

ارزیابی پاسخ‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی برخی از ارقام انار ایرانی در مقایسه با رقم وارداتی و اندرفول در شرایط کم آبیاری

Evaluation of Physiological and Biochemical Responses of Some Iranian Pomegranate Cultivars in Comparison with Introduced 'Wonderful' Cultivar Under Low Irrigation Condition

فرزانه پایمرد^{۱*}، عبدالرحمان محمدخانی^۱، علی نیازی^۲، علیرضا شهسوار^۳ و محمدرضا نوری امامزاده‌ای^۴

۱. گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

۲. پژوهشکده بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.

۳. گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.

۴. گروه خاکشناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

نویسنده مسئول، پست الکترونیک: (fpimard@yahoo.com)

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۶/۶، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۵

چکیده

تغییرات آب و هوایی منجر به تنش خشکی شده که تهدیدی برای تولید محصولات کشاورزی، از جمله انار که از تولیدات مهم باغی ایران می‌باشد، محسوب می‌شود. این پژوهش با هدف بررسی اثر تنش کم‌آبی بر ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی انار به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو فاکتور شامل سطح آبیاری (۱۰۰، ۷۵، ۵۵ و ۳۵ درصد ظرفیت زراعی) و پنج رقم انار (رباب نیریز، ملس ممتاز ساوه، ملس یوسف خانی، تبریزی و واندرفول) انجام شد. نتایج این پژوهش نشان داد که تنش کم‌آبی باعث کاهش محتوای نسبی آب (کاهش ۳۵ درصد)، ثبات غشاء یاخته (کاهش ۴۲/۹ درصد)، کلروفیل a و کلروفیل کل، و افزایش مقدار کاروتنوئید (افزایش ۱۹/۵ درصد)، فلاونوئید (افزایش ۷/۹ درصد)، کربوهیدرات محلول کل (افزایش ۲۳/۹ درصد) و فنول کل (افزایش ۲۱/۴ درصد)، در سطح ۳۵ درصد ظرفیت زراعی نسبت به تیمار شاهد شد. در بین رقم‌های مورد بررسی، رقم واندرفول با بالاترین محتوای نسبی آب، کلروفیل a، b و کلروفیل کل، کاروتنوئید، ثبات غشاء و فنول کل بر اساس اسید الاجیک که نقش موثری در فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانی غیر آنزیمی و دفاعی در این رقم داشتند، در مقایسه با سایر ارقام انار، در برابر تنش خشکی متحمل‌تر و رقم تبریزی تحمل کمتری نسبت به تنش نشان داد.

واژه‌های کلیدی: تنش کم‌آبی، ثبات غشاء، کلروفیل، متابولیت‌های ثانویه.

مقدمه

انار (*Punica granatum* L.) میوه محبوب مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری بوده و بومی مناطق مختلفی بین ایران تا هیمالیا در شمال هند است. این درخت به طور گسترده در ایران، هند، کشورهای مدیترانه، مالزی، آفریقا، ایالات متحده، چین، ژاپن و روسیه کشت می‌شود (Nowak, & Tuzimski, 2007; Pena et al., 2013). ایران از نظر تعداد و تنوع ارقام انار، سطح زیر کشت، تولید و صادرات میوه انار، رتبه سوم را در جهان دارد (Pena et al., 2013). انار یکی از قدیمی‌ترین محصولات باغی است و میوه‌های آن به صورت تازه و فرآوری شده مصرف می‌شود (Zahedi et al., 2022). به دلیل ویژگی‌های تغذیه‌ای، محتوای بالای

اسید آسکوربیک، آنتوسیانین‌ها و اسید فرولیک، انار به عنوان منبع غنی از پلی‌فنول‌های رژیم غذایی، با ظرفیت آنتی اکسیدانی بالقوه و خواص ارتقا دهنده سلامت، شناخته شده است (Davaranpanah *et al.*, 2018).

تنش‌های غیر زیستی مختلفی مانند شوری، خشکی، اسمری و سرما می‌توانند بسیاری از صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی را در گونه‌های مختلف گیاهی تغییر دهند (Javadi & Jafari, 2016). در سال‌های اخیر ضمن کاهش میزان بارندگی، افزایش درجه حرارت کره زمین منجر به افزایش تبخیر و تعرق و توسعه مناطق خشک شده است (Cheuk *et al.*, 2020). قرار گرفتن گیاهان در معرض تنش خشکی به عنوان یکی از جدی‌ترین تنش‌های غیر زیستی ضمن کاهش رشد و عملکرد گیاه، باعث ایجاد طیف وسیعی از پاسخ‌ها و تغییرات فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی، مورفولوژیکی و استراتژی‌های مولکولی برای مقاومت در برابر شرایط تنش‌زا و بهبود عملکرد گیاهان به طرق مختلف می‌شود (Zahedi *et al.*, 2021; Rezayian *et al.*, 2018). گیاهان در طول چرخه زندگی خود برای مقاومت در برابر خشکی و یا مقابله با کمبود آب از مکانیسم‌های خاصی مانند گریز از خشکی، اجتناب از خشکی و تحمل خشکی بهره می‌گیرند. برخی گیاهان در بهار قبل از وقوع خشکی، چرخه زندگی خود را کامل می‌کنند، همچنین برخی از گیاهان از طریق تنظیم اسمری، تغییر در تعداد و اندازه روزنه‌ها، کاهش سطح برگ و افزایش نسبت ریشه به تاج (اجتناب از خشکی) از اتلاف آب جلوگیری می‌کنند. برخی ژنوتیپ‌ها نیز با انجام یک سری فعل و انفعالات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی (تحمل خشکی) با تنش خشکی مقابله می‌کنند (Wang *et al.*, 2012). تنش خشکی از طریق تاثیر بر برخی از فرآیندهای متابولیسمی باعث تغییر در رفتار و نهایتاً مقاوم سازی گیاه می‌شود (Yordanov & Velikova, 2003). تنش خشکی باعث القاء پاسخ‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در گیاهان می‌شود. این پاسخ‌ها شامل بسته شدن روزنه‌ای، توقف رشد گیاه و فتوسنتز و فعال‌سازی تنفس است. تجمع اسمولیت‌ها در سیتوزول، امکان تعدیل فشار اسمزی را در یاخته فراهم می‌آورد که در این شرایط از تجمع یون‌های سمی مثل سدیم که برای پروتئین‌ها و غشاء سمی است، جلوگیری می‌کند. اسمولیت‌ها همچنین باعث پایداری آنزیم‌ها در حضور یون‌ها در تنش آبی و نیز تاثیر بر ترکیبات شیمیایی دنا توره کننده می‌شوند. از واکنش‌های منحصر به فرد گیاه به تنش‌های محیطی به ویژه به تنش کم آبی می‌توان به تجمع قندهای محافظ شامل گلوکز، فروکتوز و ساکاروز، قندهای الکلی شامل مانیتول، گلیسرول، سوربیتول، پینیتول و کوئرسیتول، و همچنین پرولین، گلیسین بتائین و یون‌های معدنی اشاره نمود. مسیرهای متابولیسمی که شامل سنتز پلی‌آمین، کربوهیدرات، پرولین، گلیسین بتائین و ترهالوز می‌باشند، با مقاومت به خشکی در ارتباط هستند (Nasrabadi *et al.*, 2019; Slabbert & Kruger, 2014; Wu & Xia, 2006). املاح نقش مهمی در حفظ محتوای نسبی آب برگ (RWC) و عملکرد یاخته‌ای تحت تنش آبی دارند (Pena *et al.*, 2013).

تنش خشکی و کم آبی در انار ضمن کاهش عملکرد و کیفیت میوه، عوارضی مانند آفتاب‌سوختگی، ترک‌خوردگی و تغییر در محتوای ترکیبات مختلف بیوشیمیایی مانند فنولیک‌ها، آنتوسیانین‌ها، اسید سیتریک و اسید تارتاریک را تشدید می‌کند (Adib *et al.*, 2021a; Adib *et al.*, 2021b). همچنین باعث القاء پاسخ‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی و کاهش کیفیت و عملکرد می‌شود. از این رو در انتخاب ارقام، مساله خشکی و تحمل به خشکی باید مورد توجه قرار گیرد. میزان تحمل به خشکی در بین گونه‌ها و حتی در ارقام مختلف یک گونه متفاوت است. در بیش‌تر مطالعات مربوط به تاثیر خشکی و کم آبی در درختان انار، فرآیندهایی مانند تعرق، هدایت روزنه‌ای، پایداری کلروفیل، پایداری غشای یاخته، تبادل گازی و شاخص‌های فتوسنتزی، شاخص آسیب خشکی، تغییرات ماده خشک، اندازه و تراکم روزنه‌ها، راندمان آب، پتانسیل آب بافت‌ها و محتوای نسبی آب برگ مورد بررسی قرار گرفته است (Pena *et al.*, 2013; Galindo *et al.*, 2013; Mena *et al.*, 2013; Gholami *et al.*, 2012). تنش خشکی اغلب منجر به واکنش‌های روزنه‌ای برای کاهش تعرق شده و بر جذب CO_2 تاثیر منفی می‌گذارد. آسیب جدی تنش شدید آبی هنگامی اتفاق می‌افتد که بیش‌تر آب پروتوپلاسمی بافت خارج شده و منجر به اختلال عمده در متابولیسم، فعالیت‌های آنتی اکسیدانی آنزیمی و ساختار یاخته‌ای می‌شود که البته تاثیر منفی آن بر توسعه یاخته‌ای بیش از تقسیم یاخته‌ای است (Qian *et al.*, 2020). درخت انار از جمله گونه‌های متحمل به خشکی کم آبی است که معمولاً در مناطق خشک و نیمه خشک با منابع آبی محدود رشد می‌کند (Zahedi *et al.*, 2022). مطالعه روابط آبی برگ‌های درختان انار تحت رژیم‌های مختلف آبیاری نشان داد، درخت انار با توسعه مکانیسم‌های اجتناب از تنش و تحمل به تنش با تنش آبی مقابله می‌کند. هدایت روزنه‌ای برگ به منظور کنترل از دست دادن آب از طریق تعرق و با جلوگیری از کاهش تورژسانس برگ (مکانیسم اجتناب از

تنش) کاهش یافته و فعال شدن مکانیسم تنظیم اسمزی (مکانیسم تحمل تنش) باعث حفظ تورژسانس برگ می‌شود (Rodríguez-González et al., 2012).

