų, plyšių vainikuose ir kitų šviesos sklaidą lemiančių veiksnių (Grant, 1997).

Aktyvi fotosintezė lapuose tiesiškai priklauso nuo saulės šviesos, kol pasiekiama 50% (600-1200 μmol m^{-2} s^{-1}) pilnos saulės šviesos, o didesnis šviesos kiekis jau yra perteklinis ir tai trukdo normaliai lapų funkcijai. Esant labai dideliam apšvietimui, pertekliniai fotonai gali būti sulaikyti lapuose, kas sukelia fotokvėpavimą ir fotoinhibiciją, kuomet padidėja grynojo anglies kiekis, o tai kenkia fotosintezės funkcijai (Asada, 1999). Didelis šviesos srautas (didelė UV radiacija) ir aukšta temperatūra vaismedžių viršūnėje sukelia vaismedžio stresą bei kenksmingą reaktyviojo deguonies rūšių susidarymą (Foyer et al., 1994; Janssen et al., 1998). Tai kenkia augalų ląstelėms, nes gali pažeisti fosfolipidines membranas, baltymus ir nukleino rūgštis (Alscher et al., 1997). Tačiau vaisiai turi mechanizmą, kurie gali sumažinti šių žalingų aplinkos veiksnių poveikį. Askorbato-glutationo ciklas (Demmig-Adams, Adams, 1992) ir ksantofilinis ciklas (Gilmore, 1997) atlieka svarbią foto-apsauginę funkciją mažindami oksidacinį stresą, kurį sukelia per didelė sužadinimo energija ir reaktyvusis deguonis stipriai apšviestoje aplinkoje. Saulės apšviesta obuolių odelė iš išorinės vainiko dalies prisitaiko prie didesnio apšvietimo didinant fermentų aktyvumą ksantofiliniame ir askorbato-glutationo cikluose, kad išsklaidytų perteklinę šviesą ir reaktyvųjį deguonį (Ma, Cheng, 2003). Fenoliniai junginiai daugiausia kaupiasi augalų epidermio sluoksniuose ir apsaugo ląsteles nuo pernelyg didelės UV-B spinduliuotės, absorbuodama šviesą šioje UV-B srityje, tačiau praleidžiančią fotosintezei reikalingus bangos ilgius (Solovchenko, Merzlyak, 2003). Viena pagrindinių antocianinų funkcijų, išskyrus vaisiams suteikiamą

raudoną spalvą, yra foto-apsauga (Steyn et al., 2009). Tai pasiekiama apsaugant chlorofilą nuo foto-inhibitorių, veikiant kaip selektyviam ekranui nuo perteklinės mėlynos ir žalios šviesos (Smillie, Hetherington, 1999). Antocianinai taip pat gali sumažinti reaktyviojo deguonies sukeltą oksidacinę žalą (Hatier, Gould, 2009). Fenoliai yra svarbūs augalų apsaugai, nes jie stipriai sulaiko UV spinduliuotę (Krauss et al., 1997). Fenoliai, esantys obuolių odelėje filtruoja tiek UV-A tiek UV-B spindulius, prieš jiems pasiekiant epidermines ir hipodermines ląsteles (Solovchenko, Merzlyak, 2003).

Produktyvumas. Gerai prižiūrimuose soduose, vaisių derlius tiesiškai priklauso nuo gaunamos šviesos kiekio (Monteith, 1977). Vaisių kokybė taip pat priklauso nuo gaunamos šviesos kiekio bei šviesos pasiskirstymo pačiame vainike (Palmer, 1989; Robinson et al., 1983; Sansavini, Correlli, 1992). Šiam tikslui pasiekti soduose yra naudojamos įvairios technologinės priemonės, tokios kaip vaismedžių eilių išdėstymo kryptis, parinkta optimali sodo konstrukcija, atsižvelgiant į veislės ir poskiepio derinio augumą, priklausomai nuo vaismedžių augumo ir derėjimo pobūdžio ypatumų parinkta ir įdiegta optimali vaismedžių formavimo bei genėjimo sistema (Jackson, 1980; Lakso, 1994; Wagenmakers, Wertheim 1991). Šešėlis, krentantis ant lapų ir vaisių, turi neigiamą įtaką vaismedžių produktyvumui (Bepete, Lakso, 1998). Vainiko apšvietimo ribojimas iki 35% penkias savaites po pilno žydėjimo stipriai sumažina įvairių asimiliatų kiekį vaisiuose (Corelli et al., 1994). Tačiau vaisiams pasiekus brandą, toks saulės šviesos apribojimas sumažina odelės pažeidimų skaičių, tokių kaip saulės nudeginimai (Schrader et al., 2003; Gindaba, Wand, 2005).

Vaisių augimo vieta vaismedžio vainike ir vaisių kokybė. Derliaus nuėmimo metu obuolių vizualinė kokybė – vaisių dydis ir spalva, skoninės savybės – cukrų ir rūgščių kiekis bei jų santykis ir vaisių tvirtumas bei tekstūra gali stipriai skirtis tiek tarp atskirų vaismedžių, tiek paties vaismedžio viduje (Johnson, Ridout, 2000).

Vaisių išvaizda ir tvirtumas. Vieta vaismedžio vainike daro įtaką obuolių išvaizdai dėl apšvitos lygio, kas turi įtakos įvairių pigmentų kaupimuisi vaisiaus odelėje. Šviesa yra svarbus veiksnys chlorofilo sintezei vaisių vystymosi pradžioje (Gorski, Creasy, 1977). Vaisiams nokstant, didelis šviesos radiacijos kiekis lemia chlorofilo skylimą į karotenoidus (Felicetti, Schrader, 2008). Mažesnio intensyvumo šviesa ankstyvojo vaisiaus vystymosi tarpsniuose lemia šviesiai žalius vaisius (Fouché et al., 2010; Hirst et al., 1990). Karotenoidų koncentracija vaisiuose didėja kartu didėjant šviesos intensyvumui bei temperatūrai (Ma, Cheng, 2004; Chen et al., 2008). Vaisių vietos vaismedžių vainike ir chlorofilo bei karotenoidų kaupimosi juose dėsningumai yra prieštaringi. Jakopic ir kiti (2009) nustatė, jog vieta vaismedžio vainike neturi įtakos chlorofilo ir karotenoidų kiekiui vaisiuose, tačiau Ma ir Cheng (2003) nustatė, jog jie iš išorinės vainiko dalies turėjo mažesnį chlorofilo bet didesnį karotenoidų kiekius. Didelis šviesos intensyvumas padidino karotenoidų kiekį ‘Fuji’ ir ‘Delicious’ veislės obuoliuose, tačiau veislėje ‘Granny Smith’ tokio dėsningumo nenustatyta (Felicetti, Schrader, 2009). Didesnis šviesos kiekis ir žemesnės temperatūros skatina antocianinų sintezę obuolių odelėje (Saure, 1990; Steyn et al., 2005). Obuolių odelė iš saulės apšviestos pusės sukaupia daugiau antocianinų negu vaisiai, iš vainiko vidaus

(Awad et al., 2001a; Jakopic et al., 2009). Tokia pati tendencija pastebima ir su kitais vaisiais, pvz. persikais (Lewallen, Marini, 2003). Obuoliai iš vainiko išorės taip pat yra labiau pažeidžiami saulės nudegimų, kuomet vaisių odelė vietomis paruduoja dėl didelių temperatūrų ir didelio šviesos kiekio. Tokie nudegimai atsiranda odelės temperatūrai pasiekus 46 ºC – 49 ºC tiesioginėje saulės šviesoje (Schrader et al., 2003). Odelės nekrozė pasireiškia dėl didelio karščio (52 ºC), kuomet žūsta epiderminės ir subepiderminės ląstelės. Foto-oksidacinės dėmės vaisių odelėje gali atsirasti ir žemesnėje nei 30 ºC temperatūroje, kuomet šešėlyje esantis vaisius staiga ir stipriai apšviečiamas.

Kai kurių šaltinių teigimu, šviesos poveikis ir vaisių vieta vaismedžio vainike vaisių tvirtumui įtakos neturi (Seeley et al., 1980). Tačiau kitų mokslininkų tyrimai rodo, jog šviesa turi atvirkštinį ryšį su vaisių tvirtumu dėl vaisių brandos ir dydžio (Robinson et al., 1983).

Cukrūs ir rūgštys. Didesnis kiekis saulės šviesos vaismedžių lapuose padidina foto-asimiliatų sintezę (Johnson, Lakso, 1986). Sorbitolis ir sacharozė yra pagrindiniai fotosintezės produktai ir pereinamieji cukrūs obuoliuose (Zhou et al., 2006). Vaisiuose, sorbitolis yra paverčiamas į fruktozę vykstant sorbitolio dehidrogenazei, o sacharozė metabolizuojama į gliukozę ir fruktozę vykstant invertazei ir sacharozės sintazei. Kaip minėta anksčiau, cukrūs suteikia vaisiams saldų skonį, o cukrų indėlis į bendrą tirpių sausųjų medžiagų sudėti sudaro nuo 56% iki 72% (Fourie et al., 1991). Tirpių sausųjų medžiagų kiekis vaisiuose priklauso nuo gaunamos šviesos kiekio per visą augimo sezoną, šis dėsningumas nustatytas įvairiuose vaisiuose ir uogose: persikuose (Lewallen, Marini, 2003; Feng-li et al., 2008), vyšniose (Flore, Layne, 1999), vynuogėse (Kliewer, Smart 1989), obuoliuose (Tustin et al., 1988; Nilsson, Gustavsson, 2007; Solomakhin, Blanke, 2010). Nustatyta, jog obuolių rūgštingumas priešingai koreliuoja su gaunamu šviesos kiekiu (Robinson et al., 1983). Vaisiai, kurie pažeisti saulės nudegimo, sukaupia didesnius kiekius tirpių sausųjų medžiagų (Schrader et al., 2009), sausųjų medžiagų (Racsko et al., 2005) ir yra tvirtesni už nepažeistus obuolius (Makeredza, 2011).

Mineralinė sudėtis. Mikroklimato skirtumai, kuriuos lemia vaisiaus vieta vainike, gali turėti įtakos mineralinių maistinių medžiagų kaupimui vaisiuose. Vanduo ir mineralai augaluose transportuojami per ksilemą, o transpiracija yra pagrindinė ksilemos srauto varomoji jėga (Jarvis, 1985). Vaisių transpiracija yra svarbus rodiklis ksilemos srauto mineralams, tačiau kitos maistinės medžiagos ir angliavandeniai vaisių augimui yra gaunami iš floemos srauto. Didelis šviesos kiekis ir temperatūra sudaro geras sąlygas trasnpiracijai, o tai turi teigiamos įtakos mineralinių medžiagų patekimui į vaisius (Morandi et al., 2010). Tokie dėsningumai nustatyti ne tik obuoliuose (Haynes, Goh, 1980), bet ir kituose vaisiuose, pvz. kiviuose (Montanaro et al., 2006), mandarinuose (Cronje et al., 2011).

Fenoliniai junginiai ir antioksidacinis aktyvumas. Fenoliniai junginiai yra antriniai metabolitai, išvesti iš fenilanino, arba jo pirmtako - šikimo rūgšties ((3R,4S,5R)-3,4,5-trihidroksi-1-cikloheksen-1-karboksirūgšties) (Taiz, Zeiger, 2002). Fenilalanino amonio liazės – fermento, kuris katalizuoja svarbų reguliavimo žingsnį formuojant fenolinius junginius, aktyvumas labiausiai yra nulemtas šviesos (Takos et al., 2006). Obuolių odelėse

iš išorinės vainiko dalies nustatomi didesni fenolinių junginių kiekiai (Drogoudi, Pantelidis, 2011). Flavonoidų nustatoma daugiausiai vaisiuose, skintuose iš vaismedžių viršūnės (Awad et al., 2001a). Kitų mokslininkų tyrimuose vaisių vieta vaismedžio vainike fenolinių junginių kiekiui įtakos neturėjo (Hagen et al., 2007). Fenoliniai junginiai yra pagrindinis antioksidantas obuoliuose (Lee et al., 2003). Obuoliuose, skintuose iš išorinės vainiko dalies, pastebimas didesnis antioksidacinis aktyvumas (Ma, Cheng, 2004; Drogoudi, Pantelidis, 2011). Šie dėsningumai nustatyti ir askorbo rūgšties kiekiui obuoliuose (Ma, Cheng, 2004). Saulės šviesa vaisiams leido reguliuoti askorbato-glutationo ciklą, kuris yra svarbus askorbo rūgšties susidaryme (Ishikawa et al. 2006). Tačiau askorbo rūgšties kiekiui obuolių minkštime šviesa įtakos neturėjo. Tai gali būti paaiškinta tuo, jog odelėje askorbo rūgšties sintezė vyksta L-galaktozės ir D-galakturono keliais, o minkštime ir sėklose – tik L-galaktozės keliu (Li et al., 2008).

Nors vaisių augimo vietos obels vainike tyrimų atlikta nemažai, tačiau, mūsų žiniomis, tyrimų, kuriuose kompleksiškai būtų įvertinta įtaka šių obuolių cheminei sudėčiai ir bioaktyviųjų junginių kaupimuisi vaisiuose, atlikta dar nebuvo.

1.3. Obelų konkurencinės įtampos reguliavimo ypatumai

Šiuolaikiniuose versliniuose soduose sodinamos pusiau žemaūgės ir žemaūgės obelys dėl jų ankstesnio derėjimo laiko ir patogesnio derliaus nuėmimo bei vaismedžių priežiūros (Uselis, 2001; Barritt et al., 2008; Robinson, 2008). Atsižvelgiant į ekonomines, klimatines ir dirvožemio sąlygas, kiekvienoje šalyje labai svarbu pasirinkti tinkamus veislių ir poskiepių derinius ir sukurti optimalias šiuolaikinių sodų konstrukcijas bei parinkti optimalius vaismedžių sodinimo atstumus. Vaismedžių tankumas, genėjimas ir formavimas daro įtaką fiziologiniams procesams vaismedžiuose, o tai tiesiogiai siejasi su derliumi, vaisių kokybe bei pelnu. (Wünsche, Lakso, 2000). Įvairių mokslininkų tyrimuose nustatyta, jog tankinant vaismedžius sode mažėja derlius iš vieno vaismedžio, tačiau didėja iš ploto vieneto (Barritt et al., 2008; Uselis, 2003). Makosz (1997) teigia, jog Lenkijoje ekonomiškiau auginti sodus, kurių tankumas yra 2000-3000 medžių ha^{-1}, o ne retesnius sodus, kurių tankumas siekia 500-1200 medžių ha^{-1}. Panašios nuomonės yra ir kiti mokslininkai (Groot, 1995; Mika, 1998; Meljnik, Shestopalj, 1998; Klochko, 1999; Kviklys, Kviklienė, 2005; Uselis ir kt., 2006).

Šviesos patekimas į vaismedžio vainiką ir jos įsisavinimas daro poveikį fotosintezės bei kvėpavimo santykiui vaismedyje, o tai turi įtakos ir vaisių kokybei (Zarco-Tejada et al., 2000). Tai plačiau aprašyta šio darbo 1.2. skyrelyje. Konkurencinė įtampa, atsirandanti tankiai susodinus vaismedžius, lemia mažesnę vaisių masę, prastesnį nusispalvinimą bei mažesnį tirpių sausųjų medžiagų kiekį (Doud, Ferree, 1980; Sadowski et al., 2004). Siekiant užauginti geros kokybės vaisius ir gauti optimalų derlių, reikia parinkti tinkamą vaismedžių sodinimo atstumą, atsižvelgiant į veislės ir poskiepio derinio augumą (Wertheim et al., 2001; Maas, Wertheim, 2004). Sodinant vaismedžius įvairiais atstumais, taip pat reikėtų įvertinti ir vainiko formą. Pastaraisiais metais versliniuose soduose, priklausomai nuo veislės ir

poskiepio derinio augumo, vaismedžiai formuojami įvairių modifikacijų verpstės formos vainikais (Uselis et al., 2006).

Per mažas vaismedžių sodinimo atstumas lemia vaismedžių tarpusavio šešėliavimą, o tai daro neigiamą įtaką fotosintezės intensyvumui (Wertheim et al., 2001). Tokią vaismedžių konkurencinę įtampą taip pat rodo ir fluorescensinių rodiklių kitimas bei mažėjantis chlorofilų *a* ir *b* santykis obelų lapuose (Šabajevienė ir kt., 2006). Tokia tendencija pastebėta ir kituose augaluose (Balčiūnas ir kt., 2008). Angliavandenių kaupimasis įvairiose vaismedžių dalyse nusako fiziologinę jų būklę, o vaismedžių tankumas daro įtaką fruktozės, gliukozės ir maltozės pokyčiams pirmamečių ūglių žievėje (Šabajevienė ir kt., 2009). Minėtų mokslininkų tyrime, mažiausias sacharidų kiekis obelyse buvo nustatytas rugpjūčio mėnesį, kuomet sintetinami angliavandeniai, kurie reikalingi augalams augti ir vystytis. Obelų, pasodintų 3 x 0,75 m tankumu, ūglių žievėje sacharidų buvo daugiausia (~14 mg g^{-1}), o tai leidžia daryti prielaidą, jog šie vaismedžiai vaisius maisto medžiagomis aprūpino geriausiai. Tarp vaismedžių, pasodintų 3 x 1,0 ir 3 x 0,5 m atstumu, pasak minėtų mokslininkų, esminių skirtumų nebuvo. Didėjant vaismedžių tankumui, bendras sacharidų kiekis mažėja, o tai gali lemti lėtesnį biomasės kaupimąsi ir mažesnius augumo bei derliaus rodiklius. Gerai derančiame sode derlingiausi buvo rečiausiai (3 x 1,00 ir 3 x 0,75 m) pasodinti vaismedžiai. Vaismedžius sutankinus iki 3 x 0,5 m, pastebėtos jų derlingumo mažėjimo tendencijos. o sutankinus iki 3 x 0,25 m, vaismedžių derlingumas sumažėjo iš esmės (Šabajevienė ir kt., 2009). Tokios tendencijos pastebėtos ir kituose vaismedžiuose (Spann et al., 2008).

Nors sodinimo tankumo tyrimų atlikta daug, tačiau obuolių kokybės parametrai apsiriboja ties komerciniais kokybės reikalavimais: vaisių nusispalvinimu, tvirtumu, išsilaikymu ir pan. Tačiau, mūsų žiniomis, tyrimų, kuriuose kompleksiškai būtų įvertinta obelų konkurencinės įtampos (sodinimo atstumo) įtaka obuolių cheminei sudėčiai ir bioaktyviųjų junginių kaupimuisi vaisiuose, atlikta dar nebuvo.

1.4. Obelų augumo reguliavimas

Obelų vegetatyvinio augimo ir generatyvinio vystymosi kontrolė yra viena iš pagrindinių ir būtiniausių veiklų, atliekamų intensyviame sode. Dažniausiai vegetatyvinis augimas yra pernelyg didelis ir jeigu yra netinkamai kontroliuojamas, jis gali turėti įtakos daugeliui vaisių auginimo aspektų: žiedinių pumpurų formavimuisi, vaisių kiekiui ir kokybei, įvairiems fiziologiniams sutrikimams, kenkėjų kontrolei ir tolimesniam vaisių laikymui po derliaus nuėmimo. Praeityje buvo taikomi įvairūs augimo kontrolės metodai (Miller, 1988; Greene, 2003). Plačiai naudojami žemaūgiai bei nykštukiniai obelų poskiepiai buvo pagrindinė priemonė reguliuojant vegetatyvinį vaismedžių augimą bei generatyvinį vystymąsi, tačiau tai yra tik dalinis sprendimas, siekiant sukontroliuoti intensyvų vegetatyvinį augimą, nes netolygios ir netipiškos klimato sąlygos, šaltis, pramečiavimo tendencijos, įvairios sodinimo klaidos ir kiti veiksniai sukelia situacijas, kuomet reikia papildomų vegetatyvinio augimo kontrolės priemonių. Derliaus normavimo strategijos vaismedžiuose pasirinkimas priklauso nuo daugelio veiksnių – obelų veislės, vaismedžių

amžiaus, derėjimo tendencijų, žydėjimo ir galimo vaisių krūvio, ir, labai svarbu – dėl prognozuojamų oro sąlygų bent keletui dienų po atitinkamos priemonės panaudojimo sode (Greene, 2002). Mūsų darbe buvo taikytos ir įvertintos vaismedžių kamieno įpjovimo, šaknų genėjimo, kalcio proheksadiono panaudojimo ir vasarinio genėjimo priemonės, skirtos kontroliuoti obelų vegetatyvinio augimo ir generatyvinio vystymosi balansą.

Šaknų genėjimas. Stiprios vaismedžių šaknys reikalingos maistinių medžiagų ir vandens įsisavinimui, tačiau perteklinis skeletinių šaknų kiekis tik papildomai apkrauna vaismedžius ir yra nenaudingas (Yang et al., 2009). Tinkamas šaknų genėjimas leidžia sumažinti skeletinių šaknų kiekį ir labiau skatinti aktyviųjų šaknų formavimąsi (Guan et al., 2011). Šaknų genėjimas slopina vegetatyvinį vaismedžių augimą ir skatina žiedinių pumpurų iniciaciją (Yang et al., 2012).

Šaknų genėjimas iš dviejų pusių patikimai pagerina šaknų architektūrą jaunuose obelų soduose. Genėtuose vaismedžiuose didesnis naujų šaknelių (< 1 mm skersmens) ilgis bei jų kiekis rodo pagreitintą naujų šaknų formavimąsi, o sumažėjęs skeletinių šaknų (>2 mm skersmens) ilgis rodo šaknų ploto ir tūrio sumažėjimą (Fang et al., 2017). Šis augalų šaknų formavimas taip pat gali būti kontroliuojamas reguliuojant maistinių medžiagų prieinamumą. Pvz. esant azoto ir geležies trūkumui sodinukuose jaunų šaknelių kiekis padidėja, o senesnių šaknų skersmuo sumažėja, tuo tarpu trešiant azotu, šaknys darosi ilgesnės (Yang et al. 2012).

Augalų šaknų genėjimas mažina šaknų kiekį ir taip sutrikdo augimo pusiausvyrą nuo šaknų iki ūglių. Genėtos šaknys pradeda atsigauti ir ataugti, todėl šaknų sistema pasidaro maisto medžiagas įsisavinančiu organu (Li et al.1996). Šaknims padaryta žala iš pradžių stimuliuoja maistinių medžiagų ir vandens naudojimą bei fotosintezę, o kuomet šaknys atsigauna, fotosintezės greitis dar padidėja ir ilgainiui netgi viršija kontrolinius augalus, kuriems šaknų genėjimas netaikytas (Fang et al., 2017). Šio mechanizmo galimas paaiškinimas yra toks, jog šaknims atsigavus po genėjimo, naujai išaugusios šaknys sustiprina citokininų sintezę (Yang et al., 2009).

Ši šaknų genėjimo praktika taip pat pagerina vaisių kokybę – padidėja tirpių sausųjų medžiagų, titruojamo rūgštingumo, vitamino C ir antocianinų kiekis obels vaisiuose (Zhang et al. 2013; Chen et al. 2011). Tačiau šaknų genėjimo įtaka fenolinių ir triterpeninių junginių kaupimuisi vaisiuose, ypač obuoliuose, mūsų žiniomis, pasaulyje dar nėra tyrinėta.

Kamienų įpjovimai. Nors išauginamų obuolių kiekis pasaulyje vis didėja, tačiau pastebėta, jog jų kokybė darosi vis prastesnė, ypač įvertinant įvairių cukrų ir augalinių aminorūgščių kiekybinę ir kokybinę sudėtį, vaisių aromatą ir skonį (Nava, Dechen, 2009; Demirsoy et al., 2012). Šiuos kokybės parametrus vaismedžių priežiūros metu galima reguliuoti tokiomis technologinėmis priemonėmis kaip vaismedžių kamieno įpjovimais (Zhao et al., 2013). Iš minėtų kokybės rodiklių, vaisių aromatas yra labai svarbus kriterijus norint sėkmingai konkuruoti rinkoje, kadangi vartotojai į tai labai atkreipia dėmesį (Taylor, Hort, 2004). Obels vaisiams aromatą suteikiantys junginiai sintetinami antrinio metabolizmo procesų metu (Nie et al., 2004), o norint kontroliuoti šiuos procesus, soduose taikomi

kamienų įpjovimai (Khandaker et al., 2011), arba modeliuojamos įvairios vaisių laikymo sąlygos (Echeverría et al., 2004). Kamienų įpjovimai gali padidinti vaisių užuomazgų ir derliaus dydį, taip pat pagerinti vaisių fizikinius ir cheminės sudėties rodiklius (Khandaker et al., 2011).

Kamienų įpjovimai blokuoja fotosintezės produktų ir metabolitų tekėjimą žemyn per vaismedžio floemą ir tai leidžia šiems asimiliatams kauptis aukščiau įpjovimo vietos (Li et al., 2003a; Dannenmann et al., 2009). Tai paskatina vaismedžių žydėjimo gausumą (Roper, Williams, 1989) ir pagerina vaisių kokybės rodiklius, tokius kaip vaisių masė ir jų skersmuo, cukrų ir vitamino C kiekius (Arakawa et al., 1998; Meintjes et al., 2005; Jing, 2007). Šie teigiami kokybės pokyčiai vaisiuose atsiranda dėl geresnio angliavandenių prieinamumo į vaisius.

Rūgštingumas ir tirpios sausosios medžiagos yra svarbūs vaisių kokybės vertinimo ir vaisių skonio rodikliai. Nustatyta, jog kamienų įpjovimai sąlygojo didesnius tirpių sausųjų medžiagų ir mažesnius organinių rūgščių kiekius vaisiuose (Jing, 2007; Zhao et al., 2013). Taip pat pastebėta, jog ši technologinė priemonė padidino vitamino C kiekį vaisiuose, tačiau tirpių augalinių baltymų kiekis sumažėjo (Krapp, 1995; Seung, 2000; Zhao et al., 2013). Tačiau kamienų įpjovimų įtaka obels vaisių fenolinių ir triterpeninių junginių kiekiui, mūsų žiniomis, pasaulyje tyrinėta taip pat nebuvo.

Kalcio proheksadionas. Šis preparatas yra palyginti naujas augimo reguliatorius, kuris JAV buvo pradėtas naudoti nuo 1999 m., o daugybė tyrimų patvirtino, kad tai išties yra veiksmingas vegetatyvinio augimo reguliatorius (Miller, 2002; Rademacher, Kober, 2003; Basak, 2004; Byers et al., 2004; Medjdoub et al., 2005). Daminozidas daugelį metų buvo sėkmingai naudojamas vegetatyviniam vaismedžių augimui kontroliuoti, tačiau naudojimui obelyse jo registracija 1989 m. buvo panaikinta. Kita priemonė yra etefonas – etileną išskiriantis augimo reguliatorius, kuris šiuo metu yra prieinamas, tačiau jo naudojimas obelyse yra sudėtingas, kadangi efektyviam rezultatui pasiekti yra reikalingas didelis šio preparato kiekis, o tai savo ruožtu gali sukelti ir pernelyg didelį užuomazgų išretinimą (Greene, 2003).

Kad pasiekti optimalią obels augumo kontrolę, kalcio proheksadionas turi būti naudojamas vos tik atsiranda nauji lapeliai, į kuriuos jis ir turi patekti (Byers, Yoder, 1999; Unrath, 1999). Apskritai, šios priemonės taikymas turėtų būti pradėtas tada, kuomet prasideda žiedlapių kritimas (Rademacher, Kober, 2003). Ankstesnis taikymas nerekomenduojamas, nes kalcio proheksadionas daugiausia įsisavinamas per lapus, o pakankamas lapų plotas nesusidaro, kol ūgliai nepasiekia 2-5 cm, o tai dažniausiai pasireiškia laikotarpyje tarp pilno obels žydėjimo ir žiedlapių kritimo (Miller, 2002). Taip pat kalcio proheksadionas vaismedžiuose pakankamai greitai inaktyvuojasi (Rademacher et al., 2004). Dėl šios priežasties šis preparatas sezono metu rekomenduojamas naudoti daugiau negu vieną kartą, ypač kuomet naudojamos mažesnės dozės (Miller, 2002). Ši priemonė taip pat yra veiksminga kovojant su rauplėmis, miltlige bei bakterine deglige (Yoder et al., 1999;

Costa et al., 2001; Bazzi et al., 2003). Su tuo gali būti susijęs padidėjęs atsparumas patogenams, su kuriuo siejamas flavonoidas leuteferolis (Rademacher, 2004).

Įvairių tyrėjų duomenys dėl kalcio proheksadiono įtakos obels vaisių derliui yra prieštaringi. Kai kurie mokslininkai savo tyrimuose nustatė, jog šis preparatas padidina vaisių užuomazgų kiekį vaismedyje (Greene, 1999; Byers et al., 2004; Glenn, Miller, 2005), tuo tarpu kiti mokslininkai nustatė, jog ši priemonė tam įtakos neturi (Byers, Yoder, 1999; Costa et al., 2000; Miller, 2002). Medjdoub ir kt. (2005) tyrime buvo nustatyta, jog kalcio proheksadiono naudojimas padidino vaisių užuomazgų kiekį 'Gala' veislės obelyse, tačiau 'Fuji' veislėje ši tendencija nepastebėta. Ryšium su didesniu vaisių kiekiu vaismedžiuose, atitinkamai sumažėja pačių vaisių dydis. Apie tai plačiau aprašyta šio darbo 1.1. skyrelyje. Taikant kalcio proheksadiono preparatą, ši tendencija taip pat buvo pastebėta (Glenn, Miller, 2005; Medjdoub et al., 2005). Šis preparatas taip pat padidina labai mažų (nykštukinių) obuolių skaičių vaismedžiuose, kurie paprastai skaičiuojant vidutinį vaisių svorį įtraukiami nebūna. Kitais atvejais, kuomet kalcio proheksadiono naudojimas vaisių kiekiui vaismedyje įtakos nedaro, vis tiek pastebimas šioks toks vaisių masės mažėjimas (Miller, 2008). Didelės šio preparato normos gali būti susijusios ar bent iš dalies atsakingos už šį vaisių masės sumažėjimą. Dėl šios priežasties kai kurie mokslininkai siūlo naudoti mažesnes kalcio proheksadiono normas arba jas išskaidyti per keletą kartų (Rademacher, Kober, 2003).

Vasarinis genėjimas. Obelų genėjimas atliekamas siekiant suformuoti pageidaujamą vainiko architektūrą ir lapų tankį, pašalinant neproduktyvias vaismedžių šakas. Pavasarinis genėjimas skatina vešlumą bei medienos augimą, o vasarinis – pagerina vainiko apšviestumą ir skatina geresnę vaisių kokybę. Vasarinis genėjimas obelų soduose jau minimas iki XVII a., o nuo 1903 m. jam pradėtas skirti ir mokslinis dėmesys (Marini, Barden, 1987). Genėjimas atliekamas siekiant apriboti pernelyg didelį vegetatyvinį augimą ir išlaikyti pusiausvyrą tarp lapų ir vaisių santykio, vaisių dydžio, spalvos ir kitų kokybės rodiklių. Tai padidina auksinų aktyvumą apie 60%, giberelinų ir citokininų – apie 90% (Grochowska et al., 1984). Vaismedžių vasarinis genėjimas padidina fotosintetinę translokaciją į vaisius ir šaknis, o tai reguliuoja žiedinių pumpurų formavimąsi. Tai taip pat slopina ūglių augimą, jie būna trumpesni. Vasarinis genėjimas gerina šviesos įsiskverbimą ir pasiskirstymą vainiko viduje ir pagerina vaisių nusispalvinimą (Lakso et al., 1989). Priklausomai nuo genėjimo intensyvumo, augalo vystymosi tarpsnio ir aplinkos sąlygų (pvz. maistinių medžiagų, dirvožemio drėgmės, šviesos), vasarinis genėjimas gali turėti įvairiapusį poveikį. Li ir Lakso (2004) tyrime buvo nustatyta, jog išgenėjus vaismedžius vidinio ir vidurinio vainiko dalių apšvietimas vis tiek buvo daug mažesnis už išorinės vainiko dalies apšvietimą, todėl lapų fotosintezės veiksnumas po vasarinio genėjimo nepadidėjo. Taip pat pastebėta, jog vasarinis genėjimas pagreitina vaisių nokimą augimo metu, o tai sąlygoja didesnį tirpių sausųjų medžiagų kiekį ir mažesnį rūgštingumą obuoliuose (Rather, 2006). Tačiau detalesnių cheminės sudėties ir bioaktyviųjų junginių kaupimosi tyrimų obels vaisiuose dėl vasarinio genėjimo, mūsų žiniomis, atlikta nėra.

Be obels vaisių nusispalvinimo pagerinimo ir vaismedžių augimo sumažinimo, yra ir kitų vasarinio genėjimo privalumų – tikėtina, jog dalinis lapų pašalinimas nuo vaismedžio gali sumažinti bendrą vainiko vandens transpiraciją ir taip pagerinti vaismedžio aprūpinimą vandeniu. Yra aprašyta, jog intensyvus vasarinis vaismedžių išgenėjimas padėjo kriaušių ir persikų sodams didelių sausrų metais (Li et al., 2001). Todėl sausringais metais ar sausringose vietovėse vasarinis genėjimas gali padėti sumažinti sausrų sukeltą vaisių augimo mažėjimą.

1.5. Vaismedžių geografinių augimo vietovių įtaka vaisių kokybei

Geografinės vaismedžių augimo vietos tyrimai visame pasaulyje yra atlikti tik vertinant poskiepių įtaką vaisių kokybei (Maas, Wertheim 2004; Robinson et al. 2004; Autio et al. 2008). Šiaurinės ir centrinės Amerikos regione vykdomas „NC-140“ projektas, kuris tiria vaismedžių poskiepių įtaką vaismedžių augumui, derliui ir vaisių kokybei. Baltijos šalių regione tokie tyrimai taip pat buvo atlikti projekto ‘Baltic fruit rootstock studies’ vykdymo metu (Bite et al. 2004; Kviklys et al., 2012). Obelys su vienodais poskiepiais ir veislėmis buvo sodinti Lenkijoje, Lietuvoje, Latvijoje, Estijoje ir Baltarusijoje. Vaisių kokybė visuose šiuose tyrimuose buvo tirta tik vertinant išorinę vaisių kokybę – vaisių dydį, tvirtumą, nusispalvinimą, sunokimą, tirpias sausąsias medžiagas. Tačiau tyrimų, kurie įvertintų geografinės vaismedžių augimo vietovės įtaką vaisių vidinei kokybei (antriniams metabolitams, fitocheminei sudėčiai), mūsų žiniomis, pasaulyje dar nėra atlikta.

2. TYRIMŲ METODAI IR SĄLYGOS

2.1. Tyrimų objektas

Naminės obels (*Malus x domestica* Borkh.) vaisiai – obuoliai.

2.2. Tyrimų vieta ir lauko bandymų bendrosios sąlygos

Tyrimai atlikti 2014-2017 m. Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centro (LAMMC) filialo Sodininkystės ir daržininkystės instituto (SDI) Biochemijos ir technologijos laboratorijoje bei Lietuvos sveikatos mokslų universiteto (LSMU) Medicinos akademijos Farmacijos fakulteto Farmakognozijos katedroje.

Lauko bandymai vykdyti 2014-2016 m. LAMMC SDI bandyminiuose soduose, Babtuose (55°60′ N, 23°48′ E). Papildomai, vaismedžių geografinės vietos tyrimui, obuoliai 2015-2016 m. buvo atvežti iš Skierniewice, Lenkijos sodininkystės instituto (51°58′ N, 20°09′ E) ir Polli, Estijos sodininkystės tyrimų centro (58°67′ N, 25°33′ E). Vaismedžių trešimas atliktas atsižvelgiant į dirvožemio ir lapų ėminių tyrimus. Dirvožemio savybės pateiktos 1 lentelėje.

1 lentelė. Dirvožemio savybės skirtinguose lauko bandymų vietose

Table 1. Soil properties between different trial locations

Dirvožemio savybės Soil properties	Lauko bandymų vieta / Trial locations		
	Skierniewice, Lenkija Poland	Babtai, Lietuva Lithuania	Polli, Estija Estonia
Granuliometrinė sudėtis Granulometric composition	Gilus priesmėlis Deep sandy-loam	Priemolis Clay loam	Priemolis Clay loam
pH	6,7	7,3	5,3
Humusas, % / humus, %	1,4	2,8	2,0
P_2O_5, mg kg^{-1}	195	255	130
K_2O, mg kg^{-1}	190	230	223
Vidutinis metinis kritulių kiekis, mm Average annual precipitation, mm	550	630	455
Vidutinė aktyvių temperatūrų suma, ºC Average sum of active temperatures, ºC	2550	2300	1930

Vaisių krūvis vaismedyje. Vaisių krūvis - išvestinis rodiklis, gaunamas dalijant vaisių skaičių vaismedyje iš kamieno skerspjūvio ploto (KSP). Vaisių krūvis išreiškiamas vaisių vnt. cm^{-2} KSP. Šiam tyrimui naudoti 'Ligol' veislės obuoliai su P 60 poskiepiu, vaismedžių sodinimo schema – 3,5 x 1,25 m, vaismedžių sodinimo metai – 2011. Vaisių krūvis vaismedžiuose buvo reguliuojamas žiedynus retinant rankiniu būdu prieš žydėjimą gegužės pradžioje, žiedpumpurių rausvėjimo tarpsnyje. Po birželinio užuomazgų kritimo, likusios užuomazgos buvo suskaičiuojamos ir dar kartą išretinamos atitinkamai pagal numatytą vaisių krūvį. Lauko bandymas buvo įrengtas keturiais pakartojimais, po du vaismedžius pakartojime. Bandymo laukeliai buvo išdėstyti randomizuotai. Dešimt vaisių iš kiekvieno vaismedžio (20 vaisių per pakartojimą) iš įvairių vaismedžio vainiko vietų buvo atsitiktinai atrinkti tyrimams. Vaisiai skinti optimaliu skynimo laiku.

Tyrimo variantai:

1. 4 vaisiai cm^{-2} KSP;
2. 8 vaisiai cm^{-2} KSP;
3. 12 vaisių cm^{-2} KSP;

Vaisių augimo vieta vaismedžio vainike. Tyrimui naudoti veislės 'Ligol' obelų su P 60 poskiepiu vaisiai, vaismedžių sodinimo schema – 4 x 1,25 m., vaismedžių sodinimo metai – 2002. Vaismedžių eilės išdėstytos šiaurės-pietų kryptimi. Lauko bandymas buvo įrengtas keturiais pakartojimais, po keturis vaismedžius pakartojime. Bandymo laukeliai buvo išdėstyti randomizuotai. Tyrimams buvo skinta po penkis vaisius iš kiekvieno vaismedžio (20 vaisių iš pakartojimo) kiekvienai tiriamajai vainiko vietai. Vaisiai skinti optimaliu skynimo laiku.

Tyrimo variantai:

1. Apačia – obuoliai skinti iš vainiko apatinės ir vidinės dalių (iki 1,2 m nuo žemės);
2. Viršus – obuoliai skinti iš vaismedžio viršūnės (aukščiau nei 2,3 m nuo žemės);
3. Rytai – obuoliai skinti iš rytinės vaismedžio pusės (1,2 – 1,8 m nuo žemės);
4. Vakarai – obuoliai skinti iš vakarinės vaismedžio pusės (1,2 – 1,8 m nuo žemės);

Vaismedžių konkurencinė įtampa (vaismedžių sodinimo atstumai). Tyrimui naudoti veislės 'Auksis' obelų su P 60 poskiepiu vaisiai, vaismedžių sodinimo metai – 2001. Lauko bandymas buvo įrengtas keturiais pakartojimais, po penkis vaismedžius pakartojime. Tyrimams buvo skinta po dešimt vaisių iš kiekvieno vaismedžio, atsitiktinėje vainiko dalyje. Iš 50 nuskintų vaisių, toliau tyrimams atsitiktinai buvo paimama po 20 vaisų. Vaisiai skinti optimaliu skynimo laiku.

Tyrimo variantai:

1. Sodinimo schema 3 x 1,50 m, 2 222 vaism. ha^{-1}, vainiko forma paprastoji verpstė;
2. Sodinimo schema 3 x 1,00 m, 3 333 vaism. ha^{-1}, vainiko forma laiboji verpstė;
3. Sodinimo schema 3 x 0,50 m, 6 667 vaism. ha^{-1}, vainiko forma superverpstė;

Vaismedžių augumo reguliavimas. Tyrimui naudoti veislės 'Rubin' obelų su P 60 poskiepiu vaisiai, vaismedžių sodinimo schema – 4 x 1,5 m, vaismedžių sodinimo metai – 1999.

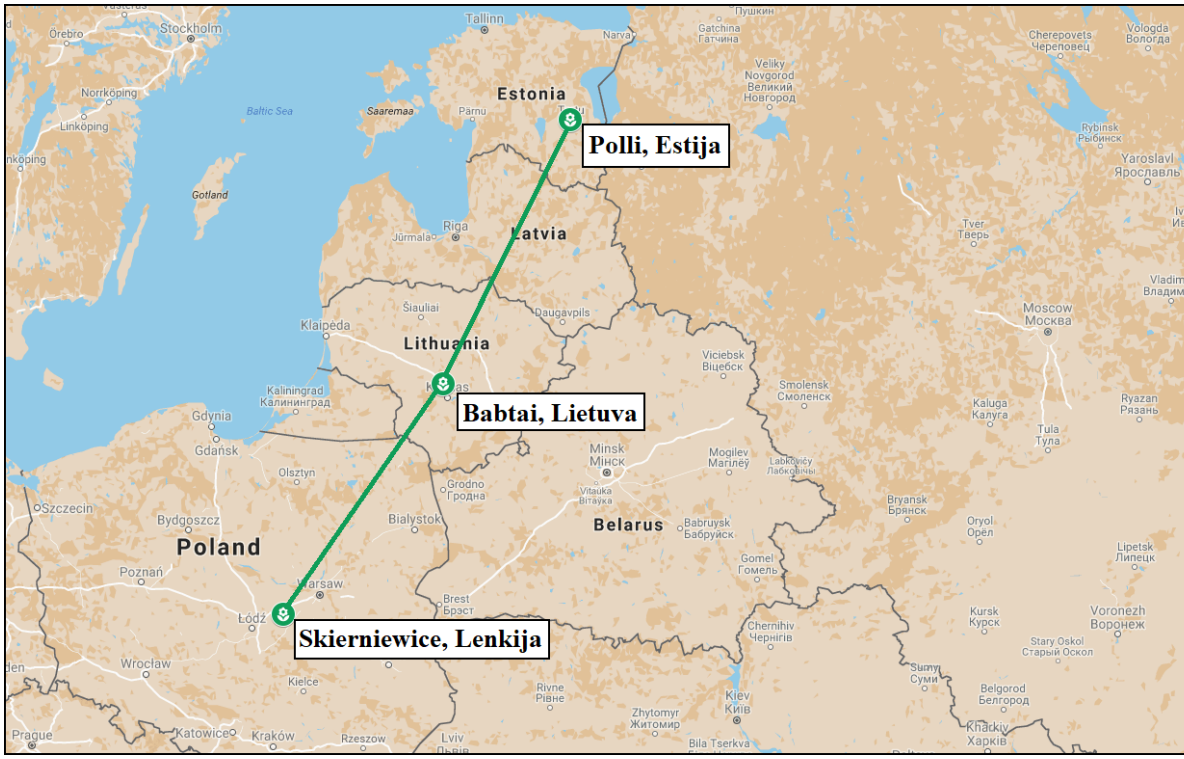
Tyrimo variantai:

1. Kontrolė – vaismedžių augimą reguliuojančios priemonės nenaudotos;
2. Kamienų įpjovimai – vaismedžių kamienai prieš žydėjimą įpjauti iki pusės 20 cm aukštyje virš žemės paviršiaus iš vienos pusės ir 60 cm aukštyje iš kitos pusės;
3. Šaknų pjovimas – vaismedžių šaknys prieš žydėjimą 20 cm atstumu nuo kamieno ir iki 40 cm gyliu nupjautos iš abiejų pusių;
4. Purškimas kalcio proheksadionu **– v**aismedžiai purkšti augimo reguliatoriumi Regalis™ (veiklioji medžiaga – kalcio proheksadionas) 2,5 kg ha^{-1} vieną kartą, iškart po žydėjimo, kuomet jauni ūgliai turėjo po 5 lapelius;
5. Vasarinis genėjimas **– v**aismedžių ūgliai genėti vasarą (rugpjūčio viduryje).

Vaismedžių geografinė augimo vieta. Tyrimui naudoti veislių 'Auksis' ir 'Ligol' obelų su B.396 poskiepiais vaisiai, vaismedžių sodinimo schema – 4 x 1,5 m, vaismedžių sodinimo metai – 2005. Vaismedžiai sodinti pagal vieningą schemą visose tiriamose geografinėse vietovėse. Dirvožemio sąlygos aprašytos 1 lentelėje. Tiriamieji sodai vienas nuo kito nutolę beveik vienodu ~400 km atstumu, šiaurės-rytų kryptimi (1 pav.).

Tyrimo variantai:

1. Obuoliai, išauginti Lenkijos sodininkystės instituto bandyminiuose soduose (Skierniewice, Lenkija);
2. Obuoliai, išauginti LAMMC SDI bandyminiuose soduose (Babtai, Lietuva);
3. Obuoliai, išauginti Estijos sodininkystės tyrimų centro bandyminiuose soduose (Polli, Estija);



1 pav. Bandyminių sodų geografinės vietovės

Fig. 1. Geographical locations of the trial orchards

2.3. Tyrimų metodai

Obuolių ėminių paruošimas. Obuoliai supjaustyti naudojant obuolių pjaustymo ir lupimo įrenginį AS 4 (Kronen GmbH, Vokietija). Įrenginys pašalina iš obuolių sėklalizdžius ir supjausto obuolius lygiomis skiltelėmis. Triterpenų nustatymui obuoliuose atskirai buvo nulupta odelė, prie įrenginio prijungiant tam skirtą odelės lupimo priedą. Supjaustytos obuolių skiltelės (arba odelės, priklausomai nuo tyrimo) nedelsiant sudėtos į šaldiklį ir užšaldytos iki –35 °C temperatūros. Užšaldytos obuolių skiltelės ir odelės džiovintos liofilizatoriuje Sublimator 3x4x5 (Zirbus technology GmbH, Vokietija). Liofilizacija vykdyta 0,01 mbar vakuume, šaldymo kondensoriaus temperatūra –85 °C. Liofilizuotos obuolių skiltelės ir odelės susmulkintos iki smulkių miltelių (apie 100 µm) ultracentrifūginiu malūnu ZM200 (Retsch GmbH, Vokietija). Liofilizuoti ėminiai laikyti tamsoje, sandariai uždarytuose induose. Nuodžiūvis liofilizatuose nustatytas drėgnio analizatoriumi PMB 53 (Adam Equipment Inc., JAV), esant 105°C temperatūrai, masės pasikeitimo jautrumas – iki 0,01 g. Gautas nuodžiūvis perskaičiuotas į absoliučiai sausą liofilizato masę (European Pharmacopoeia, 2010).

Obuolių ekstraktų paruošimas fenolinių junginių nustatymui. Atsveriama 2,5 g (tikslus svėrinys) liofilizuotų obuolių miltelių, užpilama 30 ml 70 proc. (v/v) etanoliu ir

ekstrahuojama ultragarso vonelėje Sonorex Digital 10 P (Bandelin electronic GmbH, Vokietija) 27 min. 45 °C temperatūroje sandariai uždarytuose stikliniuose buteliukuose. Ultragarso stipris – 480 W, dažnis – 35000 Hz. Gautas ekstraktas filtruojamas per popierinį filtrą, obuolių liofilizatas, esantis ant filtro, du kartus praplaunamas po 10 ml 70 proc. (v/v) etanolio į 50 ml matavimo kolbutę ir paskiedžiama 70 proc. (v/v) etanoliu iki žymės. Prieš ESC analizę ekstraktai filtruojami per 0,22 μm porų dydžio politetrafluoretileno (PTFE) membraninius filtrus (Carl Roth GmbH, Vokietija).

Obuolių ekstraktų paruošimas cukrų ir obuolių rūgšties nustatymui. Atsveriama 0,5 g (tikslus svėrinys) liofilizuotų obuolių miltelių, užpilama 50 ml išgryninto vandens. Ekstrakcija vykdyta 10 min. purtyklėje. Chromatografinei analizei mėginiai nufiltruoti per 0,22 μm porų dydžio PTFE membraninius filtrus (Carl Roth GmbH, Vokietija).

Obuolių ekstraktų paruošimas triterpeninių junginių nustatymui. Atsveriama 1 g (tikslus svėrinys) liofilizuotų obuolių odelių miltelių, užpilama 10 ml acetonu (100 proc., v/v) ir ekstrahuojama ultragarso vonelėje Sonorex Digital 10 P (Bandelin electronic GmbH, Vokietija) 10 min. Ultragarso stipris – 480 W, dažnis – 35000 Hz. Gautas ekstraktas filtruojamas per popierinį filtrą, obuolių liofilizatas, esantis ant filtro, praplaunamas 10 ml acetonu (100 proc., v/v) į 10 ml kolbutę. Chromatografinei analizei mėginiai nufiltruoti per 0,22 μm porų dydžio PTFE membraninius filtrus (Carl Roth GmbH, Vokietija).

Efektyviosios skysčių chromatografijos metodika fenolinių junginių nustatymui. Fenolinių junginių kokybinė ir kiekinė analizė atlikta taikant Liaudansko ir kt. straipsnyje aprašytą metodiką (Liaudanskas ir kt., 2014), atvirkščių fazių efektyviosios skysčių chromatografijos (ESC) metodu Waters e2695 Alliance chromatografine sistema (Waters, JAV), naudojant diodų matricos detektorių Waters 2998. Chromatografinio skirstymo valdymas, chromatogramų registravimas, duomenų kaupimas ir apdorojimas atliktas naudojantis Empower® 3 Chromatography Data Software (Waters, JAV) programine įranga. Skirstymui naudota kolonėlė YMC-Pack ODS-A (250×4,6 mm, C18, dalelių dydis 5 μm) su prieškolone YMC-Triart (10×3,0 mm, C18, dalelių dydis 5 μm) (YMC Europe GmbH, Vokietija). Optimizuotos chromatografinės metodikos eliuentų sistema sudaryta iš 2 proc. (v/v) acto rūgšties tirpalo vandenyje (eliuentas A) ir 100 proc. (v/v) acetonitrilo (eliuentas B). Gradiento kitimas: 0–30 min. 3–15 proc. B, 30–45 min. 15–25 proc. B, 45–50 min. 25–50 proc. B, 50–55 min. 50–95 proc. B. Judrios fazės tėkmės greitis – 1 ml/min., injekcijos tūris – 10 μl. Kolonėlė termostatuota 25°C temperatūroje. Chromatografinės smailės identifikuotos lyginant analičių ir etaloninių junginių sulaikymo laikus ir UV absorbcijos spektrines charakteristikas (λ=200–400 nm). Identifikuotų junginių tapatybė patvirtinta priedo metodu į tiriamąjį ekstraktą pridėjus etaloninio junginio, vertinant chromatografinių smailių formos ir spektrinių charakteristikų pokyčius. Kiekinis obels vaisių ėminių ekstraktuose identifikuotų junginių nustatymas atliktas naudojantis penkių lygmenų kiekvienai analitei sudarytais etaloninių junginių kalibravimo grafikais bei remiantis analitės chromatografinės smailės ploto priklausomybe nuo analitės

koncentracijos analizuojamame ekstrakte. Dihidrochalkonų, monomerinių ir oligomerinių flavan-3-olių kiekiai tiriamuosiuose ekstraktuose apskaičiuoti bangos ilgiui esant 280 nm, fenolinių rūgščių – 320 nm, flavonolių – 360 nm.

Efektyviosios skysčių chromatografijos metodika triterpeninių junginių nustatymui. Korosolo, betulino, oleonolo ir ursolo rūgščių kiekio ir sudėties analizė obels vaisiuose atlikta pagal Zhang ir kt. (2014) aprašytą metodiką su nedideliais pakeitimais. Chromatografinė analizė atlikta ESC metodu Waters e2695 Alliance chromatografine sistema (Waters, JAV), naudojant diodų matricos detektorių Waters 2998. Chromatografinio skirstymo valdymas, chromatogramų registravimas, duomenų kaupimas ir apdorojimas atliktas naudojantis Empower® 3 Chromatography Data Software (Waters, JAV) programine įranga. Skirstymui naudota kolonėlė ACE (5 µm, C18, 250 × 4.6 mm). Kolonėlė termostatuota 25°C temperatūroje. Judrios fazės tėkmės greitis – 1 ml/min., injekcijos tūris – 10 µl. Naudoti eliuentai – acetonitrilas (88 proc., eliuentas A) ir ultragrynas vanduo (12 proc., eliuentas B). Analizės trukmė – 15 min. Chromatografinės smailės identifikuotos lyginant analičių ir etaloninių junginių sulaikymo laikus ir UV absorbcijos spektrines charakteristikas (λ=200–400 nm). Identifikuotų junginių tapatybė patvirtinta priedo metodu į tiriamąjį ekstraktą pridėjus etaloninio junginio, vertinant chromatografinių smailių formos ir spektrinių charakteristikų pokyčius. Triterpenai tiriamuosiuose ekstraktuose apskaičiuoti bangos ilgiui esant 205 nm. Kiekinis triterpenų nustatymas atliktas išorinio standarto metodu naudojantis etaloninio junginio kalibracinėmis kreivėmis.

Efektyviosios skysčių chromatografijos metodika cukrų nustatymui. Fruktozės, gliukozės, sacharozės ir sorbitolio kiekio ir sudėties analizė obels vaisiuose atlikta pagal Ma ir kt. (2014) aprašytą metodiką su nedideliais pakeitimais. Chromatografinė analizė atlikta hidrofilinės sąveikos skysčių chromatografijos metodu (HILIC), naudojant Waters e2695 Alliance chromatografinę sistemą (Waters, JAV). Chromatografinio skirstymo valdymas, chromatogramų registravimas, duomenų kaupimas ir apdorojimas atliktas naudojantis Empower® 3 Chromatography Data Software (Waters, JAV) programine įranga. Analičių skirstymui taikyta kolonėlė Shodex SUGAR SZ5532 (150×6,0 mm, dalelių dydis 6 µm) su prieškolone Shodex SUGAR SZ-G (10×4,6 mm, dalelių dydis 6 µm) (Shodex Group, Japonija). Naudoti eliuentai – ultragrynas vanduo (eliuentas A) ir acetonitrilas (eliuentas B). Gradiento kitimas: 0–5 min. 19 proc. A, 5–20 min. 19–30 proc. A, 20–22 min. 30 proc. A, 22–25 min. 30–19 proc. A. Judrios fazės tėkmės greitis – 1 ml/min., injekcijos tūris – 10 µl. Kolonėlė termostatuota 60°C temperatūroje. Detekcija atlikta su garinančiojo šviesos sklaidos detektoriumi (ELSD) Waters ACQUITY UPLC® ELS Detector (Waters, JAV). Detektoriaus parametrai: purkštuvo temperatūra – 40°C, azoto dujų srauto slėgis – 25 psi, garintojo temperatūra – 60°C. Chromatografinių smailių identifikavimas atliktas pagal analitės bei etaloninio junginio eliucijos trukmės sutapimą ir priedo metodu, į tiriamąjį ekstraktą pridedant etaloninio junginio ir vertinant chromatografinių smailių ploto pokyčius.

Kiekinis cukrų nustatymas atliktas išorinio standarto metodu naudojantis etaloninio junginio kalibracinėmis kreivėmis.

Efektyviosios skysčių chromatografijos metodika obuolių rūgšties nustatymui. Obuolių rūgšties kiekio obels vaisiuose analizė atlikta pagal Ergönül ir Nergiz (2010) metodiką su nedideliais pakeitimais. Chromatografinė analizė atlikta molekulinių sietų (angl. ion-exclusion) skysčių chromatografijos metodu, naudojant Waters e2695 Alliance chromatografine sistemą (Waters, JAV). Chromatografinis obuolių rūgšties skirstymas atliktas kolonėle Shodex RSpak KC-118 (300 × 8,0 mm) su prieškolone Shodex RSpak KC-G (50 x 6,0 mm). Judri fazė – 1 mM (v/v) perchlorato rūgštis vandenyje, tėkmės greitis – 1 ml/min., injekcijos tūris – 10 µl. Kolonėlė termostatuota 60°C temperatūroje. Detekcija atlikta su ultravioletinės – matomos šviesos detektoriumi Waters 2489 UV/Visible (UV/Vis) Detector (Waters, JAV) esant 210 nm bangos ilgiui. Chromatografinių smailių identifikavimas atliktas pagal analitės bei etaloninio junginio eliucijos trukmės sutapimą ir priedo metodu, į tiriamąjį ekstraktą pridedant etaloninio junginio ir vertinant chromatografinių smailių ploto pokyčius. Kiekinis junginių nustatymas atliktas išorinio standarto metodu naudojantis etaloninio junginio kalibracinėmis kreivėmis.

Antioksidacinio aktyvumo nustatymas. Obuolių ėminių antioksidacinis aktyvumas ir fenolinių junginių indėlis į bendrą antioksidacinį aktyvumą nustatytas taikant mūsų su kolegomis parengtą metodiką, kurioje buvo įvertintos 6 Lietuvoje auginamos obelų veislės (Raudonė ir kt., 2016). Ši metodika taip pat naudota ir šiame darbe.

ABTS tirpalo paruošimas. 2 mM ABTS miltelių ištirpinama 0,7 mM vandeniniame kalio persulfato tirpale. Tirpalas laikomas 16–17 val. kambario temperatūroje tamsoje, kol pasiekiama reakcijos pusiausvyra. Gautas pradinis ABTS radikalo-katijono ($ABTS^{\bullet+}$) tirpalas skiedžiamas acetatiniu buferiu (0,1 M; pH 4,5) iki darbinės 110 µM $ABTS^{\bullet+}$ koncentracijos.

FRAP tirpalo paruošimas. 10 mM 2,4,6-tripiridil-s-triazino (TPTZ) miltelių ištirpinama 40 mM vandenilio chlorido rūgšties tirpale. 20 mM geležies (III) chlorido heksahidrato ($FeCl_3 \times 6H_2O$) ištirpinama išgrynintame vandenyje. Darbinis FRAP tirpalas ruošiamas sumaišius TPTZ, $FeCl_3 \times 6H_2O$ ir acetatinio buferio (300 mM, pH 3,6) tirpalus santykiu 1:1:25.

ESC-ABTS ir ESC-FRAP pokolonėliniai metodai. Tiriamųjų ekstraktų chromatografinis skirstymas atliktas chromatografine Waters 2695 Alliance sistema (Waters, JAV) su diodų matricos detektoriumi Waters 2998, taikant aukščiau aprašytą ESC skirstymo metodiką. Ekstraktų antiradikalinio ir redukcinio aktyvumo nustatymas atliktas taikant Raudonio ir kt. straipsnyje aprašytas ESC-ABTS ir ESC-FRAP metodikas (Raudonis ir kt., 2012). Po detekcijos eliuatas tiesiogiai sumaišomas su $ABTS^{\bullet+}$ arba FRAP reagentu, kurie į pokolonėlę tiekiami chromatografu Beckman programable solvent module 126 (Beckman, JAV) pastoviu 0,5 ml/min. tėkmės greičiu. Reakcija tarp analitės ir reagento

vykdyta reakcijos kilpoje, pagamintoje iš polietereterketono (ilgis 15 m, vidinis skersmuo 0,3 mm), 25 °C temperatūroje. Waters 2487 detektorius naudotas registruoti absorbcijos padidėjimą po reakcijos su FRAP (esant 593 nm bangos ilgiui) arba sumažėjimą po reakcijos su $ABTS^{\bullet+}$ (esant 650 nm bangos ilgiui). ABTS kalibravimo grafikas (y=10497x+4758,1, R^2=0,9987) sudarytas, naudojant 20−200 µM koncentracijos etaloninius trolokso tirpalus. FRAP kalibravimo grafiko (y=18560x−7573,8, R^2=0,9995) sudarymui naudoti 1–100 µM koncentracijos etaloniniai trolokso tirpalai.

Antioksidacinio aktyvumo apskaičiavimas. Obuolių ėminių ekstraktų antioksidacinis aktyvumas apskaičiuotas pagal trolokso kalibravimo grafiką ir išreikštas trolokso ekvivalentu (TE, µmol/g) absoliučiai sausai medžiagai. TE atitinka trolokso kiekį (µmol), kuris tokiomis pat tyrimo sąlygomis turi identišką antioksidacinį aktyvumą, kaip 1 g augalinės žaliavos. TE apskaičiuojamas iš formulės:

$$TE = \frac{A - b}{a} \times \frac{V_{band}(l)}{m_{band}(g)}, (\mu mol/g), \qquad (1)$$

kur: A – antioksidantiškai aktyvios analitės smailės plotas antioksidacinio aktyvumo chromatogramoje; a – nuolydis, b – nuokrypis iš trolokso kalibravimo grafiko regresijos lygties; V_{band} – tiriamos augalinės žaliavos ekstrakto bandinio tūris (l); m_{band} – tiriamo bandinio atsvertas kiekis (tiksli masė, g). Antioksidantinis profilis leidžia įvertinti individualių komponentų įtaką antioksidaciniam aktyvumui (Beekwilder et al., 2005). Identifikuotų junginių indėlis į antioksidacinį aktyvumą (IAA) apskaičiuotas pagal formulę:

$$IAA = \frac{S_x}{S_{bendras}} \times 100, \qquad (2)$$

kur: S_x – vertinamos smailės plotas; $S_{bendras}$ – visų antioksidaciniame profilyje identifikuotų smailių plotų suma.

Vaisių spalvos nustatymas. Spalvos koordinatės vienodo kontrasto spalvų erdvėje CIE L*a*b* buvo matuojamos spektrofotometru MiniScan XE Plus (Hunter Associates Laboratory, Inc., JAV). Šviesos atspindžio režimu buvo matuojami parametrai: L*, a* ir b* (atitinkamai šviesumas, raudonumo ir geltonumo koordinatės pagal CIE L*a*b* skalę) ir apskaičiuojamas spalvos grynumas ($C = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$) bei spalvos tonas ($h° = \arctan(b^*/a^*)$) (McGuiere, 1992). Dydžiai L*, a*, b* ir C* matuojami NBS vienetais, spalvos tonas h° – laipsniais nuo 0 iki 360°. NBS vienetas – tai JAV Nacionalinio standartų biuro vienetas, atitinkantis vieną spalvų skiriamosios galios slenkstį, t. y. mažiausias spalvos skirtumas, kurį gali užfiksuoti treniruota žmogaus akis. Prieš kiekvieną matavimų seriją spektrofotometras buvo kalibruojamas šviesos gaudykle ir baltos spalvos standartu, kurio spalvos koordinatės XYZ spalvų erdvėje yra tokios: X = 81,3, Y = 86,2, Z = 92,7. Duomenys pateikti kaip keturių matavimų vidurkiai. Spalvų koordinatės apdorotos programa Universal SoftwareV.4-10. L* vertė nurodo baltos ir juodos spalvos santykį, a* vertė – raudonos ir žalios spalvos santykį, b* vertė – geltonos ir mėlynos spalvos santykį, h° – spalvos toną laipsniais.

Sausųjų medžiagų nustatymas. Sausosios medžiagos vaisiuose nustatytos drėgmės analizatoriumiPMB 53 (Adam Equipment Inc., JAV), esant 105°C temperatūrai, masės pasikeitimo jautrumas – iki 0,01 g.

Kvėpavimo intensyvumo vaisiuose nustatymas. Pasveriama 10 vaisių, sudedama į 8,36 l tūrio specialius stiklinius sandarius su dangčiu indus ir laikoma šaldytuve (1±0,5°C) tris paras. Dujų analizatoriumi EASI-1 (Absoger, Les Barthes, Prancūzija) išmatuojama kiekviename inde CO_2 dujų koncentracija ir pagal vaisių masę bei laikymo trukmę apskaičiuojamas kvėpavimo intensyvumas (mg CO_2 Kgh^{-1}).

Tirpių sausųjų medžiagų nustatymas. Tirpios sausosios medžiagos nustatytos skaitmeniniu refraktometru PR-32 (Atago Co., Ltd., Japonija).

Vaisių tvirtumo nustatymas. Vaisių tvirtumas nustatytas tekstūros analizatoriumi TA.XTPlus (Stable Micro Systems, D. Britanija) naudojant P/2 zondą. Analizės sąlygos: matuoti pradedama zondui prisilietus prie bandinio paviršiaus ir užfiksavus 2 g jėgą, zondas į bandinį susminga 10 mm gyliu 1 mm/s greičiu. Analizei imama po penkis kiekvieno varianto vaisius. Analizės duomenys apdorojami Texture Exponent (Stable Micro Systems, D. Britanija) programa.

Titruojamojo rūgštingumo nustatymas. Rūgščių kiekis obels vaisiuose buvo nustatytas titruojant 0,1N NaOH tirpalu iki pH 8,2 ir išreikštas procentiniu citrinos rūgšties ekvivalentu.

Askorbo rūgšties (vitamino C) kiekio nustatymas. Askorbo rūgšties kiekis buvo nustatytas pagal AOAC metodiką (AOAC, 1990) titruojant 0,001N 2,6-dichlorfenolindofenolio natrio druskos tirpalu.

2.4. Naudoti reagentai ir medžiagos

Tyrimų metu naudoti analitinio švarumo reagentai, gradientinio švarumo eliuentai ir ESC grynumo etaloniniai junginiai (standartai). įsigyti iš šių gamintojų: Sigma-Aldrich (Šveicarija), Extrasynthese (Prancūzija), Chromadex (JAV), AB Stumbras (Lietuva), Fluka (Šveicarija), Scharlau (Ispanija). Išgrynintas dejonizuotas vanduo (18,2 $m\Omega$ cm^{-1}) ruoštas Crystal E HPLC (Adrona, Latvija) vandens valymo sistema.

2.5. Tyrimo duomenų statistinis įvertinimas

Obelų vaisių fitocheminių tyrimų metu gautų duomenų įvertinimas atliktas MS Excel (Microsoft, JAV) kompiuterine programa ir STATISTICA 10 (StatSoft, Inc., JAV) statistiniu paketu. Statistiškai patikimi skirtumai tarp skirtingų tyrimų ėminių buvo nustatyti atlikus vienfaktorinę dispersinę analizę iš viso bandymų laikotarpio bandinių ir taikant daugkartinio palyginimo Tukey‘s HSD kriterijų. Skirtumai laikyti statistiškai patikimais, kai $p<0,05$. Visi kiekvienų metų tyrimai atlikti trimis biologiniais pakartojimais. Duomenys pateikiami kaip trijų (ar dviejų, priklausomai nuo tyrimo) metų vidurkis ± standartinis nuokrypis.

3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Technologinių priemonių ir biologinių veiksnių įtaka obels vaisių fizikiniams ir fiziologiniams rodikliams

Vaisių kokybę vartotojams pirmiausiai apsprendžia išoriniai kokybės rodikliai – vaisių spalva ir dydis (jei skonis vartotojui dar nežinomas). Verslinių sodų augintojams be šių rodiklių taip pat svarbu užtikrinti gerą vaisių transportabilumą (tai nulemia vaisių tvirtumas) ir kaip įmanomą ilgesnį vaisių išsilaikymą – tai galima įvertinti nustatant vaisių kvėpavimo intensyvumą (Mangaraj, Goswami, 2008; Fagundes et al., 2013; Choi, Jung, 2014). Šie kokybės rodikliai nustatomi beveik visada, kuomet vertinama vaisių kokybė (Kovač et al., 2010; Winzeler, Schupp, 2011; Unuk et al., 2012).

Tiriamųjų vaisių spalvą vertinome CIEL*a*b* spalvos koordinatėmis, papildomai apskaičiuojant spalvos grynumą (C*) bei spalvos toną (h°). Vaisių tvirtumas įvertintas nustačius odelės ir minkštimo tvirtumą. Papildomai įvertinta vidutinė vaisių masė bei kvėpavimo intensyvumas. Visi šie rodikliai buvo nustatomi šviežiuose vaisiuose.

Vaisių krūvio reguliavimas. Obels vaisių spalvai krūvio reguliavimas vaismedyje įtakos neturėjo (2 lentelė). Pastebėta tik nežymi tendencija, jog didėjant vaisių krūviui, vaisių spalvos tonas artėjo nuo raudonumo link geltonumo, ir tai aiškintume dėl pačių vaisių šešėliavimo vienų kitiems vaismedžio vainike. Vaisių krūvio tyrimuose tyrėjai pateikia tik spalvos tono (Jemrić et al., 2003; Farina et al., 2005) arba bendro vaisių nusispalvinimo rodiklius (Wright et al., 2006; Serra et al., 2016). Pastebėta, jog vaisiai iš mažą krūvį turinčių vaismedžių procentaliai nusispalvina labiau.

Vaisių krūvis vaismedyje vaisių odelės ir minkštimo tvirtumo rodikliams bei kvėpavimo intensyvumui įtakos taip pat neturėjo (3 lentelė), tačiau vaisių masė esmingai didėjo, mažėjant vaisių krūviui. Tokius rezultatus gavo ir kiti mokslininkai (Castro et al. 2015). Tendencija, jog vaisių masė didėja, mažėjant vaisų krūviui, jau senai pastebi dauguma vaisių krūvį tyrinėjančių mokslininkų (Assaf et al. 1982; Erf and Proctor 1987; Forshey and Elfving 1989; Koike et al. 1990; Jones et al. 1997; Palmer et al. 1997; Wünsche et al. 2000). Salvador ir kiti (2006) bei Meland (2009) tyrimai rodo, jog vaisių minkštimo tvirtumo parametrai didėja didėjant vaismedžio vaisių krūviui. Šiuo tyrimu nustatyti vaisių minkštimo tvirtumo rezultatai sutampa ir su anksčiau atliktų tyrimų rezultatais, kurie rodo, jog vaisiaus minkštimo tvirtumas neigiamai koreliuoja su vidutine vaisiaus mase (Johnson, 1994). Kitų mokslininkų tyrimai rodo priešingą tendenciją – didelis vaisių krūvis (daugiau negu 10 vaisių/KSP) sąlygojo mažesnį vaisių tvirtumą (Robinson, Watkins, 2003; Serra et al., 2016).

Atsižvelgiant į tokius prieštaringus rezultatus, galima daryti išvadą, jog pats vaisių krūvio reguliavimas įtakos vaisių minkštimo tvirtumui neturi. Tai gali sąlygoti obuolių veislė, mikroklimato sąlygos bei kiti abiotiniai, biotiniai bei antropogeniniai veiksniai, kurie atliktuose tyrimuose nebuvo įvertinti.

2 lentelė. Vaisių krūvio vaismedyje įtaka obuolių odelės spalvai CIEL*a*b* spalvų koordinačių sistemoje (veislė 'Ligol', 2014-2016 m. vidurkis)

Table 2. Crop load effect on apple skin colour in CIEL*a*b* colour coordinate system (cv. 'Ligol', average 2014-2016)

Spalvos koordinatė Colour coordinate	Vaisių krūvis obelyje, vnt. cm^{-2} KSP Crop load in apple-tree, fruits cm^{-2} TSCA		
	4	8	12
L*	39,3 ± 4,09[a]	38,7 ± 2,11[a]	38,2 ± 2,21[a]
a*	30,8 ± 1,70[a]	30,8 ± 2,04[a]	31,6 ± 2,24[a]
b*	17,1 ± 2,90[a]	16,3 ± 1,71[a]	15,7 ± 1,59[a]
C*	35,5 ± 1,42[a]	35,1 ± 1,52[a]	35,5 ± 1,90[a]
h°	28,9 ± 5,10[a]	27,8 ± 3,52[a]	26,2 ± 3,00[a]

Pastaba: toje pačioje eilutėje esančios skirtingos raidės žymi statistiškai patikimus spalvos koordinatės skirtumus tarp tirtų obuolių ėminių ($p < 0,05$).

Note: the different letters in the same line indicate statistically significant differences between colour coordinate in the apple samples ($p < 0.05$).

3 lentelė. Vaisių krūvio vaismedyje įtaka obuolių fizikiniams ir fiziologiniams rodikliams (veislė 'Ligol', 2014-2016 m. vidurkis)

Table 3. Crop load effect on apple physical and physiological properties (cv. 'Ligol', average 2014-2016)

Rodiklis Characteristic	Vaisių krūvis obelyse, vnt. cm^{-2} KSP Crop load in apple-tree, fruits cm^{-2} TSCA		
	4	8	12
Odelės tvirtumas, N cm^{-2} Skin firmness, N cm^{-2}	406 ± 4,8[a]	409 ± 5,2[a]	406 ± 13,3[a]
Minkštimo tvirtumas, N cm^{-2} Flesh firmness, N cm^{-2}	96 ± 3,0[a]	99 ± 5,6[a]	95 ± 3,5[a]
Vidutinė vaisių masė, g Average fruit weight, g	213 ± 5,4[a]	193 ± 9,5[b]	171 ± 5,9[c]
Kvėpavimo intensyvumas, mg $CO_2 \cdot Kg \cdot h^{-1}$ Respiration rate, mg $CO_2 \cdot Kg \cdot h^{-1}$	3,1 ± 0,44[a]	2,9 ± 0,30[a]	3,2 ± 0,23[a]

Pastaba: Toje pačioje eilutėje esančios skirtingos raidės žymi statistiškai patikimus fizikinių rodiklių skirtumus tarp tirtų obuolių ėminių ($p < 0,05$).

Note. The different letters in the same line indicate statistically significant differences between physical properties in the apple samples ($p < 0.05$).

Vaisių augimo vieta vaismedžio vainike. Obels vaisių vieta vaismedžio vainike turėjo reikšmingą įtaką vaisių spalvai (4 lentelė). Vaisiai skinti iš vainiko apačios turėjo vos rausvą atspalvį, buvo menkai nusispalvinę. Vaisiai iš vainiko viršaus buvo sodriai raudoni, nusispalvinęs vaisių plotas taip pat buvo didelis. Vaisiai, skinti iš rytų ir vakarų pusių, turėjo panašias spalvų charakteristikas kaip ir vaisiai iš viršaus, tačiau buvo šiek tiek geltonesni. Tokias pačias tendencijas nustatė ir kiti mokslininkai (Unuk et al., 2012).

Vainiko vieta įtakoja vaisių spalvą dėl saulės radiacijos poveikio, kuomet vaisių odelėje susintetinama daugiau pigmentų. Vaisiai gaunantys daug saulės šviesos sukaupia daugiau antocianinų, lyginant su vaisiais, kurie saulės šviesos gauna mažiau (Awad et al., 2001a; Jakopic et al., 2009).

4 lentelė. Vaisių augimo vietos vaismedyje įtaka obuolių odelės spalvai CIEL*a*b* spalvų koordinačių sistemoje (veislė 'Ligol', 2014-2016 m. vidurkis)

Table 4. Effect of fruit growth position in apple-tree on apple skin colour in CIEL*a*b* colour coordinate system (cv. 'Ligol', average 2014-2016)

Spalvos koordinatė Colour coordinate	Vaisių vieta obelų vainike / Fruit position in apple-tree crown			
	Apačia / Bottom	Viršus / Top	Rytai / East	Vakarai / West
L*	$53,7 \pm 2,02^{a}$	$33,4 \pm 1,24^{c}$	$37,2 \pm 2,49^{b}$	$36,6 \pm 2,27^{b}$
a*	$16,1 \pm 2,51^{b}$	$30,8 \pm 1,92^{a}$	$31,4 \pm 1,67^{a}$	$30,9 \pm 1,26^{a}$
b*	$28,1 \pm 1,23^{a}$	$12,3 \pm 1,34^{c}$	$15,6 \pm 1,88^{b}$	$14,7 \pm 1,77^{b}$
C*	$36,1 \pm 1,99^{a}$	$33,2 \pm 2,24^{b}$	$35,3 \pm 1,57^{a}$	$34,4 \pm 1,71^{ab}$
h°	$59,5 \pm 4,17^{a}$	$21,6 \pm 1,23^{c}$	$26,4 \pm 3,24^{b}$	$25,2 \pm 2,33^{b}$

Pastaba: Toje pačioje eilutėje esančios skirtingos raidės žymi statistiškai patikimus spalvos koordinatės skirtumus tarp tirtų obuolių ėminių ($p < 0,05$).

