

# The effect of pomegranate aril paleness phenomenon on the secondary metabolites content and activity of phenylalanine amonialyase (PAL) enzyme at different stages of fruit development

## ABSTRACT

In order to reduce the damage caused by the pomegranate aril paleness disorder and the fundamental management of orchards, the present study was conducted to identify the most sensitive stage/stages of pomegranate fruit growth and development in relation to the changes of secondary metabolites and phenylalanine amonialyase (PAL) enzyme activity in two probable and improbable conditions for the occurrence of aril paleness. The stages of pomegranate fruit development included: fruit set (stage1), hazelnut size (stage 2), fast fruit growth (stage 3) and ripening (stage 4). Based on the results obtained, in both probable and improbable conditions for the occurrence of aril paleness, the changes in the total phenolics content (TPC) after the hazelnut size stage until the end of the fruit growth and development stage showed a downward and regular trend. Nevertheless, this decreasing trend in TPC was more intense in probable conditions compared to improbable conditions. The total flavonoid content (TFC) in improbable conditions, the first had a decreasing trend (from stage 1 to 3) and then an increasing trend (from stage 3 to 4) and in probable conditions, TFC changes from the beginning of fruit set to the end of fruit growth and development stage showed a regular downward trend. The content of cyanidin (Cyd) increased from stage 1 to stage 3 in both conditions; however, after the fast fruit growth stage (stage 3), a significant change in Cyd content was observed in improbable conditions (increasing trend) and probable conditions for the occurrence of paleness disorder (decreasing trend). Additionally, PAL enzyme activity was observed in all stages of pomegranate fruit growth and development under both conditions. In general, under improbable conditions for the occurrence of aril paleness, the most sensitive stage of pomegranate fruit growth and development with the most changes in the content of secondary metabolites was from the stage of hazelnut size to full ripening. Therefore, the fundamental management of orchards in order to reduce damage caused by heat stress is necessary in the stages of pomegranate fruit growth and development or the stage of construction of pomegranate orchards. Additionally, the alignment of changes in the activity of this enzyme with anthocyanin content in the first three stages of fruit growth and development indicates the participation of this enzyme in anthocyanin biosynthesis. On the other hand, the inconsistent trend of PAL enzyme activity and anthocyanin content (under improbable conditions) as well as the decrease in the activity of this enzyme in both probable and improbable conditions from stage 3 (fast fruit growth) to the end of pomegranate fruit growth and development showed that in addition to the PAL enzyme, the role of other enzymes of the flavonoid biosynthesis pathway in the accumulation and synthesis of anthocyanin in pomegranate fruit should not be ignored.

**Keywords:** Anthocyanin biosynthesis, Heat stress, Polyphenolic compounds, Pomegranate orchards

## اثر عارضه سفیدشدگی آریل انار بر محتوای متابولیت‌های ثانویه و فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لایاز (PAL) در مراحل مختلف نمو میوه

### چکیده

به منظور کاهش خسارت عارضه سفیدشدگی آریل انار و مدیریت اصولی باغات، مطالعه حاضر با هدف شناسایی حساس‌ترین مرحله از مراحل رشد و نمو میوه انار در خصوص تغییرات متابولیت‌های ثانویه و فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لایاز (PAL) در دو شرایط محتمل (وجود تنش گرمایی) و غیرمحتمل (عدم وجود تنش گرمایی) برای بروز عارضه سفیدشدگی اجرا گردید. مراحل رشد و نمو میوه انار شامل تشکیل میوه (مرحله ۱)، فندق‌شدن (مرحله ۲)، رشد سریع میوه (مرحله ۳) و رسیدن میوه (مرحله ۴) می‌باشد. بر اساس نتایج به دست آمده، در هر دو شرایط محتمل و غیرمحتمل برای بروز عارضه سفیدشدگی آریل انار، تغییرات در محتوای مواد فنلی کل (TPC) بعد از مرحله فندق‌شدن تا پایان مرحله رشد و نمو میوه روندی نزولی و منظم را نشان داد؛ با این وجود، این روند کاهشی در TPC در شرایط محتمل در مقایسه با شرایط غیرمحتمل از شدت بیشتری برخوردار بود. محتوای فلاونوئید کل (TFC) در شرایط غیرمحتمل، ابتدا روند کاهشی (از مرحله ۱ تا ۳) و سپس روند افزایشی (از مرحله ۳ تا ۴) داشته است و در شرایط محتمل، تغییرات TFC از شروع تشکیل میوه تا بلوغ میوه، روند نزولی و منظمی را نشان داد. محتوای آنتوسیانین (Cyd) از مرحله ۱ تا مرحله ۳، در هر دو شرایط مورد بررسی، روندی افزایشی داشته است؛ اما پس از مرحله رشد سریع میوه (مرحله ۳) تغییر قابل ملاحظه‌ای در محتوای Cyd در شرایط غیرمحتمل (روند افزایشی) و محتمل (روند کاهشی) برای بروز عارضه سفیدشدگی مشاهده گردید. همچنین در تمام مراحل رشد و نمو میوه انار تحت هر دو شرایط، فعالیت آنزیم PAL مشاهده گردید. در مجموع نتایج نشان داد که تحت شرایط محتمل برای بروز عارضه سفیدشدگی، حساس‌ترین مرحله رشد و نمو میوه انار با بیشترین تغییرات در محتوای متابولیت‌های ثانویه، از فاصله مرحله فندق‌شدن میوه تا رسیدگی کامل میوه بود. از این رو مدیریت اصولی باغ‌ها به منظور کاهش خسارت ناشی از تنش گرما در مراحل رشد و نمو میوه یا مرحله احداث باغ‌های انار ضروری می‌باشد. همچنین همسو بودن تغییرات فعالیت آنزیم PAL با Cyd در سه مرحله اول رشد و نمو میوه انار، نشان دهنده مشارکت این آنزیم در بیوسنتز آنتوسیانین آریل انار است. از سوی دیگر روند غیرهمسو فعالیت آنزیم PAL (کاهشی) و محتوای آنتوسیانین (افزایشی) در شرایط غیرمحتمل برای بروز عارضه سفیدشدگی و همچنین کاهشی فعالیت این آنزیم در هر دو شرایط محتمل و غیرمحتمل از مرحله ۳ تا بلوغ میوه انار نشان داد که علاوه بر آنزیم PAL، نقش سایر آنزیم‌های مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها در تجمع و سنتز آنتوسیانین میوه انار را نباید نادیده گرفت.

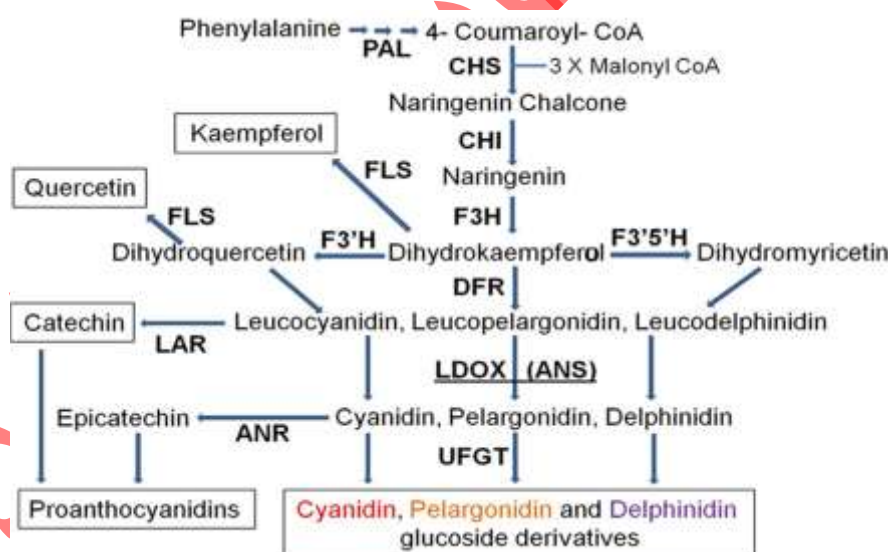
**واژه‌های کلیدی:** بیوسنتز آنتوسیانین، تنش گرمایی، ترکیبات پلی فنولیک، باغات انار

## مقدمه

تولید متابولیت‌های ثانویه در مراحل رشد و نمو تا رسیدگی میوه، پدیده‌ای ضروری است که کیفیت (طعم، بو و رنگ) و بازار پسندی میوه را تحت تاثیر قرار می‌دهد. همچنین بسیاری از این ترکیبات در صنایع دارویی، کشاورزی، غذایی و بهداشتی به‌طور گسترده استفاده می‌شوند (Gould & Lister, 2006). در بین متابولیت‌های ثانویه، فلاونوئیدها گروهی بزرگ و متعلق به کلاس فنیل پروپانویدها می‌باشند که نوع و میزان این ترکیبات فلاونوئیدی در بافت‌های مختلف، تفاوت‌های زیادی دارد؛ اما در بیشتر میوه‌ها نوع غالب، آنتوسیانین‌ها می‌باشند (Jaakola et al., 2002).

## پیشینه پژوهش

تاکنون بیش از ۵۶۰ مولکول آنتوسیانین در گیاهان مختلف شناسایی شده که این ترکیب فلاونوئیدی محلول در آب (در سیتوزول ساخته و در واکوئل ذخیره می‌شوند) عامل رنگ قرمز، نارنجی، ارغوانی، بنفش، آبی و سیاه در بسیاری از گل‌ها، برگ‌ها، میوه‌ها، سبزی‌ها و دانه‌ها هستند (Aizza & Dornelas, 2011). علاوه بر این، کمبود الکترون خصوصیت عمومی آنتوسیانین‌ها است که سبب فعال‌سازی آن‌ها در واکنش با اکسیژن فعال (ROS) و رادیکال‌های آزاد می‌گردد. بنابراین ساختار خاص آنتوسیانین‌ها به آن‌ها خاصیت آنتی‌اکسیدانی اهدا می‌کند (Jing et al., 2008). سیانیدین-۳-گلوکوزاید (Cyanidin-3-glucoside) یکی از متداول‌ترین آنتوسیانین‌ها در بافت‌های گیاهی است که علاوه بر ایجاد رنگدانه قرمز، دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی حدود ۳/۵ برابر بیشتر از ویتامین E می‌باشد (Jing et al., 2008). در مسیر بیوسنتز آنتوسیانین آنزیم فنیل آلانین آمونیلیاز (PAL) اولین آنزیم کلیدی و تعیین‌کننده در ابتدای مسیر تولید فنیل پروپانویدها است و عمل اصلی آن دآمین کردن غیراکسیداتیو آمینواسید فنیل آلانین و تبدیل آن به یون آمونیوم و ترانس سینامیک می‌باشد. فنیل آلانین پیش ماده اصلی سنتز فلاونوئیدها می‌باشد (Boudet, 2007) (شکل ۱).