اعمال تنش خشکی در درختان انار رقم رباب نشان داده، درختان انار از طریق مکانیسم‌های متعدد نظیر افزایش تورژسانس یاخته‌ای و با تجمع مواد اسمولیتی مثل قندهای محلول و اسیدهای آمینه‌ای مانند پرولین و افزایش پتانسیل آب یاخته برای دریافت آب بیش‌تر از خاک، حفظ رنگدانه‌های کلروفیل و کاروتنوئید از طریق کنترل محتوای آب نسبی برگ (RWC^8) و کاهش سطح ویژه برگ با تنش خشکی مقابله می‌کنند (Rad et al., 2015). گزارش شده که تنش خشکی بر محتوای متابولیت‌ها و فعالیت‌های آنزیمی آن‌تی‌اکسیدانی ارقام انار تاثیر دارد. به عنوان مثال رقم رباب تحت تنش خشکی ظرفیت آن‌تی‌اکسیدانی بالاتر و مکانیسم کارآمدی برای مهار گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) از خود نشان داده است. همچنین سطوح پایین‌تری از پراکسیداسیون لیپید غشاء در شرایط تنش خشکی و کاهش قابل توجه، در غلظت مالون دی‌آلدئید پس از آبیاری مجدد را نشانه تحمل بهتر تنش خشکی دانسته‌اند (Zahedi et al., 2022). مطالعه پاسخ‌های فیزیولوژیکی چند رقم انار (رباب نیریز، قجاق قم، شیشه کپ فردوس، ملس ساوه و ملس یزدی) به تنش خشکی و آبیاری مجدد جهت بررسی تحمل به خشکی نشان داده که همه ارقام انار دارای توانایی تحمل نسبت به تنش بوده ولی رقم قجاق با دارا بودن محتوای آب نسبی، پایداری غشاء و پتانسیل آب ساقه و تنظیم اسمزی بالاتر تحمل بیشتری نسبت به تنش خشکی نشان داده است. رقم ملس یزدی بیشترین آسیب پذیری را نسبت به تنش خشکی با درجه پایینی از پایداری غشاء در مقایسه با سایر ارقام مورد آزمایش نشان داده است (Pourghayoumi et al., 2017).

ارقام انار در ایران بسیار متنوع بوده و به دلیل تحمل نسبی آن در برابر کم‌آبی، در بیشتر نقاط کشور کشت می‌شود، اما در سال‌های اخیر به دلیل تنش شدید خشکی و کاهش منابع آب زیر زمینی آسیب جدی به باغ‌های انار وارد شده است (Qian et al., 2020). هرچند اطلاعات علمی با ارزشی در مورد جنبه‌های مختلف انار گزارش شده لیکن هنوز اطلاعات دقیقی از میزان تحمل ارقام مختلف به تنش خشکی در دسترس نیست. یکی از راهکارهای اساسی برای غلبه بر مشکلات ناشی از تنش، انتخاب ارقام مقاوم و اصلاح ژنوتیپ‌های سازگار می‌باشد. تحمل به تنش خشکی و کم‌آبی به دلیل برهمکنش بین عوامل تنش و پاسخ‌های مختلف مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و مولکولی که رشد گیاه را تحت تاثیر قرار می‌دهد بسیار پیچیده است (Giancarla et al., 2012; Jaleel et al., 2009). هدف از این پژوهش، غربالگری پنج رقم انار رباب نیریز، ملس ممتاز ساوه، ملس یوسف خانی، تبریزی و رقم واندرفول، در برابر تنش خشکی بر اساس برخی ویژگی‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و سنجش متابولیت‌های پاسخ دهنده به تنش خشکی می‌باشد تا بتوان مکانیسم و درجه نسبی تحمل به تنش خشکی را در بین ارقام مورد بررسی، تعیین نمود.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در گلخانه و پژوهشکده بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز (واقع در باجگاه) در عرض جغرافیایی ۲۹ درجه و ۷۳ دقیقه شمالی طول جغرافیایی ۵۲ درجه و ۵۸ دقیقه شرقی و با متوسط دمای ۲۵ درجه سلسیوس با دوره روشنایی ۱۶ ساعت با شدت نور حدود ۸۰۰ میکرومول در مترمربع بر ثانیه و رطوبت نسبی ۵۰ درصد در سال ۱۳۹۷ به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایش شامل فاکتور تنش خشکی بر اساس ظرفیت مزرعه (FC) در چهار سطح ۳۵، ۵۵، ۷۵ و ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی روی پنج رقم انار رباب نیریز^۲، ملس ممتاز ساوه^۴، ملس یوسف خانی^۵، تبریزی^۶ و رقم واندرفول^۷ (که به تازگی توسط شرکت ایتا صدرا وارد و از طریق کشت بافت و قلمه تکثیر و کشت آن توسعه یافته است) اجرا شد. نهال‌های دو ساله پس از تهیه به گلدان‌های ۵ لیتری که حاوی ترکیبی از خاک و ماسه و کمپوست به نسبت (۱:۱:۱) انتقال داده شدند. پس از چهار ماه سازگاری در گلخانه، تنش به مدت ۵۰ روز با اعمال روش ظرفیت زراعی مزرعه انجام گردید. ظرفیت زراعی براساس درصد رطوبت وزنی تعیین شد. در این معادله (رابطه ۱)، FC ظرفیت مزرعه، FW وزن تر خاک و DW وزن خشک خاک بود. رابطه (۱)

$$\%FC = ((FW - DW))/DW \times 100$$

۱- Relative water content ۲- Field capacity ۳- Rababe Neyriz ۴- Momtaz saveh ۵- Yousefkhani ۶- Tabrizi ۷- Wonderful

$100 \times \left\{ \frac{\text{وزن خشک خاک}}{(\text{وزن خشک خاک} - \text{وزن تر خاک})} \right\} = \text{درصد آب خاک}$

$100 \times (\text{وزن خشک خاک} / \text{وزن آب موجود در خاک}) = \text{نسبت رطوبت وزنی}$

با استفاده از میانگین عددی نسبت رطوبت وزنی و میانگین وزنی خاک خشک نمونه‌ها و همچنین وزن خاک موجود در گلدان‌ها، میزان نیاز آبی هر گلدان براساس ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی مشخص شد و سپس جهت مقادیر ۷۵ درصد، ۵۵ درصد و ۳۵ درصد ظرفیت زراعی نیز محاسبه شدند. سپس درصد رطوبت حجمی و حجم آب مورد نیاز هر تیمار با استفاده از درصد آب خاک به دست آمده در حالت ظرفیت زراعی محاسبه و جهت اعمال تیمارهای تنش کم آبیاری استفاده شد. پس از ۵۰ روز پس از اعمال تیمارها (در انتهای دوره تنش) نمونه‌برداری از برگ‌های بالغ انجام و صفات مورد نظر به شرح ذیل مورد ارزیابی قرار گرفت.