Note. The different letters in the same line indicate statistically significant differences between colour coordinate in the apple samples ($p < 0.05$).

Vaisių augimo vieta vaismedžio vainike obels vaisių minkštimo tvirtumui ir kvėpavimo intensyvumui įtakos neturėjo (5 lentelė), tačiau turėjo reikšmingą poveikį odelės tvirtumui ir vidutinei vaisių masei – vaisiai skinti iš vainiko viršaus turėjo tvirtesnę odelę bei didesnę masę, lyginant su vaisiais iš vainiko vidaus. Tai patvirtina ir kitų mokslininkų atlikti tyrimai (Drogoudi, Pantelidis, 2011; Feng et al., 2014). Vaisių masę galėjo sąlygoti saulės šviesa ir dėl to susikaupiantys didesni asimiliatų kiekiai, o kietesnė odelė susiformuoti kaip apsauginė funkcija dėl nepalankių biotinių veiksnių, taip pat dėl geresnio vaisių sunokimo. Vaisiai skinti iš rytų ir vakarų pusės turėjo artimus fizikinius rodiklius kaip ir vaisiai skinti iš vainiko viršūnės.

5 lentelė. Vaisių augimo vietos vaismedyje įtaka obuolių fizikiniams ir fiziologiniams rodikliams (veislė 'Ligol', 2014-2016 m. vidurkis)

Table 5. Effect of fruit growth position in apple-tree on apple physical and physiological properties (cv. 'Ligol', average 2014-2016)

Rodiklis Characteristic	Vaisių vieta obelų vainike Fruit position in apple-tree crown			
	Apačia Bottom	Viršus Top	Rytai East	Vakarai West
Odelės tvirtumas, c Skin firmness, N cm^{-2}	$380 \pm 9{,}5^{b}$	$423 \pm 0{,}4^{a}$	$408 \pm 14{,}5^{a}$	$406 \pm 11{,}8^{ab}$
Minkštimo tvirtumas, N cm^{-2} Flesh firmness, N cm^{-2}	$94 \pm 5{,}0^{a}$	$97 \pm 2{,}5^{a}$	$97 \pm 10{,}2^{a}$	$92 \pm 1{,}3^{a}$
Vidutinė vaisių masė, g Average fruit weight, g	$165 \pm 22{,}6^{b}$	$222 \pm 30{,}5^{a}$	$182 \pm 11{,}9^{ab}$	$175 \pm 9{,}6^{ab}$
Kvėpavimo intens., mg $CO_2 \cdot Kg \cdot h^{-1}$ Respiration rate, mg $CO_2 \cdot Kg \cdot h^{-1}$	$2{,}5 \pm 0{,}24^{a}$	$2{,}2 \pm 0{,}24^{a}$	$2{,}3 \pm 0{,}22^{a}$	$2{,}7 \pm 0{,}30^{a}$

Pastaba: Toje pačioje eilutėje esančios skirtingos raidės žymi statistiškai patikimus fizikinių rodiklių skirtumus tarp tirtų obuolių ėminių ($p < 0{,}05$).

Note. The different letters in the same line indicate statistically significant differences between physical properties in the apple samples ($p < 0.05$).

6 lentelė. Vaismedžių augumo reguliavimo įtaka obuolių odelės spalvai CIEL*a*b* spalvų koordinačių sistemoje (veislė 'Rubin', 2015-2016 m. vidurkis)

Table 6. Effect of apple-tree growth regulation on apple skin colour in CIEL*a*b* colour coordinate system (cv. 'Rubin', average 2015-2016)

Spalvos koordinatė Colour coordinate	Vaismedžių augumo reguliavimo priemonės Tree growth regulation treatments				
	Kontrolė Control	Kamieno įpjovimas Trunk incision	Šaknų genėjimas Root pruning	Pro-Ca	Vasarinis genėjimas Summer pruning
L*	$41{,}8 \pm 3{,}11^{a}$	$41{,}5 \pm 3{,}01^{a}$	$39{,}6 \pm 2{,}47^{a}$	$41{,}3 \pm 2{,}35^{a}$	$40{,}1 \pm 2{,}11^{a}$
a*	$37{,}7 \pm 1{,}63^{a}$	$36{,}8 \pm 1{,}97^{a}$	$37{,}6 \pm 2{,}11^{a}$	$36{,}1 \pm 1{,}94^{a}$	$38{,}0 \pm 2{,}11^{a}$
b*	$21{,}6 \pm 2{,}56^{a}$	$20{,}9 \pm 2{,}25^{a}$	$19{,}7 \pm 2{,}29^{a}$	$21{,}2 \pm 2{,}16^{a}$	$20{,}3 \pm 2{,}09^{a}$
C*	$43{,}6 \pm 1{,}27^{a}$	$42{,}5 \pm 1{,}55^{a}$	$42{,}5 \pm 2{,}70^{a}$	$42{,}0 \pm 1{,}82^{a}$	$43{,}2 \pm 2{,}25^{a}$
h°	$29{,}9 \pm 3{,}71^{a}$	$29{,}6 \pm 3{,}57^{a}$	$27{,}6 \pm 2{,}07^{a}$	$30{,}3 \pm 3{,}09^{a}$	$28{,}0 \pm 2{,}56^{a}$

Pastaba: Toje pačioje eilutėje esančios skirtingos raidės žymi statistiškai patikimus spalvos koordinatės skirtumus tarp tirtų obuolių ėminių ($p < 0{,}05$).

Note. The different letters in the same line indicate statistically significant differences between colour coordinate in the apple samples ($p < 0.05$).

Vaismedžių augumo reguliavimas. Obels vaisių spalvai vaismedžių augumo reguliavimas įtakos neturėjo (6 lentelė). Odelės ir minkštimo tvirtumui, vidutinei vaisių masei bei vaisių kvėpavimo intensyvumui taikytos priemonės taip pat įtakos neturėjo (7 lentelė). Kitų mokslininkų tyrimai tokius rezultatus taip pat patvirtina (Wesley et al., 1990; Duane, Greene, 1999; Li et al., 2003b; Medjdoub et al., 2005; Roux et al., 2006; Mata et al., 2006a; Mata et al., 2006b, Meland, Kasier, 2016).

7 lentelė. Vaismedžių augumo reguliavimo įtaka obuolių fizikiniams ir fiziologiniams rodikliams (veislė 'Rubin', 2015-2016 m. vidurkis)
Table 7. Effect of tree growth regulation on apple physical and physiological properties (cv. 'Rubin', average 2015-2016)

Rodiklis Characteristic	Vaismedžių augumo reguliavimo priemonės Tree growth regulation treatments				
	Kontrolė Control	Kamieno įpjovimas Trunk incision	Šaknų genėjimas Root pruning	Pro-Ca	Vasarinis genėjimas Summer pruning
Odelės tvirtumas, N cm^{-2} Skin firmness, N cm^{-2}	386 ± 17,9[a]	376 ± 9,1[a]	385 ± 4,1[a]	404 ± 21,5[a]	375 ± 16,9[a]
Minkštimo tvirtumas, N cm^{-2} Flesh firmness, N cm^{-2}	104 ± 7,7[a]	104 ± 1,5[a]	98 ± 1,8[a]	110 ± 12,2[a]	93 ± 8,5[a]
Vidutinė vaisių masė, g Average fruit weight, g	225 ± 5,7[a]	228 ± 12,4[a]	214 ± 32,4[a]	232 ± 10,9[a]	234 ± 8,8[a]
Kvėpavimo intensyvumas, mg $CO_2 \cdot Kg \cdot h^{-1}$ Respiration rate, mg $CO_2 \cdot Kg \cdot h^{-1}$	2,4 ± 0,43[a]	2,8 ± 0,20[a]	2,5 ± 0,11[a]	2,4 ± 0,26[a]	3,0 ± 0,38[a]

Pastaba: Toje pačioje eilutėje esančios skirtingos raidės žymi statistiškai patikimus fizikinių rodiklių skirtumus tarp tirtų obuolių ėminių ($p < 0,05$).
Note. The different letters in the same line indicate statistically significant differences between physical properties in the apple samples ($p < 0.05$).

Vaismedžių konkurencinė įtampa. Skirtingas vaismedžių sodinimo atstumas vaisių spalvai įtakos neturėjo (8 lentelė), nors pastebėta tendencija jog tankiausiai susodinti vaismedžiai vedė truputį geltonesnio tono vaisius. Panaši tendencija nustatyta ir kitų mokslininkų (Stampar et al., 1998). Odelės ir minkštimo tvirtumui bei kvėpavimo intensyvumui sodinimo atstumas taip pat neturėjo įtakos (9 lentelė). Patikimai didesnė buvo tik vaisų masė, kuri didėjo vaismedžius auginant rečiau. Panašūs rezultatai dėl vaisių masės ir sodinimo atstumo gauti ir kitų mokslininkų (Uselis, 2006; Šabajevienė ir kt., 2009). Šį masės didėjimą vaisiuose iš rečiau pasodintų obelų galima paaiškinti didesniu asimiliatų kiekiu tenkančių vaisiams dėl mažesnės vaismedžių konkurencijos, taip pat dėl šiek tiek

didesnio saulės šviesos patekimo į vaismedžių vainiką, kadangi rečiau susodinti vaismedžiai mažiau šešėliuoja vieni kitus.

8 lentelė. Vaismedžių sodinimo atstumų įtaka obuolių odelės spalvai CIEL*a*b* spalvų koordinačių sistemoje (veislė 'Auksis', 2015-2016 m. vidurkis)

Table 8. Apple-tree planting distance effect on apple skin colour in CIEL*a*b* colour coordinate system (cv. 'Auksis', average 2015-2016)

Spalvos koordinatė Colour coordinate	Vaismedžių sodinimo atstumas, m Fruit-tree planting distance, m		
	3 x 1,50	3 x 1,00	3 x 0,50
L*	51,7 ± 4,25[a]	50,9 ± 3,00[a]	54,0 ± 3,75[a]
a*	26,0 ± 5,61[a]	27,0 ± 4,25[a]	22,9 ± 6,13[a]
b*	24,0 ± 2,92[a]	23,9 ± 1,95[a]	25,9 ± 3,31[a]
C*	37,2 ± 1,97[a]	37,7 ± 1,73[a]	38,0 ± 1,19[a]
h°	43,8 ± 9,60[a]	42,5 ± 6,52[a]	49,2 ± 10,28[a]

Pastaba: Toje pačioje eilutėje esančios skirtingos raidės žymi statistiškai patikimus spalvos koordinatės skirtumus tarp tirtų obuolių ėminių ($p < 0,05$).

Note. The different letters in the same line indicate statistically significant differences between colour coordinate in the apple samples ($p < 0.05$).

9 lentelė. Vaismedžių sodinimo atstumų įtaka obuolių fizikiniams ir fiziologiniams rodikliams (veislė 'Auksis', 2015-2016 m. vidurkis)

Table 9. Fruit-tree planting distance effect on apple physical and physiological properties (cv. 'Auksis', average 2015-2016)

Rodiklis Characteristic	Vaismedžių sodinimo atstumas, m Fruit-tree planting distance, m		
	3 x 1,50	3 x 1,00	3 x 0,50
Odelės tvirtumas, N cm^{-2} Skin firmness, N cm^{-2}	392 ± 3,7[a]	385 ± 15,0[a]	391 ± 11,9[a]
Minkštimo tvirtumas, N cm^{-2} Flesh firmness, N cm^{-2}	89 ± 4,5[a]	89 ± 5,0[a]	89 ± 0,8[a]
Vidutinė vaisių masė, g Average fruit weight, g	158 ± 7,8[a]	147 ± 8,0[ab]	134 ± 7,1[b]
Kvėpavimo intensyvumas, mg $CO_2 \cdot Kg \cdot h^{-1}$ Respiration rate, mg $CO_2 \cdot Kg \cdot h^{-1}$	2,8 ± 0,50[a]	3,0 ± 0,54[a]	2,8 ± 0,18[a]

Pastaba: Toje pačioje eilutėje esančios skirtingos raidės žymi statistiškai patikimus fizikinių rodiklių skirtumus tarp tirtų obuolių ėminių ($p < 0,05$).

Note. The different letters in the same line indicate statistically significant differences between physical properties in the apple samples ($p < 0.05$).

Vaismedžių geografinė augimo vieta. Veislės 'Auksis' obuolių raudonos spalvos tonas didžiausias buvo Estijoje, mažiausias – Lenkijoje (10 lentelė). Nustatėme statistiškai patikimą tendenciją, jog veislės 'Auksis' obuoliai geriau nusispalvina šiauriniuose regionuose. Lenkijoje išaugę obuoliai buvo šviesesni ir labiau geltoni, Estijoje – tamsesnės raudonos spalvos. Lietuvoje išaugę obuoliai pasižymėjo tarpiniu spalvos tonu tarp Lenkijoje ir Estijoje išaugusių obuolių. Obuolių odelės ir minkštimo tvirtumas taip pat didesnis buvo Lietuvoje bei Estijoje (11 lentelė), tačiau vidutinė vaisių masė turėjo priešingą tendenciją – didžiausi obuoliai užaugo Lenkijoje, mažiausi – Estijoje. Didžiausias vaisių kvėpavimo intensyvumas nustatytas Lenkijoje, mažiausias – Estijoje. Tai rodo, jog obuoliai išaugę šiauriau, turi potencialiai ilgesnį išsilaikymo laikotarpį.

Veislės 'Ligol' obuolių raudonos spalvos tonas buvo didžiausias Lenkijoje, mažiausias – Estijoje (12 lentelė). Tai priešinga tendencija, negu buvo stebėta veislės 'Auksis' obuoliuose. Vaisių odelės ir minkštimo tvirtumo tendencija išliko tokia pati kaip ir veislės 'Auksis' obuoliuose – tvirtesnis obuoliai išaugo Estijoje (13 lentelė). Vidutinė vaisių masė taip pat buvo mažiausia Estijoje, didžiausia – Lenkijoje. Didžiausias vaisių kvėpavimo intensyvumas nustatytas Estijoje, mažiausias – Lenkijoje. Tai priešinga tendencija negu veislės 'Auksis' obuoliuose, todėl galima daryti išvadą, jog veislės 'Auksis' veislės obuoliai labiau tinkami augti šiauriniuose regionuose, o ‘Ligol’ – pietiniuose. Tai galima paaiškinti skirtinga šių veislių genetine kilme bei pasireiškiančia genų raiška atitinkamuose auginimo regionuose.

10 lentelė. Geografinės vaismedžių augimo vietos įtaka obuolių odelės spalvai CIEL*a*b* spalvų koordinačių sistemoje (veislė 'Auksis', 2015-2016 m. vidurkis)
Table 10. Geographical fruit-tree growing location effect on apple skin colour in CIEL*a*b* colour coordinate system (cv. ‘Auksis’, average 2015-2016)

Spalvos koordinatė Colour coordinate	Geografinė vietovė / Geographical location		
	Lenkija / Poland	Lietuva / Lithuania	Estija / Estonia
L*	$47,7 \pm 0,62^{a}$	$44,3 \pm 0,26^{b}$	$40,5 \pm 0,82^{c}$
a*	$28,2 \pm 0,11^{c}$	$33,7 \pm 1,27^{b}$	$37,4 \pm 0,29^{a}$
b*	$24,8 \pm 0,49^{a}$	$21,3 \pm 0,26^{b}$	$19,9 \pm 0,41^{b}$
C*	$38,2 \pm 0,39^{b}$	$40,1 \pm 0,90^{a}$	$42,4 \pm 0,06^{a}$
h°	$41,0 \pm 0,45^{a}$	$32,6 \pm 1,21^{b}$	$28,0 \pm 0,75^{c}$

Pastaba: Toje pačioje eilutėje esančios skirtingos raidės žymi statistiškai patikimus spalvos koordinatės skirtumus tarp tirtų obuolių ėminių ($p < 0,05$).
Note. The different letters in the same line indicate statistically significant differences between colour coordinate in the apple samples ($p < 0.05$).

11 lentelė. Geografinės vaismedžių augimo vietos įtaka obuolių fizikiniams ir fiziologiniams rodikliams (veislė 'Auksis', 2015-2016 m. vidurkis)

Table 11. Geographical fruit-tree growing location effect on apple physical and physiological properties (cv. 'Auksis', average 2015-2016)

Rodiklis Characteristic	Geografinė vietovė / Geographical location		
	Lenkija Poland	Lietuva Lithuania	Estija Estonia
Odelės tvirtumas, N cm^{-2} Skin firmness, N cm^{-2}	$294 \pm 22,6^{b}$	$348 \pm 12,1^{a}$	$324 \pm 8,8^{ab}$
Minkštimo tvirtumas, N cm^{-2} Flesh firmness, N cm^{-2}	$60 \pm 3,3^{b}$	$77 \pm 3,2^{a}$	$82 \pm 2,5^{a}$
Vidutinė vaisių masė, g Average fruit weight, g	$198 \pm 5,3^{a}$	$176 \pm 2,4^{b}$	$140 \pm 0,4^{c}$
Kvėpavimo intensyvumas, mg $CO_2 \cdot Kg \cdot h^{-1}$ Respiration rate, mg $CO_2 \cdot Kg \cdot h^{-1}$	$3,1 \pm 0,25^{a}$	$2,7 \pm 0,05^{ab}$	$2,4 \pm 0,10^{b}$

Pastaba: Toje pačioje eilutėje esančios skirtingos raidės žymi statistiškai patikimus fizikinių rodiklių skirtumus tarp tirtų obuolių ėminių ($p < 0,05$).

Note. The different letters in the same line indicate statistically significant differences between physical properties in the apple samples ($p < 0.05$).

12 lentelė. Geografinės vaismedžių augimo vietos įtaka obuolių odelės spalvai CIEL*a*b* spalvų koordinačių sistemoje (veislė 'Ligol', 2015-2016 m. vidurkis)

Table 12. Geographical fruit-tree growing location effect on apple skin colour in CIEL*a*b* colour coordinate system (cv. 'Ligol', average 2015-2016)

Spalvos koordinatė Colour coordinate	Geografinė vietovė / Geographical location		
	Lenkija / Poland	Lietuva / Lithuania	Estija / Estonia
L*	$36,2 \pm 1,25^{b}$	$43,2 \pm 1,07^{a}$	$41,6 \pm 1,07^{a}$
a*	$29,7 \pm 0,41^{b}$	$28,9 \pm 0,30^{b}$	$31,8 \pm 0,23^{a}$
b*	$14,4 \pm 1,11^{b}$	$19,9 \pm 0,68^{a}$	$19,1 \pm 0,73^{a}$
C*	$33,1 \pm 0,21^{c}$	$35,5 \pm 0,64^{b}$	$37,3 \pm 0,18^{a}$
h°	$26,0 \pm 2,06^{b}$	$34,8 \pm 0,64^{a}$	$31,3 \pm 1,16^{ab}$

Pastaba: Toje pačioje eilutėje esančios skirtingos raidės žymi statistiškai patikimus spalvos koordinatės skirtumus tarp tirtų obuolių ėminių ($p < 0,05$).

Note. The different letters in the same line indicate statistically significant differences between colour coordinate in the apple samples ($p < 0.05$).

13 lentelė. Geografinės vaismedžių augimo vietos įtaka obuolių fizikiniams ir fiziologiniams rodikliams (veislė 'Ligol', 2015-2016 m. vidurkis)

Table 13. Geographical fruit-tree growing location effect on apple physical and physiological properties (cv. 'Ligol', average 2015-2016)

Rodiklis Characteristic	Geografinė vietovė / Geographical location		
	Lenkija Poland	Lietuva Lithuania	Estija Estonia
Odelės tvirtumas, N cm^{-2} Skin firmness, N cm^{-2}	$454 \pm 14{,}4^{b}$	$450 \pm 11{,}2^{b}$	$502 \pm 10{,}7^{a}$
Minkštimo tvirtumas, N cm^{-2} Flesh firmness, N cm^{-2}	$97 \pm 3{,}7^{b}$	$108 \pm 5{,}5^{b}$	$137 \pm 5{,}1^{a}$
Vidutinė vaisių masė, g Average fruit weight, g	$243 \pm 8{,}7^{a}$	$207 \pm 1{,}8^{b}$	$188 \pm 9{,}6^{c}$
Kvėpavimo intensyvumas, mg $CO_2 \cdot Kg \cdot h^{-1}$ Respiration rate, mg $CO_2 \cdot Kg \cdot h^{-1}$	$2{,}1 \pm 0{,}19^{b}$	$3{,}1 \pm 0{,}08^{a}$	$3{,}4 \pm 0{,}07^{a}$

Pastaba: Toje pačioje eilutėje esančios skirtingos raidės žymi statistiškai patikimus fizikinių rodiklių skirtumus tarp tirtų obuolių ėminių ($p < 0{,}05$).

Note. The different letters in the same line indicate statistically significant differences between physical properties in the apple samples ($p < 0.05$).

***

Vaisių krūvio *reguliavimas obelyse vaisių spalvai, tvirtumui ir kvėpavimui įtakos neturėjo, tačiau vidutinė vaisių masė proporcingai didėjo mažėjant vaisių krūviui – vaisiai, auginti mažą vaisių krūvį turinčiuose vaismedžiuose buvo iki 25 proc. sunkesni nei vaisiai auginti didelio vaisių krūvio vaismedžiuose. Tai paaiškinama didesniu tenkančių asimiliatų ir gaunamos saulės šviesos kiekiu kiekvienam vaisiui.*

Vaisių augimo vieta *obels vainike turėjo reikšmingą įtaką vaisių spalvai, odelės tvirtumui ir vidutinei vaisių masei. Vaisiai išaugę vainiko viršuje turėjo iki 11 proc. tvirtesnę odelę, iki 35 proc. didesnę masę, bei buvo geriau nusispalvinę, lyginant su vaisiais, augusiais obels vainiko apačioje ir viduje. Vaisiai, augę rytinėje ir vakarinėje pusėje, savo fizikiniais ir fiziologiniais rodikliais buvo artimesni vaisiams augusiems obels viršūnėje. Šiuos rezultatus galima paaiškinti vaisiams tenkančiu skirtingu saulės šviesos kiekiu bei skirtingu vaisių sunokimu.*

Vaismedžių augumo reguliavimas *įtakos obels vaisių spalvai, tvirtumui, vidutinei vaisių masei bei kvėpavimo intensyvumui statistiškai reikšmingos įtakos neturėjo.*

Vaismedžių konkurencinė įtampa *obels vaisių spalvai, tvirtumui bei kvėpavimui įtakos neturėjo, patikimai didesnė buvo tik vaisių masė, kuri didėjo vaismedžius auginant rečiau. Obelys augintos kas 1,50 m vedė iki 18 proc. sunkesnius vaisius, lyginant su obelimis, augintomis kas 0,50 m. Tai galima paaiškinti tuo, jog tankiau susodintos obelys labiau*

konkuruoja tarpusavyje dėl maistinių medžiagų, vandens ir saulės šviesos, todėl užaugina mažesnės masės vaisius.

***Vaismedžių geografinė augimo vieta** turėjo ženklią įtaką obels vaisių fizikiniams ir fiziologiniams rodikliams. Veislės 'Auksis' obuoliai geriau nusispalvina tirtame šiaurės-rytiniame regione, o 'Ligol' – pietiniame. Veislės 'Auksis' obuoliai buvo iki 18 proc., o veislės 'Ligol' – iki 11 proc., tvirtesni šiaurės-rytiniame regione negu pietiniame. Abiejų veislių obuolių masė didžiausia buvo pietiniame regione: Lenkijoje užaugintų veislės 'Auksis' obuolių vidutinė masė buvo iki 41 proc. didesnė negu obuoliuose užaugintuose Estijoje, veislės 'Ligol' – iki 29 proc.. Tai galima paaiškinti šiltesniu klimatu ir didesniu gaunamos saulės šviesos kiekiu. Vaisių kvėpavimas tarp veislių buvo priešingas – veislės 'Auksis' obuoliai geriau išsilaiko, kuomet buvo išauginti šiaurės-rytiniame regione (obuolių kvėpavimo intensyvumas Lenkijoje vyko apie 29 proc. sparčiau negu obuoliuose iš Estijos), o veislės 'Ligol' – pietiniame regione (obuolių kvėpavimas Estijoje vyko apie 62 proc. intensyviau, negu obuoliuose iš Lenkijos). Tai būtų galima paaiškinti skirtinga šių veislių genetine kilme bei genų raiška atitinkamose klimatinėse sąlygose.*

Taigi, didžiausią įtaką vaisių odelės ir minkštimo tvirtumui, vidutinei masei bei kvėpavimo intensyvumui turėjo geografinė vaismedžių augimo vieta, o vaisių spalvai – vaisių vieta vaismedžio vainike. Priklausomai nuo biologinių veiksnių bei obelyse taikytų technologinių priemonių, obels vaisių odelės tvirtumą galima padidinti iki 18 proc., minkštimo tvirtumą ir vidutinę vaisių masę – iki 41 proc., o vaisių kvėpavimo intensyvumą sumažinti iki 38 proc.

3.2. Cheminės sudėties įvairavimas obels vaisiuose

Kitas vartotojams ir augintojams svarbus vaisių kokybės rodiklis yra cheminė vaisių sudėtis, o ypatingai tirpios sausosios medžiagos, cukrų kiekis, rūgštingumas bei jų santykis, kas sąlygoja vaisių skonį. Šie kokybės rodikliai nustatomi beveik visada, kuomet vertinama vaisių kokybė (Kviklienė et al., 2006; Goliáš et al., 2008; Mziou et al., 2009; Petkovšek et al., 2009). Tirpios sausosios medžiagos taip pat svarbios vaisių kvėpavimui ir masės nuostoliams, o tai turi įtakos vaisių išsilaikymo rodikliams (Farooq et al., 2012; Fagundes et al., 2013). Lyginant su kitais vaisiais, obuoliuose askorbo rūgšties (vitamino C) yra mažai, tačiau įvertinus didelį obuolių suvartojimą, šis rodiklis taip pat dažnai yra įvertinamas moksliniuose tyrimuose (Varming et al., 2013).

Tiriamųjų vaisių cheminė sudėtis įvertinta nustačius bendrą cukrų kiekį, tirpias sausąsias medžiagas, askorbo rūgšties kiekį, titruojamąjį rūgštingumą bei sausąsias medžiagas. Kadangi cukrūs ir rūgštingumas yra svarbus rodiklis, lemiantis vaisių organoleptines savybes, papildomai įvertinta obuolių rūgštis ir cukrų kokybinė bei kiekybinė sudėtis. Obuolių rūgštis yra dominuojanti obuoliuose (Campeanu et al., 2009) ir yra glaudžiai susijusi su titruojamuoju rūgštingumu (Markowski et al., 2009). Nour ir kitų (2010) tyrime nustatyta, kad obuolių rūgštis veislės 'Red Boskoop' obuoliuose sudarė 1993,7 mg 100 g^{-1}, kai tuo tarpu citrinų rūgštis ir askorbo rūgštis sudarė tik 16,3 ir 18,7 mg 100 g^{-1} atitinkamai, todėl papildomai kitų organinių rūgščių šiame darbe netyrėme.

Vaisių krūvio reguliavimas. Obels vaisių cheminei sudėčiai vaisių krūvis vaismedyje įtakos neturėjo (14 lentelė). Kai kurie mokslininkai (Radivojevic at al. 2014; Castro et al. 2015) vaisių krūvio įtakos tirpių sausųjų medžiagų kiekiui bei titruojamajam rūgštingumui nenustatė, tačiau dar kitų mokslininkų tyrimai rodo, jog tirpių sausųjų medžiagų kiekio ir rūgštingumo parametrai didėja didėjant vaismedžio vaisių krūviui (Salvador et al., 2006; Meland, 2009). Dar kitų mokslininkų tyrimai rodo priešingą tendenciją – didelis vaisių krūvis sąlygojo mažesnį vaisių rūgštingumą, mažesnę sausųjų bei tirpių sausųjų medžiagų sintezę vaisiuose (Robinson, Watkins 2003; Serra et al., 2016).

Šiuos prieštaringus įvairių mokslininkų rezultatus esame aprašę straipsnyje „Vaisių krūvio reguliavimas vaismedžiuose (apžvalga)" (Viškelis, Kviklys, 2017).

Šviežiuose vaisiuose bendras cukrų kiekis nekito, tačiau įvertinus obuolių cukrų kokybinę sudėti, nustatyta, jog individualūs junginiai skyrėsi, nepaisant jog suminis tirtų cukrų kiekis taip pat buvo beveik vienodas (15 lentelė). Esant didesniam vaisių krūviui reikšmingai didėjo gliukozės kiekis, tačiau mažėjo sacharozės ir sorbitolio kiekiai. Didesnius kiekius obuolių rūgšties, sacharozės ir sorbitolio vaisiuose iš žemo vaisių krūvio vaismedžių nustatė ir kiti mokslininkai (Jakopič et al., 2013). Mūsų tyrime obuolių rūgšties kiekis vaisiuose tarp tirtų variantų reikšmingai nesiskyrė, tačiau tendencija išliko tokia pati – vaisiai skinti nuo mažesnį vaisių krūvį turinčių obelų buvo nežymiai rūgštesni.

Fruktozė ir sacharozė sudarė pagrindinę dalį visų cukrų, tai patvirtina ir kitų mokslininkų darbai (Hecke et al., 2006; Teo et al., 2006; Petkovsek et al., 2007). Sorbitolis

yra pirminis fotosintezės produktas, kuris vaisiuose vėliau paverčiamas į fruktozę, ir tai paaiškina didelį fruktozės ir mažą sorbitolio kiekį vaisiuose (Zhou et al., 2006).

Individualūs cukrai obels vaisiuose iš skirtingą vaisių krūvį turinčių vaismedžių yra mažai tyrinėti, tačiau fiziologinis ir biocheminis vaismedžių atsakas į vaisių krūvio reguliavimą yra ištyrinėtas gerai (Wünsche et al., 2005; Samuolienė ir kt., 2016a; Samuolienė ir kt., 2016b).

14 lentelė. Vaisių krūvio vaismedyje įtaka obuolių cheminei sudėčiai (veislė 'Ligol', 2014-2016 m. vidurkis)

Table 14. Crop load effect on apple chemical composition (cv. 'Ligol', average 2014-2016)

Rodiklis Parameter	Vaisių krūvis vaismedyje, vnt. cm^{-2} KSP Crop load in fruit-tree, fruits cm^{-2} TSCA		
	4	8	12
Bendras cukrų kiekis, % Total sugar content, %	12,1 ± 0,02[a]	12,3 ± 0,34[a]	12,3 ± 0,22[a]
Tirpios sausosios medžiagos, % Dry soluble solids, %	13,4 ± 0,07[a]	13,6 ± 0,32[a]	13,6 ± 0,17[a]
Askorbo rūgštis, mg 100 g^{-1} Ascorbic acid, mg 100 g^{-1}	7,7 ± 0,13[a]	7,7 ± 0,13[a]	7,8 ± 0,08[a]
Titruojamasis rūgštingumas, % Titratable acidity, %	0,48 ± 0,01[a]	0,48 ± 0,01[a]	0,46 ± 0,01[a]
Sausosios medžiagos, % Dry matter, %	15,5 ± 0,19[a]	15,5 ± 0,40[a]	15,8 ± 0,28[a]

Pastaba: Toje pačioje eilutėje esančios skirtingos raidės žymi statistiškai patikimus cheminės sudėties rodiklių kiekybinius skirtumus tarp tirtų obuolių ėminių ($p < 0,05$).

Note. The different letters in the same line indicate statistically significant quantitative differences between chemical composition elements in the apple samples ($p < 0.05$).

15 lentelė. Vaisių krūvio vaismedyje įtaka cukrų, sorbitolio ir obuolių rūgšties sudėties įvairavimui obuolių ėminiuose, mg g^{-1} SM (veislė 'Ligol', 2014-2016 m. vidurkis)

Table 15. Crop load effect on apple sugar, sorbitol and malic acid composition, mg g^{-1} DW (cv. 'Ligol', average 2014-2016)

Junginys Compound	Vaisių krūvis vaismedyje, vnt. cm^{-2} KSP Crop load in fruit-tree, fruits cm^{-2} TSCA		
	4	8	12
Fruktozė / Fructose	446,9 ± 22,35[a]	463,8 ± 23,19[a]	477,5 ± 23,88[a]
Gliukozė / Glucose	75,6 ± 3,78[c]	92,1 ± 4,61[b]	112,5 ± 5,62[a]
Sacharozė / Sucrose	289,9 ± 14,49[a]	244,9 ± 12,25[b]	224,8 ± 11,24[b]
Sorbitolis / Sorbitol	26,2 ± 1,31[a]	22,0 ± 1,10[b]	21,3 ± 1,06[b]
Obuolių rūgštis / Malic acid	41,4 ± 2,07[a]	41,6 ± 2,08[a]	39,2 ± 1,96[a]

Pastaba: Toje pačioje eilutėje esančios skirtingos raidės žymi statistiškai patikimus individualių junginių kiekių skirtumus tarp tirtų obuolių ėminių ($p < 0,05$).

Note. The different letters in the same line indicate statistically significant differences between the individual compounds in the apple samples ($p < 0.05$).

Vaisių augimo vieta vaismedžio vainike. Obuoliai, skinti iš vainiko išorinės dalies (viršaus, rytų bei vakarų pusių) sukaupė daugiau cukraus, pasižymėjo didesniu tirpių sausųjų ir sausųjų medžiagų kiekiu (16 lentelė). Tokias pačias tendencijas nustatė ir kiti mokslininkai (Nilsson, Gustavsson, 2007; Feng et al., 2014). Tai paaiškinama tuo, jog lapai tose vainiko dalyse yra geriau apšviesti ir juose vyksta intensyvesnė fotosintezė, todėl šalia esantiems vaisiams tenka daugiau asimiliatų (Barritt et al., 1987).

Sorbitolio ir sacharozės kiekis vaisiuose iš vidinės vainiko dalies buvo mažesnis, negu iš kitų vainiko dalių (17 lentelė). Tai vėlgi paaiškinama tuo, jog sorbitolis ir sacharozė yra tiesiogiai į vaisius perduodami cukrai iš šalia esančių fotosintetinančių lapų. Ši tendencija sutampa su kitų mokslininkų rezultatais (Feng et al., 2014).

Daugiau obuolių rūgšties nustatyta vaisiuose iš vainiko apačios bei rytinės pusės. Nors šviežiuose vaisiuose iš išorinės vainiko dalies titruojamasis rūgštingumas buvo šiek tiek didesnis, labiau pasikliaujame tikslesniu ESC metodu, kuris parodė priešingą tendenciją. Tai, jog vaisių iš išorinės vainiko dalies rūgštingumas yra mažesnis, nustatė ir kiti mokslininkai (Nilsson, Gustavsson, 2007). Dar kiti mokslininkai nustatė, jog obuolių rūgšties kiekis nuo vainiko padėties nesiskyrė (Krishnaprakash et al., 1983; Feng et al., 2014).

16 lentelė. Vaisių augimo vietos vaismedyje įtaka obuolių cheminei sudėčiai (veislė 'Ligol', 2014-2016 m. vidurkis)

Table 16. Effect of fruit growth position in tree on apple chemical composition (cv. 'Ligol', average 2014-2016)

Rodiklis Parameter	Vaisių vieta obelų vainike Fruit position in apple-tree crown			
	Apačia Bottom	Viršus Top	Rytai East	Vakarai West
Bendras cukrų kiekis, % Total sugar content, %	11,7 ± 0,29^{b}	12,4 ± 0,06^{a}	12 ± 0,17^{ab}	12,1 ± 0,14^{ab}
Tirpios sausosios medžiagos, % Dry soluble solids, %	12,9 ± 0,32^{a}	13,5 ± 0,05^{a}	13,3 ± 0,36^{a}	13,5 ± 0,20^{a}
Askorbo rūgštis, mg 100 g^{-1} Ascorbic acid, mg 100 g^{-1}	7,7 ± 0,13^{a}	7,8 ± 0,15^{a}	7,9 ± 0,00^{a}	7,6 ± 0,08^{a}
Titruojamasis rūgštingumas, % Titratable acidity, %	0,48 ± 0,02^{b}	0,46 ± 0,00^{b}	0,50 ± 0,02^{ab}	0,53 ± 0,01^{a}
Sausosios medžiagos, % Dry matter, %	14,4 ± 0,42^{b}	15,2 ± 0,24^{a}	14,9 ± 0,36^{ab}	15,2 ± 0,27^{a}

Pastaba: Toje pačioje eilutėje esančios skirtingos raidės žymi statistiškai patikimus cheminės sudėties rodiklių kiekybinius skirtumus tarp tirtų obuolių ėminių ($p < 0,05$).

Note. The different letters in the same line indicate statistically significant quantitative differences between chemical composition elements in the apple samples ($p < 0.05$).

17 lentelė. Vaisių vietos vaismedyje įtaka cukrų, sorbitolio ir obuolių rūgšties sudėties įvairavimui obuolių ėminiuose, mg g^{-1} SM (veislė 'Ligol', 2014-2016 m. vidurkis)

Table 17. Effect of fruit position in tree on apple sugar, sorbitol and malic acid composition, mg g^{-1} DW (cv. 'Ligol', average 2014-2016)

Junginys Compound	Vaisių vieta obelų vainike / Fruit position in apple-tree crown			
	Apačia / Bottom	Viršus / Top	Rytai / East	Vakarai / West
Fruktozė / Fructose	505,6 ± 25,28 ^{a}	447,2 ± 22,36 ^{a}	460,6 ± 23,03 ^{a}	493,9 ± 24,69 ^{a}
Gliukozė / Glucose	101,6 ± 5,08 ^{a}	82,9 ± 4,15 ^{b}	87,5 ± 4,38 ^{b}	90,3 ± 4,52 ^{ab}
Sacharozė / Sucrose	229,2 ± 11,46 ^{a}	260,6 ± 13,03 ^{a}	256,4 ± 12,82 ^{a}	251,5 ± 12,57 ^{a}
Sorbitolis / Sorbitol	15,4 ± 0,77 ^{c}	23,2 ± 1,16 ^{a}	18,9 ± 0,95 ^{b}	23,4 ± 1,17 ^{a}
Obuolių rūgštis Malic acid	45,8 ± 2,29 ^{a}	40,2 ± 2,01 ^{b}	42,7 ± 2,14 ^{ab}	40,1 ± 2,01 ^{b}

Pastaba: Toje pačioje eilutėje esančios skirtingos raidės žymi statistiškai patikimus individualių junginių kiekių skirtumus tarp tirtų obuolių ėminių ($p < 0,05$).

Note. The different letters in the same line indicate statistically significant differences between the individual compounds in the apple samples ($p < 0.05$).

Vaismedžių augumo reguliavimas. Obelų augumo reguliavimas vaisių bendram cukrų kiekiui, tirpioms sausosioms ir sausosioms medžiagoms, titruojamajam rūgštingumui ir askorbo rūgšties kiekiui įtakos neturėjo (18 lentelė). Kiti mokslininkai taip pat gavo panašius rezultatus (Li et al., 2003b; Medjdoub et al., 2005; Roux et al., 2006; Mata et al., 2006a; Mata et al., 2006b; Meland, Kasier, 2016). Nors bendras cukrų kiekis tarp taikytų skirtingų priemonių nesiskyrė, kokybinė cukrų sudėtis ir obuolių rūgšties kiekis skyrėsi (19 lentelė). Vaismedžiai purkšti kalcio proheksadionu sukaupė daugiau gliukozės, tačiau mažiau sacharozės. Ūglių genėjimas vasarą lėmė vaisiuose didesnius sacharozės ir sorbitolio kiekius. Kamieno įpjovimas padidino obuolių rūgšties kiekį vaisiuose. Šiuos skirtumus, priklausomai nuo taikytos technologinės priemonės, lėmė vaismedžiams tenkančių maisto medžiagų apribojimas, asimiliatų pasiskirstymo tarp vaismedžio organų reguliavimas ar lapų ploto sumažinimas.

18 lentelė. Vaismedžių augumo reguliavimo įtaka obuolių cheminei sudėčiai (veislė 'Rubin', 2015-2016 m. vidurkis)

Table 18. Effect of tree growth regulation on apple chemical composition (cv. 'Rubin', average 2015-2016)

Rodiklis Parameter	Vaismedžių augumo reguliavimo priemonės Tree growth regulation treatments				
	Kontrolė Control	Kamieno įpjovimas Trunk incision	Šaknų genėjimas Root pruning	Pro-Ca	Vasarinis genėjimas Summer pruning
Bendras cukrų kiekis, % Total sugar content, %	12,9 ± 0,64 [a]	12,8 ± 0,06 [a]	12,9 ± 0,23 [a]	13,0 ± 0,14 [a]	13,4 ± 0,25 [a]
Tirpios sausosios medžiagos, % Dry soluble solids, %	14,4 ± 0,67 [a]	14,4 ± 0,12 [a]	14,4 ± 0,26 [a]	14,2 ± 0,46 [a]	14,7 ± 0,23 [a]
Askorbo rūgštis, mg 100 g^{-1} Ascorbic acid, mg 100 g^{-1}	8,0 ± 0,00 [a]	8,1 ± 0,12 [a]	8,0 ± 0,00 [a]	8,1 ± 0,12 [a]	8,0 ± 0,00 [a]
Titruojamasis rūgštingumas, % Titratable acidity, %	0,69 ± 0,03 [a]	0,70 ± 0,04 [a]	0,67 ± 0,04 [a]	0,67 ± 0,03 [a]	0,61 ± 0,05 [a]
Sausosios medžiagos, % Dry matter, %	16,4 ± 0,88 [a]	16,4 ± 0,46 [a]	16,3 ± 0,18 [a]	16,0 ± 0,33 [a]	16,9 ± 0,42 [a]

Pastaba: Toje pačioje eilutėje esančios skirtingos raidės žymi statistiškai patikimus cheminės sudėties rodiklių kiekybinius skirtumus tarp tirtų obuolių ėminių ($p < 0,05$).

Note. The different letters in the same line indicate statistically significant quantitative differences between chemical composition elements in the apple samples ($p < 0.05$).

19 lentelė. Vaismedžių augumo reguliavimo įtaka cukrų, sorbitolio ir obuolių rūgšties sudėties įvairavimui obuolių ėminiuose, mg g^{-1} SM (veislė 'Rubin', 2015-2016 m. vidurkis)
Table 19. Effect of tree growth regulation on apple sugar, sorbitol and malic acid composition, mg g^{-1} DW (cv. 'Rubin', average 2015-2016)

Junginys Compound	Vaismedžių augumo reguliavimo priemonės Tree growth regulation treatments				
	Kontrolė Control	Kamieno įpjovimas Trunk incision	Šaknų genėjimas Root pruning	Pro-Ca	Vasarinis genėjimas Summer pruning
Fruktozė Fructose	432,3 ± 21,61[a]	433,0 ± 21,65 [a]	431,2 ± 21,56 [a]	463,2 ± 23,16 [a]	418,9 ± 20,94 [a]
Gliukozė Glucose	84,0 ± 4,20[b]	95,8 ± 4,79 [ab]	87,6 ± 4,38 [b]	102,2 ± 5,11 [a]	84,5 ± 4,22 [b]
Sacharozė Sucrose	276,9 ± 13,84[ab]	270,4 ± 13,52 [ab]	276,7 ± 13,84 [ab]	241,9 ± 12,10 [b]	288,7 ± 14,44 [a]
Sorbitolis Sorbitol	27,9 ± 1,39[b]	30,3 ± 1,51 [ab]	28,5 ± 1,42 [b]	26,4 ± 1,32 [b]	33,7 ± 1,69 [a]
Obuolių rūgštis Malic acid	45,9 ± 2,29[ab]	49,7 ± 2,49 [a]	43,3 ± 2,16 [b]	43,6 ± 2,18 [b]	41,0 ± 2,05 [b]

Pastaba: Toje pačioje eilutėje esančios skirtingos raidės žymi statistiškai patikimus individualių junginių kiekių skirtumus tarp tirtų obuolių ėminių ($p < 0,05$).
Note. The different letters in the same line indicate statistically significant differences between the individual compounds in the apple samples ($p < 0.05$).

Vaismedžių konkurencinė įtampa. Vaismedžių sodinimo atstumas vaisių cheminei sudėčiai reikšmingos įtakos neturėjo (20 lentelė). Šie vaisiai kokybine ir kiekybine cukrų sudėtimi bei obuolių rūgšties kiekiu taip pat nesiskyrė (21 lentelė). Kitų mokslininkų darbuose pastebėta tendencija, jog tankesnis vaismedžių auginimas prastino vaisių kokybę – nustatyta mažiau tirpiųjų sausųjų medžiagų, sacharozės, gliukozės, fruktozės, sorbitolio, obuolių ir citrinos rūgšties (Stampar et al., 1998). Tai gali būti paaiškinama dėl tirtų skirtingų veislių, kurios į nepalankias sąlygas (konkurencinę įtampą) gali reaguoti skirtingai.

20 lentelė. Vaismedžių sodinimo atstumo įtaka obuolių cheminei sudėčiai (veislė 'Auksis', 2015-2016 m. vidurkis)

Table 20. Fruit-tree planting distance effect on apple chemical composition (cv. 'Auksis', average 2015-2016)

Rodiklis Parameter	Vaismedžių sodinimo atstumas, m Fruit-tree planting distance, m		
	3 x 1,50	3 x 1,00	3 x 0,50
Bendras cukrų kiekis, % Total sugar content, %	11,6 ± 0,20[a]	11,5 ± 0,06[a]	11,2 ± 0,30[a]
Tirpios sausosios medžiagos, % Dry soluble solids, %	12,7 ± 0,19[a]	12,8 ± 0,05[a]	12,6 ± 0,14[a]
Askorbo rūgštis, mg 100 g^{-1} Ascorbic acid, mg 100 g^{-1}	8,1 ± 0,06[a]	8,2 ± 0,06[a]	8,2 ± 0,06[a]
Titruojamasis rūgštingumas, % Titratable acidity, %	0,62 ± 0,03[a]	0,67 ± 0,03[a]	0,63 ± 0,02[a]
Sausosios medžiagos, % Dry matter, %	14,4 ± 0,05[a]	14,6 ± 0,29[a]	14,5 ± 0,17[a]

Pastaba: Toje pačioje eilutėje esančios skirtingos raidės žymi statistiškai patikimus cheminės sudėties rodiklių kiekybinius skirtumus tarp tirtų obuolių ėminių ($p < 0,05$).

Note. The different letters in the same line indicate statistically significant quantitative differences between chemical composition elements in the apple samples ($p < 0.05$).

21 lentelė. Vaismedžių sodinimo atstumo įtaka cukrų, sorbitolio ir obuolių rūgšties sudėčiai obuolių ėminiuose, mg g^{-1} SM (veislė 'Auksis', 2015-2016 m. vidurkis)

Table 21. Fruit-tree planting distance effect on apple sugar, sorbitol and malic acid composition, mg g^{-1} DW (cv. 'Auksis', average 2015-2016)

Junginys Compound	Vaismedžių sodinimo atstumas, m Fruit-tree planting distance, m		
	3 x 1,50	3 x 1,00	3 x 0,50
Fruktozė / Fructose	477,6 ± 23,88[a]	460,5 ± 23,02[a]	479,8 ± 23,99[a]
Gliukozė / Glucose	104,5 ± 5,23[a]	92,0 ± 7,82[a]	100,9 ± 5,04[a]
Sacharozė / Sucrose	184,8 ± 9,26[a]	189,5 ± 5,54[a]	175,5 ± 8,16[a]
Sorbitolis / Sorbitol	39,3 ± 1,96[a]	41,0 ± 2,05[a]	38,2 ± 1,91[a]
Obuolių rūgštis /Malic acid	57,0 ± 1,92[a]	52,6 ± 2,23[a]	53,2 ± 2,28[a]

Pastaba: Toje pačioje eilutėje esančios skirtingos raidės žymi statistiškai patikimus individualių junginių kiekių skirtumus tarp tirtų obuolių ėminių ($p < 0,05$).

Note. The different letters in the same line indicate statistically significant differences between the individual compounds in the apple samples ($p < 0.05$).

Geografinė vaismedžių augimo vieta. Veislės 'Auksis' obuoliai daugiausiai cukrų ir tirpių sausųjų medžiagų sukaupė obuoliuose išaugintuose Lietuvoje, mažiausiai – Estijoje (22 lentelė). Tai gali būti paaiškinama dėl šios veislės genetinės kilmės. Kokybinė cukrų sudėtis rodo, jog vaisiuose iš Lietuvos buvo daugiau sacharozės, tačiau mačiau gliukozės ir sorbitolio (23 lentelė).

Veislės 'Ligol' obuoliuose esminių skirtumų bendram cukrų kiekiui, tirpių sausųjų ir sausųjų medžiagų kiekiui, titruojamajam rūgštingumui ir askorbo rūgšties kiekiui geografinė vaisių augimo vieta įtakos neturėjo (24 lentelė). Kokybinės cukrų sudėties analizės rezultatai rodo, jog cukrų kiekis taip pat nesiskyrė, išskyrus sorbitolį, kurio Lietuvoje išaugintuose vaisiuose buvo rasta mažiausiai (25 lentelė). Obuolių rūgšties mažiausiai nustatyta vaisiuose, išaugintuose Lenkijoje.

Abiejų tirtų veislių obuoliuose sorbitolio buvo rasta daugiau Lenkijoje išaugintuose vaisiuose. Tai gali būti paaiškinta dėl Lenkijoje vyraujančios aukštesnės temperatūros, lengvesnių dirvožemių ir mažesnio kritulių kiekio, kadangi vandens deficito stresas vaismedyje stabdo gliukozės ir sorbitolio pavertimą krakmolu, o tai ir lemia didesnį sorbitolio kaupimąsi vaisiuose (Wang et al., 1996).

22 lentelė. Geografinės vaismedžių augimo vietos įtaka obuolių cheminei sudėčiai (veislė 'Auksis', 2015-2016 m. vidurkis)

Table 22. Geographical fruit-tree growing location effect on apple chemical composition (cv. 'Auksis', average 2015-2016)

Rodiklis Parameter	Geografinė vietovė / Geographical location		
	Lenkija / Poland	Lietuva / Lithuania	Estija / Estonia
Bendras cukrų kiekis, % Total sugar content, %	$11,9 \pm 0,30^{ab}$	$12,5 \pm 0,38^{a}$	$11,5 \pm 0,31^{b}$
Tirpios sausosios medžiagos, % Dry soluble solids, %	$13,3 \pm 0,32^{ab}$	$13,9 \pm 0,36^{a}$	$12,9 \pm 0,33^{b}$
Askorbo rūgštis, mg 100 g^{-1} Ascorbic acid, mg 100 g^{-1}	$7,6 \pm 0,18^{a}$	$7,6 \pm 0,18^{a}$	$7,4 \pm 0,17^{a}$
Titruojamasis rūgštingumas, % Titratable acidity, %	$0,43 \pm 0,01^{b}$	$0,49 \pm 0,02^{a}$	$0,48 \pm 0,01^{a}$
Sausosios medžiagos, % Dry matter, %	$14,9 \pm 0,35^{a}$	$15,5 \pm 0,36^{a}$	$14,7 \pm 0,37^{a}$

Pastaba: Toje pačioje eilutėje esančios skirtingos raidės žymi statistiškai patikimus cheminės sudėties rodiklių kiekybinius skirtumus tarp tirtų obuolių ėminių ($p < 0,05$).

Note. The different letters in the same line indicate statistically significant quantitative differences between chemical composition elements in the apple samples ($p < 0.05$).

23 lentelė. Geografinės vaismedžių augimo vietos įtaka cukrų, sorbitolio ir obuolių rūgšties sudėties įvairavimui obuolių ėminiuose, mg g^{-1} SM (veislė 'Auksis', 2015-2016 m. vidurkis)
Table 23. Geographical fruit-tree growing location effect on apple sugar, sorbitol and malic acid composition, mg g^{-1} DW (cv. 'Auksis', average 2015-2016)

Junginys Compound	Geografinė vietovė / Geographical location		
	Lenkija / Poland	Lietuva / Lithuania	Estija / Estonia
Fruktozė / Fructose	474,2 ± 23,71[a]	463,2 ± 23,16[a]	473,4 ± 23,67[a]
Gliukozė / Glucose	118,7 ± 5,93[a]	103,6 ± 5,18[b]	116,7 ± 5,83[ab]
Sacharozė / Sucrose	182,3 ± 9,11[b]	218,6 ± 10,93[a]	145,6 ± 7,28[c]
Sorbitolis / Sorbitol	50,3 ± 2,51[a]	43,8 ± 2,19[b]	41,6 ± 2,08[b]
Obuolių rūgštis / Malic acid	40,4 ± 2,02[a]	40,7 ± 2,03[a]	40,6 ± 2,03[a]

Pastaba: Toje pačioje eilutėje esančios skirtingos raidės žymi statistiškai patikimus individualių junginių kiekių skirtumus tarp tirtų obuolių ėminių ($p < 0,05$).
Note. The different letters in the same line indicate statistically significant differences between the individual compounds in the apple samples ($p < 0.05$).

24 lentelė. Geografinės vaismedžių augimo vietos įtaka obuolių cheminei sudėčiai (veislė 'Ligol', 2015-2016 m. vidurkis)
Table 24. Geographical fruit-tree growing location effect on apple chemical composition (cv. 'Ligol', average 2015-2016)

Rodiklis Parameter	Geografinė vietovė / Geographical location		
	Lenkija / Poland	Lietuva / Lithuania	Estija / Estonia
Bendras cukrų kiekis, % Total sugar content, %	12,8 ± 0,37[a]	12,4 ± 0,38[a]	12,1 ± 0,33[a]
Tirpios sausosios medžiagos, % Dry soluble solids, %	14,3 ± 0,41[a]	13,5 ± 0,39[a]	13,6 ± 0,44[a]
Askorbo rūgštis, mg 100 g^{-1} Ascorbic acid, mg 100 g^{-1}	7,9 ± 0,26[a]	7,9 ± 0,17[a]	7,9 ± 0,26[a]
Titruojamasis rūgštingumas, % Titratable acidity, %	0,46 ± 0,02[a]	0,44 ± 0,02[a]	0,47 ± 0,02[a]
Sausosios medžiagos, % Dry matter, %	15,7 ± 0,53[a]	16,0 ± 0,48[a]	15,0 ± 0,46[a]

Pastaba: Toje pačioje eilutėje esančios skirtingos raidės žymi statistiškai patikimus cheminės sudėties rodiklių kiekybinius skirtumus tarp tirtų obuolių ėminių ($p < 0,05$).
Note. The different letters in the same line indicate statistically significant quantitative differences between chemical composition elements in the apple samples ($p < 0.05$).

25 lentelė. Geografinės vaismedžių augimo vietos įtaka cukrų, sorbitolio ir obuolių rūgšties sudėties įvairavimui obuolių ėminiuose, mg g^{-1} SM (veislė 'Ligol', 2015-2016 m. vidurkis)
Table 25. Geographical fruit-tree growing location effect on apple sugar, sorbitol and malic acid composition, mg g^{-1} DW (cv. 'Ligol', average 2015-2016)

Junginys Compound	Geografinė vietovė / Geographical location		
	Lenkija / Poland	Lietuva / Lithuania	Estija / Estonia
Fruktozė / Fructose	475,7 ± 23,78[a]	458,1 ± 22,90[a]	461,9 ± 23,10[a]
Gliukozė / Glucose	92,2 ± 4,61[a]	83,7 ± 4,18[a]	94,8 ± 4,74[a]
Sacharozė / Sucrose	258,7 ± 12,94[a]	265,7 ± 13,28[a]	234,4 ± 11,72[a]
Sorbitolis / Sorbitol	26,3 ± 1,31[a]	20,4 ± 1,02[b]	23,5 ± 1,18[a]
Obuolių rūgštis / Malic acid	32,8 ± 1,64[b]	46,7 ± 2,34[a]	45,3 ± 2,27[a]

Pastaba: Toje pačioje eilutėje esančios skirtingos raidės žymi statistiškai patikimus individualių junginių kiekių skirtumus tarp tirtų obuolių ėminių ($p < 0,05$).
Note. The different letters in the same line indicate statistically significant differences between the individual compounds in the apple samples ($p < 0.05$).

***

Vaisių krūvio *reguliavimas vaismedžiuose obuolių cheminei sudėčiai įtakos neturėjo. Nors bendras cukrų kiekis tirtuose obels vaisiuose nesiskyrė, tačiau individualių cukrų kiekis tarp skirtingų tyrimo variantų buvo skirtingas. Obels vaisiai, auginti didžiausią vaisių krūvį (12 vaisių cm^{-2} KSP) turinčiuose obelyse, sukaupė iki 49 proc. daugiau gliukozės, nei vaisiai, auginti mažiausią vaisių krūvį (4 vaisiai cm^{-2} KSP) turinčiose vaismedžiuose. Sacharozės ir sorbitolio kiekiai kito priešinga tendencija – didėjant vaisių krūviui šių cukrų kiekis mažėjo. Sacharozės kiekis obels vaisiuose, augintuose mažiausią vaisių krūvį turinčiuose vaismedžiuose, buvo iki 29 proc., o sorbitolio – iki 23 proc. didesnis negu vaisiuose, augintuose didelį vaisių krūvį turinčiuose obelyse. Šiuos vaisių krūvio reguliavimo obelyse rezultatus galima paaiškinti dėl skirtingo asimiliatų kiekio tenkančio kiekvienam vaisiui.*

Vaisių vieta *obels vainike turėjo reikšmingos įtakos vaisių cheminei sudėčiai. Obuoliai, išauginti obels vainiko išorinėse dalyse (viršūnės, rytų bei vakarų pusių) sukaupė iki 6 proc. daugiau cukraus ir tirpių sausųjų medžiagų, bei pasižymėjo iki 12 proc. mažesniu rūgštingumu, nei obuoliai, augę obels vainiko apačioje. Sorbitolio kiekis vaisiuose iš obels vainiko apačios buvo iki 34 proc. mažesnis, negu vaisiuose iš kitų vainiko dalių. Gliukozės kiekis kito priešinga tendencija – obuoliuose iš obels vainiko apačios šio cukraus nustatyta iki 23 proc. daugiau, nei vaisiuose iš kitų obels vainiko vietų. Obuolių rūgšties nustatyta iki 14 proc. daugiau vaisiuose iš obels vainiko apačios bei rytinės pusės. Šiuos rezultatus galima paaiškinti skirtingu gaunamos saulės šviesos kiekiu skirtingose obels vainiko vietose.*

Vaismedžių augumo reguliavimas *obels vaisių cheminei sudėčiai įtakos neturėjo, skyrėsi tik kai kurių individualių cukrų kiekis tarp dviejų tyrimo variantų. Vaismedžiai purkšti kalcio proheksadionu sukaupė apie 22 proc. daugiau gliukozės, o ūglių genėjimas vasarą įtakojo vaisiuose iki 21 proc. didesnį sorbitolio kiekį, lyginant su kontroliniais vaismedžiais. Tai paaiškinama dėl asimiliatų pasiskirstymo tarp vaismedžio organų reguliavimo bei lapų ploto sumažinimo.*

Vaismedžių sodinimo atstumas *obels vaisių cheminei sudėčiai statistiškai patikimos įtakos neturėjo.*

Vaismedžių augimo geografinė vieta *turėjo įtaką veislės 'Auksis' obuolių cheminei sudėčiai: daugiausiai cukrų ir tirpių sausųjų medžiagų nustatyta obuoliuose išaugintuose Lietuvoje, mažiausiai – Estijoje. Kokybinė cukrų sudėtis rodo, jog vaisiuose iš Lietuvos buvo iki 50 proc. daugiau sacharozės, tačiau apie 11 proc. mažiau gliukozės. Lenkijoje išaugintuose obuoliuose sorbitolio nustatyta iki 21 proc. daugiau, nei kitose tirtose vietovėse. Geografinė vaisių augimo vieta veislės 'Ligol' obuoliams įtakos bendrai cheminei sudėčiai neturėjo. Obuolių rūgšties Lenkijoje išaugintuose obels vaisiuose buvo iki 30 proc. mažiau nei kituose tirtuose regionuose išaugintuose vaisiuose. Šie rezultatai paaiškinami skirtinga šių veislių genetine kilme, skirtingu vegetacijos periodu bei nevienodu gaunamos šviesos kiekiu.*

Kompleksiškai įvertinus tirtas technologines priemones ir biologinius veiksnius, nustatyta, jog bendram cukrų, sacharozės, tirpių sausųjų medžiagų, titruojamojo rūgštingumo ir obuolių rūgšties kiekiui, didžiausią įtaką turėjo geografinė vaismedžių augimo vieta veislės 'Auksis' obuoliams. Didžiausią įtaką sorbitolio ir sausųjų medžiagų kiekiui turėjo vaisių vieta vaismedžio vainike, o gliukozės kiekis vaisiuose labiausiai kito reguliuojant vaisių krūvį vaismedžiuose. Priklausomai nuo šių tirtų biologinių veiksnių bei taikytų technologinių priemonių, obels vaisių bendrą cukrų kiekį galima padidinti iki 9 proc., gliukozės kiekį iki 49 proc., sacharozės iki 50 proc., sorbitolio iki 52 proc., tirpių sausųjų medžiagų iki 8 proc., sausųjų medžiagų iki 6 proc., o obuolių rūgšties kiekį sumažinti iki 30 proc. Askorbo rūgšties ir fruktozės kiekiui vaisiuose biologiniai veiksniai bei taikytos technologinės priemonės įtakos neturėjo.

3.3. Antrinių fenolinių metabolitų kiekio ir sudėties pokyčių dėsningumai bei antioksidacinis aktyvumas obels vaisiuose

Fenoliniai junginiai yra naudingi žmogaus organizmui dėl jų antioksidacinių savybių, o obuoliai yra geras šių junginių šaltinis (Eberhardt et al., 2000; Wolfe et al., 2003; Sun, Liu, 2008; Liu et al., 2009). Obuolių minkštime ir odelėje kaupiasi skirtingi fenolinių junginių kiekiai (Raudonė ir kt., 2017). Odelėje fenolinių junginių koncentracija kelis kartus didesnė nei minkštime, taip pat odelėje randama flavonoido kvercetino glikozidų, kurių nėra minkštime (Awad et al., 2000; Chinnici et al., 2004; Łata, Tomala, 2007; Drogoudi et al., 2008).

Biologiškai aktyvių junginių, ypač fenolių, tyrimai obuoliuose apsiriboja vertinant skirtingų veislių (Lee et al., 2003; Tsao et al., 2003; Wojdyło et al., 2008; Vieira et al., 2009; Liaudanskas ir kt., 2015), ekologiškų ir integruotų auginimo sistemų (Hecke et al., 2006), šviesos (Awad et al., 2001a; Drogoudi, Pantelidis, 2011; Feng et al., 2014) ir keleto vaismedžių streso veiksnių, kaip sausra, patogenai ar dirvožemio druskingumas (Treutter, 2010) įtaką fenolinių junginių kaupimuisi obuoliuose. Mes su kolegomis taip pat atlikome tyrimus, kuriuose įvertinome vaismedžių mitybos (Lanauskas ir kt., 2017), poskiepių (Kviklys ir kt., 2014; 2017) ir vegetacijos periodo (Liaudanskas ir kt., 2016) įtaką fenolinių junginių kaupimuisi obuoliuose, o išsamius šių tyrimų rezultatus galima rasti šio darbo prieduose prisegtose straipsnių kopijose. Auginant perdirbti skirtus vaisius, fenolinių junginių kiekį taip pat reikėtų įvertinti. Dėl stiprios fenolinių junginių reakcijos su taninais bei makromolekulėmis, tokiomis kaip baltymai ir polisacharidai, fenoliai skatina nuosėdų susidarymą ir daro įtaką sulčių skaidrumo parametrams (Siebert et al., 1996).

Kadangi obuoliai yra vienas labiausiai pasaulyje vartojamų vaisių, o sodininkai taiko įvairias technologines ir biologines priemones, garantuojančias optimalų vaisių kokybės ir derliaus santykį, svarbu įvertinti kaip tokios priemonės įtakoja fenolinių junginių kaupimąsi vaisiuose, kadangi tokių tyrimų, atsižvelgiant į taikomas priemones, yra atlikta nedaug, neatlikta visai, arba rezultatai tarp skirtingų mokslininkų yra prieštaringi.

Pritaikę Liaudansko ir kt. (2014) išvystytą ir validuotą ESC metodiką, 2014-2016 metais atlikome obuolių ėminių ekstraktų analizę vaisių krūvio ir vietos vaismedžio vainike tyrimams, 2015-2016 metais – vaismedžių augumo, sodinimo atstumo ir geografinės augimo vietos tyrimams. 2015 metais atliktas antiradikalinio ir redukcinio aktyvumo tyrimas. Tirtuose ekstraktuose identifikuoti ir kiekybiškai įvertinti šie skirtingų grupių fenoliniai junginiai: kvercetino glikozidai (hiperozidas, izokvercitrinas, rutinas, reinotrinas, avikuliarinas, kvercitrinas), flavan-3-oliai (procianidinas B1, procianidinas B2, procianidinas C1, (+)-katechinas, (–)-epikatechinas), floridzinas ir chlorogeno rūgštis. Taip pat ištyrėme individualių fenolinių junginių įtaką bendram antioksidaciniam aktyvumui obels vaisiuose, pagal mūsų su kolegomis aprašytą metodiką (Raudonė ir kt., 2016). Su kolegomis taip pat optimizavome fenolinių junginių – flavonoidų, ekstrakcijos sąlygas Lietuvoje plačiai auginamoms obuolių veislėms (Liaudanskas ir kt., 2018).

Fenolinių junginių ekstrakcijos optimizavimas. Obuoliuose esančių flavonoidų ultragarsinė ekstrakcija buvo modeliuojama taikant atsako paviršiaus metodologiją (angl. *Response Surface Methodology*), pasirinkus trijų lygių ir trijų faktorių centrinę sudėtinę schemą (angl. *Central Composite Design*). Siekiant gauti didžiausią flavonoidų ekstrakcijos išeigą iš liofilizuotų obuolių mėginių, buvo pasirinkti trys optimizuojami parametrai: temperatūra (X_1), ekstrakcijos laikas (X_2) ir ultragarso galia (X_3). Ekstrakcijos sąlygų optimizavimui buvo pasirinkti veislės 'Ligol' obuoliai. Tyrimo mėginių paruošimas, naudojami reagentai, flavonoidų nustatymas ir kt. pateikti tyrimų metodikos skyriuje. Programinė įranga Design Expert (Versija 6.0.8, Stat-Ease, Inc. JAV) buvo naudota eksperimento duomenų analizei, modelio sudarymui ir ekstrakcijos sąlygų optimizavimui. Kvadratinio daugianario (polinomo) modelio tinkamumas buvo vertinamas pagal regresijos koeficientą (R^2) bei statistines *F* ir *p* reikšmes, rodančias ar koreliacija buvo statistiškai reikšminga.

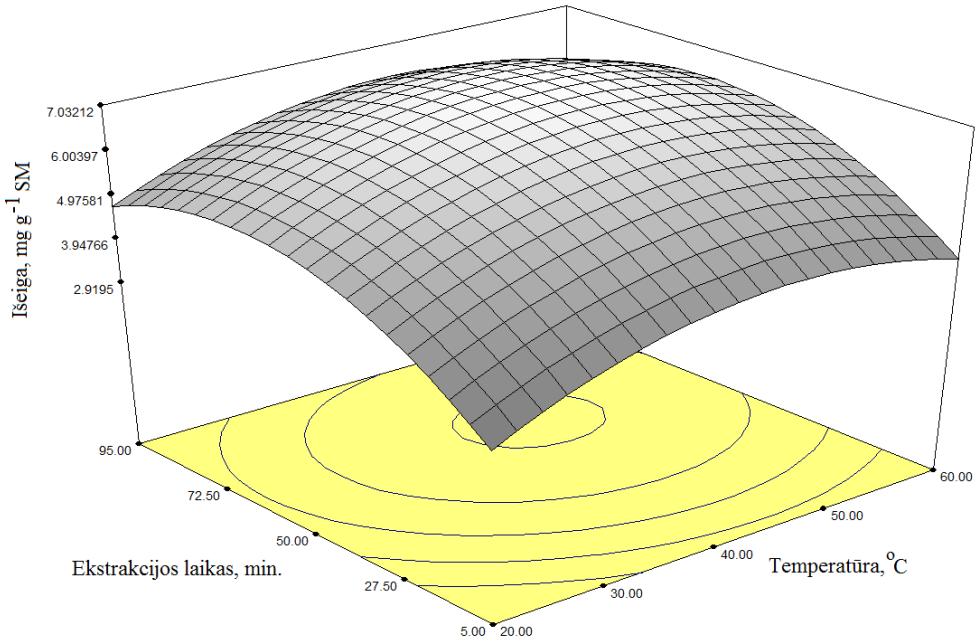
Prieš taikant atsako paviršiaus metodologiją, flavonoidų ekstrakcijos išeiga iš obuolių buvo palyginta ekstrahavus trimis ekstrahentais – etanoliu, metanoliu ir acetonu, įvairiomis koncentracijomis. Nustatyta, jog didžiausia flavonoidų ekstrakcijos išeiga po 4 val. ekstrakcijos buvo pasiekta maceruojant mėginius 70 proc. (v/v) etanoliu, todėl šis ekstrahentas buvo pasirinktas ekstrakcijos sąlygų optimizavimo uždaviniui spręsti. Palyginus maceracijos ir ekstrakcijos ultragarsinėje vonelėje metodus, mėginiai, paveikti ultragarsu davė didesnę ekstrakcijos išeigą, todėl buvo pasirinkta ekstrakcija ultragarsinėje vonelėje. Nuodugniau šis metodų palyginamasis tyrimas aprašytas Liaudansko ir kt. (2014) straipsnyje. Šiam uždaviniui spręsti pasirinkome tokius nepriklausomų kintamųjų intervalus: temperatūra 20-60 ºC, ekstrakcijos laikas 5-95 min. ir ultragarso galia 48-480 W. Trijų lygių ir trijų faktorių centrinė sudėtinė schema buvo pasirinkta nustatyti geriausią kintamųjų kombinaciją, siekiant gauti didžiausią flavonolių ekstrakcijos išeigą iš obuolių mėginių. Eksperimento duomenys parodė, jog atsako kintamieji atitiko kvadratinio daugianario (polinomo) modelį. Bendra kvadratinio polinomo modelio forma pateikta (3) formulėje:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{3} \beta_i X_i + \sum_{i=1}^{3} \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{2} \sum_{j=i+1}^{3} \beta_{ij} X_i \ , \qquad (3)$$

kur Y yra priklausomas kintamasis; β_0, β_i, β_{ii} ir β_{ij} yra regresijos modelio koeficientai; X_i ir X_j – nepriklausomi kintamieji.

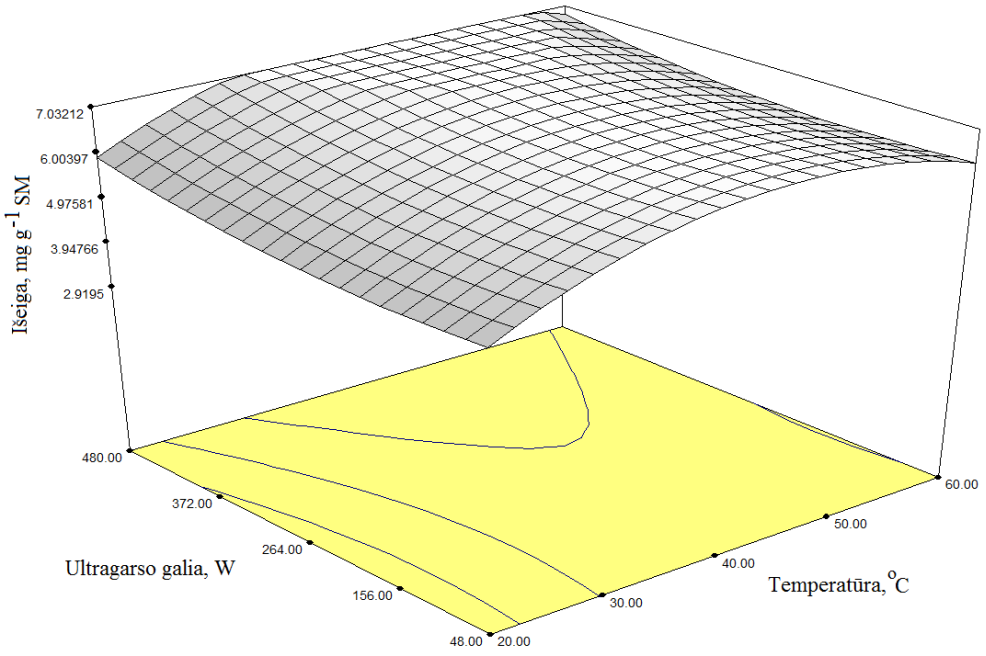
Atlikus eksperimentinių duomenų regresinę analizę prognozuojamam atsakui Y (priklausomam kintamajam – bendram flavonoidų kiekiui mg g^{-1} SM (BFK)), gavome kvadratinę daugianario lygtį (4), kurioje pažymėti užkoduoti kintamieji (X_1, X_2 ir X_3):

$$Y(BFK) = 6{,}86 + 0{,}49X_1 + 0{,}83X_2 + 0{,}29X_3 - 1{,}08X_1^2 - 1{,}47X_2^2 + 0{,}30X_3^2 - 0{,}071X_1X_3 + 0{,}013X_2X_3 \qquad (4)$$



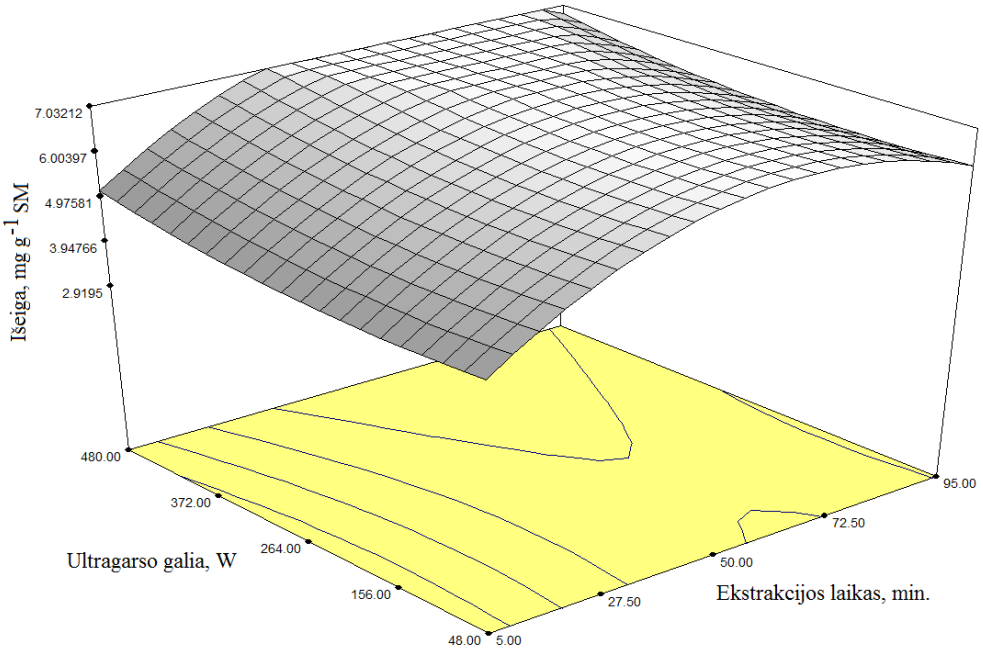
2 pav. Temperatūros ir ekstrakcijos laiko įtaka flavonoidų išeigai

Fig. 2. The influence of temperature and extraction time on the yield of flavonoids



3 pav. Temperatūros ir ultragarso galios įtaka flavonoidų išeigai

Fig. 3. The influence of temperature and ultrasound power on the yield of flavonoids



4 pav. Ekstrakcijos laiko ir ultragarso galios įtaka flavonoidų išeigai
Fig. 4. The influence of extraction time and ultrasound power on the yield of flavonoids

Remiantis sudarytu modeliu, gavome rezultatus, jog didžiausia teorinė fenolinių junginių ekstrakcijos išeiga (6,69 mg g^{-1} SM) buvo tuomet, kada mėginiai buvo ekstrahuoti 26,90 min. 44,61 ºC temperatūroje ir veikiant 480W ultragarso galia (2, 3 ir 4 pav.). Atlikus fenolinių junginių ekstrakciją optimizuotomis sąlygomis buvo gautas 6,58 mg g^{-1} SM bendras fenolinių junginių kiekis, kuris yra labai artimas prognozuotajam. Atsižvelgiant į įrangos valdymo ir tikslumo niuansus, optimalios sąlygos gali būti suapvalintos taip: ekstrakcijos temperatūra 45 ºC, ekstrakcijos laikas 27 min., ultragarso galia – 480W. Šios ekstrakcijos sąlygos toliau naudotos ir šiame darbe.

