



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

Sakine Faraji¹, Soraya Karami²

1. Crop and Horticultural Science Research Department, Markazi Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Arak, Iran. E-mail: s.faraji@areeo.ac.ir
2. Corresponding Author, Department of Agriculture, Payame Noor University (PNU), Tehran, Iran. E-mail: soraya.karami@pnu.ac.ir

Article Info	ABSTRACT
Article type: Research Article	This study aimed to investigate the changes in content of secondary metabolite and activity of phenylalanine amonialyase (PAL) enzyme under heat stress and normal conditions (probable and improbable conditions for the occurrence of aril paleness, respectively) in pomegranate. To this end, two pomegranate orchards with the highest and lowest percentages of aril paleness were selected based on our previous study. Fruits were harvested at four stages of growth and development, including stage 1 (fruit set), stage 2 (hazelnut size), stage 3 (fast growth), and stage 4 (full ripening), to measure total phenolic, total flavonoid and anthocyanin contents, and PAL enzyme activity. The results showed that under probable conditions, the most sensitive stages of fruit growth and development were from the hazelnut size toward the full ripening stage, synchronized with high changes in the content of secondary metabolites. Meanwhile, activity of PAL enzymes was observed in all stages of fruit growth and development. Therefore, during establishing a pomegranate orchard, alleviating the adverse effect of heat stress is of utmost importance. At the first three stages of fruit growth, a simultaneous change in PAL activity and anthocyanin content suggests the role of this enzyme in the biosynthesis of anthocyanin. On the other hand, decreasing and increasing trends of PAL activity and anthocyanin content, respectively, in improbable condition for aril paleness, as well as a reduction in PAL activity, under both conditions, was found to be occurred from fast growth stage to fruit ripening stage. Such issues suggest that the role of other enzymes involved in flavonoids biosynthesis pathways, besides the PAL enzyme, in the synthesis and accumulation of anthocyanin in the pomegranate fruit should be considered.
Article history: Received: 6 July 2024 Received in revised form: 8 October 2024 Accepted: 15 October 2024 Published online: Winter 2024	
Keywords: <i>Anthocyanin biosynthesis,</i> <i>Heat stress,</i> <i>Polyphenolic compounds,</i> <i>Pomegranate orchards.</i>	

Cite this article: Faraji, S. & Karami, S. (2024). 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'. *Iranian Journal of Horticultural Science*, 55 (4), 719-737. DOI: <https://doi.org/10.22059/ijhs.2024.378987.2184>



© The Author(s).

DOI: <https://doi.org/10.22059/ijhs.2024.378987.2184>

Publisher: The University of Tehran Press.

Extended Abstract

Introduction

Secondary metabolites in some plants such as pomegranate generally influence fruit quality (taste, smell, and color), marketability, and therapeutic properties. Pomegranate (*Punica granatum* L.) plays a remarkable role in food and pharmaceutical industries, due to its substantial antioxidant activity and being rich of secondary metabolites (especially anthocyanin). In the last decade, the emerging of aril-paleness disorder has widely been reported as a novel and prevalent disorder, leading to a reduction in the quality of pomegranate fruit. Therefore, in order to diminish the delirious effect of aril-paleness disorder on pomegranate, this study aimed to identify the most sensitive growth stage (s) of pomegranate fruit to heat stress at which the aril-paleness disorder emerge as well as to assess the substantial changes occurred simultaneously in the content of secondary metabolites and activity of phenylalanine amonialyase (PAL) enzyme during subjecting the plants to 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). Based on the factors affecting the emergence of pomegranate aril paleness, such as temperature, irrigation water, and soil salinity, two orchards named 19 and 17 with high and low magnitude of aril paleness, respectively, were selected in the first year. Regarding the value of average temperature during fruit maturation (25-27 °C for the orchard 19 and > 38 °C for the orchard 17), 30 trees were selected and labeled carefully. At the end of September (2022), the percentage of fruit paleness in each tree was calculated. In the second year (i.e., 2023), ten trees were chosen out of 30 trees selected in the first year, and their fruit (three fruits per tree) was harvested at four stages of growth as follows: stage 1 (fruit set), stage 2 (Hazelnut size), stage 3 (fast fruit growth), and stage 4 (full ripening), and then some phytochemical characteristics were measured, including the content of total phenolic compounds (TP), total flavonoids (TF), and anthocyanins (Cyd) , as well as PAL activity.

Results and Discussion

The results showed a regularly downward status in the changes of TP content after the hazelnut size until the end of the fruit growth under both conditions, although this trend was remarkably severe in probable conditions rather than improbable conditions for the aril paleness occurrence. The change in the content of total flavonoid (TF) in improbable conditions was different, in a way that it initially decreased (from stage 1 to 3) followed by an increasing in TF (from stage 3 to 4), while in probable conditions its change was regularly downward from fruit set to the end of fruit growth and development. Overall, the lowest TF was recorded at 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 both improbable (increasing trend) and probable (decreasing trend) conditions for the occurrence of paleness disorder. Under both condition and up to stage 3, the PAL activity and Cyd content were mounted simultaneously, although the activity of PAL decreased after the fast fruit growth stage.

Conclusion

Our findings showed that under improbable conditions for the occurrence of aril paleness, the highest changes in secondary metabolites and most sensitive stage of fruit growth to aril-paleness disorder occurred at the stage of fruit hazelnut size to full ripening. In order to mitigate the harmful effect of heat stress on pomegranate, some issues should be taken into account during establishing its orchard: choosing land with an appropriate height (> 1000 m above sea), possessing a suitable slope for obtaining maximum shade (Northern and Eastern slopes), choosing a suitable tree-planting pattern, especially in tropical and subtropical areas (square planting pattern), using light mulches, maintaining annual weeds, and using light-colored shades. Additionally, the simultaneous changes in PAL activity and anthocyanin content at the first three stages of fruit growth suggest the role of PAL in the synthesis of anthocyanin. However, regarding separately changes in PAL activity and anthocyanin content (under improbable conditions) as well as a reduction in PAL activity from stage 3 to the end of fruit growth under both probable and improbable conditions substantiate the role of other flavonoid-synthesizing enzymes, beside PAL enzyme, in the synthesis of anthocyanin under heat stress.



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

سکینه فرجی^۱ | ثریا کرمی^۲ ✉

۱. بخش تحقیقات علوم زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان مرکزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی،

اراک، ایران. رایانامه: s.faraji@areeo.ac.ir

۲. نویسنده مسئول، گروه علوم کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران. رایانامه: soraya.karami@pnu.ac.ir