نسبت وزن خشک برگ به سطح برگ

اندازه‌گیری شاخص نسبت وزن خشک برگ در واحد سطح (LMA) ابتدا به کمک پانچ ۱۰ دیسک با قطر ۱/۴ سانتی‌متر از برگ‌های انار تازه جدا شد و به مدت ۲۴ ساعت در آون ۸۰ درجه سلسیوس قرار داده و سپس وزن خشک برگ‌ها تعیین شد. LMA بر اساس رابطه زیر اندازه‌گیری شد (Varon et al., 2012) (رابطه ۱) $LMA = \text{وزن خشک برگ} / \text{سطح برگ}$

محتوای نسبی آب برگ

برای سنجش محتوای نسبی آب، دیسک‌های برگ‌ها از پهنک برگ بالغ و جوان جدا و وزن (FW) و سپس درون آب مقطر به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی نگهداری و وزن حالت تورژسانس به دست آمد (TW) و پس از آن وزن نمونه‌های خشک شده در آون (DW) اندازه‌گیری و با استفاده از وزن تر، وزن اشباع و وزن خشک محاسبه و بر اساس درصد ارائه شد (رابطه ۲) (Bastam 2011).

$$\%RWC = (FW - DW) / (TW - DW) \times 100 \quad (\text{رابطه ۲})$$

شاخص پایداری غشا یاخته‌ای

سنجش شاخص پایداری غشا با روش Bertin و همکاران (۱۹۹۶) بر اساس تغییرات نشت یونی انجام شد. در ابتدا دیسک‌های برگ‌ها از برگ بالغ و تازه جدا شده تهیه و پس از ماندن در آب به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق هدایت الکتریکی نمونه‌ها با استفاده از EC متر اندازه‌گیری شد (C1). سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس اتوکلاو شده و بعد از سرد شدن هدایت الکتریکی نمونه‌ها مجدداً اندازه‌گیری شد (C2). شاخص پایداری غشاء بر اساس رابطه زیر محاسبه گردید (رابطه ۳).

$$\% \text{ شاخص پایداری غشا} = 1 - (C1/C2) \times 10$$

کلروفیل و کاروتنوئید

برای سنجش رنگدانه‌های کلروفیل و کاروتنوئید، ۰/۱ گرم برگ تازه در ۵ میلی‌لیتر متانول خالص همگن شد و به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی در دمای ۴ درجه سلسیوس قرار داده شد، سپس محلول روشن‌ر در طول موج‌های ۶۶۵/۲، ۶۵۲/۴ و ۴۷۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Uv/visible spectrophotometer-sp-3000 plus made by Optima Tokyo, Japan) ساخت کشور ژاپن قرائت گردید و با استفاده از رابطه (۴) زیر محاسبه شدند (Liu et al., 2020). رابطه (۴)

Chlorophyll a (mg.g⁻¹ fw) = {16.72 (A665.2) - 9.26 (A652.4)}

Chlorophyll b (mg.g⁻¹ fw) = {34.09 (A652.4) - 15.28 (A665.2)}

Total Chlorophyll (mg.g⁻¹ fw) = Chl a + Chl b

Cartenoid (mg.g⁻¹ fw) = [(1000 (A470) - 1.63(chla) - 104.96 (chlb) / 221]

آنتوسیانین

اندازه‌گیری آنتوسیانین طبق روش Alexieva و همکاران (۲۰۰۱) با عصاره‌گیری از ۰/۲ گرم بافت برگ با متانول اسیدی یک درصد انجام شد. نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در در دمای ۴ درجه سلسیوس در تاریکی نگهداری و سپس عصاره حاصل سانتریفیوژ و در طول موج ۵۳۰ و ۶۵۷ نانومتر قرائت شد. مقدار آنتوسیانین با استفاده از رابطه زیر (رابطه ۵) محاسبه شد. در این رابطه، A مقدار جذب در طول موج مورد نظر می‌باشد. رابطه (۵)

$$\text{Anthocyanin} = A530 - (0.25 \times A657)$$

فلاونوئید

مقدار فلاونوئید از روش رنگ سنجی کلرید آلومینیوم محاسبه شد. عصاره‌گیری از ۰/۲ گرم بافت برگ در سه میلی‌لیتر متانول اسیدی (۹۹:۱) انجام و سپس ۰/۱ میلی‌لیتر کلرید آلومینیوم ۱۰٪ با ۰/۱ میلی‌لیتر استات پتاسیم یک آمیخته و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر به مخلوط اضافه شد. در آخر ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول عصاره به آمیخته افزوده شد. نمونه‌ها پس از ۳۰ دقیقه ماندن در تاریکی در طول موج ۴۱۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Optima) قرائت گردید. مقدار فلاونوئید کل با استفاده از منحنی استاندارد کوئرستین، به صورت میلی‌گرم کوئرستین بر گرم وزن تر محاسبه شد (Karimi et al., 2017; Chang et al., 2002).

فنول کل

جهت سنجش مواد فنولی، ۰/۱ گرم از بافت تازه در ۵ میلی‌لیتر اتانول ۰/۹۵ سائیده و در لوله‌های آزمایش به مدت ۷۲۴۸ ساعت در تاریکی نگهداری و سپس ۱ میلی‌لیتر از محلول روشن‌آور با ۱ میلی‌لیتر اتانول ۰/۹۵٪ مخلوط و توسط آب مقطر به حجم ۵ میلی‌لیتر رسانده شد. به محلول موجود، ۰/۵ میلی‌لیتر معرف فولین ۵۰ درصد و ۱ میلی‌لیتر کربنات کلسیم ۵ درصد اضافه کرده که منجر به ایجاد رنگ سیاه در نمونه‌ها گردید. لوله‌ها به مدت یک ساعت در تاریکی نگهداری و سپس میزان جذب آن‌ها در طول موج ۷۲۵ نانومتر دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد (Isfendiyaroglu & Zeker, 2002). نمونه شاهد شامل مخلوط سنجش بدون عصاره بود. مقدار فنول کل با استفاده از منحنی استاندارد اسید گالیک و اسید الایک و به صورت (میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) با استفاده از رابطه ۶ گزارش گردید. (A میزان جذب). (رابطه ۶)

$$3.6 + (A \times 104.984) = \text{فنول}$$

کربوهیدرات محلول کل

سنجش میزان کربوهیدرات محلول برگ‌ها مطابق روش Irigoyen و همکاران (۱۹۹۲) میزان قند محلول محاسبه شد. برای این منظور، ۰/۱ میلی‌لیتر از عصاره تهیه شده در اتانول با ۳ میلی‌لیتر از آنترون تازه تهیه شده (۲۰۰ میلی‌گرم آنترون به علاوه ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۷۲ درصد) مخلوط شده و سپس، به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم قرار داده شد. پس از خنک شدن، جذب نوری آن در در طول موج ۶۲۵ نانومتر قرائت شد. مقدار کربوهیدرات محلول کل با استفاده از منحنی استاندارد گلوکز و بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه شد.

واکاوی داده‌ها

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها توسط نرم افزار MSTAT-C (ver 1.42)، SPSS (ver, 26) و Minita 16 مقایسه میانگین‌ها براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام گردید. رسم شکل‌ها با استفاده از نرم افزار Excel انجام گرفت. تحلیل عاملی به منظور تعیین فاکتورهای فیزیولوژیکی تأثیرگذار بر طبقه‌بندی نمونه‌ها، با استفاده از نرم‌افزارهای SPSS (ver, 26) و Minita 16، تجزیه عاملی (FA) انجام گردید. نتایج تجزیه واریانس صفات در جدول‌های شماره ۳ و ۴ (پیوست) نشان داده شده است.

نتایج و بحث

محتوای نسبی آب برگ (RWC)

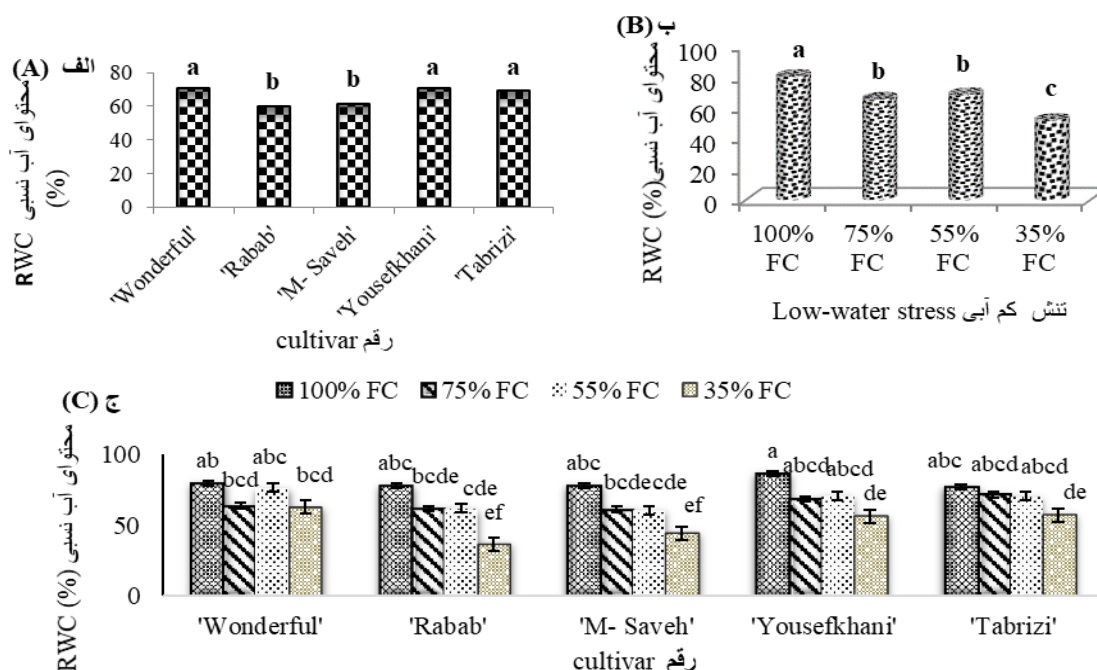
نتایج نشان داد RWC تحت تأثیر تنش خشکی قرار گرفت و با افزایش سطح تنش خشکی از ۱۰۰ درصد (۸۰/۰۷ درصد) تا ۳۵ درصد (۵۱/۶ درصد) و با کاهش ۳۵/۵ درصدی نسبت به شاهد RWC به‌طور معنی‌داری کاهش نشان داد (شکل ۱-الف). بیشترین RWC در رقم‌های واندرفول (۷۰/۸٪) و یوسف‌خانی (۷۰/۸٪) و کمترین RWC در رقم رباب (۵۹/۶٪) مشاهده شد (شکل ۱-ب). در همه ارقام با افزایش سطح خشکی از ۱۰۰٪ به ۳۵٪ نیاز آبی، RWC کاهش یافت، بیشترین محتوای نسبی آب در تیمار ۱۰۰٪ نیاز آبی در رقم یوسف‌خانی (۸۶/۵۹٪) بود و کمترین میزان در رقم رباب مربوط به تیمار خشکی ۳۵٪ نیاز آبی به میزان ۳۶/۸٪ مشاهده شد. با توجه به کاهش RWC برگ، رقم واندرفول نسبت به سایر ارقام نسبت بالایی از RWC (۶۹/۸۲٪) را در سطح ۳۵٪ تنش خشکی نشان داد (شکل ۱-ج). محتوای نسبی آب برگ نشان دهنده میزان آب موجود در اندام‌های گیاه یا شادابی آن بوده و قابلیت یک گیاه در حفظ آب در شرایط تنش را مشخص می‌کند. هر چه