شکل ۱. مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها که منجر به تولید آنتوسیانین‌ها و پروآنتوسیانیدین‌ها می‌گردد. اختصار نام آنزیم‌ها عبارت است از: PAL، فنیل آلانین آمونیلیاز؛ CHS، چالکون سنتاز؛ CHI، ایزومراز چالکون؛ F3H، فلاوانون ۳-هیدروکسیلاز؛ F3'H، فلاونوئید ۳-هیدروکسیلاز؛ F3'5'H، فلاونوئید ۳،۵-هیدروکسیلاز؛ FLS، فلاونول سنتاز؛ DFR، دی هیدروفلاونول ردوکتاز؛ LDOX، لوکوانتوسیانیدین اکسیداز؛ ANS، آنتوسیانیدین سنتاز؛ LAR، لوکوانتوسیانیدین ردوکتاز؛ ANR، آنتوسیانیدین ردوکتاز؛ UFGT، UDP-گلوکز: فلاونوئید ۳-O-گلوکزبیل ترانسفراز (بر گرفته از Ben-Simhon et al., 2015)

انار (*Punica granatum* L.) یکی از قدیمی‌ترین و محبوب‌ترین میوه‌های خوراکی است که متابولیت‌ها و ترکیبات زیست فعال متعددی از این گیاه گزارش شده است. اطلاعات موجود نشان می‌دهند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل ملاحظه‌ای انار به‌سبب محتوای بالای آنتوسیانین-های پوست و آب میوه آن است (Gil et al., 2000). هر چه مشتقات گلوکوزیدی آنتوسیانین‌ها در آریل بیشتر باشد، میوه‌ها از کیفیت و

بازارپسندی بالاتری برخوردار می‌باشند (Borochoy-Neori et al., 2009). با این وجود در یک دهه اخیر بروز عارضه سفیدشدگی آریل انار به‌عنوان عامل جدید و فراگیر در کاهش کیفیت میوه انار در بسیاری از کشورها و از جمله ایران، گزارش شده است (Meighani et al., 2014).

در عارضه سفیدشدگی، آریل‌ها بدشکل شده و شفافیت خود را از دست می‌دهند و مانند کریستال دارای ترک‌های فراوان بوده و رنگ آن‌ها از قرمز اناری شفاف با توجه به شدت عارضه، به سفید کرمی تا قهوه‌ای سوخته تغییر می‌نماید (Meighani et al., 2014). این عارضه در واقع نوعی اختلال فیزیولوژیک است که در طول دوره رشد و نمو میوه آغاز می‌گردد. در ارتباط با سفیدشدگی آریل انار دلایل متنوعی از جمله آفتاب سوختگی، کم آبی، خشکسالی (Meighani et al., 2014)، سرمای شدید (Mohseni et al., 2020)، شوری آب آبیاری و خاک (Sedaghat et al., 2021)، کاهش آنتوسیانین (Narjesi, 2021)، و کاهش عناصر غذایی و مواد فنلی (Asadi et al., 2019) گزارش شده است. مطالعه Sedaghat et al. (2021) نشان داد که بین میزان آنتوسیانین و درصد سفیدشدگی آریل انار رابطه منفی وجود دارد. همچنین Borochoy-Neori et al. (2009) گزارش دادند که مقدار آنتوسیانین‌ها در پوست و آریل میوه انار پرورش یافته در آب و هوای خنک به‌طور معنی‌داری بیشتر از میوه‌های رشد یافته در منطقه گرم‌تر است.

از بین مراحل مختلف رشد انار، پدیده رسیدن میوه ترکیبی پیچیده از بسیاری فرایندهای سلولی نظیر تغییر در ساختار دیواره سلولی آریل‌ها به‌دلیل تغییر محتوای لیگنین و سلولز (به‌منظور تغییر در سفتی آریل) (Zarei et al., 2016)، و تجمع هیدروکربن‌ها و به‌خصوص متابولیت‌های ثانویه می‌باشد (Shwartz et al., 2009). تولید متابولیت‌های ثانویه در طی رسیدن میوه، پدیده‌ای ضروری است که کیفیت میوه (رنگ، طعم و بو) و بازار پسندی میوه را تحت تاثیر قرار می‌دهد. اگر چه محدود مطالعاتی در خصوص سفیدشدگی انار گزارش شده است اما در خصوص روند تغییر متابولیت‌های ثانویه به‌عنوان فاکتور مهم تعیین‌کننده کیفیت میوه، بازار پسندی و همچنین خاصیت درمانی و دارویی در مراحل رشد میوه از شروع میوه‌دهی تا رسیدگی کامل انار، اطلاعات مدونی وجود ندارد. بنابراین این مطالعه با هدف: ۱) بررسی روند تغییرات متابولیت‌های ثانویه و فعالیت آنزیم PAL در انارهای دچار عارضه سفیدشدگی در مقایسه با انارهای فاقد عارضه از مرحله تشکیل میوه تا رسیدگی کامل و ۲) شناسایی مرحله/مراحل حساس رشد میوه در خصوص تجمع متابولیت‌های ثانویه به‌منظور اتخاذ بهترین شیوه مدیریتی باغات با هدف کاهش عارضه سفیدشدگی آریل انار، اجرا گردید.

## روش‌شناسی پژوهش

مطالعه حاضر طی دو سال (۱۴۰۱-۱۴۰۲) در باغ‌های انار مناطق مختلف ساوه (درختان انار هفت ساله رقم ملس ساوه با فاصله کشت ۵ × ۵) اجرا گردید. شهرستان ساوه در شمال استان مرکزی، بین عرض جغرافیایی ۳۴ درجه و ۴۵ دقیقه تا ۳۵ درجه و ۳۴ دقیقه عرض شمالی و ۴۹ درجه و ۱۵ دقیقه تا ۵۰ درجه و ۵۶ دقیقه طول شرقی واقع شده است. منطقه ساوه به‌دلیل مجاورت با کویر و ارتفاع کم در شرق دارای آب و هوای گرم و نیمه خشک و در غرب به دلیل مشرف بودن به مناطق کوهستانی دارای زمستان‌های سرد و تابستان‌های معتدل است. میانگین دمای سالانه در ایستگاه ساوه ۱۸/۲ درجه سانتی‌گراد و میزان بارندگی کم و حدود ۲۱۶ میلی‌متر در سال می‌باشد و بیشتر بارش بصورت باران است. متوسط رطوبت شهر ساوه ۳۹ درصد می‌باشد که ماه دی با میانگین ۵۸ درصد مرطوب‌ترین ماه و ماه‌های تیر و مرداد با میانگین ۲۶ درصد خشک‌ترین ماه‌های سال می‌باشند.

با توجه به اینکه از نظر ظاهری بین میوه آسیب دیده (مبتلا به عارضه سفیدشدگی آریل انار) و سالم تا پایان مرحله بلوغ میوه تفاوتی وجود ندارد؛ لذا طراحی آزمایش و انتخاب واحدهای آزمایشی بر اساس نتایج مطالعه Faraji & Karami (2024) انجام شد. Faraji & Karimi (2024) در طی یک دوره دو ساله (۱۳۹۹-۱۴۰۰) با هدف بررسی پراکنش عارضه سفیدشدگی آریل انار رقم ساوه در ۱۹ منطقه ساوه، مهمترین عوامل موثر بر بروز و شدت عارضه سفیدشدگی انار را دما، شوری آب آبیاری و خاک معرفی نمودند. از این رو در فاز ابتدایی مطالعه حاضر (سال ۱۴۰۱) باغ شماره ۱۹ با کمترین درصد سفیدشدگی در طی دو سال ۱۳۹۹ و ۱۴۰۰ (۱۳/۳ و ۱۷/۷ درصد)، آب آبیاری مناسب ( $3/25$  دسی‌زیمنس بر متر) و خاک غیرشور ( $4/00$  دسی‌زیمنس بر متر) و باغ شماره ۱۷ با بیشترین درصد سفیدشدگی در طی دو سال ۱۳۹۹ و ۱۴۰۰ ( $78/00$  و  $94/00$  درصد)، آب آبیاری نامناسب ( $3/25$  دسی‌زیمنس بر متر) و خاک شور ( $4/00$  دسی‌زیمنس بر متر) بر اساس مطالعه Faraji & Karami (2024)، انتخاب گردید. ارتفاع از سطح دریا برای باغ شماره ۱۹ و ۱۷ به‌ترتیب ۱۱۰۰ و ۹۰۳

متر و فاصله دو باغ از یکدیگر ۴۵ کیلومتر بود. سپس برای انتخاب واحد آزمایشی مناسب (درخت انار) در هر دو باغ از ابتدای اردیبهشت ماه، دماسنج‌های حداقل و حداکثر در ده نقطه مختلف باغ تعبیه و دما در هر روز ثبت گردید. بر اساس میانگین دما در طول دوره رشد و نمو میوه (اوایل اردیبهشت ماه تا پایان شهریورماه) دو نقطه از هر باغ انتخاب گردید. برای باغ شماره ۱۹ با سابقه کمترین درصد سفیدشدگی میانگین دمایی در طول دوره رشد میوه برای نقاط انتخابی بین ۲۷-۲۵ درجه سانتیگراد و برای باغ شماره ۱۷ با بیشترین سابقه درصد سفیدشدگی میانگین دمایی در طول دوره مزبور بیشتر از ۳۸ درجه سانتیگراد بود. از هر نقطه ۱۵ درخت انتخاب و پلاک‌گذاری گردید (۳۰ درخت در هر باغ) و در پایان شهریورماه ۱۰ میوه از جهات مختلف هر درخت (مجموعاً ۳۰۰ میوه از هر باغ) به تفکیک برداشت و درصد سفیدشدگی در هر درخت بر اساس دستورالعمل (Kavand et al., 2020) محاسبه گردید.

در فاز دوم مطالعه (سال ۱۴۰۲)، به‌منظور انتخاب مجدد واحد آزمایشی (درخت) بر اساس نتایج سال اول، ۱۰ درخت از ۳۰ درخت پلاک‌گذاری‌شده سال قبل، انتخاب و مجدداً پلاک‌گذاری گردیدند. مبنای انتخاب در باغ شماره ۱۷ و ۱۹ به‌ترتیب درخت‌هایی با میوه‌های آسیب دیده (سفیدشدگی آریل انار < ۹۵ درصد) و درخت‌هایی با میوه‌های کاملاً سالم و فاقد سفیدشدگی بود. سپس طی چهار مرحله از مراحل رشد و نمو میوه شامل شروع تشکیل میوه (اوایل خردادماه)، فندق‌شدن (تیرماه)، رشد سریع میوه (مردادماه) و رسیدگی کامل میوه (پایان شهریورماه)، ۳ عدد میوه از گلدی سری اول از هر درخت انتخاب و برای اندازه‌گیری ترکیب‌های پلی‌فنولیک عصاره آب انار شامل محتوای مواد فنلی کل (TPC)، محتوای فلاونوئید کل (TFC)، محتوای آنتوسیانین (Cyd) و فعالیت آنزیم PAL به آزمایشگاه منتقل گردید. همچنین در هر دوره کیفیت آریل میوه‌های برداشت شده از نظر رنگ و شکل ظاهری بررسی گردید.

#### متغیرهای مورد بررسی سال دوم

به‌منظور اندازه‌گیری محتوای ترکیبات پلی‌فنولیک، پس از جداسازی آریل از میوه‌های برداشت شده در هر دوره، آگیری از آریل‌ها با استفاده از دستگاه آبمیوه‌گیری دستی انجام شد. سپس عصاره حاصل با سرعت دوران ۵۰۰۰ دور در دقیقه و به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و محلول روشن‌آور برای سنجش ترکیبات زیست فعال جدا گردید.

**محتوای مواد فنلی کل (TPC):** محتوای مواد فنلی کل بر اساس روش فولین-سیوکالتیو (Folin-Ciocalteu) و با استفاده از گالیک اسید (GAE) به‌عنوان استاندارد، اندازه‌گیری شد (Du et al., 2009). بدین‌منظور به ۲۵۰ میکرولیتر از عصاره میوه انار و محلول‌های استاندارد (GAE با غلظت  $100\text{ mg ml}^{-1}$  -۱۰۰) رقیق شده با متانول ۸۰٪ (۱:۲۰)، ۱ میلی‌لیتر معرف فولین سیوکالتیو رقیق شده (۱:۱۰ v/v) اضافه شد. بعد از ۵ دقیقه با افزودن ۲ میلی‌لیتر از محلول کربنات سدیم ۲۰٪ ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) و سپس نگهداری در دمای آزمایشگاه به‌مدت ۳۰ دقیقه، جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۶۵ نانومتر تعیین و مقدار مواد فنلی کل از روی منحنی استاندارد بر حسب میلی‌گرم گالیک اسید در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب میوه ( $\text{mgGAE. } 100\text{ ml}^{-1}\text{ J}$ ) محاسبه شد.