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله پژوهشی تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۴/۱۶ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۷/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۷/۲۴ تاریخ انتشار: زمستان ۱۴۰۳ کلیدواژه‌ها: بیوسنتز آنتوسیانین، تنش گرمایی، ترکیبات پلی فنولیک، باغات انار.	این مطالعه با هدف بررسی تغییرات محتوای متابولیت‌های ثانویه و فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالاز (PAL) در شرایط تنش گرمایی و شرایط عادی (به ترتیب شرایط محتمل و غیرمحتمل برای بروز سفیدشدگی آریل در انار انجام شد. به این منظور، بر اساس مطالعه قبلی دو باغ انار با بیشترین و کمترین درصد سفیدشدگی آریل انتخاب شدند. برداشت میوه‌ها در چهار مرحله رشد و نمو، شامل ۱ (تشکیل میوه)، ۲ (فندقی شدن)، ۳ (رشد سریع) و ۴ (رسیدن کامل)، برای اندازه‌گیری محتوای فنول، کل فلاونوئید و آنتوسیانین و فعالیت آنزیم PAL انجام شد. نتایج نشان داد که تحت شرایط محتمل برای عارضه سفیدشدگی آریل انار، مرحله فندقی شدن تا مرحله رسیدن کامل، حساس‌ترین مراحل رشد و نمو میوه می‌باشند که با تغییرات زیاد در محتوای متابولیت‌های ثانویه همراه است. همچنین، در تمام مراحل رشد و نمو میوه انار تحت هر دو شرایط، فعالیت آنزیم PAL مشاهده گردید. بنابراین، در هنگام احداث باغ انار، کاهش اثر نامطلوب تنش گرمایی از اهمیت بالایی برخوردار است. همچنین، همسو بودن تغییرات فعالیت آنزیم PAL با محتوای آنتوسیانین در سه مرحله اول رشد و نمو میوه نشان‌دهنده 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 کاهش 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 باید در نظر گرفته شود.

استناد: فرجی، سکینه و کرمی، ثریا (۱۴۰۳). اثر عارضه سفیدشدگی آریل انار بر محتوای متابولیت‌های ثانویه و فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالاز (PAL) در مراحل مختلف نمو میوه. نشریه علوم باغبانی ایران، ۵۵ (۴)، ۷۱۹-۷۳۷. DOI: <https://doi.org/10.22059/ijhs.2024.378987.2184>



© نویسندگان.

DOI: <https://doi.org/10.22059/ijhs.2024.378987.2184>

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

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. علاوه بر این، بسیاری از این ترکیب‌ها 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. نوع و میزان این ترکیبات فلاونوئیدی در بافت‌های مختلف تفاوت‌های زیادی دارد، اما در اغلب میوه‌ها نوع غالب را آنتوسیانین‌ها تشکیل می‌دهند (Jaakola et al., 2002). انار (*Punica granatum* L.) یکی از قدیمی‌ترین و محبوب‌ترین میوه‌های خوراکی است که متابولیت‌ها و ترکیبات زیست فعال متعددی از آن گزارش شده است. اطلاعات موجود نشان می‌دهند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل ملاحظه انار به‌سبب محتوای بالای آنتوسیانین‌های پوست و آب میوه آن است (Gil et al., 2000). هر اندازه مشتقات گلوکوزیدی آنتوسیانین‌ها در آوریل 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 آوریل 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).

پیشینه پژوهش

تاکنون بیش از ۵۶۰ مولکول آنتوسیانین در گیاهان مختلف شناسایی شده است. این ترکیب فلاونوئیدی که در آب محلول می‌باشد (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 یکی از ویژگی‌های عمومی آنتوسیانین‌ها است که سبب فعال‌سازی آن‌ها در واکنش با گونه‌های اکسیژن فعال و رادیکال‌های آزاد می‌گردد. بنابراین، ساختار خاص آنتوسیانین‌ها به آن‌ها خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌دهد (Jing et al., 2008). سیانیدین-۳-گلوکوزاید یکی از متداول‌ترین آنتوسیانین‌ها در بافت‌های گیاهی است که علاوه بر ایجاد رنگدانه قرمز، دارای فعالیت آنتی-اکسیدانی حدود ۳/۵ برابر بیشتر از ویتامین E می‌باشد (Jing et al., 2008). در مسیر بیوسنتز آنتوسیانین، آنزیم فنیل آلانین آمونیالیز 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). در عارضه سفیدشدگی، آریل‌ها بدشکل شده، شفافیت خود را از دست می‌دهند و همانند کریستال دارای ترک‌های فراوان می‌شوند. همچنین، رنگ آن‌ها از قرمز اناری شفاف، با توجه به شدت عارضه، به سفید کرمی تا قهوه‌ای سوخته تغییر می‌نماید (Meighani et al., 2014). در حقیقت، این عارضه نوعی اختلال فیزیولوژیک است که در طول دوره رشد و نمو میوه آغاز می‌گردد. در ارتباط با سفیدشدگی آوریل انار دلایل متنوعی از جمله افتاب 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. مطالعات انجام شده نشان می‌دهند که بین میزان آنتوسیانین و درصد سفیدشدگی آوریل انار رابطه منفی وجود دارد (Sedaghat et al., 2021). همچنین، مقدار آنتوسیانین‌ها در پوست و آوریل میوه انار پرورش یافته در آب و هوای خنک به‌طور معنی‌داری بیشتر از میوه‌های رشد یافته در منطقه گرم‌تر است (Borochoy-Neori et al., 2009).

از بین مراحل مختلف رشد انار، پدیده رسیدن میوه ترکیبی پیچیده‌تر از بسیاری فرایندهای سلولی نظیر تغییر در ساختار دیواره سلولی آریل‌ها می‌باشد. این تغییر، به‌دلیل تغییر محتوای لیگنین و سلولز، به‌منظور تغییر در سفتی آریل (Zarei et al.,

1 Cyanidin-3-glucoside

2 Phenylalanine ammonia-lyase

(2016)، تجمع هیدروکربن‌ها، و به‌خصوص متابولیت‌های ثانویه می‌باشد (Shwartz et al., 2009). تولید متابولیت‌های ثانویه، در طی رسیدن میوه، یک پدیده ضروری است که کیفیت (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. با توجه به موارد فوق، این مطالعه با هدف بررسی روند تغییرات متابولیت‌های ثانویه و فعالیت آنزیم PAL در انارهای دچار عارضه سفیدشدگی، از مرحله تشکیل میوه تا رسیدگی کامل و نیز 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 به‌دلیل مشرف بودن به مناطق کوهستانی دارای زمستان‌های سرد و تابستان‌های معتدل است. میانگین دمای سالانه در ایستگاه ساوه ۱۸/۲ درجه سلسیوس است. میزان بارندگی کم، حدود ۲۱۶ میلی‌متر در سال بوده و بیشتر بارش بصورت باران است. متوسط رطوبت شهر ساوه ۳۹ درصد است. ماه دی با میانگین ۵۸ درصد مرطوب‌ترین و ماه‌های تیر و مرداد با میانگین ۲۶ درصد خشک‌ترین ماه‌های سال می‌باشند.

با توجه به اینکه از نظر ظاهری بین میوه آسیب‌دیده (میتلا 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 که در آن، 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 باغ شماره ۱۹ با کمترین درصد سفیدشدگی در طی سال‌های ۱۳۹۹ و ۱۴۰۰ (به ترتیب ۱۳/۳ و ۱۷/۷ درصد)، آب آبیاری مناسب ($3/25 < \text{دسی‌زیمنس بر متر}$) و خاک غیرشور ($4/00 > \text{دسی‌زیمنس بر متر}$) و باغ شماره ۱۷ با بیشترین درصد سفیدشدگی در طی سال‌های ۱۳۹۹ و ۱۴۰۰ (به ترتیب ۷۸/۰۰ و ۹۴/۰۰ درصد)، آب آبیاری نامناسب ($3/25 < \text{دسی‌زیمنس بر متر}$) و خاک شور ($4/00 < \text{دسی‌زیمنس بر متر}$) (Faraji & Karami, 2024) انتخاب گردید. ارتفاع از سطح دریا برای باغ شماره ۱۹ و ۱۷ به ترتیب 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 شد. در باغ شماره ۱۹ با سابقه کمترین درصد سفیدشدگی، میانگین دمایی در طول دوره رشد میوه برای نقاط انتخابی بین ۲۷-۲۵ درجه سلسیوس و در باغ شماره ۱۷ با بیشترین سابقه درصد سفیدشدگی، میانگین دمایی در طول دوره مزبور بیشتر از ۳۸ درجه سلسیوس بود. بر اساس میانگین دما در طول دوره رشد و نمو میوه (اوایل اردیبهشت ماه تا پایان شهریورماه) دو نقطه از هر باغ انتخاب گردید. 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 محاسبه گردید (Kavand et al., 2020).