RWC بیش‌تر باشد، توانایی حفظ آب در گیاه نیز بیش‌تر خواهد بود. در بیش‌تر گونه‌ها وقتی که جذب آب توسط ریشه با میزان تعرق و آب از دست دهی برگ‌ها برابر باشد، محتوای نسبی آب برگ حدود ۹۵-۸۵٪ است (Slabbert & Kruger, 2014). کاهش در محتوای نسبی آب برگ در شرایط کم آبیاری ممکن است یکی از دلایل کاهش رشد گیاهان در شرایط تنش باشد (Zhu, 2002). در این پژوهش محتوای نسبی آب در بین ارقام تحت تنش خشکی انار نیز متفاوت بود. ارقام متحمل‌تر در برابر خشکی، محتوای نسبی آب بیش‌تری داشته‌اند. نتایج مشابهی در مورد سیب^۸ (Gao et al., 2020)، نارنج سه برگ^۹ (He et al., 2019) و مرکبات (Conceicao Assar, et al., 2021; dos Santos, 2019) گزارش شده است. به نظر می‌رسد با کاهش محتوای نسبی آب برگ انار در نتیجه تنش کم‌آبی، سیستم آنتی‌اکسیدانی و تنظیم اسمزی فعال شده و گیاه را در مقابل تنش محافظت می‌کند. محتوای نسبی آب را می‌توان به عنوان معیاری برای ارزیابی تحمل به خشکی استفاده نمود (Conceicao dos Santos, 2019). زیرا بین RWC با سرعت تعرق ارتباط وجود دارد و همچنین محتوای نسبی آب برگ‌ها با حجم یاخته مرتبط است در نتیجه از این شاخص جهت تعیین مقاومت ارقام از نظر تحمل به خشکی و سنجش میزان تنش استفاده می‌گردد. مکانیسم‌های کاهش هدایت روزنه‌ای و کنترل اتلاف آب از طریق حفظ تورژسانس برگ، بسته شدن کامل روزنه‌ها در شرایط تنش شدید، تطابق اسمزی از طریق تجمع مواد اسمولیتی در درون یاخته‌ها و حفظ تورژسانس یاخته‌ها، باعث افزایش گنجایش نسبی آب و در نهایت افزایش پتانسیل آب یاخته می‌شود (Santos et al., 2005). در این پژوهش بیش‌ترین میزان افزایش در RWC به ترتیب مربوط به رقم واندرفول، یوسف‌خانی و تبریزی مشاهده شد. به نظر می‌رسد در رقم واندرفول سازوکار تنظیم اسمزی نقش عمده‌ای در مقابله با تنش شدید خشکی دارد. RWC در این پژوهش همبستگی مثبت با کلروفیل کل، ثبات غشاء یاخته و نسبت کلروفیل به کاروتنوئید و همبستگی منفی با صفات نسبت وزن خشک به سطح و میزان کربوهیدرات، نشان داد (جدول ۲).

نسبت وزن خشک برگ به سطح برگ

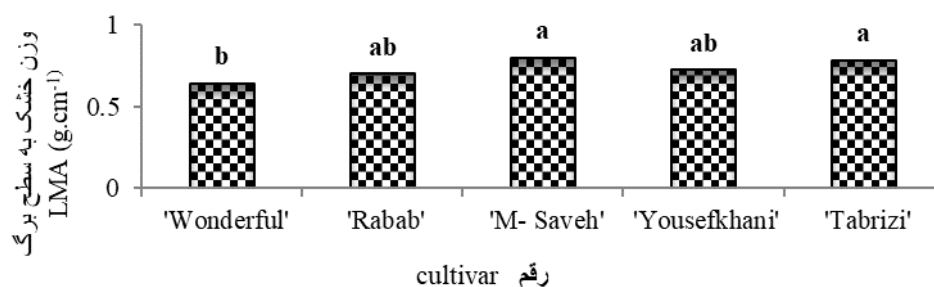
نتایج نشان داد نسبت وزن خشک به سطح برگ در بین سطوح تنش کم آبی تفاوت معنی‌داری نداشت. بیش‌ترین نسبت وزن خشک در واحد سطح برگ مربوط به رقم‌های ممتاز ساوه ($0/78 \text{ g/cm}^{-1}$) و تبریزی ($0/78 \text{ g/cm}^{-1}$) بود که نسبت به رقم واندرفول ($0/64 \text{ g/cm}^{-1}$) اختلاف معنی‌داری را نشان داد. کمترین نسبت وزن خشک برگ به سطح در رقم واندرفول ($0/64 \text{ g/cm}^{-1}$) مشاهده شد که با این میزان در رقم‌های رباب ($0/69 \text{ g/cm}^{-1}$) و یوسف‌خانی ($0/72 \text{ g/cm}^{-1}$) تفاوت معنی‌داری نداشت (شکل ۲). برهمکنش رقم و سطح تنش کم آبی بر میزان وزن خشک برگ در واحد سطح معنی‌دار نبود. کاهش سطح برگ فرآیند مهمی است که گیاهان در تنش خشکی جهت حفظ آب مورد نیاز از آن استفاده می‌کنند. رشد اندام‌ها نتیجه تقسیم و توسعه یاخته‌ای است (Yang et al., 2021) و از آنجایی که لازمه بزرگ شدن یاخته، فشار تورژسانس ناشی از جذب آب است بنابراین اثر تنش آبی بر توسعه یاخته‌ای آشکارتر از تقسیم یاخته‌ای است (Taiz & Zeiger, 2015; Lichtenthaler, 1987). کاهش سطح برگ و افزایش تراکم بافت و ضخامت برگ مکانیسمی برای سازگاری با خشکی است (Bhusal et al., 2020). در اثر خشکی، کاهش فشار تورژسانس برگ منجر به کاهش سطح برگ می‌شود (Hosseini et al., 2017) و راندمان فتوسنتزی نیز تابعی از شاخص سطح سبز برگ و در نتیجه جذب نور فعال فتوسنتزی است (Dastborhan & Ghassemi-Golezani, 2015). رقم‌های با وزن خشک در واحد سطح بالاتر، ارقام مقاوم‌تری تحت تنش خشکی هستند، به این دلیل که مقدار بیش‌تری از مواد خشک را در خود تجمع می‌کنند و سبب می‌شوند RWC در سطح بالاتری نگه داشته شود و در نتیجه فعالیت‌های متابولیکی یاخته و تنظیم فعال اسمزی در طی تنش خشکی حفظ شود (Rodríguez-González et al., 2012). در این پژوهش در طی تنش خشکی رقم ممتاز ساوه دارای بالاترین میزان وزن خشک در واحد سطح بود و بیش‌ترین میزان کاهش در RWC مربوط به این رقم بود. به نظر می‌رسد در رقم ممتاز ساوه نقش تنظیم اسمزی در مقابله با تنش کم خشکی محدود باشد و برعکس رقم واندرفول که کمترین میزان وزن خشک در واحد سطح را دارا بود، کمترین کاهش را در محتوای نسبی آب نشان داد و تنظیم اسمزی در مقابله با تنش در آن نقش عمده‌ای را دارا بود. شاخص نسبت وزن خشک به سطح

برگ در این پژوهش همبستگی مثبت با کربوهیدرات محلول کل و همبستگی منفی با RWC کلروفیل a و b و کلروفیل کل و کاروتنوئید داشت (جدول ۲).



شکل ۱- اثر رقم انار بر محتوای نسبی آب برگ (الف)، اثر تنش کم آبی بر محتوای نسبی آب برگ (ب)، برهمکنش رقم و تنش کم آبی بر محتوای نسبی آب برگ در ارقام انار تحت تنش کم آبی. † میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک، در سطح احتمال ۵٪ آزمون دانکن تفاوت معنی‌داری ندارند.

Fig. 1. (A) Effect of pomegranate cultivar on relative leaf water content (RWC), (B) Effect of low-water stress on RWC, (C) Interaction effect of cultivar and stress levels on RWC in pomegranate cultivars under low-water stress. † In each chart, columns with atleast one similar letter indicate no significant difference among treatments according to Duncan test at 5% level of probability.