Vaisių krūvio reguliavimas. Obuoliai, užauginti didelį vaisių krūvį turinčiuose vaismedžiuose, sukaupė daugiau visų nustatytų individualių kvercetino glikozidų junginių (26 lentelė). Tokia pati tendencija pastebėta ir įvertinus flavan-3-olių, floridzino ir chlorogeno rūgšties kiekius (27 lentelė). Didėjant vaisių krūviui vaismedyje, didėja ir bendras fenolinių junginių kiekis obuoliuose (5 pav.). Awad ir kiti (2001b) nustatė, kad tuo atveju, kai vaisių kiekis ant vaismedžio kito nuo 50 iki 200 vnt., chlorogeno rūgšties koncentracija ir bendras flavonoidų kiekis vaisiuose nesiskyrė. Tokią pačią tendenciją nustatė ir kiti mokslininkai (Unuk et al., 2006; Jakopič et al., 2013). Stopar ir kiti (2002) nustatė, jog vaismedžio vaisių krūvio mažinimas nuo 157 iki 30 vnt. skatino didesnį bendro polifenolių kiekio kaupimąsi obuoliuose nuo 1 300 iki 1 680 mg kg^{-1}, atitinkamai. Bendro polifenolių kiekio vaisiuose skirtumus minėtame tyrime sąlygojo sukaupti didesni atskirų junginių – chlorogeno rūgšties, katechino ir epikatechino – kiekiai. Mūsų atliktuose tyrimuose epikatechino kiekis tarp skirtingų variantų nesiskyrė, o chlorogeno rūgšties kiekis

didėjo kartu didėjant vaisių krūviui. Prieštaringus įvairių tyrėjų rezultatus dėl skirtingo fenolinių junginių kaupimosi vaisiuose esant skirtingam vaisių krūviui, aiškintume dėl tirtų skirtingų obuolių veislių bei kitų veiksnių, į kuriuos atsižvelgta nebuvo. Skirtingos veislės obuoliai sukaupia skirtingą kiekį fenolinių junginių, skiriasi jų kokybinė sudėtis, individualių junginių santykis bei skirtumai tarp junginių susikaupiančių odelėje bei minkštime (Liaudanskas, 2015a). Yra žinoma, jog didelis vaisių krūvis vaismedžiuose sąlygoja didesnį vaismedžių stresą, o fenolinių junginių kaupimasis įvairiuose vaismedžių dalyse, tame tarpe ir vaisiuose, kaip tik ir yra siejamas su įvairiais stresiniais veiksniais (Winkel-Shirley, 2002; Lattanzio et al., 2006), kas leidžia pagrįsti mūsų gautus rezultatus.

26 lentelė. Vaisių krūvio vaismedyje įtaka kvercetino glikozidų kiekybinės sudėties įvairavimui obuolių ėminiuose, mg g^{-1} SM (veislė 'Ligol', 2014-2016 m. vidurkis)

Table 26. Crop load effect on apple quercetin glycosides composition, mg g^{-1} DW (cv. 'Ligol', average 2014-2016)

Junginys Compound	Vaisių krūvis vaismedyje, vnt. cm^{-2} KSP Crop load in fruit-tree, fruits cm^{-2} TSCA		
	4	8	12
Hiperozidas / Hyperoside	$0,08 \pm 0,004^{c}$	$0,10 \pm 0,005^{b}$	$0,14 \pm 0,007^{a}$
Izokvercitrinas / Isoquercitrin	$0,03 \pm 0,001^{b}$	$0,03 \pm 0,001^{b}$	$0,03 \pm 0,002^{a}$
Rutinas / Rutin	$0,02 \pm 0,001^{b}$	$0,02 \pm 0,001^{a}$	$0,02 \pm 0,001^{a}$
Reinotrinas / Reynoutrin	$0,02 \pm 0,001^{b}$	$0,03 \pm 0,001^{b}$	$0,04 \pm 0,002^{a}$
Avikuliarinas / Avicularin	$0,05 \pm 0,003^{c}$	$0,06 \pm 0,003^{b}$	$0,08 \pm 0,004^{a}$
Kvercitrinas / Quercitrin	$0,08 \pm 0,004^{b}$	$0,08 \pm 0,004^{b}$	$0,10 \pm 0,005^{a}$

Pastaba: Toje pačioje eilutėje esančios skirtingos raidės žymi statistiškai patikimus individualių junginių kiekių skirtumus tarp tirtų obuolių ėminių ($p < 0,05$).

Note. The different letters in the same line indicate statistically significant differences between the individual compounds in the apple samples ($p < 0.05$).

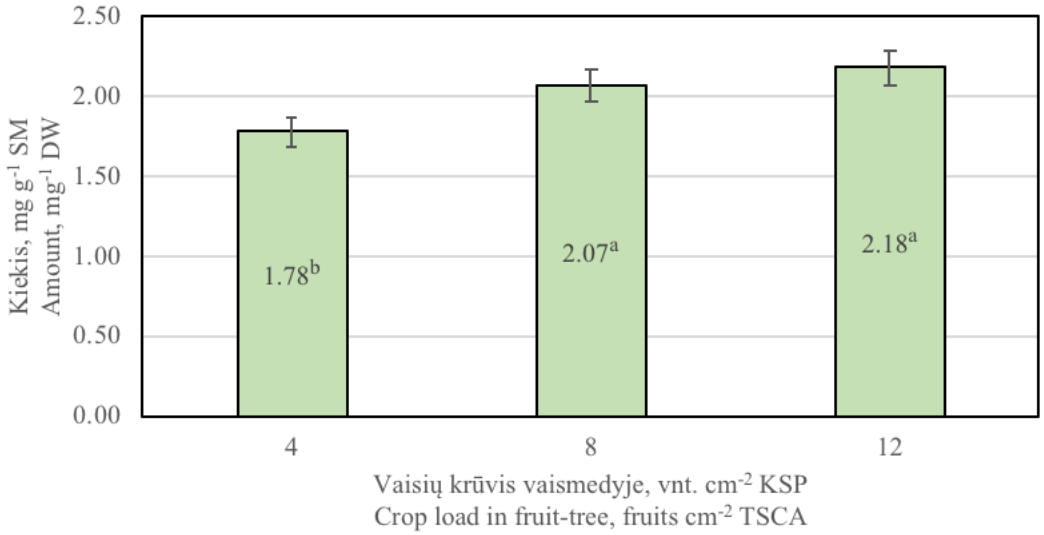
27 lentelė. Vaisių krūvio vaismedyje įtaka flavan-3-olių, floridzino ir chlorogeno rūgšties kiekybinės sudėties įvairavimui obuolių ėminiuose, mg g^{-1} SM (veislė 'Ligol', 2014-2016 m. vidurkis)

Table 27. Crop load effect on apple flavan-3-ol's, phlorizin and chlorogenic acid composition, mg g^{-1} DW (cv. 'Ligol', average 2014-2016)

Junginys Compound	Vaisių krūvis vaismedyje, vnt. cm^{-2} KSP Crop load in fruit-tree, fruits cm^{-2} TSCA		
	4	8	12
Procianidinas B1 / Procyanidin B1	0,02 ± 0,001^{c}	0,03 ± 0,001^{b}	0,03 ± 0,002^{a}
Procianidinas B2 / Procyanidin B2	0,35 ± 0,018^{b}	0,46 ± 0,023^{a}	0,42 ± 0,021^{a}
Procianidinas C1 / Procyanidin C1	0,12 ± 0,006^{b}	0,16 ± 0,008^{a}	0,12 ± 0,006^{b}
(+)-Katechinas / (+)-Catechin	0,03 ± 0,002^{b}	0,04 ± 0,002^{a}	0,04 ± 0,002^{a}
(–)-Epikatechinas / (–)-Epicatechin	0,24 ± 0,012^{a}	0,26 ± 0,013^{a}	0,25 ± 0,012^{a}
Floridzinas / Phlorizin	0,08 ± 0,004^{b}	0,10 ± 0,005^{a}	0,11 ± 0,005^{a}
Chlorogeno rūgštis / Chlorogenic acid	0,66 ± 0,033^{b}	0,71 ± 0,036^{b}	0,81 ± 0,040^{a}

Pastaba: Toje pačioje eilutėje esančios skirtingos raidės žymi statistiškai patikimus individualių junginių kiekių skirtumus tarp tirtų obuolių ėminių ($p < 0,05$).

Note. The different letters in the same line indicate statistically significant differences between the individual compounds in the apple samples ($p < 0.05$).



5 pav. Bendras tirtų fenolinių junginių kiekis (mg g^{-1}) obuoliuose, skintuose iš skirtingą vaisių krūvį turinčių vaismedžių (veislė 'Ligol', 2014-2016 m. vidurkis)

Fig. 5. Total amount of investigated phenolic compounds (mg g^{-1}) in apples taken from apple-trees with different crop load (cv. 'Ligol', average 2014-2016)

Taip pat ištyrėme individualių fenolinių junginių įtaką bendram antioksidaciniam aktyvumui obels vaisiuose, skintuose iš skirtingą vaisių krūvį turinčių vaismedžių. Antioksidacinį aktyvumą vertinome dvejomis – ESC-ABTS (antiradikalinio aktyvumo, 28 lentelė) ir ESC-FRAP (redukcinio aktyvumo, 29 lentelė) pokolonėlinėmis sistemomis. Didėjant vaisių krūviui, pastebėtas didesnis vaisių antiradikalinis ir redukcinis aktyvumas. Antioksidacinį aktyvumą obuoliuose labiausiai nulemia juose esantys fenoliniai junginiai (D´Abrosca et al., 2007; Lata, 2007; Drogoudi et al., 2008; Raudone et al., 2016). Tai tiesiogiai susiję su didesniu fenolinių junginių kiekiu, nustatytu šiuose vaisiuose. (-)-Epikatechinas, procianidinas B2 ir chlorogeno rūgštis sudarė didžiausią dalį (apie ¾) bendrojo antioksidacinio aktyvumo (atitinkamai 19,3%, 17,4% ir 35,4%). Panašūs dėsningumai sutinkami ir kitų mokslininkų tyrimuose (Tsao et al., 2005).

28 lentelė. Vaisių krūvio vaismedyje įtaka antiradikaliniam aktyvumui (TE_{ABTS}, µmol/g) ir individualių junginių indėliui į suminį antiradikalinį aktyvumą (IAA, %) obuolių ėminiuose, SM (veislė 'Ligol', 2015 m.)

Table 28. Crop load effect on apple radical scavenging activity (TE_{ABTS}, µmol/g), and individual compounds contribution to the total antiradical activity (IAA, %), DW (cv. 'Ligol', 2015)

Junginys Compound	Vaisių krūvis vaismedyje, vnt. cm^{-2} KSP Crop load in fruit-tree, fruits cm^{-2} TSCA					
	4		8		12	
	TE	IAA	TE	IAA	TE	IAA
Hiperozidas / Hyperoside	0,11	3,0	0,20	4,2	0,31	6,0
Izokvercitrinas / Isoquercitrin	0,00	0,5	0,03	0,9	0,02	0,8
Rutinas / Rutin	0,03	1,2	0,04	1,0	0,04	1,0
Reinotrinas / Reynoutrin	0,02	1,0	0,05	1,3	0,05	1,2
Avikuliarinas / Avicularin	0,10	2,8	0,08	2,0	0,10	2,2
Kvercitrinas / Quercitrin	0,06	1,7	0,06	1,5	0,11	2,4
Procianidinas B1 / Procyanidin B1	0,18	4,6	0,07	1,7	0,03	1,0
Procianidinas B2 / Procyanidin B2	0,72	17,4	1,00	20,0	1,03	19,0
Procianidinas C1 / Procyanidin C1	0,25	6,3	0,28	5,9	0,38	7,3
(+)-Katechinas / (+)-Catechin	0,08	2,3	0,07	1,7	0,03	0,9
(–)-Epikatechinas / (–)-Epicatechin	0,80	19,3	1,06	21,1	0,94	17,4
Chlorogeno rūgštis / Chlorogenic acid	1,48	35,4	1,70	33,7	2,00	36,7
Neidentifikuoti / Unidentified	0,11	4,4	0,18	4,9	0,16	4,2
Suminis / Total	**3,94[b]**		**4,81[a]**		**5,20[a]**	

Pastaba: Paskutinėje (suminėje) eilutėje esančios skirtingos raidės žymi statistiškai patikimą antiradikalinio aktyvumo skirtumą tarp tirtų obuolių ėminių ($p < 0,05$).
Note. The different letters in the last (total) line indicate statistically significant differences between radical scavenging activity in the apple samples ($p < 0.05$).

29 lentelė. Vaisių krūvio vaismedyje įtaka redukciniam aktyvumui (TE_{FRAP}, μmol/g) ir individualių junginių indėliui į suminį antiradikalinį aktyvumą (IAA, %) obuolių ėminiuose, SM (veislė 'Ligol', 2015 m.)
Table 29. Crop load effect on apple radical reducing activity (TE_{FRAP}, μmol/g), and individual compounds contribution to the total antiradical activity (IAA, %), DW (cv. 'Ligol', 2015)

Junginys Compound	Vaisių krūvis vaismedyje, vnt. cm^{-2} KSP Crop load in fruit-tree, fruits cm^{-2} TSCA					
	4		8		12	
	TE	IAA	TE	IAA	TE	IAA
Hiperozidas / Hyperoside	0,01	0,31	0,30	5,98	0,46	7,89
Izokvercitrinas / Isoquercitrin	0,22	6,19	0,09	1,84	0,11	1,94
Rutinas / Rutin	0,02	0,54	0,03	0,49	0,05	0,81
Reinotrinas / Reynoutrin	0,07	1,88	0,08	1,50	0,02	0,25
Avikuliarinas / Avicularin	0,14	3,89	0,16	3,20	0,23	4,02
Kvercitrinas / Quercitrin	0,17	4,60	0,20	4,08	0,34	5,85
Procianidinas B1 / Procyanidin B1	0,03	0,69	0,04	0,69	0,09	1,62
Procianidinas B2 / Procyanidin B2	0,29	8,07	0,55	11,03	0,58	10,04
Procianidinas C1 / Procyanidin C1	0,02	0,63	0,07	1,34	0,03	0,54
(+)-Katechinas / (+)-Catechin	0,07	1,90	0,10	1,94	0,10	1,76
(–)-Epikatechinas / (–)-Epicatechin	0,62	17,23	0,87	17,50	0,84	14,53
Chlorogeno rūgštis / Chlorogenic acid	1,62	45,25	2,10	42,42	2,34	40,55
Neidentifikuoti / Unidentified	0,32	8,83	0,40	7,96	0,60	10,20
Suminis / Total	**3,60^{b}**		**4,96^{a}**		**5,80^{a}**	

Pastaba: Paskutinėje (suminėje) eilutėje esančios skirtingos raidės žymi statistiškai patikimą redukcinio aktyvumo skirtumą tarp tirtų obuolių ėminių ($p < 0,05$).
Note. The different letters in the last (total) line indicate statistically significant differences between radical reducing activity in the apple samples ($p < 0.05$).

Vaisių augimo vieta vaismedžio vainike. Vaisiai augę vainiko viršūnėje sukaupė patikimai didesnius kvercetino glikozidų kiekius (30 lentelė), skyrėsi tik reinotrino kiekis, kurio daugiau buvo rasta vaisiuose iš vakarų pusės. Taip pat vaisiai iš vainiko viršaus sukaupė daugiau kai kurių flavan-3-olių bei floridzino (31 lentelė). Kitų mokslininkų tyrimuose, floridzino kiekiui neturėjo poveikio veislių 'Gala' ir 'Mutsu' obels vaisių padėtis vainike, tačiau veislės 'McIntosh' obuoliai šio junginio sukaupė patikimai daugiau, kuomet buvo nuskinti iš vainiko viršūnės (Feng et al., 2014). Tai rodo, jog veislė taip pat turi stiprią įtaką fenolinių junginių kiekiui, nepriklausomai nuo vaisių padėties vainike. Chlorogeno rūgšties kiekis tirtuose obuolių ėminiuose nesiskyrė. Bendras fenolių kiekis taip pat buvo didžiausias vaisiuose skintuose iš vainiko viršūnės (6 pav.). Panašią vaisių augimo vietos vaismedžio vainike įtaką fenolinių junginių sintezei nustatė ir kiti mokslininkai (Awad et al., 2000; Awad et al., 2001a; Jakopic et al., 2009). Vaisiai skinti iš gerai apšviestų išorinių vainiko vietų (viršūnės ir vakarų pusės) pasižymėjo didesniu antiradikaliniu (32 lentelė) ir redukciniu (33 lentelė) aktyvumu. Panašų dėsningumą nustatė ir kiti mokslininkai (Drogoudi, Pantelidis, 2011).

30 lentelė. Vaisių vietos vaismedyje įtaka kvercetino glikozidų kiekybinės sudėties įvairavimui obuolių ėminiuose, mg g^{-1} SM (veislė 'Ligol', 2014-2016 m. vidurkis)
Table 30. Effect of fruit position in tree on apple quercetin glycosides composition, mg g^{-1} DW (cv. 'Ligol', average 2014-2016)

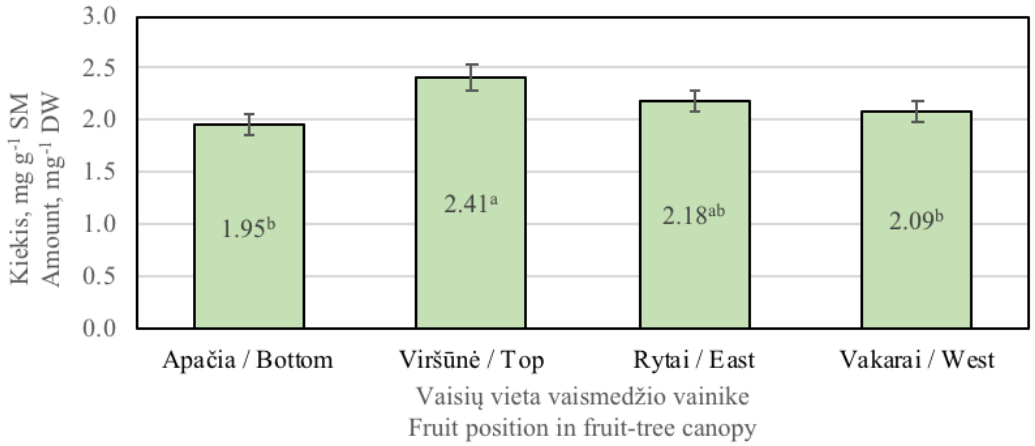
Junginys Compound	Vaisių vieta obelų vainike / Fruit position in apple-tree crown			
	Apačia / Bottom	Viršus / Top	Rytai / East	Vakarai / West
Hiperozidas Hyperoside	$0,04 \pm 0,002^{d}$	$0,18 \pm 0,009^{a}$	$0,11 \pm 0,006^{b}$	$0,10 \pm 0,005^{c}$
Izokvercitrinas Isoquercitrin	$0,02 \pm 0,001^{c}$	$0,04 \pm 0,002^{a}$	$0,03 \pm 0,001^{b}$	$0,03 \pm 0,002^{b}$
Rutinas Rutin	$0,01 \pm 0,001^{c}$	$0,03 \pm 0,001^{a}$	$0,02 \pm 0,001^{b}$	$0,02 \pm 0,001^{b}$
Reinotrinas Reynoutrin	$0,01 \pm 0,000^{d}$	$0,04 \pm 0,002^{b}$	$0,03 \pm 0,001^{c}$	$0,05 \pm 0,003^{a}$
Avikuliarinas Avicularin	$0,04 \pm 0,002^{c}$	$0,10 \pm 0,005^{a}$	$0,08 \pm 0,004^{b}$	$0,09 \pm 0,005^{a}$
Kvercitrinas Quercitrin	$0,06 \pm 0,003^{c}$	$0,11 \pm 0,005^{a}$	$0,09 \pm 0,004^{b}$	$0,06 \pm 0,003^{c}$

Pastaba: Toje pačioje eilutėje esančios skirtingos raidės žymi statistiškai patikimus individualių junginių kiekių skirtumus tarp tirtų obuolių ėminių ($p < 0,05$).
Note. The different letters in the same line indicate statistically significant differences between the individual compounds in the apple samples ($p < 0.05$).

31 lentelė. Vaisių vietos vaismedyje įtaka flavan-3-olių, floridzino ir chlorogeno rūgšties kiekybinės sudėčiai obuolių ėminiuose, mg g^{-1} SM (veislė 'Ligol', 2014-2016 m. vidurkis)
Table 31. Effect of fruit position in tree on apple flavan-3-ol's, phlorizin and chlorogenic acid composition, mg g^{-1} DW (cv. 'Ligol', average 2014-2016)

Junginys Compound	Vaisių vieta obelų vainike Fruit position in apple-tree crown			
	Apačia / Bottom	Viršus / Top	Rytai / East	Vakarai / West
Procianidinas B1 Procyanidin B1	0,03 ± 0,002^{a}	0,02 ± 0,001^{b}	0,03 ± 0,001^{b}	0,02 ± 0,001^{c}
Procianidinas B2 Procyanidin B2	0,39 ± 0,019^{bc}	0,48 ± 0,024^{a}	0,41 ± 0,021^{b}	0,36 ± 0,018^{c}
Procianidinas C1 Procyanidin C1	0,15 ± 0,007^{b}	0,17 ± 0,008^{a}	0,17 ± 0,008^{a}	0,16 ± 0,008^{ab}
(+)-Katechinas (+)-Catechin	0,04 ± 0,002^{bc}	0,04 ± 0,002^{ab}	0,04 ± 0,002^{a}	0,03 ± 0,002^{c}
(–)-Epikatechinas (–)-Epicatechin	0,28 ± 0,014^{a}	0,29 ± 0,014^{a}	0,30 ± 0,015^{a}	0,29 ± 0,015^{a}
Floridzinas / Phlorizin	0,11 ± 0,005^{b}	0,13 ± 0,006^{a}	0,12 ± 0,006^{ab}	0,10 ± 0,005^{b}
Chlorogeno rūgštis Chlorogenic acid	0,78 ± 0,039^{a}	0,79 ± 0,039^{a}	0,77 ± 0,038^{a}	0,76 ± 0,038^{a}

Pastaba: Toje pačioje eilutėje esančios skirtingos raidės žymi statistiškai patikimus individualių junginių kiekių skirtumus tarp tirtų obuolių ėminių ($p < 0,05$).
Note. The different letters in the same line indicate statistically significant differences between the individual compounds in the apple samples ($p < 0.05$).



6 pav. Bendras tirtų fenolinių junginių kiekis (mg g^{-1}) obuoliuose, skintuose iš skirtingų vaismedžio vainiko vietų (veislė 'Ligol', 2014-2016 m. vidurkis)
Fig. 6. Total amount of investigated phenolic compounds (mg g^{-1}) in apples picked from different positions of tree crown (cv. 'Ligol', average 2014-2016)

32 lentelė. Vaisių vietos vaismedyje įtaka antiradikaliniam aktyvumui (TE_{ABTS}, μmol/g) ir individualių junginių indėliui į suminį antiradikalinį aktyvumą (IAA, %) obuolių ėminiuose, SM (veislė 'Ligol', 2015 m.)

Table 32. Effect of fruit position in tree on apple radical scavenging activity (TE_{ABTS}, μmol/g), and individual compounds contribution to the total antiradical activity (IAA, %), DW (cv. 'Ligol', 2015)

Junginys Compound	Vaisių vieta obelų vainike / Fruit position in apple-tree crown							
	Apačia / Bottom		Viršus / Top		Rytai / East		Vakarai / West	
	TE	IAA	TE	IAA	TE	IAA	TE	IAA
Hiperozidas Hyperoside	-	-	0,22	4,06	0,17	3,78	0,22	4,27
Izokvercitrinas Isoquercitrin	0,01	0,61	0,02	0,59	0,03	1,02	0,06	1,36
Rutinas / Rutin	0,03	1,08	0,12	2,37	0,03	1,01	0,11	2,34
Reinotrinas Reynoutrin	0,02	0,75	0,04	1,08	0,01	0,63	0,07	1,55
Avikuliarinas Avicularin	0,00	0,43	0,11	2,17	0,06	1,64	0,11	2,19
Kvercitrinas Quercitrin	0,02	0,91	0,07	1,55	0,06	1,66	0,11	2,19
Procianidinas B1 Procyanidin B1	0,09	2,47	0,12	2,40	0,05	1,33	0,12	2,40
Procianidinas B2 Procyanidin B2	0,85	19,36	0,94	16,55	0,85	17,92	0,89	16,21
Procianidinas C1 Procyanidin C1	0,33	7,73	0,43	7,70	0,31	6,72	0,35	6,58
(+)-Katechinas (+)-Catechin	0,06	1,65	0,07	1,51	0,01	0,63	0,06	1,40
(–)-Epikatechinas (–)-Epicatechin	0,83	19,01	1,04	18,28	0,95	20,05	0,89	16,11
Chlorogeno rūgštis Chlorogenic acid	1,73	39,14	2,01	35,15	1,82	37,97	2,17	38,83
Neidentifikuoti Unidentified	0,23	6,84	0,31	6,58	0,20	5,64	0,19	4,57
Suminis / Total	**4,20^{b}**		**5,48^{a}**		**4,56^{ab}**		**5,34^{a}**	

Pastaba: Paskutinėje (suminėje) eilutėje esančios skirtingos raidės žymi statistiškai patikimą antiradikalinio aktyvumo skirtumą tarp tirtų obuolių ėminių ($p < 0,05$).

Note. The different letters in the last (total) line indicate statistically significant differences between radical scavenging activity in the apple samples ($p < 0.05$).

33 lentelė. Vaisių vietos vaismedyje įtaka redukciniam aktyvumui (TE_{FRAP}, µmol/g) ir individualių junginių indėliui į suminį antiradikalinį aktyvumą (IAA, %) obuolių ėminiuose, SM (veislė 'Ligol', 2015 m.)

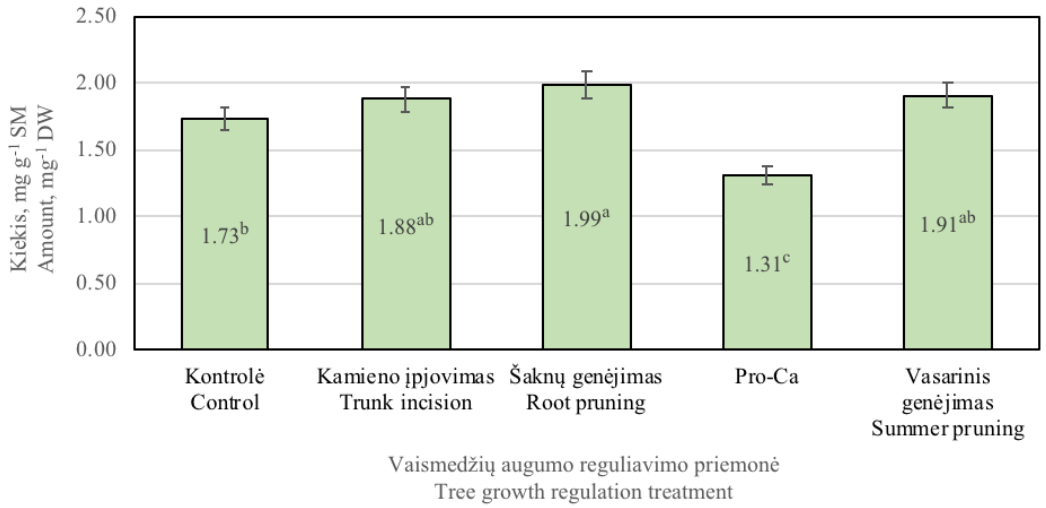
Table 33. Effect of fruit position in tree on apple radical reducing activity (TE_{FRAP}, µmol/g), and individual compounds contribution to the total antiradical activity (IAA, %), DW (cv. 'Ligol', 2015)

Junginys Compound	Vaisių vieta obelų vainike / Fruit position in apple-tree crown							
	Apačia / Bottom		Viršus / Top		Rytai / East		Vakarai / West	
	TE	IAA	TE	IAA	TE	IAA	TE	IAA
Hiperozidas Hyperoside	0,02	0,48	0,37	6,46	0,25	5,30	0,38	6,91
Izokvercitrinas Isoquercitrin	0,02	0,35	0,11	1,88	0,07	1,44	0,11	1,98
Rutinas / Rutin	0,06	1,35	0,04	0,74	0,02	0,41	0,03	0,56
Reinotrinas Reynoutrin	0,02	0,44	0,04	0,62	0,06	1,35	0,04	0,65
Avikuliarinas Avicularin	0,09	2,20	0,18	3,21	0,18	3,78	0,19	3,40
Kvercitrinas Quercitrin	0,02	0,34	0,23	4,14	0,03	0,60	0,25	4,56
Procianidinas B1 Procyanidin B1	0,05	1,07	0,03	0,56	0,03	0,67	0,03	0,58
Procianidinas B2 Procyanidin B2	0,51	11,93	0,54	9,60	0,47	10,14	0,51	9,24
Procianidinas C1 Procyanidin C1	0,10	2,40	0,11	1,87	0,06	1,18	0,09	1,57
(+)-Katechinas (+)-Catechin	0,08	1,93	0,10	1,84	0,08	1,65	0,09	1,54
(–)-Epikatechinas (–)-Epicatechin	0,77	18,12	0,95	16,77	0,77	16,48	0,85	15,28
Chlorogeno rūgštis Chlorogenic acid	2,09	49,41	2,40	42,56	2,12	45,57	2,44	44,08
Neidentifikuoti Unidentified	0,43	9,98	0,56	9,76	0,54	11,44	0,54	9,65
Suminis / Total	**4,26^{b}**		**5,66^{a}**		**4,68^{ab}**		**5,55^{a}**	

Pastaba: Paskutinėje (suminėje) eilutėje esančios skirtingos raidės žymi statistiškai patikimą redukcinio aktyvumo skirtumą tarp tirtų obuolių ėminių ($p < 0,05$).

Note. The different letters in the last (total) line indicate statistically significant differences between radical reducing activity in the apple samples ($p < 0.05$).

Vaismedžių augumo reguliavimas. Šaknų pjovimas bei vasarinis genėjimas padidino obuoliuose susikaupiančių kvercetino glikozidų kiekį (34 lentelė). Vaismedžių augumą reguliuojanti priemonė kalcio prohesadionas turėjo neigiamą poveikį šių junginių kaupimuisi vaisiuose. Tai patvirtina ir kitų mokslininkų atliktas darbas (Petkovšek et al., 2009). Flavan-3-olių, floridzino ir chlorogeno rūgšties kiekiui vaisiuose vaismedžių augumo reguliavimo priemonės taip pat turėjo įtakos (35 lentelė). Vaismedžių purškimas kalcio proheksadionu esmingai sumažino šių junginių kaupimąsi vaisiuose. Petkovšek ir kitų (2009) atliktame tyrime nustatyta, jog naudojant kalcio proheksadioną chlorogeno rūgšties kiekis vaisiuose padidėjo, tačiau mūsų tyrime jo kiekis vaisiuose buvo esmingai mažesnis, lyginant su kitomis priemonėmis ar kontrole. Šie rezultatai leidžia manyti, jog šaknų pjovimas, kamieno įpjovimas ar vasarinis genėjimas vaismedžiams sukelia didelį stresą, todėl vaisiai sukaupia daugiau fenolinių junginių (Winkel-Shirley, 2002; Lattanzio et al., 2006), o vaismedžių augumą reguliuojanti priemonė - kalcio proheksadionas, tokį stresą vaismedžiuose sumažina, kadangi yra žinoma, jog ši priemonė taip pat yra veiksminga kovojant su rauplėmis, miltlige bei bakterine deglige (Yoder et al., 1999; Costa et al., 2001; Bazzi et al., 2003). Pagal bendro tirtų fenolinių junginių kiekį (7 pav.) galėtume daryti išvadą, jog šaknų pjovimas vaismedžiuose sukėlė didžiausią stresą, todėl fenolinių junginių kiekis vaisiuose iš šių vaismedžių buvo didžiausias, prie to taip pat prisidėjo ir asimiliatų sulaikymas vaismedyje (plačiau šis mechanizmas aprašytas šio darbo 1.4 skyrelyje).



7 pav. Bendras tirtų fenolinių junginių kiekis (mg g^{-1}) obuoliuose, skintuose iš skirtingų vaismedžių, taikant įvairias vaismedžių augumo priemones (veislė 'Rubin', 2015-2016 m. vidurkis)

Fig. 7. Total amount of investigated phenolic compounds (mg g^{-1} DW) in apples picked from different trees, using various tree growth regulation treatments (cv. 'Rubin', average 2015-2016)

34 lentelė. Vaismedžių augumo reguliavimo įtaka kvercetino glikozidų kiekybinės sudėties įvairavimui obuolių ėminiuose, mg g^{-1} SM (veislė 'Rubin', 2015-2016 m. vidurkis)

Table 34. Effect of tree growth regulation on apple quercetin glycosides composition, mg g^{-1} DW (cv. 'Rubin', average 2015-2016)

Junginys Compound	Vaismedžių augumo reguliavimo priemonės Tree growth regulation treatments				
	Kontrolė Control	Kamieno įpjovimas Trunk incision	Šaknų genėjimas Root pruning	Pro-Ca	Vasarinis genėjimas Summer pruning
Hiperozidas Hyperoside	0,16 ± 0,008^{c}	0,18 ± 0,009^{bc}	0,21 ± 0,011^{a}	0,11 ± 0,006^{d}	0,20 ± 0,010^{ab}
Izokvercitrinas Isoquercitrin	0,05 ± 0,002^{ab}	0,04 ± 0,002^{b}	0,05 ± 0,002^{a}	0,03 ± 0,002^{c}	0,05 ± 0,002^{a}
Rutinas Rutin	0,02 ± 0,001^{a}	0,02 ± 0,001^{b}	0,02 ± 0,001^{a}	0,02 ± 0,001^{b}	0,02 ± 0,001^{a}
Reinotrinas Reynoutrin	0,01 ± 0,001^{b}	0,022 ± 0,001^{a}	0,02 ± 0,001^{a}	0,00 ± 0,000^{c}	0,02 ± 0,001^{a}
Avikuliarinas Avicularin	0,07 ± 0,003^{b}	0,08 ± 0,004^{a}	0,09 ± 0,004^{a}	0,05 ± 0,003^{c}	0,09 ± 0,004^{a}
Kvercitrinas Quercitrin	0,07 ± 0,003^{b}	0,08 ± 0,004^{ab}	0,08 ± 0,004^{a}	0,05 ± 0,002^{c}	0,08 ± 0,004^{a}

Pastaba: Toje pačioje eilutėje esančios skirtingos raidės žymi statistiškai patikimus individualių junginių kiekių skirtumus tarp tirtų obuolių ėminių ($p < 0,05$).

Note. The different letters in the same line indicate statistically significant differences between the individual compounds in the apple samples ($p < 0.05$).

35 lentelė. Vaismedžių augumo reguliavimo įtaka flavan-3-olių, floridzino ir chlorogeno rūgšties kiekybinės sudėties įvairavimui obuolių ėminiuose, mg g^{-1} SM (veislė 'Rubin', 2015-2016 m. vidurkis)

Table 35. Effect of tree growth regulation on apple flavan-3-ol's, phlorizin and chlorogenic acid composition, mg g^{-1} DW (cv. 'Rubin', average 2015-2016)

Junginys Compound	Vaismedžių augumo reguliavimo priemonės Tree growth regulation treatments				
	Kontrolė Control	Kamieno įpjovimas Trunk incision	Šaknų genėjimas Root pruning	Pro-Ca	Vasarinis genėjimas Summer pruning
Procianidinas B2 Procyanidin B2	0,23 ± 0,012^{c}	0,28 ± 0,014^{b}	0,35 ± 0,017^{a}	0,24 ± 0,012^{c}	0,32 ± 0,016^{a}
Procianidinas C1 Procyanidin C1	0,10 ± 0,005^{b}	0,13 ± 0,006^{a}	0,11 ± 0,006^{ab}	0,08 ± 0,004^{c}	0,12 ± 0,006^{a}
(+)-Katechinas (+)-Catechin	0,04 ± 0,002^{c}	0,04 ± 0,002^{c}	0,06 ± 0,003^{a}	0,05 ± 0,002^{b}	0,05 ± 0,003^{ab}
(–)-Epikatechinas (–)-Epicatechin	0,29 ± 0,014^{bc}	0,32 ± 0,016^{ab}	0,35 ± 0,018^{a}	0,26 ± 0,013^{c}	0,31 ± 0,016^{ab}
Floridzinas Phlorizin	0,08 ± 0,004^{a}	0,08 ± 0,004^{a}	0,08 ± 0,004^{a}	0,06 ± 0,003^{b}	0,08 ± 0,004^{a}
Chlorogeno rūgštis Chlorogenic acid	0,62 ± 0,031^{a}	0,61 ± 0,031^{a}	0,57 ± 0,028^{a}	0,35 ± 0,017^{b}	0,55 ± 0,028^{a}

Pastaba: Toje pačioje eilutėje esančios skirtingos raidės žymi statistiškai patikimus individualių junginių kiekių skirtumus tarp tirtų obuolių ėminių ($p < 0,05$).

Note. The different letters in the same line indicate statistically significant differences between the individual compounds in the apple samples ($p < 0.05$).

Taip pat ištyrėme individualių fenolinių junginių įtaką bendram antioksidaciniam aktyvumui obels vaisiuose, augusiuose skirtingomis augumo priemonėmis paveiktose obelyse. Bendro antioksidacinio aktyvumo rezultatai koreliuoja su bendru tirtų fenolinių junginių kiekiu. Mažiausias antiradikalinis (36 lentelė) ir redukcinis (37 lentelė) aktyvumas nustatytas vaisiuose, skintuose iš vaismedžių, kurie buvo purkšti kalcio proheksadionu, o didžiausias – vaisiuose, kurie buvo skinti iš vaismedžių, kuriems buvo pjaunamos šaknys. Šie rezultatai taip pat sutampa su kitų mokslininkų atliktu tyrimu (Petkovšek et al., 2009).

36 lentelė. Vaismedžių augumo reguliavimo įtaka antiradikaliniam aktyvumui (TE_{ABTS}, μmol/g) ir individualių junginių indėliui į suminį antiradikalinį aktyvumą (IAA, %) obuolių ėminiuose, SM (veislė 'Ligol', 2015 m.)

Table 36. Effect of tree growth regulation on apple radical scavenging activity (TE_{ABTS}, μmol/g), and individual compounds contribution to the total antiradical activity (IAA, %), DW (cv. 'Ligol', 2015)

Junginys Compound	Vaismedžių augumo reguliavimo priemonės Tree growth regulation treatments									
	Kontrolė Control		Kamieno įpjovimas Trunk incision		Šaknų genėjimas Root pruning		Pro-Ca		Vasarinis genėjimas Summer pruning	
	TE	IAA	TE	IAA	TE	IAA	TE	IAA	TE	IAA
Hiperozidas Hyperoside	0,13	3,26	0,01	0,54	0,36	6,97	0,14	4,34	0,21	4,77
Izokvercitrinas Isoquercitrin	0,02	0,84	0,01	0,54	0,08	1,80	0,02	1,14	0,01	0,63
Rutinas / Rutin	0,10	2,56	0,23	4,77	0,04	1,10	0,05	2,03	0,06	1,68
Reinotrinas Reynoutrin	0,04	1,28	0,03	1,00	0,03	0,99	0,04	1,56	0,06	1,57
Avikuliarinas Avicularin	0,07	1,86	0,09	2,18	0,11	2,33	0,04	1,60	0,07	1,81
Kvercitrinas Quercitrin	0,04	1,17	0,07	1,65	0,07	1,60	0,01	0,65	0,05	1,37
Procianidinas B1 Procyanidin B1	0,07	1,81	0,11	2,57	0,06	1,39	0,12	3,98	0,00	0,41
Procianidinas B2 Procyanidin B2	0,86	18,94	1,03	20,50	0,95	17,99	0,69	19,80	0,95	20,41
Procianidinas C1 Procyanidin C1	0,27	6,12	0,03	0,97	0,25	4,97	0,21	6,28	0,33	7,39
(+)-Katechinas (+)-Catechin	0,11	2,74	0,08	1,83	0,10	2,28	0,13	4,10	0,13	3,22
(–)-Epikatechinas (–)-Epicatechin	0,93	20,37	1,14	22,53	1,25	23,54	0,89	25,31	1,06	22,63
Chlorogeno rūgštis Chlorogenic acid	1,53	33,20	1,65	32,59	1,42	26,74	0,73	20,98	1,35	28,82
Neidentifikuoti Unidentified	0,20	5,86	0,35	8,34	0,37	8,30	0,22	8,22	0,18	5,30
Suminis / Total	**4,36^{b}**		**4,83^{ab}**		**5,09^{a}**		**3,30^{c}**		**4,47^{ab}**	

Pastaba: Paskutinėje (suminėje) eilutėje esančios skirtingos raidės žymi statistiškai patikimą antiradikalinio aktyvumo skirtumą tarp tirtų obuolių ėminių ($p < 0,05$).

Note. The different letters in the last (total) line indicate statistically significant differences between radical scavenging activity in the apple samples ($p < 0.05$).

37 lentelė. Vaismedžių augumo reguliavimo įtaka redukciniam aktyvumui (TE_{FRAP}, μmol/g) ir individualių junginių indėliui į suminį antiradikalinį aktyvumą (IAA, %) obuolių ėminiuose, SM (veislė 'Ligol', 2015 m.)

Table 37. Effect of tree growth regulation on apple radical reducing activity (TE_{FRAP}, μmol/g), and individual compounds contribution to the total antiradical activity (IAA, %), DW (cv. 'Ligol', 2015)

Junginys Compound	Vaismedžių augumo reguliavimo priemonės Tree growth regulation treatments									
	Kontrolė Control		Kamieno įpjovimas Trunk incision		Šaknų genėjimas Root pruning		Pro-Ca		Vasarinis genėjimas Summer pruning	
	TE	IAA	TE	IAA	TE	IAA	TE	IAA	TE	IAA
Hiperozidas Hyperoside	0,09	3,05	0,02	0,51	0,21	6,43	0,09	3,93	0,13	4,41
Izokvercitrinas Isoquercitrin	0,02	0,78	0,01	0,23	0,06	1,66	0,02	1,03	0,02	0,58
Rutinas / Rutin	0,07	2,39	0,14	4,45	0,03	1,02	0,04	1,83	0,05	1,55
Reinotrinas Reynoutrin	0,03	1,19	0,03	0,93	0,03	0,91	0,03	1,41	0,04	1,45
Avikuliarinas Avicularin	0,05	1,73	0,06	2,03	0,07	2,15	0,03	1,45	0,05	1,68
Kvercitrinas Quercitrin	0,03	1,10	0,05	1,54	0,05	1,48	0,01	0,59	0,04	1,27
Procianidinas B1 Procyanidin B1	0,05	1,69	0,08	2,40	0,04	1,28	0,08	3,60	0,01	0,38
Procianidinas B2 Procyanidin B2	0,50	17,70	0,59	19,14	0,55	16,61	0,40	17,91	0,55	18,87
Procianidinas C1 Procyanidin C1	0,09	3,09	0,07	2,32	0,07	2,20	0,09	3,76	0,07	2,49
(+)-Katechinas (+)-Catechin	0,07	2,56	0,05	1,71	0,07	2,11	0,08	3,71	0,09	2,97
(–)-Epikatechinas (–)-Epicatechin	0,54	19,03	0,65	21,04	0,72	21,73	0,51	22,89	0,61	20,92
Chlorogeno rūgštis Chlorogenic acid	0,87	31,02	0,94	30,42	0,81	24,69	0,43	18,98	0,77	26,64
Neidentifikuoti Unidentified	0,42	14,65	0,42	13,29	0,59	17,73	0,43	18,91	0,49	16,77
Suminis / Total	**2,84^{b}**		**3,12^{ab}**		**3,31^{a}**		**2,26^{c}**		**2,93^{ab}**	

Pastaba: Paskutinėje (suminėje) eilutėje esančios skirtingos raidės žymi statistiškai patikimą redukcinio aktyvumo skirtumą tarp tirtų obuolių ėminių ($p < 0,05$).

Note. The different letters in the last (total) line indicate statistically significant differences between radical reducing activity in the apple samples ($p < 0.05$).

Vaismedžių konkurencinė įtampa. Kvercetino glikozidų kiekis obels vaisiuose truputį mažėjo didėjant atstumams tarp vaismedžių (38 lentelė). Iš flavan-3-olių grupės fenolinių junginių, reikšmingai skyrėsi procianidinas B1 – jo vaisiuose iš tankiausiai augančių vaismedžių buvo nustatyta mažiausiai, ir procianidinas C1 – jo šiuose vaisiuose nustatyta daugiausiai (39 lentelė). Floridzino kiekis vaisiuose didėjo mažėjant atstumui tarp vaismedžių. Chlorogeno rūgšties kiekis reikšmingai nesiskyrė. Nepaisant keleto individualių junginių skirtumų, bendras tirtų fenolinių junginių kiekis vaisiuose nekito (8 pav.), t.y. vaismedžių sodinimo atstumas fenolinių junginių kiekiui vaisiuose įtakos neturėjo, nors pastebėta nežymi tendencija, jog vaismedžių tankumui didėjant, nežymiai didėja ir fenolinių junginių kiekis vaisiuose.

38 lentelė. Vaismedžių sodinimo atstumo įtaka kvercetino glikozidų kiekybinės sudėties įvairavimui obuolių ėminiuose, mg g^{-1} SM (veislė 'Auksis', 2015-2016 m. vidurkis)
Table 38. Fruit-tree planting distance effect on apple quercetin glycosides composition, mg g^{-1} DW (cv. 'Auksis', average 2015-2016)

Junginys Compound	Vaismedžių sodinimo atstumas, m Fruit-tree planting distance, m		
	3 x 1,50	3 x 1,00	3 x 0,50
Hiperozidas Hyperoside	0,07 ± 0,003[a]	0,07 ± 0,004[a]	0,06 ± 0,003[b]
Izokvercitrinas Isoquercitrin	0,03 ± 0,002[a]	0,03 ± 0,002[a]	0,03 ± 0,002[a]
Rutinas Rutin	0,02 ± 0,001[a]	0,02 ± 0,001[a]	0,01 ± 0,001[b]
Reinotrinas Reynoutrin	0,02 ± 0,001[ab]	0,03 ± 0,001[a]	0,02 ± 0,001[b]
Avikuliarinas Avicularin	0,07 ± 0,003[a]	0,07 ± 0,003[a]	0,06 ± 0,003[a]
Kvercitrinas Quercitrin	0,05 ± 0,002[b]	0,06 ± 0,003[a]	0,04 ± 0,002[c]

Pastaba: Toje pačioje eilutėje esančios skirtingos raidės žymi statistiškai patikimus individualių junginių kiekių skirtumus tarp tirtų obuolių ėminių ($p < 0,05$).
Note. The different letters in the same line indicate statistically significant differences between the individual compounds in the apple samples ($p < 0.05$).

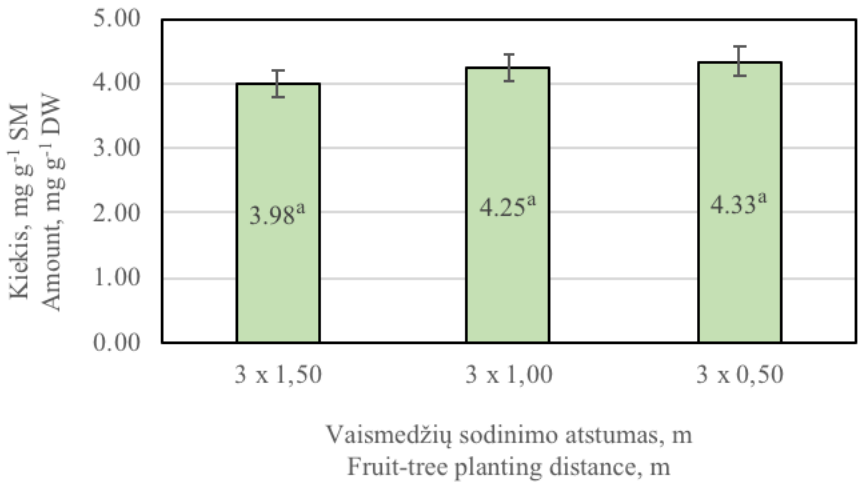
39 lentelė. Vaismedžių sodinimo atstumo įtaka flavan-3-olių, floridzino ir chlorogeno rūgšties kiekybinės sudėties įvairavimui obuolių ėminiuose, mg g^{-1} SM (veislė 'Auksis', 2015-2016 m. vidurkis)

Table 39. Fruit-tree planting distance effect on apple flavan-3-ol's, phlorizin and chlorogenic acid composition, mg g^{-1} DW (cv. 'Auksis', average 2015-2016)

Junginys Compound	Vaismedžių sodinimo atstumas, m Fruit-tree planting distance, m		
	3 x 1,50	3 x 1,00	3 x 0,50
Procianidinas B1 / Procyanidin B1	0,05 ± 0,003[a]	0,05 ± 0,002[a]	0,04 ± 0,002[b]
Procianidinas B2 / Procyanidin B2	0,57 ± 0,028[a]	0,58 ± 0,029[a]	0,578 ± 0,029[a]
Procianidinas C1 / Procyanidin C1	0,23 ± 0,011[b]	0,22 ± 0,011[b]	0,267± 0,013[a]
(+)-Katechinas / (+)-Catechin	0,14 ± 0,007[a]	0,15 ± 0,008[a]	0,14 ± 0,007[a]
(–)-Epikatechinas / (–)-Epicatechin	0,42 ± 0,021[a]	0,43 ± 0,022[a]	0,45 ± 0,022[a]
Floridzinas / Phlorizin	0,12 ± 0,006[c]	0,21 ± 0,011[b]	0,26 ± 0,013[a]
Chlorogeno rūgštis / Chlorogenic acid	2,20 ± 0,110[a]	2,32 ± 0,116[a]	2,38 ± 0,119[a]

Pastaba: Toje pačioje eilutėje esančios skirtingos raidės žymi statistiškai patikimus individualių junginių kiekių skirtumus tarp tirtų obuolių ėminių ($p < 0,05$).

Note. The different letters in the same line indicate statistically significant differences between the individual compounds in the apple samples ($p < 0.05$).



8 pav. Bendras tirtų fenolinių junginių kiekis (mg g^{-1}) obuoliuose, skintuose iš skirtingais atstumais augančių vaismedžių (veislė 'Auksis', 2015-2016 m. vidurkis)

Fig. 8. Total amount of investigated phenolic compounds (mg g^{-1}) in apples taken from apple-trees with different growing distance (cv. 'Auksis', average 2015-2016)

Antiradikalinis aktyvumas (40 lentelė) vaisiuose beveik nesiskyrė, o mažesnis redukcinis aktyvumas (41 lentelė) pastebėtas vaisiuose, skintuose iš vaismedžių, augančių tankiausiu atstumu – kas pusantro metro. Tai galima būtų paaiškinti šiek tiek mažesniu fenolinių junginių kiekiu šiuose vaisiuose.

40 lentelė. Vaismedžių sodinimo atstumo įtaka antiradikaliniam aktyvumui (TE_{ABTS}, µmol/g) ir individualių junginių indėliui į suminį antiradikalinį aktyvumą (IAA, %) obuolių ėminiuose, SM (veislė 'Ligol', 2015 m.)

Table 40. Fruit-tree planting distance effect on apple radical scavenging activity (TE_{ABTS}, µmol/g), and individual compounds contribution to the total antiradical activity (IAA, %), DW (cv. 'Ligol', 2015)

Junginys Compound	Vaismedžių sodinimo atstumas, m Fruit-tree planting distance, m					
	3 x 1,50		3 x 1,00		3 x 0,50	
	TE	IAA	TE	IAA	TE	IAA
Hiperozidas / Hyperoside	0,11	1,09	0,10	0,94	0,06	0,72
Izokvercitrinas / Isoquercitrin	0,09	0,95	0,02	0,34	0,01	0,24
Rutinas / Rutin	0,18	1,70	0,13	1,24	0,13	1,41
Reinotrinas / Reynoutrin	0,01	0,28	0,02	0,36	0,04	0,54
Avikuliarinas / Avicularin	0,10	1,05	0,09	0,92	0,05	0,60
Kvercitrinas / Quercitrin	0,04	0,48	0,07	0,79	0,01	0,24
Procianidinas B1 / Procyanidin B1	0,35	3,18	0,33	2,91	0,31	3,03
Procianidinas B2 / Procyanidin B2	1,83	15,85	1,80	15,37	1,58	14,65
Procianidinas C1 / Procyanidin C1	1,23	10,66	0,66	5,73	0,63	5,97
(+)-Katechinas / (+)-Catechin	0,37	3,29	0,40	3,51	0,36	3,45
(–)-Epikatechinas / (–)-Epicatechin	0,97	8,44	1,87	15,99	1,80	16,75
Chlorogeno rūgštis / Chlorogenic acid	5,39	46,38	5,53	46,80	5,02	46,24
Neidentifikuoti / Unidentified	0,70	6,65	0,53	5,12	0,60	6,16
Suminis / Total	**11,38[a]**		**11,58[a]**		**10,59[a]**	

Pastaba: Paskutinėje (suminėje) eilutėje esančios skirtingos raidės žymi statistiškai patikimą antiradikalinio aktyvumo skirtumą tarp tirtų obuolių ėminių ($p < 0,05$).

Note. The different letters in the last (total) line indicate statistically significant differences between radical scavenging activity in the apple samples ($p < 0.05$).

41 lentelė. Vaismedžių sodinimo atstumo įtaka redukciniam aktyvumui (TE_{FRAP}, μmol/g) ir individualių junginių indėliui į suminį antiradikalinį aktyvumą (IAA, %) obuolių ėminiuose, SM (veislė 'Ligol', 2015 m.)

Table 41. Fruit-tree planting distance effect on apple radical reducing activity (TE_{FRAP}, μmol/g), and individual compounds contribution to the total antiradical activity (IAA, %), DW (cv. 'Ligol', 2015)

Junginys Compound	Vaismedžių sodinimo atstumas, m Fruit-tree planting distance, m					
	3 x 1,50		3 x 1,00		3 x 0,50	
	TE	IAA	TE	IAA	TE	IAA
Hiperozidas / Hyperoside	0,20	1,82	0,21	1,53	0,14	1,17
Izokvercitrinas / Isoquercitrin	0,10	0,82	0,12	0,88	0,10	0,82
Rutinas / Rutin	0,12	1,24	0,12	0,92	0,11	0,92
Reinotrinas / Reynoutrin	0,06	0,55	0,11	0,86	0,07	0,57
Avikuliarinas / Avicularin	0,15	1,29	0,19	1,39	0,14	1,15
Kvercitrinas / Quercitrin	0,10	0,89	0,12	0,88	0,11	0,88
Procianidinas B1 / Procyanidin B1	0,25	2,60	0,22	1,65	0,21	1,78
Procianidinas B2 / Procyanidin B2	1,07	11,49	1,27	9,61	1,20	10,06
Procianidinas C1 / Procyanidin C1	0,32	3,76	0,27	2,05	0,29	2,39
(+)-Katechinas / (+)-Catechin	0,30	2,94	0,45	3,36	0,42	3,54
(–)-Epikatechinas / (–)-Epicatechin	1,36	13,87	1,77	13,41	1,71	14,37
Chlorogeno rūgštis / Chlorogenic acid	5,07	48,72	7,39	55,85	6,50	54,48
Neidentifikuoti / Unidentified	0,93	10,01	1,02	7,61	0,94	7,87
Suminis / Total	**10,02^{b}**		**13,26^{a}**		**11,94^{a}**	

Pastaba: Paskutinėje (suminėje) eilutėje esančios skirtingos raidės žymi statistiškai patikimą redukcinio aktyvumo skirtumą tarp tirtų obuolių ėminių ($p < 0,05$).

Note. The different letters in the last (total) line indicate statistically significant differences between radical reducing activity in the apple samples ($p < 0.05$).

Geografinė vaismedžių augimo vieta. Kvercetino glikozidų kiekis veislės 'Auksis' obuoliuose tendencingai didėjo vaisiams augant soduose išsidėsčiusiuose šiaurės-rytų kryptimi (42 lentelė). Lenkijoje išaugusiuose obuoliuose šių junginių nustatyta mažiausiai, Estijoje – daugiausiai. Flavan-3-olių kiekis taip pat tendencingai didėjo ta pačia kryptimi, nors skirtumai tarp Lenkijos ir Lietuvos nebuvo esminiai (43 lentelė). Floridzino ir chlorogeno rūgšties kiekis patikimai didėjo einant link šiaurės rytinių regionų. Ši tendencija taip pat aiškiai atsispindi bendrame tirtų fenolinių junginių kiekyje (9 pav.). Estijoje

išaugusiuose veislės 'Auksis' obuoliuose fenolinių junginių buvo net 2,5 karto daugiau negu Lenkijoje išaugusiuose obuoliuose.

Taip pat ištyrėme individualių fenolinių junginių įtaką bendram antioksidaciniam aktyvumui veislės 'Auksis' obuoliuose, skintuose iš skirtingose geografinėse vietose augusių vaismedžių. Didžiausias antiradikalinis aktyvumas nustatytas vaisiuose, išaugusiuose Estijoje, mažiausias – Lenkijoje. Antiradikalinio aktyvumo skirtumas tarp šių vietovių sudaro net 3,3 karto (44 lentelė). Redukcinis aktyvumas taip pat didžiausias nustatytas Estijoje, mažiausias – Lenkijoje. Čia redukcinio aktyvumo skirtumas siekė apie 3 kartus (45 lentelė).

42 lentelė. Geografinės vaismedžių augimo vietos įtaka kvercetino glikozidų kiekybinės sudėties įvairavimui obuolių ėminiuose, mg g^{-1} SM (veislė 'Auksis', 2015-2016 m. vidurkis)
Table 42. Geographical fruit-tree growing location effect on apple quercetin glycosides composition, mg g^{-1} DW (cv. 'Auksis', average 2015-2016)

Junginys Compound	Geografinė vietovė / Geographical location		
	Lenkija Poland	Lietuva Lithuania	Estija Estonia
Hiperozidas Hyperoside	0,09 ± 0,005^{c}	0,12 ± 0,006^{b}	0,20 ± 0,010^{a}
Izokvercitrinas Isoquercitrin	0,03 ± 0,002^{b}	0,04 ± 0,002^{b}	0,05 ± 0,003^{a}
Rutinas Rutin	0,01 ± 0,001^{c}	0,02 ± 0,001^{b}	0,02 ± 0,001^{a}
Reinotrinas Reynoutrin	0,03 ± 0,001^{c}	0,04 ± 0,002^{b}	0,09 ± 0,004^{a}
Avikuliarinas Avicularin	0,07 ± 0,003^{c}	0,09 ± 0,004^{b}	0,19 ± 0,009^{a}
Kvercitrinas Quercitrin	0,04 ± 0,002^{b}	0,05 ± 0,002^{b}	0,08± 0,004^{a}

Pastaba: Toje pačioje eilutėje esančios skirtingos raidės žymi statistiškai patikimus individualių junginių kiekių skirtumus tarp tirtų obuolių ėminių ($p < 0,05$).
Note. The different letters in the same line indicate statistically significant differences between the individual compounds in the apple samples ($p < 0.05$).

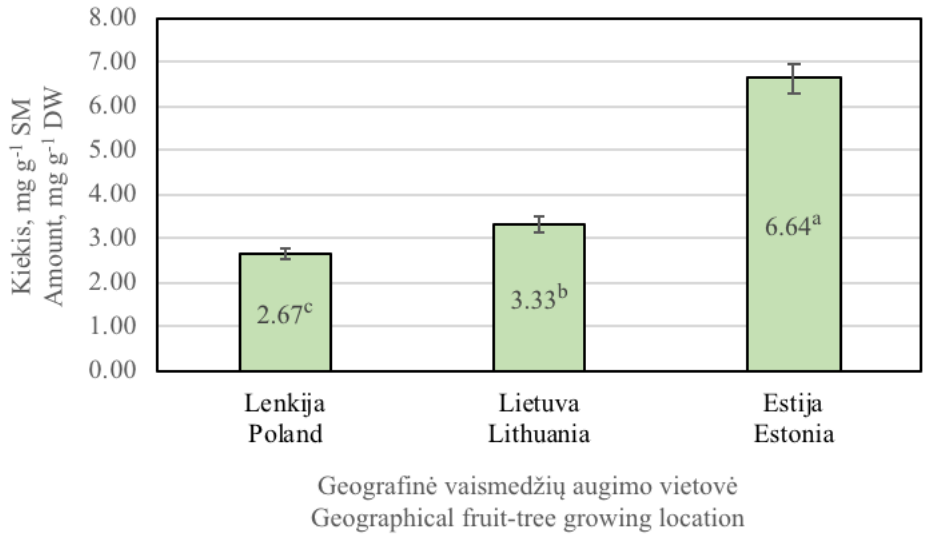
43 lentelė. Geografinės vaismedžių augimo vietos įtaka flavan-3-olių, floridzino ir chlorogeno rūgšties kiekybinės sudėties įvairavimui obuolių ėminiuose, mg g^{-1} SM (veislė 'Auksis', 2015-2016 m. vidurkis)

Table 43. Geographical fruit-tree growing location effect on apple flavan-3-ol's, phlorizin and chlorogenic acid composition, mg g^{-1} DW (cv. 'Auksis', average 2015-2016)

Junginys Compound	Geografinė vietovė / Geographical location		
	Lenkija Poland	Lietuva Lithuania	Estija Estonia
Procianidinas B1 / Procyanidin B1	0,02 ± 0,001[b]	0,02 ± 0,001[b]	0,10 ± 0,005[a]
Procianidinas B2 / Procyanidin B2	0,39 ± 0,020[b]	0,42 ± 0,021[b]	1,11 ± 0,056[a]
Procianidinas C1 / Procyanidin C1	0,16 ± 0,008[b]	0,16 ± 0,008[b]	0,46 ± 0,023[a]
(+)-Katechinas / (+)-Catechin	0,06 ± 0,003[b]	0,08 ± 0,004[b]	0,25 ± 0,012[a]
(–)-Epikatechinas / (–)-Epicatechin	0,25 ± 0,012[c]	0,34 ± 0,017[b]	0,76 ± 0,038[a]
Floridzinas / Phlorizin	0,08 ± 0,004[c]	0,10 ± 0,005[b]	0,18 ± 0,009[a]
Chlorogeno rūgštis / Chlorogenic acid	1,44 ± 0,072[c]	1,87 ± 0,093[b]	3,15 ± 0,157[a]

Pastaba: Toje pačioje eilutėje esančios skirtingos raidės žymi statistiškai patikimus individualių junginių kiekių skirtumus tarp tirtų obuolių ėminių ($p < 0,05$).

Note. The different letters in the same line indicate statistically significant differences between the individual compounds in the apple samples ($p < 0.05$).



9 pav. Bendras tirtų fenolinių junginių kiekis (mg g^{-1} SM) obuoliuose, išaugusiuose skirtingose geografinėse vietovėse (veislė 'Auksis', 2015-2016 m. vidurkis)

Fig. 9. Total amount of investigated phenolic compounds (mg g^{-1} DW) in apples grown in different geographical location (cv. 'Auksis', average 2015-2016)

44 lentelė. Geografinės vaismedžių augimo vietos įtaka antiradikaliniam aktyvumui (TE_{ABTS}, μmol/g) ir individualių junginių indėliui į suminį antiradikalinį aktyvumą (IAA, %) obuolių ėminiuose, SM (veislė 'Auksis', 2015 m.)

Table 44. Geographical fruit-tree growing location effect on apple radical scavenging activity (TE_{ABTS}, μmol/g), and individual compounds contribution to the total antiradical activity (IAA, %), DW (cv. 'Auksis', 2015)

Junginys Compound	Geografinė vietovė Geographical location					
	Lenkija Poland		Lietuva Lithuania		Estija Estonia	
	TE	IAA	TE	IAA	TE	IAA
Hiperozidas / Hyperoside	0,08	1,81	0,18	2,82	0,30	1,89
Izokvercitrinas / Isoquercitrin	0,02	0,71	0,02	0,48	0,05	0,41
Rutinas / Rutin	0,06	1,44	0,07	1,28	0,17	1,12
Reinotrinas / Reynoutrin	0,02	0,65	0,03	0,71	0,15	0,98
Avikuliarinas / Avicularin	0,05	1,39	0,11	1,84	0,35	2,22
Kvercitrinas / Quercitrin	-	-	0,06	1,04	0,04	0,33
Procianidinas B1 / Procyanidin B1	0,15	3,12	0,29	4,34	0,61	3,81
Procianidinas B2 / Procyanidin B2	0,71	13,89	0,99	14,27	2,97	17,97
Procianidinas C1 / Procyanidin C1	0,33	6,61	0,33	4,89	1,37	8,34
(+)-Katechinas / (+)-Catechin	0,10	2,28	0,15	2,44	0,61	3,76
(–)-Epikatechinas / (–)-Epicatechin	0,48	9,46	0,88	12,75	2,56	15,54
Chlorogeno rūgštis / Chlorogenic acid	2,49	47,97	3,24	46,07	5,90	35,63
Neidentifikuoti / Unidentified	0,49	10,66	0,43	7,08	1,26	8,01
Suminis / Total	**4,97^{c}**		**6,78^{b}**		**16,33^{a}**	

Pastaba: Paskutinėje (suminėje) eilutėje esančios skirtingos raidės žymi statistiškai patikimą antiradikalinio aktyvumo skirtumą tarp tirtų obuolių ėminių ($p < 0,05$).

Note. The different letters in the last (total) line indicate statistically significant differences between radical scavenging activity in the apple samples ($p < 0.05$).

45 lentelė. Geografinės vaismedžių augimo vietos įtaka redukciniam aktyvumui (TE_{FRAP}, μmol/g) ir individualių junginių indėliui į suminį antiradikalinį aktyvumą (IAA, %) obuolių ėminiuose, SM (veislė 'Auksis', 2015 m.)

Table 45. Geographical fruit-tree growing location effect on apple radical reducing activity (TE_{FRAP}, μmol/g), and individual compounds contribution to the total antiradical activity (IAA, %), DW (cv. 'Auksis', 2015)

Junginys Compound	Geografinė vietovė Geographical location					
	Lenkija Poland		Lietuva Lithuania		Estija Estonia	
	TE	IAA	TE	IAA	TE	IAA
Hiperozidas / Hyperoside	0,21	3,09	0,27	3,44	0,74	3,58
Izokvercitrinas / Isoquercitrin	0,14	2,04	0,12	1,50	0,29	1,38
Rutinas / Rutin	0,05	0,77	0,12	1,56	0,25	1,22
Reinotrinas / Reynoutrin	0,14	2,05	0,12	1,55	0,39	1,87
Avikuliarinas / Avicularin	0,14	2,09	0,23	2,99	0,73	3,49
Kvercitrinas / Quercitrin	0,05	0,72	0,16	2,08	0,41	1,97
Procianidinas B1 / Procyanidin B1	0,29	4,27	0,10	1,27	0,47	2,28
Procianidinas B2 / Procyanidin B2	0,75	11,11	0,71	9,19	2,31	11,14
Procianidinas C1 / Procyanidin C1	0,24	3,53	0,24	3,11	0,72	3,47
(+)-Katechinas / (+)-Catechin	0,20	2,89	0,16	2,09	0,70	3,35
(–)-Epikatechinas / (–)-Epicatechin	0,60	8,81	0,88	11,26	2,69	12,95
Chlorogeno rūgštis / Chlorogenic acid	3,09	45,69	4,01	51,67	8,20	39,47
Neidentifikuoti / Unidentified	0,88	12,93	0,65	8,30	2,88	13,83
Suminis / Total	**6,77^{c}**		**7,79^{b}**		**20,78^{a}**	

Pastaba: Paskutinėje (suminėje) eilutėje esančios skirtingos raidės žymi statistiškai patikimą redukcinio aktyvumo skirtumą tarp tirtų obuolių ėminių ($p < 0,05$).

Note. The different letters in the last (total) line indicate statistically significant differences between radical reducing activity in the apple samples ($p < 0.05$).

Kvercetino glikozidų (46 lentelė), flavan-3-olių, floridzino ir chlorogeno rūgšties (47 lentelė) kiekiai veislės 'Ligol' obuoliuose varijavo skirtingai, tačiau didžiausias bendras šių junginių kiekis taip pat nustatytas Estijoje, kaip ir su veislės 'Auksis' obuoliais (10 pav.).

46 lentelė. Geografinės vaismedžių augimo vietos įtaka kvercetino glikozidų kiekybinės sudėties įvairavimui obuolių ėminiuose, mg g^{-1} SM (veislė 'Ligol', 2015-2016 m. vidurkis)
Table 46. Geographical fruit-tree growing location effect on apple quercetin glycosides composition, mg g^{-1} DW (cv. 'Ligol', average 2015-2016)

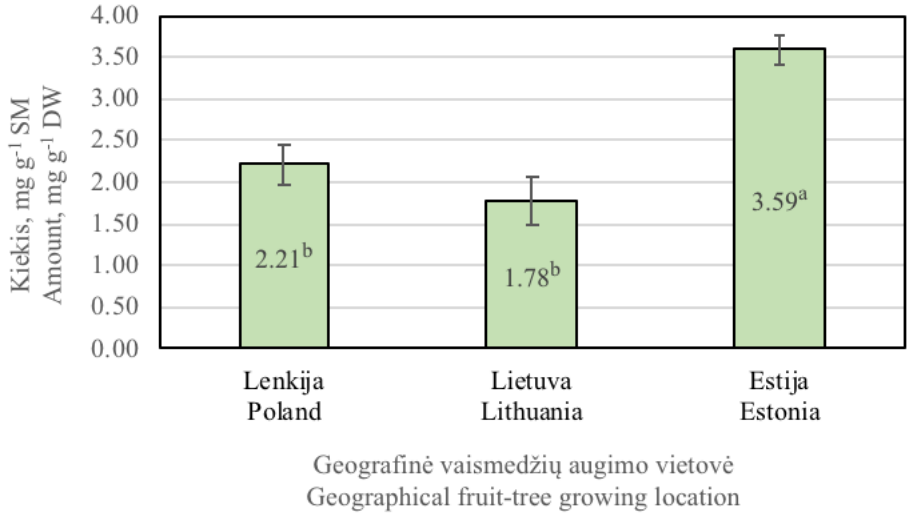
Junginys Compound	Geografinė vietovė / Geographical location		
	Lenkija Poland	Lietuva Lithuania	Estija Estonia
Hiperozidas / Hyperoside	$0,19 \pm 0,020^{b}$	$0,10 \pm 0,015^{c}$	$0,24 \pm 0,012^{a}$
Izokvercitrinas / Isoquercitrin	$0,04 \pm 0,005^{a}$	$0,03 \pm 0,004^{b}$	$0,05 \pm 0,002^{a}$
Rutinas / Rutin	$0,03 \pm 0,002^{a}$	$0,02 \pm 0,002^{c}$	$0,03 \pm 0,001^{b}$
Reinotrinas / Reynoutrin	$0,04 \pm 0,005^{b}$	$0,02 \pm 0,002^{c}$	$0,07 \pm 0,004^{a}$
Avikuliarinas / Avicularin	$0,09 \pm 0,011^{b}$	$0,06 \pm 0,007^{c}$	$0,15 \pm 0,007^{a}$
Kvercitrinas / Quercitrin	$0,11 \pm 0,012^{b}$	$0,08 \pm 0,009^{c}$	$0,15 \pm 0,008^{a}$

Pastaba: Toje pačioje eilutėje esančios skirtingos raidės žymi statistiškai patikimus individualių junginių kiekių skirtumus tarp tirtų obuolių ėminių ($p < 0,05$).
Note. The different letters in the same line indicate statistically significant differences between the individual compounds in the apple samples ($p < 0.05$).

47 lentelė. Geografinės vaismedžių augimo vietos įtaka flavan-3-olių, floridzino ir chlorogeno rūgšties kiekybinės sudėties įvairavimui obuolių ėminiuose, mg g^{-1} SM (veislė 'Ligol', 2015-2016 m. vidurkis)
Table 47. Geographical fruit-tree growing location effect on apple flavan-3-ol's, phlorizin and chlorogenic acid composition, mg g^{-1} DW (cv. 'Ligol', average 2015-2016)

Junginys Compound	Geografinė vietovė / Geographical location		
	Lenkija Poland	Lietuva Lithuania	Estija Estonia
Procianidinas B1 / Procyanidin B1	$0,01 \pm 0,001^{b}$	$0,00 \pm 0,001^{c}$	$0,01 \pm 0,001^{a}$
Procianidinas B2 / Procyanidin B2	$0,40 \pm 0,043^{b}$	$0,31 \pm 0,031^{c}$	$0,55 \pm 0,027^{a}$
Procianidinas C1 / Procyanidin C1	$0,21 \pm 0,022^{a}$	$0,11 \pm 0,012^{b}$	$0,21 \pm 0,011^{a}$
(+)-Katechinas / (+)-Catechin	$0,02 \pm 0,001^{b}$	$0,02 \pm 0,001^{b}$	$0,09 \pm 0,004^{a}$
(–)-Epikatechinas / (–)-Epicatechin	$0,25 \pm 0,013^{b}$	$0,24 \pm 0,012^{b}$	$0,55 \pm 0,028^{a}$
Floridzinas / Phlorizin	$0,08 \pm 0,004^{b}$	$0,08 \pm 0,004^{b}$	$0,14 \pm 0,007^{a}$
Chlorogeno rūgštis / Chlorogenic acid	$0,73 \pm 0,065^{b}$	$0,70 \pm 0,077^{b}$	$1,35 \pm 0,068^{a}$

Pastaba: Toje pačioje eilutėje esančios skirtingos raidės žymi statistiškai patikimus individualių junginių kiekių skirtumus tarp tirtų obuolių ėminių ($p < 0,05$).
Note. The different letters in the same line indicate statistically significant differences between the individual compounds in the apple samples ($p < 0.05$).



10 pav. Bendras tirtų fenolinių junginių kiekis (mg g^{-1} SM) obuoliuose, išaugusiuose skirtingose geografinėse vietovėse (veislė 'Ligol', 2015-2016 m. vidurkis)
Fig. 10. Total amount of investigated phenolic compounds (mg g^{-1} DW) in apples grown in different geographical location (cv. 'Ligol', average 2015-2016)

Taip pat ištyrėme individualių fenolinių junginių įtaką bendram antioksidaciniam aktyvumui veislės 'Ligol' obuoliuose, išaugusiuose skirtingose geografinėse vietose. Didžiausias antiradikalinis aktyvumas nustatytas vaisiuose, išaugusiuose Estijoje. Skirtumas tarp mažiausio ir didžiausio antiradikalinio aktyvumo sudarė 1,8 karto (48 lentelė), redukcinio aktyvumo – 1,7 karto (49 lentelė) ir tai yra ženkliai mažesnis skirtumas, negu veislės 'Auksis' obuoliuose. Tikėtina, jog dėl skirtingos šių veislių genetinės kilmės, veislė 'Ligol' yra mažiau jautri klimatinių sąlygų pokyčiams, nei veislė Auksis'. Tuo ir aiškintume atsiradusius skirtumus.