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 به ترتیب درخت‌هایی با میوه‌های آسیب‌دیده (سفیدشدگی آریل انار < 95 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)، فندق شدن (تیرماه)، رشد سریع میوه (مردادماه) و رسیدگی کامل میوه (پایان شهریورماه)، ۳ عدد میوه از گلدهی سری اول از هر درخت انتخاب و برای اندازه‌گیری ترکیب‌های پلی فنولیک عصاره آب انار شامل محتوای مواد فنلی کل، محتوای فلاونوئید کل، محتوای آنتوسیانین 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 پلی فنولیک، 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 روشناور برای سنجش ترکیبات زیست فعال جدا گردید.

محتوای مواد فنلی کل

محتوای مواد فنلی کل بر اساس روش فولین-سیوکالتیو و با استفاده از گالیک اسید به‌عنوان استاندارد، اندازه‌گیری شد (Du et al., 2009). بدین‌منظور، به ۲۵۰ میکرولیتر از عصاره میوه انار و محلول‌های استاندارد (گالیک اسید در غلظت‌های مختلف از صفر تا ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) رقیق شده با متانول ۸۰ درصد (۱:۲۰)، یک میلی‌لیتر معرف فولین سیوکالتیو رقیق شده (حجمی ۱:۱۰) اضافه شد. بعد از ۵ دقیقه با افزودن ۲ میلی‌لیتر از محلول کربنات سدیم بیست درصد 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 محاسبه شد.

محتوای فلاونوئید کل

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 ۵ درصد مخلوط گردید. بعد از گذشت ۶ دقیقه، ۱۵۰ میکرولیتر معرف کلرید آلومینیوم اضافه شد و در ادامه، بعد از گذشت ۵ دقیقه، ۷۵۰ میکرولیتر محلول هیدروکسید سدیم یک مولار و ۱/۴ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر به مخلوط اضافه گردید. شدت جذب مخلوط حاصل در طول موج ۵۱۰ نانومتر با استفاده از اسپکتوفتومتر (ساخت شرکت فارمیشیا بیوتک)، بعد از گذشت ۱۵ دقیقه اندازه‌گیری شد. نتایج، بر اساس میلی‌گرم کوئرستین در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب میوه گزارش شد.

محتوای آنتوسیانین

آماده‌سازی و رقیق‌سازی عصاره با استفاده از محلول متانول اسیدی و به روش Siegelman & Hendricks (1958) انجام شد. محتوای آنتوسیانین عصاره به روش تفاوت پی‌اچ دو سیستم بافری کلرید پتاسیم (KCl, 0.025M) با pH=۱ و استات سدیم (CH₃COONa, 0.4M) با pH=۴/۵ مطابق روش Giusti & Wrolstad (2001) و در طول موج‌های ۵۳۰ و ۷۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. نتایج طبق رابطه‌های ۱ و ۲ و بر اساس میلی‌گرم سیانیدین-۳-گلوکوزاید در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب میوه گزارش گردید.

$$A = (A_{530} - A_{700})_{pH\ 1.0} - (A_{530} - A_{700})_{pH\ 4.5} \quad \text{رابطه ۱}$$

$$Cyad-3-glu [mg.100ml^{-1}] = (A \times MW \times DF \times 1000) / (\varepsilon \times 1) \quad \text{رابطه ۲}$$

1 Folin-Ciocalteu

2 Gallic acid

3 Novaspec II Visible Spectrophotometer; Pharmacia Biotech

در این روابط MW: وزن مولکولی Cyd-3-glu برابر با ۴۴۹/۲ گرم بر مول؛ DF: فاکتور رقت برابر با ۱۰۰؛ ε: ضریب خاموشی برابر ۲۶۹۰۰؛ ۱۰^۳: فاکتور برای تبدیل گرم به میلی گرم و ۱: عرض کووت استفاده شده بر حسب سانتی متر می باشد.

فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لایز

سنجش آنزیم فنیل آلانین آمونیا لایز با استفاده از روش Wang et al. (2006) انجام شد. مقدار ۱۰ گرم آریل انار (آریل پودر نشده) با ۵۰ میلی لیتر بافر بورات سدیم ۵۰ میلی مولار (Na₂B₄O₇•5H₂O₂) با pH= ۸/۸ که حاوی ۵ میلی مولار مرکاپتواتانول (HOCH₂CH₂SH) بود، ابتدا در هاون چینی سرد شده له شده و سپس به صورت مخلوط یکنواخت درآمد. این مخلوط به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۱۵۰۰۰ سانتیفریوژ گردید. سپس، محلول رویی آن برای سنجش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لایز مورد استفاده قرار گرفت. در ادامه، به ۵۰۰ میکرولیتر از عصاره استخراجی، دو میلی لیتر بافر بورات سدیم ۵۰ میلی مولار با pH= ۸/۸ و ۵۰۰ میکرولیتر فنیل آلانین ۲۰ میلی مولار (C₉H₁₁NO) اضافه و به مدت یک ساعت در بن ماری با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. جهت توقف واکنش، ۱۰ میکرولیتر اسید کلریدریک ۶ نرمال به آن اضافه شد. محصول به دست آمده با ۱۵ میلی لیتر اتیل استات استخراج و سپس ۳ میلی لیتر هیدروکسید سدیم نیم مولار به آن اضافه گردید. در نهایت، غلظت سینامیک اسید با اندازه گیری میزان جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر، با استفاده از اسپکتروفتومتر محاسبه گردید. برای به دست آوردن فعالیت آنزیمی بر حسب واحد آنزیمی، جذب غلظت های مختلف سینامیک اسید در طول موج ۲۹۰ نانومتر مشخص 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 می کند، بنابراین فعالیت آنزیم PAL بر حسب واحد آنزیمی، به صورت میکرومول سینامیک اسید بر دقیقه بیان شد.