شکل ۲- اثر رقم بر نسبت وزن خشک برگ به سطح در ارقام انار تحت تنش کم آبی. † میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک، در سطح احتمال ۵٪ آزمون دانکن تفاوت معنی‌داری ندارند.

Fig. 2. Effect of pomegranate cultivar on the ratio of leaf dry weight to Area (LMA) in pomegranate cultivars under low-water stress. In each chart, † Columns with atleast one similar letter indicate no significant difference among treatments according to Duncan test at 5% level of probability

جدول ۱- برهمکنش رقم و سطح تنش بر برخی آنٹی اکسیدان‌های غیر آنزیمی (کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل، کاروتنوئید، نسبت کلروفیل به کاروتنوئید، آنتوسیانین و فلاونوئید) در برگ ارقام انار تحت تنش کم آبی

Table 1. Interaction effect of cultivar and stress level on some non-enzymatic antioxidants (chlorophyll a, chlorophyll b, total chlorophyll, carotenoid, chlorophyll to carotenoid ratio, anthocyanin and flavonoid) in leaves of pomegranate cultivars under low-water stress.

تنش کم آبی Low water stress	رقم Cultivar	کلروفیل a (میلی گرم/گرم وزن تر) Chlorophyll a (mg/g fw)	کلروفیل b (میلی گرم/گرم وزن تر) Chlorophyll b (mg/g fw)	کلروفیل کل (میلی گرم/گرم وزن تر) Chlorophyll T (mg/g fw)	کاروتنوئید (میلی گرم/گرم وزن تر) Carotenoid (mg/g fw)	کلروفیل کل / کاروتنوئید Chlorophyll / carotenoid	آنتوسیانین (میلی گرم/گرم وزن تر) Anthocyanin (mg/g fw)	فلاونوئید (میلی گرم/گرم وزن تر) Flavonoid (mg/g fw)
100% FC	'Wonderful'	13.95 ^a	6.567 ^a	20.5 ^a	11.1 ^{bcd}	1.86 ^{a-c}	7.05 ^a	29.54 ^{f-h}
	'Rabab'	12.72 ^{ab}	4.787 ^{ab}	17.5 ^{a-c}	8.52 ^e	2.09 ^{ab}	5.33 ^{ab}	33.72 ^{ef}
	'M- Saveh'	13.32 ^{ab}	6.76 ^a	20.08 ^{ab}	9.7 ^{cde}	2.07 ^{ab}	6.49 ^{ab}	36.42 ^{de}
	'Yousefkhani'	13.36 ^{ab}	6.6 ^a	19.96 ^{ab}	10.12 ^{b-e}	1.98 ^{abc}	5.8 ^{ab}	33.17 ^{e-h}
	'Tabrizi'	7.91 ^e	4.5 ^{ab}	12.41 ^{ef}	8.83 ^e	1.41 ^{d^{ef}}	4.98 ^{ab}	28.28 ^{gh}
75% FC	'Wonderful'	13.29 ^{ab}	5.68 ^{ab}	18.97 ^{ab}	11.07 ^{b-d}	1.73 ^{a-d}	5.67 ^{ab}	28.31 ^{gh}
	'Rabab'	13.05 ^{ab}	5.19 ^{ab}	18.97 ^{ab}	8.94 ^e	2.12 ^a	5.37 ^{ab}	48.24 ^a
	'M- Saveh'	11.11 ^{a-d}	5.55 ^{ab}	16.67 ^{abcd}	9.86 ^{c-e}	1.69 ^{b-d}	5.27 ^{ab}	32.17 ^{e-h}
	'Yousefkhani'	11.34 ^{a-d}	5.53 ^{ab}	16.88 ^{abcd}	9.54 ^{c-e}	1.76 ^{a-d}	5.22 ^{ab}	32.26 ^{e-h}
	'Tabrizi'	7.49 ^e	4.4 ^{a^b}	11.9 ^f	9.96 ^{c-e}	1.19 ^f	5.97 ^{ab}	28.6 ^{gh}
55% FC	'Wonderful'	12.67 ^{ab}	6.46 ^a	19.13 ^{ab}	12.14 ^{ab}	1.58 ^{c-f}	5.81 ^{ab}	33.91 ^{ef}
	'Rabab'	11.86 ^{a-c}	6.46 ^a	18.3 ^{ab}	10.14 ^{b-e}	1.81 ^{a-d}	6.57 ^{ab}	44.29 ^{ab}
	'M- Saveh'	7.46 ^e	3.71 ^b	11.17 ^f	9.13 ^{de}	1.22 ^{ef}	4.9 ^{ab}	22.92 ⁱ
	'Yousefkhani'	12.7 ^{ab}	6.257 ^a	18.95 ^{ab}	12.07 ^{ab}	1.57 ^{c-f}	5.9 ^{ab}	40.36 ^{b-d}
	'Tabrizi'	8.49 ^{de}	4.48 ^{ab}	12.97 ^{def}	9.22 ^{de}	1.4 ^{d-f}	5.43 ^{ab}	33.05 ^{e-g}
35% FC	'Wonderful'	11.42 ^{a-d}	5.8 ^{ab}	17.22 ^{abc}	13.67 ^a	1.26 ^{ef}	4.33 ^b	39.73 ^{cd}
	'Rabab'	10.3 ^{b-e}	5.85 ^{ab}	16.15 ^{b-e}	10.49 ^{b-e}	1.57 ^{c-f}	6.43 ^{ab}	27.99 ^h
	'M- Saveh'	13.03 ^{ab}	4.69 ^{ab}	17.7 ^{a-c}	11.02 ^{bcd}	1.62 ^{c-e}	5.57 ^{ab}	42.28 ^{bc}
	'Yousefkhani'	12.4 ^{ab}	6.4 ^a	18.8 ^{ab}	11.52 ^{bc}	1.63 ^{c-e}	5.65 ^{ab}	32.37 ^{e-h}
	'Tabrizi'	8.99 ^{c-e}	4.84 ^{ab}	13.83 ^{c-f}	11.04 ^{b-d}	1.26 ^{ef}	5.09 ^{ab}	31.52 ^{e-h}

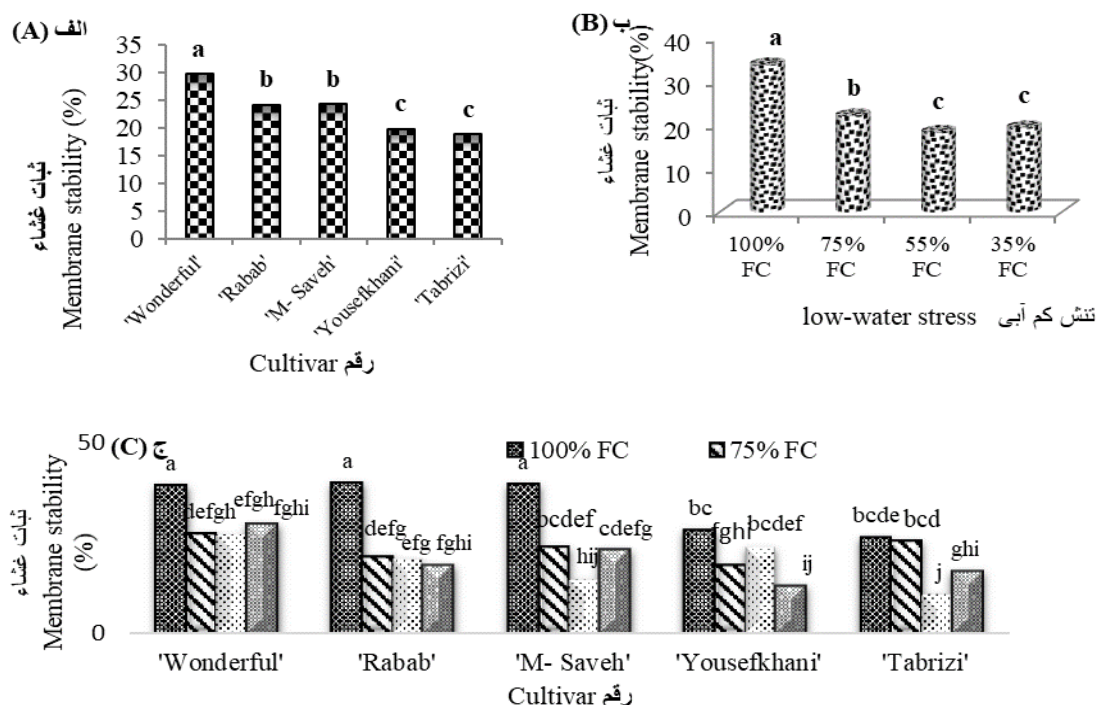
† میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک، در سطح احتمال ۵٪ آزمون دانکن تفاوت معنی‌داری ندارند.