48 lentelė. Geografinės vaismedžių augimo vietos įtaka antiradikaliniam aktyvumui (TE_{ABTS}, μmol/g) ir individualių junginių indėliui į suminį antiradikalinį aktyvumą (IAA, %) obuolių ėminiuose, SM (veislė 'Ligol', 2015 m.)

Table 48. Geographical fruit-tree growing location effect on apple radical scavenging activity (TE_{ABTS}, μmol/g), and individual compounds contribution to the total antiradical activity (IAA, %), DW (cv. ‘'Ligol', 2015)

Junginys Compound	Geografinė vietovė / Geographical location					
	Lenkija Poland		Lietuva Lithuania		Estija Estonia	
	TE	IAA	TE	IAA	TE	IAA
Hiperozidas / Hyperoside	0,31	5,85	0,18	4,41	0,24	3,14
Izokvercitrinas / Isoquercitrin	0,03	0,92	0,06	1,77	0,03	0,61
Rutinas / Rutin	0,05	1,13	0,02	0,87	0,08	1,17
Reinotrinas / Reynoutrin	0,05	1,17	0,03	1,00	0,06	1,01
Avikuliarinas / Avicularin	0,12	2,35	0,07	2,04	0,16	2,13
Kvercitrinas / Quercitrin	0,12	2,34	0,04	1,37	0,09	1,37
Procianidinas B1 / Procyanidin B1	0,08	1,66	0,04	1,32	0,12	1,72
Procianidinas B2 / Procyanidin B2	1,10	19,56	0,77	17,46	1,30	16,05
Procianidinas C1 / Procyanidin C1	0,40	7,42	0,27	6,38	0,60	7,53
(+)-Katechinas / (+)-Catechin	0,04	1,03	0,06	1,70	0,19	2,53
(–)-Epikatechinas / (–)-Epicatechin	0,90	16,04	0,87	19,76	1,50	18,52
Chlorogeno rūgštis / Chlorogenic acid	1,96	34,78	1,53	34,27	3,09	37,92
Neidentifikuoti / Unidentified	0,26	5,76	0,27	7,64	0,45	6,32
Suminis / Total	**5,41^{b}**		**4,23^{b}**		**7,92^{a}**	

Pastaba: Paskutinėje (suminėje) eilutėje esančios skirtingos raidės žymi statistiškai patikimą antiradikalinio aktyvumo skirtumą tarp tirtų obuolių ėminių ($p < 0,05$).

Note. The different letters in the last (total) line indicate statistically significant differences between radical scavenging activity in the apple samples ($p < 0.05$).

49 lentelė. Geografinės vaismedžių augimo vietos įtaka redukciniam aktyvumui (TE_{FRAP}, μmol/g) ir individualių junginių indėliui į suminį antiradikalinį aktyvumą (IAA, %) obuolių ėminiuose, SM (veislė 'Ligol', 2015 m.)

Table 49. Geographical fruit-tree growing location effect on apple radical reducing activity (TE_{FRAP}, μmol/g), and individual compounds contribution to the total antiradical activity (IAA, %), DW (cv. ''Ligol', 2015)

Junginys Compound	Geografinė vietovė / Geographical location					
	Lenkija Poland		Lietuva Lithuania		Estija Estonia	
	TE	IAA	TE	IAA	TE	IAA
Hiperozidas / Hyperoside	0,49	7,96	0,29	5,19	0,46	4,80
Izokvercitrinas / Isoquercitrin	0,14	2,28	0,07	1,27	0,21	2,14
Rutinas / Rutin	0,04	0,60	0,03	0,53	0,07	0,67
Reinotrinas / Reynoutrin	0,18	2,88	0,17	3,11	0,22	2,27
Avikuliarinas / Avicularin	0,24	3,86	0,13	2,38	0,39	4,08
Kvercitrinas / Quercitrin	0,28	4,46	0,17	3,09	0,36	3,75
Procianidinas B1 / Procyanidin B1	0,07	1,11	0,21	3,74	0,17	1,81
Procianidinas B2 / Procyanidin B2	0,64	10,46	0,44	7,87	1,12	11,73
Procianidinas C1 / Procyanidin C1	0,08	1,35	0,08	1,36	0,27	2,83
(+)-Katechinas / (+)-Catechin	0,11	1,77	0,36	6,51	0,28	2,92
(–)-Epikatechinas / (–)-Epicatechin	0,83	13,53	0,84	15,27	1,40	14,71
Chlorogeno rūgštis / Chlorogenic acid	2,19	35,67	1,88	34,05	3,57	37,50
Neidentifikuoti / Unidentified	0,87	14,07	0,87	15,61	1,04	10,79
Suminis / Total	**6,16^{b}**		**5,55^{b}**		**9,55^{a}**	

Pastaba: Paskutinėje (suminėje) eilutėje esančios skirtingos raidės žymi statistiškai patikimą redukcinio aktyvumo skirtumą tarp tirtų obuolių ėminių ($p < 0,05$).

Note. The different letters in the last (total) line indicate statistically significant differences between radical reducing activity in the apple samples ($p < 0.05$).

***

Vaisių krūvio *reguliavimas obelyse turėjo reikšmingos įtakos obuolių fenolinių junginių sudėčiai. Didėjant vaisių krūviui vaismedyje, didėjo ir bendras fenolinių junginių kiekis obuoliuose. Obels vaisiai, auginti didžiausią vaisių krūvį (12 vaisių cm^{-2} KSP) turinčiuose obelyse, sukaupė iki 23 proc. daugiau fenolinių junginių, nei vaisiai, auginti mažiausią vaisių krūvį (4 vaisiai cm^{-2} KSP) turinčiose vaismedžiuose. Didėjant vaisių*

krūviui taip pat pastebėtas iki 32 proc. didesnis vaisių antiradikalinis aktyvumas bei iki 61 proc. didesnis redukcinis aktyvumas. Šie rezultatai galėtų būti paaiškinami dėl didesnio vaismedžių streso esant aukštesniam vaisių krūviui, kadangi fenolinių junginių sintezė yra bent dalinai susijusi su vaismedžių stresu.

Vaisių augimo vieta *obels vainike turėjo reikšmingos įtakos obuolių fenolinių junginių sudėčiai: vaisiai, augę vainiko viršūnėje, sukaupė 1,7 karto didesnį kvercetino glikozidų kiekį, bei iki 15 proc. didesnį flavan-3-olių kiekį, lyginant su vaisiais, augusiais obels vainiko viduje. Bendras fenolinių junginių kiekis vaisiuose, augusiuose obels vainiko viršūnėje, buvo iki 24 proc. didesnis nei vaisiuose, augusiuose kitose vainiko vietose. Vaisiai skinti iš vainiko viršūnės pasižymėjo apie 31 proc. didesniu antiradikaliniu aktyvumu bei iki 33 proc. didesniu redukciniu aktyvumu. Šie tyrimų rezultatai gali būti paaiškinami skirtingu vaisių gaunamo saulės šviesos kiekiu vaismedžio vainike.*

Vaismedžių augumo reguliavimas *turėjo reikšmingą įtaką obuolių fenolinių junginių sudėčiai. Šaknų pjovimas bei vasarinis genėjimas padidino obuoliuose susikaupiančių kvercetino glikozidų kiekį iki 27 proc., o vaismedžių augumą reguliuojanti priemonė kalcio prohesadionas šių junginių kaupimąsi vaisiuose sumažino apie 29 proc. Bendras tirtų fenolinių junginių kiekis nustatytas vaisiuose iš obelų, kurios buvo purkštos kalcio proheksadionu, buvo apie 24 proc. mažesnis, lyginant su kontroliniu variantu. Šaknų pjovimas turėjo priešingą tendenciją – iki 9 proc. padidino bendrą fenolinių junginių kiekį obels vaisiuose. Ši tendencija taip pat nustatyta tiriant obels vaisių antiradikalinį ir redukcinį aktyvumą. Šiuos fenolinių junginių ir antioksidacinio aktyvumo rezultatus galima paaiškinti vaismedžio atsaku į streso poveikį – tikėtina, jog šaknų pjovimas vaismedžiui sukelia didelį stresą, o kalcio proheksadiono naudojimas esmingai šių junginių sintezę vaisiuose mažino, nes optimizavo vegetatyvinio ir generatyvinio vystymosi balansą.*

Vaismedžių sodinimo atstumas *bendram fenolinių junginių kiekiui obels vaisiuose įtakos neturėjo, pastebėta tik nežymi tendencija, jog vaismedžių tankumui didėjant, vaisiuose nežymiai didėja ir fenolinių junginių kiekis. Antiradikalinis aktyvumas tirtuose obels vaisiuose beveik nesiskyrė, o iki 24 proc. mažesnis redukcinis aktyvumas pastebėtas vaisiuose, skintuose iš vaismedžių, augančių rečiausiai. Tai galima paaiškinti šiek tiek mažesniu fenolinių junginių kiekiu vaisiuose, kur vaismedžių konkurencinė įtampa buvo mažiausia.*

Vaismedžių augimo geografinė vieta *turėjo įtakos obuolių fenolinių junginių sudėčiai. Kvercetino glikozidų kiekis veislės 'Auksis' obuoliuose tendencingai didėjo vaisiams augant soduose išsidėsčiusiuose šiaurės-rytų kryptimi. Lenkijoje skintuose obuoliuose šių junginių nustatyta iki 56 proc. mažiau nei Estijoje išaugintuose obuoliuose. Flavan-3-olių, floridzino ir chlorogeno rūgšties kiekis taip pat tendencingai didėjo ta pačia kryptimi. Ši tendencija taip pat aiškiai atsispindi bendrame tirtų fenolinių junginių kiekyje. Estijoje išaugintuose veislės 'Auksis' obuoliuose fenolinių junginių buvo net 2,5 karto daugiau negu Lenkijoje išaugintuose obuoliuose. Estijoje išaugintuose veislės 'Auksis'*

obuoliuose nustatytas net iki 3,3 kartų didesnis antiradikalinis ir redukcinis aktyvumas nei vaisiuose išaugintuose Lenkijoje. Veislės 'Ligol' obuoliuose fenolinių junginių kiekis taip pat didžiausias buvo Estijoje išaugintuose obuoliuose – čia jų sukaupta apie 2 kartus daugiau nei Lenkijoje ar Lietuvoje. Antiradikalinis ir redukcinis aktyvumas veislės 'Ligol' obuoliuose taip pat didžiausias buvo Estijoje – iki 1,8 karto didesnis nei vaisiuose išaugintuose Lenkijoje ar Lietuvoje. Šiuos fenolinių junginių ir antioksidacinio aktyvumo rezultatus ir skirtumus tarp veislių aiškintume skirtinga šių veislių kilme ir pasireiškiančia skirtinga genų raiška esant skirtingoms klimato sąlygoms. Dėl mažiausiai palankių obelims augimo sąlygų Estijoje, vaismedžiai toje vietovėje sukaupė didžiausią nustatytų fenolinių junginių kiekį abejose veislėse. Tai galima paaiškinti šių vaismedžiu atsaku į stresą – nepalankias augimui klimatines sąlygas.

Apibendrinant gautus tyrimų duomenis, galima teigti, jog obels vaisiuose susikaupiančių kvercetino glikozidų kiekiui didžiausią įtaką turėjo vaisių augimo vieta vaismedžio vainike, o flavan-3-olių, floridzino ir chlorogeno rūgšties kiekiui didžiausią įtaką turėjo geografinė vaismedžių augimo vieta. Priklausomai nuo tirtų biologinių veiksnių bei taikytų technologinių priemonių, obels vaisiuose esantį kvercetino glikozidų kiekį galima padidinti iki 2,7 karto, flavan-3-olių kiekį – iki 3 kartų, floridzino – iki 2,4 karto, chlorogeno rūgšties – iki 2,2 karto, o bendrą fenolinių junginių kiekį – iki 2,5 karto.

3.4. Triterpeninių junginių kokybinės ir kiekybinės sudėties įvairavimas obels vaisiuose

Triterpenai yra gerai žinomi dėl savo farmakologinių savybių, tokių kaip: antibakterinių (Fontanay et al., 2008), priešuždegiminių (Liu, 2005; Ikeda et al., 2008), anti-ŽIV (Kashiwada et al., 2000), priešnavikinių (Young et al., 1995), hepatoprotekcinių (Kim et al., 2004; Saravanan et al., 2006), anti-hiperlipideminių (Somova et al., 2003), ir antidiabetinių (Teodoro et al., 2008; Jang et al., 2009). Nepaisant šių savybių, triterpeniniai junginiai obuoliuose yra mažai tyrinėti. Triterpenai yra didelė grupė junginių priklausančių terpenams. Korosolo, betulino, oleonolo ir ursolo rūgštys yra tipiniai pentaciklinių triterpenų pavyzdžiai, kurie plačiai paplitę augaluose ir maisto produktuose (Jäger et al., 2009; Guinda et al., 2010; Romero et al., 2010; González-Castejón, Rodriguez-Casado, 2011; Mazumder et al., 2011; Muffler et al., 2011). Oleonolo ir ursolo rūgštys taip pat randamos vaisių ir lapų vaškiniame sluoksnyje (Qi et al., 2006; Koch, Ensikat, 2008).

Savo tyrimuose nustatėme keturis triterpeninius junginius: korosolo, betulino, oleonolo ir ursolo rūgštis. Tai yra pagrindiniai ir dominuojantys triterpeniniai junginiai obuoliuose, nors kiti mokslininkai obuoliuose yra nustatę trylika triterpeninių junginių (He, Liu, 2007). Triterpenai yra randami obuolių odelėse, o didžiausią šių junginių dalį sudaro oleonolo ir ursolo rūgštys (Cefarelli et al., 2006; Jäger et al., 2009). Tai patvirtina ir mūsų atlikti tyrimai.

Vaisių krūvio reguliavimas. Obuoliai, auginti didelį vaisių krūvį turinčiuose vaismedžiuose, sukaupė patikimai didesnį triterpeninių junginių kiekį (11 pav.). Ši tendencija nustatyta visiems tirtiems individualiems triterpeniniams junginiams (50 lentelė).

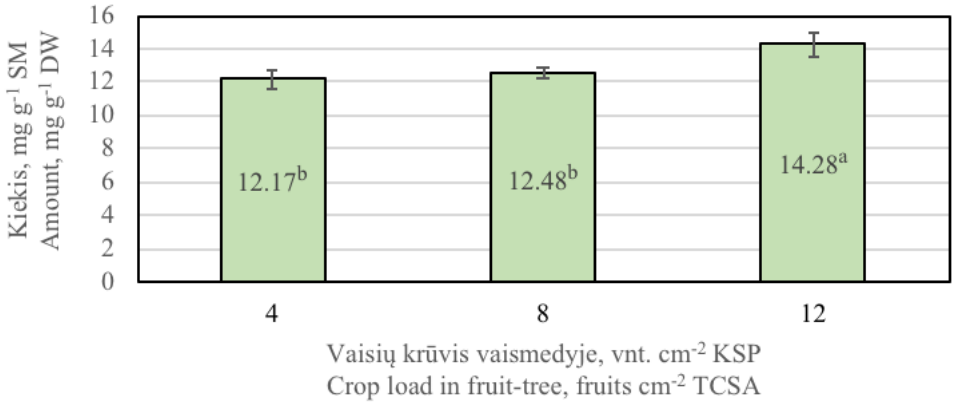
50 lentelė. Vaisių krūvio vaismedyje įtaka triterpenų sudėties įvairavimui obuolių ėminiuose, mg g^{-1} SM (veislė 'Ligol', 2015-2016 m. vidurkis)

Table 50. Crop load effect on apple triterpene composition, mg g^{-1} DW (cv. 'Ligol', average 2015-2016)

Junginys Compound	Vaisių krūvis vaismedyje, vnt. cm^{-2} KSP Crop load in fruit-tree, fruits cm^{-2} TSCA		
	4	8	12
Korosolo rūgštis / Corosolic acid	1,48 ± 0,074[b]	1,48 ± 0,038[b]	1,70 ± 0,085[a]
Betulino rūgštis / Betulinic acid	0,10 ± 0,005[b]	0,11 ± 0,003[b]	0,17 ± 0,008[a]
Oleonolo rūgštis / Oleonolic acid	1,81 ± 0,090[b]	1,97 ± 0,049[b]	2,29 ± 0,115[a]
Ursolo rūgštis / Ursolic acid	8,78 ± 0,439[b]	8,93 ± 0,226[b]	10,13 ± 0,506[a]

Pastaba: Toje pačioje eilutėje esančios skirtingos raidės žymi statistiškai patikimus individualių junginių kiekių skirtumus tarp tirtų obuolių ėminių ($p < 0,05$).

Note. The different letters in the same line indicate statistically significant differences between the individual compounds in the apple samples ($p < 0.05$).



11 pav. Bendras nustatytų triterpenų kiekis (mg g^{-1} SM) obuoliuose, skintuose iš skirtingą vaisių krūvį turinčių obelų (veislė 'Ligol', 2015-2016 m. vidurkis)

Fig. 11. Total amount of investigated triterpenes (mg g^{-1} DW) in apples taken from apple-trees with different crop load (cv. 'Ligol', average 2015-2016)

Vaisių augimo vieta vaismedžio vainike. Obuoliai, skinti iš vaismedžio vidinės dalies, sukaupė didesnį individualių triterpeninių junginių kiekį (51 lentelė). Iš viršūnės ir vakarų pusės skinti obuoliai šių junginių sukaupė mažiausiai (12 pav.). Panašius duomenis nustatė ir kiti mokslininkai - šešėlyje buvę obuoliai sukaupė didesnius oleonolo ir ursolo rūgščių kiekius (Lv et. al., 2015). Skirtumai tarp šešėlyje esančių ir tiesiogiai saulės veikiamų vaisių įtakoja skirtingą vaškinio sluoksnio ir jo struktūros susidarymą, kuri skiriasi tiek kiekybiškai, tiek kokybiškai (Curry, 2008; Tahir et al., 2009).

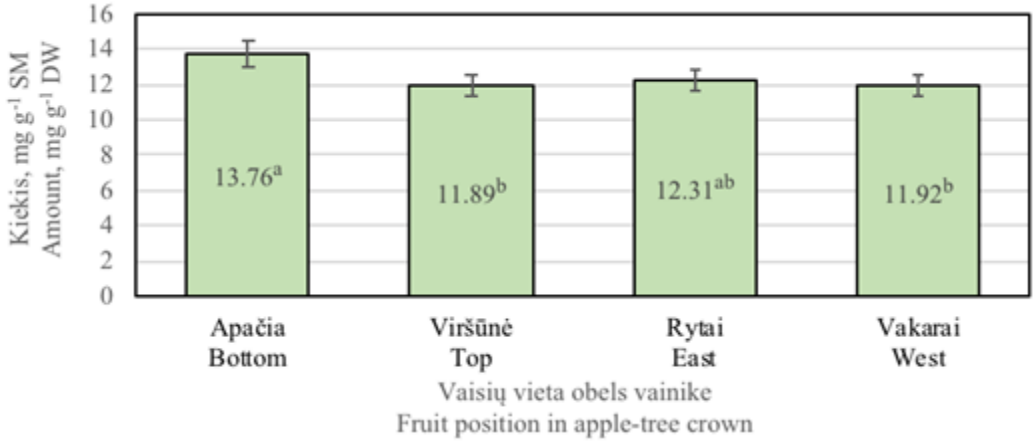
51 lentelė. Vaisių vietos vaismedyje įtaka triterpenų sudėties įvairavimui obuolių ėminiuose, mg g^{-1} SM (veislė 'Ligol', 2015-2016 m. vidurkis)

Table 51. Effect of fruit position in tree on apple triterpene composition, mg g^{-1} DW (cv. 'Ligol', average 2015-2016)

Junginys Compound	Vaisių vieta obelų vainike / Fruit position in apple-tree crown			
	Apačia / Bottom	Viršus / Top	Rytai / East	Vakarai / West
Korosolo rūgštis Corosolic acid	$1,44 \pm 0,072^{a}$	$1,25 \pm 0,063^{b}$	$1,34 \pm 0,067^{ab}$	$1,41 \pm 0,071^{ab}$
Betulino rūgštis Betulinic acid	$0,14 \pm 0,007^{a}$	$0,10 \pm 0,005^{c}$	$0,12 \pm 0,006^{b}$	$0,09 \pm 0,004^{c}$
Oleonolo rūgštis Oleonolic acid	$2,13 \pm 0,107^{a}$	$1,89 \pm 0,095^{ab}$	$1,95 \pm 0,098^{ab}$	$1,77 \pm 0,088^{b}$
Ursolo rūgštis Ursolic acid	$10,05 \pm 0,502^{a}$	$8,65 \pm 0,433^{b}$	$8,90 \pm 0,445^{ab}$	$8,65 \pm 0,432^{b}$

Pastaba: Toje pačioje eilutėje esančios skirtingos raidės žymi statistiškai patikimus individualių junginių kiekių skirtumus tarp tirtų obuolių ėminių ($p < 0,05$).

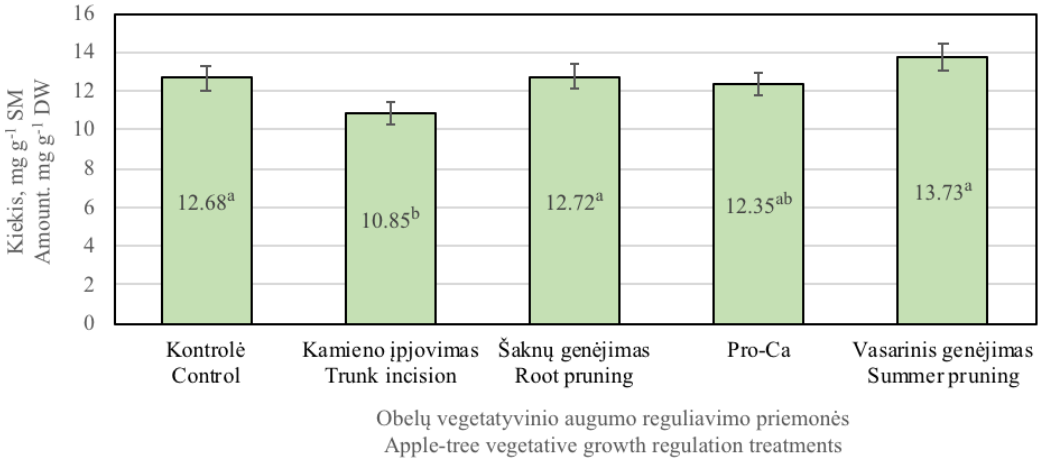
Note. The different letters in the same line indicate statistically significant differences between the individual compounds in the apple samples ($p < 0.05$).



12 pav. Bendras nustatytų triterpenų kiekis (mg g^{-1} SM) obuoliuose, skintuose iš skirtingų obels vainiko vietų (veislė 'Ligol', 2015-2016 m. vidurkis)

Fig. 12. Total amount of investigated triterpenes (mg g^{-1} DW) in apples picked from different positions of apple-tree canopy (cv. 'Ligol', average 2016-2016)

Vaismedžių augumo reguliavimas. Kamienų įpjovimai obelyse sąlygojo patikimai mažesnius triterpeninių junginių kiekius obuoliuose (52 lentelė). Šaknų genėjimas ir kalcio proheksadiono naudojimas sąlygojo tik betulino rūgšties padidėjimą vaisiuose, lyginant su kontroliniais vaismedžiais. Vasarinis vaismedžių genėjimas lėmė vaisiuose sukauptą didžiausią kiekį visų tirtų triterpeninių junginių (13 pav.), nors šis skirtumas nebuvo statistiškai reikšmingas lyginant su vaismedžiais, kuriems nebuvo taikytos jokios augumą reguliuojančios priemonės.



13 pav. Bendras nustatytų triterpenų kiekis (mg g^{-1} SM) obuoliuose iš skirtingų vaismedžių, taikant įvairias vaismedžių augumo priemones (veislė 'Rubin', 2015-2016 m. vidurkis)

Fig. 13. Total amount of investigated triterpenes (mg g^{-1} DW) in apples picked from different trees, using various tree growth regulation treatments (cv. 'Rubin', average 2015-2016)

52 lentelė. Vaismedžių augumo reguliavimo įtaka triterpenų sudėties įvairavimui obuolių ėminiuose, mg g^{-1} SM (veislė 'Rubin', 2015-2016 m. vidurkis)

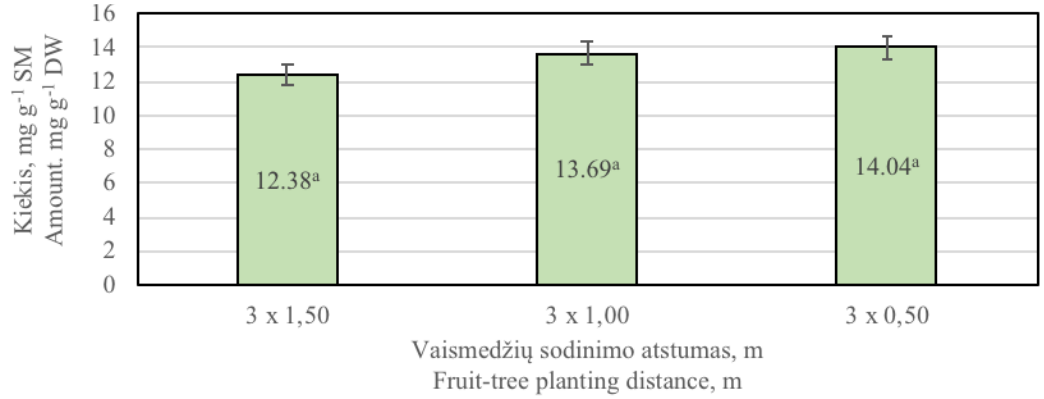
Table 52. Effect of tree growth regulation on apple triterpene composition, mg g^{-1} DW (cv. 'Rubin', average 2015-2016)

Junginys Compound	Vaismedžių augumo reguliavimo priemonės Tree growth regulation treatments				
	Kontrolė Control	Kamieno įpjovimas Trunk incision	Šaknų genėjimas Root pruning	Pro-Ca	Vasarinis genėjimas Summer pruning
Korosolo rūgštis Corosolic acid	1,33 ± 0,067^{a}	1,15 ± 0,057^{b}	1,32 ± 0,066^{ab}	1,29 ± 0,064^{ab}	1,42 ± 0,071^{a}
Betulino rūgštis Betulinic acid	0,19 ± 0,009^{d}	0,15 ± 0,008^{e}	0,27 ± 0,014^{b}	0,24 ± 0,012^{c}	0,32 ± 0,016^{a}
Oleonolo rūgštis Oleonolic acid	2,10 ± 0,105^{abc}	1,85 ± 0,093^{c}	2,13 ± 0,107^{ab}	2,02 ± 0,101^{bc}	2,35 ± 0,118^{a}
Ursolo rūgštis Ursolic acid	9,06 ± 0,453^{a}	7,70 ± 0,385^{b}	9,00 ± 0,450^{a}	8,81 ± 0,441^{ab}	9,63 ± 0,482^{a}

Pastaba: Toje pačioje eilutėje esančios skirtingos raidės žymi statistiškai patikimus individualių junginių kiekių skirtumus tarp tirtų obuolių ėminių ($p < 0,05$).

Note. The different letters in the same line indicate statistically significant differences between the individual compounds in the apple samples ($p < 0.05$).

Vaismedžių konkurencinė įtampa. Vaismedžių augimo atstumas įtakos neturėjo nei korosolo nei ursolo rūgščių kiekiams vaisiuose (53 lentelė). Daugiausiai betulino rūgšties nustatyta obuoliuose, skintuose iš rečiausiai augusių vaismedžių, tuo tarpu oleonolo rūgšties – priešingai, daugiausia buvo rasta obuoliuose iš tankiausiai augusių vaismedžių. Šis individualių junginių kiekybinis skirtumas nulėmė tai, jog bendras šių junginių kiekis esmingai tarp skirtingu tankumu augusių vaismedžių nesiskyrė (14 pav.).



14 pav. Bendras nustatytų triterpenų kiekis (mg g^{-1} SM) obuoliuose, skintuose iš skirtingais atstumais augusių vaismedžių (veislė 'Auksis', 2015-2016 m. vidurkis)

Fig. 14. Total amount of investigated triterpenes (mg g^{-1} DW) in apples taken from apple-trees with different planting distance (cv. 'Auksis', average 2015-2016)

53 lentelė. Vaismedžių sodinimo atstumo įtaka triterpenų sudėties įvairavimui obuolių ėminiuose, mg g^{-1} SM (veislė 'Auksis', 2015-2016 m. vidurkis)

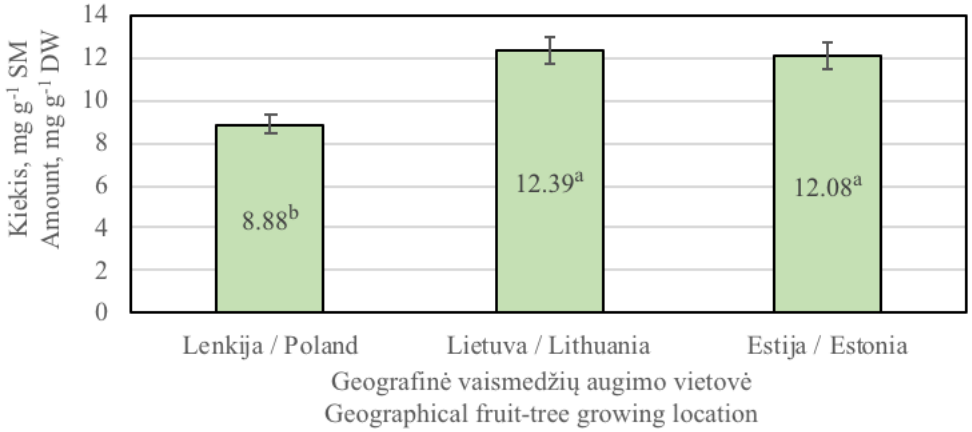
Table 53. Fruit-tree planting distance effect on triterpene composition, mg g^{-1} DW (cv. 'Auksis', average 2015-2016)

Junginys Compound	Vaismedžių sodinimo atstumas, m Fruit-tree planting distance, m		
	3 x 1,50	3 x 1,00	3 x 0,50
Korosolo rūgštis / Corosolic acid	0,40 ± 0,020[a]	0,42 ± 0,021[a]	0,43 ± 0,022[a]
Betulino rūgštis / Betulinic acid	0,22 ± 0,011[a]	0,16 ± 0,008[b]	0,17 ± 0,008[b]
Oleonolo rūgštis / Oleonolic acid	2,05 ± 0,103[b]	2,34 ± 0,117[ab]	2,57 ± 0,129[a]
Ursolo rūgštis / Ursolic acid	9,71 ± 0,486[a]	10,77 ± 0,539[a]	10,86 ± 0,543[a]

Pastaba: Toje pačioje eilutėje esančios skirtingos raidės žymi statistiškai patikimus individualių junginių kiekių skirtumus tarp tirtų obuolių ėminių ($p < 0,05$).

Note. The different letters in the same line indicate statistically significant differences between the individual compounds in the apple samples ($p < 0.05$).

Geografinė vaismedžių augimo vieta. Veislės 'Auksis' obuoliai, išaugę Lenkijoje, sukaupė reikšmingai mažesnį korosolo, oleonolo ir ursolo rūgščių kiekį (54 lentelė). Tai taip pat atsiliepė ir bendram triterpenų kiekiui obuoliuose (15 pav.). Tai aiškintume tuo, jog Lenkijoje gaunamos šviesos kiekis vaisiams yra didesnis, o tai sąlygoja mažesnį vaškinį sluoksnį ir tuo pačiu mažesnį triterpenų kiekį šių vaisių odelėse. Veislės 'Ligol' obuoliuose tendencija išliko panaši kaip ir veislės 'Auksis' obuoliuose, tačiau šis skirtumas šiuo atveju nebuvo statistiškai patikimas (55 lentelė ir 16 pav.). Tai būtų galima paaiškinti tuo, jog veislės 'Ligol' obuoliai turi genetiškai nulemtą labiau vaškuotą odelę nei veislės 'Auksis' obuoliai, todėl veislei 'Ligol' šis klimatinių sąlygų pasikeitimas nebuvo toks reikšmingas kaip veislės 'Auksis' obuoliams.



15 pav. Bendras nustatytų triterpenų kiekis (mg g^{-1} SM) obuoliuose, išaugusiuose skirtingose geografinėse vietovėse (veislė 'Auksis', 2015-2016 m. vidurkis)

Fig. 15. Total amount of investigated triterpenes (mg g^{-1} DW) in apples picked from different geographical locations (cv. 'Auksis', average 2015-2016)

54 lentelė. Geografinės vaismedžių augimo vietos įtaka triterpenų sudėties įvairavimui obuolių ėminiuose, mg g^{-1} SM (veislė 'Auksis', 2015-2016 m. vidurkis)

Table 54. Geographical fruit-tree growing location effect on apple triterpene composition, mg g^{-1} DW (cv. 'Auksis', average 2015-2016)

Junginys Compound	Geografinė vietovė / Geographical location		
	Lenkija Poland	Lietuva Lithuania	Estija Estonia
Korosolo rūgštis / Corosolic acid	$0,29 \pm 0,015^{b}$	$0,48 \pm 0,024^{a}$	$0,49 \pm 0,024^{a}$
Betulino rūgštis / Betulinic acid	$0,11 \pm 0,005^{b}$	$0,13 \pm 0,006^{a}$	$0,10 \pm 0,005^{b}$
Oleonolo rūgštis / Oleonolic acid	$1,41 \pm 0,070^{b}$	$2,10 \pm 0,105^{a}$	$1,96 \pm 0,098^{a}$
Ursolo rūgštis / Ursolic acid	$7,08 \pm 0,354^{b}$	$9,68 \pm 0,484^{a}$	$9,54 \pm 0,477^{a}$

Pastaba: Toje pačioje eilutėje esančios skirtingos raidės žymi statistiškai patikimus individualių junginių kiekių skirtumus tarp tirtų obuolių ėminių ($p < 0,05$).

Note. The different letters in the same line indicate statistically significant differences between the individual compounds in the apple samples ($p < 0.05$).

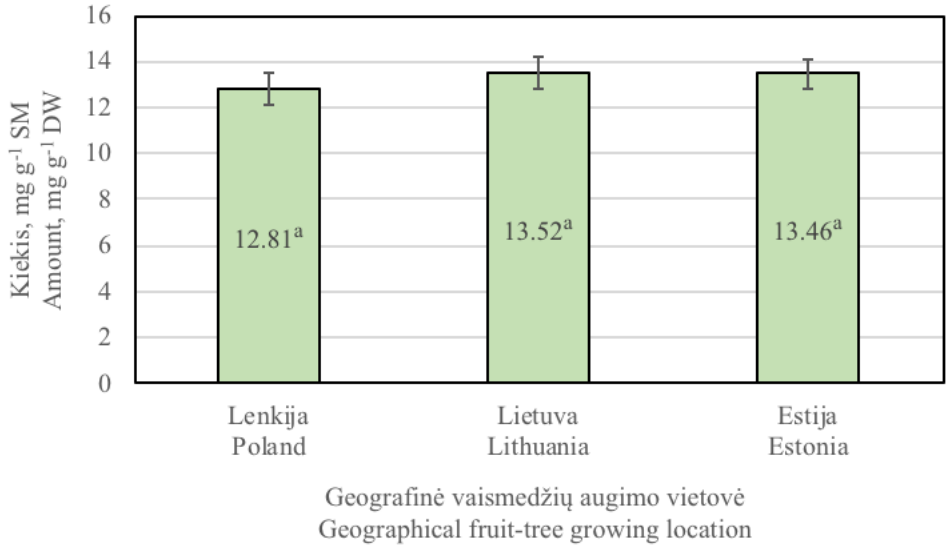
55 lentelė. Geografinės vaismedžių augimo vietos įtaka triterpenų sudėties įvairavimui obuolių ėminiuose, mg g^{-1} SM (veislė 'Ligol', 2015-2016 m. vidurkis)

Table 55. Geographical fruit-tree growing location effect on apple triterpene composition, mg g^{-1} DW (cv. 'Ligol', average 2015-2016)

Junginys Compound	Geografinė vietovė / Geographical location		
	Lenkija Poland	Lietuva Lithuania	Estija Estonia
Korosolo rūgštis / Corosolic acid	$1,17 \pm 0,059^{b}$	$1,55 \pm 0,078^{a}$	$0,91 \pm 0,046^{c}$
Betulino rūgštis / Betulinic acid	$0,12 \pm 0,006^{b}$	$0,15 \pm 0,008^{a}$	$0,13 \pm 0,007^{b}$
Oleonolo rūgštis / Oleonolic acid	$1,89 \pm 0,095^{b}$	$2,24 \pm 0,112^{a}$	$2,31 \pm 0,115^{a}$
Ursolo rūgštis / Ursolic acid	$9,63 \pm 0,481^{a}$	$9,57 \pm 0,479^{a}$	$10,10 \pm 0,505^{a}$

Pastaba: Toje pačioje eilutėje esančios skirtingos raidės žymi statistiškai patikimus individualių junginių kiekių skirtumus tarp tirtų obuolių ėminių ($p < 0,05$).

Note. The different letters in the same line indicate statistically significant differences between the individual compounds in the apple samples ($p < 0.05$).



16 pav. Bendras nustatytų triterpenų kiekis (mg g^{-1} SM) obuoliuose, išaugusiuose skirtingose geografinėse vietovėse (veislė 'Ligol', 2015-2016 m. vidurkis)
Fig. 16. Total amount of investigated triterpenes (mg g^{-1} DW) in apples picked from different geographical locations (cv. 'Ligol', average 2015-2016)

***

Vaisių krūvio reguliavimas *obelyse turėjo įtakos triterpeninių junginių kaupimuisi vaisiuose. Obuoliai, skinti nuo didelį vaisių krūvį turinčių vaismedžių, sukaupė iki 17 proc. didesnį tirtų triterpeninių junginių kiekį. Tai galėtų būti paaiškinama dėl mažesnio saulės šviesos patekimo į vainiką, kadangi, veikiamas tiesioginės saulės šviesos, triterpeninių junginių kiekis vaisiuose mažėja.*

Vaisių augimo vieta vaismedžio vainike *taip pat turėjo įtakos triterpeninių junginių kaupimuisi obels vaisiuose - obuoliai, skinti iš vaismedžio vidinės dalies, sukaupė iki 14 proc. didesnį individualių triterpeninių junginių kiekį, nei iš obels viršūnės ar vakarų pusės skinti obuoliai. Tai galima paaiškinti tuo, jog šešėlyje esantys vaisiai lemia skirtingą vaškinio sluoksnio vaisiaus odelėje susidarymą, o tai turi tiesioginės įtakos triterpeninių junginių kaupimuisi.*

Vaismedžių augumo reguliavimas *obelyse sąlygojo iki 14 proc. mažesnį triterpeninių junginių kiekį obuoliuose, kuomet vaismedžiams buvo taikytas kamieno įpjovimas. Šaknų genėjimas, kalcio proheksadiono naudojimas ir vasarinis ūglių genėjimas įtakojo tik betulino rūgšties padidėjimą vaisiuose. Šis, lyginant su vaisiais iš kontrolinių vaismedžių, padidėjo iki 72 proc., tačiau reikšmingos įtakos bendram triterpenų kiekiui vaisiuose neturėjo. Šį kamieno įpjovimo ryšį su mažesniu triterpenų kiekiu galima būtų aiškinti dėl pakitusio asimiliatų pasiskirstymo tarp vaismedžio organų.*

Vaismedžių konkurencinė įtampa *įtakos neturėjo nei korosolo nei ursolo rūgščių kiekiams obels vaisiuose. Betulino rūgšties kiekis obuoliuose, augusiuose rečiausiai susodintuose vaismedžiuose, buvo iki 34 proc. didesnis. Oleonolo rūgšties kiekis – priešingai, iki 25 proc. daugiau jos nustatyta obuoliuose iš tankiausiai susodintų vaismedžių. Šis individualių junginių kiekybinis skirtumas nulėmė tai, jog bendras šių junginių kiekis esmingai tarp tirtų variantų nesiskyrė, tačiau pastebėta tendencija, jog tankiau sodinant vaismedžius, triterpeninių junginių kiekis nežymiai didėja. Tai galima paaiškinti didesniu vaismedžiu tarpusavio šešėliavimu tankinant sodinimo atstumą.*

Geografinė vaismedžių augimo vieta *turėjo įtakos triterpeninių junginių kaupimuisi obuoliuose. Veislės 'Auksis' obuoliai, išauginti Lenkijoje, sukaupė iki 28 proc. mažesnį triterpeninių junginių kiekį, nei vaisiai, išauginti kitose tirtose vietovėse. Veislės 'Ligol' obuoliuose ši tendencija išliko panaši, tačiau šis skirtumas nebuvo statistiškai reikšmingas. Šiuos rezultatus aiškintume gaunamu saulės šviesos kiekiu bei veislių kilme ir genų raiška skirtingose klimato zonose.*

Didžiausią poveikį obels vaisiuose esančių korosolo, oleonolo ir ursolo rūgščių kiekiui bei bendram triterpeninių junginių kiekiui turėjo veislės genetinė kilmė ir geografinė vaisių augimo vieta, o betulino rūgšties kiekiui – vaismedžių augumo reguliavimas. Priklausomai nuo biologinių veiksnių bei taikytų technologinių priemonių, obels vaisiuose esantį korosolo rūgšties kiekį galima padidinti iki 70 proc., betulino rūgšties – iki 2,1 karto, oleonolo rūgšties – iki 50 proc., ursolo rūgšties – iki 37 proc., o bendrą tirtų triterpenų kiekį – iki 39 proc.

IŠVADOS

1. Obelų vaisių krūvio reguliavimas yra efektyvi priemonė vaisių kokybės rodikliams modeliuoti. Sumažinus vaisių krūvį, obuolių masė didėja iki 25 proc. Prie didelio vaisių krūvio obuoliai sukaupė iki 49 proc. daugiau gliukozės, iki 23 proc. daugiau fenolinių ir iki 17 proc. triterpeninių junginių, juose nustatytas iki 32 proc. didesnis vaisių antiradikalinis bei iki 61 proc. didesnis redukcinis aktyvumas.
2. Vaismedžio viršūnėje augantys obels vaisiai turėjo iki 11 proc. tvirtesnę odelę, iki 35 proc. didesnę masę, buvo geriau nusispalvinę, sukaupė iki 6 proc. daugiau cukraus, iki 24 proc. daugiau fenolinių junginių, ir iki 12 proc. mažiau organinių rūgščių, išsiskyrė apie 31 proc. didesniu antiradikaliniu bei 33 proc. didesniu redukciniu aktyvumu, lyginant su vaisiais, augusiais obels vainiko apačioje. Šiuose vaisiuose susikaupė iki 14 proc. didesnis triterpeninių junginių kiekis. Tarp vaisių, augusių rytinėje ir vakarinėje vainiko pusėje, esminių skirtumų tarp pagrindinių kokybės rodiklių nebuvo, išskyrus rūgštingumą, kuris vaisiuose iš vakarų pusės buvo iki 15 proc. didesnis.
3. Įvairios vaismedžių augumo reguliavimo priemonės nulėmė tik bioaktyviųjų medžiagų sintezę, tačiau kitiems vaisių kokybės rodikliams - spalvai, tvirtumui, vidutinei vaisių masei, kvėpavimo intensyvumui ir bendrai cheminei sudėčiai – įtakos neturėjo. Šaknų pjovimas bei vasarinis genėjimas padidino obuoliuose susikaupiančių kvercetino glikozidų kiekį iki 27 proc.. Kalcio proheksadiono naudojimas lėmė iki 24 proc. mažesnį bendrą fenolinių junginių kiekį, o šaknų pjovimas turėjo priešingą poveikį – šių junginių kiekį vaisiuose padidino apie 9 proc. Obelų kamieno įpjovimas sąlygojo iki 14 proc. mažesnį triterpeninių junginių kiekį obuoliuose.
4. Iš visų tirtų technologinių priemonių mažiausią įtaką vaisių kokybei turėjo vaismedžių sodinimo atstumas. Mažėjant vaismedžių konkurencinei įtampai, patikimai (iki 18 proc.) didėjo tik vaisių masė, tačiau kiti vaisių kokybės rodikliai nepriklausė nuo vaismedžių augimo tankumo.
5. Vaismedžių geografinė augimo vieta dėl skirtingų agroklimatinių sąlygų (teigiamų temperatūrų sumos, dirvožemio tipo ir pan.) turėjo įtakos visiems obels vaisių kokybės rodikliams, tačiau jų pokyčius lėmė ir veislės genotipas. Veislės 'Auksis' obuoliai intensyviau spalvinasi šiaurės-rytiniame regione, veislės 'Ligol' – pietiniame. Daugiausiai cukrų ir tirpių sausųjų medžiagų nustatyta veislės 'Auksis' obuoliuose užaugintuose Lietuvoje, mažiausiai – Estijoje, o veislės 'Ligol' obuoliuose skirtumų nebuvo. Lyginant su Estija, iki 41 proc. didesnės masės abiejų veislių obuoliai užauga Lenkijoje, tačiau jų minkštimo tvirtumas sumažėja iki 18 proc. Kuo šiauriau auginami obuoliai, tuo daugiau jie sukaupia fenolinių junginių – Estijoje abiejų veislių obuoliuose jų nustatyta net iki 2,5 karto daugiau, o antiradikalinis ir redukcinis aktyvumas šiuose vaisiuose buvo didesnis iki 3,3 karto.

6. Kompleksiškai įvertinus sodų priežiūros technologinių priemonių bei biologinių veiksnių įtaką įvairių obels vaisių kokybės rodiklių pokyčiams, nustatyta, kad stabiliausia yra vaisių cheminė sudėtis. Didžiausi kiekybiniai ir kokybiniai pokyčiai, taikant įvairias technologines priemones, nustatyti ištyrus bioaktyviuosius junginius.

REKOMENDACIJA

Technologinių obelų sodo priežiūros priemonių įtaka biologiškai aktyviems junginiams vaisiuose

Obuoliai yra vieni labiausiai pasaulyje vartojamų vaisių, todėl sodininkai taiko įvairias technologines ir biologines priemones, garantuojančias optimalų vaisių kokybės ir derliaus santykį. Labai svarbu įvertinti kaip šios priemonės įtakoja įvairių biologiškai aktyvių junginių kaupimąsi vaisiuose. Fenoliniai junginiai yra naudingi žmogaus organizmui dėl jų antioksidacinių savybių, o triterpeniniai junginiai – dėl savo farmakologinių savybių. Ne visuomet didesnis šių junginių kiekis yra visais atvejais naudingesnis – pvz. dėl stiprios fenolinių junginių reakcijos su taninais bei makromolekulėmis, tokiomis kaip baltymai ir polisacharidai, fenoliai skatina nuosėdų susidarymą ir daro įtaką sulčių skaidrumo parametrams. Taikytos technologinės priemonės, reguliuojant obels vaisių krūvį, vegetatyvinį vaismedžių augumą ir konkurencinę įtampą, bei vaisių augimo vieta vainike skatina arba slopina įvairių fenolinių bei triterpeninių junginių kaupimąsi vaisiuose.

Vaisių krūvio reguliavimas

Didėjant vaisių krūviui vaismedyje, didėja ir bendras fenolinių junginių kiekis obuoliuose. Obels vaisiai, auginti didžiausią vaisių krūvį (12 vaisių cm^{-2} kamieno skerspjūvio plotui (KSP)) turinčiose obelyse, sukaupia iki 23 proc. daugiau fenolinių junginių, nei vaisiai, auginti mažiausią vaisių krūvį (4 vaisiai cm^{-2} KSP) turinčiuose vaismedžiuose.

Obuoliai, skinti nuo didelį vaisių krūvį turinčių vaismedžių, sukaupia iki 17 proc. didesnį triterpeninių junginių kiekį.

Vaisių vieta obels vainike

Obels vaisiai, augę vainiko viršūnėje, sukaupia iki 1,7 karto didesnį kvercetino glikozidų kiekį, bei iki 15 proc. didesnį flavan-3-olių kiekį, lyginant su vaisiais, augusiais obels vainiko viduje. Bendras fenolinių junginių kiekis vaisiuose, augusiuose obels vainiko viršūnėje, būna iki 24 proc. didesnis nei vaisiuose, augusiuose kitose vainiko vietose.

Obuoliai, skinti iš vaismedžio vidinės dalies, sukaupia iki 14 proc. didesnį individualių triterpeninių junginių kiekį, nei iš obels viršūnės ar vakarų pusės skinti obuoliai.

Vegetatyvinis vaismedžių augumo reguliavimas

Šaknų genėjimas (kuomet vaismedžių šaknys prieš žydėjimą 20 cm atstumu nuo kamieno ir iki 40 cm gyliu nupjautos iš abiejų pusių) bei vasarinis genėjimas (kuomet vaismedžių ūgliai genėti rugpjūčio viduryje) didina obuoliuose susikaupiančių kvercetino glikozidų kiekį iki 27 proc., o bendrą fenolinių junginių kiekį – iki 9 proc. Vaismedžių augumą reguliuojanti priemonė kalcio proheksadionas (kuomet vaismedžiai purkšti 2,5 kg ha^{-1} vieną kartą, iškart po žydėjimo, kuomet jauni ūgliai turėjo po 5 lapelius) šių junginių

kaupimąsi vaisiuose mažina iki 29 proc., o bendrą fenolinių junginių kiekį vaisiuose – iki 24 proc.

Kamieno įpjovimas (kuomet vaismedžių kamienai prieš žydėjimą įpjauti iki pusės 20 cm aukštyje virš žemės paviršiaus iš vienos pusės ir 60 cm aukštyje iš kitos pusės) obelyse sąlygoja iki 14 proc. mažesnį triterpeninių junginių kiekį obuoliuose. Šaknų genėjimas, kalcio proheksadiono naudojimas ir vasarinis ūglių genėjimas įtakoja tik betulino rūgšties padidėjimą vaisiuose - šis, lyginant su vaisiais iš kontrolinių vaismedžių, padidėja iki 72 proc., tačiau tai reikšmingos įtakos bendram triterpenų kiekiui vaisiuose nedaro.

Vaismedžių konkurencinė įtampa

Vaismedžių sodinimo atstumas bendram fenolinių junginių kiekiui obels vaisiuose įtakos neturi, tačiau triterpeninio junginio betulino rūgšties kiekis obuoliuose, augusiuose rečiausiai susodintuose vaismedžiuose (sodinimo schema 3 x 1,50 m, 2 222 vaism. ha^{-1}), buvo iki 34 proc. didesnis, o oleonolo rūgšties kiekis – priešingai, iki 25 proc. daugiau jos nustatyta obuoliuose iš tankiausiai susodintų vaismedžių (sodinimo schema 3 x 0,50 m, 6 667 vaism. ha^{-1}). Šis individualių junginių kiekybinis skirtumas nulėmė tai, jog bendras triterpenų kiekis esmingai tarp skirtingais atstumais susodintų vaismedžių nesiskiria.

Norint užauginti obels vaisius, turinčius didesnį fenolinių junginių kiekį, rekomenduojama didinti vaisių krūvį vaismedžiuose ir reguliuoti vegetatyvinį augimą, taikant vasarinį ir šaknų genėjimą. Norint užauginti obels vaisius su mažesniu fenolinių junginių kiekiu, rekomenduojame mažinti vaisių krūvį vaismedyje, ir reguliuoti vegetatyvinį augimą augumo reguliatoriumi kalcio proheksadionu. Norint užauginti obels vaisius, turinčius didesnį triterpeninių junginių kiekį, rekomenduojame vaisius auginti taip, kad jie gautų mažiau tiesioginės saulės šviesos – tam tinka vaisius skinti iš vainiko vidaus, arba obelyse palikti didelį vaisių krūvį.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Alscher R. G., Donahue J. L., Cramer C. L. 1997. Reactive oxygen species and antioxidants: relationships in green cells. Physiologia Plantarum, 100(2): 224-233.
2. AOAC. 1990. Vitamin C (ascorbic acid) in vitamin preparations and juices. In Helrich K. (Ed.), Official Methods of Analysis (15th ed.). AOAC Inc., Arlington, VA, USA. 1058.
3. Arakawa O., Kanetsuka A., Kanno K., Shiozaki Y. 1998. Effects of five methods of bark inversion and girdling on the tree growth and fruit quality of 'Megumi' apple. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 67(5): 721–727.
4. Arakawa O., Shinoda M., Hiraga M., Wang H. 1999. Comparison of anthocyanin synthesis of true-to-type ‘Tsugaru’ apple and its red sport strains. The Journal of Horticultural Science & Biotechnology, 74(6): 738–742.
5. Asada K. 1999. The water-water cycle in chloroplast: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. Annual Review of plant physiology and plant Molecular Biology, 50: 601-639.
6. Assaf R., Levin I., Bravdo B. 1982. Apple fruit growth as a measure of irrigation control. HortScience, 17: 59–61.
7. Autio W. R., Greene D. W. 1990. Summer Pruning Affects Yield and Improves Fruit Quality of ‘McIntosh’ Apples. Journal of the American Society for Horticultural Science, 115(3): 356-359.
8. Autio W., Robinson T., Cowgill W., Hampson C., Kushad M., Masabni J., Quezada P. R., Perry R., Rom C. 2008. Performance of ‘Gala’ apple trees on Supporter 4, P.14, and different strains of B.9, M.9 and M.26 rootstocks: A five-year report on the 2002 NC-140 Apple Rootstock Trial. Journal of the American Pomological Society, 62(3): 119–128.
9. Awad M. A, Wagenmakers P. S., Jager A. de. 2001a. Effects of light on flavonoid and chlorogenic acid levels in the skin of ‘Jonagold’ apples. Scientia Horticulturae, 88(4): 289–298.
10. Awad M. A., Jager A. de, Dekker M., Jongen W. M. F. 2001b. Formation of flavonoids and chlorogenic acid in apples as affected by crop load. Scientia Horticulturae, 91(3-4): 227–237.
11. Awad M. A., Jager A. de, Plas L. H. W. van der, Krol A. R. van der. 2001c. Flavonoid and chlorogenic acid changes in skin of ‘Elstar’ and ‘Jonagold’ apples during development and ripening. Scientia Horticulturae, 90(1-2): 69–83.

12. Awad M. A., Jager A. de, Westing L. M. van. 2000. Flavonoid and chlorogenic acid levels in apple fruit: characterisation of variation. Scientia Horticulturae, 83(3-4): 249–263.

13. Balčiūnas M., Jankauskienė Z., Brazaitytė A., Duchovskis P. 2008. Lapų indekso ir fotosintezės pigmentų dinamika įvairaus tankumo pluoštinių linų pasėlyje. Žemdirbystė-Agriculture, 95(4): 97–109.

14. Barritt B. H., Konishi B., Dilley M. 2008. Performance of four high density apple orchard systems with 'Fuji' and 'Braeburn'. Acta Horticulturae, 772: 389–394.

15. Barritt B. H., Rom C. R., Guelich K. R., Drake S. R., Dilley M. A. 1987. Canopy position and light effects on spur, leaf, and fruit characteristics of delicious apple. HortScience, 22: 402–405.

16. Basak A. 2004. Growth and fruiting of 'Elstar' apple trees in response to prohexadione calcium depending on the rootstock. Acta Horticulturae, 653: 117–125.

17. Bazzi C., Messina C., Tortoreto L., Stefani E., Bini F., Brunelli A., Andreotti C., Sabatini E., Spinelli F., Costa G., Hauptmann S., Stammler G., Doerr S., Marr, J., Rademacher, W. 2003. Control of pathogen incidence in pome fruits and other horticultural crop plants with prohexadione-Ca. European Journal of Horticultural Science, 68(3): 108-114.

18. Beekwilder J., Hall R. D., Vos C. H. D. R. 2005. Identification and dietary relevance of antioxidants from raspberry. Biofactors, 23(4): 197−205.

19. Behboudian M. H., Mills T. M. 1997. Deficit irrigation in deciduous orchards. In: J. Janick (Ed.) Horticultural Reviews, 21: 105–131, John Wiley & Sons, Inc., Oxford, UK.

20. Bengoechea M. L., Sancho A. I., Bartolome B., Estrella I., Gómez-Cordovés C., Hernández M. T. 1997. Phenolic composition of industrially manufactured purees and concentrates from peach and apple fruits. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45(10): 4071–4075.

21. Bepete M., Lakso A. N. 1998. Differential effects of shade and on early season fruit and shoot growth rates in 'Empire' apple. HortScience, 33(5): 823-825.

22. Bite A., Kviklys D., Univer T., Lukut T. 2004. The beginning of the project "Baltic fruit rootstock studies". Acta Horticulturae, 658: 437–440.

23. Blanke M. M. 2008. Perspectives of fruit research and apple orchard management in Germany in a changing climate. Acta Horticulturae (ISHS), 769: 441–447.

24. Byers R. E. 2003. Flowering and fruit thinning and vegetative: fruiting balance. In: D. C. Ferree, I. J. Warrington (eds.), Apples: Botany, production and uses. CABI

Publishing, Cambridge, MA, 409–436.

25. Byers R. E., Carbaugh D. H., Combs L. D. 2004. The influence of prohexadione-calcium sprays on apple tree growth, chemical thinning, and return bloom. Journal of The American Pomological Society, 58(2): 111–117.

26. Byers R. E., Carbaugh D. H., Presley C. N., Wolf T. K. 1991. The influence of low light levels on apple fruit abscission. Journal of Horticultural Science, 66(1): 1–17.

27. Byers R. E., Yoder K. S. 1999. Prohexadione-calcium inhibits apple, but not peach tree growth, but has little influence on apple fruit thinning or quality. HortScience 34(7): 1205–1209.

28. Callesen O. 1988. Effect of flower bud position on fruit set and fruit size in apple. Tidsskrift for Planteavl, 92: 339–344.

29. Campeanu G., G. Neata G., Darjanschi G. 2009. Chemical composition of the fruits of several apple cultivars growth as biological crop. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 37(2): 161-164.

30. Castro D. C., Álvarez N., Gabriel P., Micheloud N., Buyatti M., Gariglio N. 2015. Crop loading studies on ‘caricia’ and ‘eva’ apples grown in a mild winter area. Scientia Agricola, 72(3): 237–244.

31. Cefarelli G., D'Abrosca B., Fiorentino A., Izzo A., Mastellone C., Pacifico S., Piscopo V. 2006. Free-Radical-Scavenging and Antioxidant Activities of Secondary Metabolites from Reddened Cv. Annurca Apple Fruits. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54(3): 803-809.

32. Chen L. S., Li P., Cheng L. 2008. Effects of high temperature coupled with high light on the balance between photooxidation and photoprotection in the sun-exposed peel of apple. Planta, 228(5): 745-756.

33. Chen Q., Liu Y. C., Zhou Z., Bi B., Zhang X. X., Sun H. 2011. Effect of cutting root on sprouting of lignified roots of seedlings of *Parakmeria yunnanensis* in different season. Journal of West China Forest Science, 40(2): 7–12.

34. Chinnici F., Bendini A., Gaiani A., Riponi C. 2004. Radical scavenging activities of peels and pulps from cv. ‘Golden Delicious’ apples as related to their phenolic composition. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52(15): 4684–4689.

35. Choi H. S., Jung S. K. 2014. Effect of Treatment Time of 1-MCP on Ripening of ‘Fuji’ Apples Stored at Low and Room Temperature for a Long Period. Journal of Food and Nutrition Research, 2(9): 617-620.

36. Coombs J., Hall D. O., Long S. P., Scurlock J. M. O. (eds.). 1985. Techniques in bioproductivity and photosynthesis. Second edition. Oxford: Pergamon Press.

37. Corelli L., Lakso A. N., Flore J. A. 1994. Early season patterns of carbohydrate partitioning in exposed and shaded apple branches. Journal of the American Society for Horticultural Science, 119(3): 596-603.

38. Costa G., Andreotti C., Bucchi F., Sabatini E., Bazzi C., Malaguti S., Rademacher W. 2001. Prohexadione-Ca (Apogee®): Growth regulation and reduced fire blight incidence in pear. HortScience, 36(5): 931-933.

39. Costa G., Andreotti M. C., Sabatini E., Bregoli A. M., Bomben C., Vizzotto G. 2000. The effect of prohexadione-Ca on tree growth and fireblight suppression in apple and pear. Proceedings of the Plant Growth Regulation Society of America, 27: 253–258.

40. Cronje P. J. R., Barry G. H., Huysamer M. 2011. Fruiting positioning during development of 'Nules Clementine' mandarin affects the concentration of K, Mg and Ca in the flavedo. Scientia Horticulturae, 130(4): 829-837.

41. Curry E. 2008. Effects of 1-MCP applied postharvest on epicuticular wax of apples (*Malus domestica* Borkh.) during storage. Journal of the Science of Food and Agriculture, 88(6): 996–1006.

42. D´Abrosca B., Pacifico S., Cefarelli G., Mastellone C., Fiorentino A. 2007. 'Limoncella' apple, an Italian cultivar: Phenolic and flavonoid contents and antioxidant activity. Food Chemistry, 104(4): 1333–1337.

43. Dannenmann M., Simon J., Gasche R., Holst J., Naumann P. S., Kögel-Knabner I., Knicker H., Mayer H., Schloter M., Pena R., Polle A., Rennenberg H., Papen H. 2009. Tree girdling provides insight on the role of labile carbon in nitrogen partitioning between soil microorganisms and adult European beech. Soil Biology and Biochemistry, 41(8): 1622–1631.

44. Demirsoy L., Demirsoy H., Balci G. 2012. Different growing conditions affect nutrient content fruit yield and growth in strawberry. Pakistan Journal of Botany, 44(1): 125–129.

45. Demmig-Adams B., Adams III W. W. 1992. Photoprotection and other responses of plants to high light stress. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 43: 599-626.

46. Doud D. S., Ferree D. C. 1980. Influence of altered light levels on growth and fruiting of mature 'Delicious' apple trees. Journal of the American Society for Horticultural Science, 105(3): 325–328.

47. Drogoudi P. D., Michailidis Z., Pantelidis G. 2008. Peel and flesh antioxidant content and harvest quality characteristics of seven apple cultivars. Scientia Horticulturae, 115(2): 149–153.

48. Drogoudi P. D., Pantelidis G. 2011. Effect of position on canopy and harvest time on fruit physio-chemical and antioxidant properties in different apple cultivars. Scientia Horticulturae, 129(4): 752-760.

49. Eberhardt M. V., Lee C. Y., Liu R. H. 2000. Antioxidant activity of fresh apples. Nature, 405: 903–904.

50. Echeverría G., Fuentes T., Graell J., Lara I., López M. L. 2004. Aroma volatile compounds of 'Fuji' apples in relation to harvest date and cold storage technology: A comparison of two seasons. Postharvest Biology and Technology, 32(1): 29–44.

51. Erf J. A., Proctor J. T. A. 1987. Changes in apple leaf water status and vegetative growth as influenced by crop load. Journal of the American Society for Horticultural Science, 112: 617–620.

52. Ergönül P. G., Nergiz C. 2010. Determination of organic acids in olive fruit by HPLC. Czech Journal of Food Sciences 28(3): 202–205.

53. European Pharmacopoeia, 7th ed., Vol 1. 2010. Council of Europe, Strasbourg, France.

54. Fagundes C., Carciofi B. A. M., Monteiro A. R. 2013. Estimate of respiration rate and physicochemical changes of fresh-cut apples stored under different temperatures. Food Science and Technology (Campinas), 33(1): 60-67

55. Fang C., Zhou K., Zhang Y., Li B., Han M. 2017. Effect of root pruning and nitrogen fertilization on growth of young 'Fuji' apple (Malus domestica Borkh.) trees. Journal of Plant Nutrition, 40(11): 1538–1546.

56. Farina V., Bianco R. L., Inglese P. 2005. Vertical Distribution of Crop Load and Fruit Quality within Vase- and Y-shaped Canopies of 'Elegant Lady' Peach. HortScience 40(3): 587–591.

57. Farooq K., Rab A., Khan N., Iqbal I. 2012. Physico-chemical quality of apple cv. Gala must fruit stored at low temperature. FUUAST Journal of Biology, 2(1): 103-107

58. Felicetti D. A., Schrader L. E. 2008. Photooxidative sunburn of apples: characterization of a third type of apple sunburn. International Journal of Fruit Science, 8(3): 160–172.

59. Felicetti D. A., Schrader L. E. 2009. Changes in pigment concentrations associated with sunburn browning of five apple cultivars. I. Chlorophylls and carotenoids. Plant Science, 176(1): 78-83.

60. Feng F., Li M., Ma F., Cheng L. 2014. Effects of location within the tree canopy on carbohydrates, organic acids, amino acids and phenolic compounds in the fruit peel and flesh from three apple (Malus × domestica) cultivars. Horticulture Research, 1: 14019.

61. Feng-li H. E., Wang F., Wei Q., Wang X., Zhang Q. 2008. Relationship between the distribution of relative canopy light intensity and peach yield quality. Agricultural Sciences in China, 7(3): 297-302.

62. Ferguson I. B., Watkins C. B. 1992. Crop Load Affects Mineral Concentrations and Incidence of Bitter Pit in 'Cox's Orange Pippin' Apple Fruit. Journal of the American Society for Horticultural Science, 117(3): 373–376.

63. Ferree D. C., Bishop B. L., Schupp J. R., Tustin D. S., Cashmore W. M. 2001. Influence of flower type, position in the cluster and spur characteristics on fruit set and growth of apple cultivars. The Journal of Horticultural Science & Biotechnology, 76(1): 1–8.

64. Ferree D. C., Palmer J. W. 1982. Effect of spur defoliation and ringing during bloom on fruiting, fruit mineral level, and net photosynthesis of 'Golden Delicious' apple. Journal of the American Society for Horticultural Science, 107: 1182–1186.

65. Flore J. A., Lakso A. N. 1989. Environmental and physiological regulation of photosynthesis in fruit crops. Horticultural Reviews, 11: 111–157.

66. Flore J. A., Layne D. R. 1999. Photoassimilate production and distribution in cherry. HortScience, 34(6): 1015-1019.

67. Forshey C. G., Elfving D. C. 1977. Fruit numbers, fruit size and yield relationships in 'McIntosh' apples. Journal of the American Society for Horticultural Science, 102: 399–402.

68. Forshey C. G., Elfving D. C. 1989. The relationship between vegetative growth and fruiting in apple trees. Horticultural Reviews, 11: 229–287.

69. Fouché J. R., Roberts S. C., Midgley S. J. E, Steyn W. J. 2010. Peel colour and blemishes in 'Granny Smith' apples in relation to canopy light environment. HortScience, 45(6): 899-905.

70. Fourie P. C., Hansman C. F., Oberholzer H. M. 1991. Sugar content of fresh apples and pears in South Africa. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 39(11): 1938-1939.

71. Foyer C. H., Lelandais M., Kunert K. J. 1994. Photooxidative stress in plants. Physiologia Plantarum, 92(4): 696-717.

72. Gilmore A. M. 1997. Mechanistic aspects of xanthophyll cycle-dependant photoprotection in higher plant chloroplasts and leaves. Physiologia Plantarum, 99(1): 197-209.

73. Gindaba J., Wand S. J. E. 2005. Comparative effects of evaporative cooling, kaolin particle film, and shade net on sunburn and fruit quality. HortScience, 40(3): 592-596.

74. Glenn D. M. Miller S. S. 2005. Effect of Apogee on growth and whole-canopy photosynthesis in spur 'Delicious' apples trees. HortScience 40(2): 397–400.

75. Goliáš J., Mýlová P., Němcová A. 2008. A comparison of apple cultivars regarding ethylene production and physico-chemical changes during cold storage. Horticultural Science (Prague), 35(4): 137–144.

76. González-Castejón M., Rodriguez-Casado A. 2011. Dietary phytochemicals and their potential effects on obesity: a review. Pharmacological Research, 64(5): 438-455.

77. Gorski P. M., Creasy L. L. 1977. Color development in 'Golden Delicious' apples. Journal of the American Society for Horticultural Science, 102: 73-75.

78. Grant R.H. 1997. Partitioning of biologically active radiation in plant canopies. International Journal of Biometeorology, 40(1): 26-40.

79. Greene D. W. 1999. Tree Growth Management and Fruit Quality of Apple Trees Treated with Prohexadione-calcium (BAS 125). HortScience, 34(7): 1209-1212.

80. Greene D. W. 1999. Tree growth management and fruit quality of apple trees treated with prohexadione- calcium (BAS 125). HortScience 34(7): 1209–1212.

81. Greene D. W. 2002. Chemicals, timing, and environmental factors involved in thinner efficacy on apple. HortScience 37(3): 477–481.

82. Greene D. W. 2003. Endogenous hormones and bioregulator use on apples, p. 437–457. In: Ferree D. C. Warrington I. J. (eds.). Apples: Botany, Production and Uses. CAB Intl., Wallingford, UK.

83. Greer D. H., Wünsche J. N., Halligan E. A. 2002. Influence of postharvest temperatures on leaf gas exchange, carbohydrate reserves and allocations, subsequent bud break, and fruit yield of 'Braeburn' apple (*Malus domestica*) trees. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 30(3): 175–185.

84. Grochowska M. J., Karaszewska A., Jankowska B., Maksymiuk J., Williams M. W. 1984. Dormant pruning influence on auxin, gibberellins and cytokinin levels in apple trees. Journal of the American Society for Horticultural Science, 109(3): 312-318.

85. Groot M. J. 1995. Economic calculations on high - density plantings. Annual Report, Fruit Research Station, Wilhelminadorp, 74-77.

86. Guan W. L., Kuang D. L. 2011. Effects of cutting roots during different periods on transplanting survival in *Mang lietia* insignis. Southwest China Journal of Agriculture Science, 24(2): 707–11.

87. Guinda A., Rada M., Delgado T., Gutiérrez-Adánez P., Castellano J. M. 2010. Pentacyclic Triterpenoids from Olive Fruit and Leaf. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58(17): 9685-9691.

88. 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.

89. Hampson C. R., Kemp H. 2003. Characteristics of important commercial apple cultivars, 61-69. In: Ferree D. C., Warrington I. J. (eds.), Apples: Botany, Production and Uses. CABI Publishing, Cambridge, MA.

90. Hansen P. 1969. Photosynthesis consumption in fruits in relation to the leaf-fruit ratio and the leaf-fruit position. Physiologia Plantarum, 22: 186–198.

91. Hatier J. H. B., Gould K. S. 2009. Anthocyanin function in vegetative organs, 1-19. In: Gould K., Davies K. M., Winefield C. (eds.). Anthocyanins. Biosynthesis, Functions and Applications, Springer-Verlag, New York, USA.

92. Haynes R. J., Goh K. M. 1980. Variation in the nutrient content of leaves and fruit with season and crown position for two apple varieties. Australian Journal of Agricultural Research, 31(4): 739–748.

93. He X., Liu R. H. 2007. Triterpenoids Isolated from Apple Peels Have Potent Antiproliferative Activity and May Be Partially Responsible for Apple's Anticancer Activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55(11): 4366-4370.

94. Hecke K., Herbinger K., Veberic R., Trobec M., Toplak H., Štampar F., Keppel H., Grill D. 2006. Sugar-, acid- and phenol contents in apple cultivars from organic and integrated fruit cultivation. European Journal of Clinical Nutrition, 60(9): 1136–1140.

95. Hirst P. M., Tustin D. S., Warrington I. J. 1990. Fruit colour responses of 'Granny Smith' apple to variable light environment. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 18(4): 205-214.

96. Hooge I. E. de, Oostindjer M., Aschemann-Witzel J., Normann A., Loose S. M., Almli V. L. 2017. This apple is too ugly for me! Consumer preferences for suboptimal food products in the supermarket and at home. Food Quality and Preference, 56: 80-92.

97. Ikeda Y., Murakami A., Ohigashi H. 2008. Ursolic acid: An anti- and pro-inflammatory triterpenoid. Molecular Nutrition & Food Research, 52(1): 26-42.

98. Ishikawa T., Dowdle J., Smirnoff N. 2006. Progress in manipulating ascorbic acid biosynthesis and accumulation in plants. Physiologia Plantarum, 126(3): 343–355.

99. Jackson J. E. 1970. Aspects of light climate within apple orchards. Journal of Applied Ecology, 7(2): 207-216.

100. Jackson J. E. 1980. Light Interception and Utilization by Orchard Systems. In: Janick J. (ed.). Horticultural Reviews, Vol. 2, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.

101. Jäger S., Trojan H., Kopp T., Laszczyk M., Scheffler A. 2009. Pentacyclic Triterpene Distribution in Various Plants – Rich Sources for a New Group of Multi-Potent Plant Extracts. Molecules, 14(6): 2016-2031.

102. Jakopič J., Fajt N., Štampar F., Veberič R. 2013. Effect of crop load on fruit quality of 'Fuji' apple. Acta Alimentaria 42(3): 318-327.

103. Jakopič J., Stampar F., Verberič R. 2009. The influence of exposure to light on the phenolic content of 'Fuji' apple. Scientia Horticulturae, 123(2): 234-239.

104. Jang S.-M., Yee S.-T., Choi J., Choi M.-S., Do G.-M., Jeon S.-M., Yeo J., Kim M.-J., Seo K.-I., Lee M.-K. 2009. Ursolic acid enhances the cellular immune system and pancreatic β-cell function in streptozotocin-induced diabetic mice fed a high-fat diet. International Immunopharmacology, 9(1): 113-119.

105. Janssen M. A. K., Gaba V., Greenberg B. M. 1998. Higher plants and UV-B radiation: balancing damage, repair and acclimation. Trends in Plant Science, 3(4): 131-135.

106. Jarvis P. P. G. 1985. Coupling of transpiration to the atmosphere in horticultural crops: The omega factor. Acta Horticulturae, 171: 187-206.

107. Jemrić T., Pavičić N., Blašković D., Krapac M., Pavičić D. 2003. The effect of hand and chemical fruit thinning on 'golden delicious cl. B' apple fruit quality. Current Studies of Biotechnology – Volume III. – Food, 193-198.

108. Jing L. 2007. Effects of ringing and girdling on growth and nutrition, photosynthetic characteristics in Myrica ruba and major qualities of Bayberry fruits. Thesis for Master Degree of Fujian Agriculture and Forestry University, China.

109. Johnson D. S. 1994. Influence of time and flower and fruit thinning on the firmness of 'Cox's Orange Pippin' apples at harvest and after storage. The Journal of Horticultural Science, 69 (2): 197–203.

110. Johnson D. S., Ridout M. S. 2000. Effects on the quality of stored apple fruit, 67-84. In: Shewfelt R. L., Bruckner B. (eds.). Fruit and Vegetable Quality - An Integrated View, CRC Press, USA.

111. Johnson R. S., Lakso A. N. 1986. Carbon balance model of a growing apple shoot: II. Simulated effects of light and temperature on long and short shoots. Journal of the American Society for Horticultural Science, 111(2): 164-169.

112. Jones H. G., Lakso A. N., Syvertsen J. P. 1985. Physiological control of water status in temperate and subtropical fruit trees. Horticultural Reviews, 7: 301–344.

113. Jones K. M., Bound S. A., Summers C. R., Oakford M. J. 1997. Preliminary examination of thinning strategies on young 'Jonagold' and 'Pink Lady' apples. Australian Journal of Experimental Agriculture. 37(3): 377–382.

114. Ju Z., Yuan Y., Liu C., Zhan S., Wang M. 1996. Relationships among simple phenol, flavonoid and anthocyanin in apple fruit peel at harvest and scald susceptibility. Postharvest Biology and Technology, 8(2): 83–93.

115. Kashiwada Y., Nagao T., Hashimoto A., Ikeshiro Y., Okabe H., Cosentino L.M., Lee, K.-H. 2000. Anti-AIDS Agents 38. Anti-HIV Activity of 3-O-Acyl Ursolic Acid Derivatives. Journal of Natural Products, 63(12): 1619-1622.