تجزیه داده های آماری

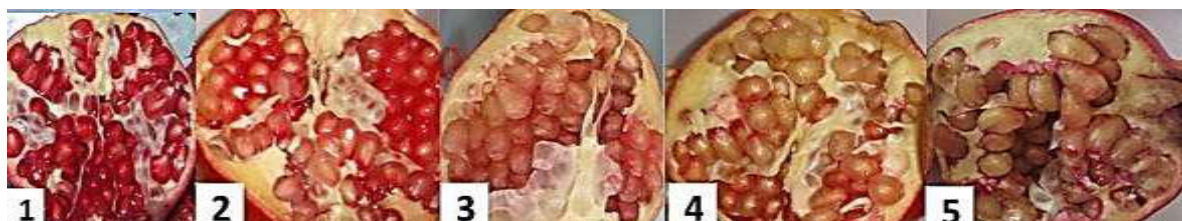
آزمون نرمال بودن داده ها به روش Kolmogorov-Smirnov انجام گردید. داده های مربوط به میزان سفیدشدگی آریل انار در سال اول با استفاده از آزمون Z فیشر و برای داده های سال دوم از روش تجزیه واریانس یک طرفه به روش GLM در قالب طرح بلوک های کامل تصادفی در ده تکرار استفاده شد. مقایسه میانگین پارامترهای اندازه گیری شده در مراحل مختلف رشد و نمو میوه در شرایط محتمل و غیرمحتمل برای بروز عارضه سفیدشدگی آریل انار با استفاده از آزمون حداقل اختلاف معنی دار (LSD) در سطح احتمال P < ۰/۰۵ و مقایسه میانگین پارامترهای اندازه گیری شده در هر مرحله بین دو شرایط محتمل و غیرمحتمل بر اساس آزمون t (α=۰/۰۵، df= ۱۸) مستقل با استفاده از نرم افزار SAS انجام شد.

یافته های پژوهشی

نتایج آزمون Z فیشر در سال اول نشان داد که بین دو باغ شماره ۱۹ و ۱۷ به ترتیب با ۰/۶۳ و ۹۵/۳۲ درصد سفیدشدگی آریل انار تفاوت معنی داری در سطح یک درصد وجود داشت (P=0.001).

بررسی کیفی میوه های انتخابی در مرحله رسیدگی کامل از درختان انتخابی هر باغ در سال دوم نشان داد که تمامی میوه های انتخابی از باغ شماره ۱۹ فاقد عارضه سفیدشدگی آریل، و ۹۵/۱۲ درصد میوه های انتخابی از درختان انتخابی باغ شماره ۱۷ دارای عارضه سفیدشدگی با شدت زیاد و بسیار زیاد و ۴/۸۸ درصد میوه ها دارای شدت عارضه متوسط بودند (شکل ۱).

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



شکل ۱. 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

مقایسه مراحل رشدی میوه در شرایط غیرمحمتمل 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 فندق و رشد سریع میوه) و کمترین آن در مرحله تشکیل میوه حاصل شد (جدول ۲). از سوی دیگر، روند تغییرات در محتوای مواد فنلی کل در ابتدا افزایشی (از مرحله ۱ تا ۲) و بعد از مرحله فندق شدن روندی نزولی و منظم را نشان داد که تا مرحله رسیدن میوه ادامه داشت (جدول ۲ و شکل ۲). در شرایط محتمل برای بروز عارضه سفیدشدگی آریل انار، بیشترین انباشت محتوای مواد فنلی کل در مرحله تشکیل میوه و فندق 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 کل بعد از مرحله فندق شدن تا پایان مرحله رشد و نمو میوه روندی نزولی و منظم را نشان داد (جدول ۲ و شکل ۲)؛ با این وجود، این روند کاهشی در محتوای مواد فنلی کل در شرایط محتمل در مقایسه با شرایط غیرمحمتمل برای بروز عارضه سفیدشدگی آریل انار از شدت بیشتری برخوردار بود (جدول ۲ و شکل ۲). همچنین، نتایج آزمون t مستقل نشان داد که در هر مرحله از مراحل رشد و نمو میوه تفاوت معنی‌داری از نظر محتوای مواد فنلی کل بین دو محیط مورد ارزیابی وجود دارد (شکل ۲). نکته قابل توجه آنکه حساس‌ترین مرحله رشد و نمو میوه برای تغییر در میزان این مواد در فاصله زمانی فندق شدن میوه (مرحله دوم) تا مرحله رسیدگی کامل میوه (مرحله چهارم) رخ داد (شکل ۲).

محتوای فلاونوئید کل

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

جدول ۱. نتایج 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 غیرمحتمل 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	۱۱۳۹/۹۷	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: یافته های پژوهش.

جدول ۲. مقایسه میانگین شاخص های فیتوشیمیایی و بیوشیمیایی اندازه گیری شده در مراحل مختلف رشد و نمو میوه انار تحت دو شرایط محتمل و غیر محتمل برای بروز عارضه سفید شدگی آریل انار

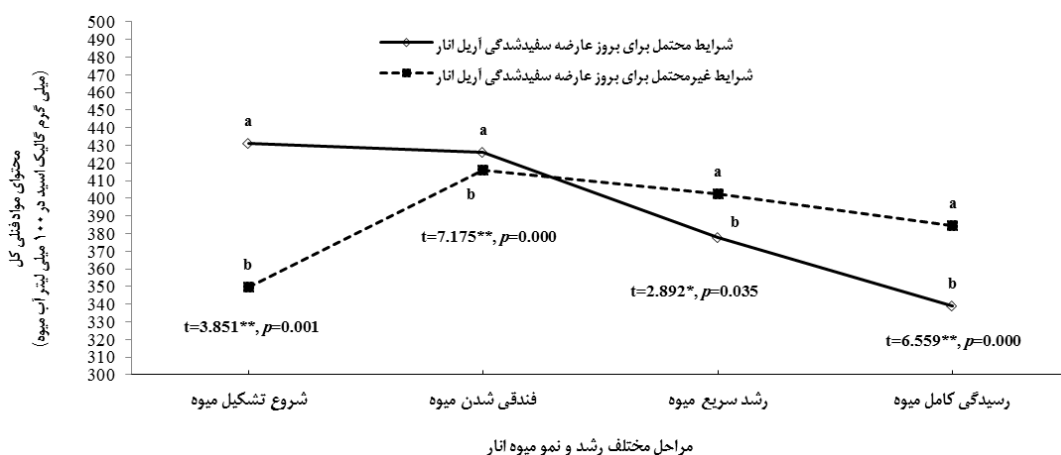
مراحل رشد و نمو میوه	محتوای مواد فنلی کل (میلی گرم)	محتوای فلاونوئید کل (میلی گرم)	محتوای آنتوسیانین (میلی گرم)	فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لایاز (میکرومول سیانیدین ۳- در دقیقه)	محتوای مواد فنلی کل (میلی گرم)	محتوای فلاونوئید کل (میلی گرم)	محتوای آنتوسیانین (میلی گرم)	فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لایاز (میکرومول سیانیدین ۳- در دقیقه)
	در ۱۰۰ میلی لیتر آب میوه)	در ۱۰۰ میلی گرم آب میوه)	در ۱۰۰ میلی گرم آب میوه)	در ۱۰۰ میلی گرم آب میوه)	در ۱۰۰ میلی لیتر آب میوه)	در ۱۰۰ میلی گرم آب میوه)	در ۱۰۰ میلی گرم آب میوه)	در ۱۰۰ میلی گرم آب میوه)
شرایط غیر محتمل (باغ شماره ۱۹)				شرایط محتمل (باغ شماره ۱۷)				
شروع تشکیل میوه	۳۴۹/۹۲ ^c	۳۰/۸۸ ^a	۰/۶۲۷ ^c	۱/۰۶ ^c	۴۳۱/۲۳ ^a	۲۶/۳۰ ^a	۱/۰۸ ^c	۱/۴۰ ^c
فندق شدن میوه	۴۱۵/۹۵ ^a	۱۰/۴۳ ^b	۴/۸۲۳ ^b	۱/۲۰ ^b	۴۲۶/۰۸ ^a	۱۴/۴۳ ^b	۲/۲۷ ^b	۱/۶۰ ^b
رشد سریع میوه	۴۰۲/۳۰ ^{ab}	۲/۵۲ ^c	۶/۷۰۷ ^b	۲/۹۱ ^a	۳۷۸/۰۰ ^b	۱۲/۱۹ ^b	۴/۷۹ ^a	۱/۹۷ ^a
رسیدگی کامل میوه	۳۸۴/۳۰ ^b	۱۰/۵۶ ^b	۲۵/۳۱ ^a	۰/۳۹ ^d	۳۳۹/۲۰ ^c	۷/۲۰ ^c	۱/۰۴ ^c	۰/۲۷ ^d

در هر ستون میانگین های دارای حرف مشترک تفاوت معنی داری در سطح احتمال ۵ درصد ندارند. منبع: یافته های پژوهش.