**محتوای فلاونوئید کل (TFC):** محتوای فلاونوئید کل موجود در عصاره انار تمامی نمونه‌ها به روش Zhang et al. (2015) با اندکی تغییرات اندازه‌گیری شد. به‌طور خلاصه، ۱۲۵ میکرولیتر عصاره رقیق شده هر نمونه با ۷۵ میکرولیتر نیتريت سدیم ( $\text{NaNO}_2$ ) ۵ درصد مخلوط گردید. بعد از گذشت ۶ دقیقه، ۱۵۰ میکرولیتر معرف کلرید آلومینیوم ( $\text{AlCl}_3$ ) اضافه شد و در ادامه، ۷۵۰ میکرولیتر محلول هیدروکسید سدیم یک مولار ( $\text{NaOH}$ , 1M) و ۱/۴ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر بعد از گذشت ۵ دقیقه به مخلوط اضافه گردید. شدت جذب مخلوط حاصل در طول موج ۵۱۰ نانومتر با استفاده از اسپکتوفتومتر (Novaspec II Visible Spectrophotometer; Pharmacia Biotech) بعد از گذشت ۱۵ دقیقه اندازه‌گیری شد. نتایج بر اساس میلی‌گرم کوئرستین در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب میوه ( $\text{mgQUE. } 100\text{ ml}^{-1}\text{ J}$ ) گزارش شد.

**محتوای آنتوسیانین (Cyd):** به‌منظور آماده‌سازی و رقیق‌سازی عصاره، از محلول متانول اسیدی شده مطابق دستورالعمل Siegelman & Hendricks (1958) استفاده شد. محتوای Cyd موجود در عصاره با استفاده از روش تفاوت pH دو سیستم بافری کلرید پتاسیم (KCl, 0.025M) با pH= ۱ و استات سدیم ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ , 0.4M) با pH ۴/۵ مطابق دستورالعمل Giusti & Wrolstad (2001) و در طول

موج‌های ۵۳۰ و ۷۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. نتایج طبق فرمول زیر و بر اساس میلی‌گرم سیانیدین-۳- گلوکوزاید در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب میوه (mgCyd.100ml<sup>-1</sup>J) گزارش گردید.

$$A = (A_{530} - A_{700})_{pH\ 1.0} - (A_{530} - A_{700})_{pH\ 4.5}$$

$$C_{\text{Cyd-3-glu}} [\text{mg.100ml}^{-1}] = (A \times MW \times DF \times 1000) / (\epsilon \times 1)$$

MW: وزن مولکولی Cyd-3-glu (۴۴۹/۲ g.mol<sup>-1</sup>); DF: فاکتور رقت (۱۰۰); ε: ضریب خاموشی برابر ۲۶۹۰۰؛ ۱۰<sup>۳</sup>: فاکتور برای تبدیل گرم به میلی‌گرم و ۱: عرض کووت استفاده شده بر حسب سانتی‌متر.

**فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیاز (PAL):** بر اساس دستورالعمل Wang et al. (2006) برای سنجش آنزیم PAL، ۱۰ گرم آرپل انار (آرپل پودر نشده) با ۵۰ میلی‌لیتر بافر بورات سدیم ۵۰ میلی‌مولار (50Mm Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>•5H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) با pH ۸/۸ که حاوی ۵ میلی‌مولار مرکاپتواتانول (HOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SH) بود، ابتدا در هاون چینی سرد شده له و سپس به‌صورت مخلوط یکنواخت درآمد. مخلوط مورد نظر به‌مدت ۲۰ دقیقه با دور ۱۵۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. سپس محلول روبی آن برای سنجش فعالیت آنزیم PAL مورد استفاده قرار گرفت. در ادامه به ۵۰۰ میکرولیتر از عصاره استخراجی دو میلی‌لیتر بافر بورات سدیم ۵۰ میلی‌مولار با pH ۸/۸ و ۵۰۰ میکرولیتر فنیل آلانین ۲۰ میلی‌مولار (C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub>, 20 mM) اضافه کرده و به‌مدت یک ساعت در بن‌ماری با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده و سپس برای توقف واکنش ۱۰ میکرولیتر اسید کلریدریک ۶ نرمال (HCl, 6N) به آن اضافه شد. محصول به‌دست آمده با ۱۵ میلی‌لیتر اتیل استات (CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) استخراج و سپس ۳ میلی‌لیتر هیدروکسید سدیم نیم‌مولار (NaOH, 0.5M) اضافه گردید و در نهایت غلظت سینامیک اسید با اندازه‌گیری میزان جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر (Novaspec II Visible Spectrophotometer; Pharmacia Biotech) به‌دست آمد. برای به‌دست آوردن فعالیت آنزیمی بر حسب واحد آنزیمی، جذب غلظت‌های مختلف سینامیک اسید در طول موج ۲۹۰ نانومتر به‌دست آمد و منحنی استاندارد سینامیک اسید رسم شد. از آنجا که یک واحد آنزیم PAL مقداری از آنزیم است که طی یک دقیقه، یک میکرومول سینامیک اسید را تولید می‌کند، بنابراین فعالیت آنزیم PAL بر حسب واحد آنزیمی به‌صورت میکرومول سینامیک اسید بر دقیقه بیان شد (μM Cinamic acid.min<sup>-1</sup>).

### تجزیه داده‌های آماری

آزمون نرمال بودن داده‌ها بر اساس روش Kolmogorov-Smirnov انجام گردید. داده‌های مربوط به میزان سفیدشدگی آرپل انار در سال اول با استفاده از آزمون z فیشر و برای داده‌های سال دوم از روش تجزیه واریانس یک‌طرفه با استفاده از رویه GLM در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در ده تکرار استفاده شد. مقایسه میانگین پارامترهای اندازه‌گیری شده در مراحل مختلف رشد و نمو میوه در شرایط محتمل و غیرمحتمل برای بروز عارضه سفیدشدگی آرپل انار با استفاده از آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال ۰/۰۵ < P و مقایسه میانگین پارامترهای اندازه‌گیری شده در هر مرحله بین دو شرایط محتمل و غیرمحتمل بر اساس آزمون  $t_{(\alpha=0.05, df=18)}$  مستقل با استفاده از نرم افزار SAS انجام شد.

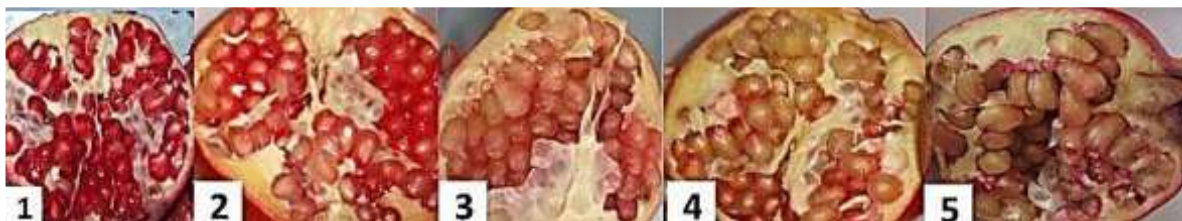
### یافته‌های پژوهشی

نتایج آزمون z فیشر در سال اول (۱۴۰۱) نشان داد که بین دو باغ شماره ۱۹ و ۱۷ به‌ترتیب با ۰/۶۳ و ۹۵/۳۲ درصد سفیدشدگی آرپل انار تفاوت معنی‌داری در سطح ۰/۰۱ وجود داشت (P=0.001).

بررسی کیفی میوه‌های انتخابی در مرحله رسیدگی کامل از درختان انتخابی هر باغ در سال دوم (۱۴۰۲) نشان داد که تمامی میوه‌های انتخابی از باغ شماره ۱۹ فاقد عارضه سفیدشدگی آرپل و ۹۵/۱۲ درصد میوه‌های انتخابی از درختان انتخابی باغ شماره ۱۷ دارای عارضه سفیدشدگی با شدت زیاد و بسیار زیاد و ۴/۸۸ درصد میوه‌ها دارای شدت عارضه متوسط بودند (شکل ۲).

بر اساس نتایج تجزیه واریانس جداگانه برای هر دو باغ در سال دوم نیز تفاوت معنی‌داری بین مراحل مختلف رشد و نمو میوه (۴ مرحله) از نظر کلیه صفات اندازه‌گیری شده مشاهده شد (جدول ۱).





شکل ۲. شدت عارضه سفیدشدگی آریل انار در رقم ملس ساوه: ۱ (سالم و بدون عارضه); ۲ (عارضه با شدت کم); ۳ (عارضه با شدت متوسط); ۴ (عارضه با شدت زیاد); ۵ (عارضه با شدت بسیار زیاد) (منبع: یافته‌های پژوهش).

**محتوای مواد فنلی کل (TPC):** مقایسه مراحل رشدی میوه در شرایط غیرمحمول برای بروز عارضه سفیدشدگی آریل انار نشان داد که بیشترین انباشت محتوای مواد فنلی کل عصاره آب انار مربوط به مرحله ۲ و ۳ (مرحله فندقی و رشد سریع میوه) و کمترین آن در مرحله تشکیل میوه حاصل شد (جدول ۲). از سوی دیگر روند تغییرات در TPC در ابتدا افزایشی (از مرحله ۱ تا ۲) و بعد از مرحله فندقی شدن روندی نزولی و منظم را نشان داد که تا مرحله رسیدن میوه ادامه داشت (جدول ۲، شکل ۳).

در شرایط محمول برای بروز عارضه سفیدشدگی آریل انار، بیشترین انباشت TPC در مرحله تشکیل میوه و فندقی شدن (مرحله ۱ و ۲) و کمترین آن در مرحله رسیدگی کامل (مرحله ۴) رخ داد (جدول ۲). همچنین روند تغییرات در محتوای مواد فنلی بعد از مرحله فندقی شدن تا پایان مرحله رشد و نمو میوه روندی نزولی و منظم را نشان داد (جدول ۲، شکل ۳); با این وجود، این روند کاهش در TPC در شرایط محمول در مقایسه با شرایط غیرمحمول برای بروز عارضه سفیدشدگی آریل انار از شدت بیشتری برخوردار بود (جدول ۲، شکل ۳). همچنین نتایج آزمون t مستقل نشان داد که در هر مرحله از مراحل رشد و نمو میوه، تفاوت معنی‌داری از نظر TPC بین دو محیط مورد ارزیابی وجود دارد (شکل ۳). نکته قابل توجه آنکه حساس‌ترین مرحله رشد و نمو میوه برای تغییر در میزان TPC در فاصله زمانی فندقی شدن میوه (مرحله دوم) تا مرحله رسیدگی کامل میوه (مرحله چهارم) رخ داد (شکل ۳).