116. Khandaker M. M., Abm S. H., Normaniza O., Amru N. B. 2011. Application of girdling for improved fruit retention, yield and fruit quality in *Syzygium samarangense* under field conditions. International Journal of Agriculture and Biology, 13(1): 18–24.

117. Kim K.-A., Lee J.-S., Park H.-J., Kim J.-W., Kim C.-J., Shim I.-S., Kim N.-J., Han S.-M., Lim, S. 2004. Inhibition of cytochrome P450 activities by oleanolic acid and ursolic acid in human liver microsomes. Life Sciences, 74(22): 2769-2779.

118. Klages K., Donnison H., Wünsche J. N., Boldingh H. 2001. Diurnal changes in non-structural carbohydrates in leaves, phloem exudate and fruit in 'Braeburn' apple. Australian Journal of Plant Physiology, 28(2): 131–139.

119. Kliewer W. M., Smart R. E. 1989. Canopy manipulation for optimizing vine microclimate, crop yield, and composition of grapes, 275–291. In: Wright C. J. (ed.) Manipulation of Fruiting, Butterworth-Heinemann, London, UK.

120. Klochko P. 1999. Yield of apple trees on clonal rootstocks in different types of intensive orchards under irrigation in the Southern Ukraine. Proc. Apple Rootstocks for Intensive Orchards, Warszawa, 57-59.

121. Koch K., Ensikat H.-J. 2008. The hydrophobic coatings of plant surfaces: Epicuticular wax crystals and their morphologies, crystallinity and molecular self-assembly. Micron, 39(7): 759-772.

122. Koike H., Yoshizawa S., Tsukahara K. 1990. Optimum crop load and dry weight partitioning in 'Fuji'/M.26 apple trees. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 58(4): 827–834.

123. Kondo S., Takahashi Y. 1987. Effects of high temperature in the nighttime and shading in the daytime on the early drop of apple fruit 'Starking Delicious'. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 56(2): 142–150.

124. Kovač A., Babojelić M. S., Pavičić N., Voća S., Voća N., Dobričević N., Jagatić A. M., Šindrak Z. 2010. Influence of harvest time and storage duration on "Cripps Pink" apple cultivar (*Malus* × *domestica* Borkh) quality parameters, CyTA - Journal of Food, 8(1): 1-6.

125. Krapp A., Stitt M. 1995. An evaluation of direct and indirect mechanisms for the 'sink regulation' of photosynthesis in spinach: changes in gas exchange, carbohydrates,

metabolites, enzyme activities and steady state transcript events after cold-girdling source leaves. Planta, 195(3): 313–323.

126. Krauss P., Markstadter C., Riederer M. 1997. Attenuation of UV radiation by plant cuticles from woody species. Plant, Cell & Environment, 20(8): 1079-1085.

127. Krishnaprakash M. S., Aravindaprasad B., Krishnaprasad C. A., Narasimham P., Ananthakrishna S. M., Dhanaraj S., Govindarajan V. S. 1983. Effect of apple position on the tree on maturity and quality. Journal of Horticultural Science, 58(1): 31–36.

128. Kviklienė N., Kviklys D. Viškelis P. 2006. Changes In Fruit Quality During Ripening And Storage In The Apple Cultivar 'Auksis'. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research, 14(2): 195-202.

129. Kviklys D., Kviklienė N. 2005. Performance of apple trees in the young orchard, depending on the quality of planting material. Fruit growing, Samohvalovichi, 17(2): 67-71.

130. Kviklys D., Kviklienė N., Bite A., Lepsis J., Univer T., Univer N., Uselis N., Lanauskas J., Buskienė L. 2012. Baltic fruit rootstock studies: evaluation of 12 apple rootstocks in North-East Europe. Horticultural Science (Prague), 39(1): 1–7.

131. Kviklys D., Liaudanskas M., Viškelis J., Buskienė L., Lanauskas J., Uselis N., Janulis V. 2017. Composition and concentration of phenolic compounds of 'Auksis' apple grown on various rootstocks. Proceedings of the latvian academy of sciences. Section B, 71(3): 144–149.

132. Kviklys D., Viškelis P., Rubinskienė M., Kviklienė N., Liaudanskas M., Lanauskas J., Janulis V. 2014. Rootstock affects apple fruit biochemical content: preliminary results. Acta Horticulturae, 1058: 595-599.

133. Lakso A. N. 1994. Apple, 3-42. In: Schaffer B. S., Andersen P. C. (eds.), Handbook of Environmental Physiology of Fruit Crops. Vol. 1. CRC Press, Boca Raton, FL. USA.

134. Lakso A. N., Corelli-Grappadelli L. 1993. Implications of pruning and training practices to carbon partitioning and fruit development in apple. Acta Horticulturae, 332: 231–240.

135. Lakso A. N., Robinson T. L., Carpenter S. G. 1989. The palmette leader, a tree design for improved light distribution. HortScience, 24(2): 271-275.

136. Lakso A. N., Robinson T. L., Pool R. M. 1989. Canopy microclimate effects on patterns of fruiting and fruit development in apples and grapes, 263-274.. In: C. J. Wright (ed.), Manipulation of Fruiting. Butterworths, London, UK.

137. Lakso A., Corelli-Grappadelli L., Wünsche J., Robinson T. 1997. Understanding apple tree productivity – balancing carbohydrate supply and demand. Compact Fruit Tree, 30: 11-17.

138. Lanauskas J., Kviklys D., Liaudanskas M., Janulis V., Uselis N., Viškelis J., Viškelis P. 2017. Lower nitrogen nutrition determined higher phenolic content of organic apples. Horticultural Science (Prague), 44: 113-119.

139. Landsberg J. J., Jones H. G. 1981. Apple orchards, 419-469.. In: Kozlowski T. T. (ed.), Water Deficit and Plant Growth. Academic Press, New York, USA.

140. Lata B. 2007. Relationship between apple peel and the whole fruit antioxidant content: Year and cultivar variation. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55(3): 663–671.

141. Łata B., Tomala K. 2007. Apple peel as a contributor to whole fruit quantity of potentially healthful bioactive compounds. Cultivar and year implication. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55(26): 10795–10802.

142. Lattanzio V., Lattanzio V. M. T., Cardinali A. 2006. Phytochemistry: Role of Phenolics in the Resistance Mechanisms of Plants against Fungal Pathogens and Insects, 23-67. In: Imperato F. (ed.), Phytochemistry: Advances in Research. Research Signpost; Kerala, India.

143. Lauri P. E., Terouanne E., Lespinasse J. M. 1997. Relationship between the early development of apple fruiting branches and the regularity of bearing – an approach to the strategies of various cultivars. Journal of Horticultural Science, 72(4): 519-530.

144. Lee K. W., Kim Y. J., Kim D. O., Lee H. J., Lee C. Y. 2003. Major phenolics in apple and their contribution to the total antioxidant capacity. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(22): 6516–6520.

145. Lee K. W., Kim Y. J., Kim D. O., Lee H. J., Lee C. Y. 2003. Major phenolics in apple and their contribution to the total antioxidant capacity. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(22): 6516-6520.

146. Lee S. K., Kader A. A. 2000. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. Postharvest Biology and Technology, 20(3): 207–220.

147. Lewallen K. S., Marini R. P. 2003. Relationship between flesh firmness and ground colour in peach as influenced by light and canopy position. Journal of the American Society for Horticultural Science, 128(2): 163-170.

148. Li C. Y., Weiss D., Goldschmidt E. E. 2003a. Girdling affects carbohydrate-related gene expression in leaves, bark and roots of alternate-bearing citrus trees. Annals of Botany, 92(1): 137–143.

149. Li K. -T., Lakso A. N., Piccioni R., Robinson T. 2003b. Summer pruning effects on fruit size, fruit quality, return bloom and fine root survival in apple trees. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 78(6): 755-761.

150. Li K. T., Lakso A, Piccioni R. 2001. Summer Pruning: The Good, The Bad and the Ugly. New York Fruit Quarterly, 7(2): 6-9.

151. Li K. T., Lakso A. N. 2004. Photosynthetic characteristics of apple spur leaves after summer pruning to improve exposure to light. HortScience, 39(5): 969-972.

152. Li M. J., Ma F. W., Zhang M., Fei P. 2008. Distribution and metabolism of ascorbic acid in apple fruits (*Malus domestica* Borkh cv. Gala). Plant Science, 174(6): 606-612.

153. Li X. L., Gao D. S., Gen L. 1996. Effect of root pruning in flower on nutrition and photosynthetic characteristics of leaves in apple. Journal Shangdong Agriculture University, 27(3): 293–96.

154. Liaudanskas M. 2015b. Naminių obelų (*malus domestica* Borkh.) vaisių ir lapų fenolinių junginių sudėties tyrimas. Daktaro disertacija, Lietuvos Sveikatos Mokslų Universitetas, Kaunas, 137 p.

155. Liaudanskas M., Brunevičiūtė R., Gaivelytė K., Viškelis J., Viškelis P., Kviklys D., Janulis V. 2016. Seasonal Variation of Qualitative and Quantitative Composition of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity in Apple (Malus domestica Borkh.) Fruits. International Journal of Biochemistry Research & Review, 14(3): 1-13.

156. Liaudanskas M., Viškelis P., Jakštas V., Raudonis R., Kviklys D., Milašius A., Janulis V. 2014. Application of an optimized HPLC method for the detection of various phenolic compounds in apples from Lithuanian cultivars. Journal of Chemistry, Article ID 542121.

157. Liaudanskas M., Viškelis P., Kviklys D., Raudonis R. Janulis V. 2015a. A Comparative Study of Phenolic Content in Apple Fruits. International Journal of Food Properties, 18(5): 945-953.

158. Link H. 2000. Significance of flower and fruit thinning on fruit quality. Plant Growth Regulation, 31(1-2): 17–26.

159. Liu J. 2005. Oleanolic acid and ursolic acid: Research perspectives. Journal of Ethnopharmacology, 100(1-2): 92-94.

160. Liu J. R., Dong H. W., Chen B. Q., Zhao P., Liu R. H. 2009. Fresh apples suppress mammary carcinogenesis and proliferative activity and induce apoptosis in mammary tumors of the Sprague-Dawley rat. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57(1): 297–304.

161. Lv Y., Tahir I. I., Olsson M. E. 2015. Factors affecting the content of the ursolic and oleanolic acid in apple peel: influence of cultivars, sun exposure, storage conditions, bruising and Penicillium expansum infection. Journal of the Science of Food and Agriculture, 96(6): 2161–2169.

162. Ma C., Sun Z., Chen C., Zhang L., Zhu S. 2014. Simultaneous separation and determination of fructose, sorbitol, glucose and sucrose in fruits by HPLC–ELSD. Food Chemistry, 145: 784-788

163. Ma F., Cheng L. 2003. The sun exposed peel of apple fruit has higher xanthophyll cycle-dependent thermal dissipation and antioxidants of the ascorbate-glutathione pathway than the shaded peel. Plant Science, 165(4):819-827.

164. Ma F., Cheng L. 2004. Exposure of the shaded side of the apple fruit to full sun leads up to up-regulation of both the xanthophyll cycle and the ascorbate-gluthione cycle. Plant Science, 166(6): 1479-1486.

165. Maas F. M., Wertheim S. J. 2004. A multi-site rootstock trial with the apple cultivars ‘Cox's Orange Pippin’ and ‘Jonagold’. Acta Horticulturae, 658: 177–184.

166. Maas F. M., Wertheim S. J. 2004. A multi-site rootstock trial with the apple cultivars ‘Cox’s Orange Pippin’ and ‘Jonagold’. Acta Horticulturae, 658: 177–184.

167. Makeredza B. 2011. Studies toward understanding sunburn in apple. Thesis (MSc. Agric), Stellenbosch University, Stellenbosch, South Africa.

168. Makosz E. 1997. Economical evaluation of different apple planting schemes. Strategy of fruit growing development in Poland until 2010. Lublin, 187-190.

169. Mangaraj S., Goswami T. K. 2008. Respiration Rate Modelling of Royal Delicious Apple at Different Storage Temperatures. Fresh Produce 2 (2), 72-80.

170. Marini R. P., Barden J. A. 1987. Summer pruning of apple and peach trees. Horticultural Reviews, 9: 351-375.

171. Markowski J., Baron A., Mieszczakowska M., Płocharski W. 2009. Chemical composition of French and Polish cloudy apple juices. Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 84(6): 68-74.

172. Mata A. P., Val J., Blanco A. 2006a. Differential effects of prohexadione-calcium on red colour development in ‘Royal Gala’ and ‘Fuji’ apples. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 81(1): 84-88.

173. Mata A. P., Val J., Blanco A. 2006b. Prohexadione-calcium effects on the quality of ‘Royal Gala’ apple fruits. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 81(6): 965-970.

174. Mazumder K., Siwu E. R. O., Nozaki S., Watanabe Y., Tanaka K., Fukase K. 2011. Ursolic acid derivatives from Bangladeshi medicinal plant, *Saurauja roxburghii*: Isolation and cytotoxic activity against A431 and C6 glioma cell lines. Phytochemistry Letters, 4(3): 287-291.

175. McArtney S. J., Palmer J. W., Adams H. M. 1996. Crop loading studies with 'Royal Gala' and 'Braeburn' apples: effect of time and level of hand thinning. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 24(4): 401–407.

176. McGuiere R. G. Reporting of objective color measurements. HortScience, 27(12), p. 1254-1255, 1992.

177. Medjdoub R., Val J., Blanco A. 2005. Inhibition of vegetative growth in red apple cultivars using prohexadione-calcium. Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 80(2): 263–271.

178. Meintjes J.J., Stassen P., Theron K. I. 2005. The effect of different rates of prohexadionecalcium and girdling on shoot growth and fruit quality when applied to different pear cultivars. Acta Horticulturae, 671: 539–546.

179. Meland M. 2009. Effects of different crop loads and thinning times on yield, fruit quality, and return bloom in *Malus* x *domestica* Borkh. 'Elstar'. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 84(6): 117–121.

180. Meland, M., Kasier, C. 2016. Growth regulation of apple trees by Prohexadione-Ca application in a nordic climate. Acta Horticulturae, 1139: 519-522.

181. Meljnik A. V., Shestopalj A. H. 1998. State and tendencies of Ukrainian horticulture. Proc. Horticulture in Central and Eastern Europe, 157-172.

182. Mika A. 1998. Orchard models of XXI century. Proceedings of XXXVII Horticultural Conference, Skierniewice, 75-76.

183. Miller S. S. 1988. Plant bioregulators in apple and pear culture. Horticultural Reviews, 10: 309–401.

184. Miller S. S. 2002. Prohexadione-calcium controls vegetative growth in apple. Journal of Tree Fruit Production, 3(1): 11–28.

185. Miller S. S. 2008. Effect of Apogee in fruit set and size. Compact Fruit Tree, Special Issue, 14: 32–36.

186. Montanaro G., Dichio B., Xiloyannis C., Celano G. 2006. Light influences transpiration and calcium accumulation in fruit of kiwifruit plants (*Actinidia deliciosa* var. *deliciosa*). Plant Science, 170(3): 520-527.

187. Monteith J. L. 1977. Climate and the efficiency of crop production in Britain. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences, 281(980): 277-294.

188. Morales S. P., Davies F. S., Little R. C. 2000. Pruning and skirting affect canopy microclimate, yields and fruit quality of 'Orlando' Tangelo. HortScience. 35(1): 30-35.

189. Morandi B., Manfrini L., Losciale P., Zibordi M., Corelli-Grappadelli L. 2010. The positive effects of skin transpiration in peach fruit growth. Journal of Plant Physiology, 167(13): 1033-1037.

190. Muffler K., Leipold D., Scheller M. C., Haas C., Steingroewer J., Bley T., Neuhaus H. E., Mirata M. A., Schrader J., Ulber R. 2011. Biotransformation of triterpenes. Process Biochemistry, 46(1): 1-15.

191. Mziou S., Scheerlinck N., Nicolaï B. M. 2009. Study and modelling of two apple quality attributes: the soluble solids content and the firmness. Mathematical and Computer Modelling of Dynamical Systems, 15(4): 317-336.

192. Nava G., Dechen A. R. 2009. Long-team annual fertilization with nitrogen and potassium affect yield and mineral composition of 'Fuji' apple. Scientia Agricola (Piracicaba, Braz.), 66(3): 377–385.

193. Neilsen J. C., Dennis Jr. F. G. 2000. Effects of seed number, fruit removal, bourse shoot length and crop density on flowering in 'Spencer Seedless' apple. Acta Horticulturae, 527: 137–146.

194. Nie C. L., Sun J. S., Huang R. H. 2004. The Biosynthesis and Affecting Factors of Aroma in Some Fruits. Chinese Bulletin of Botany, 21(5): 631–637.

195. Nilsson T., Gustavsson K. E. 2007. Postharvest physiology of 'Aroma' apples in relation to position on the tree. Postharvest Biology and Technology, 43(1): 36–46.

196. Nour V., Trandafir I., Ionica M. E. 2010. Compositional Characteristics of Fruits of several Apple (Malus domestica Borkh.) Cultivars. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 38(3): 228-233.

197. Palmer J. W. 1989. Canopy manipulation for optimum utilization of light, 245-262. In: Wright C. J. (ed.), Manipulation of Fruiting, Butterworths, London, UK.

198. Palmer J. W., Giuliani R., Adams H. M. 1997. Effect of crop load on fruiting and leaf photosynthesis of 'Braeburn'/M.26 apple trees. Tree Physiology, 17: 741–746.

199. Palmer J. W., Prive J. P., Tustin D. S. 2003. Temperature, 217-236. In: Ferree D. C., Warrington I. J. (eds.), Apples: Botany, Production and Uses. CABI Publishing, Cambridge, MA, USA.

200. Petkovšek M. M., Štampar F., Veberič R. 2007. Parameters of inner quality of the apple scab resistant and susceptible apple cultivars (Malus domestica Borkh.). Scientia Horticulturae, 114(1), 37–44.

201. Petkovšek M. M., Štampar F., Veberič R. 2009. Changes in the inner quality parameters of apple fruit from technological to edible maturity. Acta Agriculturae Slovenica, 93(1): 17 – 29.

202. Petkovšek M. M., Štampar F., Veberič R. 2009. The effect of prohexadione-calcium on the phenolic content in developing fruits and leaves of apple trees. Journal of Food, Agriculture & Environment, 7(3-4): 369-375.

203. Qi S., Ding L., Tian K., Chen X., Hu, Z. 2006. Novel and simple nonaqueous capillary electrophoresis separation and determination bioactive triterpenes in Chinese herbs. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 40(1): 35-41.

204. Racsko J., Szabo Z., Nyeki J. 2005. Importance of supra-optimal radiance supply and sunburn effects on fruit quality. Acta Biologica Szegediensis. 49(1-2): 111-114.

205. Rademacher W. 2004. Prohexadione-Ca induces resistance against fire blight and other diseases. EPPO Bulletin, 34(3): 383–388.

206. Rademacher W., Kober R. 2003. Efficient use of prohexadione-Ca in pome fruits. European Journal of Horticultural Science, 68(3): 101–107.

207. Rademacher W., Saarloos K. V., Garuz Porte J. A., Riera Forcades F., Senechai Y., Andreotti C., Spinelli F., Sabatini E., Costa G. 2004. Impact of prohexadione-Ca on the vegetative and reproductive performance of apple and pear trees. European Journal of Horticultural Science, 69(8): 221–228.

208. Radivojevic D. D., Milivojevic J. M., Oparnica C. D., Vulic T. B., Djordjevic B. S., Ercisli, S. 2014. Impact of early cropping on vegetative development, productivity, and fruit quality of Gala and Braeburn apple trees. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 38(6): 773–780.

209. Rather G. H. 2006. Combined influence of pruning regimes and fertilizer application on production and quality of apple (Malus x domestica Borkh.) cv. Red Delicious. Ph. D Thesis submitted to Sher-e-Kashmir University of Agricultural Sciences and Technology of Kashmir, Srinagar, India.

210. Raudonė L., Raudonis R., Liaudanskas M., Janulis V., Viškelis P. 2017. Phenolic antioxidant profiles in the whole fruit, flesh and peel of apple cultivars grown in Lithuania. Scientia Horticulturae, 216: 186–192.

211. Raudonė L., Raudonis R., Liaudanskas M., Viškelis J., Pukalskas A., Janulis, V. 2016. Phenolic Profiles and Contribution of Individual Compounds to Antioxidant Activity of Apple Powders. Journal of Food Science, 81(5): C1055–C1061.

212. Raudonis R, Raudonė L, Jakštas V, Janulis V. 2012. Comparative evaluation of post-column free radical scavenging and ferric reducing antioxidant power assays for screening of antioxidants in strawberries. Journal of Chromatography A., 1233: 8−15.

213. Robinson T. L. 2008. The evolution towards more competitive apple orchard systems in the USA. Acta Horticulture, 772: 491-500.

214. Robinson T. L. Watkins C. B. 2003. Croploat of 'Honeycrisp' affects not only fruit size but many quality attributes. New York Fruit Quarterly, 3: 7–15.

215. Robinson T. L., Anderson L., Azarenko A., Barritt B. H., Brown G., Cline J., Crassweller R., Domoto P., Embree C., Fennell A., Ferree D., Garcia E., Gaus A., Greene G., Hampson C., Hirst P., Hoover E., Johnson S., Kushad M., Marini R. E. 2004. Performance Of Cornell-Geneva Rootstocks Across North America In Multi-Location NC-140 Rootstock Trials. Acta Horticulturae, 658: 241-245.

216. Robinson T. L., Fazio G., Aldwinckle H. S. 2014. Characteristics and Performance of Four new Apple Rootstocks from Cornell-USDA Apple Rootstock Breeding Program. Acta Horticulture, 1058: 651-656.

217. Robinson T. L., Seeley E. J., Barrit B. H. 1983. Effect of light environment and spur age on 'Delicious' apple fruit size and quality. Journal of the American Society for Horticultural Science, 108(5): 855-861.

218. Romero C., García A., Medina E., Ruíz-Méndez M. V., Castro A. d., Brenes, M. 2010. Triterpenic acids in table olives. Food Chemistry, 118(3): 670-674.

219. Roper T., Williams L. 1989. Net CO_2 assimilation and carbohydrate partitioning of grapevine leaves in response to trunk girdling and gibberellic acid application. Plant Physiology, 89(4): 1136–1140.

220. Roux C., Lemarquand A., Orain G., Campion C., Simoneau P., Poupard P. 2006. Effects of the plant growth regulator prohexadione-calcium and the SAR-inducer acibenzolar-S-methyl on the quality of apples at harvest. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 81(1): 139-145.

221. Šabajevienė G., Sakalauskaitė J., Šlapakauskas V., Uselis N., Duchovskis P. 2006. Chlorophyll fluorescence characteristics of cultivar 'Auksis' on rootstocks P 22 and P 60 in high density orchards of different construction. Sodininkystė ir Daržininkystė, 25(3): 364–370.

222. Šabajevienė G., Uselis N., Samuolienė G., Kviklys D., Sakalauskaitė J., Duchovskis P. 2009. Sodinimo tankumo įtaka obelų veislės 'Auksis' su P 22 poskiepiu fiziologiniams rodikliams. Žemdirbystė-Agriculture, 96(3): 83–92.

223. Sadowski A., Dziuban R., Jabłoński K. 2004. Growth and cropping of three apple cultivars on different rootstocks over a 7-year period. Acta Horticulturae, 658: 257–263.

224. Salvador F. R. de, Fisichella M. Fontanari M. 2006. Correlations between fruit size and fruit quality in apple trees with high and standard crop load levels. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research, 14(2): 113–122.

225. Samuolienė G., Čeidaitė A, Sirtautas R., Duchovskis P., Kviklys D. 2016b. Effect of crop load on phytohormones, sugars, and biennial bearing in apple trees. Biologia Plantarum, 60(2): 394-400.

226. Samuolienė G., Viškelienė A., Sirtautas R., Kviklys D. 2016a. Relationships between apple tree rootstock, crop-load, plant nutritional status and yield. Scientia Horticulturae, 211: 167–173.

227. Sansavini S., Corelli L. 1992. Canopy efficiency of apple as affected by microclimatic factors and tree structure. Acta Horticulturae, 332: 69-78.

228. Saravanan R., Viswanathan P., Pugalendi K. V. 2006. Protective effect of ursolic acid on ethanol-mediated experimental liver damage in rats. Life Sciences, 78(7): 713-718.

229. Saure M. C. 1990. External control of anthocyanin formation in apple. Scientia Horticulturae, 42(3): 181-218

230. Schneider G. W. 1977. Studies on the mechanism of fruit abscission in apple and peach. Journal of the American Society for Horticultural Science, 102(2): 179–181.

231. Schrader L. E., Zhang J., Sun J. 2003. Environmental stress that cause sunburn of apple. Acta Horticulturae, 618: 397-405.

232. Schrader L. E., Zhang J., Sun J., Xu J., Elfving D. C., Kahn C. 2009. Postharvest changes in internal apples with sunburn browning. Journal of the American Society for Horticultural Science, 134(1): 148-155.

233. Seeley E. J., Micke W. C., Kammereck R. 1980. 'Delicious' apple fruit size and quality as influenced by radiant flux density in the immediate growing environment. Journal of the American Society for Horticultural Science, 105(5): 645–647.

234. Serra S., Leisso R., Giordani L., Kalcsits L., Musacchi S. 2016. Crop Load Influences Fruit Quality, Nutritional Balance, and Return Bloom in 'Honeycrisp' Apple. HortScience, 51(3): 236-244.

235. Siebert K. J., Troukhanova N. V., Lynn P. Y. 1996. Nature of polyphenol–protein interactions. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44(1): 80–85.

236. Smart R. E. 1985. Principles of grapevine canopy microclimate manipulation with implications for yield and quality. A review. American Journal of Enology and Viticulture, 36(3): 230-239.

237. Smillie R. M., Hetherington S. E. 1999. Photoabatement by anthocyanin shields photosynthetic systems from light stress. Photosynthetica, 36(3): 451-463.

238. Solomakhin A., Blanke M. M. 2010. Can coloured hailnets improve taste (sugar, sugar: acid ratio), consumer appeal (colouration) and nutritional value (anthocyanin, vitamin C) of apple fruit. LWT - Food Science and Technology, 43(8): 1277-1284.

239. Solovchenko A., Merzlyak M. 2003. Optical properties and contribution of cuticle to UV protection in plants: experiment with apple fruit. Photochemical & Photobiological Sciences, 2(8): 861-866.

240. Somova L. O., Nadar A., Rammanan P., Shode F. O. 2003. Cardiovascular, antihyperlipidemic and antioxidant effects of oleanolic and ursolic acids in experimental hypertension. Phytomedicine, 10(2–3): 115-121.

241. Spann T. M., Beede R. H., DeJong T. M. 2008. Seasonal carbohydrate storage and mobilization in bearing and non-bearing pistachio (*Pistacia vera*) trees. Tree Physiology, 28(2): 207–213.

242. Stampar F., Hudina M., Usenik V., Dolenc K., Zadravec P. 1998. Influence Of Planting Densities On Vegetative And Generative Growth And Fruit Quality Of Apple (Malus Domestica Bork.). Acta Horticulturae, 513: 349-356.

243. Steyn W. J., Wand S. J. E., Holcroft D. M., Jacobs G. 2005. Red colour development and loss in pears. Acta Horticulturae, 671: 79-85.

244. Steyn W. J., Wand S. J. E., Jacobs G., Rosecrance R. C., Roberts S. C. 2009. Evidence for a photoprotective function of low-temperature-induced anthocyanin accumulation in apple and pear peel. Physiologia Plantarum, 136 (4): 461-472.

245. Stopar M., Bolcina U., Vanzo A., Vrhovsek U. 2002. Lower crop load for cv 'Jonagold' apples (*Malus domestica* Borkh.) increases polyphenol content and fruit quality. Journal of the Science of Food and Agriculture, 50(6): 1643–1646.

246. Sun J., Liu R. H. 2008. Apple phytochemical extracts inhibit proliferation of estrogen-dependent and estrogen-independent human breast cancer cells through cell cycle modulation. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56(24): 11661–11667.

247. Tahir I. I., Johansson E., Olsson M. E. 2009. Improvement of apple quality and storability by a combination of heat treatment and controlled atmosphere storage. HortScience, 44(6): 1648–1654.

248. Taiz L., Zeiger E. 2002. Plant physiology, 3rd edition. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA.

249. Takos A. M., Jaffe F. W., Jacobs S. R., Bogs J., Robinson S. P., Walker A. R. 2006. Light-induced expression of *MYB* gene regulates anthocyanin biosynthesis in red apples. Plant Physiology, 142(3): 1216-1232.

250. Taylor A. J., Hort J. 2004. Measuring proximal stimuli involved in flavour perception. In: Taylor A. J., Roberts D. D. (Eds.). Flavor Perception, Oxford: Blackwell Publishing, 1–38.

251. Teo G., Suzuki Y., Uratsu S. L., Lampinen B., Ormonde N., Hu W. K., DeJong T. M., Dandekar A. M. 2006. Silencing leaf sorbitol synthesis alters long-distance partitioning and apple fruit quality. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103(49), 18842–18847.

252. Teodoro T., Zhang L., Alexander T., Yue J., Vranic, M., Volchuk, A. 2008. Oleanolic acid enhances insulin secretion in pancreatic β-cells. FEBS Letters, 582(9): 1375-1380.

253. Treder W. 2010. Crop loading studies with 'Jonagold' apple tree. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research, 18(1): 59–69.

254. Treutter D. 2010. Managing Phenol Contents in Crop Plants by Phytochemical Farming and Breeding-Visions and Constraints. International Journal of Molecular Sciences, 11(3): 807-857.

255. Tromp J. 2000. Flower-bud formation in pome fruits as affected by fruit thinning. Plant Growth Regulation, 31(1-2): 27–34.

256. Tsao R., Yang R., Christopher J., Zhu Y., Zhu H. H. 2003. Polyphenolic profiles in eight apple cultivars using high-performance liquid chromatography (HPLC). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(21): 6347–6353.

257. Tsao R., Yang R., Xie S. H., Sockovie E., Khanizadeh S.H. 2005. Which polyphenolic compounds contribute to the total antioxidant activities of apple? Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53(12): 4989–4995.

258. Tustin D. S., Cashmore W. M., Bensley R. B. 1998. The influence of orchard row canopy discontinuity on irradiance and leaf area distribution in apple trees. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 73(3): 289–297.

259. Tustin D. S., Dayatilake G. A., Breen K. C., Oliver M. J. 2012. Fruit responses to changes in floral bud load – a new concept for crop load regulation. Acta Horticulture, 932: 195-202.

260. Unrath C. R. 1999. Prohexadione-Ca: A promising chemical for controlling vegetative growth of apples. HortScience 34(7): 1197–1200.

261. Untiedt R., Blanke M. 2001. Effect of thinning agents on whole apple tree canopy photosynthesis. Plant Growth Regulation, 35(1): 1-9.

262. Unuk T., Tijskens L., Germšek B., Zadravec P., Vogrin A., Hribar J., Simčič M., Tojnko S. 2012. Effect of location in the canopy on the colour development of three apple cultivars during growth. Journal of the Science of Food and Agriculture, 92(12): 2450–2458.

263. Unuk T., Tojnko S., Cmelik Z., Stopar M. 2006. Polyphenol Content In Apple Fruits As Affected By Crop Load And Rate Of Applied Nitrogen. Acta Horticulture, 721: 173-176.

264. Uselis N. 2001. Sodo konstrukcijų įtaka žemaūgių obelų augumui. Sodininkystė ir Daržininkystė, 20(1): 35–43.

265. Uselis N. 2006. Influence of planting schemes and crown forms of apple tree on rootstock P 60 on productivity and fruit quality. Sodininkystė ir Daržininkystė, 25(3): 124-132.

266. Varming C., Agerlin Petersen M., Toldam-Andersen T. B.. 2013. Ascorbic acid contents in Danish apple cultivars and commercial apple juices, LWT - Food Science and Technology, 54(2): 597-599.

267. Vieira F. G., Borges G. D., Copetti C., Amboni R. D., Denardi F., Fett R. 2009. Physicochemical and antioxidant properties of six apple cultivars (*Malus domestica* Borkh.) grown in southern Brazil. Scientia Horticulturae, 122: 421–425.

268. Viškelis J., Kviklys D. 2017. Vaisių krūvio reguliavimas vaismedžiuose (apžvalga). Sodininkystė ir Daržininkystė. 36(1-2): 30-42

269. Wagenmakers P. S., Wertheim S. J. 1991. Planting systems for fruit trees in temperate climates. Critical Reviews in Plant Sciences, 10(4): 369-385.

270. Wang H., Cao G., Prior R. 1997. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45(2): 304–309.

271. Wang Z., Quebedeoux B., Stutte G.W. 1996. Partitioning of [14C] glucose into sorbitol and other carbohydrates in apple under water stress. Functional Plant Biology, 23(3): 245-251.

272. Warrington I. J., Fulton T. A., Halligan E. A., Silva H. N. de. 1999. Apple fruit growth and maturity are affected by early season temperatures. Journal of the American Society for Horticultural Science, 124(5): 468–477.

273. Wertheim S. J., Wagenmakers P. S., Bootsma J. H., Groot M. J. 2001. Orchard systems for apple and pear: conditions for success. Acta Horticulturae, 557: 209–227.

274. Winkel-Shirley B. 2002. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. Current Opinion in Plant Biology, 5(3): 218–223.

275. Winzeler H. E., Schupp J. R. 2011. Image Analysis of Blush Coverage Extent and Measures of Categorical Blush Intensity in 'Honeycrisp' Apples, HortScience 46(5): 705–709.

276. Wojdyło A., Oszmiański J., Laskowski P. 2008. Polyphenolic compounds and antioxidant activity of new and old apple varieties. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56(15): 6520–6530.

277. Wolfe K., Wu X., Liu R. H. 2003. Antioxidant activity of apple peels. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(3): 609–614.

278. Wright A. H., Embree C. G., Nichols D. S., Prange R. K., Harrison P. A., Delong J. M. 2006. Fruit mass, colour and yield of 'Honeycrisp' apples are influenced by manually-adjusted fruit population and tree form. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 81(3): 397–401.

279. Wünsche J. N., Greer D. H., Laing W. A., Palmer J. W. 2005. Physiological and biochemical leaf and tree responses to crop load in apple. Tree Physiology 25(10), 1253–1263.

280. Wünsche J. N., Lakso A. N. 2000. The relationship between leaf area and light interception by spur and extension shoot leaves and apple orchard productivity. HortScience, 35(7): 1202–1206.

281. Wünsche J. N., Palmer J. W. 1997. Effects of fruiting on seasonal leaf and whole canopy carbon dioxide exchange of apple. Acta Horticulturae, 451: 295–301.

282. Wünsche J. N., Palmer J. W., Greer D. H. 2000a. Effects of crop load on fruiting and gas-exchange characteristics of 'Braeburn'/M.26 apple trees at full canopy. Journal of the American Society for Horticultural Science, 125(1): 93–99.

283. Wünsche, J. N., Lakso A. N. 2000b. The relationship between leaf area and light interception by spur and extension shoot leaves and apple orchard productivity. HortScience 35(7): 1202–1206.

284. Yang S. J., Du H. Y., Yu Y., Che Y. Y., Yuan C. H., Xing S. J. 2012. Effect of root pruning on competitive ability in Chinese jujube tree. Fruits, 67(6): 429–36.

285. Yang S. J., Xing S. J., Du Z. Y., Jiang W., Wang H., Liu C. S. 2009. Effect of root cutting on vegetative growth of *Zizyphus jujuba* Mill 'Dongzao' trees. Acta Horticulturae Sinica, 36(5): 625–30.

286. Yoder K. S., Miller S. S., Byers R. E. 1999. Suppression of fireblight in apple shoots by prohexadione-calcium following experimental and natural inoculation. HortScience 34(7): 1202–1204.

287. Young H. S., Lee C. K., Park S. W., Park K. Y., Kim K. W., Chung H. Y., Yokozawa T., Oura, H. 1995. Antitumor Effects of Ursolic Acid Isolated from the Leaves of *Eriobotrya japonica*. Natural Medicines, 49(2): 190-192.

288. Zarco-Tejada P. J., Miller J. R., Mohammed G. H., Noland T. L. 2000. Chlorophyll fluorescence effects on vegetation apparent reflectance: I. Leaf-level measurements and model simulation. Remote Sensing of Environment, 74(3): 582–595.

289. Zhang S., Sun Y., Sun Z., Wang X., You J., Suo, Y. 2014. Determination of triterpenic acids in fruits by a novel high performance liquid chromatography method with high sensitivity and specificity. Food chemistry, 146: 264-269.

290. Zhang W., Zhu X. R., Zhou K. Y., Fan C. H. 2013. Effects of root system pruning on photosynthetic characteristics and fruit quality of apple tree. Journal of Northwest Forest University 28(6): 42–45.

291. Zhao Y., Zhang L., Gao M., Li T.., Zheng P., Wang K., Zhang L., Li B., Han M., Alva A. K. 2013. Influence of girdling and foliar-applied urea on apple (*malus domestica* L.) Fruit Quality. Pakistan Journal of Botany, 45(5): 1609–1615.

292. Zhou R., Cheng L., Dandekar A. M. 2006. Down-regulation of sorbitol dehydrogenase and up-regulation of sucrose synthase in shoot tips of the transgenic apple trees with decreased sorbitol synthesis. Journal of Experimental Botany, 57(14): 3647-3657.

MOKSLINIŲ PUBLIKACIJŲ DISERTACIJOS TEMA SĄRAŠAS

Straipsniai recenzuojamuose mokslo leidiniuose, referuojamuose ir turinčiuose citavimo indeksą „*Clarivate Analytics Web of Science*" duomenų bazėje

1. **Viškelis J.**, Uselis N., Liaudanskas M., Janulis V., Bielicki P., Univer T., Lepsis J., Kviklys D. 2018. Triterpenic acid content in the fruit peel of *Malus* × *domestica* Borkh. depends on the growing technology. Zemdirbyste-Agriculture, 105(1): 71–78.
2. Liaudanskas M., Zymonė K., **Viškelis J.**, Janulis V. 2018. Optimisation of the extraction of flavonoids from apples using response surface methodology. Italian Journal of Food Science, 30(1): 89-101.
3. Lanauskas J., Kviklys D., Liaudanskas M., Janulis V., Uselis N., **Viškelis J.**, Viškelis P. 2017. Lower nitrogen nutrition determines higher phenolic content of organic apples. Horticultural Science (Prague), 44: 113-119.
4. Raudone L., Raudonis R., Liaudanskas M., **Viskelis J.**, Pukalskas A., Janulis, V. 2016. Phenolic Profiles and Contribution of Individual Compounds to Antioxidant Activity of Apple Powders. Journal of Food Science, 81: C1055–C1061.

Straipsniai recenzuojamuose periodiniuose mokslo leidiniuose

1. **Viškelis J.**, Kviklys D. 2017. Vaisių krūvio reguliavimas vaismedžiuose (apžvalga). Sodininkystė ir daržininkystė, 36(1-2): 30-42.
2. Kviklys D., Liaudanskas M., **Viškelis J.**, Buskienė L., Lanauskas J., Uselis N., Janulis V. 2017. Composition and concentration of phenolic compounds of 'Auksis' apple grown on various rootstocks. Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B, 71(3): 144–149.
3. Liaudanskas M., Brunevičiūtė R., Gaivelytė K., **Viškelis J.**, Viškelis P., Kviklys D., Janulis V. 2016. Seasonal variation of qualitative and quantitative composition of phenolic compounds and antioxidant activity in apple (*Malus domestica* Borkh.) fruits. International Journal of Biochemistry Research & Review, 14(3): 1-13.

Dalyvavimas konferencijose

1. **Viškelis J.**, Liaudanskas M., Kviklys D. 2017. Quantitative and qualitative differences of bioactive compounds in apples (cv. 'Auksis') grown in different geographical locations. The International Conference of Young Scientists „Young Scientists for Advance of Agriculture", Lapkričio 16 d., 2017, Vilnius, Lietuva.
2. **Viškelis J.**, Uselis N., Liaudanskas M., Janulis V., Kviklys D. Effect of apple-tree vegetative growth regulation on accumulation of fruit triterpenic and phenolic

compounds. 4th North and East European Congress on Food, Rugsėjo 10-13 d., 2017, Kaunas, Lietuva.

3. Butkevičiūtė A., Liaudanskas M., **Viškelis J.**, Raudonis R., Viškelis P., Kviklys D., Janulis V. Obuolių triterpeninių junginių kokybinės ir kiekinės sudėties vertinimas, taikant validuotą efektyviosios skysčių chromatografijos metodiką. Dvidešimt trečioji tarptautinė mokslinė-praktinė konferencija "Žmogaus ir gamtos sauga 2017", gegužės 3-5 d., 2017, Kaunas, Lietuva.
4. **Viškelis J.**, Liaudanskas M., Kviklys D. 2016. Quantitative differences of bioactive compounds in apples picked from different positions of an apple-tree. The International Conference of Young Scientists „Young Scientists for Advance of Agriculture“, Lapkričio 10 d., 2016, Vilnius, Lietuva.
5. Kviklys D., Liaudanskas M., **Viškelis J.**, Buskienė L., Lanauskas J., Uselis N., Janulis V. 2016. Composition and content of phenolic compounds of ‘Auksis’ apple on various rootstocks. 3rd international scientific conference „Sustainable Fruit Growing: From Plant to Product”, Rugpjūčio 17-19 d., 2016, Ryga, Latvija
6. **Viškelis J.**, Bobinaitė R., Urbonavičienė D., Kviklys D. Qualitative description of apples cv. ‚Ligol‘ picked from various positions of tree. 1st international conference on the scientific actualities and inovations in horticulture 2016 (SAIH 2016), Birželio 2-3 d., 2016, Kaunas, Lietuva.
7. Butkevičiūtė A., Liaudanskas M., **Viškelis J.**, Raudonis R., Viškelis P., Kviklys D., Janulis V. Triterpeninių junginių kokybinės ir kiekinės sudėties įvairavimas Lietuvoje auginamų skirtingų veislių obuolių ėminiuose. Dvidešimt antroji tarptautinė mokslinė-praktinė konferencija "Žmogaus ir gamtos sauga 2016". Gegužės 4-6 d., 2016, Kaunas, Lietuva.
8. Liaudanskas M., **Viškelis J.**, Kviklys D. Variation of qualitative and quantitative composition of phenolic compounds of the apple cultivars grown in Lithuania. The 6th International Pharmaceutical Conference „Science and practice 2015“, Lapkričio 5-6 d., 2015, Kaunas, Lietuva.

APIE AUTORIŲ

Jonas Viškelis gimė 1986 m. spalio 14 d. Kaune. Nuo 2005 iki 2011 m. studijavo Kauno technologijos universitete, informatikos fakultete. 2011 m. Jonas Viškelis įgijo informatikos bakalauro kvalifikacinį laipsnį, o 2011 m. informatikos inžinerijos magistro laipsnį. 2014-2018 m. jis buvo Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centro filialo Sodininkystės ir daržininkystės instituto doktorantas. 2016 m. J. Viškelis mokslines žinias gilino Latvijos žemės ūkio universiteto Sodininkystės ir daržininkystės institute Dobelėje, Latvijoje. Nuo 2011 m. iki dabar dirba LAMMC Sodininkystės ir daržininkystės instituto Biochemijos ir technologijos laboratorijos jaunesniuoju mokslo darbuotoju.

PASKELBTŲ PUBLIKACIJŲ KOPIJOS

ISSN 1392-3196 / e-ISSN 2335-8947
Zemdirbyste-Agriculture, vol. 105, No. 1 (2018), p. 71–78
DOI 10.13080/z-a.2018.105.010

Triterpenic acid content in the fruit peel of *Malus* × *domestica* Borkh. depends on the growing technology

Jonas VIŠKELIS[1], Nobertas USELIS[1,3], Mindaugas LIAUDANSKAS[2], Valdimaras JANULIS[2], Pawel BIELICKI[4], Toivo UNIVER[5], Janis LEPSIS[6], Darius KVIKLYS[1]

[1]Institute of Horticulture, Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry
Kauno 30, Babtai, Kaunas distr., Lithuania
E-mail: j.viskelis@lsdi.lt

[2]Medicinal Academy, Lithuanian University of Health Sciences
Eivenių 4, Kaunas, Lithuania

[3]Aleksandras Stulginskis University
Studentų 11, Akademija, Kaunas distr., Lithuania

[4]Research Institute of Horticulture
Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice, Poland

[5]Polli Horticultural Research Centre, Institute of Agricultural and Environmental Sciences,
Estonian University of Life Sciences
Polli 69108, Karksi-Nuia, Viljandi county, Estonia

[6]Institute of Horticulture, Latvia University of Agriculture
Pure 3124, Tukuma distr., Latvia

Abstract

Regardless of the numerous investigations of secondary metabolites, the impact of new growing technologies or individual technological means on fruit internal quality, particularly triterpene concentration in apple fruits has not been studied yet. Apple-tree (*Malus* × *domestica* Borkh.) growing technologies and geographical location of the growing site had clear effect on triterpene concentration in apple fruits. The effect of crop load, fruit location in apple-tree canopy, planting distance, apple-tree vegetative growth regulation and geographical location on triterpene content in apples was evaluated in 2015 and 2016. Four triterpenic compounds: corosolic, betulinic, oleonolic and ursolic acids, were quantified in apple peel. Triterpene accumulation in apple fruits was directly correlated with crop load, where 17% more total triterpenes were found at the highest crop load (12 fruits cm^{-2} trunk cross-sectional area (TCSA)) in comparison to the lowest crop load (4 fruits cm^{-2} TCSA). Higher concentration of triterpenes was found in the fruits harvested from the inner canopy of the apple-tree. Apple-tree growth regulation affected the synthesis of triterpenes – trunk incision decreased the amount of total triterpenes by 16% compared to the control and by 26% compared to summer pruning. Also, a trend of higher accumulation of triterpenes in fruits was found along with decreasing apple-tree planting distances. Colder climate and shorter vegetation period resulted in significantly higher contents of triterpenes in the fruits of cultivar 'Auksis' in Lithuania and Estonia compared to the fruits grown in Poland. The same trend, yet insignificant, was noticed for the cultivar 'Ligol'.

Key words: apple-tree, bioactive compounds, growing technologies.

Introduction

Apples are one of the most commonly consumed fruits in the world. Until now, development of apple growing and management technologies has been aimed at higher yields, fruit size and external quality (Hooge et al., 2017). In recent years, attention has been focussed on fruit internal quality. Apples contain multiple nutrients and a variety of bioactive compounds, including phenols. Several studies have been conducted in Lithuania to explore the impact of rootstocks (Kviklys et al., 2014) and nutrition (Lanauskas et al., 2017) on

Please use the following format when citing the article:
Viškelis J., Uselis N., Liaudanskas M., Janulis V., Bielicki P., Univer T., Lepsis J., Kviklys D. 2018. Triterpenic acid content in the fruit peel of *Malus* × *domestica* Borkh. depends on the growing technology. Zemdirbyste-Agriculture, 105 (1): 71–78 DOI 10.13080/z-a.2018.105.0010

the accumulation of phenols. Fruit phenol content has been investigated in the main apple cultivars grown in Lithuanian commercial orchards too (Liaudanskas et al., 2015; Raudonė et al., 2017). Research into other important bioactive compounds including triterpenes in apples is performed to a much lesser extent.

Triterpenes are a large group belonging to the terpenoid compounds and are well known for their pharmacological effects (Fontanay et al., 2008; Ikeda et al., 2008; Jang et al., 2009). Corosolic, betulinic, oleanolic and ursolic acids are typical representatives of pentacyclic triterpenes and they are widely distributed in the plant kingdom and in food products (Jäger et al., 2009; Muffler et al., 2011). Oleanolic and ursolic acids are found in the waxes of fruit and leaves (Qi et al., 2006; Koch, Ensikat, 2008). Triterpene content of various apple varieties (Andre et al., 2012), effect of rootstock, harvest maturity and storage methods (Lv et al., 2015) have been investigated, but there are no data on growing technologies or growing site effects on triterpene accumulation in apple fruits.

New findings about apple nutritional value are especially important while facing overproduction of apples in the world market and decrease of fruit prices. New scientific results on the impact of modern technologies on fruit quality parameters could increase consumption of apples.

The aim of this study was to evaluate the influence of different orchard management technologies (crop load, planting distance between apple-trees and apple-tree growth regulation), biological factors (fruit location in apple-tree canopy) and growing site on triterpene concentrations in apple fruits.

Materials and methods

The effect of different growing and management technologies on the triterpene content in apple -tree (*Malus* × *domestica* Borkh.) fruit was investigated in the experimental orchards of the Institute of Horticulture, Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry in 2015 and 2016. Additionally, apple samples, grown at Research Institute of Horticulture in Skierniewice, Poland and Polli Horticultural Research Centre, Estonia, were investigated for the effect of the geographical location on the accumulation of triterpene compounds.

Growing and management technologies. Effect of crop load. Three crop load levels: 4, 8 and 12 fruits per unit of trunk cross-sectional area (fruits cm^{-2} TCSA), were established by hand thinning before flowering in early May at the pink bud stage. Fruitlets remaining after the June drop were counted and thinned according to the crop load level. Apple-trees of cultivar 'Ligol' on rootstock P 60 were planted at the distance 3.5 × 1.25 m in 2011. The trial was established in four replicates with two apple-trees per replicate. The experiment was laid out in a fully randomized design. Ten fruits per each tree (20 fruits per replicate) from different canopy places were randomly selected for the analysis at optimum harvest time.

Effect of fruit location in apple-tree canopy. Investigations were carried out with an apple-tree cultivar 'Ligol' on rootstock P 60 planted at the distance 4 × 1.25 m in 2002. Orchard row direction was South-North. Four fruit locations in the apple-tree canopy were tested: 1) top of the apple-tree (above 2.3 m), 2) lower inside part of the canopy (bottom) and 3–4) east and west sides of apple-trees. Apples for the last two treatments were harvested at 1.2–1.8 m above the ground. The trial was established in four replicates with four apple-trees per replicate. The experiment was laid out in a fully randomized design. Five fruits per each apple-tree (20 fruits per replicate) from the tested fruit locations in the canopy were randomly selected for the analysis at optimum harvest time.

Effect of planting distance. Investigations were carried out with an apple-tree cultivar 'Auksis' on rootstock P 60 planted in 2001. Apple-trees were planted at three distances: 1) 3 × 1.50 m, 2) 3 × 1.00 m and 3) 3 × 0.50 m. According to the planting distance, apple-trees were trained as spindles, slender spindles and super spindles. The trial was established in four replicates with five apple-trees per replicate. Ten fruits per each apple-tree from different canopy places were randomly selected at optimum harvest time. From the bulk of 50 fruits from each replication 20 fruits were randomly selected for the analysis.

Effect of apple-tree vegetative growth regulation. Investigations were carried out with an apple-tree cultivar 'Rubin' on rootstock P 60 planted at the distance 4 × 1.5 m in 1999. Four treatments of apple-tree vegetative growth control were established: 1) control, where apple-trees were maintained according to intensive technologies; 2) apple-tree trunk incision before flowering by chain saw at the level of 20 cm above the ground from one side and 60 cm level from the other side; 3) application of growth regulator prohexadione-calcium at a rate of 2.5 kg ha^{-1} immediately after flowering when new shoots had 5 leaves; 4) summer pruning performed in the middle of August.

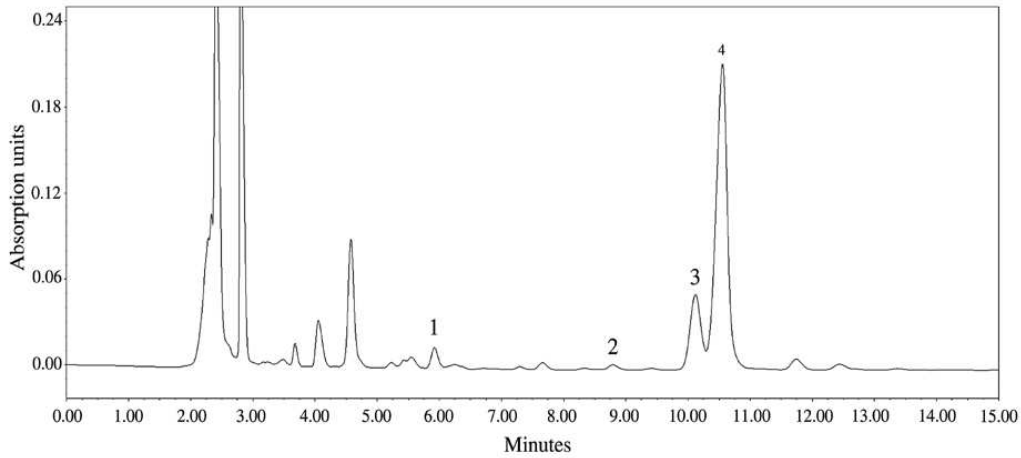
Effect of geographical location. Two apple-tree cultivars 'Auksis' and 'Ligol' grown on rootstock B.396 were tested. Fruit samples of each cultivar were collected at the Research Institute of Horticulture located at Skierniewice (51°58′ N, 20°09′ E), Poland, Institute of Horticulture, Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry in Babtai (55°60′ N, 23°48′ E) and at Polli Research Centre (58°67′ N, 25°33′ E), Institute of Agricultural and Environmental Sciences of the Estonian University of Life Sciences. The orchards are located ~400 km apart, at a similar distance from the Baltic Sea. The orchards were planted in the spring of 2005 under a uniform design in three replicates with five apple-trees per replicate. Planting distance was 4 × 1.5 m. Apple-trees were trained as slender spindle. Climate conditions and soil properties differed between the trial locations. In Poland: soil – deep sandy-loam, pH – 6.7, humus – 1.4%, P_2O_5 – 195 mg kg^{-1}, K_2O – 190 mg kg^{-1}, average annual

precipitation: 550 mm, average sum of active temperatures: 2550°. In Lithuania: soil – clay loam, pH – 7.3, humus – 2.8%, P_2O_5 – 255 mg kg^{-1}, K_2O – 230 mg kg^{-1}, average annual precipitation – 630 mm, average sum of active temperatures (>10°C) – 2300°. In Estonia: soil – clay loam, pH – 5.3, humus – 2.0%, P_2O_5 – 130 mg kg^{-1}, K_2O – 223 mg kg^{-1}, average annual precipitation – 455 mm, average sum of active temperatures – 1930°. 50 randomly selected apples were harvested at 1.2–1.8m above the ground from 5 apple-trees from each experimental plot at the optimal harvest time individually established for every cultivar and country.

Chemical analysis. Sample preparation. Each apple was peeled with a semi-automatic peeling machine AS 4 (Kronen GmbH, Germany). The peels were immediately frozen in a freezer (at −35°C) with air circulation and then lyophilized with a sublimator Zirbus 3 × 4 × 5 (ZIRBUS technology GmbH, Germany) at a pressure of 0.01 mbar (condenser temperature −85°C). The lyophilized apple peels were ground to fine powder by using a knife mill GM (Retsch GmbH, Germany). Loss on drying before analysis was determined by drying the apple peel lyophilizate in a laboratory drying oven to complete evaporation of water and volatile compounds (temperature – 105°C, the difference in weight between measurements – up to 0.01 g) and by calculating the difference in raw material weight before and after drying. The data were recalculated for absolute dry weight (DW).

Extraction. An amount of 1 g of lyophilized apple peel powder (exact weight) was weighed, added to 10 mL of acetone (100%, v/v), and extracted in a Sonorex Digital 10 P ultrasonic bath (Bandelin Electronic GmbH & Co. KG, Germany) for 10 minutes. The conditions of extraction (type of extraction, duration, temperature, solvent and its concentration) were chosen considering the results of extraction optimization. The extract obtained was filtered through a paper filter; the apple peel lyophilizate on the filter was washed with acetone (100%, v/v) in a 10-mL flask. The extract was filtered through a membrane filter with a pore size of 0.22 μm (Carl Roth GmbH, Germany).

Instrumentation and chromatographic conditions. A chromatograph Waters 2695 equipped with a detector Waters 2998 PDA ("Waters", USA) was used for high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis. Chromatographic separation was managed, chromatograms were recorded, and data were processed with the software *Empower® v.3.0* ("Waters"). Chromatographic separations were carried out by using an ACE® (5 μm, C_{18}, 250 × 4.6 mm) column. The column was operated at a constant temperature of 25°C. The volume of the extract being investigated was 10 μL. The flow rate was 1 mL min^{-1}, and isocratic elution was used. The mobile phase consisted of 88% acetonitrile (solvent A) and 12% water (solvent B). The duration of the analysis was 15 minutes. The identification of the chromatographic peaks was achieved by comparing the retention times and spectral characteristics (λ = 200–400 nm) of the eluting peaks with those of reference compounds. The compounds identified were confirmed by spiking the sample with the standard compound and monitoring the changes in the peak shape and spectral characteristics. For quantitative analysis, a calibration curve was obtained by injection of known concentrations of different standard compounds. The concentrations of triterpenic compounds, identified in the apple peel extracts, were within the limits of calibration curves. Triterpenic compounds were quantified at 205 nm. The concentration of triterpene compounds was calculated based on the peak areas by using standard compounds (Fig.). All trials were repeated three times (biological replicates) each year.



Note. Numbers indicate the peaks of analytes: 1 – corosolic acid, 2 – betulinic acid, 3 – oleonolic acid, 4 – ursolic acid.

Figure. Chromatogram of acetone extracts of apple peel sample

Statistical analysis. The data on the main traits were subjected to the analysis of variance (*ANOVA*). Results in tables are presented as means, since there were no year / treatment interactions. Significance of differences between treatments was estimated by Tukey's HSD (honest significant difference) test at $P < 0.05$.

Results

Effect of crop load on triterpene content. Apples harvested from the trees, that had higher number of fruits, accumulated larger quantities of all investigated triterpenic compounds (Table 1). With the highest crop load (12 fruits cm^{-2} TCSA) this difference was statistically significant for all investigated triterpene compounds.

Table 1. The effect of crop load on the content (mg g^{-1} dry weight) of triterpenic acids in the fruit of cultivar 'Ligol' (2015–2016)

Compounds	Crop load, fruits cm^{-2} trunk cross-sectional area		
	4	8	12
Corosolic acid	1.48 b	1.48 b	1.70 a
Betulinic acid	0.10 b	0.11 b	0.17 a
Oleonolic acid	1.81 b	1.97 b	2.29 a
Ursolic acid	8.78 b	8.93 b	10.13 a
Total	12.17 b	12.48 b	14.28 a

Note. The different letters in the same line indicate statistically significant differences between the individual compounds in the apple peel samples ($p < 0.05$).

Effect of fruit location in apple-tree canopy on triterpene content. Apples, harvested from the bottom of an apple-tree, accumulated the highest amount of total triterpene compounds (Table 2). Betulinic acid concentration was significantly higher in these apples. A lower amount of the investigated triterpenes was found in fruits, picked from the top position of an apple-tree. Fruits from bottom and east side accumulated more triterpenes than fruits from top and west side.

Table 2. The effect of fruit location in the apple-tree canopy on the content (mg g^{-1} dry weight) of triterpenic acids in the fruit of cultivar 'Ligol' (2015–2016)

Compounds	Fruit location in apple-tree canopy			
	bottom	top	east	west
Corosolic acid	1.44 a	1.25 b	1.34 ab	1.41 ab
Betulinic acid	0.14 a	0.10 c	0.12 b	0.09 c
Oleonolic acid	2.13 a	1.89 ab	1.95 ab	1.77 b
Ursolic acid	10.05 a	8.65 b	8.90 ab	8.65 b
Total	13.76 a	11.89 b	12.31 ab	11.92 b

Explanation under Table 1

Effect of apple-tree growth regulation on triterpene content. Of all the treatments applied, only summer pruning had a positive effect on the accumulation of all triterpenic compounds in apple fruits (Table 3). Trunk incision by chain saw from both sides of the trunk had a negative effect on triterpene concentration in apples – it was significantly lower in comparison to the control samples. Spraying apple-trees with a growth regulator prohexadione-calcium had no effect on triterpene concentration, except for betulinic acid, which increased in comparison with the control samples.

Table 3. The effect of the apple-tree growth regulation method on the content (mg g^{-1} dry weight) of triterpenic acids in the fruit of cultivar 'Rubin' (2015–2016)

Compounds	Apple-tree growth regulation method			
	control	trunk incision	prohexadione-calcium	summer pruning
Corosolic acid	1.33 a	1.15 b	1.29 ab	1.42 a
Betulinic acid	0.19 c	0.15 d	0.24 b	0.32 a
Oleonolic acid	2.10 ab	1.85 b	2.02 b	2.35 a
Ursolic acid	9.06 a	7.70 b	8.81 ab	9.63 a
Total	12.68 a	10.85 b	12.35 ab	13.73 a

Explanation under Table 1

Effect of apple-tree planting distance on triterpene content. More triterpenes were accumulated when the trees were planted at high densities (Table 4). The amount of total triterpenes depended on the planting distances between trees. Lower triterpene concentrations were found in the fruits from trees that had been planted at the widest distance. Only betulinic acid content was higher in these samples, but it had a small influence on the total concentration of triterpenes.

Table 4. The effect of apple-tree planting distance on the content (mg g^{-1} dry weight) of triterpenic acids in the fruit of cultivar 'Auksis' (2015–2016)

Compounds	Apple-tree planting distance m		
	3 × 1.50	3 × 1.00	3 × 0.50
Corosolic acid	0.40 a	0.42 a	0.43 a
Betulinic acid	0.22 a	0.16 b	0.17 b
Oleonolic acid	2.05 b	2.34 ab	2.57 a
Ursolic acid	9.71 a	10.77 a	10.86 a
Total	12.38 a	13.69 a	14.04 a

Explanation under Table 1

Effect of apple-tree geographical location on triterpene content. Significantly lower amount of triterpenic compounds was accumulated in the apples of the cultivar 'Auksis' from Poland (Table 5). This trend was observed in both years.

Table 5. The effect of apple-tree geographical location on the content (mg g^{-1} dry weight) of triterpenic acids in the fruit of cultivar 'Auksis'

Year	Compounds	Apple-tree geographical location		
		Skierniewice, Poland	Babtai, Lithuania	Polli, Estonia
2015	corosolic acid	0.18 c	0.28 b	0.45 a
	betulinic acid	0.07 b	0.08 ab	0.09 a
	oleonolic acid	1.06 c	1.55 b	1.88 a
	ursolic acid	4.83 c	7.17 b	9.29 a
	Total	6.14 c	9.08 b	11.71 a
2016	corosolic acid	0.41 c	0.68 a	0.53 b
	betulinic acid	0.14 b	0.18 a	0.11 c
	oleonolic acid	1.75 c	2.65 a	2.04 b
	ursolic acid	9.33 b	12.18 a	9.78 b
	Total	11.62 b	15.69 a	12.45 b
Average	corosolic acid	0.29 b	0.48 a	0.49 a
	betulinic acid	0.11 a	0.13 b	0.10 a
	oleonolic acid	1.41 b	2.10 a	1.96 a
	ursolic acid	7.08 b	9.68 a	9.54 a
	Total	8.88 b	12.39 a	12.08 a

Explanation under Table 1

The apples of the cultivar 'Ligol' from Polish, Lithuanian and Estonian trial orchards did not significantly differ in the total triterpenes content (Table 6).

Table 6. The effect of apple-tree geographical location on the content (mg g^{-1} dry weight) of triterpenic acids in the fruit of cultivar 'Ligol'

Year	Compounds	Apple-tree geographical location		
		Skierniewice, Poland	Babtai, Lithuania	Polli, Estonia
2015	corosolic acid	1.06 b	1.35 a	0.98 b
	betulinic acid	0.12 b	0.15 a	0.12 b
	oleonolic acid	1.76 b	2.05 a	1.96 ab
	ursolic acid	8.46 a	9.29 a	8.93 a
	Total	11.40 a	12.82 a	11.99 a
2016	corosolic acid	1.28 b	1,76 a	0,85 c
	betulinic acid	0.12 b	0,16 a	0,14 b
	oleonolic acid	2.03 b	2.44 a	2.66 a
	ursolic acid	10.80 ab	9.85 b	11.28 a
	Total	14.23 a	14.21 a	14.93 a
Average	corosolic acid	1.17 c	1.55 a	0.91 b
	betulinic acid	0.12 b	0.15 a	0.13 b
	oleonolic acid	1.89 b	2.24 a	2.31 a
	ursolic acid	9.63 a	9.57 a	10.10 a
	Total	12.81 a	13.52 a	13.46 a

Explanation under Table 1

Also, it was noticed that cultivar 'Ligol' accumulated more triterpenes than 'Auksis' apples, and mainly it was due to the corosolic acid, which was found at much higher concentrations in 'Ligol' apples.

Discussion

Our study determined the quantities of the four triterpenic compounds: corosolic, betulinic, oleonolic and ursolic acids, which are the most common triterpenes found in apple peel. However, a total of thirteen triterpenoids have been identified in apple peel (He, Liu, 2007). The highest concentrations, found in apple peel, was of oleonolic and ursolic acids (Cefarelli et al., 2006; Jäger et al., 2009), which agrees with the findings of our study. Compared with apple flesh, apple peel shows more potent antioxidant activity and antiproliferative activity (Wolfe et al., 2003), and this can be linked to triterpenes, because they are found mostly in peel.

Regardless of the numerous investigations of secondary metabolites, the impact of new growing technologies or separate technological means on fruit internal quality has not been explored yet. Until now, investigations of bioactive compounds and especially phenolics in apples have been limited to determination of differences between cultivars or growing systems (organic and integrated) or to the impact of light, apple-tree nutrition and some stress factors as drought, pathogens or soil salinity (Awad et al., 2001; Vieira et al., 2009; Lanauskas et al., 2017).

In previous investigations, it has been found that crop load has a significant effect on plant nutritional status and phytohormones (Samuolienė et al., 2016 a; b), it also influences the concentration of anthocyanins in fruits (Jakopic et al., 2009). Very contrasting data on crop load influence on apple fruit quality have been obtained by various researchers (Viškelis, Kviklys, 2017). This confirms the idea that fruit quality is determined by many different growing technologies and biological aspects, including cultivar, growing site, and other factors.

Apple-tree growth regulation, such as spraying with a growth regulator prohexadione-calcium or summer pruning, is a common practise in commercial orchards, but fruit quality is mostly determined by the external quality parameters, fruit colour, size and firmness, and basic internal quality parameters, such as soluble solids, sugar content and acidity (Zadravec et al., 2008; Ashraf, Ashraf, 2014). There are few research data available on the relationship between bioactive compounds, such as phenolics or triterpenes, and apple-tree growth regulation. Our data suggest that summer pruning increases triterpene accumulation in apples, while trunk incision has a negative effect.

The effect of fruit location in apple-tree canopy on fruit quality has been researched in much more detail: fruits from outer-canopy had higher phenolic content, higher fresh weight and higher soluble solids content. Research on the effects of location within the canopy

on both primary and secondary metabolites showed the importance of light exposure on apple fruit quality (Nilsson, Gustavsson, 2007; Drogoudi, Pantelidis, 2011; Unuk et al., 2012; Feng et al., 2014). In the case of triterpenes, our study indicated higher accumulation in fruits harvested from the bottom of the apple-tree – in the shaded zone of the apple-tree canopy.

Our research data show that the concentration of triterpene compounds in most cases could be attributed to solar irradiation and is negatively related to the amount of received sunlight. In Lv et al. (2015) research, apple cultivars with obvious sun-exposed and shaded sides were investigated for triterpene concentration in both sides of the fruit. The results showed that oleonolic and ursolic acid concentrations were higher in the peel of the shaded side than of the sun-exposed side. This trend was also observed in grapefruits (McDonald et al., 1993). The data of some researchers show that differences between shaded ant sun-exposed fruits cause different wax formation and its structure, which differs both qualitatively and quantitatively (Curry, 2008; Tahir et al., 2009). So, this fruit wax formation can be linked to triterpene concentration and explains higher triterpene concentration in cultivar 'Ligol' apples which has waxier peel than cultivars 'Auksis' and 'Rubin'.

Conclusions

1. The concentration of triterpenes in apple-tree (*Malus* × *domestica* Borkh.) fruits was directly correlated with the crop load: 17% more triterpenes were found at the highest crop load of 12 fruits cm^{-2} trunk cross-sectional area (TCSA) compared with the lowest crop load of 4 fruits cm^{-2} TCSA.

2. Significantly the highest amount of triterpenes was found in the fruits harvested from the bottom and inside of the apple-tree canopy.

3. Apple-tree growth regulation by technological means affected synthesis of triterpenes. Trunk incision decreased the amount of total triterpenes by 16% compared to the control and by 26% compared to summer pruning.

4. A trend towards higher accumulation of triterpenes in fruits was found along with decreasing planting distances between the apple-trees.

5. Colder climate and a shorter vegetation period resulted in significantly higher triterpene concentrations in the fruits of the cultivar 'Auksis' grown in Lithuania and Estonia compared with those grown in Poland. The same trend, yet insignificant, was noticed for the cultivar 'Ligol'.

Received 03 08 2017
Accepted 15 04 2018

References

1. Andre C. M., Greenwood J. M, Walker E. G, Rassam M., Sullivan M., Evers D., Perry N. B., Laing W. A. 2012. Anti-inflammatory procyanidins and triterpenes in 109 apple varieties. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60 (42): 10546–10554. https://doi.org/10.1021/jf302809k
2. Ashraf N., Ashraf M. Summer pruning in fruit trees. 2014. African Journal of Agricultural Research, 9 (2): 206–210. https://doi.org/10.5897/AJAR2013.7916
3. Awad M., Wagenmakers P., de Jager A. 2001. Effects of light on flavonoids and chlorogenic acid levels in the skin of 'Jonagold' apples. Scientia Horticulturae, 88: 289–298. https://doi.org/10.1016/S0304-4238(00)00215-6
4. Cefarelli G., D'Abrosca B., Fiorentino A., Izzo A., Mastellone C., Pacifico S., Piscopo V. 2006. Free-radical-scavenging and antioxidant activities of secondary metabolites from reddened cv. Annurca apple fruits. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54 (3): 803–809. https://doi.org/10.1021/jf052632g
5. Curry E. 2008. Effects of 1-MCP applied postharvest on epicuticular wax of apples (*Malus domestica* Borkh.) during storage. Journal of the Science of Food and Agriculture, 88 (6): 996–1006. https://doi.org/10.1002/jsfa.3180
6. Drogoudi P. D., Pantelidis G. 2011. Effects of position on canopy and harvest time on fruit physico-chemical and antioxidant properties in different apple cultivars. Scientia Horticulturae, 129 (4): 752–760. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.05.036
7. Feng F., Li M., Ma F., Cheng L. 2014. Effects of location within the tree canopy on carbohydrates, organic acids, amino acids and phenolic compounds in the fruit peel and flesh from three apple (*Malus* × *domestica*) cultivars. Horticulture Research, 1: 14019. https://doi.org/10.1038/hortres.2014.19
8. Fontanay S., Grare M., Mayer J., Finance C., Duval R. E. 2008. Ursolic, oleanolic and betulinic acids: antibacterial spectra and selectivity indexes. Journal of Ethnopharmacology, 120 (2): 272–276. https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.09.001
9. He X., Liu R. H. 2007. Triterpenoids isolated from apple peels have potent antiproliferative activity and may be partially responsible for apple's anticancer activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55 (11): 4366–4370. https://doi.org/10.1021/jf063563o
10. Hooge de I. E., Oostindjer M., Aschemann-Witzel J., Normann A., Loose S. M., Almli V. L. 2017. This apple is too ugly for me!: consumer preferences for suboptimal food products in the supermarket and at home. Food Quality and Preference, 56 (A): 80–92. https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2016.09.012
11. Ikeda Y., Murakami A., Ohigashi H. 2008. Ursolic acid: an anti- and pro-inflammatory triterpenoid. Molecular Nutrition and Food Research, 52 (1): 26–42. https://doi.org/10.1002/mnfr.200700389
12. Jäger S., Trojan H., Kopp T., Laszczyk M., Scheffler A. 2009. Pentacyclic triterpene distribution in various plants – rich sources for a new group of multi-potent plant extracts. Molecules, 14 (6): 2016–2031. https://doi.org/10.3390/molecules14062016

13. Jakopic J., Stampar F., Veberic R. 2009. The influence of exposure to light on the phenolic content of 'Fuji' apple. Scientia Horticulturae, 123 (2): 234–239. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.09.004
14. Jang S.-M., Yee S.-T., Choi J., Choi M.-S., Do G.-M., Jeon S.-M., Yeo J., Kim M.-J., Seo K.-I., Lee M.-K. 2009. Ursolic acid enhances the cellular immune system and pancreatic β-cell function in streptozotocin-induced diabetic mice fed a high-fat diet. International Immunopharmacology, 9 (1): 113–119. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2008.10.013
15. Koch K., Ensikat H.-J. 2008. The hydrophobic coatings of plant surfaces: epicuticular wax crystals and their morphologies, crystallinity and molecular self-assembly. Micron, 39 (7): 759–772. https://doi.org/10.1016/j.micron.2007.11.010
16. Kviklys D., Liaudanskas M., Janulis V., Viškelis P., Rubinskienė M., Lanauskas J., Uselis N. 2014. Rootstock genotype determines phenol content in apple fruits. Plant, Soil and Environment, 60 (5): 234–240.
17. Lanauskas J., Kviklys D., Liaudanskas M., Janulis V., Uselis N., Viškelis J., Viškelis P. 2017. Lower nitrogen nutrition determined higher phenolic content of organic apples. Horticultural Science, 44 (3): 113-119. https://doi.org/10.17221/50/2016-HORTSCI
18. Liaudanskas M., Viškelis P., Kviklys D., Raudonis R. Janulis V. 2015. A comparative study of phenolic content in apple fruits. International Journal of Food Properties, 18 (5): 945–953. https://doi.org/10.1080/10942912.2014.911311
19. Lv Y., Tahir I. I., Olsson M. E. 2015. Factors affecting the content of the ursolic and oleanolic acid in apple peel: influence of cultivars, sun exposure, storage conditions, bruising and *Penicillium expansum* infection. Journal of the Science of Food and Agriculture, 96 (6): 2161–2169. https://doi.org/10.1002/jsfa.7332
20. McDonald R. E., Nordby H. E., McCollum T. G. 1993. Epicuticular wax morphology and composition are related to grapefruit chilling injury. HortScience, 28 (4): 311–312.
21. Muffler K., Leipold D., Scheller M. C., Haas C., Steingroewer J., Bley T., Neuhaus H. E., Mirata M. A., Schrader J., Ulber R. 2011. Biotransformation of triterpenes. Process Biochemistry, 46 (1): 1–15. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.07.015
22. Nilsson T., Gustavsson K.-E. 2007. Postharvest physiology of 'Aroma' apples in relation to position on the tree. Postharvest Biology and Technology, 43 (1): 36–46. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2006.07.011
23. Qi S., Ding L., Tian K., Chen X., Hu Z. 2006. Novel and simple nonaqueous capillary electrophoresis separation and determination bioactive triterpenes in Chinese herbs. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 40 (1): 35–41. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2005.06.003
24. Raudonė L., Raudonis R., Liaudanskas M., Janulis V., Viškelis P. 2017. Phenolic antioxidant profiles in the whole fruit, flesh and peel of apple cultivars grown in Lithuania. Scientia Horticulturae, 216: 186–192. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.01.005
25. Samuolienė G., Viškelienė A., Sirtautas R., Kviklys D. 2016 (a). Relationships between apple tree rootstock, crop-load, plant nutritional status and yield. Scientia Horticulturae, 211: 167–173. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.08.027
26. Samuolienė G., Čeidaitė A., Sirtautas R., Duchovskis P., Kviklys D. 2016 (b). Effect of crop load on phytohormones, sugars, and biennial bearing in apple trees. Biologia Plantarum, 60 (2): 394–400. https://doi.org/10.1007/s10535-015-0581-3
27. Tahir I. I., Johansson E., Olsson M. E. 2009. Improvement of apple quality and storability by a combination of heat treatment and controlled atmosphere storage. HortScience, 44 (6): 1648–1654.
28. Unuk T., Tijskens L. M., Germšek B., Zadravec P., Vogrin A., Hribar J., Simčič M., Tojnko S. 2012. Effect of location in the canopy on the colour development of three apple cultivars during growth. Journal of the Science of Food and Agriculture, 92 (12): 2450–2458. https://doi.org/10.1002/jsfa.5651
29. Vieira F. G., Borges G. D., Copetti C., Amboni R. D., Denardi F., Fett R. 2009. Physicochemical and antioxidant properties of six apple cultivars (*Malus domestica* Borkh.) grown in southern Brazil. Scientia Horticulturae, 122 (1): 421–425. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.06.012
30. Viškelis J., Kviklys D. 2017. Crop load management in fruit-trees (review). Sodininkystė ir daržininkystė, 36 (1–2): 30–42 (in Lithuanian).
31. Wolfe K., Wu X., Liu R. H. 2003. Antioxidant activity of apple peels. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51 (3): 609–614. https://doi.org/10.1021/jf020782a
32. Zadravec P., Cmelik Z., Tojnko S., Unuk T., Schlauer B. 2008. Vegetative growth, yield and fruit quality of 'Gala' apple treated with Regalis (prohexadione-ca). Acta Horticulturae, 774: 287–290. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2008.774.38

ISSN 1392-3196 / e-ISSN 2335-8947
Zemdirbyste-Agriculture, vol. 105, No. 1 (2018), p. 71–78
DOI 10.13080/z-a.2018.105.010

Triterpeninių rūgščių kiekį obuolių luobelėse lemia vaismedžių auginimo technologijos

J. Viškelis[1], N. Uselis[1,3], M. Liaudanskas[2], V. Janulis[2], P. Bielicki[4], T. Univer[5], J. Lepsis[6], D. Kviklys[1]

[1]Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centro Sodininkystės ir daržininkystės institutas
[2]Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos akademija
[3]Aleksandro Stulginskio universitetas
[4]Lenkijos sodininkystės ir daržininkystės institutas
[5]Estijos gyvybės mokslų universiteto Žemės ūkio ir aplinkos mokslų instituto Polli sodininkystės tyrimų centras
[6]Latvijos žemės ūkio universiteto Sodininkystės institutas

Santrauka

Nors atlikta daug antrinių metabolitų tyrimų, naujų auginimo technologijų ar atskirų technologinių priemonių įtaka vaisių vidinei kokybei, ypač triterpenų koncentracijai obuoliuose, dar nėra tyrinėta. Naminės obels (*Malus* × *domestica* Borkh.) auginimo technologijos ir auginimo vieta turi įtakos triterpenų kaupimuisi obuoliuose. Vaisių krūvio, vaisių vietos vaismedžių vainike, vaismedžių sodinimo atstumo, jų vegetatyvinio augumo reguliavimo ir geografinės augimo vietos įtaka triterpenų kiekiui obuoliuose 2015–2016 m. buvo tirta Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centro Sodininkystės ir daržininkystės institute. Obuolių žievelėse buvo nustatyti keturi triterpeniniai junginiai: korosolo, betulino, oleonolo ir ursolo rūgštys. Triterpenų kaupimasis obuoliuose tiesiogiai susijęs su vaisių krūviu. Obelyse esant dideliam vaisių krūviui (12 vaisių cm^{-2} kamieno skerspjūvio ploto (KSP)), obuoliai sukaupė 17 % daugiau triterpenų nei vaismedžiai su mažu vaisių krūviu (4 vaisiai cm^{-2} KSP). Esmingai daugiau triterpenų sukaupė obuoliai, augę vaismedžio vainiko apačioje ir vidinėje dalyje. Triterpenų sintezei vaisiuose taip pat turėjo įtakos vaismedžių vegetatyvinio augumo reguliavimo priemonės. Kamieno įpjovimas triterpenų kiekį obuoliuose sumažino 16 %, lyginant su kontroliniu variantu, ir 26 %, lyginant su vasariniu genėjimu. Nustatyta tendencija, jog mažinant obelų sodinimo atstumą triterpenų kiekis obuoliuose didėja. Šaltesnis klimatas ir trumpesnė vegetacijos trukmė reikšmingai padidino triterpenų kiekį veislės ‘Auksis’ obuoliuose Lietuvoje bei Estijoje, lyginant su Lenkija. Panaši tendencija nustatyta ir tiriant veislės ‘Ligol’ obuolius.