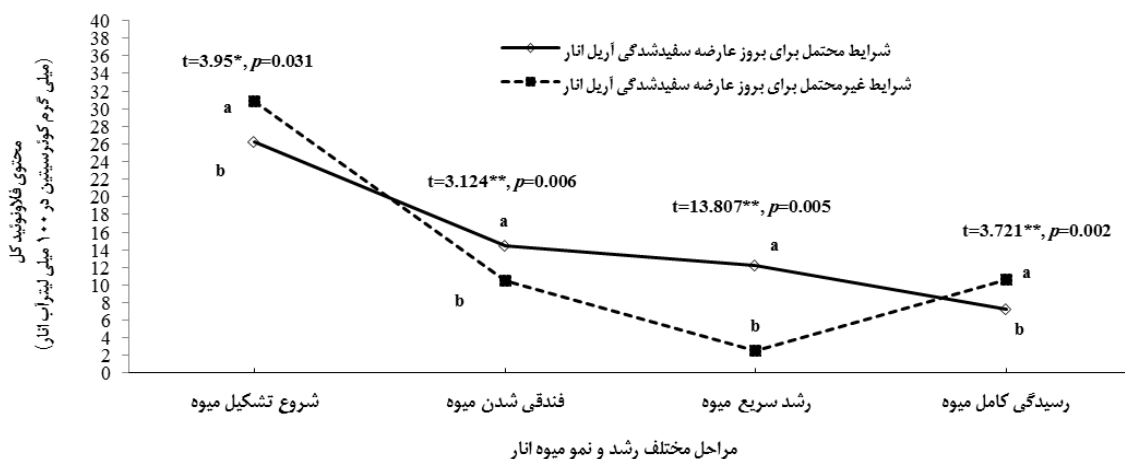
محتوای آنتوسیانین

در شرایط غیرمحتمل، 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 آنتوسیانین روندی افزایشی داشته و در فاصله رشد سریع میوه (مرحله سوم) تا رسیدگی کامل میوه (مرحله چهارم) افزایش قابل ملاحظه ای در محتوای آنتوسیانین مشاهده گردید (جدول ۲ و شکل ۴). بر خلاف شرایط غیرمحتمل، در شرایط محتمل برای بروز عارضه سفیدشدگی بیشترین انباشت آنتوسیانین در مرحله رشد سریع میوه و کمترین 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

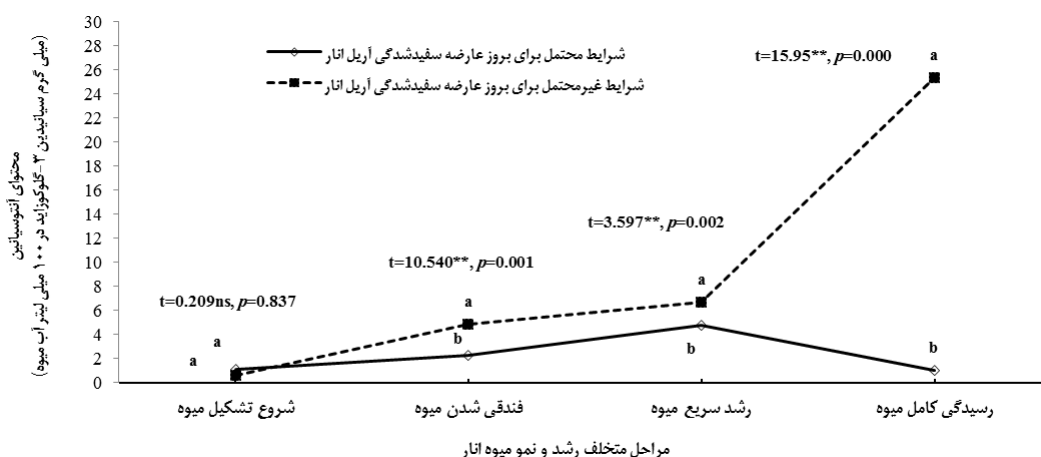
آنتوسیانین مشاهده شد، این روند افزایشی در مقایسه با شرایط غیرمختل برای بروز عارضه از شیب بسیار ملایمی برخوردار بود (شکل ۴). همچنین، نتایج آزمون t مستقل نشان داد که در هر مرحله از مراحل رشد و نمو میوه (به استثناء مرحله تشکیل میوه)، تفاوت معنی داری از نظر محتوای آنتوسیانین بین دو محیط مورد ارزیابی وجود داشت (شکل ۴). 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 و شکل ۴).



شکل ۲. محتوای مواد فنلی کل در شرایط محتمل و غیرمختل برای بروز عارضه سفیدشدگی آریل انار در مراحل مختلف رشد و نمو میوه حروف غیرمشترک در هر مرحله از رشد میوه نشان دهنده تفاوت معنی دار بر اساس آزمون t مستقل می باشد؛ * و ** به ترتیب نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد می باشند. (منبع: یافته های تحقیق).



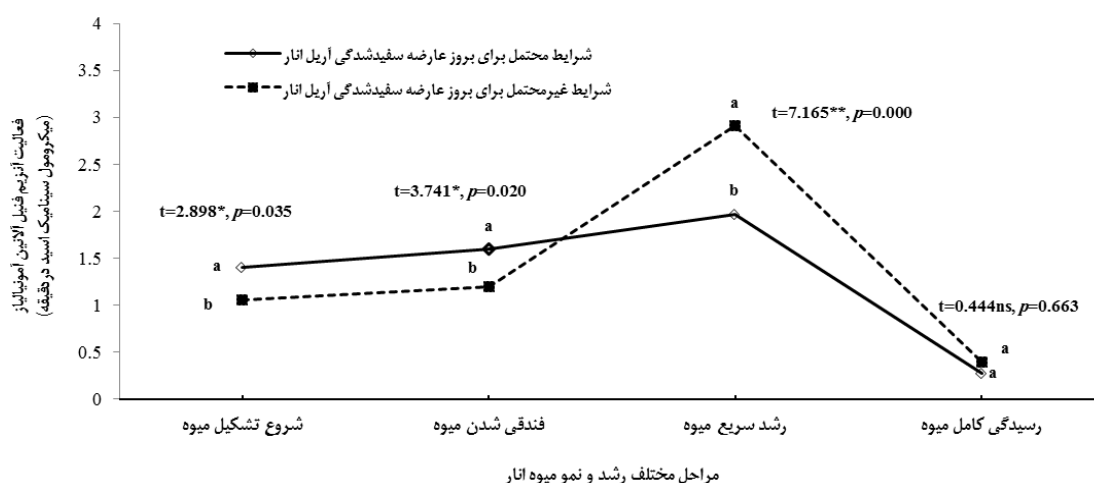
شکل ۳. محتوای فلاونوئید کل در شرایط محتمل و غیرمختل برای بروز عارضه سفیدشدگی آریل انار در مراحل مختلف رشد و نمو میوه حروف غیرمشترک در هر مرحله از رشد میوه نشان دهنده تفاوت معنی دار بر اساس آزمون t مستقل می باشد؛ * و ** به ترتیب نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد می باشند. (منبع: یافته های تحقیق).