**محتوای فلاونوئید کل (TFC):** در خصوص محتوای فلاونوئید کل، در شرایطی که وقوع عارضه سفیدشدگی محمول نبود، بیشترین محتوای فلاونوئید در مرحله اول (تشکیل میوه) و کمترین مقدار آن در مرحله سوم (رشد سریع میوه) حاصل شد (جدول ۲) و بر خلاف TPC، تغییرات TFC در ابتدا روند کاهش (از مرحله ۱ تا ۳) و سپس روند افزایشی (از مرحله ۳ تا ۴) داشته است (جدول ۲، شکل ۴). در شرایطی که وقوع عارضه سفیدشدگی محمول بود، TFC در مرحله تشکیل میوه و مرحله رسیدگی کامل به ترتیب بیشترین و کمترین انباشت را نشان داد. همچنین محتوای فلاونوئید کل در مجموع روند کاهش منظمی با شیب ملایم (در مقایسه با شرایط غیرمحمول) را در کل دوره رشد و نمو میوه نشان داد (جدول ۲، شکل ۴). اولین مرحله معنی‌دار کاهش در فاصله تشکیل میوه تا فندقی شدن (مرحله ۱ تا ۲) و دومین کاهش معنی‌دار در فاصله رشد سریع میوه تا رسیدگی کامل میوه (مرحله ۳ تا ۴) رخ داد (جدول ۲، شکل ۳). از سوی دیگر نتایج آزمون t مستقل نشان داد که در هر مرحله از مراحل رشد و نمو میوه تفاوت معنی‌داری از نظر TFC بین دو محیط مورد ارزیابی وجود دارد (شکل ۴). همچنین نتایج نشان داد که حساس‌ترین مرحله رشد و نمو میوه برای تغییر در میزان TFC در فاصله زمانی رشد سریع میوه (مرحله سوم) تا مرحله رسیدگی کامل میوه (مرحله چهارم) بود (شکل ۴).

**جدول ۱.** تجزیه واریانس اثر مراحل رشدی مختلف میوه بر محتوای مواد فنلی کل، فلاونوئید کل، آنتوسیانین و میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لایاز در دو شرایط محتمل و غیرمحمتمل برای بروز عارضه سفید شدگی آریل انار

| میانگین مربعات                                                    |            |                     |                     |                   |                                       |
|-------------------------------------------------------------------|------------|---------------------|---------------------|-------------------|---------------------------------------|
| شرایط غیر محتمل برای بروز عارضه سفیدشدگی آریل انار (باغ شماره ۱۹) |            |                     |                     |                   |                                       |
| منابع تغییرات                                                     | درجه آزادی | محتوای مواد فنلی کل | محتوای فلاونوئید کل | محتوای آنتوسیانین | فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لایاز |
| تکرار                                                             | ۹          | ۱۳۱۲/۴۹             | ۷/۴۶                | ۶/۸۶              | ۰/۰۷                                  |
| مراحل رشدی                                                        | ۳          | ۸۱۶۵/۹۵**           | ۱۴۶۷/۷۰**           | ۴۴۰/۳۳**          | ۰/۸۱**                                |
| خطا                                                               | ۲۷         | ۱۱۲۹/۹۷             | ۱۰/۷۸               | ۸/۷۵              | ۰/۱۷                                  |
| ضریب تغییرات                                                      |            | ۸/۶۶                | ۲۴/۱۰               | ۱۴/۵۸             | ۱۶/۹۴                                 |
| شرایط محتمل برای بروز عارضه سفیدشدگی آریل انار (باغ شماره ۱۷)     |            |                     |                     |                   |                                       |
| تکرار                                                             | ۹          | ۵۱۵/۸۵              | ۱۸/۱۳               | ۳/۸۲              | ۰/۰۶۲                                 |
| مراحل رشدی                                                        | ۳          | ۱۸۹۱۱/۱۹**          | ۶۵۵/۵۰**            | ۵۶۷/۰۸**          | ۰/۸۹**                                |
| خطا                                                               | ۲۷         | ۴۶۰/۸۰              | ۹/۰۶                | ۵/۲۹              | ۰/۱۲                                  |
| ضریب تغییرات                                                      |            | ۵/۴۵                | ۲۰/۰۲               | ۱۲/۰۲             | ۱۸/۶۸                                 |

\*\* معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد (منبع: یافته‌های پژوهش).

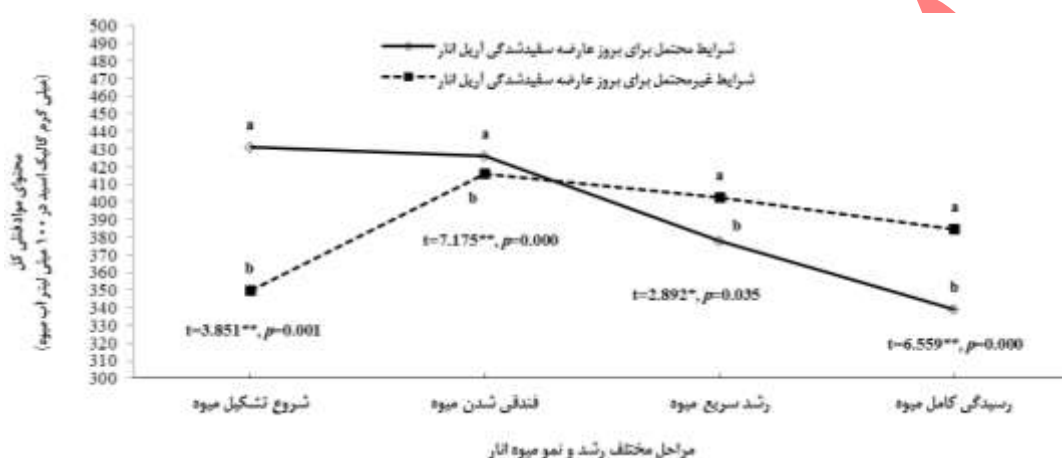
**جدول ۲.** مقایسه میانگین محتوای مواد فنلی کل، محتوای فلاونوئید کل، آنتوسیانین و میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لایاز در مراحل مختلف رشد و نمو میوه انار تحت دو شرایط محتمل و غیر محتمل برای بروز عارضه سفید شدگی آریل انار

| مراحل رشد و نمو میوه                                              | محتوای مواد فنلی کل (میلی گرم)                                | محتوای فلاونوئید کل (میلی گرم) | محتوای آنتوسیانین (میلی گرم) | فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لایاز (میکرومول سیانیدین ۳- در دقیقه) | محتوای مواد فنلی کل (میلی گرم) | محتوای فلاونوئید کل (میلی گرم) | محتوای آنتوسیانین (میلی گرم) | فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لایاز (میکرومول سیانیدین ۳- در دقیقه) |
|-------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|--------------------------------|------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| شرایط غیر محتمل برای بروز عارضه سفیدشدگی آریل انار (باغ شماره ۱۹) | شرایط محتمل برای بروز عارضه سفیدشدگی آریل انار (باغ شماره ۱۷) |                                |                              |                                                                       |                                |                                |                              |                                                                       |
| شروع تشکیل میوه                                                   | ۳۴۹/۹۳ <sup>c</sup>                                           | ۳۰/۸۸ <sup>a</sup>             | ۰/۶۳۷ <sup>c</sup>           | ۱/۰۶ <sup>c</sup>                                                     | ۴۳۱/۲۳ <sup>a</sup>            | ۲۶/۳۰ <sup>a</sup>             | ۱/۰۸ <sup>c</sup>            | ۱/۴۰ <sup>c</sup>                                                     |
| فندقی شدن میوه                                                    | ۴۱۵/۹۵ <sup>a</sup>                                           | ۱۰/۴۳ <sup>b</sup>             | ۴/۸۲۲ <sup>b</sup>           | ۱/۲۰ <sup>b</sup>                                                     | ۴۲۶/۰۸ <sup>a</sup>            | ۱۴/۴۳ <sup>b</sup>             | ۲/۲۷ <sup>b</sup>            | ۱/۶۰ <sup>b</sup>                                                     |
| رشد سریع میوه                                                     | ۴۰۲/۳۰ <sup>ab</sup>                                          | ۲/۵۳ <sup>c</sup>              | ۶/۷۰۷ <sup>b</sup>           | ۲/۹۱ <sup>a</sup>                                                     | ۳۷۸/۰۰ <sup>b</sup>            | ۱۲/۱۹ <sup>b</sup>             | ۴/۷۹ <sup>a</sup>            | ۱/۹۷ <sup>a</sup>                                                     |
| رسیدگی کامل میوه                                                  | ۳۸۴/۳۰ <sup>b</sup>                                           | ۱۰/۵۶ <sup>b</sup>             | ۲۵/۳۱ <sup>a</sup>           | ۰/۳۹ <sup>d</sup>                                                     | ۳۳۹/۲۰ <sup>c</sup>            | ۷/۲۰ <sup>c</sup>              | ۱/۰۴ <sup>c</sup>            | ۰/۳۷ <sup>d</sup>                                                     |

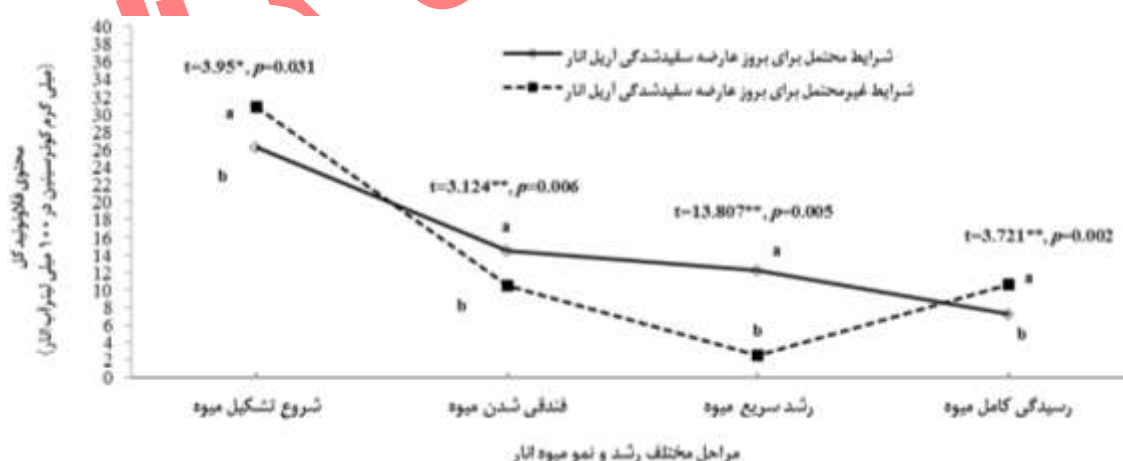
در هر ستون میانگین‌هایی با حرف مشترک از نظر آماری در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند (منبع: یافته‌های پژوهش).

**محتوای آنتوسیانین (Cyd):** در شرایط غیرمحمتمل برای بروز عارضه سفیدشدگی آریل انار، بیشترین و کمترین انباشت آنتوسیانین آب انار به ترتیب در مرحله چهارم (رسیدگی کامل میوه) و مرحله اول (تشکیل میوه) رخ داد (جدول ۲). از سوی دیگر نتایج نشان داد تغییرات Cyd روندی افزایشی داشته و در فاصله رشد سریع میوه (مرحله سوم) تا رسیدگی کامل میوه (مرحله چهارم) افزایش قابل ملاحظه‌ای در محتوای

آنتوسیانین مشاهده گردید (جدول ۲، شکل ۵). بر خلاف شرایط غیرمحتمل، در شرایط محتمل برای بروز عارضه سفیدشدگی، بیشترین انباشت آنتوسیانین در مرحله رشد سریع میوه بود و کمترین میزان آن در مرحله رسیدگی کامل میوه و مرحله تشکیل میوه مشاهده شد (جدول ۲). علیرغم اینکه از شروع تشکیل میوه تا رشد سریع میوه روند افزایشی در محتوای آنتوسیانین مشاهده شد این روند افزایشی در مقایسه با شرایط غیرمحتمل برای بروز عارضه از شیب بسیار ملایمی برخوردار بود (شکل ۵). همچنین نتایج آزمون  $t$  مستقل نشان داد که در هر مرحله از مراحل رشد و نمو میوه (به استثناء مرحله تشکیل میوه)، تفاوت معنی داری از نظر محتوای آنتوسیانین بین دو محیط مورد ارزیابی وجود داشت (شکل ۵). نکته قابل توجه آنکه حساس ترین مرحله رشد و نمو میوه برای تغییر در میزان آنتوسیانین در فاصله زمانی رشد سریع میوه (مرحله سوم) تا مرحله رسیدگی کامل میوه (مرحله چهارم) رخ داد (جدول ۲، شکل ۵).