† Columns with atleast one similar letter indicate no significant difference among treatments according to Duncan test at 5% level of probability

شاخص پایداری و ثبات غشاء یاخته

بر طبق نتایج، با افزایش تنش خشکی میزان ثبات غشاء یاخته برگ کاهش یافت. بیش‌ترین میزان ثبات غشاء در تیمار شاهد با ۱۰۰٪ نیاز آبی (۳۲/۷٪) مشاهده گردید که به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از این میزان در سایر تیمارها بود. همچنین کمترین میزان ثبات غشاء یاخته برگ در تیمارهای خشکی ۵۵ و ۳۵٪ نیاز آبی (به ترتیب ۱۸/۲ و ۱۹/۲۵٪) با ۴۶ و ۴۲/۹٪ کاهش ثبات غشا با اختلاف معنی‌داری نسبت به شاهد مشاهده شد (شکل ۳-ب). در بین رقم‌ها نیز بیش‌ترین میزان مربوط به رقم واندرفول (۲۹/۱٪) بود که به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از این مقدار در سایر رقم‌ها بود. کم‌ترین میزان ثبات غشاء در رقم تبریزی (۱۸/۷۸٪) مشاهده شد (شکل ۳-الف). نتایج برهمکنش‌ها نشان داد، در تمام ارقام با افزایش سطح تنش خشکی، ثبات غشاء یاخته برگ کاهش یافت. همچنین بیش‌ترین میزان ثبات غشاء یاخته مربوط به رقم واندرفول در سطح شاهد با ۱۰۰٪ نیاز بود و کم‌ترین میزان ثبات غشاء یاخته در رقم تبریزی ۹/۹۷٪ در سطح ۵۵٪ نیاز آبی مشاهده شد (شکل ۳-ج). میزان ثبات غشاء در این پژوهش دارای همبستگی مثبت با فاکتورهای RWC، کلروفیل a، کلروفیل کل و نسبت کلروفیل به کاروتنوئید و همبستگی منفی با میزان کربوهیدرات محلول کل و فنول کل (اسید گالیک) بود (جدول ۲). نتایج این همبستگی‌ها و معنی‌دار نشان می‌دهد که غشاءهای یاخته‌ای به کاهش مقدار آب در گیاه حساس بوده و در طی تنش خشکی دچار آسیب شده که با افزایش پراکسیداسیون لیپید غشاء یاخته‌ای، گیاه سیستم آنتی اکسیدانی آنزیمی و غیر آنزیمی و تنظیم اسمزی خود را برای کاهش خسارت به یاخته‌ها فعال کرده و گیاه را در مقابل تنش محافظت می‌کند.

پژوهشگران با بررسی میزان ثبات غشاء در سایر درختان میوه تحت تنش خشکی از جمله گردو^۱ (Karimi et al., 2020)، نارنج سه برگ (He et al., 2019)، انار (Eftekhari Shahabadi, 2017)، بلوط^۲ (Jafarnia et al., 2018)، انگور^۳ (Xiaoyue et al., 2020)، نشان دادند که تنش خشکی باعث کاهش ثبات غشاء و افزایش نشت یونی یاخته گردید که نتایج حاصل از این پژوهش در رابطه با کاهش ثبات غشاء یاخته در برگ انار تحت تنش خشکی با آن نتایج همسو می‌باشد. میزان یکپارچگی و پایداری غشاء یاخته در شرایط تنش شدید خشکی با تحمل به تنش خشکی در ارتباط است. رقم‌های انار مورد مطالعه از نظر میزان پایداری غشاء یاخته به‌طور معنی‌داری با یکدیگر اختلاف داشتند. نتایج نشان داد بالاترین و پایین‌ترین درجه پایداری غشاء یاخته‌ای به ترتیب مربوط به رقم واندرفول و تبریزی بود. درجه پایین پایداری غشاء یاخته‌ای در رقم تبریزی می‌تواند در ارتباط با آسیب‌های بیش‌تر این رقم در طی تنش شدید خشکی و تحمل کم‌تر نسبت به شرایط کمبود آب باشد. از طرف دیگر میزان بالاتر پایداری غشاء یاخته‌ای در رقم واندرفول و همچنین به ترتیب، رباب و ممتاز ساوه می‌تواند در ارتباط با سیستم کارآمد این ارقام در مقابله با تنش خشکی و حذف رادیکال‌های آزاد ROS باشد. مکانیسم‌های تحمل به خشکی در رقم واندرفول می‌تواند در ارتباط با تنظیم اسمزی فعال و نتیجه سیستم آنتی اکسیدانی آنزیمی فعال در این رقم باشد. تنش خشکی فرآیندهای مختلف فیزیولوژیکی مانند پایداری غشاء یاخته را تحت تاثیر قرار می‌دهد. نقص در متابولیسم یاخته‌ای در هنگام کم آبی باعث ایجاد گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) و آسیب به غشای یاخته‌ای شده که منجر به افزایش نشت الکترولیت یاخته‌ای می‌گردد (Karimi et al., 2020). نتایج نشان داده است که افزایش شدت و مدت زمان تنش خشکی سبب ایجاد اختلال شدیدتر در فعالیت‌های بیولوژیک غشای یاخته‌ای، کاهش سیالیت و غیرفعال سازی یا کاهش سرعت پمپ شدن یون‌های غشایی می‌شود، بنابراین بر میزان نشت یون‌ها نیز افزوده می‌گردد (Sarker & Oba, 2018). همچنین حفظ تمامیت غشای یاخته‌ای در طی تنش خشکی نشانه وجود مکانیسم‌های کنترلی در تحمل به پسابدگی است بنابراین تنش خشکی یک سری تغییرات را در فسفولیپیدهای غشا ایجاد می‌کند و اسیدهای چرب غیراشباع، افزایش می‌یابند. در تنش‌های شدید بعضی از قسمت‌های فسفولیپیدهای دو لایه ای غشا، حالت شش وجهی پیدا کرده و ساختار غشاء به ساختار منفذدار تبدیل می‌شود و نشت مواد رخ می‌دهد (Mitra, 2001).



شکل ۳- اثر رقم انار بر ثبات غشاء (الف)، اثر سطح تنش بر ثبات غشاء (ب)، برهمکنش رقم و تنش خشکی بر ثبات غشاء در ارقام انار تحت تنش کم آبی. † میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک، در سطح احتمال ۵٪ آزمون دانکن تفاوت معنی‌داری ندارند.

Fig. 3. (A) Effect of pomegranate cultivar on Membrane stability, (B) Effect of low-water stress on Membrane stability, (C) Interaction effect of cultivar and stress levels on Membrane stability in pomegranate cultivars under low-water stress. † In each chart, columns with atleast one similar letter indicate no significant difference among treatments according to Duncan test at 5% level of probability.

کلروفیل

بر اساس نتایج، با افزایش سطح تنش خشکی، میزان کلروفیل a کاهش نشان داد. بیش‌ترین میزان کلروفیل a در سطح ۱۰۰٪ درصد ظرفیت زراعی ($12/25 \text{ mg/g}^{-1} \text{FW}$) مشاهده شد که به‌طور معنی‌داری بیش‌تر این مقدار در سطح ۵۵٪ ظرفیت زراعی با کم‌ترین مقدار ($10/6 \text{ mg/g}^{-1} \text{FW}$) و ۱۳٪ کاهش نسبت به شاهد بود. بیش‌ترین میزان کلروفیل a، مربوط به رقم واندرفول ($12/84 \text{ mg/g}^{-1} \text{FW}$) و کمترین کلروفیل a نیز در رقم تبریزی ($8/2 \text{ mg/g}^{-1} \text{FW}$) مشاهده شد. برهمکنش رقم و سطوح مختلف تنش خشکی نشان داد، در همه رقم‌ها با افزایش سطح تنش خشکی از ۱۰۰ به ۳۵٪ ظرفیت زراعی، میزان کلروفیل a کاهش یافت اما در رقم ممتاز ساوه در سطح ۳۵٪ کاهش نیاز آبی نسبت به سایر ارقام افزایش کلروفیل ($\text{mg/g}^{-1} \text{FW}$) نشان داد (جدول ۱). میزان کلروفیل a در این پژوهش دارای همبستگی مثبت با شاخص‌های پایداری غشاء، کلروفیل b، کلروفیل کل و نسبت کلروفیل به کاروتنوئید، کاروتنوئید و فلاونوئید و همبستگی منفی با میزان نسبت وزن خشک به سطح برگ و کربوهیدرات محلول کل بود (جدول ۲). در ارتباط با کاهش کلروفیل a تحت تنش خشکی، نتایج مشابهی برای انار (Eftekhari Shahabadi, 2017)، سیب (Gao et al., 2020) و زیتون^۱ (Shafiei, 2016) گزارش شده است.

کلروفیل b

نتایج این پژوهش نشان داد که با افزایش سطح تنش خشکی تفاوت معنی‌داری در بین تیمارهای خشکی مشاهده نشد. در بین رقم‌ها، بیش‌ترین میزان مربوط به رقم یوسف خانی و واندرفول (به ترتیب $6/2$ و $6/13 \text{ mg/g}^{-1} \text{FW}$) و کمترین میزان کلروفیل b نیز در رقم تبریزی مشاهده شد که به‌طور معنی‌داری کمتر از این میزان در سایر رقم‌ها بود. برهمکنش رقم و سطوح مختلف تنش خشکی بر میزان کلروفیل b نشان داد، در همه رقم‌ها جز رقم رباب با افزایش سطح تنش خشکی از ۱۰۰

به ۳۵٪ ظرفیت زراعی، میزان کلروفیل b کاهش نشان داد ولی این کاهش معنی‌داری نبود. در رقم رباب نیز با وجود کمی افزایش در مقدار کلروفیل b با افزایش سطح خشکی، این افزایش در بین تیمارهای خشکی تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول ۱). میزان کلروفیل b در این پژوهش دارای همبستگی مثبت با فاکتورهای کلروفیل a، کلروفیل کل، نسبت کلروفیل به کاروتنوئید، کاروتنوئید، آنتوسیانین و فلاونوئید بود. همچنین همبستگی منفی با نسبت وزن خشک به سطح برگ داشت (جدول ۲). نتایج مشابهی در سایر درختان میوه تحت تنش خشکی از جمله سیب (Gao et al., 2020) و زیتون (Sheffield & Wood, 2008) به دست آمده که نتایج حاصل از این پژوهش در رابطه با کاهش کلروفیل b در برگ انار با نتایج ذکر شده تحت تنش خشکی همسو می باشد.