شکل ۴. محتوای آنتوسیانین در شرایط محتمل و غیرمحمتمل برای بروز عارضه سفیدشدگی آریل انار در مراحل مختلف رشد و نمو میوه حروف غیرمشترک در هر مرحله از رشد میوه نشان‌دهنده تفاوت معنی دار بر اساس آزمون t مستقل می‌باشد؛ * و ** به ترتیب نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد می‌باشند. (منبع: یافته‌های تحقیق).

فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالاز

در هر دو شرایط محتمل و غیر محتمل برای وقوع عارضه سفیدشدگی آریل انار، فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالاز از زمان تشکیل میوه تا مرحله رشد سریع میوه روند افزایشی نشان داد (جدول ۲). همچنین، بیشترین فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالاز در مرحله رشد سریع میوه (مرحله سوم) ثبت گردید (جدول ۲). با این وجود، کمترین فعالیت این آنزیم، 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 ۵). نکته قابل توجه آنکه حساس‌ترین مرحله رشد و نمو میوه برای تغییر در میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالاز در فاصله زمانی فندقی شدن میوه (مرحله دوم) تا مرحله رشد سریع میوه (مرحله سوم) رخ داد (شکل ۵).



شکل ۵. فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالاز در شرایط محتمل و غیرمحمتمل برای بروز عارضه سفیدشدگی آریل انار در مراحل مختلف رشد و نمو میوه؛

حروف غیرمشترک در هر مرحله از رشد میوه نشان‌دهنده تفاوت معنی دار بر اساس آزمون t مستقل می‌باشد؛ * و ** به ترتیب نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد می‌باشند. (منبع: یافته‌های تحقیق).

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 مواد فنلی کل بعد از مرحله فندق شدن تا پایان مرحله رشد و نمو میوه روندی نزولی و منظم داشته است. (برخی مطالعات Weerakkody et al., 2010) نیز، مشابه تحقیق حاضر، نشان داده اند 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 برخی مطالعات گزارش شده است. (Kulkarni & Aradhya, 2005; Mirdehghan & Rahemi, 2007; Weerakkody et al., 2010; Fawole & Opara, 2013; Goldstein & Swain, 1963) و گواوا (Bashir & Abu-Goukh, 2003) نیز نشان داده شده است. از سوی دیگر، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که روند کاهشی محتوای مواد فنلی کل 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، گزارش شده است که 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 ارتباط دارد. محتوای پلی‌فنل‌ها شامل استرهای اسید گالیک است که میزان گس بودن طعم میوه را تعیین می‌کند (Ozawa et al., 1987). کاهش گسی یکی از تغییرات اصلی است که در طول رسیدن بسیاری از میوه‌ها رخ می‌دهد. 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 در مصارف تازه‌خوری و همچنین به‌صورت آب انار یکی از ویژگی‌هایی است که حس مطلوبی را ایجاد می‌کند. 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 انجام شده (Wang et al., 1997) ضمن تاکید بر اهمیت نقش اسیدهای فنولیک و ترکیبات فلاونوئیدی بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی میوه، نشان داده‌اند که ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بسیاری از میوه‌ها عمدتاً به‌دلیل مواد شیمیایی گیاهی غیر آسکوربیک اسید است. بدین جهت از دیدگاه سلامت مصرف‌کنندگان، هرچه محتوای این ترکیبات، به‌خصوص فلاونوئیدها (به‌دلیل فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا) بیشتر باشد بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل آب میوه و مزایای نسبی آن، از جهت سلامتی برای 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، محتوای مواد فنلی کل و محتوای فلاونوئید کل، 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 محتوای فلاونوئید کل از شیب ملایم‌تری در تمام مراحل رشد و نمو میوه برخوردار بود. همچنین، محتوای مواد فنلی کل در مراحل ابتدایی رشد و نمو میوه بیشتر از سایر مراحل بود. در توضیح این نتیجه نقش تنش گرمایی را نباید از نظر دور داشت. در منطقه ساوه و سایر مناطق دیگر، تنش گرمایی (به‌خصوص دمای بالای ۴۰ درجه سلسیوس) به‌عنوان اصلی‌ترین عامل در بروز و تشدید عارضه سفیدشدگی معرفی گردید (Melgarejo et al., 2004; Weerakkody et al., 2010; Kavand et al., 2020; Faraji & Karami, 2024). تنش گرمایی منجر به تولید گونه‌های فعال

اکسیژن و در نتیجه تنش اکسیداتیو می‌شود. از این رو گونه‌های گیاهی، از جمله انار، اثرات سمی گونه‌های فعال اکسیژن را با افزایش آنزیم‌هایی همچون کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز (Sofo et al., 2005; Farji et al., 2020) یا متابولیت‌های آنتی-اکسیدانی که توانایی حذف رادیکال‌های آزاد را دارند تعدیل می‌کنند. به عبارت دیگر 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 به دلیل مشارکت در مکانیسم‌های دفاعی اولیه (اما ناپایدار)، به منظور تعدیل آسیب‌های ناشی از تنش گرمایی می‌باشد. با این وجود، توجه به این نکته ضروری است که اگرچه سطح متابولیت‌های آنتی اکسیدانی گیاهان در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی تغییر می‌کند، اما این تغییرات ممکن است به طور دائمی نقش محافظتی قوی را ایفا ننمایند (Weerakkody et al., 2010)، بنابراین با افزایش شدت تنش یا مدت زمان تنش، سطح همه متابولیت‌های ثانویه به همان نسبت افزایش نخواهد یافت. به همین دلیل، محتوای مواد فنلی کل از مرحله فندق‌شدن میوه (مرحله دوم) و محتوای محتوای فلاونوئید کل از مرحله رشد سریع میوه (مرحله سوم) تا مرحله رسیدگی کامل میوه بیشترین کاهش را نشان دادند. در تایید این نتیجه، در یک بررسی بالا رفتن سطح دمای برگ درختان سیب از ۲۸ به ۴۰ درجه سلسیوس باعث افزایش محتوای آسکوربات کل، اسید آسکوربیک و گلوکاتیون در برگ‌ها شد، اما پس از قرار گرفتن در معرض دمای بالا به مدت بیش از ۲ ساعت، محتوای این ترکیبات آنتی اکسیدانی کاهش یافت (Ma et al., 2008). علاوه بر این، در گزارشی آمده است که در پاسخ به افزایش گونه‌های فعال اکسیژن تولید شده تحت شرایط نور و دمای بالا، سیستم آنتی اکسیدانی در پوست میوه سیب در مراحل اولیه فعالیت بالایی نشان داد، اما به علت آنکه سیستم دفاعی برای حفاظت در مقابل آسیب‌های ناشی از تنش نوری و دمایی کافی نبود آسیب‌دیدگی ناشی از آفتاب سوختگی در پوست میوه ظاهر گردید (Chen et al., 2008).