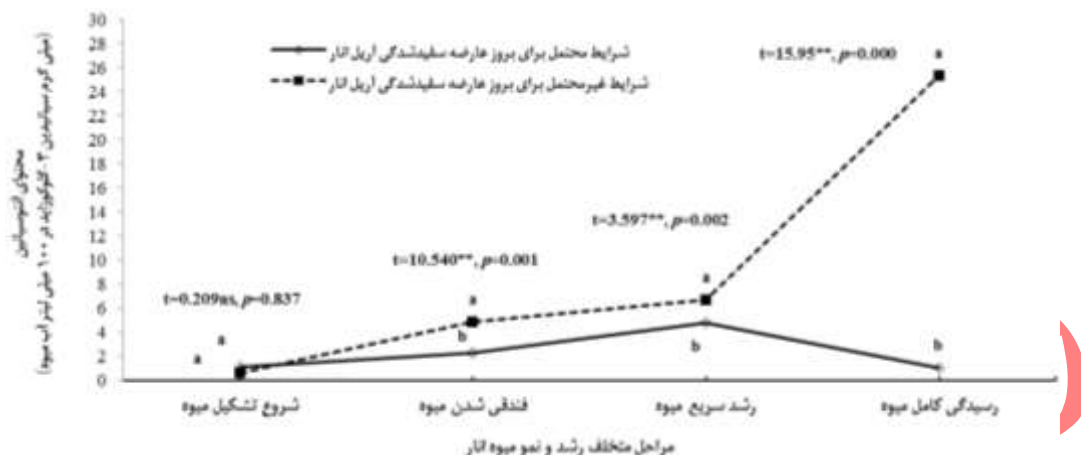


**شکل ۳.** محتوای مواد فنلی کل در شرایط محتمل و غیرمحتمل برای بروز عارضه سفیدشدگی آریل انار در مراحل مختلف رشد و نمو میوه؛ حروف غیرمشترک در هر مرحله از رشد میوه نشان دهنده تفاوت بین میانگین محتوای مواد فنلی کل بین دو شرایط محتمل و غیرمحتمل برای بروز عارضه سفیدشدگی آریل انار در هر مرحله بر اساس آزمون  $t$  مستقل می باشد؛ \* و \*\*: به ترتیب معنی داری در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد (منبع: یافته‌های پژوهش)



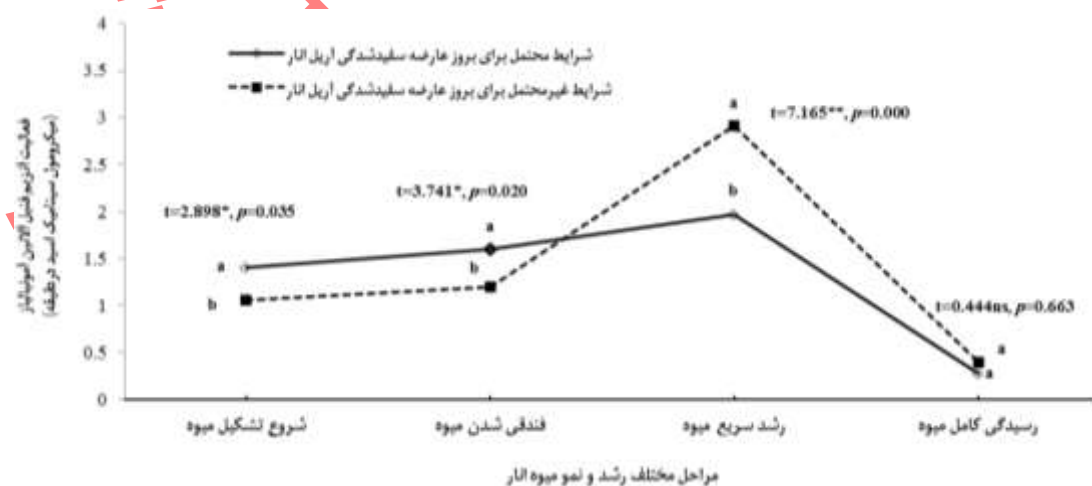
**شکل ۴.** محتوای فلاونوئید کل در شرایط محتمل و غیرمحتمل برای بروز عارضه سفیدشدگی آریل انار در مراحل مختلف رشد و نمو میوه؛ حروف غیرمشترک در هر مرحله از رشد میوه نشان دهنده تفاوت بین میانگین محتوای فلاونوئید کل بین دو شرایط محتمل و غیرمحتمل برای بروز عارضه سفیدشدگی آریل انار در هر مرحله بر اساس آزمون  $t$  مستقل می باشد؛ \* و \*\*: به ترتیب معنی داری در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد (منبع: یافته‌های پژوهش)





شکل ۵. محتوای آنتوسیانین در شرایط محتمل و غیرمتمنل برای بروز عارضه سفیدشدگی آریل انار در مراحل مختلف رشد و نمو میوه؛ حروف غیرمشترک در هر مرحله از رشد میوه نشان‌دهنده تفاوت بین میانگین محتوای آنتوسیانین بین دو شرایط محتمل و غیرمتمنل برای بروز عارضه سفیدشدگی آریل انار در هر مرحله بر اساس آزمون  $t$  مستقل می‌باشد؛ NS: غیر معنی‌دار؛ \* و \*\*: به ترتیب معنی‌داری در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد (منبع: یافته‌های پژوهش)

**فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالایز (PAL):** در هر دو شرایط بررسی شده در مطالعه حاضر (متمنل و غیر متمنل برای وقوع عارضه سفیدشدگی آریل انار)، فعالیت آنزیم PAL از زمان تشکیل میوه تا مرحله رشد سریع میوه روند افزایشی نشان داده است (جدول ۲)؛ و بیشترین فعالیت آنزیم PAL در مرحله رشد سریع میوه (مرحله سوم) ثبت گردید (جدول ۲). با این وجود کمترین فعالیت آنزیم PAL در هر دو شرایط در مرحله رسیدگی کامل حاصل شد که بین دو شرایط مورد بررسی بر اساس آزمون  $t$  مستقل، تفاوت معنی‌داری در این مرحله مشاهده نشد (شکل ۶). نکته قابل توجه آنکه حساس‌ترین مرحله رشد و نمو میوه برای تغییر در میزان فعالیت آنزیم PAL در فاصله زمانی فندقی شدن میوه (مرحله دوم) تا مرحله رشد سریع میوه (مرحله سوم) رخ داد (شکل ۶).



شکل ۶. فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالایز در شرایط محتمل و غیرمتمنل برای بروز عارضه سفیدشدگی آریل انار در مراحل مختلف رشد و نمو میوه؛ حروف غیرمشترک در هر مرحله از رشد میوه نشان‌دهنده تفاوت بین میانگین فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالایز بین دو شرایط محتمل و غیرمتمنل برای بروز عارضه سفیدشدگی آریل انار در هر مرحله بر اساس آزمون  $t$  مستقل می‌باشد؛ NS: غیر معنی‌دار؛ \* و \*\*: به ترتیب معنی‌داری در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد (منبع: یافته‌های پژوهش)

## بحث

عارضه سفیدشدگی آریل انار با تاثیرگذاری مستقیم بر کیفیت داخلی میوه منجر به کاهش بازارپسندی و ارزش اقتصادی این میوه در ایران گردیده است. بررسی تغییرات متابولیت‌های ثانویه در مراحل مختلف رشد و نمو میوه انار نشان داد که در هر دو شرایط محتمل و غیرمحتمل برای بروز عارضه سفیدشدگی آریل انار، روند تغییرات در محتوای TPC بعد از مرحله فندقی شدن تا پایان مرحله رشد و نمو میوه روندی نزولی و منظم داشته است. مطابق با نتایج مطالعه حاضر، (Weerakkody et al., 2010) نیز گزارش دادند که میوه‌های نارس در مقایسه با میوه‌های رسیده انار دارای محتوای مواد فنلی بالاتری هستند. همچنین کاهش سریع و قابل توجه در محتوای مواد فنلی کل از مرحله اولیه تا رشد کامل میوه انار در مطالعات (Kulkarni & Aradhya, 2005)، (Mirdehghan & Rahemi, 2007) و (Weerakkody et al., 2010) و (Fawole & Opara, 2013) نیز گزارش گردید. کاهش ترکیبات فنلی با بلوغ و رسیدن میوه در میوه موز (Goldstein & Swain, 1963) و گواوا (Bashir & Abu-Goukh, 2003) نیز گزارش گردید. از سوی دیگر نتایج مطالعه حاضر نشان داد که روند کاهشی TPC در شرایط محتمل (وجود تنش گرمایی) در مقایسه با شرایط غیرمحتمل (عدم وجود تنش گرمایی) برای بروز عارضه سفیدشدگی از شدت بیشتری برخوردار بود. مطابق با یافته‌های حاضر، در میوه‌های تحت تنش آفتاب‌سوختگی (به‌عنوان یک تنش اکسیداتیو و موثر در کاهش کیفیت میوه انار به‌خصوص پوست و احتمالاً بخش زیرین پوست) در مقایسه با میوه‌های بدون آسیب، محتوای مواد فنلی کل کمتری مشاهده شد (Weerakkody et al., 2010).

یکی از دلایل روند کاهشی محتوای مواد فنلی در مراحل مختلف رشد و نمو میوه به نقش این ترکیبات در طعم میوه مرتبط است. محتوای پلی‌فنل‌ها شامل استرهای اسید گالیک است که میزان گس بودن طعم میوه را تعیین می‌کنند (Ozawa et al., 1987). از این رو کاهش گسی یکی از تغییرات اصلی است که در طول رسیدن بسیاری از میوه‌ها رخ می‌دهد و این تغییر باعث می‌شود که میوه هنگام رسیدن خوش طعم‌تر گردد (Ozawa et al., 1987). در خصوص انار به‌خصوص انارهای ترش، کاهش میزان گسی میوه برای مصارف تازه‌خوری و مصرف به‌صورت آب انار یک ویژگی حسی مطلوب است. علاوه بر طعم میوه، سطح فعالیت آنتی‌اکسیدانی متابولیت‌های ثانویه در مواد غذایی به‌خصوص آب میوه‌ها یکی دیگر از ویژگی‌های کیفی مهم از نظر زیست‌فعالی محسوب می‌شود. مطالعات (Wang et al., 1997) ضمن تاکید بر اهمیت نقش اسیدهای فنولیک و ترکیبات فلاونوئیدی بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی میوه، گزارش نمودند که ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بسیاری از میوه‌ها عمدتاً به‌دلیل مواد شیمیایی گیاهی غیر آسکوربیک اسید است. از این رو، از دیدگاه سلامت مصرف‌کنندگان، هر چه محتوای این ترکیبات به‌خصوص فلاونوئیدها (به‌دلیل فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا) بیشتر باشد، بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل آب میوه و مزایای نسبی آن برای سلامتی مصرف‌کنندگان افزوده می‌شود (Gil et al., 2000). بنابراین در شرایط غیرمحتمل برای بروز عارضه سفیدشدگی آریل، روند متقابل در تغییرات محتوای مواد فنلی و فلاونوئیدی از مرحله رشد سریع تا مرحله پایانی رشد و نمو میوه را می‌توان به ضرورت برقراری تعادل بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات زیست‌فعال و طعم میوه در این فاصله زمانی نسبت داد.