کلروفیل کل

بر طبق نتایج، با افزایش سطح تنش میزان کلروفیل کل کاهش یافت. بیش‌ترین میزان کلروفیل کل در سطح ۱۰۰٪ ظرفیت زراعی ($18/1 \text{ mg/g}^{-1} \text{FW}$) و کم‌ترین میزان کلروفیل کل نیز مربوط به سطح ۵۵٪ ظرفیت زراعی در مقایسه با شاهد بود. بیش‌ترین میزان کلروفیل کل مربوط به رقم‌های واندرفول و یوسف‌خانی (به ترتیب $18/96 \text{ mg/g}^{-1} \text{FW}$ و $18/65$) بود و کم‌ترین میزان کلروفیل نیز در رقم تبریزی ($12/78$) مشاهده گردید که به‌طور معنی‌داری کم‌تر از این میزان در سایر رقم‌ها بود. طبق نتایج این پژوهش در برهمکنش رقم و سطوح مختلف تنش خشکی بر میزان کلروفیل کل مشاهده شد. سطوح ۵۵٪، ۷۵٪ و ۳۵٪ ظرفیت زراعی نسبت به شاهد کاهش معنی‌داری نشان دادند (جدول ۱). نتایج مشابهی در سایر درختان میوه تحت تنش خشکی از جمله انار (Eftekhari Shahabadi, 2017)، سیب (Gao et al., 2020)، انجیر^۱ (Gholami et al., 2012)، بادام^۲ (Karimi et al., 2013)، مرکبات^۳ (Karimi et al., 2017; Conceicao dos Santos, 2019) و زردآلو^۴ (Liu et al., 2020) مشاهده شده است که نتایج حاصل از این پژوهش در رابطه با کاهش کلروفیل کل در برگ انار تحت تنش خشکی با نتایج ذکر شده همسو می باشد. میزان کلروفیل کل در این پژوهش دارای همبستگی مثبت با ثبات غشاء یاخته و فاکتورهای میزان محتوای نسبی آب، کلروفیل a و b، کلروفیل کل، کاروتنوئید، نسبت کلروفیل به کاروتنوئید، آنتوسیانین و فلاونوئید بود. همچنین دارای همبستگی منفی با نسبت وزن خشک به سطح برگ، میزان قندهای محلول کل بود (جدول ۲). مقدار رنگدانه‌ها یک شاخص مهم در گیاهان بوده که می‌تواند جهت بقاء ظرفیت و فعالیت فتوسنتز در گیاهان استفاده گردد. کاهش کلروفیل در اثر تنش خشکی یک پاسخ متدوال گیاهان در طی تنش‌های زنده و غیر زنده و به دلیل اکسیداسیون نوری، تجزیه کلروفیل و آسیب به بیوسنتز کلروفیل می‌باشد (Jafarnia et al., 2018). افزایش، کاهش یا عدم تغییر میزان کلروفیل در شرایط تنش خشکی و در طول دوره تنش و شدت تنش خشکی گزارش شده است (Banks, 2018). تنش خشکی سبب کاهش انتقال الکترون در فتوسنتز و محتوای کلروفیل می‌شود. از دست دادن کلروفیل در گیاه تحت تنش شدید می‌تواند در ارتباط با اکسیداسیون نوری و در نتیجه آن تنش اکسیداتیو ناشی از آن باشد. کم شدن کلروفیل در تنش خشکی را می‌توان به عواملی همچون آسیب‌های ساختاری کلروپلاست در اثر تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن و تجزیه نوری این رنگدانه‌ها، افزایش برخی هورمون‌ها مانند اتیلن و اسید آبسزیک و فعالیت کلروفیل‌از که منجر به هیدرولیز کلروپلاست و پروتئین‌های a تیلاکوئیدی، محتوای کلروفیلی گردد، مرتبط دانست (Huseynova, 2012). در شرایط تنش کمبود آب، کاهش محتوای کلروفیل به عنوان نشانه ای معمول از استرس اکسیداتیو در نظر گرفته شده است و طبق گزارشات (Hanci & Cebeci, 2014) کلروفیل a حساس‌تر از کلروفیل b است و در شرایط تنش بیش‌تر تخریب می‌شود (Fathi & Tari, 2016). کلروفیل یکی از ترکیبات اصلی کلروپلاست جهت فتوسنتز می‌باشد و محتوای کلروفیل نسبی همبستگی مثبتی با میزان فتوسنتز دارد. رنگدانه‌های فتوسنتز کننده از کلروفیل a، b و کل تشکیل شده‌اند و مهم‌ترین وظیفه آن‌ها دریافت و ذخیره انرژی نوری بوسیله رزونانس القایی از طریق مجتمع‌های آنتن و متعاقباً حمل و نقل الکترونی توسط فوتوسیستم II می‌باشد (Zhu, 2002). کاهش میزان کلروفیل در اثر کمبود آب باعث القاء و تحریک از بین رفتن غشاهای کلروپلاست، تورم بیش از حد و بد شکلی کیسه‌های لاملا و ظاهر قطرات لیپیدی شده که منجر به کاهش غلظت رنگدانه فتوسنتزی می‌شود و به طور مستقیم می‌تواند پتانسیل فتوسنتزی و در نتیجه تولید اولیه را محدود کند. علاوه بر این کاهش کلروفیل ممکن است به علت تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن باشد، که

سبب تجزیه این رنگیزه‌ها می‌شوند (Shafiei, 2016). کاهش غلظت کلروفیل در طی تنش خشکی در برخی رقم‌ها (تبریزی) ممکن است یک راهکار اضافی برای محافظت نوری بوده که جذب نور به‌وسیله کلروپلاست را کاهش می‌دهد و از تنش اکسیداتیو بیشتر در کلروپلاست جلوگیری می‌کند.

کاروتنوئید

بر طبق نتایج، با افزایش سطح تنش خشکی مقدار کاروتنوئید افزایش یافت که بیش‌ترین میزان کاروتنوئید مربوط به سطح ۳۵٪ ظرفیت زراعی ($11/5 \text{ mg/g}^{-1} \text{FW}$) بود که تفاوت معنی‌داری را نسبت به سایر سطوح ظرفیت زراعی نشان داد. اثر برهمکنش رقم و سطوح مختلف تنش خشکی بر میزان کاروتنوئید نشان داد، کمترین میزان کاروتنوئید نیز مربوط به سطح ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی (شاهد) بود. در بین رقم‌ها بیش‌ترین مقدار مربوط به رقم واندر فول ($12 \text{ mg/g}^{-1} \text{FW}$) و کمترین مقدار کاروتنوئید نیز در رقم رباب ($9/52 \text{ mg/g}^{-1} \text{FW}$) مشاهده گردید. در تمام رقم‌ها با افزایش سطح تنش خشکی از ۱۰۰ به ۳۵٪ ظرفیت زراعی مقدار کاروتنوئید افزایش یافت (جدول ۱). اثر برهمکنش رقم و سطح تنش بر میزان کاروتنوئید معنی‌دار نبود. میزان کاروتنوئید در این پژوهش دارای همبستگی مثبت با کلروفیل a و b، کلروفیل کل و همبستگی منفی با نسبت وزن خشک به سطح برگ، میزان کربوهیدرات محلول کل و نسبت کلروفیل به کاروتنوئید و نسبت وزن خشک به سطح برگ بود (جدول ۲). همبستگی‌های مثبت نشان می‌دهد که با افزایش کاروتنوئیدها گیاه سیستم آنتی اکسیدانی را برای حفاظت از غشاهای تیلاکوئیدی و جلوگیری از تخریب کلروفیل‌ها فعال می‌کند. کاروتنوئیدها به عنوان ترکیبات محافظ نوری، با خاموش کردن کلروفیل نقش مهمی در محدود کردن خسارت ساختاری به کلروپلاست و کلروفیل دارند. بنابراین حفظ کاروتنوئیدها در برگ‌ها ممکن است منجر به کاهش آسیب ساختاری و افزایش غلظت کلروفیل در زمان تنش آبی گردد (Khaleghi et al., 2019). کاروتنوئیدها به عنوان آنتی اکسیدان، بازدارنده پراکسیداسیون چربی و پایدارساز غشاهای شناخته شده‌اند (He et al., 2019). به نظر می‌رسد افزایش کاروتنوئید در درختان خزان‌دار تحت شرایط تنش خشکی نشان‌دهنده یک نیاز بالاتر محافظت نوری به‌وسیله کاروتنوئیدها می‌باشد (Mellisho et al., 2012). بررسی پاسخ تنش خشکی در نهال‌های گلابی وحشی در سه منطقه مختلف نشان داد، در تمامی مناطق میزان رنگدانه کاروتنوئید در نهال‌های گلابی تحت تنش خشکی افزایش یافت (Zarafshar et al., 2014) که نتایج حاصل از این پژوهش با آن همسو می‌باشد.