در مسیر بیوسنتز آنتوسیانین‌ها 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 فلاویلیوم منجر به بیوسنتز آنتوسیانین‌ها می‌شود (Kulkarni & Aradhya, 2005). آنزیم‌های متعددی برای گلیکوزیله شدن ترکیبات فلاونوئیدی وجود دارد که یکی از آن‌ها UDP-گلوز: فلاونوئید ۳-O-گلوزیل ترانسفراز می‌باشد (Gil et al., 2000). در مطالعات بسیاری مشخص شد که فعالیت ژن UFGT به عنوان ژن انتهایی سنتز آنتوسیانین منجر به ساخت این آنزیم می‌شود. در بررسی شناسایی ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز آنتوسیانین‌ها مشخص شد که تجمع آنتوسیانین در بافت‌های رنگی، ارتباط نزدیکی با میزان بیان ژن *PgUFGT*، در پوست و آریل میوه انار دارد، به طوری که در طول رشد و نمو میوه انار تغییر سطح بیان ژن *PgUFGT* منعکس کننده مرحله رسیدگی میوه و رنگ پوست می‌باشد. همچنین، بیان ژن *PgUFGT* 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 مرحله تشکیل میوه محتوای آنتوسیانین ناچیز بود، اما در هر دو شرایط مورد بررسی، تا مرحله سوم (رشد سریع میوه)، روند محتوای آنتوسیانین افزایشی، اما سپس تا مرحله رسیدگی کامل روند متفاوتی در هر دو شرایط محتمل (روند کاهش) و غیرمحتمل (روند افزایشی) در پدیده عارضه سفیدشدگی مشاهده شد. روند افزایشی محتوای آنتوسیانین در مراحل بلوغ میوه در بسیاری از مطالعات گزارش گردیده است (Kulkarni & Aradhya, 2005; Weerakkody et al., 2010; Khaksar et al., 2015) که مشابه با نتایج این تحقیق می‌باشد. در توجیه روند کاهش محتوای آنتوسیانین یا به عبارت دیگر 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 برای بیوسنتز آنتوسیانین و همچنین تاثیر شرایط محیطی بر ساختار و محتوای آنتوسیانین را نباید نادیده گرفت. در همین رابطه،

1. Catalase

2. Superoxide dismutase

3. Flavylium

4. UDP-glucose: flavonoid-3-O-glucosyltransferase (UFGT)

برخی مطالعات 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 نموده‌اند (Mena et al., 2011). علاوه بر این، برخی بررسی‌ها (Schwartz et al., 2009; Tarara et al., 2008; Mori et al., 2007; Kulkarni & Aradhva, 2005) تاثیر منفی تنش گرمایی را در فرایند بیوسنتز آنتوسیانین نشان دادند، به‌طوری‌که دمای پائین منجر به افزایش تجمع آنتوسیانین شده، اما 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)، تسریع تخریب شیمیایی رنگدانه، و افزایش فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز ناشی از تنش گرمایی باشد (Mori et al., 2007). نتایج مطالعه 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 آمونیا لایز (PAL) یکی از آنزیم‌های مشارکت‌کننده و آغازگر مسیر فنیل پروپانویید است. مسیری که در آن متابولیت‌هایی نظیر کومارین‌ها، اسانس‌ها، فلاونوئیدها، لیگنین، تانن و سایر ترکیبات پلی‌فنلی سنتز می‌شوند. در یک تحقیق، فعال‌شدن این آنزیم در طول رسیدگی میوه گزارش و یکی از دلایل فعال‌شدن آن به افزایش فعالیت هورمون اتیلن نسبت داده شد (Roca & Minguez-Mosquera, 2001). افزایش میزان اتیلن در فرایند رسیدگی میوه باعث تحریک فعالیت آنزیم کلروفیل‌لاز و به دنبال آن کاهش میزان رنگیزه‌های کلروفیلی در پوست و گوشت میوه می‌شود (Roca & Minguez-Mosquera, 2001). این افزایش، همچنین منجر به فعال‌شدن آنزیم PAL در مسیر بیوسنتز ترکیباتی نظیر آنتوسیانین‌ها و فلاونوئیدها می‌شود (Ebrahimzadeh, 2000). بر اساس نتایج Khademi et al. (2021)، همبستگی مثبت معنی‌دار بین سطح بیان ژن PAL با رنگ‌گیری آریل میوه انار، ارتباط فعالیت آنزیم PAL با محتوای آنتوسیانین، 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 توجه به روند تغییرات فعالیت آنزیم PAL و محتوای آنتوسیانین، به‌نظر 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 باشد.

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 به‌تنهایی در سنتز آنتوسیانین، دست کم در مراحل رشد و نمو میوه و به‌خصوص 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 نتیجه‌گیری را تقویت می‌کند. در تایید این نتیجه، Khademi et al. (2021) مشارکت آنزیم‌های PAL، چالکون سنتاز، لوکوآنتوسیانیدین دی‌اکسیژناز^۱ و UFGT را در بیوسنتز آنتوسیانین انار در سه رقم 'ملس ساوه'، 'نادری' و پوست سفید^۲ در سه تاریخ برداشت مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان دهنده همبستگی مثبت معنی‌داری بین سطح بیان ژن‌های کنترل‌کننده آنزیم‌های مورد بررسی، به‌خصوص ژن LDOX با محتوای آنتوسیانین آریل بود. سطح بیان ژن‌های مورد مطالعه در ارقام مختلف انار و تاریخ‌های مختلف برداشت متفاوت بود. سطح بیان ژن LDOX در رقم 'ملس ساوه' و 'نادری' در تمام تاریخ‌های برداشت، در مقایسه با سایر ژن‌های مورد بررسی بیشتر بود. رقم 'ملس ساوه' با شدت رنگ و محتوای آنتوسیانین بیشتر، در مقایسه با رقم 'نادری' دارای سطح بیان بالاتری از ژن UFGT بود. همچنین، در مطالعه Ben-Simhon et al. (2015) و Zhao et al. (2015)، گزارش گردید که در رقم 'P.G.254-265' (آریل و پوست سفید) در مقایسه با رقم 'واندروفل' (آریل و پوست قرمز) سطح پائین بیان ژن LDOX (از ژن‌های ساختاری مرکزی در مسیر بیوسنتز آنتوسیانین)،

1 Chalcone Synthase (CHS)

2 Leucoanthocyanidin dioxygenase (LDOX)

عامل سفید بودن پوست و آریل (عدم وجود آنتوسیانین) بوده است. همچنین، در رقم P.G.254-265 در هیچ کدام از بافت های مورد مطالعه (گل، آریل میوه، پوست میوه و برگ) آنتوسیانین مشاهده نشد، در حالی که سایر فلاونوئیدهای مربوط به واکنش های بیوشیمیایی بالادست ژن *LDOX* شناسایی شد. به طور مشابه، خاموشی ژن *LDOX* در سیب رقم 'برگ قرمز'، تقریباً به طور کامل منجر به عدم سنتز آنتوسیانین گردید. این اتفاق با یک تغییر در تجمع و پروفایل فلاونوئیدها و پلی فنول های مربوطه (به خصوص در بخش میانی) مسیر سنتز آنتوسیانین همراه بود (Szankowski et al., 2009). از سوی دیگر، بر خلاف میوه انار، در گلبرگ های گل مینا مهار فعالیت آنزیم PAL عامل عدم سنتز آنتوسیانین معرفی گردید (Shaked-Sachray et al., 2002). بنابراین، به نظر می رسد که در گونه های گیاهی مختلف و حتی ارقام مختلف یک گونه ژن های مشارکت کننده و سطح بیان این ژن ها در بیوسنتز آنتوسیانین می تواند متفاوت باشد.