بر خلاف شرایط غیرمحتمل، تحت شرایط محتمل (وجود تنش گرمایی) برای بروز عارضه، TPC و TFC روندی هم‌سو و کاهشی را از مراحل اولیه تشکیل میوه تا بلوغ میوه انار نشان دادند. ضمن آنکه در مقایسه با شرایط غیرمحتمل، روند تغییرات TFC از شیب ملایم‌تری در تمام مراحل رشد و نمو میوه برخوردار بود و محتوای TPC در مراحل ابتدایی رشد و نمو میوه بیشتر از سایر مراحل بود. در توضیح این نتیجه نقش تنش گرمایی را نباید نادیده گرفت. در منطقه ساوه و سایر مناطق دیگر تنش گرمایی (به‌خصوص دمای بالای ۴۰ درجه سانتیگراد) به‌عنوان اصلی‌ترین عامل در بروز و تشدید عارضه سفیدشدگی معرفی گردید (Faraji & Karami, 2024; Kavand et al., 2020; Weerakkody et al., 2010; Melgarejo et al., 2004). تنش گرمایی منجر به تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و در نتیجه تنش اکسیداتیو می‌شود؛ از این رو گونه‌های گیاهی از جمله انار، اثرات سمی ROS را توسط افزایش آنزیم‌هایی همچون کاتالاز (CAT) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) (Farji et al., 2020; Sofu et al., 2005) یا متابولیت‌های آنتی‌اکسیدانی که توانایی حذف رادیکال‌های آزاد را دارند، تعدیل می‌کنند. به‌عبارتی تحت شرایط محتمل برای بروز عارضه سفیدشدگی، محتوای بیشتر مواد فنلی کل در مراحل اولیه رشد و نمو میوه و کاهش تدریجی محتوای فلاونوئید کل به‌دلیل مشارکت در مکانیسم‌های دفاعی اولیه (اما ناپایدار) به‌منظور تعدیل آسیب‌های ناشی از تنش گرمایی می‌باشد. با این وجود، نکته مهمی که نباید نادیده گرفت آن است که، اگرچه سطح متابولیت‌های آنتی‌اکسیدانی

گیاهان در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی تغییر می‌کند اما این تغییرات ممکن است به‌طور دائمی نقش محافظتی قوی را ایفا نمایند (Weerakkody *et al.*, 2010) و نمی‌توان انتظار داشت که با افزایش شدت تنش یا مدت زمان تنش، سطح همه متابولیت‌های ثانویه به همان نسبت افزایش یابد. از همین رو است که محتوای TPC از مرحله فندقی‌شدن میوه (مرحله دوم) و محتوای TFC از مرحله رشد سریع میوه (مرحله سوم) تا مرحله رسیدگی کامل میوه بیشترین کاهش را نشان دادند. در تایید این نتیجه مطالعات (Ma *et al.*, 2008) نشان داد که بالا رفتن سطح دمای برگ درختان سیب از ۲۸ به ۴۰ درجه سانتی‌گراد باعث افزایش محتوای آسکوربات کل، اسید آسکوربیک و گلوکاتینون در برگ‌ها شد؛ اما پس از قرار گرفتن در معرض دمای بالا به مدت بیش از ۲ ساعت، محتوای این ترکیبات آنتی‌اکسیدانی کاهش یافت. علاوه بر این (Chen *et al.*, 2008) گزارش دادند که در پاسخ به افزایش گونه‌های اکسیژن فعال تولید شده تحت شرایط نور و دمای بالا، سیستم آنتی‌اکسیدانی در پوست میوه سیب در مراحل اولیه فعالیت بالایی نشان داد؛ با این وجود این سیستم دفاعی برای حفاظت در مقابل آسیب‌های ناشی از تنش نوری و دمایی کافی نبوده و در نتیجه آسیب‌دیدگی ناشی از آفتاب‌سوختگی در پوست میوه ظاهر گردید.

در مسیر بیوسنتز آنتوسیانین‌ها (شکل ۱)، فرایند گلیکوزیله شدن یکی از واکنش‌های تولیدی برای طیف وسیعی از فلاونوئیدها با ساختار و رنگ‌های متنوع است که اغلب در گام‌های نهایی بیوسنتز آنتوسیانین اتفاق می‌افتد. گلیکوزیله شدن ترکیبات فلاونوئیدی فلاویلوم (آنتوسیانیدین‌ها) منجر به بیوسنتز آنتوسیانین‌ها می‌شود (Kulkarni & Aradhya, 2005) (شکل ۱). آنزیم‌های متعددی برای گلیکوزیله شدن ترکیبات فلاونوئیدی وجود دارد که یکی از آن‌ها UDP-گلوز-۳-O گلوذیل ترانسفراز (UGFT) می‌باشد (Gil *et al.*, 2000) (شکل ۱). در بسیاری از مطالعات مشخص شد که ژن *UGFT* به‌عنوان ژن انتهایی سنتز آنتوسیانین منجر به ساخت این آنزیم می‌شود. در همین راستا، Khaksar *et al.* (2015) ژن *PgUGFT* دخیل در مسیر بیوسنتز آنتوسیانین را در انار شناسایی نمودند و تجزیه و تحلیل بیان ژن نشان داد که تجمع آنتوسیانین در بافت‌های رنگی، ارتباط نزدیکی با میزان بیان این ژن در پوست و آریل میوه انار دارد. به‌طوریکه در طول رشد و نمو میوه انار، تغییر سطح بیان ژن *PgUGFT* منعکس‌کننده مرحله رسیدگی میوه و رنگ پوست می‌باشد. همچنین بیان ژن *PgUGFT* در میوه‌های رسیده انار در مقایسه با میوه‌های جوان و میوه‌های تقریباً بالغ به حداکثر میزان خود می‌رسد (Khaksar *et al.*, 2015). در مطالعه حاضر نیز در خصوص تغییرات محتوای آنتوسیانین، اگر چه در مرحله تشکیل میوه، محتوای آنتوسیانین ناچیز بود؛ اما در هر دو شرایط مورد بررسی، تا مرحله سوم (رشد سریع میوه)، روند افزایشی و پس از آن تا مرحله رسیدگی کامل روند متفاوتی در دو شرایط محتمل (روند کاهشی) و غیرمحتمل (روند افزایشی) برای بروز عارضه سفیدشدگی مشاهده شد. مطابق با نتایج حاضر، روند افزایشی محتوای آنتوسیانین در مراحل بلوغ میوه در بسیاری از مطالعات گزارش گردیده است (Weerakkody *et al.*, 2010; Kulkarni & Aradhya, 2005; Ben-Simhon *et al.*, 2015). در توجیه روند کاهشی محتوای آنتوسیانین یا به عبارتی فلاونوئیدهای گلیکوزیله‌ای (Ben-Simhon *et al.*, 2015) از مرحله رشد سریع میوه تا بلوغ میوه در شرایط محتمل برای بروز عارضه سفیدشدگی، نقش میزان ذخیره محتوای فلاونوئید کل در این مرحله (توضیح داده شده در بخش قبل) برای بیوسنتز آنتوسیانین و همچنین تاثیر شرایط محیطی بر ساختار و محتوای آنتوسیانین را نباید نادیده گرفت. در همین راستا، Mena *et al.* (2011) به نقش و تاثیر منفی تنش‌های خشکی، شوری، دمای بالا، اشعه فرابنفش و شدت زیاد تابش نور خورشید بر بیوسنتز آنتوسیانین و حتی مشتقات آن تاکید نمودند. همچنین نتایج مطالعات (Kulkarni & Aradhya, 2005) و (Mori *et al.*, 2007) و (Tarara *et al.*, 2008)، (Schwartz *et al.*, 2009) نشان دادند. به‌طوریکه دمای پائین منجر به افزایش تجمع آنتوسیانین می‌شود، در حالیکه در دماهای بالا غلظت رنگیزه کاهش می‌یابد. این کاهش ممکن است منعکس‌کننده کاهش همزمان در نرخ سنتز آنتوسیانین به‌دلیل مهار رونویسی mRNA ژن‌های بیوسنتزی آنتوسیانین (Oren-Shamir, 2009) و تسریع تخریب شیمیایی رنگدانه و افزایش فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز ناشی از استرس گرمایی باشد (Mori *et al.*, 2007). نتایج مطالعات Francis (1975) نیز حاکی از وجود یک رابطه لگاریتمی بین تخریب آنتوسیانین با افزایش درجه حرارت بود؛ به‌طوریکه در دمای بالا میزان آنتوسیانین موجود در توت فرنگی کاملاً تخریب و به رنگ قهوه‌ای تبدیل گردید.

فنیل آلانین آمونیلایز (PAL) یکی از آنزیم‌های مشارکت‌کننده و آغازگر مسیر فنیل پروپانویید است (شکل ۱)؛ مسیری که در آن متابولیت‌هایی نظیر کومارین‌ها، اسانس‌ها، فلاونوئیدها، لیگنین، تانن و سایر ترکیبات پلی‌فنلی سنتز می‌شوند. فعال‌شدن این آنزیم در طول رسیدگی میوه گزارش گردید و یکی از دلایل فعال‌شدن این آنزیم به افزایش فعالیت هورمون اتیلن نسبت داده شد (Roca & Minguéz-Mosquera, 2009).

2001). افزایش میزان اتیلن در طول رسیدگی میوه باعث تحریک فعالیت آنزیم کلروفیلاز و به دنبال آن کاهش میزان رنگیزه‌های کلروفیلی در پوست و گوشت میوه (Roca & Minguez-Mosquera, 2001) و از سوی دیگر منجر به فعال شدن آنزیم PAL در مسیر بیوسنتز ترکیباتی نظیر آنتوسیانین‌ها و فلاونوئیدها می‌شود (Ebrahimzadeh, 2000). در خصوص ارتباط فعالیت آنزیم PAL با محتوای آنتوسیانین، بر اساس نتایج مطالعه (Khademi et al., 2021)، همبستگی مثبت معنی‌داری بین سطح بیان ژن PAL با رنگ‌گیری آریل میوه انار مشاهده شد. در مطالعه حاضر نیز نتایج بررسی فعالیت آنزیم PAL (صرف نظر از کمیت فعالیت) نشان‌دهنده مشارکت این آنزیم در مراحل مختلف رشد و نمو میوه انار رقم ملس ساوه (مراحل چهارگانه مورد مطالعه) بود. با این وجود، با توجه به روند تغییرات فعالیت آنزیم PAL و محتوای آنتوسیانین، به نظر می‌رسد که عمده فعالیت این آنزیم در مسیر بیوسنتز آنتوسیانین میوه انار در هر دو شرایط محتمل و غیرمحتمل برای بروز عارضه سفیدشدگی، از مرحله شروع تشکیل میوه تا مرحله رشد سریع میوه می‌باشد.