Reikšminiai žodžiai: auginimo technologijos, bioaktyvūs junginiai, naminė obelis.

PAPER

OPTIMISATION OF THE EXTRACTION OF FLAVONOIDS FROM APPLES USING RESPONSE SURFACE METHODOLOGY

M. LIAUDANSKAS*[1,2], K. ZYMONĖ[1], J. VIŠKELIS[2] and V. JANULIS[1]
[1]Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Lithuanian University of Health Sciences, Lithuania
[2]Institute of Horticulture, Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry, Lithuania
*E-mail address: m.liaudanskas@yahoo.com

ABSTRACT

The ultrasound-assisted extraction of flavonoids from apple samples was modelled using response surface methodology. A three-level-three-factor central composite design using the response surface methodology (RSM) was employed to optimise three extraction variables, including temperature, extraction time and ultrasonic power, for the achievement of the highest extraction yield of the flavonoids from lyophilised apple samples. The optimised extraction conditions were 44.61ºC, an extraction time of 26.90 min, and ultrasonic power 480 W. The experimental yield of flavonoids was 6.58 mg g-1 expressed as rutin equivalent, which was close to the predicted yield (6.69 mg g-1). Optimised extraction conditions were applied for the analysis of apple samples of six cultivars.

Keywords: apple, central composite design, flavonoids, HPLC, response surface methodology, ultrasonic extraction

1. INTRODUCTION

Apples play an important role in the human diet. They are one of the most consumed fruits in the whole world (WU *et al*., 2007, CEYMANN *et al*., 2012). Based on data from the year 2014, approximately 84.63 million tonnes of apples are grown per annum. Countries that grow the most apples are China (approximately 40.92 million tonnes per annum), the USA (approximately 5.19 million tonnes per annum) and Poland (3.20 million tonnes per annum) (FAO Statistical Database, 2017). Apples are widely used in the food industry to produce various products and drinks (juice, wine, cider); they are also used unprocessed (MARKS *et al*., 2007, PRICE *et al*., 1999).

Some of the most important biologically active substances in apples are phenolic compounds, which are attributed to natural antioxidants. Oxidative stress causes changes in cell metabolism related to DNA and protein damage as well as lipid peroxidation (COOKE et al., 2003; PIZZIMENTI *et al*., 2010). It can cause inflammatory processes, cardiac, vascular and other diseases (MADAMANCHI *et al*., 2010). Phenolic compounds neutralise reactive forms of oxygen and nitrogen (PANDEY and RIZVI, 2009) and therefore are valuable for the treatment and prophylaxis of various diseases. Qualitative and quantitative composition analyses of raw materials that accumulate phenolic compounds are important and relevant.

The selection of extraction conditions is an important analytical step in developing the qualitative and quantitative analysis methodologies of phenolic compounds in multi-component matrices. Our developed and validated method of flavonoid and phenolic acid determination in apples is published in the paper by LIAUDANSKAS *et al*. (2014). In developing this method, the extraction parameter selection was empirical. It is relevant to compare flavonoid extraction yield when the samples are extracted using empirical extraction conditions and when conditions are selected based on statistical modelling.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Plant material

Apple samples of the Ligol cultivar were chosen for the extract optimisation analysis. The Ligol cultivar (winter cultivar, bred in Poland) is one of the main cultivars in commercial apple orchards in Lithuania. Optimised extraction conditions were applied for the analysis of the apple samples of different cultivars. The following apple cultivars were included in the comparable researches: Aldas (early winter cultivar, bred in Lithuania, recommended for ecological orchards), Auksis (early winter cultivar, bred in Lithuania,), Connel Red (winter cultivar, bred in USA), Ligol, Lodel (early winter cultivar, bred in Lithuania) and Rajka (early winter cultivar, bred in Czech Republic). The apple trees were grown in the experimental orchard (block 2, row 4, trees 21-40) of the Institute of Horticulture, Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry, Babtai, Lithuania (55°60′ N, 23°48′ E). The altitude of Babtai town is 57 m above sea level. Trees were trained as a slender spindle, and pest and disease management was carried out according to the rules of the integrated plant protection. The experimental orchard was not irrigated. Tree fertilisation was performed according to soil and leaf analysis. In addition, nitrogen was applied before flowering at the rate of 80 kg ha^{-1}, and potassium was applied after harvest at the rate of 90 kg ha^{-1}. Soil conditions of the experimental orchard were the following: clay loam, pH - 7.3, humus - 2.8%, P_2O_5 - 255 mg kg^{-1} and K_2O - 230 mg kg^{-1}.

2.2. Sample preparation

Apples were cut into slices of equal size (up to 1 cm in thickness), and the stalks and the seeds were removed. The apple slices were immediately frozen in a freezer (at -35°C) with air circulation. Apple samples were lyophilised with a ZIRBUS sublimator 3× 4×5/20 (ZIRBUS technology, Bad Grund, Germany) at a pressure of 0.01 mbar (condenser temperature, -85°C). The lyophilised apple slices were ground to a fine powder (about 100 μm) by using the knife mill Grindomix GM 200 (Retsch, Haan, Germany).
Loss on drying before analysis was determined by drying the apple lyophilisate in a laboratory drying oven to complete the evaporation of free water and volatile compounds (temperature 105°C) and by calculating the difference in raw material weight before and after drying (European Pharmacopoeia, 2010). The data were recalculated for the absolute dry lyophilisate weight.

2.3. Chemicals

All solvents, reagents, and standards used were of analytical grade. Acetonitrile, aluminium trichloride hexahydrate, hexamethylenetetramine and acetic acid were obtained from Sigma-Aldrich GmbH (Buchs, Switzerland), and ethanol from Stumbras AB (Kaunas, Lithuania). Hyperoside, rutin, quercitrin, phloridzin, procyanidin B1 and procyanidin B2, and chlorogenic acid standards were purchased from Extrasynthese (Genay, France); reynoutrin, (+)-catechin and (−)-epicatechin were purchased from Sigma-Aldrich GmbH (Buchs, Switzerland); and avicularin, procyanidin C1 and isoquercitrin were purchased from Chromadex (Santa Ana, USA). In the study, we used deionised water that the Crystal E HPLC (Adrona SIA, Riga, Latvia) water purification system produced.

2.4. Extraction

A total of 2.5 g of lyophilised apple powder (exact weight) was weighed, added to 30 mL of ethanol (70%, v/v) and extracted in a Sonorex Digital 10 P ultrasonic bath (Bandelin Electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Germany). A total of 480 W is the maximum ultrasonic power that can be achieved by using the Sonorex Digital 10 P ultrasonic bath. The obtained extract was filtered through a paper filter, and the apple lyophilisate on the filter was washed twice with 10 mL of ethanol (70%, v/v) in a 50mL flask. Then, the extract was filtered through a PVDF syringe filter with a pore size of 0.22 μm (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany).

2.5. Determination of the total flavonoid content

The total flavonoid content in the extracts of lyophilised apple samples was determined by applying the technique that URBONAVIČIŪTĖ *et al*. (2006) described. It was calculated using the rutin calibration curve and was expressed as its equivalent (mg RE/g) for absolute dry weight (DW).

2.6. High-performance liquid chromatography

The qualitative and quantitative analyses of phenolic compounds were performed according to the previously validated and described high-performance liquid chromatography (HPLC) method (LIAUDANSKAS *et al*., 2014).

2.7. Experimental design and statistical analyses

Before the development of the study through the response surface methodology (RSM), the flavonoid yield from the apples of three extractants (ethanol, methanol, and acetone) of different concentrations were compared. It was determined that the highest yield of flavonoids after four hours of extraction was achieved by macerating apple samples with ethanol 70% (v/v); therefore, this extractant was chosen for further analyses.
Selection of extraction method: The efficacy levels of maceration and extraction in ultrasonic bath methods were compared, and it was determined that the yield was higher when sonification method was applied. The results for the extractant and extraction method selections are discussed more in depth in the paper by LIAUDANSKAS *et al*. (2014).
In general, such multiple parameters as liquid/solid ratio, temperature, time, solvent polarity and ultrasonic power influence the efficiency of the extraction of a compound, and these are the primary extraction parameters that many other authors have referred to (TIAN *et al*., 2013; RADOJKOVIC *et al*., 2012; CHEN *et al*., 2012) In this study, three factors (or independent variables) were selected: temperature (20-60°C), extraction time (5-95 min) and ultrasonic power (48-480 W) (Table 1).

Table 1. Factors and levels for RSM, and central composite experimental design with the independent variables.

Run	Coded and non-coded variable levels						Total flavonoid content, mg RE g^{-1}
	X_1	Temperature, °C	X_2	Extraction time, min	X_3	Ultrasonic power, W	
1	0	40	0	50	0	264	6.889
2	0	40	0	50	-1	48	6.58
3	0	40	-1	5	0	264	4.199
4	0	40	1	95	0	264	6.312
5	-1	20	-1	5	-1	48	3.154
6	1	60	0	50	0	264	6.315
7	0	40	0	50	0	264	7.087
8	1	60	1	95	-1	48	5.618
9	1	60	1	95	1	480	5.963
10	-1	20	1	95	-1	48	4.682
11	1	60	-1	5	-1	48	4.102
12	-1	20	-1	5	1	480	3.555
13	0	40	0	50	0	264	6.794
14	0	40	0	50	0	264	7.175
15	0	40	0	50	0	264	6.821
16	-1	20	0	50	0	264	4.966
17	0	40	0	50	0	264	6.982
18	-1	20	1	95	1	480	5.406
19	1	60	-1	5	1	480	4.665
20	0	40	0	50	1	480	7.465

A three-level-three-factor central composite design was employed to determine the optimal combination of flavonoid extraction variables from apple samples. Table 1 represents the coded and non-coded values of the experimental variables and 20 experimental points. Six replicates (1, 7, 13, 14, 15, 17) were used to evaluate the pure error. Experimental data showed that response variables were fitted to a quadratic polynomial model. The general form of the quadratic polynomial model is presented in Fig. 1, where Y is the dependent variable; β_0, β_i, β_{ii} and β_{ij} are the regression coefficients for intercept, linearity, square and interaction respectively. X_i and X_j are the independent variables.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{3} \beta_i X_i + \sum_{i=1}^{3} \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{2} \sum_{j=i+1}^{3} \beta_{ij} X_i$$

Figure 1. The general form of the quadratic polynomial model.

Design-Expert® 6.0.8 software (Stat-Ease Inc., Minneapolis, Minnesota, USA) was used to analyse the data, develop models and optimise the extraction conditions. The fitness of the quadratic polynomial model was inspected with the regression coefficient of R^2. The p-value was used to check the significance of the regression coefficient.
All of the experiments (except extraction optimisation researches) were carried out in triplicate. Means and standards errors were calculated with SPSS 20.0 software (Chicago, USA). A single factor analysis of variance (ANOVA) along with the post hoc Tukey's HSD test was employed for statistical analysis. Differences were considered to be significant at the $p<0.05$ level.

3. RESULTS AND DISCUSSIONS

3.1. Optimisation of extraction conditions of total flavonoids in apples

The design matrix and the corresponding results of RSM experiments to determine the effects of the three independent variables, including temperature (X_1), extraction time (X_2) and ultrasonic power (X_3), are shown in Table 2. Through multiple regression analysis of the experimental data, the model for predicted response Y could be expressed with the following quadratic polynomial equation (in the form of coded values), presented in Fig. 2.

$$Y\,(TFC) = 6.86 + 0.49X_1 + 0.83X_2 + 0.29X_3 - 1.08X_1^2 - 1.47X_2^2 + 0.30X_3^2 - 0.071X_1X_2 - 0.027X_1X_3 + 0.013X_2X_3$$

Figure 2. The model for the predicted response Y expressed by the quadratic polynomial equation (in the form of coded values).

Statistical testing of the model was performed in the form of analysis of variance (ANOVA). The ANOVA for the fitted quadratic polynomial model of extraction of polysaccharides is shown in Table 2.

Table 2. Analysis of variance for fitted quadratic model of extraction of phenolic compounds.

Source	Sum of squares	Degree of freedom	p-value
Model	32.32	9	<0.0001 Significant
Residual	0.60	10	
Lack of fit	0.49	5	0.0698 Not significant
Pure error	0.11	5	
Cor. total	32.92	19	

R^2 = 0.9818; R^2_{adj} = 0.9674; C.V. = 4.27%; adequate precision = 26.232.

The results of the analysis of variance for the fitted quadratic model of extraction of phenolic compounds are presented in Table 2. They indicated a high degree of correlation between the observed and predicted values. The lack of fit test determines whether a selected model is adequate for explaining the experimental data or whether another model should be reselected. The value of the lack of fit test indicated that the fitting model was adequate. An adequate precision is a measure of the signal-to-noise ratio, which when greater than 4 is considered to be adequate (CANETTIERI *et al.*, 2007). In addition, the value of adequate precision demonstrates an adequate signal. At the same time, a relatively low value of the coefficient of variation indicates a better precision and reliability of the experimental values. Therefore, the model is adequate for prediction in the range of experimental variables.
Residual analysis of the response surface design was performed. A normal probability plot was applied to the residuals. The data points fell along a straight line, indicating that they were distributed normally. In addition, residual runs for analysis were used. It was determined that the order of observations did not influence the results. Residuals versus predicted responses were plotted. The data points fell on both sides of the zero line, so no pattern could be concluded. The relationship between the actual and predicted values was evaluated. The data points fell along a straight line indicating close similarity between the two data points and the adequacy of the model.

Table 3. Regression coefficients estimate and their significance test for quadratic model.

Source	Sum of squares	Degree of freedom	p-Value
X_1	2.40	1	<0.0001
X_2	6.90	1	<0.0001
X_3	0.85	1	0.0037
X_1^2	3.23	1	<0.0001
X_2^2	5.94	1	<0.0001
X_3^2	0.24	1	0.0717
X_1X_2	0.040	1	0.4337
X_1X_3	5.886×10^{-3}	1	0.7605
X_2X_3	1.378×10^{-3}	1	0.8825

The significance of each coefficient measured using the p-value is listed in Table 3. A smaller p-value means the corresponding variables are more significant. The p-value of the model is less than 0.0001, which indicates that the model is significant and can be used to optimise the extraction variables. The three independent variables (X_1, X_2, X_3) and two quadratic terms (X_1^2 and X_2^2) significantly affect the extraction yield of flavonoids. The interaction among temperature (X_1), extraction time (X_2) and ultrasonic power (X_3) did not affect the extraction yield of flavonoids significantly.

The three-dimensional response surface is the graphical representation of the regression equation and is very useful for judging the relationship between independent and dependent variables. Different shapes of the contour plots indicate whether the mutual interactions among the variables are significant or not. A circular contour plot means the interactions between the corresponding variables are negligible, whereas an elliptical contour suggests that the interactions between the corresponding variables are significant (MURALIDHAR *et al.*, 2001). The three-dimensional representation of the response surfaces generated via the model is shown in Fig. 3–5. With these three variables, when two variables are depicted in three-dimensional surface plots, the third variable is fixed at the zero level.

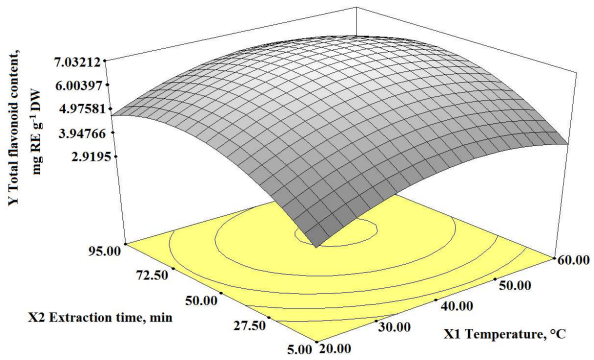


Figure 3. Response surface plot showing the effect of temperature (X_1) and extraction time (X_2). X_3 (Ultrasonic power) = 264 W.

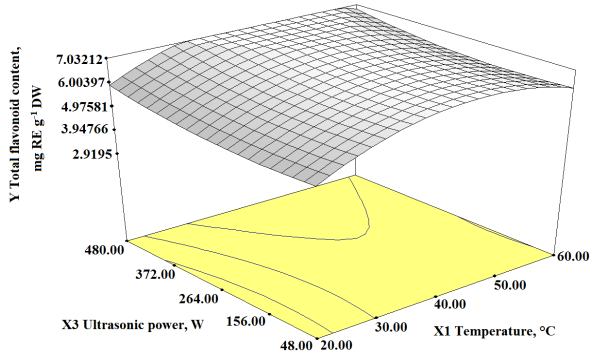


Figure 4. Response surface plot showing the effect of temperature (X_1) and ultrasonic power (X_3). X_2 (Extraction time) = 50 min.

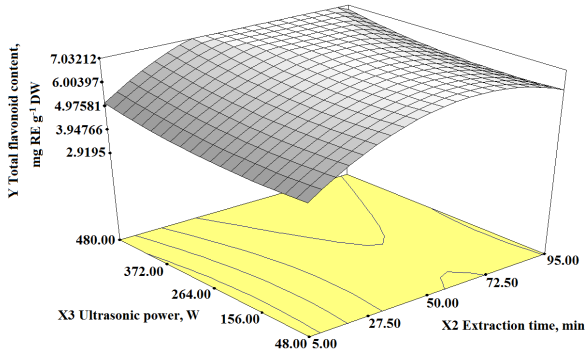


Figure 5. Response surface plot showing the effect of extraction time (X_1) and ultrasonic power (X_3). X_2 (Temperature) = 40°C.

It is found in Figs. 3-5 that all of the three response surfaces are convex in shape, which indicates that the ranges of variables were chosen properly. As shown in Fig. 3, the yield of extraction increases when extraction time and temperature are increased. Based on the chosen model, the projected highest amount of phenolic compounds (6.69 mg g^{-1}) is achieved when samples are extracted at 44.61°C for 26.90 min. According to the applied model, a further increase of extraction time and temperature decreases the extraction yield.

Flavonoid extraction yield dependency on temperature and ultrasonic power is presented in Fig. 4. The highest extraction yield is achieved when apple samples are extracted at highest ultrasound power (480 W), at 44.61°C. Extraction time and ultrasound power influence on flavonoid extraction yield is presented in Fig. 5. The highest yield is achieved when the ultrasound power is maximal (480 W), and extraction time is 50 min.

3.2. Optimization of extraction parameters and validation of the model

Through these three-dimensional plots, the suitability of the model equation for predicting the optimal response values was tested using the selected optimal conditions. The results (Table 3) showed that the optimized conditions were ultrasonic temperature of 44.61°C, extraction time of 26.90 min, and ultrasonic power 480 W. Under these conditions, the predicted extraction yield of flavonoids was 6.69 mg g^{-1}. However, considering the operability in actual production, the optimal conditions can be modified as follows: temperature of 45°C, extraction time of 27 min, and ultrasonic power 480 W. Under the modified conditions, the experimental yield of flavonoids was 6.58 mg RE g^{-1} (n = 3), which was close to the predicted value. Extraction yield was 4.1 mg RE g^{-1} when extraction conditions were selected empirically (LIAUDANSKAS *et al.*, 2014). When extraction conditions were optimized by statistical modelling method the yield was 37.69% higher than the yield when extraction conditions were selected empirically.

3.3. Analysis of ethanol extracts of apple samples of different cultivars

The chemical composition in fruits of different apple cultivars may vary significantly (CEYMANN *et al*., 2012; ŁATA *et al*., 2005; WOJDYŁO *et al*., 2008), therefore it is very important to determine the qualitative and quantitative composition of individual phenolic compounds in apples that are grown under Lithuanian climatic conditions. Optimized extraction conditions were applied for the HPLC analysis of ethanol extracts of apple samples of six cultivars grown in Lithuania: Aldas, Auksis, Connel Red, Ligol, Lodel and Rajka using previously developed and validated HPLC method (LIAUDANSKAS *et al*., 2014). These phenolic compounds of various groups were identified and quantified in analysed extracts: procyanidin B1, (+)-catechin, chlorogenic acid, procyanidin B2, (−)-epicatechin, procyanidin C1, rutin, hyperoside, isoquercitrin, reynoutrin, avicularin, quercitrin and phloridzin (synonym phlorizin). Apple sample chromatogram (cultivar Lodel) is presented in Fig. 6. Total amount of phenolic compound in analysed apple sample extracts varied from 2.521 mg g^{-1} (cultivar Connel Red) to 6.430 mg g^{-1} (cultivar Aldas).

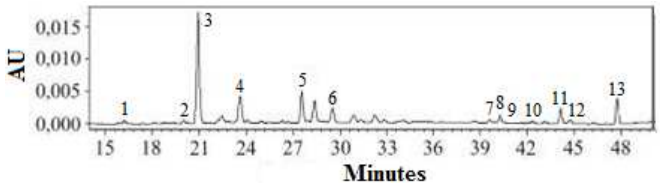


Figure 6. Chromatogram of the ethanol extract of apple sample (λ=280 nm, cultivar Lodel).
1 - Procyanidin B1, 2 - (+)-catechin, 3 - chlorogenic acid, 4 - procyanidin B2, 5 - (–)-epicatechin, 6 - procyanidin C1, 7 - rutin, 8 - hyperoside, 9 - isoquercitrin, 10 - reynoutrin, 11 - avicularin, 12 - quercitrin, 13 - phloridzin.

The highest total amount of quercetin glycoside 0.811 mg g^{-1} was determined in apple samples of cultivar Aldas. It was 1.93 times higher than the lowest total amount of quercetin glycoside (0.420 mg g^{-1}), determined in apple samples of cultivar Auksis. Quantitative composition of quercetin glycoside group compounds determined in apple samples is presented in Table 4.
Hyperoside was a predominant quercetin glycoside group compound in apple samples of cultivars Aldas, Auksis, Connel Red, Ligol and Lodel. It amounted to 25.14-35.16% of the total amount of identified and quantified quercetin glycoside group compounds. VAN DER SLUIS *et al*. indicated similar tendencies of a hyperoside quantitative composition variation. Hyperoside amounted to 23-33% of the total identified quercetin glycosides in samples of cultivars that these authors analysed (VAN DER SLUIS *et al*., 2001). The composition of apple samples of cultivar Rajka stood out among the analysed cultivars, as the predominant compound in this cultivar was quercitrin. Its amount was 1.66 times higher than the amount of hyperoside determined in the apple samples of this cultivar. Quercetin glycoside rutin-hyperoside-isoquercitrin triplet (where the predominant compound is always hyperoside, and levels of rutin are the lowest) was characteristic in apple sample extracts of all analysed cultivars. This pattern was also established in studies of other scientists (MARKS *et al*., 2007; PRICE *et al*., 1999; SCHIEBER *et al*., 2001). The ratio of rutin-hyperoside-isoquercitrin amount varies in the apple samples of different cultivars. It varied from 1:5.1:1.6 (cultivar Connel Red) to 1:11.9:1.2 (cultivar Lodel).

Monomeric ((+)-catechin and (–)-epicatechin) and oligomeric (procyanidin B1, procyanidin B2, and procyanidin C1) flavan-3-ols were determined in the apple samples. The highest total amount of identified and quantified flavan-3-ols (2.919 mg g^{-1}) was determined in apple samples of the cultivar Lodel. It was 2.55 times higher than the lowest amount (1.143 mg g^{-1}), determined in the apple samples of cultivar Connel Red.

In the scientific literature, it was noted that in apples, the amount of (–)-epicatechin is higher than (+)-catechin (WU *et al*., 2007; DUDA-CHODAK *et al*., 2010; KAHLE *et al*., 2005; PANZELLA *et al*., 2013). The results of our analysis also confirm this. The ratio of (+)-catechin and (–)-epicatechin in the samples of different cultivars varied from 1:4.3 (cultivar Rajka) to 1:21.9 (cultivar Lodel). In the paper by WOJDYŁO *et al*., it is specified that in samples of apples grown in Poland, the amount of (+)-catechin varies from 0.010 to 0.720 mg g^{-1}, and (–)-epicatechin – from 0.066 to 2.760 mg g^{-1} (WOJDYŁO *et al*., 2008)

The amounts of procyanidin B2 and C1 were higher than the amount of procyanidin B1 was in the samples of all analysed cultivars. This predisposition of the quantitative composition variation of these compounds in apples was also presented by other authors (DUDA-CHODAK *et al*., 2011). The ratio of procyanidin B1, B2 and C1 amounts in samples of different cultivars varied from 1:5.4:3.4 (cultivar Aldas) to 1:13.8:7.9 (cultivar Auksis). The quantitative composition of flavan-3-ol group compounds identified in apple samples is presented in Table 5.

Qualitative and quantitative analyses of dihydrochalcone group compounds are extremely important because the compounds of this group may be selected as chemotaxonomic indicators in apple cultivar taxonomy, for apple product identification and for the determination of apple juice and cider quality (SCHIEBER *et al*., 2001; ALONSO-SALCES *et al*., 2004; GOSCH *et al*., 2010). The amount of dihydrochalcone phloridzin in the apple samples of the analysed cultivars varied from 0.101 mg g^{-1} (cultivar Rajka) to 0.268 mg g^{-1} (cultivar Lodel) (Table 5). Similar results were presented by other authors as well-the amount of phloridzin in apple fruit comprises 2-6% of the total amount of quantified phenolic compounds (SANONER *et al*., 1999)

The highest amount of chlorogenic acid (3.074 mg g^{-1}) was determined in the apple samples of the cultivar Aldas. It was 4.99 times higher than the lowest determined amount of this acid (0.616 mg g^{-1}), determined in the apple samples of the cultivar Rajka (Table 6). WOJDYŁO *et al*. analysed the apple samples of apples grown in Poland and indicated similar amounts (0.015-2.960 mg g^{-1}) of this acid (WOJDYŁO *et al*., 2008).

Table 4. Quercetin glycoside quantitative variation in apple samples.

Substance	Quercetin glycoside amount (mg g^{-1}, dry raw material)						Coefficient of variation, %
	Aldas	Auksis	Connel Red	Ligol	Lodel	Rajka	
Hyperoside	0.274±0.005^{a}	0.138±0.002^{c,d}	0.152±0.003^{c}	0.129±0.002^{d}	0.154±0.003^{c}	0.184±0.004^{b}	31.10
Isoquercitrin	0.053±0.002^{a}	0.020±0.001^{c,d}	0.047±0.002^{a,b}	0.025±0.001^{c}	0.016±0.001^{d}	0.044±0.002^{b}	45.92
Rutin	0.036±0.001^{a}	0.015±0.001^{b,c}	0.030±0.002^{a}	0.022±0.001^{b}	0.013±0.001^{c}	0.035±0.002^{a}	39.69
Avicularin	0.226±0.005^{a}	0.120±0.002^{c}	0.099±0.001^{d,e}	0.087±0.001^{e}	0.114±0.002^{c,d}	0.139±0.003^{b}	38.15
Reynoutrin	0.080±0.003^{a}	0.053±0.002^{b}	0.039±0.001^{c}	0.037±0.001^{c}	0.043±0.001^{c}	0.025±0.001^{d}	40.92
Quercitrin	0.142±0.003^{b}	0.082±0.001^{e}	0.103±0.002^{c,d}	0.120±0.003^{c}	0.098±0.001^{d,e}	0.305±0.007^{a}	58.30

Different letters in the same row indicate statistically significant differences of individual substance amounts in apple samples of analysed cultivars (p<0.05).

Table 5. Flavan-3-ols, chlorogenic acid and phloridzin quantitative variation in apple samples.

Substance	Flavan-3-ols, chlorogenic acid and phloridzin amount (mg g^{-1}, dry raw material)						Coefficient of variation, %
	Aldas	Auksis	Connel Red	Ligol	Lodel	Rajka	
(+)-Catechin	0.092±0.002^{b}	0.077±0.002^{c}	0.034±0.001^{d}	0.033±0.001^{d}	0.042±0.001^{d}	0.121±0.003^{a}	54.26
(–)-Epicatechin	0.720±0.015^{b}	0.448±0.009^{d}	0.315±0.006^{e}	0.311±0.004^{e}	0.928±0.019^{a}	0.525±0.010^{c}	44.86
Procyanidin B1	0.157±0.003^{a}	0.170±0.004^{a}	0.035±0.001^{d}	0.064±0.001^{c}	0.094±0.002^{b}	0.097±0.002^{b}	50.84
Procyanidin B2	0.854±0.017^{c}	0.990±0.021^{b}	0.484±0.007^{e}	0.676±0.014^{d}	1.279±0.023^{a}	0.834±0.015^{c}	31.81
Procyanidin C1	0.534±0.020^{a}	0.366±0.012^{b}	0.275±0.008^{c}	0.258±0.011^{c}	0.576±0.021^{a}	0.249±0.007^{c}	38.56
Phloridzin	0.188±0.004^{b}	0.124±0.002^{d}	0.135±0.002^{d}	0.157±0.003^{c}	0.268±0.005^{a}	0.101±0.002^{e}	36.82
Chlorogenic acid	3.074±0.068^{a}	2.498±0.052^{b}	0.773±0.013^{e}	1.249±0.020^{d}	1.629±0.035^{c}	0.616±0.011^{e}	59.41

Different letters in the same row indicate statistically significant differences of individual substance amounts in apple samples of analysed cultivars (p<0.05).

The study results confirmed the hypothesis of CEYMANN *et al*., that apple cultivars can be classified based on what types of compounds phenolic acids or flavan-3-ols are predominant in the apple samples (CEYMANN *et al*., 2012). The predominant compound in the apple samples of the cultivars Aldas and Auksis was chlorogenic acid, and in the apple samples of other cultivars, it was flavan-3-ol group compounds. The coefficient of variation, which reflects the variation amplitude of every compound, was calculated to evaluate the variation of the quantitative composition of the phenolic compounds in the apple samples of different cultivars. It varied from 31.10% to 59.41% (Tables 5 and 6). The highest calculated coefficient of variation was for chlorogenic acid, and the lowest was for hyperoside.

4. CONCLUSIONS

In this study, we applied RSM for the extraction of flavonoids from lyophilised apples. The results showed that the independent variables (temperature, extraction time and ultrasonic power), and the quadratic terms of temperature and extraction time had a statistically significant effect on the efficacy of apple flavonoid extraction. A second-order (quadratic) polynomial model was employed to optimize flavonoid extraction from lyophilised apple samples. The projected optimal extraction conditions following statistical modelling were as follows: temperature 44.61ºC, extraction time 26.90 min and ultrasonic power 480 W. The experimental yield of flavonoids was 6.58 mg RE g^{-1}, which was close to the predicted yield value of flavonoids 6.69 mg g^{-1}. By applying RSM selected via statistical modelling, it was determined that the apple flavonoid extraction yield was 37.12% higher compared with sample extraction when extraction conditions were selected empirically. Optimised extraction conditions were applied for the HPLC analysis of the apple samples of six cultivars grown in Lithuania. The highest total amount of identified phenolic compounds (6.430 mg g^{-1}) was determined in the apple sample extracts of the cultivar 'Aldas'.

REFERENCES

Alonso-Salces R.M., Herrero C, Barranco A., Berrueta L.A., Gallo B. and Vicente F. 2004. Technological classification of Basque cider apple cultivars according to their polyphenolic profiles by pattern recognition analysis. J. Agric. Food Chem. 52:8006-8016.

Canettieri E.V., de Moraes Rocha G.J., de Carvalho J.A. and de Almeida e Silva J.B. 2007. Optimization of acid hydrolysis from the hemicellulosic fraction of *Eucalyptus grandis* residue using response surface methodology. Bioresour. Technol. 98:422-428.

Ceymann M., Arrigoni E., Schärer H., Nising A.B. and Hurrell R.F. 2012. Identification of apples rich in health-promoting flavan-3-ols and phenolic acids by measuring the polyphenol profile. J. Food Comp. Anal. 26:128-135.

Chen W., Wang W.P., Zhang H.S. and Huang Q. 2012. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of water-soluble polysaccharides from *Boletus edulis* mycelia using response surface methodology. Carbohydr. Poly. 87:614-619.

Cooke M.S., Evans M.D., Dizdaroglu M. and Lunec J. 2003. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. FASEB J. 17:1195-1214.

Duda-Chodak A., Tarko T. and Tuszyński T. 2011. Antioxidant activity of apples-an impact of maturity stage and fruit part. Acta Sci. Pol. Technol. Aliment. 10:443-454.

Duda-Chodak A., Tarko T., Satora P., Sroka P. and Tuszyński T. 2010. The profile of polyphenols and antioxidant properties of selected apple cultivars grown in Poland. J. Fruit Ornam. Plant Res. 18:39-50.

European Pharmacopoeia. 2010. vol. 1, 7th ed. Council of Europe, Strasbourg, France.

FAO. FAO Statistical Database. 2013. Retrieved from http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC (Accessed 23-05-2017).

Gosch C., Halbwirth H. and Stich K. 2010. Phloridzin: biosynthesis, distribution and physiological relevance in plants. Phytochemistry. 71:838-843.

Kahle K., Kraus M. and Richling E. 2005. Polyphenol profiles of apple juices. Mol. Nutr. Food Res. 49:797-806.

Łata B., Przeradzka M. and Binkowska M. 2005. Great differences in antioxidant properties exist between 56 apple cultivars and vegetation seasons. J. Agric. Food Chem. 53:8970-8978.

Liaudanskas M., Viškelis P., Jakštas V., Raudonis R., Kviklys D., Milašius A. and Janulis V. 2014. Application of an optimized HPLC method for the detection of various phenolic compounds in apples from Lithuanian cultivars. J. Chem., 2014:Article ID 542121, 10 pages.

Madamanchi N.R., Vendrov A. and Runge M.S. 2005. Oxidative stress and vascular disease. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 25:29-38.

Marks S.C., Mullen W. and Crozier A. 2007. Flavonoid and chlorogenic acid profiles of English cider apples. J. Sci. Food Agr. 87:719–728.

Muralidhar R.V., Chirumamila R.R., Marchant R. and Nigam P. 2001. A response surface approach for the comparison of lipase production by *Candida cylindracea* using two different carbon sources. Biochem. Eng. J. 9:17-23.

Pandey K.B. and Rizvi S.I. 2009. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. Oxid. Med. Cell Longev. 2:270-278.

Panzella L., Petriccione M., Rega P., Scortichini M., and Napolitano A. 2013. A reappraisal of traditional apple cultivars from Southern Italy as a rich source of phenols with superior antioxidant activity. Food Chem.140:672-679.

Pizzimenti S., Toaldo C., Pettazzoni P., Dianzani M.U. and Barrera G. 2010. The "two-faced" effects of reactive oxygen species and the lipid peroxidation product 4-hydroxyno-nenal in the hallmarks of cancer. Cancers. 2:338-363.

Price K.R., Prosser T., Richetin A.M. and Rhodes M.J.C. 1999. A comparison of the flavonol content and composition in dessert, cooking and cider-making apples; distribution within the fruit and effect of juicing. Food Chem. 66:489-494.

Radojkovic M., Zekovic Z., Jokic S., Vidovic S., Lepojevic Z. and Milosevic S. 2012. Optimization of solid-liquid extraction of antioxidants from black mulberry leaves by response surface methodology. Food Technol. Biotech. 50:167-176.

Reuter S., Gupta S.C., Chaturvedi M.M. and Aggarwal B.B. 2010. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? Free Radic. Biol. Med. 49:1603-1616.

Sanoner P., Guyot S., Marnet N., Molle D. and Drilleau J.F. 1999. Polyphenol profiles of French cider apple varieties (*Malus domestica* sp.). J. Agric. Food Chem. 47:4847-4853.

Schieber A., Keller P. and Carle R. 2001. Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. A. 910:265-273.

Tian Y., Xu Z., Zheng B., and Lo Y.M. 2013. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of pomegranate (*Punica granatum* L.) seed oil. Ultrason. Sonochem. 20:202-208.

Urbonavičiūtė A., Jakštas V., Kornyšova O., Janulis V. and Maruška A. 2006. A. Capillary electrophoretic analysis of flavonoids in single-styled hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq.) ethanol extracts. J. Chromatogr. A. 1112:339-344.

van der Sluis A.A., Dekker M.A., Jager A. and Jongen W.M.F. 2001. Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple:effect of cultivar, harvest year, and storage conditions. J. Agric. Food Chem. 48:3606-3613.

Wojdyło A., Oszmiański J and Laskowski P. 2008. Polyphenolic compounds and antioxidant activity of new and old apple varieties. J. Agric. Food Chem. 56:6520-6530.

Wu J., Gao H., Zhao L., Liao X., Chen F., Wang Z. and Hu X. 2007. Chemical compositional characterization of some apple cultivars. Food Chem. 103:88-93.

Paper Received March 28, 2017 Accepted September 8, 2017

doi: 10.17221/50/2016-HORTSCI

Lower nitrogen nutrition determines higher phenolic content of organic apples

Juozas Lanauskas[1], Darius Kviklys[1], Mindaugas Liaudanskas[2], Valdimaras Janulis[2], Nobertas Uselis[1], Jonas Viškelis[1], Pranas Viškelis[1]

[1]*Institute of Horticulture, Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry, Babtai, Lithuania*

[2]*Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Medical Academy, Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas, Lithuania*

Corresponding author: j.lanauskas@lsdi.lt

Abstract

Lanauskas J., Kviklys D., Liaudanskas M., Janulis V., Uselis N., Viškelis J., Viškelis P. (2017): Lower nitrogen nutrition determines higher phenolic content of organic apples. Hort. Sci. (Prague), 44: 113–119.

Phenolic content of apples from an integrated and organic apple tree orchard was analysed at the Institute of Horticulture of Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry in 2012–2013. Apples of 'Lodel' and 'Aldas' cultivars on rootstock B.396 in 8–9th leaf were tested. Nitrogen and potassium fertilizers were applied annually at the rates of 50 kg/ha N and 66.4 kg/ha K in an integrated fruit orchard. A mixture of perennial grasses with 25% of white clover was sown in interrows in the second year after tree establishment in the organic production system. Every two years sward in alternate interrows was tilled for natural organic matter mineralization. Fertilizers were not used in the organic apple orchard. Organic apples of both cultivars had a higher content of procyanidins B1 and B2, phloridzin, chlorogenic acid, (+)-catechin, and (–)-epicatechin. Organic 'Aldas' apples also contained more hyperoside, avicularin and quercitrin than non-organic apples. On average, the total phenolic content of organic apples of both cultivars was 43% higher than that of apples from the integrated orchard. These differences could be explained by nitrogen nutrition: the N content in organically grown apple leaves was significantly lower than that in leaves from the integrated production system. Tree trunk diameter and yield of organic apple were less, and fruits were better coloured.

Keywords: procyanidins; phloridzin; chlorogenic acid; epicatechin

People who are concerned about healthy lifestyle prefer functional and healthy food products. Fruits that are rich in secondary metabolites can provide adequate nutrition. Polyphenols are some of the most important bioactive components; a direct positive correlation between the phenol content and antioxidative activity has been reported (Matthes, Schmitz-Eiberger 2012). Apples show intermediate values of phenol content (Fu et al. 2011) and are one of the most commonly consumed fruits in the world (Francini, Sebastiani 2013). Fruits of different apple cultivars show significant variation in the content of phenols (Rop et al. 2011; Liaudanskas et al. 2015). According to Kolodziejczyk et al. (2010), the total polyphenol content of apples ranges from 161.9 to 882.4 mg/kg fresh weight. Kviklys et al. (2014) reported the effect of rootstocks on the phenolic content of apples: super-dwarf P 61 and P 22 determined the highest phenolics.

Environmental and orchard management practices also affect the phenolic content of apples. It was found that exposure to the sun significantly increased the content of anthocyanins, quercetin-glycosides, epicatechin, procyanidins, phloridzin and chlorogenic acid in the peel of fruits (Hagen

doi: 10.17221/50/2016-HORTSCI

et al. 2007). The accumulation of phenolic compounds in plants can be negatively affected by excessive N-fertilization (Treutter 2010).

Organically grown products have recently increased in popularity. Organic farming systems offer advantages for nature and society, for example, by preventing environmental and product contamination with synthetic products. Information concerning the fruit phenolic content from organically and conventionally grown apples differs: some experiments have demonstrated an increased amount of phenolic compounds in organically grown apples (Veberic et al. 2005; Mikulic Petkovsek et al. 2010), but other studies have shown no differences (Peck et al. 2009). The aim of this research was to evaluate the phenolic content of apples from integrated and organic apple tree orchards.

MATERIAL AND METHODS

The trial was conducted in the experimental orchard of the Institute of Horticulture (55°60'N; 23°48'E), at the Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry in 2012–2013. The experiment was designed in two adjacent blocks (integrated and organic) with randomly arranged plots (cultivars). Each experimental plot contained four apple trees planted at the distance of 4 × 2 m. Cvs 'Lodel' and 'Aldas' on rootstock B.396 in 8–9th leaf were tested. The experiment was performed in three replicates. The apple trees within blocks were maintained according to integrated or organic production specifications. Sward in interrows and herbicide-applied strips in the rows were maintained in the integrated production system (IPS). Nitrogen (N) and potassium (K) fertilizers were applied annually at the rate of 50 kg N/ha and 66.4 kg K/ha in the IPS. Organic block was certified in accordance with the Council Regulation (EC) No. 834/2007 (No. of Ekoagros certificates SER–K–12–01085 and SER–K–13–01301). In the organic production system (OPS) mixture of perennial grasses with 25% of white clover was sown in interrows in the second year after tree establishment. After two years, sward in every second interrows was tilled for natural organic matter mineralization. Every two years, the same procedures were repeated in alternate interrows. Soil in the strips was cultivated mechanically. Fertilizers were not used in the OPS.

The soil was analysed in the first year of the experiment, in aggregated samples taken from different blocks in tree rows at a depth 0–60 cm (Table 1). Soil pH was determined using 1N KCl potentiometric method, plant available phosphorus, potassium calcium and magnesium by the Egner-Riehm-Domingo A-L method (soil extraction with buffer solution pH 3.7 from lactic and acetic acids and ammonium acetate). Phosphorus was determined with spectrometer Shimadzu UV 1800 and potassium with flame photometer Jenway PFP7. Calcium and magnesium were determined by atomic absorption spectrometer Analyst 200 (Perkin Elmer, USA). Total organic carbon was measured by a dry combustion method by Total Organic Carbon analyzer Liqui TOC II (Elementar Analysen systeme GmbH, Germany). Soil humus was calculated by multiplying the value of total organic carbon by coefficient 1.72.

The soil in the experiment field was Epicalcari-Endohypogleyic Cambisol, heavy clay loam. The orchard was not irrigated. During the vegetation period soil moisture was measured at the depth of 30 cm with irrometers (Irrometer Comp., Inc., USA) in tree row strips. Soil moisture status during vegetation period was the same in both blocks of the experiment and ranged from 16 to 38 centibars.

Each year in late July, random samples of 50 leaves were taken for leaf chemical analyses from the middle part of the shoots. Ten randomly selected fruits from each experimental plot were taken for phenolic analyses.

Leaf nitrogen (N), phosphorus (P), potassium (K), calcium (Ca) and magnesium (Mg) concentration (% dry weight (d.w.)) was established. The content of leaf nitrogen was measured by the Kjeldahl method using Tecator Digestion System DK 20 (VelP Scientifica, Usmate, Italy) and Semi-automatic Distillation Unit UDK139 (VelP Scien-

Table 1. Agrochemical properties of the soil (0–60 cm layer) in integrated and organic apple tree production systems

Sampling place	Nutrient content (mg/kg)				Humus content (%)	pH
	P	K	Ca	Mg		
Integrated orchard	88.9	106.2	6,947	2,564	2.29	7.4
Organic orchard	96.8	102.9	8,197	1,729	1.54	7.4

doi: 10.17221/50/2016-HORTSCI

Table 2. Leaf nutrient content (%) in integrated and organic production systems

Production system		N	P	K	Ca	Mg
'Aldas'						
2012	Integrated	2.21[b]	0.20[a]	0.96[a]	1.28[b]	0.24[a]
	Organic	1.96[a]	0.22[a]	1.32[b]	1.00[a]	0.19[a]
2013	Integrated	2.16[b]	0.29[a]	1.17[a]	1.24[a]	0.24[a]
	Organic	1.98[a]	0.27[a]	1.03[a]	1.25[a]	0.26[a]
'Lodel'						
2012	Integrated	2.13[b]	0.23[a]	1.17[a]	1.05[a]	0.20[a]
	Organic	1.79[a]	0.24[a]	1.34[b]	0.99[a]	1.79[a]
2013	Integrated	2.18[b]	0.20[a]	1.10[a]	1.22[b]	0.22[a]
	Organic	1.65[a]	0.32[b]	1.55[b]	0.79[a]	0.17[a]

different letters in columns indicate significant differences between values for cultivars ($P < 0.05$)

tifica, Usmate, Italy). Phosphorus was determined by spectrometer ICP Optima 2100 (Perkin Elmer, USA), potassium by flame photometry with Jenway PFP7 (Bibby Scien-tific Limited, Staffordshire, UK), and the contents of calcium and magnesium by atomic absorption spectrophotometry (AAnalyst 200; Perkin Elmer precisely, USA).

Preparation of samples. Each apple with the peel was cut into slices and was frozen and lyophilised with a ZIRBUS sublimator 3 × 4 × 5/20 (ZIRBUS technology, Germany) and ground to a fine powder using a Retsch 200 mill (Haan, Germany).

Extraction. Lyophilised apple powder (2.5 g) was mixed with 30 mL ethanol (70%, v/v) and was extracted in a Sonorex Digital 10 P ultrasonic bath (Bandelin Electronic, Germany) for 20 min at 40°C.

Instrumentation and chromatographic conditions. A Waters 2695 (Waters Co., USA) chromatograph equipped with a Waters 2998 photodiode array (PDA) detector was used for HPLC analysis, which was controlled with Empower® v.2.0. software (Waters, Czech Republic). Chromatographic separations were carried out using a YMC-Pack ODS-A (5 µm, C_{18}, 250 × 4.6 mm i.d.) column equipped with a YMC-Triart (3 µm, C_{18}, 10 × 3.0 mm i.d.) precolumn (YMC Europe GmbH, Germany). The volume of the extract under investigation was 10 µl. The flow rate was 1 ml/min, and a gradient elution was performed. The mobile phase consisted of 2% (v/v) acetic acid in water (solvent A) and 100% (v/v) acetonitrile (solvent B). The following conditions of elution were applied: 0–30 min, 3–15% B; 30–45 min, 15–25% B; 45–50 min, 25–50% B; and 50–55 min, 50–95% B.

Detection was simultaneously performed at three wavelengths: 280 nm (dihydrochalcones, catechins, procyanidins), 320 nm (phenolic acids), and 360 nm (quercetin glycosides). All the phenolic compounds were identified by comparing their retention times and spectra (from 200 to 600 nm) with those of standard compounds.

The results were elaborated statistically by one-way analysis of variance for each cultivar and the significance of differences between the means were evaluated using the Duncan's multiple range test at $P < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Different fertilization and orchard floor management revealed differences in apple tree nutrition. N content in organically grown apple leaves was lower than that in leaves from the integrated production system (IPS). The mean decrease in N content of cv. 'Aldas' leaves was about 10% and in 'Lodel' leaves it was 20% (Table 2). Leaf K content for cv. 'Lodel' was higher in the OPS. The soil K content was similar for both production systems. The increased K content in organically grown tree leaves might be due to N deficiency or lower yield (Fiedler 1970). A higher calcium (Ca) content in cv. 'Aldas' leaves was observed in 2012 and in cv. 'Lodel' in 2013 in the IPS. The content of Ca in the soil was high in both production systems (Table 1).

Trunk diameter indicates that apple trees of both cultivars were less vigorous in OPS (Table 3). The yield of organic cv. 'Aldas' was lower by 30% and cv. 'Lodel' by 43%. Fruit weight of organic 'Lodel' apples was about 15% less than in IPS. Organic 'Lodel' apples were better coloured in both years, 'Aldas' in one year of the experiment.

doi: 10.17221/50/2016-HORTSCI

Table 3. Growth and yield parameters of integrated and organic 'Aldas' and 'Lodel' apples

Production system		Trunk diameter (cm)	Yield (kg/tree)	Fruit weight (g)	Red blush (%)
'Aldas'					
2012	Integrated	–	11.2[b]	185[a]	60[a]
	Organic	–	7.4[a]	172[a]	74[b]
2013	Integrated	9.6[b]	13.8[b]	180[a]	70[a]
	Organic	8.7[a]	10.1[a]	169[a]	78[a]
'Lodel'					
2012	Integrated	–	18.3[b]	130[b]	78[a]
	Organic	–	11.2[a]	112[a]	90[b]
2013	Integrated	7.5b	23.1[b]	124[b]	82[a]
	Organic	6.4[a]	12.3[a]	105[a]	100[b]

different letters in columns indicate significant differences between the values from separate years for cultivars ($P < 0.05$)

The content of hyperoside in organically grown 'Aldas' apples was 25–62% higher than that in the IPS (Table 4). For cv. 'Lodel', no significant differences were observed. In 2012, the content of isoquercitrin was higher in organic 'Aldas' apples than in fruits from the integrated orchard. In 'Lodel' fruits the trend was opposite. The content of rutin was higher in 'Lodel' apples in the integrated system in one year of the experiment. Organic 'Aldas' fruit had a higher content of avicularin and quercitrin than apples from the integrated orchard 37–48% and 30–40%, respectively. Production system had no effect on the content of latter glycosides in 'Lodel' apples. The total quercetin glycoside content in organic 'Aldas' fruit was 31–46% higher than in non-organic apples. 'Lodel' apples from both production systems contained a similar amount of quercetin glycosides.

No differences were observed in the content of (+)-catechin between tested production systems in the first year (Table 5). In the second year of the experiment, the content of (+)-catechin in apples of both cultivars was 52–58% higher in organic apples than in non-organic apples. The content of (–)-epicatechin was higher in organic apples in both years and for cv. 'Aldas', the increase was 18–35%. Extremely large differences were observed in 'Lodel' apples in the first year of the experiment. Organic apples contained 2.8-fold more (–)-epicatechin than apples from the integrated orchard. (–)-Epicatechin was predominant and determined differences of total content of catechins. In organic 'Aldas' apples, the content of total catechins increased by 16–38%, and in 'Lodel' – by 49–149%.

In organic 'Aldas' apples, the content of procyanidin B1 was 39–49% higher than that in the IPS (Ta-

Table 4. Content of quercetin glycosides (μg/g of dry weight) in 'Aldas' and 'Lodel' apples from integrated and organic production systems

Production system		Hyperoside	Isoquercitrin	Rutin	Avicularin	Quercitrin
'Aldas'						
2012	Integrated	138.2[a]	23.0[a]	15.4[a]	153.3[a]	108.9[a]
	Organic	224.4[b]	32.6[b]	15.8[a]	226.3[b]	141.6[b]
2013	Integrated	190.0[a]	33.6[a]	15.9[a]	164.0[a]	149.9[a]
	Organic	237.2[b]	40.4[a]	14.8[a]	224.5[b]	209.2[b]
'Lodel'						
2012	Integrated	148.1[a]	28.6[b]	50.8[b]	100.0[a]	98.8[a]
	Organic	151.8[a]	12.6[a]	16.0[a]	114.4[a]	97.8[a]
2013	Integrated	147.3[a]	27.1[a]	21.6[a]	114.3[a]	114.7[a]
	Organic	153.4[a]	22.4[a]	15.1[a]	111.8[a]	108.3[a]

different letters in columns indicate significant differences between the values from separate years for cultivars ($P < 0.05$)

doi: 10.17221/50/2016-HORTSCI

Table 5. Content of catechins (μg/g of dry weight) in 'Aldas' and 'Lodel' apples from integrated and organic production systems

Production system		(+)-Catechin	(–)-Epicatechin
'Aldas'			
2012	Integrated	90.5[a]	611.2[a]
	Organic	92.1[a]	720.3[b]
2013	Integrated	144.4[a]	545.5[a]
	Organic	218.8[b]	736.7[b]
'Lodel'			
2012	Integrated	54.3[a]	335.0[a]
	Organic	42.3[a]	928.4[b]
2013	Integrated	99.1[a]	659.1[a]
	Organic	156.3[b]	974.1[b]

different letters in columns indicate significant differences between the values from separate years for cultivars ($P < 0.05$)

ble 6) and the content of procyanidin B1 in organic 'Lodel' apples was 2.4-fold higher. The content of procyanidin B2 in organic apples was 32–54% and 22–182% higher, respectively, for 'Aldas' and 'Lodel' cultivars. Because procyanidin B2 was predominant, the differences in the total content of procyanidins were similar to those in procyanidin B2. The mean phloridzin content was 25 and 54% higher for organic 'Aldas' and 'Lodel' apples, respectively. Chlorogenic acid was the predominant phenolic compound and its content was on average 24 and 76% higher for organic 'Aldas' and 'Lodel' apples.

The mean total phenolic content of organic 'Aldas' apples increased by 30% and 'Lodel' by 63% compared to apples from the integrated orchard (Fig. 1).

The results demonstrate that the farming system had a significant effect on the phenolic content of apples. The contents of (–)-epicatechin and procyanidin B2 in organic 'Lodel' fruits harvested in 2012 was 2.8-fold higher than in fruits produced in the integrated system and the mean content of procyanidin B1 in organic 'Lodel' apples was 2.4-fold higher. In a similar experiment, Vanzo et al. (2013) observed a higher total phenolic content in organic Golden Delicious apples, whereas differences in other three cultivars were not significant. In our study, the mean total phenolic content increased significantly in both tested cultivars. The differences were observed in the accumulation of quercetin glycosides between 'Aldas' and 'Lodel' cvs. Organic 'Aldas' apples contained more hyperoside, avicularin and quercitrin than apples in the integrated system, but the content of the latter constituents was similar in 'Lodel' fruits from both production systems. The content of isoquercitrin and rutin was higher in 'Lodel' apples from the integrated system than in organic apples.

Organic apples also contained a higher level of total phenolics than integrated or conventional apples in other trials (Hecke et al. 2006; Bogs et al. 2012). The cultivation type had an important influence on the polyphenolic level and antioxidant capacity of the apple fruits and leaves. Organic apples contained higher concentrations of hydroxycinnamic acids, flavanols, dihydrochalcones, querce-

Table 6. Content of the procyanidins, phloridzin and chlorogenic acid (μg/g of dry weight) in 'Aldas' and 'Lodel' apples from integrated and organic production systems

Production system		Procyanidin B1	Procyanidin B2	Phloridzin	Chlorogenic acid
'Aldas'					
2012	Integrated	113.2[a]	645.7[a]	151.0[a]	2,745.1[a]
	Organic	156.9[b]	854.3[b]	187.9[b]	3,274.4[b]
2013	Integrated	111.3[a]	791.0[a]	150.2[a]	2314.7[a]
	Organic	165.4[b]	1219.4[b]	189.5[b]	3018.9[b]
'Lodel'					
2012	Integrated	37.6[a]	453.3[a]	131.2[a]	709.2[a]
	Organic	94.0[b]	1,278.6[b]	268.2[b]	1629.5[b]
2013	Integrated	54.6[a]	1,316.2[a]	213.0[a]	1270.8[a]
	Organic	125.6[b]	1,606.9[b]	260.4[b]	1859.1[b]

different letters in columns indicate significant differences between the values from separate years for cultivars ($P < 0.05$)

doi: 10.17221/50/2016-HORTSCI

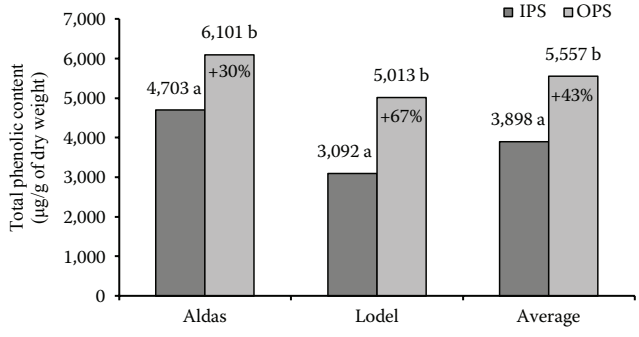


Fig. 1. Total phenolic content in 'Aldas' and 'Lodel' apples from integrated (IPS) and organic (OPS) production systems
different letters in column pairs indicate significant differences between the values ($P < 0.05$)

tins and total phenolics than apples from integrated cultivation (Mikulic Petkovsek et al. 2010).

Some studies have demonstrated no differences in the total phenolic content or in the classes of polyphenols between apples produced by organic and conventional/integrated methods (Briviba et al. 2007; Peck et al. 2009; Valavanidis et al. 2009).

In terms of why the results differ, the organic farming method itself should Wnot cause phenolic accumulation in fruits, which is instead, probably due to the impact of a distinctive aspect of the OPS. According to Veberic et al. (2005) the higher concentration of phenolic compounds in organically grown cultivars might represent a response of the plant to stress. In our experiment, such a stress factor was apparently N nutrition, because apple trees in the OPS were not supplied with additional N. Furthermore, the soil in the organic orchard had lower humus content. This led to deficient N nutrition of fruit trees. An inadequate apple tree supply with the nitrogen in OPS was confirmed by weaker tree growth, lower yield, fruit weight and better fruit colour. According to Stracke et al. (2009), organic fertilizers used in organic farming contain less-available forms of N; therefore, depending on the orchard, soil properties and fertilization practices, organically grown fruit trees might suffer from N deficiency.

Apple trees respond to a high N-supply by increased shoot growth and the reduced accumulation of total phenolic compounds in their leaves (Leser, Treutter 2005). The application of N might cause a decrease in the content of some phenolics and in the percentage of blush skin of apples (Awad, De Jager 2002).

Organic apples that contain a high phenolic content offer additional advantages to consumers, but this might not be beneficial for the fruit grower, as N deficiency usually results in smaller fruits and lower yields.

References

Awad M.A., De Jager A. (2002): Relationships between fruit nutrients and concentrations of flavonoids and chlorogenic acid in 'Elstar' apple skin. Scientia Horticulturae, 92: 265–276.

Bogs J., Bunning M., Stushnoff C. (2012): Influence of biologically enhanced organic production on antioxidant and sensory qualities of (*Malus* × domestica Borkh. cv Braeburn) apples. Organic Agriculture, 2: 117–126.

Briviba K., Stracke B.A., Rufer C.E., Watzl B., Weibel F.P., Bub A. (2007): Effect of consumption of organically and conventionally produced apples on antioxidant activity and DNA damage in humans. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55: 7716–7721.

Fiedler W. (1970): Listovoj Analiz v Plodovodstvie. Moscow, Kolos.

Francini A., Sebastiani L. (2013): Phenolic Compounds in Apple (*Malus* × *domestica* Borkh.): Compounds characterization and stability during postharvest and after processing. Antioxidants, 2: 181–193.

Fu L., Xu B.T., Xu X.R., Gan R.Y., Zhang Y., Xia E.Q., Li H.B. (2011): Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. Food Chemistry, 129: 345–350.

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: 1–10.

Hecke K, Herbinger K, Veberic R, Trobec M, Toplak H, Stampar F, Keppel H, Grill D. (2006): Sugar-, acid- and phenol contents in apple cultivars from organic and integrated fruit cultivation. European Journal of Clinical Nutrition, 60: 1136–1140.

doi: 10.17221/50/2016-HORTSCI

Kolodziejczyk K., Milala J., Sojka M., Kosmala M., Markowski J. (2010): Polyphenol oxidase activity in selected apple cultivars. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research, 18: 51–62.

Kviklys D., Liaudanskas M., Janulis V., Viškelis P., Rubinskienė M., Lanauskas J., Uselis N. (2014): Rootstock genotype determines phenol content in apple fruits. Plant, Soil and Environment, 60: 234–240.

Leser C., Treutter D. (2005): Effects of nitrogen supply on growth, contents of phenolic compounds and pathogen (scab) resistance of apple trees. Physiologia Plantarum, 123: 49–56.

Liaudanskas M., Viškelis P., Kviklys D., Raudonis R., Janulis V. (2015): A comparative study of phenolic content in apple fruits. International Journal of Food Properties, 18: 945–953.

Matthes A., Schmitz-Eiberger M. (2012): Polyphenol content and antioxidant capacity of apple fruit: effect of cultivar and storage conditions. Journal of Applied Botany and Food Quality, 82: 152–157.

Mikulic Petkovsek M., Slatnar A., Stampar F., Veberic R. (2010): The influence of organic/integrated production on the content of phenolic compounds in apple leaves and fruits in four different varieties over a 2-year period. Journal of the Science of Food and Agriculture, 90: 2366–2378.

Peck G.M., Merwin I.A., Watkins C.B., Chapman K.W., Padilla-Zakour O.I. (2009): Maturity and quality of 'Liberty' apple fruit under integrated and organic fruit production systems are similar. HortScience, 44: 1382–1389.

Rop O., Jurikova T., Sochor J., Mlcek J., Kramarova D. (2011): Antioxidant capacity, scavenging radical activity and selected chemical composition of native apple cultivars from Central Europe. Journal of Food Quality, 34: 187–194.

Stracke B.A., Rufer C.E., Weibel F.P., Bub A., Watzl B. (2009): Three-year comparison of the polyphenol contents and antioxidant capacities in organically and conventionally produced apples (*Malus domestica* Bork. cultivar 'Golden Delicious'). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57: 4598–4605.

Treutter D. (2010): Managing phenol contents in crop plants by phytochemical farming and breeding – visions and constraints. International Journal of Molecular Sciences, 11: 807–857.

Valavanidis A., Vlachogianni T., Psomas A., Zovoili A., Siatis V. (2009): Polyphenolic profile and antioxidant activity of five apple cultivars grown under organic and conventional agricultural practices. International Journal of Food Science and Technology, 44: 1167–1175.

Vanzo A., Jenko M., Vrhovsek U., Stopar M. (2013): Metabolomic profiling and sensorial quality of 'Golden Delicious', 'Liberty', 'Santana', and 'Topaz' Apples grown using organic and integrated production systems. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61: 6580–6587.

Veberic R., Trobec M., Herbinger K., Hofer M., Grill D., Stampar F. (2005): Phenolic compounds in some apple (*Malus domestica* Borkh) cultivars of organic and integrated production. Journal of the Science of Food and Agriculture, 85: 1687–1694.

Received for publication March 3, 2016
Accepted after corrections September 23, 2016

Phenolic Profiles and Contribution of Individual Compounds to Antioxidant Activity of Apple Powders

Lina Raudone, Raimondas Raudonis, Mindaugas Liaudanskas, Jonas Viskelis, Audrius Pukalskas, and Valdimaras Janulis

Abstract: Apples (*Malus domestica* L.) are the most common source of phenolic compounds in northern European diet. Besides pectins, dietary fibers, vitamins, and oligosaccharides they contain phenolic compounds of different classes. Apple powders are convenient functional forms retaining significant amounts of phenolic antioxidants. In this study reducing and radical scavenging profiles of freeze-dried powders of "Aldas," "Auksis," "Connel Red," "Ligol," "Lodel," and "Rajka" were determined and phenolic constituents were identified using ultra high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole and time-of-flight mass spectrometers. A negative ionization mode was applied and seventeen compounds: phenolic acids (coumaroylquinic, chlorogenic), flavonoids (quercetin derivatives), and procyanidin derivatives (B1, B2, and C1) were identified in all tested apple samples. Total values of Trolox equivalents varied from 7.72 ± 0.32 up to 20.02 ± 0.52 and from 11.10 ± 0.57 up to 21.42 ± 0.75 μmol/g of dry weight of apple powder in FRAP (ferric reducing antioxidant power) and ABTS (2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) postcolumn assays, respectively. The greatest Trolox equivalent values were determined for apples of "Aldas" cultivar. Chlorogenic acid and procyanidin C1 were the most significant contributors to total reducing and radical scavenging activity in all apple cultivars tested, therefore they could be considered as markers of antioxidant activity.

Keywords: apples, antioxidant activity, phenolic compounds, postcolumn reaction, UPLC–QTOF–MS

Practical Application: The research presents combined methods for the identification and structure elucidation of bioactive compounds in apple powders possessing reducing and radical scavenging properties. The assays could be applied in quality control and defining markers of antioxidant activity of apple products. Qualitatively prepared apple powders with determined antioxidant profile could be applied in the production of smart and innovative pharmaceutical or functional food ingredients.

Introduction

Scientific interest in natural antioxidants has been growing as natural food supplements are becoming more widely applied in the food and pharmaceutical industries (Erkan and others 2008). Oxidative stress takes part in the pathogenesis of many autoimmune, neurodegenerative, tumor and, especially, ageing processes. Antioxidants are able to protect the human body from free radicals and stop the progression of numerous chronic diseases (Stevenson and Hurst 2007). A group of compounds that gained scientific attention due to antioxidant properties and effects on human health are phenolic compounds. Phenolic compounds, rich in hydroxyl groups, are among the most effective compounds disturbing the oxidation processes and atherogenesis at the same time (Aviram 2003). Thus, multifunctional plant extracts can be considered as components of functional ingredients.

Apples are the most common source of phenolic compounds in northern European diets (Duda-Chodak and others 2010; Carbone and others 2011). They are well-balanced fruits containing pectins, dietary fibers, vitamins, oligosaccharides, and phenolic compounds of different classes (Figuerola and others 2005; Hyson 2011). The main factor determining the amount of bioactive compounds is the apple cultivar (Gerhauser 2008; Huber and others 2009; Duda-Chodak and others 2010). Scientific research has shown significant differences and intraspecific variations of the phenolic complex in different apple cultivars (Minnocci and others 2010; Ceymann and others 2012; Serra and others 2012). Various studies have identified and determined notable amounts of flavonols (quercetin and isorhamnetin glycosides), dihydrochalcones (phloretin glycosides), flavan-3-ols (catechins and procyanidins), anthocyanins (cyanidin glycosides), and phenolic acids in different apple cultivars and apple products (Gerhauser 2008; Duda-Chodak and others 2010; Minnocci and others 2010; Ceymann and others 2012; Serra and others 2012). Freeze-drying or lyophilization is a superior drying method (Ciurzyńska and Lenart 2011; Bhandari 2013) with advantages to retain original structure, colors and notable amounts of biologically active components without disturbing the antioxidants (Ratti 2013). Freeze dried products can be milled to powders which are easy to preserve, transport, store, and use as ingredients. Ingredient powders can be rehydrated and further processed to produce certain products (Bhandari 2013). Fruit powders possess many potential applications—volume replacement, thickening or texturizing, serving as natural antioxidants on lipid oxidation preservation

MS 20151555 Submitted 9/15/2015, Accepted 2/18/2016. *Authors Raudone, Raudonis, Liaudanskas, and Janulis are with Dept. of Pharmacognosy, Lithuanian Univ. of Health Sciences, Eivenių str. 4, LT-50161, Kaunas, Lithuania. Author Viskelis is with Inst. of Horticulture, Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry, Kauno str. 30, LT-54333, Babtai, Kaunas distr., Lithuania. Author Pukalskas is with Dept. of Food Technology, Kaunas Univ. of Technology, Radvilėnų pl. 19, LT-50254, Kaunas, Lithuania. Direct enquiries to the author Raudonė (E-mail: raudone.lina@gmail.com).*

© 2016 Institute of Food Technologists®
doi: 10.1111/1750-3841.13277
Further reproduction without permission is prohibited

Journal of Food Science A Publication of the Institute of Food Technologists

and applicable health promoting properties in the development of functional foods rich in antioxidants and dietary fibers (Figuerola and others 2005; Ciurzyńska and Lenart 2011). Apple powder ingredients with assessed antioxidant activity markers that enables quality control and elucidated quantified antioxidants could be targeted in producing innovative and smart food formulations.

Therefore, it is very important to evaluate the qualitative and quantitative characteristics of phenolic antioxidants in freeze-dried apple powders. High-performance liquid chromatography (HPLC)-FRAP and HPLC-ABTS postcolumn systems were adapted for the first time for the evaluation of reducing and radical scavenging activity of individual compounds of interest present in apples that could be regarded as markers in quality control of apple powders.

Materials and Methods

Chemicals

HPLC-grade acetonitrile was purchased from Sigma-Aldrich GmbH (Buchs, Switzerland). Water was purified using a Crystal E HPLC water purification system (Adrona SIA, Riga, Latvia). Acetic acid, iron(III) chloride hexahydrate, 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ), 2,2′-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), sodium acetate trihydrate and 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) were obtained from Sigma-Aldrich GmbH (Buchs, Switzerland) and ethanol 96% from Stumbras AB (Kaunas, Lithuania). Quercetin-3-O-galactoside (hyperoside), quercetin-3-O-rutinoside (rutin), quercetin-3-O-rhamnoside (quercitrin), phloridzin and chlorogenic acid standards were purchased from Extrasynthese (Genay, France), (+)-catechin and (−)-epicatechin from Fluka (Buchs, Switzerland), and quercetin 3-O-arabinoside (avicularin), and quercetin-3-O-glucoside (isoquercitrin) from Chromadex (Santa Ana, Calif., U.S.A.). Stock standard solutions were prepared at a concentration of 0.5 mg/mL in ethanol and stored at −20 °C.

Plant material and preparation of extracts

The following apple (*Malus domestica* L.) cultivars were included in the study: "Aldas," "Auksis," "Connel Red," "Ligol," "Lodel," and "Rajka." The apples were grown in the experimental orchard at the Institute of Horticulture, Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry, Babtai, Lithuania (Liaudanskas and others, 2014). Apples were chopped, frozen (–35 °C) and lyophilized with a ZIRBUS sublimator 3×4×5/20 (ZIRBUS technology, Bad Grund, Germany; pressure –0.01 mbar, condenser temperature, – 85 °C). The lyophilized pieces were milled to a powder using a Retsch 200 mill (Haan, Germany) and extracted with 70% ethanol (1:30, v/v), in a Sonorex Digital 10 P ultrasonic bath (Berlin, Germany) for 20 min. All samples were filtered through a membrane filter with a pore size of 0.22 μm (Karlsruhe, Germany).

UPLC-QTOF-MS analysis

Analysis was performed using Waters Aquity UPLC system with PDA detector (Waters, Milford, Mass., U.S.A.). Waters Aquity HSS T3 column was used for compound separation. Eluent A – 2% acetic acid, and B – acetonitrile. The gradient was formed as follows: 0 to 1 min 88% A, 1 to 8 min 88% to 70% A, 8 to 9 min 70% to 90% A, 9 to 10 min 90% A. Eluted compounds were analyzed by MAXIS 4G QTOF mass spectrometer (BRUKER DALTONIK GmbH, Bremen, Germany) equipped with an ESI ionization source. Capillary voltage was maintained at 4000 V. Nitrogen was used as a nebulizing and drying gas, at 2.5 Bar pressure, and 10 l/min flow rate, respectively. Drying gas temperature was maintained 200 °C. MS spectra were recorded in negative mode, in the range from 80 to 1200 m/z. Spectra recording rate was 3 Hz.

On-line analysis of individual antioxidant activity

Analysis was performed using Waters Alliance 2695 system with PDA detector (Waters, Milford, Mass., U.S.A.), equipped with a YMC-Pack ODS-A C18 column, 5 μm, 4.6 × 250 mm (Dinslaken, Germany). Eluent A – 2% acetic acid, and B – acetonitrile. The gradient was formed as follows: 0 to 30 min 97% to 85% A, 30 to 45 min 85% to 75% A, 45 to 50 min 75% to 50% A, 50 to 55 min 50% to 5% A. The flow rate was 1.0 mL/min. The HPLC column and the PEEK (polyether ether ketone) tubing were maintained at 25 °C, using a Waters temperature control module (Waters, Milford, Mass., U.S.A.). The working FRAP and ABTS solutions were prepared according to Raudonis and others (2012). The flow rate of the individual solutions was 0.5 mL/min., delivered by a Beckman 126 HPLC pump (Fullerton, Calif., U.S.A.). The reaction coil was 1.0 mL PEEK tubing, 0.3 × 1500 mm. The FRAP and ABTS postcolumn derivatization chromatograms were registered at 593 and 650 nm respectively, using Waters 2487 detector (Milford). The antioxidant activity of sample compounds was assessed by standard antioxidant Trolox. The antioxidant activity of phenolic compounds was expressed as μmol Trolox equivalent (TE) for 1 g of dry weight (DW) of apple powder using the following formula:

$$TE = c \times V/m \ (\mu\text{mol/g})$$

where c is the the concentration of Trolox established from the calibration curve, μM; V is the the volume of fruit extract, L; m is the weight (precise), g.