نتیجه گیری و پیشنهادها

تولید متابولیت های ثانویه، به خصوص آنتوسیانین در طول رشد و نمو میوه یک پدیده ضروری است که بر کیفیت (طعم، بو و رنگ)، بازارپسندی و خواص درمانی میوه تأثیر می گذارد. با این وجود، در یک دهه اخیر بروز عارضه سفیدشدگی آریل انار به عنوان عامل جدید و فراگیر در کاهش کیفیت میوه انار در ایران گزارش گردید. بر اساس نتایج این تحقیق، 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 به شدت تحت تأثیر قرار می گیرد و حساس ترین مرحله با بیشترین تغییرات در محتوای ترکیبات پلی فنولیک، از مرحله فندقی شدن میوه تا رسیدگی کامل میوه می باشد. بدین جهت، مدیریت اصولی باغ ها، از جمله احداث باغ های انار در ارتفاعات بالا (≤ 1000 متر از سطح دریا)، شیب مناسب درخت کاری به خصوص در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری (شیب های شمالی و شرقی)، انتخاب آرایش مناسب کاشت درختان به منظور حصول بیشترین سایه اندازی (آرایش کاشت مربع)، استفاده از مالچ با رنگ روشن، حفظ علف های هرز یک ساله در کف باغ و همچنین استفاده از سایبان با رنگ روشن در مراحل رشد و نمو میوه یا مرحله احداث باغ های انار، به منظور کاهش خسارت ناشی از تنش گرما به عنوان مهمترین عوامل در بروز و شدت عارضه سفیدشدگی آریل انار ضروری است. در مطالعه حاضر مشخص شد که آنزیم PAL در بیوسنتز آنتوسیانین در مراحل رشد و نمو میوه انار رقم "ملس ساوه" مشارکت دارد. از سوی دیگر، با توجه به 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 (جود تنش گرمایی) و غیرمحتمل برای بروز عارضه سفیدشدگی از مرحله رشد سریع میوه تا بلوغ میوه انار، می توان نتیجه گرفت که علاوه بر آنزیم PAL، نقش سایر آنزیم های مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها را در تجمع و سنتز آنتوسیانین میوه انار 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، حسن (۱۳۹۰). فیزیولوژی گیاهی. چاپ دوم. تهران: موسسه انتشارات دانشگاه تهران. ۶۷۰ صفحه.
خادمی، اورنگ؛ ناجی، امیرمحمد و زارعی، عبدالکریم (۱۴۰۰). مقایسه سطح بیان برخی ژن های مسیر بیوسنتزی آنتوسیانین در سه رقم انار با رنگ های مختلف. *دوازدهمین کنگره علوم باغبانی ایران*، دانشگاه ولی عصر رفسنجان، ایران.

خاکسار، غزاله؛ سید طباطبائی، بدرالدین و ارزانی، احمد (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، سحر؛ راحمی، مجید و جعفری، مسلم (۱۴۰۰). اثرات آب و خاک شور بر دانه سفیدی انار. پژوهش‌های میوه‌کاری، ۱ (۱)، ۱۲۱-۱۲۸.

فرجی، سکینه و کرمی، ثریا (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، ۵۵ (۳)، ۵۱۳-۴۹۵.

محسنی، علی؛ فرازمند، حسین؛ طباطبائی اردکانی، سید ضیاء الدین؛ عسکری، موسی؛ عسکری، سید عسگری؛ عشقی، مهدی؛ غضنفری، سلمان؛ حسن‌پور اونجی، سید رحمان و عنقابی، حسین (۱۳۹۹). دستورالعمل انار (کشت، داشت، برداشت). تهران: مرکز ترویج و آموزش کشاورزی.

نرجسی، وحیده (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. <http://dx.doi.org/10.4061/2011/371517>
- 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. <http://dx.doi.org/10.5958/0974-0112.2019.00043.4>
- Bashir, H.A. & Abu-Goukh, A.B.A. (2003). Compositional changes during guava fruit ripening. *Food Chemistry*, 80(4), 557-563. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00345-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00345-X)
- 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142777>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2008.10.011>
- Boudet, A.M. (2007). Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry*, 68(22-24), 2722-2735. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.06.012>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s00425-008-0776-3>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.025>
- Ebrahimzadeh, H. (2000). *Plant Physiology*. (Vol 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*, 55 (3), 495-513. <https://doi.org/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. | <https://doi.org/10.17660/th2020/75.3.5>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2012.11.010>

- 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. <https://doi.org/10.1021/jf000404a>
- 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. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)84860-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)84860-8)
- Gould K.S. & Lister C. (2006) Flavonoid functions in plants. In O. M. Andersen & K. R. Markham (Eds.), *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications* (pp. 397-441). 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). <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2003.618.49>
- 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. <https://doi.org/10.1021/jf8005917>
- 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 presentation] 12th 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.09.029>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2008.07.010>
- 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. <https://doi.org/10.22059/ijhst.2014.50518>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2003.09.006>
- 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. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4411>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.10.001>
- Mohseni, A., Farazmand, H., Tabatabai Ardakani, S.D., Askari, M., Asgari Khakzad, S., Eshghi, M., ... & 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. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm055>
- 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). <https://doi.org/10.22034/saps.2021.12815>
- Oren-Shamir, M. (2009). Does anthocyanin degradation play a significant role in determining pigment concentration in plants?. *Plant Science*, 177(4), 310-316. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2009.06.015>
- Ozawa, T., Lilley, T.H. & Haslam, E. (1987). Polyphenol interactions: Astringency and the loss of astringency in ripening fruit. *Phytochemistry*, 26(11), 2937-2942. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)84566-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)84566-5)
- 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. <https://doi.org/10.1021/jf001000l>
- 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). <https://doi.org/10.30466/rip.2021.121091>
- 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. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2002.1140408.x>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.01.036>
- Siegelman, H.W., & Hendricks, S.B. (1958). Photocontrol of anthocyanin synthesis in apple skin. *Plant Physiology*, 33(3), 185. <https://doi.org/10.1104/pp.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. <https://doi.org/10.1071/FP04003>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s00425-008-0864-4>
- 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. <https://doi.org/10.5344/ajev.2008.59.3.235>
- Wang, H., Cao, G. & Prior, R.L. (1997). Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(2), 304-309. <https://doi.org/10.1021/jf960421t>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2006.04.261>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.12.003>
- 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.

<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.03.043>

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. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.09.048>

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. <https://doi.org/10.1007/s10265-015-0717-8>