همسو نبودن روند تغییرات فعالیت آنزیم PAL (کاهشی) و محتوای آنتوسیانین (افزایشی) در شرایط غیرمحتمل (عدم وجود تنش گرمایی) برای بروز عارضه سفیدشدگی از مرحله رشد سریع میوه تا بلوغ میوه انار، نشان‌دهنده این واقعیت است که این آنزیم نمی‌تواند به تنهایی در سنتز آنتوسیانین، دست کم در مراحل رشد و نمو میوه و اختصاصاً در آریل انار، مشارکت داشته باشد. کاهش فعالیت آنزیم PAL در هر دو شرایط محتمل (وجود تنش گرمایی) و غیرمحتمل برای بروز عارضه سفیدشدگی در مرحله ذکر شده، این استنتاج را قوت می‌بخشد. در تایید این نتیجه، (Khademi et al., 2021) مشارکت آنزیم‌های PAL، چالکون سنتاز (CHS)، لوکواآنتوسیانیدین‌دی‌اکسیژناز (LDOX) و UFGT (شکل ۱) را در بیوسنتز آنتوسیانین انار سه رقم ملس ساوه، نادری و پوست سفید در سه تاریخ برداشت مورد بررسی قرار دادند و همبستگی مثبت معنی‌داری بین سطح بیان ژن‌های کنترل‌کننده آنزیم‌های مورد بررسی به‌خصوص ژن LDOX، با محتوای آنتوسیانین آریل مشاهده نمودند. از سوی دیگر گزارش دادند که سطح بیان ژن‌های مورد مطالعه در ارقام مختلف انار و همچنین در تاریخ‌های مختلف برداشت متفاوت بود. سطح بیان ژن LDOX در رقم ملس ساوه و نادری در همه تاریخ‌های برداشت در مقایسه با سایر ژن‌های مورد بررسی بیشتر بود و رقم ملس ساوه با شدت رنگ و محتوای آنتوسیانین بیشتر در مقایسه با رقم نادری، دارای سطح بیان بالاتری از ژن UFGT بود (Khademi et al., 2021). همچنین در مطالعه (Ben-Simhon et al., ۲۰۱۵) و Zhao et al. (2015) با مقایسه دو رقم انار واندر فول (آریل و پوست قرمز) و P.G.254-265 (آریل و پوست سفید) گزارش گردید که سطح بیان پائین ژن LDOX (یکی از ژن‌های ساختاری مرکزی در مسیر بیوسنتز آنتوسیانین) (شکل ۱) در مقایسه با رقم واندر فول در رقم P.G.254-265، عامل سفید بودن پوست و آریل (عدم وجود آنتوسیانین) بوده است. همچنین بر اساس نتایج آنالیز HPLC نشان دادند که در رقم P.G.254-265 در هیچ کدام از بافت‌های مورد مطالعه (گل، آریل میوه، پوست میوه و برگ) آنتوسیانین مشاهده نشد در حالیکه سایر فلاونوئیدهای مربوط به واکنش‌های بیوشیمیایی بالادست ژن LDOX شناسایی شدند. به‌طور مشابه، خاموشی ژن LDOX در رقم سیب برگ قرمز تقریباً به‌طور کامل منجر به عدم سنتز آنتوسیانین گردید و این اتفاق با یک تغییر در تجمع و پروفایل فلاونوئیدها و پلی‌فنول‌های مربوطه (به‌خصوص در بخش میانی) مسیر سنتز آنتوسیانین همراه بود (Szankowski et al., 2009). از سوی دیگر، بر خلاف میوه انار، در گلبرگ‌های گل مینا مهار فعالیت آنزیم PAL عامل عدم سنتز آنتوسیانین معرفی گردید (Shaked-Sachray et al., 2002). بنابراین به نظر می‌رسد که در گونه‌های گیاهی مختلف و حتی ارقام مختلف یک گونه، ژن‌های مشارکت‌کننده و سطح بیان این ژن‌ها در بیوسنتز آنتوسیانین، می‌تواند متفاوت باشد.

## نتیجه‌گیری و پیشنهادها

تولید متابولیت‌های ثانویه به‌خصوص آنتوسیانین در طول رشد و نمو میوه یک پدیده ضروری است که بر کیفیت (طعم، بو و رنگ)، بازارپسندی و خواص درمانی میوه تأثیر می‌گذارد. با این وجود در یک دهه اخیر بروز عارضه سفیدشدگی آریل انار به‌عنوان عامل جدید و فراگیر در کاهش کیفیت میوه انار در ایران، گزارش گردید. بر اساس نتایج مطالعه حاضر مشخص شد که تحت شرایط محتمل (وجود تنش گرمایی) برای بروز عارضه سفیدشدگی آریل انار، محتوای مواد فنلی کل، فلاونوئید کل و آنتوسیانین میوه انار به‌شدت تحت تأثیر قرار گرفته و حساس‌ترین مرحله با بیشترین تغییرات در محتوای ترکیبات پلی‌فنولیک ذکر شده، از فاصله فندقی شدن میوه تا رسیدگی کامل میوه می‌باشد. از این رو مدیریت اصولی باغ‌ها از جمله احداث باغ‌های انار در ارتفاعات بالا ( $\leq 1000$  متر از سطح دریا)، شیب مناسب درخت‌کاری به‌خصوص در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری (شیب‌های شمالی و شرقی)، انتخاب آرایش مناسب کاشت درختان به‌منظور حصول

بیشترین سایه‌اندازی (آرایش کاشت مربع)، استفاده از مالچ با رنگ روشن، حفظ علف‌های هرز یک‌ساله در کف باغ و همچنین استفاده از سایبان با رنگ روشن در مراحل رشد و نمو میوه یا مرحله احداث باغ‌های انار، به‌منظور کاهش خسارت ناشی از تنش گرما به‌عنوان مهمترین عامل در بروز و شدت عارضه سفیدشدگی آریل انار ضروری است. از سوی دیگر در مطالعه حاضر مشخص شد که آنزیم PAL در بیوسنتز آنتوسیانین در مراحل رشد و نمو میوه انار رقم ملس ساوه مشارکت داشته؛ اما بر اساس روند غیرهمسو فعالیت آنزیم PAL و محتوای آنتوسیانین در شرایط غیرمحتمل (عدم وجود تنش گرمایی) برای بروز عارضه سفیدشدگی و همچنین کاهش فعالیت این آنزیم در هر دو شرایط محتمل (وجود تنش گرمایی) و غیرمحتمل برای بروز عارضه سفیدشدگی از مرحله رشد سریع میوه تا بلوغ میوه انار، می‌توان چنین استنباط نمود که غیر از آنزیم PAL، نقش سایر آنزیم‌های مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها در تجمع و سنتز آنتوسیانین میوه انار را نباید نادیده گرفت.

## سپاسگزاری

پژوهش حاضر در قالب طرح تحقیقاتی مصوب به شماره ۹۳۲۰۷-۳-۶۱-۴، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی مرکز تحقیقات، آموزش ترویج کشاورزی و منابع طبیعی استان مرکزی انجام گردید.

## منابع

ابراهیم زاده، ح (۱۳۹۰). *فیزیولوژی گیاهی*. چاپ دوم. تهران: موسسه انتشارات دانشگاه تهران. ۶۷۰ صفحه  
 خادمی، ا؛ ناجی، ا و زارعی، ع (۱۴۰۰، شهریور). مقایسه سطح بیان برخی ژن‌های مسیر بیوسنتزی آنتوسیانین در سه رقم انار با رنگ‌های مختلف. *دوازدهمین کنگره علوم باغبانی ایران*، دانشگاه ولی عصر رفسنجان، ایران.  
 خاکسار، غ؛ سید طباطبائی، ب و ارزانی، ا (۱۳۹۴). ردیابی و شناسایی ژن UDP-گلوز: فلاونوئید ۳-O-گلوکوزیل ترانسفراز در مسیر بیوسنتز آنتوسیانین‌ها در انار (*Punica granatum*). *فصلنامه علمی ژنتیک نوین*، ۱۰ (۱)، ۴۷-۵۸.  
 صداقت، س؛ راحمی، م و جعفری، م (۱۴۰۰). اثرات آب و خاک شور بر دانه سفیدی انار. *پژوهش‌های میوه‌کاری*، ۱، ۱۲۱-۱۲۸.  
 فرجی، س و کرمی، ث (۱۴۰۳). پراکنش مکانی عارضه سفیدشدگی آریل انار و ارتباط آن با برخی عوامل محیطی و غیرمحیطی با استفاده از سامانه اطلاعات جغرافیایی (GIS). *نشریه علوم باغبانی ایران*. Doi: 10.22059/ijhs.2024.372626.2156  
 محسنی، ع؛ فرازمند، ح؛ طباطبائی اردکانی، س. م؛ عسکری، م؛ عسکری خاکزاد، س؛ عشقی، م؛ غضنفری، س؛ هاشم‌پور، س. ر و انگبی، ح (۱۳۹۹). *دستورالعمل انار (کشت، داشت، برداشت)*. تهران: مرکز ترویج و آموزش کشاورزی.  
 نرجسی، و (۱۴۰۰). تاثیر تیمارهای مختلف سایه‌دهی بر برخی ویژگی‌های کمی و کیفی میوه انار (رقم ملس ساوه). *نشریه دانش کشاورزی و تولید پایدار*، ۱، ۲۷۵-۲۹۳.

## REFERENCES

- Aizza, L. C. B., & Dornelas, M. C. (2011). A genomic approach to study anthocyanin synthesis and flower pigmentation in passionflowers. *Journal of Nucleic Acids*, 2011(1), 371517.
- Asadi, E., Ghehsareh, A. M., Moghadam, E. G., Hodaji, M., & Zabihi, H. R. (2019). Improving of pomegranate aril paleness disorder through application of Fe and Zn elements. *Indian Journal of Horticulture*, 76(2), 279-288.
- Bashir, H. A., & Abu-Goukh, A. B. A. (2003). Compositional changes during guava fruit ripening. *Food Chemistry*, 80(4), 557-563.
- Ben-Simhon, Z., Judeinstein, S., Trainin, T., Harel-Beja, R., Bar-Ya'akov, I., Borochoy-Neori, H., & Holland, D. (2015). A "White" anthocyanin-less pomegranate (*Punica granatum* L.) caused by an insertion in the coding region of the leucoanthocyanidin dioxygenase (LDOX; ANS) gene. *PLoS one*, 10(11), e0142777.
- Borochoy-Neori, H., Judeinstein, S., Tripler, E., Harari, M., Greenberg, A., Shomer, I., & Holland, D. (2009). Seasonal and cultivar variations in antioxidant and sensory quality of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22(3), 189-195.