Contribution to antioxidant activity of individual compounds (CAA), were calculated using relevant peak areas which correspond to relevant antioxidant activity of sample mixture (Beekwilder and others 2005).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS version 15.0 (Chicago, Ill., U.S.A.) and Microsoft Excel. All determinations were done in triplicate, means and standard errors were calculated. Linear regression model was analyzed. For the suitability of each regression model determination coefficient R^2, Pearson's correlation coefficient and p-value obtained by checking hypothesis on nonlinear regression were used. The Mann–Whitney U test was performed for the hypothesis concerning equality of distributives. Level of significance $\alpha = 0.05$.

Results and Discussion

Qualitatively prepared apple fruit powders should retain all valuable nutraceuticals and phenolics available in fresh apples (Ciurzyńska and Lenart 2011). UPLC-QTOF-MS was applied for the identification of components in the phytochemical profile of fruit powders of selected *M. domestica* L. cultivars. Figure 1 presents the UPLC-QTOF-MS chromatogram of *M. domestica* L. fruits, "Aldas" cultivar. Table 1 represents all of the identified compounds with their UV maximum absorbance, mass after ionization, molecular ion formulas which were compared to literary data (Kahle and others 2005; Mullen and others

Table 1–UPLC-QTOF-MS (negative ionization mode) phenolic compounds of apple cultivars.

No.	Compounds	UPLC-QTOF-MS RT[a] UPLC	[M-H]$^-$	Formula [M-H]$^-$	λ max (nm)	RT HPLC
1	Quinic acid	0.5	191	$C_7H_{11}O_6$		
2	Proanthocyanidin B1	2.2	577	$C_{30}H_{25}O_{12}$	280	14.8
3	(+)-Catechin	2.6	289	$C_{15}H_{13}O_6$	282	18.2
4	Chlorogenic acid	2.7	353	$C_{16}H_{17}O_9$	326	19.5
5	Proanthocyanidin B2	3.4	577	$C_{30}H_{25}O_{12}$	280	21.8
6	(–)-Epicatechin	3.9	289	$C_{15}H_{13}O_6$	282	25.7
7	Coumaroylquinic acid	4.1	337	$C_{16}H_{17}O_8$	311	26.7
8	Proanthocyanidin C1	4.5	865	$C_{45}H_{37}O_{18}$	280	27.6
9	Proanthocyanidin derivative	5	720	$C_{27}H_{45}O_{31}$	280	28.9
11	Quercetin-3-O-rutinoside	6	609	$C_{27}H_{29}O_{16}$	254 354	38.2
12	Quercetin-3-O-galactoside	6.1	463	$C_{21}H_{19}O_{12}$	255 354	38.9
13	Quercetin-3-O-glucoside	6.3	463	$C_{21}H_{19}O_{12}$	255 354	39.6
14	Quercetin pentoside	6.6	433	$C_{20}H_{17}O_{11}$	255 356	41.1
15	Quercetin 3-O-arabinoside	7.0	433	$C_{20}H_{17}O_{11}$	256 356	42.8
16	Unidentified	7.2	455	$C_{19}H_{35}O_{12}$	248 345	43.4
17	Quercetin-3-O-rhamnoside	7.2	447	$C_{21}H_{19}O_{11}$	255 356	43.7
18	Phloretin xyloglucoside	7.4	567	$C_{26}H_{31}O_{14}$	284	45.6
19	Phloridzin	8.1	435	$C_{21}H_{23}O_{10}$	284	46.6

[a]RT, retention time.

2007; Ramirez-Ambrosi and others 2013). Negative ionization mode was applied and seventeen compounds: phenolic acids, flavonoids, procyanidin derivatives were identified in all tested apple samples. Compound 1 gave *m/z* of 191, corresponded to molecular ion formula C7H11O6 and was determined as quinic acid. Procyanidin complex consisted of 4 derivatives, compounds 2, 5, 8, and 9. Procyanidins B1 (2) and B2 (5) gave *m/z* values of 577 [M-H]$^-$, and their identities were confirmed by matching their retention time with reference compounds. Compound 8 was identified as procyanidin trimer with molecular ion formula of C45H37O18 and *m/z* values of 865 [M-H]$^-$. Compound 8 was confirmed to be procyanidin C1 by matching it with reference compound. Compounds 3 and 6 corresponded to molecular ion formula C15H13O6, [M-H]$^-$ of 289, and were confirmed to be (+)-catechin and (–)-epicatechin, respectively, by matching with reference standards. Coumaroylquinic acid (7) gave *m/z* of 337 and molecular ion formula C16H17O8. Flavonoid compounds 11, 12, 13, 14, 15, and 17, consisted of quercetin derivatives. Compounds 11, 12, and 13 gave *m/z* values of 609, 463, 463 and corresponded to a triplet of quercetin-3-O-rutinoside, quercetin-3-O-galactoside, quercetin-3-O-glucoside that is characterictic of certain Rosaceae Juss. species (Raudonė and others 2014). Compounds 14 and 15 gave *m/z* 433, corresponded to formula C20H17O11 and

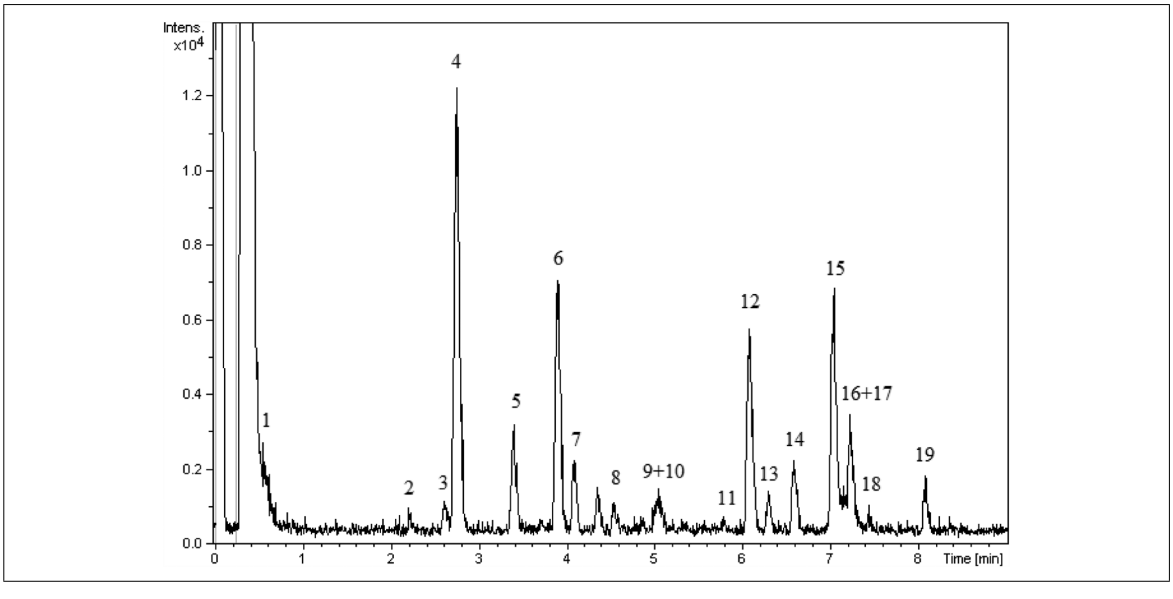


Figure 1–UPLC-QTOF-MS chromatogram of *Malus domestica* L. fruits, "Aldas" cultivar (1 – Quinic acid; 2 – Proanthocyanidin B1; 3 – (+)-Catechin; 4 – Chlorogenic acid; 5 – Procyanidin B2; 6 – (–)-Epicatechin; 7 – Coumaroylquinic acid; 8 – Procyanidin C1; 9 – Procyanidin derivative; 10 – Procyanidin derivative; 11 – Quercetin-3-O-rutinoside; 12 – Quercetin-3-O-galactoside; 13 – Quercetin-3-O-glucoside; 14 – Quercetin pentoside; 15 – Quercetin 3-O-arabinoside; 16 – Unidentified; 17 – Quercetin-3-O-rhamnoside; 18 – Phloretin xyloglucoside; 19 – Phloridzin).

Table 2–Trolox equivalent values (μmol/g of DW) of apple cultivars in FRAP postcolumn assay.

Peak No.	RT[a] min	Compound	*Aldas*	*Auksis*	*Connel Red*	*Ligol*	*Lodel*	*Rajka*
2	17.22	Procyanidin B1	0.47 ± 0.01	0.47 ± 0.02	0.32 ± 0.02	0.16 ± 0.01	0.19 ± 0.06	0.30 ± 0.03
3	21.04	(+)-Catechin	0.52 ± 0.03	0.34 ± 0.02	0.31 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.20 ± 0.06	0.25 ± 0.02
4	21.95	Chlorogenic acid	7.27 ± 0.05	4.57 ± 0.32	3.12 ± 0.20	1.88 ± 0.05	2.60 ± 0.74	1.08 ± 0.11
5	24.64	Procyanidin B2	2.06 ± 0.19	1.72 ± 0.08	2.78 ± 0.12	1.27 ± 0.06	1.99 ± 0.55	1.55 ± 0.18
6	27.34	(–)-Epicatechin	0.21 ± 0.03	0.35 ± 0.03	0.16 ± 0.05	0.12 ± 0.02	0.19 ± 0.08	0.06 ± 0.02
8	28.58	Procyanidin C1	2.33 ± 0.09	1.28 ± 0.11	2.86 ± 0.12	0.80 ± 0.04	1.84 ± 0.53	1.50 ± 0.08
9	30.55	Procyanidin derivative	1.21 ± 0.07	0.81 ± 0.05	1.29 ± 0.24	0.55 ± 0.02	0.98 ± 0.24	0.75 ± 0.06
10	31.93	Procyanidin derivative	0.77 ± 0.08	0.50 ± 0.03	0.74 ± 0.06	0.36 ± 0.01	0.62 ± 0.15	0.50 ± 0.04
11	40.59	Quercetin-3-O-rutinoside	0.18 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.23 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.16 ± 0.02	0.14 ± 0.01
12	41.27	Quercetin-3-O-galactoside	0.45 ± 0.03	0.22 ± 0.03	0.18 ± 0.02	0.20 ± 0.01	0.14 ± 0.06	0.23 ± 0.04
13	41.94	Quercetin-3-O-glucoside	0.09 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.00	0.04 ± 0.02
14	43.32	Quercetin pentoside	0.13 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.02	0.08 ± 0.01
15	45.12	Quercetin 3-O-arabinoside	0.42 ± 0.03	0.17 ± 0.03	0.16 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.13 ± 0.03	0.16 ± 0.19
17	45.75	Quercetin-3-O-rhamnoside	0.18 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.10 ± 0.02	0.41 ± 0.06
Total of all quantified compounds:			20.02 ± 0.52	13.66 ± 0.77	16.07 ± 0.70	7.72 ± 0.32	17.13 ± 2.98	9.40 ± 0.89

[a]RT, retention time.

Table 3–Trolox equivalent values (μmol/g of DW) of apple cultivars in ABTS postcolumn assay.

Peak No.	RT[a] min	Compound	*Aldas*	*Auksis*	*Connel Red*	*Ligol*	*Lodel*	*Rajka*
2	17.10	Procyanidin B1	0.60 ± 0.02	0.64 ± 0.02	0.15 ± 0.06	0.24 ± 0.03	0.29 ± 0.06	0.37 ± 0.02
3	20.90	(+)-Catechin	0.62 ± 0.03	0.39 ± 0.05	0.28 ± 0.03	0.09 ± 0.01	0.25 ± 0.05	0.19 ± 0.01
4	21.82	Chlorogenic acid	6.90 ± 0.15	4.38 ± 0.17	2.99 ± 0.19	2.34 ± 0.16	3.33 ± 0.44	1.15 ± 0.07
5	24.49	Procyanidin B2	2.63 ± 0.06	2.41 ± 0.14	3.47 ± 0.17	2.03 ± 0.14	3.14 ± 0.42	2.23 ± 0.10
6	27.22	(–)-Epicatechin	0.21 ± 0.07	0.32 ± 0.04	0.15 ± 0.04	0.12 ± 0.01	0.13 ± 0.05	0.04 ± 0.01
8	28.43	Procyanidin C1	3.01 ± 0.08	1.71 ± 0.07	3.49 ± 0.25	1.41 ± 0.07	3.14 ± 0.40	2.26 ± 0.05
9	30.39	Procyanidin derivative	1.60 ± 0.04	1.11 ± 0.04	1.71 ± 0.36	0.93 ± 0.05	1.69 ± 0.19	1.14 ± 0.05
10	31.77	Procyanidin derivative	0.95 ± 0.07	0.59 ± 0.03	0.98 ± 0.09	0.56 ± 0.04	1.01 ± 0.12	0.67 ± 0.04
11	40.51	Quercetin-3-O-rutinoside	0.19 ± 0.04	0.17 ± 0.01	0.28 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.16 ± 0.04	0.13 ± 0.02
12	41.19	Quercetin-3-O-galactoside	0.33 ± 0.07	0.18 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.17 ± 0.02	0.17 ± 0.04	0.16 ± 0.03
13	41.87	Quercetin-3-O-glucoside	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.00	0.06 ± 0.16	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.01
14	43.17	Quercetin pentoside	0.17 ± 0.03	0.13 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.11 ± 0.02	0.09 ± 0.01
15	45.06	Quercetin 3-O-arabinoside	0.42 ± 0.07	0.17 ± 0.01	0.16 ± 0.05	0.16 ± 0.01	0.11 ± 0.02	0.15 ± 0.02
17	45.68	Quercetin-3-O-rhamnoside	0.21 ± 0.05	0.07 ± 0.01	0.12 ± 0.04	0.20 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.49 ± 0.05
Total of all quantified compounds:			21.42 ± 0.5	15.51 ± 0.0	18.03 ± 0.9	11.10 ± 0.7	18.27 ± 2.8	12.21 ± 0.8

[a]RT, retention time.

was tentatively identified as quercetin pentosides, and further Compound 15 was confirmed to be quercetin 3-O-arabinoside by matching it with reference compound. Compound 16 was not identified but assumed to be flavonoid derivative and corresponded to molecular ion formula of C19H35O12. Two dihydrochalcone derivatives possessing $[M\text{-}H]^-$ of 547, 435 were tentatively identified as phloretin xyloglucoside (18) and phloridzin (19).

Both postcolumn assays (FRAP and ABTS) (Table 2 and 3) determined compounds with their individual contribution to total activity ranging from 0.01% up to 36.29%. In apple powders of Lithuanian cultivars, chlorogenic acid gave TE values ranging from 1.08 ± 0.11 and 1.15 ± 0.07 μmol/g ("Rajka" cultivar) up to 7.27 ± 0.05 and 6.90 ± 0.15 μmol/g ("Aldas" cultivar Figure 2 and 3) in FRAP and ABTS assays, respectively (Table 2 and 3). The greatest chlorogenic acid CAA values were determined for "Aldas" and "Auksis" cultivars and contributed up to 36% and 33% of total activity, respectively. In the study of Bandoniene ("Boskoop," "Golden Delicious," and "Lobo" cultivars) the assessed radical scavenging activity of chlorogenic acid was in a range of 27% to 40% of total antioxidant activity determined using on-line HPLC-DPPH assay (Bandoniene and Murkovic 2002). Chlorogenic acid was also determined as a significant contributor to coffee beans' antioxidant activity determined by HPLC-ABTS (Stalmach and others 2006). Antioxidant activity of chlorogenic acid may be one of the mechanisms for anticancer, DNA-protective, anti-inflammatory activities (Xu and others 2012). Other identified phenolic acids coumaroylquinic and quinic acids possessed no reducing and radical scavenging activity. This is in agreement with our previous study on Sorbus L. leaves, where the complex of coumaroylquinic acids also showed no antioxidant activity (Raudonė and others 2014).

Various studies confirm, that flavan-3-ols, and especially procyanidins possess high antioxidant activities (Aron and Kennedy 2008; Duda-Chodak and others 2010; Ceymann and others 2012). Structure and amounts of procyanidins have a potent contribution to the positive health effects and display anti-inflammatory, anticarcinogenic, cardioprotective, antimicrobial properties (Wood and others 2002).

(+)-Catechin and (–)-epicatechin, comprised from 1.0% to 2.2% of total antioxidant activity, and procyanidins possessed notable antioxidant activity up to 48.4% and 54.6% of activity in FRAP and ABTS assays, respectively. Scientific data suggest that the degree of polymerization increases antioxidant activity (Wood and others 2002; Karaman and others 2010). Our study determined significantly higher reducing and radical scavenging TE values of procyanidin derivatives compared to (+)-catechin and (–)-epicatechin. In the procyanidin complex procyanidin C1 and procyanidin B2 were determined as predominant compounds with significantly greatest reducing and radical scavenging activity. "Connel Red" cultivar exhibited the highest ($P < 0.05$) TE

values of procyanidin C1 (2.86 ± 0.12 μmol/g and 3.49 ± 0.25 μmol/g for FRAP and ABTS, respectively) and procyanidin B2 (2.78 ± 0.12 μmol/g and 3.47 ± 0.17 μmol/g for FRAP and ABTS, respectively) (Table 2 and 3).

Based on their phenolic profile apple cultivars can be classified into phenolic acid rich and flavan-3-ol rich types (Ceymann and others 2012). In our study regarding antioxidant activity, "Connel Red" (52% and 56% of total activity in FRAP and ABTS assays respectively), "Rajka" (51% and 56% of total activity in FRAP and ABTS assays, respectively), "Lodel" (35% and 53% of total activity in FRAP and ABTS assays, respectively) and "Ligol" (43% and 48% of total activity in FRAP and ABTS assays respectively) cultivars could be assigned to flavan-3-ol type.

In "Aldas" and "Auksis" (Figure 2 and 3; Table 2 and 3) cultivars chlorogenic acid and flavan-3-ols contributed to antioxidant activity on the same extent.

Six quercetin derivatives, (quercetin-3-O-rutinoside, quercetin-3-O-galactoside, quercetin-3-O-glucoside, quercetin pentoside, quercetin-3-O-arabinoside, quercetin-3-O-rhamnoside) had reducing and radical scavenging activity ranging from 0.62 ± 0.03 up to 1.45 ± 0.05 μmol TE/g and from 0.73 ± 0.02 up to 1.38 ± 0.04 μmol TE/g, in FRAP and ABTS assays for "Lodel" and "Aldas" cultivars, respectively.

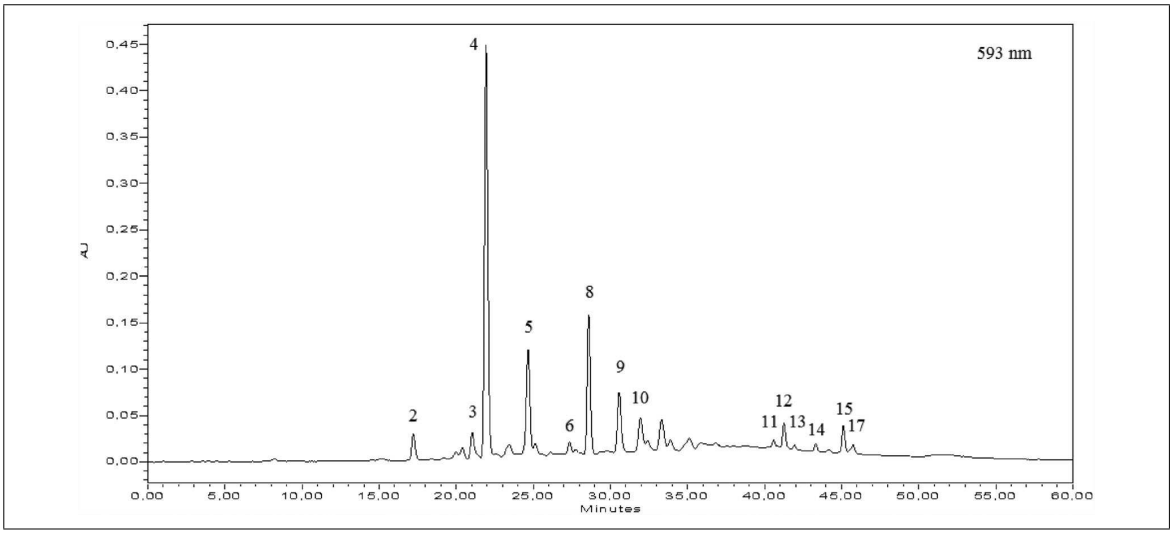


Figure 2–*Malus domestica* L. fruits ("Aldas" cultivar) FRAP postcolumn assay antioxidant profile (2 – Proanthocyanidin B1; 3 – (+)-Catechin; 4 – Chlorogenic acid; 5 – Procyanidin B2; 6 – (–)-Epicatechin; 8 – Procyanidin C1; 9 – Procyanidin derivative; 10 – Procyanidin derivative; 11 – Quercetin-3-O-rutinoside; 12 – Quercetin-3-O-galactoside; 13 – Quercetin-3-O-glucoside; 14 – Quercetin pentoside; 15 – Quercetin 3-O-arabinoside; 17 – Quercetin-3-O-rhamnoside).

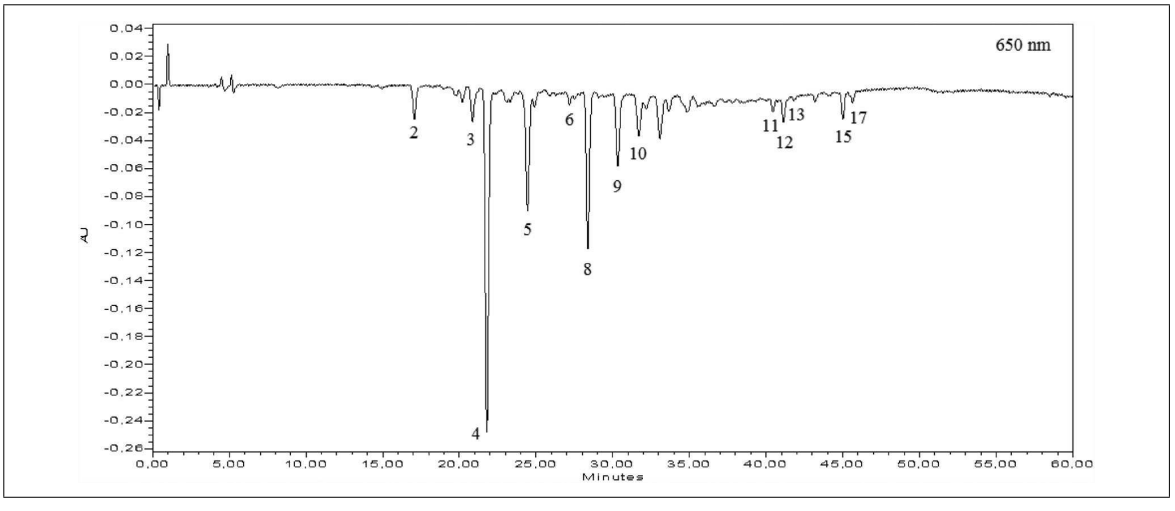


Figure 3–*Malus domestica* L. fruits ("Aldas" cultivar) ABTS postcolumn assay antioxidant profile (2 – Proanthocyanidin B1; 3 – (+)-Catechin; 4 – Chlorogenic acid; 5 – Procyanidin B2; 6 – (–)-Epicatechin; 8 – Procyanidin C1; 9 – Procyanidin derivative; 10 – Procyanidin derivative; 11 – Quercetin-3-O-rutinoside; 12 – Quercetin-3-O-galactoside; 13 – Quercetin-3-O-glucoside; 14 – Quercetin pentoside; 15 – Quercetin 3-O-arabinoside; 17 – Quercetin-3-O-rhamnoside).

The predominant compound in flavonol complex was quercetin-3-O-rhamnoside with significantly greatest TE values (0.41 ± 0.06 μmol/g and 0.49 ± 0.05 μmol/g in FRAP and ABTS assays, respectively) determined for "Rajka" cultivar. Antioxidant activity of quercetin-3-O-rutinoside, quercetin-3-O-galactoside and quercetin-3-O-glucoside showed a predominance of quercetin-3-O-galactoside in all tested apple cultivars. Reducing and radical scavenging activity of other identified flavonol compounds showed specific variation with consistent patterns characteristic to certain cultivar. Overall CAA values of quercetin derivatives were the greatest for "Rajka" cultivar (11% and 8% in, FRAP and ABTS assays, respectively). Radical scavenging activity depends on phytochemical content (Gerhauser 2008). Scientific studies determined higher antioxidant activity in apple peel compared to flesh (Carbone and others 2011). Complex of quercetin glycosides are mainly detected in peel (Gerhauser 2008; Karaman and others 2010; Huber and others 2009; Carbone and others 2011; Francini and Sebastiani 2013), therefore the phenolic rich apple powders should be produced from whole lyophilized apples containing peels.

Antihyperglycemic and antihyperlipidemic activities of apple products are ascribed to phloretin that is hydrolyzed from phloridzin in the small intestine (Shao and others 2008). Phloridzin contribution to antioxidant activity was not significant, while no reducing or radical scavenging activity was also determined for phloretin xyloglucoside (Figure 2 and 3). Bandoniene and Murkovic determined no radical scavenging activity for phloridzin (Bandoniene and Murkovic 2002).

Total values of Trolox equivalents vary from 7.72 ± 0.32 up to 20.02 ± 0.52 and from 11.10 ± 0.57 up to 21.42 ± 0.75 μmol/g in FRAP and ABTS postcolumn assays, respectively. The greatest TE values were determined for apples of "Aldas" cultivar, and lowest for apples of "Ligol" cultivar in both assays tested.

Predominant compounds in all tested apples cultivars were chlorogenic acid, procyanidin C1 and procyanidin B2 (Figure 2 and 3). Regression analysis was performed for the total TE values of apples cultivars and TE values of potential markers of antioxidant activity. Chlorogenic acid ($R^2 = 0.62$, and $R^2 = 0.61$, for FRAP and ABTS assays, respectively) and procyanidin C1 ($R^2 = 0.60$, and $R^2 = 0.61$, for FRAP and ABTS assays, respectively) showed significant ($P < 0.05$) correlations with total reducing and radical scavenging activity.

Qualitative and quantitative composition of phenolic acid in apple fruits strongly depends on cultivar (Lee and others 2003). Various studies have identified chlorogenic, coumaric, coumaroylquinic, caffeic, ferulic, cinnamic, vanillic, gentisic, protochatehuic, gallic acids in apples (Bandoniene and Murkovic 2002; Soares and others 2008; Francini and Sebastiani 2013). Chlorogenic acid is one of the most important cinnamic acid, with notable antioxidant activity that is determined almost in all apple cultivars (Lee and others 2003; Kahle and others 2005; Francini and Sebastiani 2013; Huber and others 2009)

As the phenolic antioxidant composition of the apples of different cultivars can vary considerably, it is important to determine the consistent patterns of antioxidant distribution and to identify dominant compounds further to be used as markers of quality control. Selecting cultivars with the richest phenolic composition and antioxidant power is the first step in the further production of functional foods. "Aldas" and "Auksis" cultivars are Lithuanian heritage cultivars and belong to national genetic resources (Blazyte 2008). New bred cultivars often contain higher amounts of sugars and lower phenolic content (Serra and others 2010), meanwhile heritage cultivars contain higher phenolic concentrations (Huber and others 2009; Serra and others 2010) and are superior for production of health promoting food formulations. High antioxidant power is well correlated with high phytochemical concentration that provides health benefits (Carbone and others 2011). Scientific reports describing apple powder product developments usually determine total antioxidant activities, not revealing the impact of individual compounds (Henriquez and others 2010).

For the comprehensive evaluation of individual antioxidants, HPLC-FRAP (Figure 2) and HPLC-ABTS (Figure 3) postcolumn assays were employed for the determination of antioxidant activity by 2 distinct mechanisms of action. ABTS postcolumn assay determines radical scavenging activities, while FRAP measures the ability of compounds to reduce Fe(III) to Fe(II). Postcolumn antioxidant activity assays are advantageous as at the same time they allow to determine the precise amount of the compound in the sample and to evaluate its antioxidant activity. Moreover, postcolumn reaction can serve as a certain screening of antioxidants, indicating the most potent ones, particularly if they are not predominant in phytochemical profile.

Conclusion

Apple powder of Lithuanian heritage cultivar "Aldas" possessed the greatest total antioxidant activity compared to the other cultivars tested. Chlorogenic acid and complex of procyanidin derivatives could further be used as quality markers of apple products. Qualitatively prepared apple powders with determined phenolic composition could be applied in the production of certain pharmaceutical or functional food ingredients.

Acknowledgments

This work was supported by the grant VP1-3.1-ŠMM-10-V-02-021, Ministry of Education and Science, ESFA, Lithuania.

Author Contributions

Designed the experiments: Valdimaras Janulis, Jonas Viskelis. Performed the experiments: Mindaugas Liaudanskas, Raimondas Raudonis, Audrius Pukalskas. Analyzed and discussed the data: Lina Raudone, Raimondas Raudonis. Wrote the manuscript: Lina Raudone.

References

Aron PM, Kennedy JA. 2008. Flavan-3-ols: nature, occurrence and biological activity. Mol Nutr Food Res 52:79–104.

Aviram M, Fuhrman B. 2003. Effects of flavonoids on the oxidation of low-density lipoprotein and atherosclerosis. In: Rice-Evans CA, Packer L, editors. Flavonoids in health and disease. New York, N.Y.: Marcel Dekker Inc. p 165–205.

Bandoniene D, Murkovic M. 2002. On-line HPLC-DPPH screening method for evaluation of radical scavenging phenols extracted from apples (*Malus domestica* L.). J Agric Food Chem 50:2482–7.

Beekwilder J, Jonker H, Meesters P, Hall RD, Van Der Meer IM, De Vos CHR. 2005. Antioxidants in raspberry: on-line analysis links antioxidant activity to a diversity of individual metabolites. J Agric Food Chem 53:3313–20.

Bhandari B. 2013. Introduction to food powders. In: Bhandari B, Bansal N, Zhang M, Schuck P, editors. Handbook of food powders. Oxford: Woodhead Publishing Limited. p 1–25.

Blazyte A. 2008. Lithuanian national genetic resources. Old Lithuanian fruit-tree cultivars. Akademija: Lietuvos Respublikos Aplinkos Ministerija. UDK 634(474.5).

Carbone K, Giannini B, Picchi V, Lo Scalzo R, Cecchini F. 2011. Phenolic composition and free radical scavenging activity of different apple varieties in relation to the cultivar, tissue type and storage. Food Chem 127:493–500.

Ceymann M, Arrigoni E, Schärer H, Bozzi Nising A, Hurrell RF. 2012. Identification of apples rich in health-promoting flavan-3-ols and phenolic acids by measuring the polyphenol profile. J Food Compos Anal 26:128–35.

Ciurzyńska A, Lenart A. 2011. Freeze-drying—application in food processing and biotechnology—a review. Polish J Food Nutr Sci 61:165–71.

Duda-Chodak A, Tarko T, Satora P, Sroka P, Tuszynski T. 2010. The profile of polyphenols and antioxidant properties of selected apple cultivars grown in Poland. J Fruit Ornam Plant Res 18:39–50.

Erkan N, Ayranci G, Ayranci E. 2008. Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. Food Chem 110:76–82.
Figuerola F, Hurtado ML, Estévez AM, Chiffelle I, Asenjo F. 2005. Fibre concentrates from apple pomace and citrus peel as potential fibre sources for food enrichment. Food Chem 91:395–401.
Francini A, Sebastiani L. 2013. Phenolic compounds in apple (*Malus* x *domestica* Borkh.): compounds characterization and stability during postharvest and after processing. Antioxidants 2:181–93.
Gerhauser C. 2008. Cancer chemopreventive potential of apples, apple juice, and apple components. Planta Med 74:1608–24.
Huber GM, Rupasinghe HPV. 2009. Phenolic profiles and antioxidant properties of apple skin extracts. J Food Sci 74:C693–C700. doi: 10.1111/j.1750-3841.2009.01356.x
Hyson DA. 2011. A comprehensive review of apples and apple components and their relationship to human health. Adv Nutr 2:408–20.
Kahle K, Kraus M, Richling E. 2005. Polyphenol profiles of apple juices. Mol Nutr Food Res 49:797–806.
Karaman Ş, Tütem E, Sözgen Başkan K, Apak R. 2010. Comparison of total antioxidant capacity and phenolic composition of some apple juices with combined HPLC-CUPRAC assay. Food Chem 120:1201–9.
Lee KW, Kim YJ, Kim DO, Lee HJ, Lee CY. 2003. Major phenolics in apple and their contribution to the total antioxidant capacity. J Agric Food Chem 51:6516–20.
Liaudanskas M, Viškelis P, Jakštas V, Raudonis R, Kviklys D, Milašius A, Janulis V. 2014. Application of an optimized HPLC method for the detection of various phenolic compounds in apples from Lithuanian cultivars. J Chem 2014:1–10.
McGhie TK, Hunt M, Barnett LE. 2005. Cultivar and growing region determine the antioxidant polyphenolic concentration and composition of apples grown in New Zealand. J Agric Food Chem 53:3065–70.
Minnocci A, Iacopini P, Martinelli F, Sebastiani L. 2010. Micromorphological, biochemical, and genetic characterization of two ancient, late-bearing apple varieties. Eur J Hortic Sci 75:1–7.
Mullen W, Marks SC, Crozier A. 2007. Evaluation of phenolic compounds in commercial fruit juices and fruit drinks. J Agric Food Chem 55:3148–57.
Ramirez-Ambrosi M, Abad-Garcia B, Viloria-Bernal M, Garmon-Lobato S, Berrueta LA, Gallo B. 2013. A new ultrahigh performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray ionization and quadrupole time-of-flight mass spectrometry analytical strategy for fast analysis and improved characterization of phenolic compounds in apple products. J Chromatogr A 1316:78–91.
Ratti C. 2013. Freeze drying for food powder production. In: Bhandari B, Bansal N, Zhang M, Schuck P, editors. Handbook of food powders. Oxford: Woodhead Publishing Limited. p 57–84.
Raudonė L, Raudonis R, Gaivelytė K, Pukalskas A, Viškelis P, Venskutonis PR, Janulis V. 2014. Phytochemical and antioxidant profiles of leaves from different Sorbus L. species. Nat Prod Res 29:281–5.
Raudonis R, Raudone L, Jakstas V, Janulis V. 2012. Comparative evaluation of post-column free radical scavenging and ferric reducing antioxidant power assays for screening of antioxidants in strawberries. J Chromatogr A 1233:8–15.
Serra AT, Rocha J, Sepodes B, Matias AA, Feliciano RP, De Carvalho A, Bronze MR, Duarte CMM, Figueira ME. 2012. Evaluation of cardiovascular protective effect of different apple varieties—Correlation of response with composition. Food Chem 135:2378–86. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.07.067
Shao X, Bai N, He K, Ho CT, Yang CS, Sang S. 2008. Apple polyphenols, phloretin and phloridzin: new trapping agents of reactive dicarbonyl species. Chem Res Toxicol 21:2042–50.
Soares MC, Ribeiro ÉT, Kuskoski EM, Gonzaga LV, Lima A, Filho JM, Fett R. 2008. Composition of phenolic acids content in apple (*Malus* sp) pomace. Semin Agrar 29:339–48.
Stalmach A, Mullen W, Nagai C, Crozier A. 2006. On-line HPLC analysis of the antioxidant activity of phenolic compounds in brewed, paper-filtered coffee. Brazilian J Plant Physiol 18:253–62.
Stevenson DE, Hurst RD. 2007. Polyphenolic phytochemicals—just antioxidants or much more? Cell Mol Life Sci 64:2900–16.
Wood JE, Senthilmohan ST, Peskin A V. 2002. Antioxidant activity of procyanidin-containing plant extracts at different pHs. Food Chem 77:155–61.
Xu JG, Hu QP, Liu Y. 2012. Antioxidant and DNA-protective activities of chlorogenic acid isomers. J Agric Food Chem 60:11625–30.

LIETUVOS AGRARINIŲ IR MIŠKŲ MOKSLŲ CENTRO FILIALO
SODININKYSTĖS IR DARŽININKYSTĖS INSTITUTO IR
ALEKSANDRO STULGINSKIO UNIVERSITETO MOKSLO DARBAI.
SODININKYSTĖ IR DARŽININKYSTĖ. 2017. 36(1–2).

Vaisių krūvio reguliavimas vaismedžiuose (Apžvalga)

Jonas Viškelis, Darius Kviklys
Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centro filialas Sodininkystės ir daržininkystės institutas, Kauno g. 30, LT-54333 Babtai, Kauno r.,
el. paštas: j.viskelis@lsdi.lt

Vaisių krūvio reguliavimas yra esminis veiksnys, siekiant užauginti optimalaus dydžio ir geros kokybės vaisius. Vaisių krūvis yra kiekybinis parametras, nurodantis vaisių skaičių ant vaismedžio. Šis parametras dažnai išreiškiamas vaisių kiekio ir kamieno skerspjūvio ploto santykiu (vnt./KSP). Vaismedžių žiedų retinimas (vaisių krūvio reguliavimas) užtikrina veislei būdingą potencialų vaisių dydį, nulemtą genetinių bei aplinkos veiksnių. Optimalus vaisių krūvio reguliavimas leidžia išvengti pramečiavimo, užtikrina stabilų derlingumą. Vaisių krūvio reguliavimas yra ekonomiškai naudinga agrotechninė priemonė, kuri garantuoja kasmetinį derlių ir gerą vaisių kokybės ir kiekio santykį, o tai tiesiogiai susiję su pelnu augintojui. Derliaus kokybės tyrimų, susietų su vaisių krūvio reguliavimu, atlikta nemažai, tačiau kaip kokybės parametrai dažnai pasirenkami vartotojams patrauklūs požymiai: vaisiuose esantis cukrų ir rūgščių kiekis, vaisių tvirtumas, spalva. Vaisių krūvio reguliavimo įtaka vaisiuose susikaupiantiems bioaktyviems junginiams taip pat tyrinėta, tačiau tokių mokslinių tyrimų atlikta nedaug, o jų rezultatai prieštaringi. Šioje apžvalgoje įvertinome ir apibendrinome vaisių krūvio reguliavimo tyrimų rezultatus, jų sąsajas su aplinkos veiksniais ir fiziologinių bei biocheminių vaismedžio rodiklių įtaką vaisių kiekiui ir kokybei.

Reikšminiai žodžiai: cheminė sudėtis, obuoliai, vaisių krūvis.

Įvadas. Žemės ūkio produktų rinka vis labiau atsižvelgia į vartotojų poreikius. Sodininkystėje taip pat kilo poreikis valdyti vaisių pateikimo vartotojui procesus, kuriais siekiama optimizuoti kokybę, pateikti vartotojams tam tikrus kokybės rodiklius atitinkančius vaisius. Naminės obels (*Malus* × *domestica* Borkh.) vaisių kokybė priklauso nuo genotipo, genų raiškos pokyčių vaisių augimo ir vystymosi metu, aplinkos klimato sąlygų, agrotechninių priemonių, derliaus nuėmimo laiko, vaisių laikymo sąlygų ir kt. Nuėmus derlių vaisių kokybė nebegerėja, geriausiu atveju pavyksta tik ją išlaikyti, kol obuoliai pasiekia galutinį vartotoją. Siekiant užtikrinti norimą vaisių kokybę, svarbu atsižvelgti į vaismedžių genetinę kilmę, vaisių augimo fiziologijos ir aplinkos veiksnių valdymą. Obuoliai yra vieni labiausiai pasaulyje vartojamų vaisių ne tik dėl maistinių savybių,

bet ir dėl ilgo išsilaikymo laikotarpio. Vartotojų požiūriu desertinių obuolių kokybę labiausiai lemia jų dydis, spalva, aromatas, sveikumas, subalansuotas tirpių sausųjų medžiagų (cukrų ir rūgščių) kiekis. Svarbus obuolių kokybės rodiklis yra fenolinių junginių kiekis ir sudėtis (Liaudanskas ir kt., 2015), jie suteikia obuoliui įvairių skonio savybių, bet sukelia ir oksidacinį rudavimą (Bengoechea et al., 1997).

Vaisių krūvio reguliavimas yra pagrindinė priemonė norimai vaisių kokybei, susijusiai su keliamais rinkos reikalavimais, valdyti. Taigi, informacija apie vaisių krūvio bei derliaus kiekio reguliavimą ir vaisių brandą skynimo metu yra ypač svarbi augintojams, siekiant išlaikyti optimalų derliaus ir norimos vaisių kokybės santykį. Vaisių krūvis, kaip sodų produktyvumo matas, paprastai yra apibrėžiamas atsižvelgiant į vaismedžio užauginamą vaisių kiekį, kuris gali būti išreikštas santykiu tarp vaisių kiekio ir lapų ploto arba kamieno skerspjūvio ploto (KSP) ir vainiko tūrio. Vaisių buvimas (ar nebuvimas) ant daugiamečių vaismedžių turi didelį poveikį šių vaismedžių fotosintezės veiklai ir augimui ateinančiais metais (Byers, 2003).Vaisių krūvio reguliavimo (retinimo) laikas ir intensyvumas, keičiant vaismedžio vaisių ir lapų santykį, yra plačiai tyrinėjamas jau daug metų. Šiais tyrimais siekiama padidinti vaismedžių produktyvumą, išlaikant optimalų vaisių dydį ir kokybę, ir valdyti pakartotinį vaismedžių žydėjimą. Optimizuotas vaisių krūvis, atsižvelgiant į auginamas veisles, sodinimo sistemas, aplinkos veiksnius ir kt., gali padidinti finansinę grąžą vaismedžių augintojams (Treder, 2010).

Taigi, vaismedžių žiedų retinimas yra būtina sąlyga norint subrandinti aukštos kokybės, veislei būdingo dydžio ir spalvos vaisius (Blanke, 2006), turinčius geresnes skonio savybes (cukraus ir rūgščių kiekis bei jų santykis), pakankamai transportabilius ir ilgai išsilaikančius.

Aplinkos veiksniai, darantys įtaką vaisių krūviui. Abiotiniai veiksniai iš esmės daro įtaką vaisių derliui ir kokybei, ypač svarbi yra šviesa ir aplinkos temperatūra. Saulės šviesos kiekis ir vyraujančios temperatūros skiriasi nuo geografinės vietovės klimato sąlygų. Potencialiai didesnį derlių lemiantys veiksniai yra vidutinė aplinkos temperatūra, saulėtų valandų skaičius ir ilgas vegetacijos laikas. Šviesa yra svarbiausias veiksnys, reguliuojantis vaismedžio fotosintetinį potencialą, todėl reguliuojant vaisių krūvį ant medžio reikia atsižvelgti į sodo apšvietimo sąlygas.

Gilios ir šaltos žiemos, pavasario šalnos, žemos pavasario temperatūros turi didelį poveikį būsimam obelų vaisių krūviui, kuris savo ruožtu lemia būsimą derlių. Vaismedžiai yra jautriausi temperatūros pokyčiams žydėjimo ir ankstyvojoje vaisių augimo stadijose (Palmer et al., 2003). Šaltis žydėjimo laikotarpiu gali stipriai pažeisti žiedus ir taip gerokai

sumažinti vaisių derlių. Lakso (1994) ir Warrington su kolegomis (1999) nustatė, kad temperatūros pokyčiai vaisių augimo laikotarpiu, ypač ląstelėms dalijantis tuoj pat po žydėjimo, neigiamai veikia potencialų vaisių dydį.

Streso poveikį obelų augimui ir vystymuisi dėl vandens deficito, kai nepatenkinami vaismedžio vandens poreikiai, gana plačiai tyrė daugelis mokslininkų (Landsberg, Jones, 1981; Jones et al., 1985; Lakso 1994; Behboudian, Mills, 1997). Augaluose vykstantys fiziologiniai procesai, susiję su augimu dalijantis ląstelėms, yra labai jautrūs vandens trūkumui. Vandens deficitas, priklausomai nuo jo dydžio ir trukmės, gali sumažinti žiedų skaičių, vaisių augimo tempą, vaismedžio derlingumą, vaisių kokybę (Lakso, 1994). Vandens stygius vėlesnėse vaismedžio augimo stadijose turi mažesnį neigiamą poveikį vegetatyviniam obelų augimui ir vaisių derliui, tačiau gali slopinti vaisių augimą, dėl to sumažėja patys vaisiai (Behboudian, Mills, 1997).

Vaismedžių augimas ir vaisių dydis bei kiekis taip pat priklauso nuo angliavandenių apykaitos tarp fotosintetinačių lapų bei kitų vegetatyvinių ir generatyvinių augalo organų (Flore, Lakso, 1989; Lakso, 1994). Angliavandenių paskirstymas į augančius vaisius turi didelę reikšmę tolesniam vaisių krūviui ant vaismedžio bei pačių vaisių kokybei. Žiedų retinimas 5–35 % padidina obuolių ląstelių skaičių ir 4–10 % – pačių ląstelių dydį. Asimiliatų tiekimo apribojimas, kai angliavandenių kiekis vaisių vystymosi metu yra nepakankamas (pvz., kai vaisių krūvis yra didelis), skatina negrįžtamą vaisiaus augimo mažėjimą dėl susidariusio mažesnio ląstelių skaičiaus. Tai lemia bendrą vaisių dydžio sumažėjimą ir padidina savaiminio obuolių kritimo nuo vaismedžių riziką. Šie aspektai yra visapusiškai ištirti ir dokumentuoti daugelio mokslininkų (Schneider, 1977; Ferree, Palmer, 1982; Kondo, Takahashi, 1987; Lakso et al., 1989; Byers et al., 1991; Lakso, Corelli-Grappadelli, 1993).

Vaismedžiai formuoja daug žiedų, tačiau vėliau jų negali aprūpinti reikalingomis mitybinėmis medžiagomis iki visiškos vaisių brandos. Sodininkystės praktikoje, siekiant pagerinti vaisių kokybę ir padidinti vaismedžių našumą, dažnai vaismedžiai yra retinami, kai obelys suformuoja perteklinį žiedų kiekį. Optimaliam derliui išauginti obelims yra būtini apie 7 % žiedų (Untiedt, Blanke, 2001). Vaismedžiai dažnai suformuoja per daug vaisių, todėl atsiranda poreikis taikyti efektyvius vaisių krūvio reguliavimo metodus. Vienas vaisių krūvio reguliavimo pranašumų yra tas, jog sumažinamas vaisių kiekis, tačiau tokiu būdu didinamas vidutinis vaisių svoris ir pasiekiama tinkama rinkai aukšta vaisių kokybė (Forshey, Elfving, 1977; Palmer et al., 1997). Kitas vaisių krūvio reguliavimo pranašumas tas, kad skatinama žiedinių pumpurų

indukcija. Tai garantuoja pastovų kasmetį derlių (McArtney et al., 1996; Tromp, 2000; Neilsen, Dennis, 2000; Hampson, Kemp, 2003).Vaisių kiekio mažinimas ant vaismedžio iš esmės didina lapų ploto ir vaisių santykį, todėl daugiau asimiliatų tenka likusiems vaisiams. Vaisių krūvis gali būti reguliuojamas taikant cheminius preparatus (hormoninius augimo reguliatorius) ar retinant rankomis.

Vaisių vystymasis. Reguliuojant vaisių krūvį yra optimizuojamas vaisių dydis, tačiau tai sąlygoja mažesnį kiekybinį derlių. Santykinai mažas vaisių krūvis ant vaismedžio lemia maksimalų veislės ir poskiepio genetiškai nulemtą vaisių dydį.

Norint padidinti vidutinį vaisių dydį, obelų veislėms, vedančioms mažus vaisius, ankstyvas retinimas yra naudingas. Jei užuomazgų skaičius reguliuojamas cheminiu ar rankiniu būdu netrukus po žydėjimo, yra išlaikomas didesnis vaisių krūvis ir nesumažinamas vidutinis vaisių dydis derliaus nuėmimo metu.

Anksti retinant veisles, vedančias didelius vaisius, vaisiai perauga. Dėl subalansuoto retinimo vaisiai vienodžiau vystosi, todėl sumažėja mažų ir didelių vaisių proporcija ant vaismedžio (Link, 2000).

Vaisių užuomazgų kritimas birželio mėn. priklauso nuo pradinio vaisių krūvio ant obels ir gali vykti dėl angliavandenių trūkumo vaisių augimo metu, ypač esant didesniam vaisių krūviui ankstyvajame vaisių raidos etape. Wünsche ir Palmer (1997), atlikdami tyrimą, obelų žiedus išretino palikdami 540, 310 ir 180 vnt. ant vaismedžio. Rezultatai parodė, kad skirtinguose variantuose subrendusių vaisių kiekis ant vaismedžio buvo atitinkamai 340, 260 ir 160 vnt. Nustatyta, jog labiausiai vaisių kiekis sumažėjo esant didžiausiam vaisių krūviui.

Pagrindinius obelų angliavandenių išteklius suvartoja vaisiai, todėl nuo vaisių krūvio, žydėjimo laiko, žiedų padėties ant šakų ir vaismedžio priklauso vaisių augimas (Callesen, 1988; Palmer et al., 1997; Ferree et al., 2000). Mažesnis vaisių krūvis didina angliavandenių prieinamumą, taigi dėl sukaupiamo didesnio tirpių sausųjų medžiagų kiekio didėja vaisių augimo greitis ir vaisių masė (Klages et al., 2001; Greer et al., 2002). Šie vaisių krūvio ir vaisių augimo bei dydžio dėsningumai yra išsamiai aprašyti mokslinėje literatūroje (Assaf et al., 1982; Erf, Proctor, 1987; Forshey, Elfving, 1989; Koike et al., 1990; Jones et al., 1997; Palmer et al., 1997; Wünsche et al., 2000). Vaisių masė skynimo metu paprastai atvirkščiai koreliuoja su vaisių krūviu: masė didžiausia tada, kai vaisių krūvis mažiausias, t. y. kai yra mažiausia konkurencija tarp pačių vaisių, kai yra didžiausias vaismedžio lapų ir vaisių skaičiaus santykis (Hansen, 1969; Palmer et al., 1997). Wünsche ir Palmer (1997), Wünsche ir kitų (2000) atlikti tyrimai parodė, jog dėl žiedų retinimo paliekant mažą vaisių

krūvį ‘Braeburn’ obelų veislės vaisiai buvo 50 % sunkesni, palyginti su vaisiais tų vaismedžių, ant kurių buvo palikta daugiau žiedų.

Vaisių kokybė. Vaisių krūvio įtakos organoleptiniams vaisių kokybės parametrams (tirpių sausųjų medžiagų kiekiui, rūgštingumui ir vaisių tvirtumui) tyrimų rezultatai yra prieštaringi. De Salvador su kolegomis (2006) ir Meland (2009) tyrimai rodo, jog tirpių sausųjų medžiagų kiekio, rūgštingumo ir vaisių minkštimo tvirtumo parametrai didėja didėjant vaismedžio vaisių krūviui. Šiuo tyrimu nustatyti vaisių minkštimo tvirtumo rezultatai sutampa ir su anksčiau atliktų tyrimų rezultatais, kurie rodo, jog vaisiaus minkštimo tvirtumas neigiamai koreliuoja su vidutiniu vaisiaus svoriu (Johnson, 1994). Kitų mokslininkų tyrimai rodo priešingą tendenciją – didelis vaisių krūvis (daugiau negu 10 vaisių/KSP) sąlygojo mažesnį vaisių nusispalvinimą, tvirtumą, rūgštingumą bei mažesnę tirpių sausųjų medžiagų ir krakmolo sintezę (Robinson, Watkins, 2003). Esant dideliam vaisių krūviui, vaisiai gali mažiau nusispalvinti dėl sumažėjusio asimiliatų kiekio, tenkančio kiekvienam vaisiui. Šiai išvadai pritaria ir Wright su kolegomis (2006). Kitų mokslininkų tyrimų rezultatai rodo, jog vaisių krūvio reguliavimas neturi įtakos vaisių kokybės parametrams: vaisių tvirtumui (Castro et al., 2015), tirpių sausųjų medžiagų kiekiui bei rūgštingumui (Radivojevic at al., 2014). Remiantis tokiais prieštaringais rezultatais, galima teigti, kad, norint išauginti optimalų obuolių derlių, svarbiausia yra nustatyti optimalų vaisių krūvį vaismedžiui, atsižvelgiant į veislės ir poskiepio genotipą, geografinės vietovės klimato sąlygas, atskirų metų meteorologines sąlygas, naudojamas technologines priemones ir kt.

Vaisių krūvio reguliavimas turi įtakos besikaupiančio vaisiuose kalcio ir kalio kiekiams, tačiau magnio kiekio vaisiuose reikšmingai neveikia (Ferguson, Watkins, 1992). Pastebėta, jog vaismedžiai, kurių vaisių krūvis mažas, veda didesnius vaisius su mažesniu kalcio, bet didesniu kalio kiekiu. Tai kelia didesnę vaisių fiziologinių pažeidimų, susijusių su kalcio trūkumu, riziką. Ferguson ir Watkins (1992) nustatė, jog vaisiuose, skintuose nuo vaismedžių, kurių vaisių krūvis didelis, kalcio ir kalio santykis buvo didesnis. Yra žinoma, jog dėl didesnio kalio ir mažesnio kalcio kiekio obuoliai anksčiau sunoksta, trumpėja jų laikymosi trukmė.

Fenoliniai junginiai yra naudingi žmogaus organizmui dėl jų antioksidacinių savybių, o obuoliai yra geras šių junginių šaltinis (Eberhardt et al., 2000; Wolfe et al., 2003; Sun, Liu, 2008; Liu et al., 2009). Obuolių minkštime ir odelėje kaupiasi skirtingi fenolinių junginių kiekiai (Raudonė ir kt., 2017). Odelėje fenolinių junginių koncentracija kelis kartus didesnė nei minkštime, taip pat odelėje randama flavonoido kvercetino glikozidų, kurių nėra minkštime (Awad et al., 2000; Wolfe et al., 2003; Chinnici et al., 2004; Łata, Tomala, 2007; Drogoudi et al., 2008).

Nustatyta, kad auginamos vienodomis sąlygomis skirtingų veislių obelys vedė vaisius, kuriuose fenolinių junginių sudėtis buvo itin skirtinga (Lee et al., 2003; Tsao et al., 2003; Łata, Tomala, 2007; Drogoudi et al., 2008; Wojdyło et al., 2008; Vieira et al., 2009). Auginant perdirbti skirtus vaisius, fenolinių junginių kiekį taip pat reikėtų įvertinti. Dėl stiprios fenolinių junginių reakcijos su taninais bei makromolekulėmis, tokiomis kaip baltymai ir polisacharidai, fenoliai skatina nuosėdų susidarymą ir daro įtaką sulčių skaidrumo parametrams (Siebert et al., 1996).

Awad ir kiti (2001b) nustatė, kad tuo atveju, kai vaisių kiekis ant medžio kito nuo 50 iki 200 vnt., chlorogeno rūgšties koncentracija ir bendras flavonoidų kiekis vaisiuose nesiskyrė. Tačiau Stopar ir kiti (2002) nustatė, jog medžio vaisių krūvio mažinimas nuo 157 iki 30 vnt. skatino didesnį bendro polifenolių kiekio kaupimąsi obuoliuose nuo 1 300 iki 1 680 mg kg^{-1}, atitinkamai. Bendro polifenolių kiekio skirtumus vaisiuose sąlygojo sukaupti didesni atskirų junginių – chlorogeno rūgšties, katechino ir epikatechino – kiekiai.

Reguliuojant vaisių krūvį, galima sudaryti tolygesnį visų medžio vaisių apšvietimą. Tai lemia didesnę antocianinų kiekio sintezę vaisiuose (Awad et al., 2000; Jakopic et al., 2009). Saulės apšviestoje vaisiaus vietoje (raudonos spalvos odelė) susikaupia didesni kvercetino ir cianidino glikozidų kiekiai (Arakawa et al., 1999; Awad et al., 2001b, c; Jakopic et al., 2009; Ju et al., 1996; Wang et al., 1997).

Apibendrinimas. Ekonominiu požiūriu intensyviuose soduose užauginamų vaisių dydis patikimai koreliuoja su pelnu, nes vaisių dydis ir spalva yra vieni svarbiausių kriterijų vartotojams. Augintojai visame pasaulyje taiko cheminius ar rankinius žiedų retinimo metodus. Dėl to sumažėja vaismedžio išauginamų vaisių kiekis, tačiau taip išauginti vaisiai yra dideli ir nusispalvinę, todėl patrauklūs vartotojams. Vaismedžiai, kurių vaisių krūvis didelis, išaugina didesnį derliaus kiekį, tačiau vaisiai būna mažesni, sukaupia mažiau tirpių sausųjų medžiagų (cukrų ir rūgščių), yra minkštesni ir mažiau nusispalvinę. Reikėtų pabrėžti, jog vaisių krūvio reguliavimas daro įtaką ne tik cukrų ir rūgščių kiekiui, spalvai ir tvirtumui, bet ir skatina įvairių bioaktyvių junginių sintezę vaisiuose. Tokių tyrimų dar nėra daug, jų rezultatai kartais gana prieštaringi, nes vaisių krūvio reguliavimas gali ir neturėti įtakos konkretiems kokybės parametrams, todėl svarbu kompleksiškai įvertinti ir kitų sode naudojamų biologinių ir technologinių priemonių: veislės, poskiepio, sodinimo atstumų, skynimo laiko ir pan., įtaką. Nepaisant daugelio tyrimų, aiški koreliacija tarp obels vaisių dydžio ir kokybės nenustatyta, todėl augintojams ir mokslininkams, siekiantiems užauginti norimos kokybės vaisius, vis dar kyla naujų aktualių klausimų.

Gauta 2017 04 18
Parengta spausdinti 2017 06 01

Literatūra

1. Arakawa O., Shinoda M., Hiraga M., Wang H. 1999. Comparison of anthocyanin synthesis of true-to-type 'Tsugaru' apple and its red sport strains. The Journal of Horticultural Science & Biotechnology, 74: 738–742.
2. Assaf R., Levin I., Bravdo B. 1982. Apple fruit growth as a measure of irrigation control. HortScience, 17: 59–61.
3. Awad M. A., Jager A. de, Westing L. M. van. 2000. Flavonoid and chlorogenic acid levels in apple fruit: characterisation of variation. Scientia Horticulturae, 83: 249–263.
4. Awad M. A., Jager A. de, Dekker M., Jongen W. M. F. 2001a. Formation of flavonoids and chlorogenic acid in apples as affected by crop load. Scientia Horticulturae, 91: 227–237.
5. Awad M. A., Jager A. de, Plas L. H. W. van der, Krol A. R. van der. 2001b. Flavonoid and chlorogenic acid changes in skin of 'Elstar' and 'Jonagold' apples during development and ripening. Scientia Horticulturae, 90: 69–83.
6. Awad M. A., Wagenmakers P. S., Jager A. de. 2001c. Effects of light on flavonoid and chlorogenic acid levels in the skin of 'Jonagold' apples. Scientia Horticulturae, 88: 289–298.
7. Behboudian M. H., Mills T. M. 1997. Deficit irrigation in deciduous orchards. Horticultural Reviews, 21: 105–131.
8. Bengoechea M. L., Sancho A. I., Bartolome B. 1997. Phenolic composition of industrially manufactured purees and concentrates from peach and apple fruits. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45: 4071–4075.
9. Byers R. E. 2003. Flowering and fruit thinning and vegetative: fruiting balance. In: D. C. Ferree, I. J. Warrington (eds.), Apples: Botany, production and uses. CABI Publishing, Cambridge, MA, 409–436.
10. Byers R. E., Carbaugh D. H., Presley C. N., Wolf T. K. 1991. The influence of low light levels on apple fruit abscission. Journal of Horticultural Science, 66: 1–17.
11. Blanke M. M. 2008. Perspectives of fruit research and apple orchard management in Germany in a changing climate. Acta Horticulturae (ISHS), 769: 441–447.
12. Callesen O. 1988. Effect of flower bud position on fruit set and fruit

size in apple. Tidsskrift for Planteavl, 92: 339–344.
13. Castro D.C., Álvarez N., Gabriel P., Micheloud N., Buyatti M., Gariglio N. 2015. Crop loading studies on ‘caricia’ and ‘eva’ apples grown in a mild winter area. Scientia Agricola, 72(3): 237–244.
14. Chinnici F., Bendini A., Gaiani A., Riponi C. 2004. Radical scavenging activities of peels and pulps from cv. ‘Golden Delicious’ apples as related to their phenolic composition. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52: 4684–4689.
15. Drogoudi P. D., Michailidis Z., Pantelidis G. 2008. Peel and flesh antioxidant content and harvest quality characteristics of seven apple cultivars. Scientia Horticulturae, 115: 149–153.
16. Drogoudi P. D., Pantelidis G. 2011. Effects of position on canopy and harvest time on fruit physico-chemical and antioxidant properties in different apple cultivars. Scientia Horticulturae, 129(4): 752–760.
17. Eberhardt M. V., Lee C. Y., Liu R. H. 2000. Antioxidant activity of fresh apples. Nature, 405: 903–904.
18. Erf J. A., Proctor J. T. A. 1987. Changes in apple leaf water status and vegetative growth as influenced by crop load. Journal of the American Society for Horticultural Science, 112: 617–620.
19. Ferguson I. B., Watkins C. B. 1992. Crop Load Affects Mineral Concentrations and Incidence of Bitter Pit in ‘Cox’s Orange Pippin’ Apple Fruit. Journal of the American Society for Horticultural Science, 117(3): 373–376.
20. Ferree D. C., Bishop B. L., Schupp J. R., Tustin D. S., Cashmore W. M. 2000. Influence of flower type, position in the cluster and spur characteristics on fruit set and growth of apple cultivars. The Journal of Horticultural Science & Biotechnology, 76: 1–8.
21. Ferree D. C., Palmer J. W. 1982. Effect of spur defoliation and ringing during bloom on fruiting, fruit mineral level, and net photosynthesis of ‘Golden Delicious’ apple. Journal of the American Society for Horticultural Science, 107: 1182–1186.
22. Flore J. A., Lakso A. N. 1989. Environmental and physiological regulation of photosynthesis in fruit crops. Horticultural Reviews, 11: 111–157.
23. Forshey C. G., Elfving D. C. 1977. Fruit numbers, fruit size and yield relationships in ‘McIntosh’ apples. Journal of the American Society for Horticultural Science, 102: 399–402.
24. Forshey C. G., Elfving D. C. 1989. The relationship between vegetative growth and fruiting in apple trees. Horticultural Reviews, 11: 229–287.
25. Greer D. H., Wünsche J. N., Halligan E. A. 2002. Influence of postharvest temperatures on leaf gas exchange, carbohydrate reserves

and allocations, subsequent bud break, and fruit yield of 'Braeburn' apple (*Malus domestica*) trees. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 30: 175–185.
26. Hampson C. R., Kemp H. 2003. Characteristics of important commercial apple cultivars. In: D. C. Ferree and I. J. Warrington (eds.), Apples: Botany, production and uses. CABI Publishing, Cambridge, MA, 61–89.
27. Hansen P. 1969. Photosynthesis consumption in fruits in relation to the leaf-fruit ratio and the leaf-fruit position. Physiologia Plantarum, 22: 186–198.
28. Jakopic J., Stampar F., Veberic R. 2009. The influence of exposure to light on the phenolic content of 'Fuji' apple. Scientia Horticulturae, 123: 234–239.
29. Johnson D. S. 1994. Influence of time and flower and fruit thinning on the firmness of 'Cox's Orange Pippin' apples at harvest and after storage. The Journal of Horticultural Science, 69:197–203.
30. Jones H. G., Lakso A. N., Syvertsen J. P. 1985. Physiological control of water status in temperate and subtropical fruit trees. Horticultural Reviews, 7: 301–344.
31. Jones K. M., Bound S. A., Drummers C. R., Oakford M. J. 1997. Preliminary examination of thinning strategies on young 'Jonagold' and 'Pink Lady' apples. Australian Journal of Experimental Agriculture. 37: 377–382.
32. Ju Z., Yuan Y., Liu C., Zhan S., Wang M. 1996. Relationships among simple phenol, flavonoid and anthocyanin in apple fruit peel at harvest and scald susceptibility. Postharvest Biology and Technology, 8: 83–93.
33. Klages K., Donnison H., Wünsche J. N., Boldingh H. 2001. Diurnal changes in non-structural carbohydrates in leaves, phloem exudate and fruit in 'Braeburn' apple. Australian Journal of Plant Physiology, 28: 131–139.
34. Koike H., Yoshizawa S., Tsukahara K. 1990. Optimum crop load and dry weight partitioning in 'Fuji'/M.26 apple trees. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 58: 827–834.
35. Kondo S., Takahashi Y. 1987. Effects of high temperature in the nighttime and shading in the daytime on the early drop of apple fruit 'Starking Delicious'. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 56: 142–150.
36. Lakso A. N. 1994. Apple. In: B. S. Schaffer and P. C. Andersen (eds.), Handbook of environmental physiology of fruit crops. Vol. 1. CRC Press, Boca Raton, FL, 3–42.

37. Lakso A. N., Corelli-Grappadelli L. 1993. Implications of pruning and training practices to carbon partitioning and fruit development in apple. Acta Horticulturae, 332: 231–240.
38. Lakso A. N., Robinson T. L., Pool R. M. 1989. Canopy microclimate effects on patterns of fruiting and fruit development in apples and grapes. In: C. J. Wright (ed.), Manipulation of fruiting. Butterworths, London, 263–274.
39. Landsberg J. J., Jones H. G. 1981. Apple orchards. In: T. T. Kozlowski (ed.), Water deficit and plant growth. Academic Press, New York, 419–469.
40. Łata B., Tomala K. 2007. Apple peel as a contributor to whole fruit quantity of potentially healthful bioactive compounds. Cultivar and year implication. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55: 10795–10802.
41. Lee K. W., Kim Y. J., Kim D. O., Lee H. J., Lee C. Y. 2003. Major phenolics in apple and their contribution to the total antioxidant capacity. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51: 6516–6520.
42. Liaudanskas M., Viškelis P., Kviklys D., Raudonis R., Janulis V. 2015. A comparative study of phenolic content in apple fruits. International Journal of Food Properties,18: 945–953.
43. Link H. 2000. Significance of flower and fruit thinning on fruit quality. Plant Growth Regulation, 31: 17–26.
44. Liu J. R., Dong H. W., Chen B. Q., Zhao P., Liu R. H. 2009. Fresh apples suppress mammary carcinogenesis and proliferative activity and induce apoptosis in mammary tumors of the Sprague-Dawley rat. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57: 297–304.
45. McArtney S. J., Palmer J. W., Adams H. M. 1996. Crop loading studies with ‘Royal Gala’ and ‘Braeburn’ apples: effect of time and level of hand thinning. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 24: 401–407.
46. Meland M. 2009. Effects of different crop loads and thinning times on yield, fruit quality, and return bloom in *Malus* × *domestica* Borkh. ‘Elstar’. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, ISAFRUIT Special Issue: 117–121.
47. Neilsen J. C., Dennis Jr. F. G. 2000. Effects of seed number, fruit removal, bourse shoot length and crop density on flowering in ‘Spencer Seedless’ apple. Acta Horticulturae, 527: 137–146.
48. Palmer J. W., Giuliani R., Adams H. M. 1997. Effect of crop load on fruiting and leaf photosynthesis of ‘Braeburn’/M.26 apple trees. Tree Physiology, 17: 741–746.
49. Palmer J. W., Prive J. P., Tustin D. S. 2003. Temperature. In: D. C.

Ferree, I. J. Warrington (eds.), Apples: Botany, production and uses. CABI Publishing, Cambridge, MA, 217–236.
50. Radivojevic D. D., Milivojevic J. M., Oparnica C. D., Vulic T. B., Djordjevic B. S., Ercisli, S. 2014. Impact of early cropping on vegetative development, productivity, and fruit quality of Gala and Braeburn apple trees. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 38(6): 773–780.
51. Raudonė L., Raudonis R., Liaudanskas M., Janulis V., Viškelis P. 2017. Phenolic antioxidant profiles in the whole fruit, flesh and peel of apple cultivars grown in Lithuania. Scientia Horticulturae, 216: 186–192.
52. Robinson T. L. Watkins C. B. 2003. Cropload of 'Honeycrisp' affects not only fruit size butmany quality attributes. New York Fruit Quarterly, 3: 7–15.
53. Salvador F. R. de, Fisichella M. Fontanari M. 2006. Correlations between fruit size and fruit quality in apple trees with high and standard crop load levels. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research, 14(2): 113–122.
54. Schneider G. W. 1977. Studies on the mechanism of fruit abscission in apple and peach. Journal of the American Society for Horticultural Science, 102: 179–181.
55. Siebert K. J., Troukhanova N. V., Lynn P. Y. 1996. Nature of polyphenol–protein interactions. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44: 80–85.
56. Stopar M., Bolcina U., Vanzo A., Verhovsek U. 2002. Lower crop load for cv 'Jonagold' apples (*Malus domestica* Borkh.) increases polyphenol content and fruit quality. Journal of the Science of Food and Agriculture, 50: 1643–1646.
57. Sun J., Liu R. H. 2008. Apple phytochemical extracts inhibit proliferation of estrogen-dependent and estrogen-independent human breast cancer cells through cell cycle modulation. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56: 11661–11667.
58. Treder W. 2010. Crop loading studies with 'Jonagold' apple tree. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research, 18: 59–69.
59. Tromp J. 2000. Flower-bud formation in pome fruits as affected by fruit thinning. Plant Growth Regulation, 31: 27–34.
60. Tsao R., Yang R., Christopher J., Zhu Y., Zhu H. H. 2003. Polyphenolic profiles in eight apple cultivars using high-performance liquid chromatography (HPLC). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51: 6347–6353.
61. Untiedt R., Blanke M. 2001. Effect of thinning agents on whole apple tree canopy photosynthesis. Plant Growth Regulation, 35: 1–9.

62. Vieira F. G., Borges G. D., Copetti C., Amboni R. D., Denardi F., Fett R. 2009. Physicochemical and antioxidant properties of six apple cultivars (*Malus domestica* Borkh.) grown in southern Brazil. Scientia Horticulturae, 122: 421–425.
63. Wang H., Cao G., Prior R. 1997. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45: 304–309.
64. Warrington I. J., Fulton T. A., Halligan E. A., Silva H. N. de. 1999. Apple fruit growth and maturity are affected by early season temperatures. Journal of the American Society for Horticultural Science, 124: 468–477.
65. Wojdyło A., Oszmiański J., Laskowski P. 2008. Polyphenolic compounds and antioxidant activity of new and old apple varieties. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56: 6520–6530.
66. Wolfe K., Wu X., Liu R. H. 2003. Antioxidant activity of apple peels. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51: 609–614.
67. Wright A. H., Embree C. G., Nichols D. S., Prange R. K., Harrison P. A., DeLong J. M. 2006. Fruit mass, colour and yield of 'Honeycrisp' apples are influenced by manually-adjusted fruit population and tree form. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 81:397–401.
68. Wünsche J. N., Palmer J. W. 1997. Effects of fruiting on seasonal leaf and whole canopy carbon dioxide exchange of apple. Acta Horticulturae, 451: 295–301.
69. Wünsche J. N., Palmer J. W., Greer D. H. 2000. Effects of crop load on fruiting and gas-exchange characteristics of 'Braeburn'/M.26 apple trees at full canopy. Journal of the American Society for Horticultural Science, 125: 93–99.

Crop load management in fruit-trees (Review)

J. Viškelis, D. Kviklys

Summary

Crop load in fruit-trees is a quantitative parameter indicating the number of fruits in the tree. Often, this magnitude is expressed in quantities of fruit and trunk cross-sectional area ratio (fruit number/cm^{2}TCA). Crop load management is essential in order to grow large and high-quality fruits. Flower thinning (crop load adjustment) of small fruits will not make them larger, but it will ensure the potential size of the fruit, caused by a variety of other genetic and environmental factors. Optimum crop load adjustment avoids biennial bearing and ensures sustainable tree physiology. Crop load regulation is beneficial to producers. If done correctly, it guarantees annual yield, good fruit quality and yield ratio, which is directly linked to profits. There is a lot of research data on impact of crop load management on fruit quality, but most of these quality parameters are based solely on such features that are attractive to consumers - fruit sugar and acid content, fruit firmness and color. There are also studies that have found crop load management influence on fruit bioactive compound synthesis, but such studies are rare, and their results are contradictory, since crop load control (with the purpose to achieve specific fruit quality parameters), cannot be the only affecting element to control the specific fruit quality. Biological and technological means, such as variety, rootstock, tree planting distances, the time of yield picking and so on, also have impact on fruit quality. There is no clear correlation between fruit size and fruit quality, so it still remains an issue to growers and scientists, how to control and grow fruits with specific quality.

Keywords: apple, crop load, fruit quality.

PROCEEDINGS OF THE LATVIAN ACADEMY OF SCIENCES. Section B, Vol. 71 (2017), No. 3 (708), pp. 144–149.
DOI: 10.1515/prolas-2017-0025

DE GRUYTER OPEN

COMPOSITION AND CONCENTRATION OF PHENOLIC COMPOUNDS OF 'AUKSIS' APPLE GROWN ON VARIOUS ROOTSTOCKS

Darius Kviklys[1,#], Mindaugas Liaudanskas[2], Jonas Viškelis[1], Loreta Buskienė[1], Juozas Lanauskas[1], Nobertas Uselis[1], and Valdimaras Janulis[2]

[1] Institute of Horticulture, Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry, Kauno 30, LT-54333, Babtai, Kaunas distr., LITHUANIA

[2] Department of Pharmacognosy, Lithuanian University of Health Sciences, A. Mickeviciaus 9, LT-44307 Kaunas, LITHUANIA

[#] Corresponding author, dkviklys@gmail.com

Communucated by Dalija Segliņa

The trial was carried out at the Institute of Horticulture, Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry in 2013–2015. Cv. 'Auksis' was tested on 12 rootstocks: B.396, B.9, M.9, M.26, P 22, P 59, P 61, P 62, P 66, P 67, PB.4, and Pure 1. Accumulation of phenolic compounds depended on fruit yield and average fruit weight. On average, significantly lower concentration among rootstocks occurred when apple trees had abundant yield and fruits were smaller. On average chlorogenic acid constituted 50% and total procyanidins 28% of total phenols in 'Auksis' fruits. Flavonoid concentration most depended on rootstock and the highest variation was recorded. More than 50% difference occurred between the highest total flavonoid concentration in apples on PB.4 and the lowest on M.9 rootstocks. Low variability of total procyanidin concentration among rootstocks was observed. Differences between the highest and lowest concentration was 15%. Total concentration of phenolic compounds differed among rootstocks by 29–35% depending on the year. Differences in accumulation of phenolic compounds depended on rootstock genotype but not on yield or fruit weight. PB.4 and P 67 rootstocks had the highest, and M.9, P 62 and M.26 had the lowest concentration of total phenol in 'Auksis' fruits.

Key words: *bioactive substances, fruit,* Malus x domestica *Borkh., yield.*

INTRODUCTION

Apples along with bananas are the most important fruits in the world. Apples also are distinguished by the highest amounts of phenolic compounds among fruits (Sun *et al*., 2002). Different apple cultivars as a source of variation of phytochemical content have been widely tested (Wolf *et al*., 2003; Ceymann *et al*., 2012; Liaudanskas *et al*., 2015; Wang *et al*., 2015; Xu *et al*., 2016).