- Boudet, A. M. (2007). Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry*, 68(22-24), 2722-2735.
- 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, 745-756.
- Du, G., Li, M., Ma, F., & Liang, D. (2009). Antioxidant capacity and the relationship with polyphenol and vitamin C in *Actinidia* fruits. *Food Chemistry*, 113(2), 557-562.
- Ebrahimzadeh, H. (2000). Plant Physiology. Volume 2. Tehran University Publications, Tehran (in Persian).
- Faraji, S., & Karami, S. (2024). Spatial distribution of pomegranate aril paleness and its relationship with some environmental and non-environmental factors using geographic information system (GIS). *Iranian Journal of Horticultural Science*. doi: 10.22059/ijhs.2024.372626.2156 (in Persian)
- Faraji, S., Hadadinejad, M., Abdossi, V., Basaki, T., & Karami, S. (2020). Screening pomegranate (*Punica granatum* L.) genotypes for drought tolerance using physiological and phytochemical characteristics. *Fruits*, 75(3), 130-140.
- Fawole, O. A., & Opara, U. L. (2013). Effects of maturity status on biochemical content, polyphenol composition and antioxidant capacity of pomegranate fruit arils (cv. 'Bhagwa'). *South African Journal of Botany*, 85, 23-31.
- Francis, F. J. (1975). Anthocyanins as food colors. *Food Technology*, 29, 52-54.
- Gil, M. I., Tomás-Barberán, F. A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D. M., & Kader, A. A. (2000). Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(10), 4581-4589.
- Giusti, M. M., & Wrolstad, R. E. (2001). Anthocyanins: characterization and measurement with UV-visible spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 1, 1-13.
- Goldstein, J. L., & Swain, T. (1963). Changes in tannins in ripening fruits. *Phytochemistry*, 2(4), 371-383.
- Gould K.S. & Lister C. (2006) Flavonoid functions in plants. Page 397-441 in Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications. Andersen M, Markham KR (eds). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Jaakola, L., Hohtola, A., Määtä, K., Törrönen, S., & Kärenlampi, S. (2002). Flavonoid biosynthesis in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.). In XXVI International Horticultural Congress: Environmental Stress and Horticulture Crops 618 (pp. 415-419).
- Jing, P., Bomser, J. A., Schwartz, S. J., He, J., Magnuson, B. A., & Giusti, M. M. (2008). Structure– function relationships of anthocyanins from various anthocyanin-rich extracts on the inhibition of colon cancer cell growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(20), 9391-9398.
- Kavand, M., Arzani, K., Barzegar, M., & Mirlatifi, M. (2020). Pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit quality attributes in relation to aril browning disorder. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 22(4), 1053-1065.
- Khademi, O., Naji, A., & Zarei, A. (2021, September). Comparison of expression levels of some genes involved in anthocyanin biosynthetic pathway in three pomegranate cultivars with different colors. Paper presented at the 12<sup>th</sup> Conference of the Iranian Horticultural Science, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Iran.
- Khaksar, GH., Sayed Tabatabaei, B.E., & Arzani, A. (2015). Detection and identification of a Udp-glucose: flavonoid 3-oglucosyltransferase gene involving in anthocyanin pathway in pomegranate (*Punica granatum*). *Modern Genetics Journal* (MGJ), 10(1), 47-58. (in Persian)
- Kulkarni, A. P., & Aradhya, S. M. (2005). Chemical changes and antioxidant activity in pomegranate arils during fruit development. *Food Chemistry*, 93(2), 319-324.
- Ma, Y. H., Ma, F. W., Zhang, J. K., Li, M. J., Wang, Y. H., & Liang, D. (2008). Effects of high temperature on activities and gene expression of enzymes involved in ascorbate–glutathione cycle in apple leaves. *Plant Science*, 175(6), 761-766.
- Meighani, H., Ghasemnezhad, M., & Bakshi, D. (2014). Evaluation of biochemical composition and enzyme activities in browned arils of pomegranate fruits. *International Journal of Horticultural Science and Technology*, 1(1), 53-65.
- Melgarejo, P., Martinez, J. J., Hernández, F. C. A., Martinez-Font, R., Barrows, P., & Erez, A. (2004). Kaolin treatment to reduce pomegranate sunburn. *Scientia Horticulturae*, 100(1-4), 349-353.

- Mena, P., García-Viguera, C., Navarro-Rico, J., Moreno, D. A., Bartual, J., Saura, D., & Martí, N. (2011). Phytochemical characterisation for industrial use of pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Spain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(10), 1893-1906.
- Mirdehghan, S. H., & Rahemi, M. (2007). Seasonal changes of mineral nutrients and phenolics in pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit. *Scientia Horticulturae*, 111(2), 120-127.
- Mohseni, A., Farazmand, H., Tabatabai Ardakani, S. D., Askari, M., Asgari Khakzad, S., Eshghi, M., Ghazanfari, S., Hasanpour Onji, S. R., Angabi, H. (2020). Pomegranate guide (Planting, Growing, Harvesting). Institute of Agricultural Education and Extension, Tehran, Iran, p:268. (in Persian)
- Mori, K., Goto-Yamamoto, N., Kitayama, M., & Hashizume, K. (2007). Loss of anthocyanins in red-wine grape under high temperature. *Journal of Experimental Botany*, 58(8), 1935-1945.
- Narjesi, V. (2021). Effects of different shade netting treatments on some quantitative and qualitative characteristics of pomegranate fruits cv. Malas-e-Saveh. *Journal of Agricultural Science and Sustainable Production*, 31(1), 275-293. (in Persian)
- Oren-Shamir, M. (2009). Does anthocyanin degradation play a significant role in determining pigment concentration in plants?. *Plant Science*, 177(4), 310-316.
- Ozawa, T., Lilley, T. H., & Haslam, E. (1987). Polyphenol interactions: Astringency and the loss of astringency in ripening fruit. *Phytochemistry*, 26(11), 2937-2942.
- Roca, M., & Mínguez-Mosquera, M. I. (2001). Changes in chloroplast pigments of olive varieties during fruit ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2), 832-839.
- Sedaghat, S., Rahemi, M., & Jafari, M. (2021). Effects of soil and water salinity on aril whitening in pomegranate. *Research in Pomology*, 6(1), 121-128. (in Persian)
- Shaked-Sachray, L., Weiss, D., Reuveni, M., Nissim-Levi, A., & Oren-Shamir, M. (2002). Increased anthocyanin accumulation in aster flowers at elevated temperatures due to magnesium treatment. *Physiologia Plantarum*, 114(4), 559-565.
- Shwartz, E., Glazer, I., Bar-Ya'akov, I., Matityahu, I., Bar-Ilan, I., Holland, D., & Amir, R. (2009). Changes in chemical constituents during the maturation and ripening of two commercially important pomegranate accessions. *Food Chemistry*, 115(3), 965-973.
- Siegelman, H. W., & Hendricks, S. B. (1958). Photocontrol of anthocyanin synthesis in apple skin. *Plant Physiology*, 33(3), 185.
- Sofo, A., Dichio, B., Xiloyannis, C., & Masia, A. (2005). Antioxidant defences in olive trees during drought stress: changes in activity of some antioxidant enzymes. *Functional Plant Biology*, 32(1), 45-53.
- Szankowski, I., Flachowsky, H., Li, H., Halbwirth, H., Treutter, D., Regos, I., ... & Fischer, T. C. (2009). Shift in polyphenol profile and sublethal phenotype caused by silencing of anthocyanidin synthase in apple (*Malus* sp.). *Planta*, 229, 681-692.
- Tarara, J. M., Lee, J., Spayd, S. E., & Scagel, C. F. (2008). Berry temperature and solar radiation alter acylation, proportion, and concentration of anthocyanin in Merlot grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*, 59(3), 235-247.
- Wang, H., Cao, G., & Prior, R. L. (1997). Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(2), 304-309.
- Wang, J. W., Zheng, L. P., Wu, J. Y., & Tan, R. X. (2006). Involvement of nitric oxide in oxidative burst, phenylalanine ammonia-lyase activation and taxol production induced by low-energy ultrasound in *Taxus yunnanensis* cell suspension cultures. *Nitric Oxide*, 15(4), 351-358.
- Weerakkody, P., Jobling, J., Infante, M. M. V., & Rogers, G. (2010). The effect of maturity, sunburn and the application of sunscreens on the internal and external qualities of pomegranate fruit grown in Australia. *Scientia Horticulturae*, 124(1), 57-61.

Zarei, A., Zamani, Z., Fatahi, R., Mousavi, A., Salami, S.A., Avila, C., & Cánovas, F.M. (2016). Differential expression of cell wall related genes in the seeds of soft-and hard-seeded pomegranate genotypes. *Scientia Horticulturae*, 205, 7-16.

Zhang, D. Y., Yao, X. H., Duan, M. H., Wei, F. Y., Wu, G. H., & Li, L. (2015). Variation of essential oil content and antioxidant activity of *Lonicera* species in different sites of China. *Industrial Crops and Products*, 77, 772-779.

Zhao, X., Yuan, Z., Feng, L., & Fang, Y. (2015). Cloning and expression of anthocyanin biosynthetic genes in red and white pomegranate. *Journal of Plant Research*, 128, 687-696.

## **The effect of pomegranate aril paleness phenomenon on the secondary metabolites content and activity of phenylalanine amonialyase (PAL) enzyme at different stages of fruit development**

### **Introduction**

The production of secondary metabolites during fruit growth and development is a necessary phenomenon that affects the quality (taste, smell and color), marketability and therapeutic properties of the fruit. Pomegranate fruit (*Punica granatum* L.) is of special importance in the food and pharmaceutical industries due to its considerable antioxidant activity, due to the high content of secondary metabolites, especially anthocyanin in the skin and fruit juice. Nevertheless, in the last decade, the aril paleness in pomegranate has been reported as a new and pervasive factor in reducing the quality of pomegranate fruit in many countries, including Iran. Therefore, in order to reduce the damage caused by the pomegranate aril paleness disorder and the fundamental management of orchards, the present study was conducted to identify the most sensitive stage/stages of pomegranate fruit growth and development in relation to the changes of secondary metabolites and phenylalanine amonialyase (PAL) enzyme activity in two probable and improbable conditions for the occurrence of aril paleness.

### **Materials and Methods**

This study was carried out during two years (2022 and 2023). In the first year, based on the introduced factors affecting the occurrence of pomegranate paleness (temperature, irrigation water and soil salinity), two orchards with the highest and lowest percentage of pomegranate aril paleness (orchard number 17 and 19, respectively) were selected based on the results of Faraji *et al.* (2024). Then, based on the average temperature during the fruit maturation period (average temperature of 25-27 °C and > 38 °C orchard number 19 and 17, respectively), 30 trees were selected and labeled and at the end of September (2022), percent paleness of each tree (in each orchard) according to Kavand *et al.* (2020) was calculated. In the second phase (2023), based on the results of the first year, 10 trees were selected from the 30 trees previous, and then during four stages, fruit set (stage1); Hazelnut size (stage 2); fast fruit growth (stage 3) and full ripening (stage 4)- three fruits were harvested from each tree and the total phenol content (TPC), total flavonoid content (TFC), anthocyanin (Cyd) content and PAL enzyme activity were measured.

### **Results and Discussion**

Based on the results obtained, in both probable and improbable conditions for the occurrence of aril paleness, the changes in the total phenolics content (TPC) after the hazelnut size stage until the end of the fruit growth and development stage showed a downward and regular trend. Nevertheless, this decreasing trend in TPC was more intense in probable conditions compared to improbable conditions. The total flavonoid content (TFC) in improbable conditions, the first had a decreasing trend (from stage 1 to 3) and then an increasing trend (from stage 3 to 4) and in probable conditions, TFC changes from the beginning of fruit set to the end of fruit growth and development stage showed a regular downward trend. So that, the lowest accumulation of TFC was achieved in stage 4. The content of cyanidin (Cyd) increased from stage 1 to stage 3 in both conditions; However, after the fast fruit growth stage (stage 3), a significant change in Cyd content was observed in improbable conditions (increasing trend) and probable conditions for the occurrence of paleness disorder (decreasing trend). The activity of phenylalanine ammonia lyase (PAL) enzyme increased in both conditions up to stage 3, in line with the increase in Cyd content, and after the fast fruit growth stage, the activity of this enzyme decreased in both conditions.

## Conclusion

In general, under improbable conditions for the occurrence of aril paleness, the most sensitive stage of pomegranate fruit growth and development with the most changes in the content of secondary metabolites was from the stage of hazelnut size to full ripening. Therefore, the fundamental management of orchards in order to reduce damage caused by heat stress, including choosing the right place to construct the orchard in terms of height above sea level ( $\geq 1000$  meters), choosing the right slope for planting trees to obtain maximum shade (Northern and Eastern slopes), choosing a suitable tree planting pattern, especially in tropical and subtropical areas (square planting pattern), using the light mulches, maintaining annual weeds and also using light-colored shades, is necessary in the stages of pomegranate fruit growth and development or the stage of construction of pomegranate orchards. Additionally, the alignment of changes in the activity of this enzyme with anthocyanin content in the first three stages of fruit growth and development indicates the participation of this enzyme in anthocyanin biosynthesis. On the other hand, the inconsistent trend of PAL enzyme activity and anthocyanin content (under improbable conditions) as well as the decrease in the activity of this enzyme in both probable and improbable conditions from stage 3 to the end of pomegranate fruit growth and development showed that, in addition to the PAL enzyme, the role of other enzymes of the flavonoid biosynthesis pathway in the accumulation and synthesis of anthocyanin in pomegranate fruit should not be ignored.

**Keywords:** Anthocyanin biosynthesis, Heat stress, Polyphenolic compounds, Pomegranate orchards