Accumulation of phenolic compounds in apple fruits depends on climatic and technological factors: weather conditions (Scalzo *et al*., 2005), sun exposure (Awad *et al*., 2001), fruit position on the tree (Hagen *et al*., 2007; Feng *et al*., 2014) and fertilisation practice (Awad and de Jager, 2002). In spite of numerous studies of apple phenolic compounds, effect of rootstock on the accumulation of bioactive substances in apple fruits has not been widely tested. Rootstock choice is one of the most important decision in modern apple growing. Rootstock has obvious influence on apple tree development, precocity, and fruit quality, and it regulates transport of minerals in the tree. Studies on rootstocks of other orchard plants revealed great differences between rootstocks in accumulation of phenols, for example in lemon (Gil-Izquierdo *et al*., 2004) and cherry (Bauer *et al*., 1989), but studies of apple rootstock regarding phenolic compound concentration in fruits have been conducted only in Estonia and Lithuania (Mainla *et al*., 2011; Kviklys *et al*., 2014).

The aim of the study was to evaluate apple rootstock effect on accumulation of phenolic compounds in 'Auksis' fruits and to test impact of the rootstock on the variability and stability of bioactive substance concentration.

MATERIALS AND METHODS

The trial was conducted in a productive orchard at the Institute of Horticulture, Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry in 2013–2015. Trees were planted at spacing 4 × 1.5 m in 2005 and trained as slender spindle.

Brought to you by | Lithuanian Res. Centre Agric.Forestry
Authenticated
Download Date | 8/14/17 9:00 AM

Pest and disease management was carried out in conformity with the rules of integrated plant protection. Rootstocks for this trial were chosen based on their popularity worldwide and suitability for intensive apple growing: super-dwarf rootstocks P 22, P 59, P 61, and PB.4 (Belarusian selection), dwarf rootstocks M.9, P 62, P 66, P 67, B.396, B.9, and Pure 1 (Latvian selection), and semi-dwarf rootstock M.26 (Kviklys *et al*., 2013).

Rootstocks were grafted with cv. 'Auksis' and planted in a randomised block design, with four replicates and three trees per plot. Twenty randomly selected fruits from each replication were taken for biochemical analysis and carefully mixed. Twenty-five randomly selected fruits were chosen from the bulk sample and analysed in three replicates of composite samples.

Preparation of samples. Each apple was cut into slices of equal size (up to 1 cm in thickness), and the stalks and the seeds were removed. Slices were immediately frozen in a freezer (–35 °C) with air circulation and then lyophilised with a ZIRBUS sublimator 3×4×5/20 (ZIRBUS technology, Bad Grund, Germany) at a pressure of 0.01 mbar (condenser temperature, –85 °C). The lyophilised apple slices were ground to a fine powder using a Retsch 200 mill (Haan, Germany). Loss on drying before analysis was determined by drying the apple lyophilisate in a laboratory drying oven to complete evaporation of water and volatile compounds (temperature, 105 °C; difference in weight between measurements up to 0.01 g) and by calculating the difference in raw material weight before and after drying. Data were recalculated for absolute dry lyophilisate weight.

Chemicals. All the solvents, reagents, and standards used were of analytical grade. Acetonitrile and acetic acid were obtained from Sigma-Aldrich GmbH (Buchs, Switzerland) and ethanol from Stumbras AB (Kaunas, Lithuania). Hyperoside, rutin, quercitrin, phloridzin, procyanidin B1, procyanidin B2, and chlorogenic acid standards were purchased from Extrasynthese (Genay, France), (+)-catechin and (–)-epicatechin from Fluka (Buchs, Switzerland), and avicularin and isoquercitrin from Chromadex (Santa Ana, USA). Deionised water, produced by the Crystal E HPLC (Adrona SIA, Riga, Latvia) water purification system, was used.

Extraction. An amount of 2.5 g of lyophilised apple powder (exact weight) was weighed, added to 30 mL of ethanol (70%, v/v), and extracted in a Sonorex Digital 10 P ultrasonic bath (Bandelin Electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Germany) for 20 minutes at 40 °C. The conditions of extraction (type of extraction, duration, temperature, solvent and its concentration) were chosen considering the results of extraction optimisation. The obtained extract was filtered through a paper filter; the apple lyophilisate on the filter was washed twice with 10 mL of ethanol (70%, v/v) in a 50-mL flask. The extract was filtered through a membrane filter with a pore size of 0.22 μm (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany).

Instrumentation and chromatographic conditions. Hyperoside, isoquercitrin, rutin, avicularin, quercitrin, (+)-catechin, (–)-epicatechin, procyanidin B1, procyanidin B2, phloridzin, and chlorogenic acid standards were dissolved in ethanol (96.3%, v/v). A mixture of these standards, diluted with ethanol (96.3%, v/v) to 1/2, 1/4, 1/8, and 1/16 of the initial concentration, was prepared. The initial mixture of standards and the diluted solutions were injected into the HPLC system. A calibration curve with five concentration levels was constructed for each compound. The analyses of standard solutions were performed in triplicate. The concentrations of phenolic compounds identified in the apple extracts were within the limits of calibration curves.

A Waters 2695 chromatograph equipped with a Waters 2998 photodiode array (PDA) detector (Waters, Milford, USA) was used for HPLC analysis. Chromatographic separation was managed, chromatograms were recorded, and data were processed with the Empower® v.2.0. software (Waters, Milford, USA). Chromatographic separations were carried out by using a YMC-Pack ODS-A (5 μm, C_{18}, 250 × 4.6 mm i.d.) column equipped with a YMC-Triart (3 μm, C_{18}, 10 × 3.0 mm i.d.) precolumn (YMC Europe GmbH, Dinslaken, Germany). The column was operated at a constant temperature of 25 °C. The volume of the extract being investigated was 10 μL. The flow rate was 1 mL/min, and gradient elution was used. The mobile phase consisted of 2% (v/v) acetic acid in water (solvent A) and 100% (v/v) acetonitrile (solvent B). The following conditions of elution were applied: 0–30 minutes, 3–15% B; 30–45 minutes, 15–25% B; 45–50 minutes, 25–50% B; and 50–55 minutes, 50–95% B. Detection was simultaneously performed at three wavelengths: 280 nm (dihydrochalcones, catechins, procyanidins), 320 nm (phenolic acids), and 360 nm (flavonols). The spectrum of UV-visible light was recorded from 200 to 600 nm. All the phenolic compounds were identified by comparing their retention times and spectra with those of the standard compounds. The concentration of phenolic compounds was calculated based on the peak areas by using standard compounds (Fig. 1).

The data on the main traits were subjected to the analysis of variance. Significance of differences between treatment (rootstock) means was evaluated using the LSD test at $p < 0.05$.

RESULTS

The total phenol concentration in 'Auksis' apples varied between rootstocks and years (Fig. 2). Differences between rootstocks were not the same during years of the study. In 2013, the lowest concentration of total phenolic compounds was recorded on P 62 rootstock (3741 μg/g DW) and the highest — on P 59 rootstock (5745 μg/g DW). In 2014, the lowest concentration was on M.9 (3147 μg/g DW) and the highest on Pure 1 (4690 μg/g DW). In 2015, the lowest concentration was recorded again on M.9 (3891 μg/g DW) and the highest on P 62 (5475 μg/g DW).

Brought to you by | Lithuanian Res. Centre Agric.Forestry
Authenticated
Download Date | 8/14/17 9:00 AM

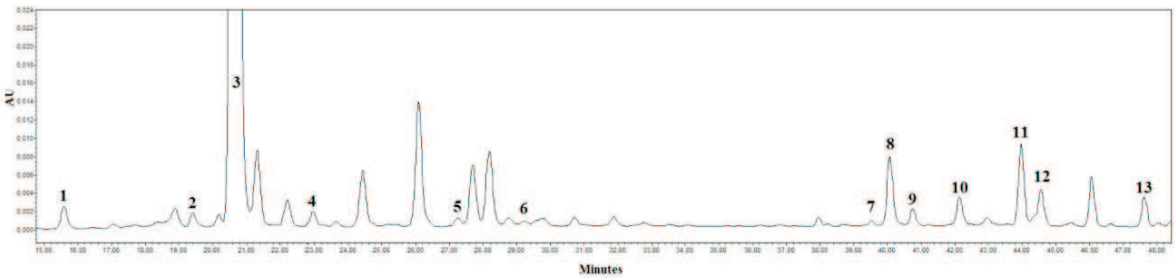


Fig. 1. Chromatogram of the ethanol extract of cv. 'Auksis' on M.9 rootstock fruit sample (λ = 320 nm). Numbers indicate the peaks of analytes: (1) procyanidin B1; (2) (+)-catechin; (3) chlorogenic acid; (4) procyanidin B2; (5) (–)-epicatechin; (6) procyanidin C1; (7) rutin; (8) hyperoside; (9) isoquercitrin; (10) reinotrin; (11) avicularin; (12) quercitrin; (13) phloridzin.

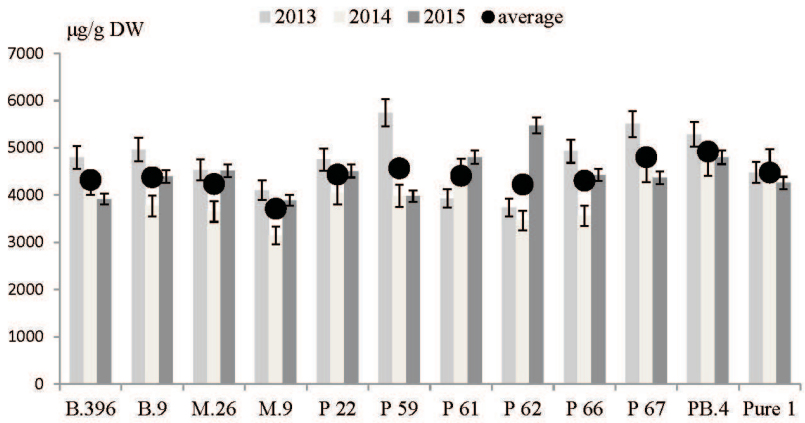


Fig. 2. Rootstock effect on the total phenol concentration in 'Auksis' apple fruits, µg/g DW. Error bars indicate least significant differences at the 5% probability level for each year separately.

On average over three years, PB.4 and P 67 rootstocks accumulated the highest (4924 and 4804 µg/g DW respectively), while M.9 rootstock accumulated the lowest concentration of total phenols (3714 µg/g DW).

Significant differences between rootstocks were observed in concentration of different phenolic compounds (Table 1). The highest concentration of quercetin glycosides (hyperoside, isoquercitrin, rutin, avicularin, and quercitrin) was found in fruits from trees grown on super dwarf rootstocks PB.4, P 59, and Pure 1. In contrast, the most vigorous trees on M.26 rootstock accumulated the lowest concentration of quercetin glycosides. M.9 rootstock significantly differed from other rootstocks in low accumulation of epicatechin, procyanidins, phloridzin, and chlorogenic acid. 'Auksis' ap-

Table 1

ROOTSTOCK EFFECT ON THE AVERAGE CONCENTRATION OF PHENOLIC COMPOUNDS IN 'AUKSIS' APPLE FRUITS, µg/g DW, AVERAGE OF 2013–2015.

Rootstock	Hyperoside	Isoquercitrin	Rutin	Avicularin	Quercitrin	Catechin	Epicatechin	ProcyanidinB1	ProcyanidinB2	Phloridzin	Chlorogenic acid
B.396	87.7	16.5	14.6	74.6	57.9	165	373	209	1099	123	2103
B.9	108.6	20.3	15.6	89.8	68.1	158	359	200	1006	112	2241
M.26	47.7	11.5	11.8	50.1	44.1	174	377	228	1031	149	2112
M.9	59.9	14.1	12.6	56.0	45.5	149	326	140	924	98	1890
P 22	77.9	16.6	15.2	70.4	56.1	174	399	223	1021	107	2276
P 59	121.8	25.6	22.0	105.9	78.4	164	359	218	1040	116	2320
P 61	91.8	18.4	15.3	79.8	64.5	153	403	197	1085	115	2188
P 62	74.6	16.0	13.4	70.8	57.5	167	391	179	1013	120	2123
P 66	79.2	16.8	13.7	72.6	59.2	127	379	230	1026	133	2171
P 67	81.6	17.5	14.5	74.4	58.6	182	434	235	1162	146	2398
PB.4	129.2	25.9	19.0	103.2	78.5	140	429	239	1082	116	2562
Pure 1	127.2	25.6	17.9	102.1	79.0	168	391	170	1052	153	2191
Mean	90.6	18.7	15.5	79.1	62.3	160	385	206	1045	124	2215
LSD_{05}	14.6	5.1	4.3	12.2	9.9	14.9	39.3	18.6	81.5	10.7	140.6

Brought to you by | Lithuanian Res. Centre Agric.Forestry
Authenticated
Download Date | 8/14/17 9:00 AM

Table 2

VARIATION OF PHENOLIC COMPOUND CONCENTRATION IN 'AUKSIS' APPLE FRUITS DURING THREE GROWING SEASONS ON DIFFERENT ROOTSTOCKS, AVERAGE OF 2013–2015, VARIATION COEFFICIENT V%.

Rootstock	Hyperoside	Isoquercitrin	Rutin	Avicularin	Quercitrin	Catechin	Epicatechin	ProcyanidinB1	ProcyanidinB2	Phloridzin	Chlorogenic acid	Total phenol content
B.396	36	35	14	27	16	4	3	41	31	14	5	13
B.9	13	6	26	17	17	11	9	38	26	23	15	14
M.26	43	31	35	33	29	4	15	53	28	65	12	12
M.9	53	48	25	38	25	2	14	22	34	26	12	14
P 22	29	20	16	32	19	15	8	51	23	27	6	8
P 59	34	34	42	21	12	16	16	65	38	10	21	22
P 61	45	22	43	37	27	13	20	39	10	37	16	10
P 62	30	13	27	25	22	26	32	40	38	35	24	26
P 66	47	29	19	39	19	43	6	57	30	34	13	16
P 67	56	41	27	47	30	17	3	46	19	31	13	13
PB.4	12	21	2	22	28	40	5	44	13	12	13	6
Pure 1	20	14	38	18	20	23	5	9	13	37	10	5
Mean	35	26	26	30	22	18	11	42	25	29	13	13

ples grown on P 67 and PB.4 rootstocks had the richest concentration of the latter phenolic compounds.

During the trial period the most stable concentration (coefficient of variation (V%) = 5 and 6) of total phenolic compounds was found in trees on PB.4 and Pure 1 rootstocks (Table 2). The most variable concentration of total phenolic compounds in three years of investigations was recorded in apples on P 62 and P 59 rootstocks (V% = 26 and 22, respectively). On average for the rootstocks, procyanidin B2 and hyperoside concentrations were the most variable, while epicatechin and chlorogenic acid concentrations were the most stable (V% = 11 and 13, respectively). Variation of separate phenolic compound concentration depended on rootstock. Very high variation (V% > 50) of hyperoside was recorded in 'Auksis' apples grown on M.26 and P 67 rootstocks, procyanidin B1 — on P 59 and phloridzin — on M.26 rootstock. The lowest variation (V% 10) of isoquercitrin concentration during three years was recorded on B.9, rutin on PB.4, catechin on B.396, B.9, P 22, and M.26, epicatechin on B.396, B.9, P 22, P 66, P 67, PB.4, and Pure 1, procyanidin B1 on Pure 1, and chlorogenic acid on B.396 and P 22 rootstocks.

The average apple yield was obtained in 2014 and fruits this year were distinguished by the lowest concentration of total phenols (Table 3). When the average yield was low, significantly higher concentration of phenols accumulated. Such relationships were not found for average fruit weight.

On average for the rootstocks, tree growth was negatively correlated (r = –0.55) with phenol concentration in fruits (Fig. 3).

On average for three years, fruit colour was positively correlated with the total phenol concentration (r = 0.62) (Fig. 4), although fruits from P 67 rootstock had only intermediate blush. However, by separate years, strong correlation between fruit colour and the total concentration of phenolic compounds was established only in 2013 (r = 0.69), medium in 2014 (r = 0.42) and no correlation in 2015 (r = 0.09) (data not presented).

Table 3

AVERAGE ANNUAL APPLE YIELD, FRUIT WEIGHT AND TOTAL CONCENTRATION OF PHENOLIC COMPOUNDS IN 'AUKSIS' APPLES, AVERAGE OF 12 ROOTSTOCKS

	2013	2014	2015	LSD_{05}
Total phenols, μg/g DW	4731	4025	4445	298
Yield, kg/tree	5.4	29.6	9.8	4.6
Fruit weight, g	157	138	183	24

DISCUSSION

Cv. 'Auksis' is one of the most popular apple cultivars grown in commercial and amateur orchards in Baltic countries (Univer *et al*., 2010; Lepsis *et al*., 2014). Along with good yield and excellent fruit quality, cv. 'Auksis' accumulates the highest concentration of phenolic compounds in comparison with some other commercially important apples cultivars grown in Lithuania (Liaudanskas *et al*., 2015). Our study demonstrated that total phenol concentration even could be increased by selecting the proper rootstock genotype, thereby enhancing the value of 'Auksis' fruits.

Cv. 'Auksis', like many apple cultivars, has biennial fruiting habit (Kviklys *et al*., 2016). Average apple yield during the investigation period differed significantly and it was inherent for all rootstocks tested. Average total phenol concentration was significantly lower in high yielding years and higher when apple had less abundant yield. Despite this overall phenomena, annual yield differences did not affect accumulation of phenols in fruits grown on B.396, P 61,

Brought to you by | Lithuanian Res. Centre Agric.Forestry
Authenticated
Download Date | 8/14/17 9:00 AM

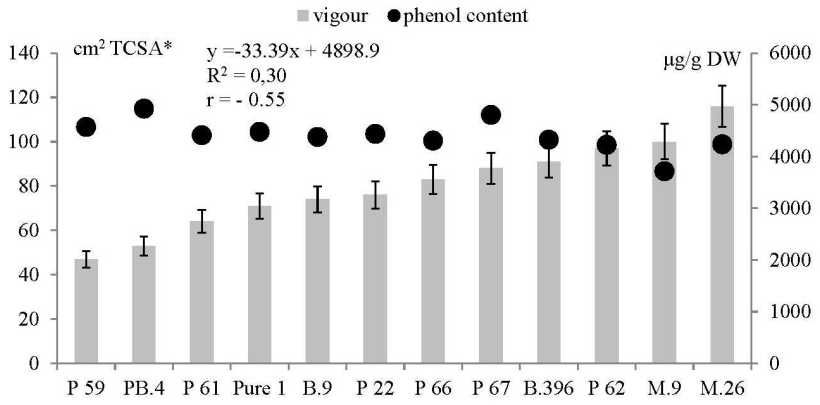


Fig. 3. Rootstock effect on tree vigour and total phenol concentration in apple fruits, average 2013–2015. Rootstocks are arranged in order of increasing tree vigour increasing order. *TCSA, trunk cross sectional area. Error bars indicate least significant differences between rootstocks in TCSA at the 5% probability level.

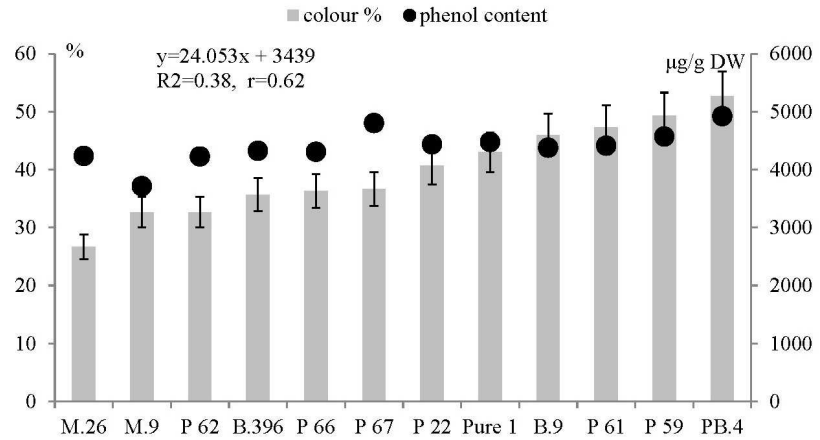


Fig. 4. Rootstock effect on fruit blush and total phenol concentration, average 2013–2015. Rootstocks are arranged in order of increasing fruit blush, average 2013–2015

Error bars indicate least significant differences between rootstocks in fruit blush at the 5% probability level.

P 67, and Pure 1 rootstocks, indicating that the accumulation of phenols is more related to rootstock genotype.

Accumulation of phenolic compounds depends on climatic conditions. Differences of their concentration in apple fruits could be caused also by other factors (as yield, nutrition, soil management (Awad and de Jager, 2002; Wang and Lin, 2003; Mittelstras *et al*., 2006; Lanauskas *et al*., 2016). Depending on the year, the total concentration of phenolic compounds differed among rootstocks by 29–35%. Choosing the right rootstock with stable phenol concentration could be achieved in the future. In our trials, rootstocks Pure 1 and PB.4 demonstrated very stable accumulation of total phenolic compounds despite variable yield and vegetation conditions. In order to achieve stability of individual phenolic compound concentration, certain rootstock cultivar combinations should be considered, as results from the trial with cultivar 'Ligol' demonstrated slightly different rootstock behaviour (Kviklys *et al*., 2014).

Flavonoids play an important role in tree growth processes and auxin transport (Buer *et al.*, 2010). It has been established that more colourful fruits contain more quercetin glycosides. Lu *et al*. (1999) demonstrated significantly higher concentrations of quercetin glycosides in fully coloured fruits from the top of the tree and low concentrations in not coloured fruits from the inner canopy. Similar results were obtained by Hagen *et al*. (2007) and Feng *et al*. (2014). Our trial results confirm these findings. 'Auksis' apples from trees on M.26 rootstock were at least colourful and the content of quercetin glycosides in apples on this rootstock was the lowest. In contrast, significantly higher concentration of the main flavonoids were found in apples grown on PB.4 and P 59 rootstocks, which also positively influenced fruit colouration. More intensive fruit colour had effect on quercetin glycoside concentration but not on total phenolic compound concentration.

Mainla *et al*. (2011) reported that vigorous rootstocks accumulated less phenolic compounds in a trial performed in Estonia. However, there were only three rootstocks tested. Medium negative correlation established between tree growth and concentration of total phenolic compounds in our trial, but rootstock genotype played more important role in accumulation of phenolic compounds than induced tree vigour. The most vigorous rootstock M.26 had an intermediate concentration of phenolic compounds, while super — dwarf PB.4 and dwarf P 67 had the highest concentration . The lowest accumulation of total phenols was detected in fruits grown on dwarf M.9 rootstock, the vigour of which did not differ significantly from P 67, which had the highest phenol concentration in 'Auksis' apples. Negative influence of M.9 rootstock on total phenol concentration was recorded also in a previous trial (Kviklys *et al*., 2014).

Brought to you by | Lithuanian Res. Centre Agric.Forestry
Authenticated
Download Date | 8/14/17 9:00 AM

REFERENCES

Awad, M., Wagenmakers, P., deJager, A. (2001). Effects of light on flavonoids and chlorogenic acid levels in the skin of 'Jonagold' apples. *Sci. Hort*., **88**, 289–298.

Awad, M. A., de Jager, A. (2002). Relationships between fruit nutrients and concentrations of favonoids and chlorogenic acid in 'Elstar' apple skin. *Sci. Hort.*, **92**, 265–276.

Bauer, H., Treutter, D., Schmid, P. P. S., Schmitt, E., Feucht, W. (1989). Specific accumulation of o-diphenols in stressed leaves of *Prunus avium*. *Phytochemistry*, **28**, 1363–1364.

Buer, C. S., Imin, N., Djordjevic, M. A. (2010). Flavonoids: New roles for old molecules. *J. Integrative Plant Biol.*, **52** (1), 98–111

Ceymann, M., Arrigoni, E., Schärer ,H., Nising, A. B., Hurrell, R. (2012). Identification of apples rich in health-promoting flavan-3-ols and phenolic acids by measuring the polyphenol profile. *J. Food Compos. Anal.*, **26**,128–135.

Feng, F., Li, M., Ma, F., Cheng, L. (2014). Effects of location within the tree canopy on carbohydrates, organic acids, amino acids and phenolic compounds in the fruit peel and flesh from three apple (*Malus* × *domestica*) cultivars. *Hort. Res.*, Article number: 14019 (2014). doi:10.1038/hortres.2014.19.

Gil-Izquierdo, A., Riquelme, M., 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. *J. Agric. Food Chem*., **52**, 324–331.

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. *Postharv. Biol. Technol*., **45**, 1–10.

Ju, Z., Liu, C., Yuan, Y., Wang, Y., Liu, G. (1999). Coloration potential, anthocyanin accumulation, and enzyme activity in fruit of commercial apple cultivars and their F1 progeny. *Sci. Hort.*, **79**, 39–50.

Kviklys, D., Čeidaitė, A., Lanauskas, J., Uselis, N., Samuolienė G. (2016). The effect of rootstock on apple tree bearing stability in a cooler climate. *Agric. Food Sci.*, **25** (1), 81–88.

Kviklys, D., Liaudanskas, M., Janulis, V., Viškelis, P., Rubinskienė, M., Lanauskas, J., Uselis, N. (2014). Rootstock genotype determines phenol content in apple fruits. *Plant Soil Environ.*, **60** (5), 234–240.

Kviklys, D., Kviklienė, N., Bielicki, P., Bite, A., Lepsis, J., Univer, T., Univer, N., Uselis, N., Lanauskas J. (2013). Baltic fruit rootstock studies: Evaluation of apple (*Malus domestica* Borkh.) new rootstocks. *Zemdirbyste-Agriculture*, **100** (4), 441–446.

Lanauskas, J., Kviklys, D., Liaudanskas, M., Janulis, V., Uselis, N., Viškelis, J., Viškelis, P. (2017). Lower nitrogen nutrition determined higher phenolic content of organic apples. *Hort. Sci.* (Prague) (in press). Available at: http://www.agriculturejournals.cz/web/hortsci.htm?type=article&id=50_2016-HORTSCI

Lepsis, J., Bite A., Kviklys D., Univer N. (2014). Evaluation of 'Auksis' apple trees On dwarfing rootstocks in the Baltic Region. *Acta Hort*., **1058**, 601–606.

Liaudanskas, M., Viškelis, P., Kviklys, D., Raudonis, R., Janulis, V. (2015). A comparative study of phenolic content in apple fruits. *Int. J. Food Properties*, **18** (5), 945–953.

Mainla, L., Moor, U., Karp, K., Püssa, T. (2011). The effect of genotype and rootstock on polyphenol composition of selected apple cultivars in Estonia. *Žemdirbystė-Agriculture*, **98** (1), 63–70.

Mittelstraß, K., Treutter, D., Pleßl, M., Heller, W., Elstner, E. F., Heiser, I. (2006). Modification of primary and secondary metabolism of potato plants by nitrogen application differentially affects resistance to *Phytophthora infestans* and *Alternaria solani*. *Plant Biol.*, **8**, 653–661.

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

Sun, J., Chu, Y., Wu, X., Liu, R. (2002). Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *J. Agric. Food Chem*., **50**, 7449–7454.

Univer, T., Kviklys, D., Lepsis, J., Univer, N. (2010). Early performance of "Auksis" apple trees on dwarfing rootstocks in Baltic region. *Agron. Res.,* **8**, 743–748.

Wang, X., Li, C., Liang, D., Zou, Y., Li, P., Ma, F. (2015). Phenolic compounds and antioxidant activity in red-fleshed apples. *J. Funct. Foods*, **18**, 1086–1094.

Wang, S. Y., Lin, H. S. (2003). Compost as a soil supplement increases the level of antioxidant compounds and oxygen radical absorbance capacity in strawberries. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 6844–6850.

Wolfe, K, Wu, X, Liu, R. (2003). Antioxidant activity of apple peels. *J. Agric. Food Chem*., **51**, 609–614.

Xu, Y., Fan, M., Ran, J., Zhang, T., Sun, H., Dong, M., Zhang, Z., Zheng, H. (2016). Variation in phenolic compounds and antioxidant activity in apple seeds of seven cultivars. *Saudi J. Biol. Sci.*, **23**, 379–388.

Received 26 September 2016
Accepted in the final form 23 May 2017

ŠĶIRNES 'AUKSIS' ĀBOLU SASTĀVS UN FENOLU SAVIENOJUMU SATURS, AUDZĒJOT UZ DAŽĀDIEM POTCELMIEM

Pētījums veikts Lietuvas lauksaimniecības un mežsaimniecības pētījumu centra Dārzkopības institūtā 2013.–2015. gadā. Šķirne 'Auksis' tika pārbaudīta uz 12 potcelmiem: B.396, B.9, M.9, M.26, P 22, P 59, P 61, P 62, P 66, P 67, PB.4 un Pure 1. Fenolu savienojumu uzkrāšanās bija atkarīga no ražas lieluma un vidējā augļu svara. Vidēji uz visiem potcelmiem ievērojami zemāks fenolu saturs novērots tad, kad ābeles bagātīgi ražoja un augļi bija sīkāki. Vidēji šķirnes 'Auksis' augļos hlorogēnskābe veidoja 50% un kopējie procianidīni 28% no kopējā fenolu satura. Flavonoīdi bija visvairāk atkarīgi no potcelma, un tiem novērotas lielākās variācijas. Novērota vairāk nekā 50% atšķirība starp augstāko kopējo flavonoīdu saturu augļos uz potcelma PB.4 un zemāko saturu uz M.9. Kopējiem procianidīniem atšķirības atkarībā no potcelma bija mazas. Starpība starp augstāko un zemāko saturu bija 15%. Kopējais fenolu savienojumu saturs atšķirās starp potcelmiem par 29–35% atkarībā no gada. Atšķirības fenolu savienojumu uzkrāšanās daudzumā ietekmēja potcelma genotips, bet ne ražas lielums vai augļu svars. Potcelmi PB.4 un P 67 deva augstāko, bet M.9, P 62 un M.26 zemāko kopējo fenolu saturu šķirnes 'Auksis' augļos.

Brought to you by | Lithuanian Res. Centre Agric.Forestry
Authenticated
Download Date | 8/14/17 9:00 AM

International Journal of Biochemistry Research & Review
14(3): 1-13, 2016, Article no.IJBCRR.28856
ISSN: 2231-086X, NLM ID: 101654445

SCIENCEDOMAIN *international*
www.sciencedomain.org

Seasonal Variation of Qualitative and Quantitative Composition of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity in Apple (*Malus domestica* Borkh.) Fruits

Mindaugas Liaudanskas[1*], Raimonda Brunevičiūtė[1], Kristina Gaivelytė[1], Jonas Viškelis[2], Pranas Viškelis[2], Darius Kviklys[2] and Valdimaras Janulis[1]

[1]Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Lithuanian University of Health Sciences, Sukilėlių Street 13, LT- 50162, Kaunas, Lithuania.
[2]Institute of Horticulture, Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry, Kauno Street 30, Babtai, LT-54333, Kaunas, Lithuania.

Authors' contributions

This work was carried out in collaboration between all authors. Authors VJ and RB designed the experiments. Authors ML, JV and DK performed the experiments. Authors PV and KG analyzed and discussed the data. Author ML wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Article Information

DOI: 10.9734/IJBCRR/2016/28856
Editor(s):
(1) G. Padmaja, Central Tuber Crops Research Institute Sreekariyam, Thiruvananthapuram, India.
Reviewers:
(1) Raffaella Preti, University La Sapienza of Rome, Italy.
(2) Elsa Uribe, La Serena University, Chile.
Complete Peer review History: http://www.sciencedomain.org/review-history/16802

Original Research Article

Received 9th August 2016
Accepted 13th October 2016
Published 4th November 2016

ABSTRACT

The aim of this study was to explore the peculiarities of the qualitative and quantitative composition of phenolic compounds and antioxidant activity variation in apple (*Malus domestica* Borkh.) fruit samples during their growth season. The highest total concentration of phenolic compounds (20.97±0.74 mg g^{-1}) was detected during the initial period of the phenological fruit growth stage (31 days after full bloom - DAFB), and the lowest (1.61±0.05 mg g^{-1}) – during the fruit maturation period (143 DAFB). Chlorogenic acid was the predominant compound in apple samples throughout the

**Corresponding author: E-mail: m.liaudanskas@yahoo.com;*

vegetation period – it comprised 24–32.12% of all identified and quantitatively evaluated phenolic compounds in apples. The highest concentration of chlorogenic acid (20.97±0.74 mg g^{-1}) was detected at the beginning of the fruit development period.
In total, 6 quercetin glycosides were detected in apple samples: hyperoside, isoquercitrin, rutin, reynoutrin, avicularin and quercitrin. The highest total concentration of quercetin glycosides (2.75±0.08 mg g^{-1}) was detected at the beginning of the fruit development period (31 DAFB), and the lowest (0.23±0.01 mg g^{-1}) – during the fruit maturation period.
The antioxidant activity in apple sample extracts was analysed by applying 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) spectrophotometric assays. The strongest antiradical and reducing activity (TE_{DPPH} reached 81.02 μmol g^{-1}, and TE_{FRAP} - 715.63 μmol g^{-1}) was detected at the beginning of the fruit development period. The statistical correlation analysis showed a very strong positive correlation between the total amount of the identified phenolic compounds and the reducing activity of the apple extracts (Spearman's correlation coefficient – R=0.927, $p<0.01$). There was also a strong positive correlation between the total amount of phenolic compounds and the antiradical activity of the apple extracts (R=0.770, $p<0.01$). Among individual compounds that have been identified and quantitatively evaluated via high-performance liquid chromatography (HPLC), the strongest correlation with antiradical and reducing activity was observed for quercetin glycosides – isoquercitrin (respectively, R=0.851 and 0.845, $p<0.01$) and hyperoside (R=0.770 and 0.891 $p<0.01$).

Keywords: Apples; phenolic compounds; phloridzin; antioxidant activity; HPLC.

1. INTRODUCTION

Over the recent years, the society has been showing a growing interest in healthy lifestyle, ecological food products, botanical medicines and dietary supplements [1]. In addition to the main function – the supply of the necessary nutrients and energy for the human body – food products may also strengthen the body, have a prophylactic effect, and reduce the risk of diseases [2]. The growing interest in botanical raw materials broadens the possibilities of their use in medicine, cosmetics and food industry. It also stimulates the application of modern methods for the evaluation and description of the resources and chemical composition of botanical raw material, its analysis techniques, and its effect on the human body, as well as the compilation and presentation of recommendations for use.

Apples play an important role in human nutrition – they are among the most widely used fruit in the world [3,4]. Apples are widely used in food industry to produce various food products and drinks (juice, wine, cider), and are also used unprocessed [5]. Apples are an important source of various biologically active substances for the human body [6]. They contain abundant phenolic compounds, organic acids, vitamins (mostly ascorbic acid), macro- and microelements, and dietary fibre [3,7]. These substances are important for the physiological processes in the body, and their deficiency results in the body's susceptibility to disease, which, in turn, leads to greater morbidity.

Phenolic compounds are an important group of botanical biologically active compounds that have an organism-strengthening and disease-preventing effect [8]. The significant correlation between the consumption of food products rich in polyphenolic compounds and a reduced risk of cardiovascular diseases, degenerative diseases and cancer has been proven in a number of epidemiological studies [9,10,11]. Phenolic compounds have a strong antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory, antiviral, antiallergic, and vasodilating effect [12-14]. They suppress lipid peroxidation and platelet aggregation, and reduce permeability and fragility of capillaries [14,15].

The evaluation and comparison of the accumulation of biologically active substances in various organs of a plant during the vegetation period is relevant, as such studies promote better understanding of the regularities in the accumulation of biologically active compounds. These studies are also important in searching for botanical raw materials accumulating high amounts of phenolic compounds, and ensuring the quality of such materials and the products manufactured from them.

We conducted a study on the composition and antioxidant activity of phenolic compounds in apple cultivars grown in Lithuania [16,17]. It is

relevant to analyse the variation of the phytochemical composition of phenolic compounds in apples during their development and maturation periods. The results of this study provide new knowledge about the variations in the quantitative composition and antioxidant activity of individual phenolic compounds in the fruit of apple cultivars grown in Lithuanian climatic conditions during their different phenological growth stages. This will provide an opportunity for supplying the consumers with high-quality apples and their products with pre-determined phenolic compound composition, and also will allow for planning the isolation of individual phenolic compounds accumulated in these apples.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Plant Material

Studied fruit samples of the 'Ligol' apple cultivar. The 'Ligol' cultivar (a winter cultivar bred in Poland) is one of the main cultivars in commercial apple orchards in Lithuania. The apple trees were grown in the experimental orchard (block 2, row 4, trees 21-40) of the Institute of Horticulture, Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry, Babtai, Lithuania (55°60′ N, 23°48′ E). The altitude of Babtai town is 57 m above the sea level. The trees were trained as slender spindle. Pest and disease management were carried out according to the rules of the integrated plant protection. The experimental orchard was not irrigated. Tree fertilization was performed depending on the results of the soil and leaf analysis. Nitrogen was applied before flowering at the rate of 80 kg ha^{-1}, and potassium was applied after harvest at the rate of 90 kg ha^{-1}. Soil conditions of the experimental orchard were the following: clay loam, pH – 7.3, humus – 2.8%, P_2O_5 – 255 mg kg^{-1}, and K_2O – 230 mg kg^{-1}.

The temperature during the vegetation was close to the annual averages with the exception of a hot period at the beginning of August. The amount of precipitations was not evenly distributed, with some dry periods in June, August, and October. Overall, there were no extremes that could have affected the normal development of apple trees. Daily minimum temperatures indicate autumn frosts, which were recorded 6 nights at the end of September – the beginning of October. Such long cold periods might interrupt leaf activity.

Apples were collected at monthly intervals right after the June drop and at weekly intervals during the final fruit ripening period beginning on September 9 (Table 1). The sample consisted of 20 fruits taken from the mid part of the outer canopy.

Apples were cut into slices of equal size (up to 1 cm in thickness), and the stalks and the seeds were removed. The apple slices were immediately frozen in a freezer (at –35°C) with air circulation. The apple samples were lyophilized with a ZIRBUS sublimator 3×4×5/20 (ZIRBUS technology, Bad Grund, Germany) at the pressure of 0.01 mbar (condenser temperature, −85°C). The lyophilized apple slices were ground to fine powder (about 100 µm) by using a knife mill Grindomix GM 200 (Retsch, Haan, Germany).

Loss on drying before the analysis was determined by drying the apple lyophilisate in a laboratory drying oven to complete the evaporation of water and volatile compounds (temperature: 105°C; the difference in weight between measurements: up to 0.01 g) and by calculating the difference in raw material weight before and after drying [19]. The data were recalculated for absolute dry lyophilisate weight.

Table 1. Sampling dates and phenological growth stages (Based on Meier et al. 2001 [18])

Date	Day of the year	DAFB	BBCH stages	Phenological growth stage
June 17	168	31	74	
July 15	196	59	75	
Aug. 12	224	87	76	Fruit development
Sept. 9	252	115	77	
Sept. 16	259	122	79	
Sept. 23	266	129	81	
Sept. 30	273	136	85	
Oct. 7	280	143	87	Fruit maturation
Oct. 14	287	150	87	
Nov. 04	308	171	89	

2.2 Chemicals

All solvents, reagents, and standards used were of analytical grade. Acetonitrile and acetic acid were obtained from Sigma-Aldrich GmbH (Buchs, Switzerland), and ethanol - from Stumbras AB (Kaunas, Lithuania). Hyperoside, rutin, quercitrin, phloridzin, procyanidin B1, procyanidin B2, and chlorogenic acid standards were purchased from Extrasynthese (Genay, France), reynoutrin, (+)-catechin and (−)-epicatechin - from Sigma-Aldrich GmbH (Buchs, Switzerland), and avicularin, procyanidin C1, and isoquercitrin - from Chromadex (Santa Ana, USA). 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•) radical, sodium acetate trihydrate, iron (III) chloride hexahydrate, and 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ) were obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). In the study, we used deionized water produced by using the Crystal E HPLC (Adrona SIA, Riga, Latvia) water purification system.

2.3 Extraction

The extraction of apple samples was carried out under conditions analogous to those described by Liaudanskas et al. [20].

2.4 High Performance Liquid Chromatography

The phenolic compounds of the apple samples were separated, identified, and quantified by applying HPLC - similarly to the technique described in previous studies [17,20].

2.5 Determination of Antioxidant Activity

2.5.1 DPPH• free radical scavenging assay

The DPPH• free radical scavenging activity was determined by applying the method proposed by Brand-Williams et al. [21]. The DPPH• solution in 96.3% v/v ethanol (3 mL, 6×10^{-5} M) was mixed with 10 μL of the apple ethanol extract. A decrease in absorbance was determined at a wavelength of 515 nm after keeping the samples for 30 minutes in the dark.

2.5.2 FRAP assay

The ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay was performed as described by Benzie and Strain [22]. The working FRAP solution included TPTZ (0.01 M dissolved in 0.04 M HCl), $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (0.02 M in water), and acetate buffer (0.3 M, pH 3.6) at the ratio of 1:1:10. A volume of 3 mL of a freshly prepared FRAP reagent was mixed with 10 μL of the apple leaf extract. An increase in absorbance was recorded after 30 minutes at a wavelength of 593 nm.

2.5.3 Calculation of antioxidant activity of the apple ethanol extracts

The antioxidant activity of the extracts was calculated from the Trolox calibration curves and was expressed as μmoL Trolox equivalent (TE) per one gram of absolutely dry weight (DW). The TE was calculated according to the following formula: $TE = c\times V/m$ (μmol g^{-1}); where c – the concentration of Trolox established from the calibration curve (in μM); V – the volume of apple fruit or leaf extract (in L); and m – the weight (precise) of lyophilized leaf powder (in g).

2.6 Methods of Statistical Data Processing

All data in the text and the figures are presented as the mean ± standard deviation calculated from three consecutive tests. The correlation was evaluated by Spearman's analysis. Differences at $p < 0.05$ were considered to be statistically significant. Calculations were made using computer software Microsoft Office Excel 2003 and SPSS 20.0 (Chicago, USA).

3. RESULTS AND DISCUSSION

Changes in the qualitative and quantitative composition of secondary metabolites in apples during their development and maturation periods determine the organoleptic properties of the apples [23] and influence their biological effect. Compared to the main apple growing regions, Lithuanian climatic conditions are characterized by cooler summers, greater variations between daytime and night-time temperatures, and earlier fall frosts. This results in a shorter vegetation period and an earlier and more intensive coloration of the apples [24,25]. It is thus relevant to study the variation in the quantitative composition of phenolic compounds in the apples grown in Lithuania during the vegetation period of the apple trees, to compare the obtained results with those published by other researchers, and to identify the time periods when the apples contain the highest amounts of flavonoids and phenolic acids.

Apple is the main fruit crop in commercial orchards in Lithuania. Apple plantations occupy

more than 2000 ha, or more than 90% of all commercially grown fruit trees. Annual apple yields vary from 80 000 to 120 000 t. Most apples are grown for fresh consumption, but a significant part (around 25-30%) is suited for processing. Due to the cultivar selection, Lithuanian apple juice concentrate is distinguishable for its high acidity. Investigating the mode of the accumulation of bioactive substances could help enrich other processed apple products as well.

The cultivar (Cv.) 'Ligol' is one of main apple varieties grown in Lithuania and occupies more than 20% of new apple plantations. Cv. 'Ligol' is the most productive variety in Lithuania producing up to 80 t ha^{-1} yields. 'Ligol' fruits are very large, tasty, and have a good appearance, but they require special care in older orchards. Mature trees, if not well pruned and trained, produce a high proportion of discoloured fruits with somewhat worse flavour. At the same time, 'Ligol' trees, if not properly thinned, are over-cropping and produce much smaller fruits. All these second-class fruits could be a good source for processing purposes.

We studied changes in the dynamics of the quantitative composition of phenolic compounds in the samples of the 'Ligol' apple cultivar during the development and the maturation periods of the fruit. Phenolic compounds of different groups were identified in the ethanol extracts of the studied apple samples – quercetin glycosides (rutin, hyperoside, isoquercitrin, reynoutrin, avicularin, quercitrin), dihydrochalcones (phloridzin), monomeric and oligomeric flavan-3-ols ((+)-catechin, (−)-epicatechin, procyanidin B1, procyanidin B2 and procyanidin C1), and phenolic acids (chlorogenic acid). The chromatogram of the ethanol extract of the apple samples is presented in Fig. 1.

Flavonols (quercetin glycosides) were the most abundant group of phenolic compounds identified in apple samples. Quercetin glycosides together with compounds of the flavan-3-ol group are most responsible for the antioxidant effect of the complex of phenolic compounds in apples [26]. Flavonols possess anticancer properties due to antioxidant mechanisms and by inducing caspase-3 activity [27]. Quercetin and its derivatives affect cytochrome P450 1A1 enzymes participating in carcinogenesis [28,27].

The total amount of quercetin glycosides comprised 11.8−16.43% of all identified and quantitatively evaluated phenolic compounds. The highest concentrations of hyperoside (0.762±0.025 mg g^{-1}), quercitrin (1.014±0.043 mg g^{-1}) and avicularin (0.739±0.030 mg g^{-1}) were detected in apple samples collected at the beginning of the development period (31 DAFB). Subsequently, during the development and maturation of the apples, the amounts of these compounds were decreasing. The lowest amounts of quercitrin and avicularin were detected in apple samples collected during the maturation period of the apples (143 DAFB) (Fig. 2). At the end of the vegetation period, when the apples reached the consumption-level of maturation (171 DAFB), the concentration of hyperoside was 0.177±0.006 mg g^{-1}, the concentration of quercitrin – 0.139±0.006 mg g^{-1}, and the concentration of avicularin – 0.091 ± 0.004 mg g^{-1} (Fig. 2).

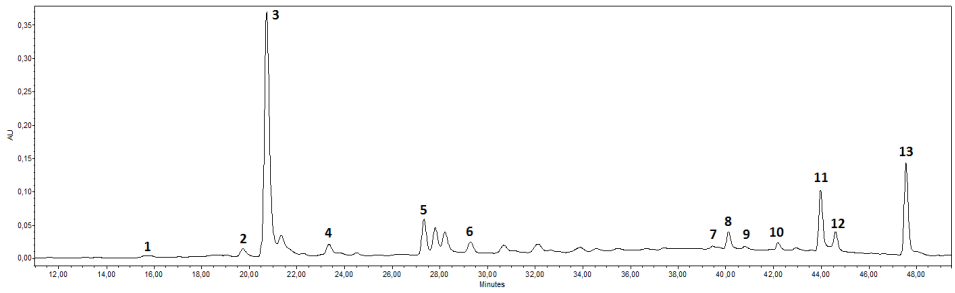


Fig. 1. Chromatogram of the ethanol extract of the 'Ligol' apple sample (λ = 280 nm). Numbers indicate the peaks of analytes: 1: Procyanidin B1, 2: (+)-catechin, 3: Chlorogenic acid, 4: Caffeic acid, 5: (–)-epicatechin, 6: Procyanidin C1, 7: rutin, 8: Hyperoside, 9: Isoquercitrin, 10: Reynoutrin, 11: Avicularin, 12: Quercitrin and 13: Phloridzin

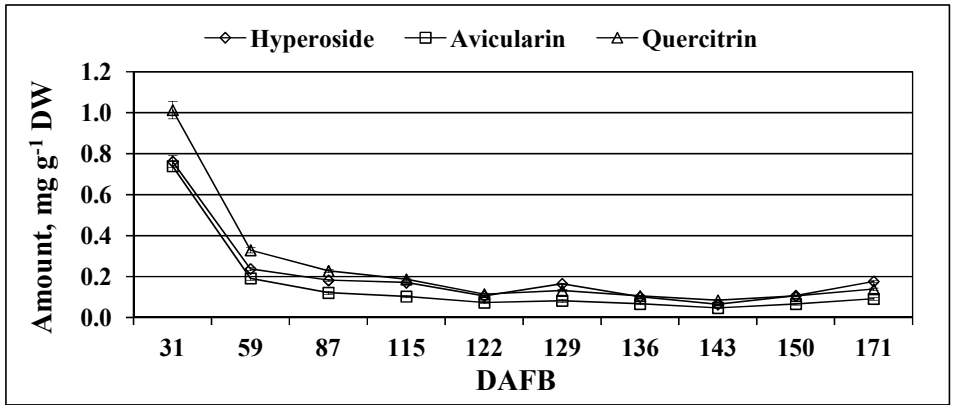


Fig. 2. Variation in the quantitative composition of quercitrin, hyperoside and avicularin in apple samples throughout the vegetation period

The concentrations of isoquercitrin, rutin and reynoutrin detected in apple samples were lower than those of other quercetin glycosides. The variation in the quantitative composition of these compounds throughout the vegetation period is presented in Fig. 3. The highest concentrations of rutin (0.041±0.002 mg g^{-1}), isoquercitrin (0.104±0.004 mg g^{-1}) and reynoutrin (0.092±0.005 mg g^{-1}) were detected at the beginning of the phenological stage of the development of the apples (31 DAFB). The lowest concentrations of these compounds were detected during the phenological stage of the apple maturation (143 DAFB). When apples reached the consumption-level of maturation (on the 308th day of the year), the detected concentration of rutin was 0.029±0.001 mg g^{-1}, the concentration of isoquercitrin – 0.033±0.001 mg g^{-1}, and the concentration of reynoutrin – 0.019 mg g^{-1} (Fig. 3). The concentration of rutin was the lowest of all identified compounds of the quercetin glycoside group throughout the vegetation period. The results of our study on the variation in the quantitative composition of quercetin glycosides were supported by those obtained by other researchers: samples of mature apples contained lower concentrations of quercetin glycosides, compared to samples obtained at the beginning of the development period [29,30].

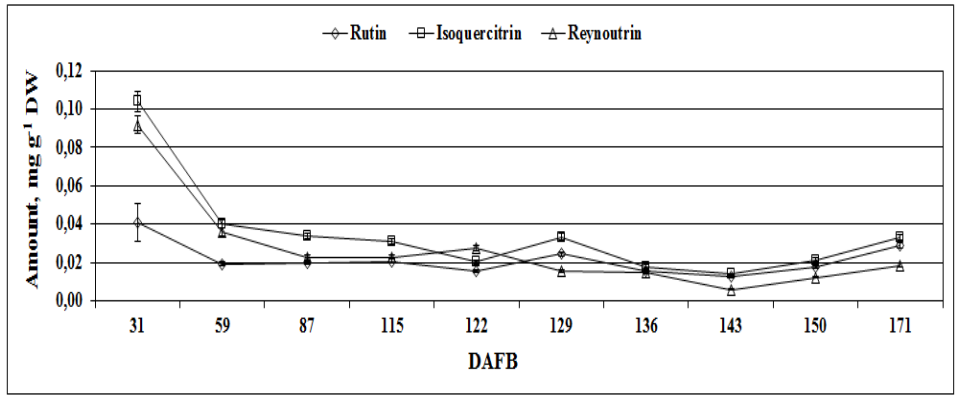


Fig. 3. Variation in the quantitative composition of rutin, isoquercitrin and reynoutrin in apple samples throughout the vegetation period

During the study, we identified and quantitatively evaluated monomeric flavan-3-ols – (+)-catechin and (–)-epicatechin. They comprised 9.5–16.7% of all the identified phenolic compounds. The highest concentrations of (+)-catechin and (–)-epicatechin were detected at the beginning of the phenological stage of fruit development (31 DAFB) – 0.690±0.027 mg g^{-1} and 1.875±0.078 mg g^{-1} respectively (Fig. 4). During the fruit development, the concentrations of (+)-catechin and (–)-epicatechin were decreasing. The concentrations of (+)-catechin detected at the beginning of the phenological stage of apple maturation (129 DAFB) were 19 times lower, and the concentration of (–)-epicatechin – 8.3 times lower than those detected at beginning of the fruit development period (on the 168th day of the year). Changes in the concentrations of these compounds during apple maturation (129–171 DAFB) were only slight. The lowest concentrations of (+)-catechin and (−)-epicatechin were detected in apple samples collected on 143 DAFB (Fig. 4). Similar regularities were observed by Awad et al. [29] who analysed the changes in the quantitative composition of catechins in apple peel samples.

We also identified and quantitatively evaluated 3 oligomeric flavan-3-ols (procyanidins) in the extracts of the studied apple samples – procyanidin B1, procyanidin B2, and procyanidin C1. Various studies confirm that flavan-3-ols, especially procyanidins, have strong antioxidant properties [31,4,32] and can act as radical scavengers [33], may inhibit certain oxidases (lipoxygenase cyclooxygenase, myeloperoxidase, NADPH oxidase, and xanthine oxidase), or may promote antioxidant enzymes (superoxide dismutase and catalase) [34]. Procyanidins isolated from apples have an antineoplastic effect [35], a strong antioxidant effect [26], an anti-inflammatory effect [36], a cholesterol- and triglyceride-lowering effect [37], and a positive effect on the cardiovascular system [38,39], and therefore they are among the most promising phenolic compounds in apples. Toda et al. [40] suggested that apple products containing significant amounts of procyanidins have a neuroprotective effect by suppressing amyloid-β-protein aggregation. The oligomeric procyanidins identified in apple samples comprised 10.2–28.6% of all the identified and quantitatively evaluated compounds. The analysis of the quantitative composition of apple samples showed that throughout the vegetation period, the concentration of procyanidin B1 ranged from 0.015 mg g^{-1} to 0.239 mg g^{-1}, the concentration of procyanidin B2 – from 0.335 mg g^{-1} to 1.853 mg g^{-1}, and the concentration of procyanidin C1 – from 0.007 mg g^{-1} to 0.045 mg g^{-1} (Fig. 5). The highest concentrations of these compounds were detected in apple samples collected at the beginning of the phenological stage of fruit development (31 DAFB), while the lowest concentrations of procyanidin B1 and procyanidin B2 were detected in apple samples c ollected during the fruit maturation period (143 DAFB). At the end of the vegetation period, when apples reached the consumption-level maturation, the detected concentration of procyanidin B1 was 0.118±0.005 mg g^{-1}, the concentration of procyanidin B2 – 0.645±0.029 mg g^{-1}, and the concentration of procyanidin C1 – 0.011 mg g^{-1}.

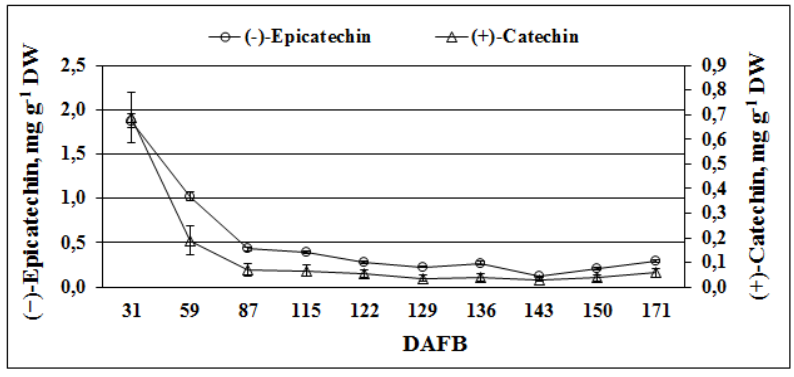


Fig. 4. Variation in the quantitative composition of (+)-catechin and (–)-epicatechin in apple samples throughout the vegetation period

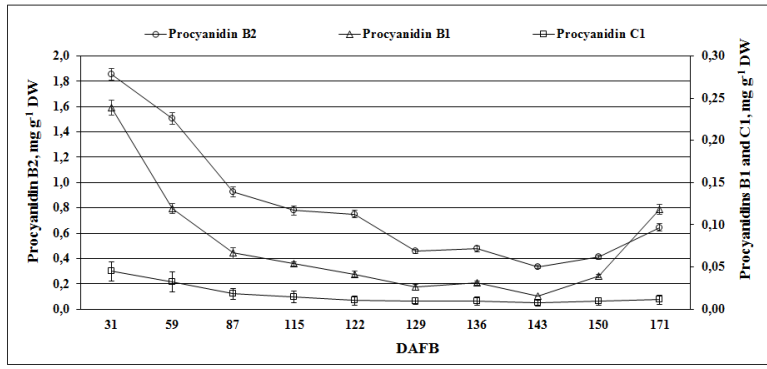


Fig. 5. Variation in the quantitative composition of procyanidin B1, procyanidin B2, and procyanidin C1 in apple samples throughout the vegetation period

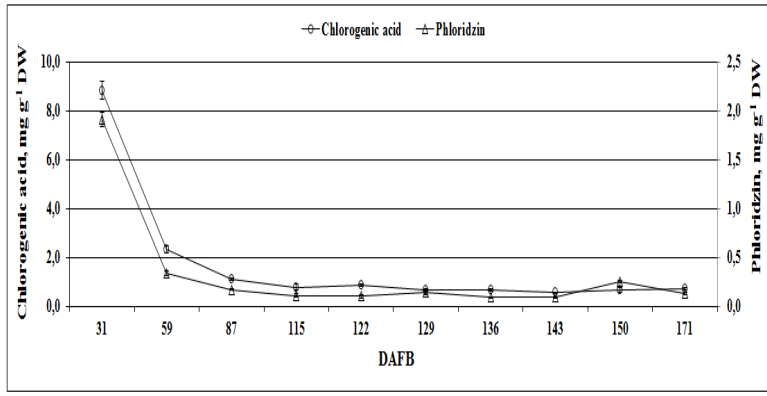


Fig. 6. Variation in the quantitative composition of phloridzin and chlorogenic acid in apple samples throughout the vegetation period

A compound of the dihydrochalcone group, phloridzin, was detected in apple samples. Qualitative and quantitative analysis of phloridzin is of great importance as this compound can be regarded as a chemotaxonomic marker for the identification of apple cultivars as well as products made from apples [41-43]. In the studied samples, this compound comprised 3.44–11.25% of all identified and quantitatively evaluated phenolic compounds. The highest concentrations of phloridzin (1.916±0.074 mg g^{-1}) were detected in apple samples collected at the beginning of the fruit development period (31 DAFB). The concentration of phloridzin (0.334±0.016 mg g^{-1}) detected in apple samples collected during apple development, after the shedding of apple embryos (59 DAFB), was 5.74 times lower than that detected on 31 DAFB. The lowest concentration of this compound was detected on 136 and 143 DAFB – 0.089±0.003 mg g^{-1}. When apples reached the consumption-level maturation (171 DAFB), the detected concentration of phloridzin was 0.134±0.010 mg g^{-1} (Fig. 6). Similar regularities in the variation of the compounds of the dihydrochalcone group during the phenological stages of fruit development and maturation were observed by Renard et al. who studied the phytochemical composition of apple peels and flesh [44].

Chlorogenic acid is one of the most important derivatives of cinnamic acid, characterized by notable antioxidant activity and detected in almost all apple cultivars [45,46,47]. Chlorogenic acid was the predominant compound throughout the vegetation period. It comprised 24–32.12% of all identified phenolic compounds. The results confirm the findings of other studies indicating

that chlorogenic acid in apples is one of the most common phenolic compounds [31,4,48]. The highest concentrations of chlorogenic acid (8.844±0.381 mg g^{-1}) were detected in apple samples collected at the beginning of the fruit development period (on the 168th day of the year). On the 196th day of the year, during fruit development, the amount of this compound decreased 3.81 times. The lowest concentrations of chlorogenic acid (0.56±0.03 mg g^{-1}) were detected during the fruit maturation period (143 DAFB). When apples reached the consumption-level maturation, the concentration of this acid reached 0.73±0.04 mg g^{-1}. Similar regularities in the variation of the quantitative composition of chlorogenic acid in apple peel samples throughout the vegetation period were observed by Awad et al. These authors indicated that the highest amounts of chlorogenic acid were accumulated in apple peel samples collected at the beginning of the fruit development period [29].

The analysis of change dynamics in the quantitative composition of all identified phenolic compounds during the apple development and maturation periods showed that the highest amounts of these compounds were accumulated at the beginning of the fruit development period. As the apples were maturing, the concentrations of phenolic compounds were decreasing. There is a general agreement that the concentration of phenolic compounds is very high in young fruits and then rapidly decreases during fruit development. This regularity is characteristic of apples as well as of other fruit [49,50, 51,29,52,53].

3.1 Evaluation of the Antioxidant Activity of Apple Sample Extracts

The benefit of phenolic compound-accumulating botanical raw materials for human health has been proven by abundant data from a number of studies [54-56]. Antioxidant activity is one of the most important biological characteristics of phenolic compounds closely related to their antineoplastic, anti-inflammatory, and cardioprotective effect [57,58,59].

We conducted the evaluation of the variation in antiradical and reduction activity of apple extracts throughout the vegetation period (Figs. 7 and 8). The strongest antiradical and reduction effect was observed in apple samples collected at the beginning of the development period (31 DAFB) (TE_{DPPH} reached 81.02 μmol g^{-1}, and TE_{FRAP} - 715.63 μmol g^{-1}, respectively).

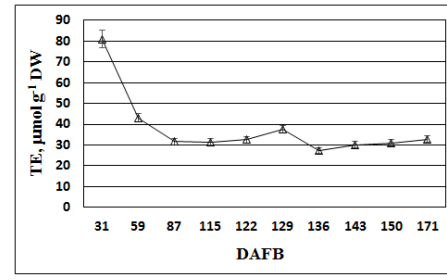


Fig. 7. Variation in antiradical activity of apple sample extracts throughout the vegetation period

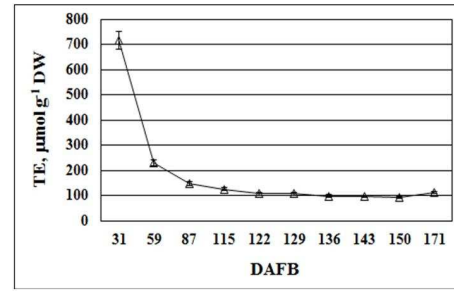


Fig. 8. Variation in reduction activity of apple sample extracts throughout the vegetation period

As apples were developing and maturing, the antioxidant activity was decreasing. The weakest antiradical activity (TE_{DPPH}=27.42 μmol g^{-1}) was observed in the extracts of apple samples collected on 136 DAFB, and the weakest reduction activity (92.15 μmol g^{-1}) – in the extracts of apple samples collected on 150 DAFB. When apples reached the consumption-level maturation, the antiradical activity of apple extracts reached 32.85 μmol g^{-1}, and their reduction activity reach 112.57 μmol g^{-1} (Figs. 7 and 8).

3.2 Results of the Correlation Analysis

The statistical correlation analysis revealed a very strong correlation between the total amount of phenolic compounds identified via the HPLC technique and the reduction activity of apple extract (Spearman's correlation coefficient R=0.927, $p<0.01$). In addition, a strong

correlation was found between antiradical activity of the analysed apple extracts and the total amount of quantitatively evaluated phenolic compounds ($R=0.770$, $p<0.01$).

Among individual compounds that have been identified and quantitatively evaluated via HPLC, the strongest correlation with antiradical and reduction activity was observed for quercetin glycosides – isoquercitrin ($R=0.851$ and 0.845 respectively, $p<0.01$), hyperoside ($R=0.770$ and 0.891 $p<0.01$), avicularin ($R=0.770$ and 0.976 $p<0.01$), and quercitrin ($R=0.784$ and 0.967 $p<0.01$). Other previously published studies also reported strong correlative connection between phenolic content in apple samples and the antioxidant activity of plant extracts evaluated by different assays [30,60]. HPLC post-column assays should be performed to evaluate the variation in antioxidant activity of individual phenolic compounds.

4. CONCLUSION

The results of the evaluation of variations in the quantitative composition of phenolic compounds in apples showed that the highest amounts of all identified phenolic compounds were accumulated in apples at the beginning of the phenological stage of fruit development (31 DAFB). Over the vegetation period, as the apple mass was increasing, the concentration of phenolic compounds was decreasing. During the fruit development and maturation periods, the total concentration of the quantitatively evaluated phenolic compounds ranged from 20.97±0.74 mg g^{-1} (31 DAFB) to 2.96±0.12 mg g^{-1} (171 DAFB). Research data have shown that the total concentration of phenolic compounds in mature apples suitable for picking and further storage ranges from 1.61±0.05 mg g^{-1} (143 DAFB) to 2.96±0.12 mg g^{-1} (171 DAFB).

During the fruit development period, the quantitative composition of quercetin glycosides could be arranged in the following descending order:rutin<reynoutrin<isoquercitrin<avicularin<hyperoside<quercitrin. At the end of the vegetation period, the quantitative composition and the ratio of quercetin glycosides changed to form the following descending sequence: rutin <isoquercitrin<avicularin<reynoutrin<quercitrin<hyperoside. Chlorogenic acid was the predominant compound among the identified individual phenolic compounds throughout the vegetation period.

The strongest antiradical (TE_{DPPH}=81.02 μmol g^{-1}) and reduction (TE_{FRAP}=715.63 μmol g^{-1}) activity was observed in the extracts of apple samples collected at the beginning of the phenological stage of fruit development (31 DAFB). The biologically active compound complex that accumulated in apples has an antioxidant effect, which makes this botanical raw material beneficial for human health.

COMPETING INTERESTS

Authors have declared that no competing interests exist.

REFERENCES

1. Cohen MH. Legal and ethical issues in complementary medicine: A United States perspective. Med J Aust. 2004;181(3): 168-169.
2. Sekmokienė D, Liutkevičius A, Malakauskas M. Funkcionalusis maistas ir jo veikliosios dalys. Vet Zootech Lith. 2007;37(59):72-78.
3. Wu J, Gao H, Zhao L, Liao X, Chen F, Wang Z. et al. Chemical compositional characterization of some apple cultivars. Food Chem. 2007;103(1):88−93.
4. Ceymann M, Arrigoni E, Schärer H, Bozzi NA, Hurrell RF. Identification of apples rich in health-promoting flavan-3-ols and phenolic acids by measuring the polyphenol profile. J Food Comp Anal. 2012;26(1):128–35.
5. Marks SC, Mullen W, Crozier A. Flavonoid and chlorogenic acid profiles of English cider apples. J Sci Food Agr. 2007;87(4): 719−28.
6. Belviso S, Scursatone B, Re G, Zeppa G. Novel data on the polyphenol composition of Italian ancient apple cultivars. International Journal of Food Properties. 2013;16(7):1507-1515.
7. Krawitzky M, Arias E, Peiro JM, Negueruela AI, Val J, Oria R. Determination of color, antioxidant activity, and phenolic profile of different fruit tissue of Spanish 'Verde Doncella' apple cultivar. International Journal of Food Properties. 2014;17(10):2298-2311.
8. El Gharras H. Polyphenols: Food sources, properties and applications – a review. International Journal of Food Science and Technology. 2009;44:2512-2518.
9. Weichselbaum E, Wyness L, Stanner S. Apple polyphenols and cardiovascular

disease–a review of the evidence. Nutrition Bulletin. 2010;35(2):92-101.
10. Spencer JPE. The impact of fruit flavonoids on memory and cognition. British Journal of Nutrition. 2010;104:S40-S47.
11. Link A, Balaguer F, Goel A. Cancer chemoprevention by dietary polyphenols: Promising role for epigenetics. Biochemical Pharmacology. 2010;80: 1771–1792.
12. Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. Oxid Med Cell Longev. 2009; 2:270-278.
13. Cushnie TPT, Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. International Journal of Antimicrobial Agents. 2005;26:343-356.
14. Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. Pharmacology & Therapeutics. 2002;96: 67-202.
15. Hollman PC, Hertog MG, Katan MB. Role of dietary flavonoids in protection against cancer and coronary heart disease. Biochem Soc Trans. 1996;24:785-789.
16. Liaudanskas M, Viškelis P, Jakštas V, Raudonis R, Kviklys D, Milašius A, Janulis V. Application of an optimized HPLC method for the detection of various phenolic compounds in apples from Lithuanian cultivars. Journal of Chemistry. 2014;10.
Article ID 542121.
DOI: 10.1155/2014/542121
17. Kviklys D, Liaudanskas M, Janulis V, Viškelis P, Rubinskienė M, Lanauskas J, Uselis N. Rootstock genotype determines phenol content in apple fruits. Plant, Soil and Environment. 2014;60(5):234-240.
18. Meier U, Editor. Growth stages of mono and dicotyledonous plants. BBCH Monograph. German Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, Berlin. 2001;52-53.
19. European Pharmacopoeia, Council of Europe, Strasbourg, France, 7th Edition. 2010;51:1.
20. Liaudanskas M, Viškelis P, Kviklys D, Raudonis R, Janulis V. A comparative study of phenolic content in apple fruits. International Journal of Food Properties. 2015;18(5):945-953.
21. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT—Food Science and Technology. 1995;28(1):25-30.
22. Benzie IFF, Strain JJ. Ferric reducing/ antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. Methods in Enzymology. 1998;299:15-27.
23. Zhang Y, Li P, Cheng L. Developmental changes of carbohydrates, organic acids, amino acids, and phenolic compounds in 'Honeycrisp' apple flesh. Food Chem. 2010;123(4):1013−8.
24. Kviklys D, Kviklienė N, Bite A, Lepsis J, Univer T, Univer N, et al. Baltic fruit root-stock studies: Evaluation of 12 apple rootstocks in North-East Europe. Hortsci. 2012;39(1):1-7.
25. Kviklys D, Kviklienė N, Bielicki P, Bite A, Lepsis J, Univer T, et al. Baltic fruit rootstock studies: Evaluation of apple (*Malus domestica* Borkh.) new rootstocks. Žemdirbystė. 2013;100(4):441-6.
26. Bai X, Zhang H, Ren S. Antioxidant activity and HPLC analysis of polyphenol-enriched extracts from industrial apple pomace. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2013;93(10):2502-2506.
27. Gerhauser C. Cancer chemopreventive potential of apples, apple juice, and apple components. Planta Medica. 2008;74: 1608-1624.
28. Hyson DA. A comprehensive review of apples and apple components and their relationship to human health. Advances in nutrition: An International Review Journal. 2011;2:408-420.
29. Awad MA, de Jager A, van der Plas LH, van der Krol AR. Flavonoid and chlorogenic acid changes in skin of 'Elstar' and 'Jonagold' apples during development and ripening. Sci Hort. 2001;90(1):69-83.
30. Zheng HZ, Kim YI, Chung SK. A profile of physicochemical and antioxidant changes during fruit growth for the utilisation of unripe apples. Food Chemistry. 2012; 131(1):106-110.
31. Duda-Chodak A, Tarko T, Satora P, Sroka P, Tuszyński T. The profile of polyphenols and antioxidant properties of selected apple cultivars grown in Poland. J Fruit Ornam. Plant Res. 2010;18(2):39−50.
32. Aron PM, Kennedy JA. Flavan-3-ols: Nature, occurrence and biological activity. Molecular Nutrition and Food Research. 2008;52:79-104.

33. Carbone K, Giannini B, Picchi V, Lo Scalzo R, Cecchini F. Phenolic composition and free radical scavenging activity of different apple varieties in relation to the cultivar, tissue type and storage. Food Chemistry. 2011;127:493-500.
34. Han X, Shen T, Lou H. Dietary polyphenols and their biological significance. International Journal of Molecular Sciences. 2007;8:950-988.
35. Maldonado-Celis ME, Bousserouel S, Gossé F, Minker C, Lobstein A, Raul F. Differential induction of apoptosis by apple procyanidins in TRAIL-sensitive human colon tumor cells and derived TRAIL-resistant metastatic cells. Journal of Cancer Molecules. 2009;5(1):21-30.
36. Andre CM, Greenwood JM, Walker EG, et al. Anti-inflammatory procyanidins and triterpenes in 109 apple varieties. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2012;60(42):10546-10554.
37. Serra AT, Rocha J, Sepodes B, Matias AA, Feliciano RP, de Carvalho A, Bronze MR, Duarte CMM, Figueira ME. Evaluation of cardiovascular protective effect of different apple varieties – correlation of response with composition. Food Chemistry. 2012;135(4):2378-86.
38. Balasuriya N, Rupasinghe HPV. Antihypertensive properties of flavonoid-rich apple peel extract. Food Chemistry. 2012;135(4):2320-2325.
39. Byun EB, Korematsu S, Ishikawa T, et al. Apple procyanidins induce hyperpolarization of rat aorta endothelial cells via activation of K+ channels. Journal of Nutritional Biochemistry. 2012;23(3): 278-286.
40. Toda T, Sunagawa T, Kanda T, Tagashira M, Shirasawa T, Shimizu T. Apple procyanidins suppress amyloid beta-protein aggregation. Biochemistry Research International. 2011;2011:8. Article ID 784698.
41. Schieber A, Keller P, Carle R. Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography A. 2001; 910(2):265-273.
42. Alonso-Salces RM, Ndjoko K, Queiroz EF, et al. On-line characterisation of apple polyphenols by liquid chromatography coupled with mass spectrometry and ultraviolet absorbance detection. Journal of Chromatography A. 2004;1046(1-2):89-100.
43. Gosch C, Halbwirth H, Stich K. Phloridzin: Biosynthesis, distribution and physiological relevance in plants. Phytochemistry. 2010; 71(8-9):838-843.
44. Renard CM, Dupont N, Guillermin P. Concentrations and characteristics of procyanidins and other phenolics in apples during fruit growth. Phytochemistry. 2007; 68(8):1128–1138.
45. Lee KW, Kim YJ, Kim DO, Lee HJ, Lee CY. Major phenolics in apple and their contribution to the total antioxidant capacity. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2003;51:6516-6520.
46. Francini A, Sebastiani L. Phenolic compounds in apple (*Malus x domestica* Borkh.): Compounds characterization and stability during postharvest and after processing. Antioxidants. 2013;2:181-193.
47. Kahle K, Kraus M, Richling E. Polyphenol profiles of apple juices. Molecular Nutrition and Food Research. 2005;49:797-806.
48. Jakobek L, García - Villalba R, Tomás-Barberán FA. Polyphenolic characterisation of old local apple varieties from Southeastern European Region. J Food Comp Anal. 2013;31(2):199−211.
49. Mayr U, Treutter D, Santos-Buelga C, Bauer H, Feucht W. Developmental changes in the phenol concentrations of 'Golden Delicious' apple fruits and leaves. Phytochemistry. 1995;38(5):1151-1155.
50. Gordon A, Friedrich M, da Matta VM, Herbster Moura CF, Marx F. Changes in phenolic composition, ascorbic acid and antioxidant capacity in cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) during ripening. Fruits. 2012;67(04):267-276.
51. Ding CK, Chachin K, Ueda Y, Imahori Y, Wang CY. Metabolism of phenolic compounds during loquat fruit development. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2001;49(6):2883-2888.
52. Wang SY, Chen CT, Wang CY. The influence of light and maturity on fruit quality and flavonoid content of red raspberries. Food Chem. 2009;112:676–684.
53. Jaakola L, Määttä K, Pirttilä AM, Törrönen R, Kärenlampi S, Hohtola A. Expression of genes involved in anthocyanin biosynthesis in relation to anthocyanin, proanthocyanidin, and flavonol levels during bilberry fruit development. Plant Physiol. 2002;130:729–739.

54. Cai Y, Luo Q, Sun M, Corke H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. Life Sci. 2004; 74(17):2157-84.
55. Dai J, Mumpr RJ. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. Molecules. 2010;15(10):7313-52.
56. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. Journal of Nutritional Biochemistry. 2002;13:572–584.
57. Chithan K, Lung-Ta L, Ping-Ping HL, Jiuan-Jiuan H, Ferng-Chun K, Ying-Tung H, Ming-Ting L. The antitumor activities of flavonoids. *In vivo.* 2005;19:895-910.
58. Nijveldt RJ, Nood E, Hoorn DEC, Boelens PG, Norren K, Leeuwen PAM. Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. Am. J. Clin. Nutr. 2001;74:418-425.
59. Morton LW, Abu-Amsha Caccetta R, Puddey IB, Croft KD. Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds: Relevance to cardiovascular disease. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 2000;27(3):152-159.
60. Vieira FGK, Borges GDSC, Copetti C, Di Pietro PF, da Costa Nunes E, Fett R. Phenolic compounds and antioxidant activity of the apple flesh and peel of eleven cultivars grown in Brazil. Scientia Horticulturae. 2011;128(3):261-266.

© 2016 Liaudanskas et al.; This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Peer-review history:
The peer review history for this paper can be accessed here:
http://sciencedomain.org/review-history/16802