نسبت کلروفیل به کاروتنوئید

نتایج نشان داد در بین ارقام بیش‌ترین نسبت کلروفیل به کاروتنوئید مربوط به رقم رباب ($1/9$) بود که از این نظر تفاوت معنی‌داری با رقم واندر فول ($1/6$) و تبریزی ($1/3$) داشت. کمترین نسبت کلروفیل به کاروتنوئید نیز در رقم تبریزی ($1/3$) مشاهده گردید (شکل ۷). اثر برهمکنش رقم و سطوح مختلف تنش خشکی نشان داد، در همه رقم‌ها با افزایش سطح تنش خشکی از ۱۰۰ به ۳۵٪ ظرفیت زراعی، نسبت کلروفیل به کاروتنوئید کاهش یافت و این کاهش در رقم تبریزی با تفاوت معنی‌داری نسبت به سایر ارقام مشاهده شد. (جدول ۱). نسبت کلروفیل به کاروتنوئید شاخصی است که نشان‌دهنده میزان سبزی برگ گیاهان است. مقادیر پایین این شاخص نشان‌دهنده تنش و خسارت به مجموعه فتوسنتزی است که با تخریب سریع‌تر کلروفیل نسبت به کاروتنوئید شرح داده می‌شود. رقم رباب دارای بالاترین نسبت کلروفیل به کاروتنوئید و کمترین کاهش در این نسبت بود در نتیجه به نظر می‌رسد که سیستم فتوسنتزی و فعالیت متابولیکی در این رقم کمتر تحت تاثیر اثرات مضر تنش قرار گرفته است.

آنتوسیانین

نتایج نشان داد که سطوح تنش خشکی و رقم‌ها بر میزان آنتوسیانین و همچنین برهمکنش اثر تنش خشکی و رقم نیز بر میزان آنتوسیانین برگ انار تحت تنش خشکی معنی‌دار نبود (جدول ۱). میزان آنتوسیانین در این پژوهش همبستگی مثبتی با مقدار سایر رنگیزه‌های کلروفیل b، کل و نسبت کلروفیل به کاروتنوئید داشت (جدول ۲).

جدول ۲- ضرایب همبستگی صفات مختلف در رقم های انار تحت تنش کم آبی

Table 2. correlation coefficients of different traits in pomegranate cultivar under low water stress

فلاونوئید Flavenoid	فنول (اسید گالیک) Phenol E	فنول (اسید الاجیک) Phenol G	کربوهیدرات محلول کل Total Carbohydrate	آنتوسیانین Antocyanin	کلروفیل/کاروتنوئید Cl T/Cart	کاروتنوئید Cartenoid	کلروفیل کل CL T	کلرفیل b Cl b	کلروفیل a Cl a	وزن خشک برگ به سطح DW/A	محتوای نسبی آب برگ RWC		
											1	RWC	محتوای نسبی آب برگ
										1	-0.237	DW/A	وزن خشک برگ به سطح برگ
									1	-0.248	0.213	Cl a	کلروفیل a
								1	0.500**	-0.319*	0.197	Cl b	کلرفیل b
							1	0.764**	0.490**	0.310*	0.236	CL T	کلروفیل کل
						1	0.372**	0.319*	0.332**	-0.302*	-0.090	Cartenoid	کاروتنوئید
					1	-0.331**	0.743**	0.533**	0.717**	-0.079	0.289*	Cl T/Cartenoid	کلروفیل/کاروتنوئید
				1	0.222	0.041	0.270*	0.288*	0.211	-0.034	-0.008	Antocyanin	آنتوسیانین
			1	0.008	-0.157	-0.225	-0.307*	-0.205	-0.305*	0.241	0.313*	Total Carbohydrate	کربوهیدرات محلول کل
		1	-0.269*	-0.140	-0.232	0.048	-0.174	-0.154	-0.153	0.159	-0.213	Phenol G	فنول (اسید گالیک)
	1	-0.246	-0.342**	0.080	-0.023	0.148	0.084	-0.012	0.120	-0.196	0.150	Phenol E	فنول (اسید الاجیک)
1	-0.059	-0.211	0.104	-0.011	0.341**	0.214	0.452**	0.320*	0.439**	0.019	-0.053	Flavenoid	فلاونوئید

† and †† Significant ($\alpha = 5\%$), highly significant ($\alpha = 1\%$), respectively

فلاونوئید

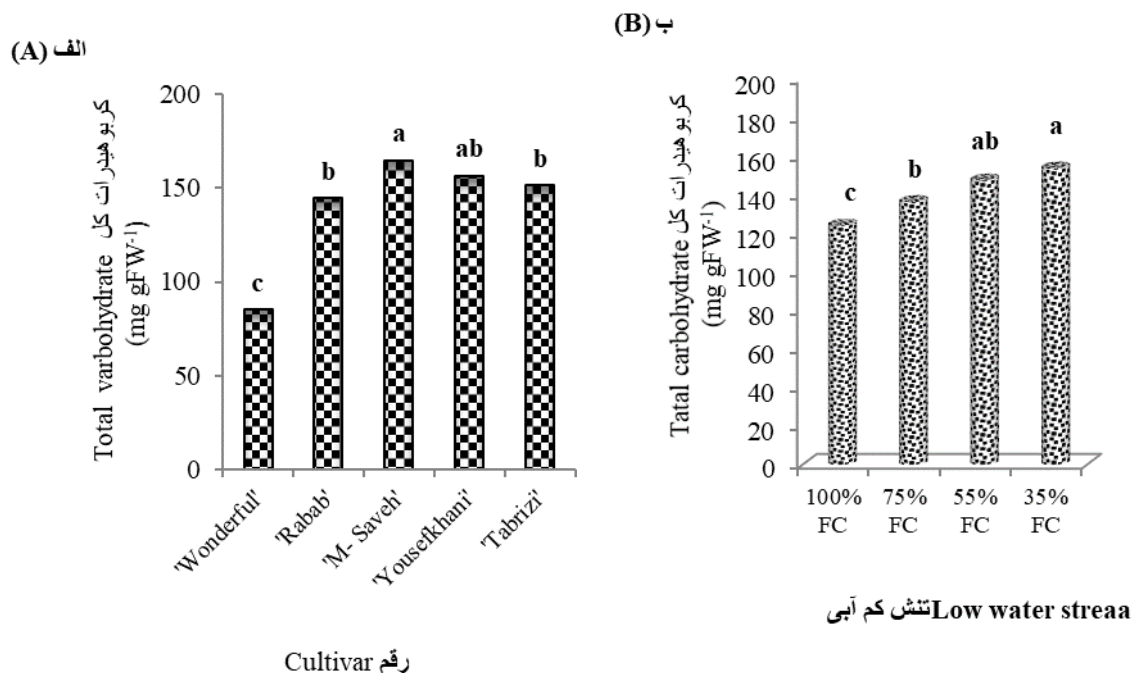
بر طبق نتایج با افزایش سطح تنش خشکی از ۱۰۰ تا ۳۵ درصد نیاز آبی، فلاونوئید برگ به طور پیوسته افزایش یافت. بیشترین میزان فلاونوئید در سطح ۵۵ درصد ظرفیت زراعی ($34/9 \text{ mg/g}^{-1} \text{FW}$) با $8/3$ درصد افزایش نسبت به شاهد مشاهده گردید و کمترین میزان فلاونوئید نیز مربوط به شاهد در سطح ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی ($32/2$) بود. اثر رقم بر میزان فلاونوئید تفاوت معنی داری نداشت. بررسی برهمکنش اثر رقم و تنش خشکی بر میزان فلاونوئید نشان داد در رقم واندرفول ($39/7 \text{ mg/g}^{-1} \text{FW}$) و ممتاز ساوه ($42/2 \text{ mg/g}^{-1} \text{FW}$) با افزایش سطح تنش خشکی از ۱۰۰ تا ۳۵٪ ظرفیت زراعی، میزان فلاونوئید افزایش یافت (جدول ۱). میزان فلاونوئید در این پژوهش دارای همبستگی مثبت با میزان کلروفیل a، b، کل و نسبت کلروفیل به کاروتنوئید بود (جدول ۲). نتایج اثر تنش خشکی بر میزان فلاونوئید در سایر گونه‌ها از جمله بلوط (Jafarnia et al., 2018) افزایش میزان فلاونوئید را نشان داد که نتایج حاصل از این پژوهش در رابطه با افزایش فلاونوئید در برگ انار تحت تنش خشکی با نتایج ذکر شده همسو می‌باشد. فلاونوئیدها از بزرگ‌ترین گروه ترکیبات فنولی و دارای نقش دفاعی در برابر تنش‌ها می‌باشند. این مواد در واکوئل یاخته‌های لایه اپیدرمی برگ و ساقه تجمع یافته و اثرات تنش اکسیداتیو را کاهش می‌دهند. از دلایل افزایش فلاونوئیدها، ایجاد محدودیت در انتقال الکترون فتوسنتزی طی تنش است که سبب ایجاد تغییرات متابولیک در گیاه از جمله منجر به القای فلاونوئیدها جهت تعدیل این وضعیت می‌شود (Taiz & Zeiger, 2006). توانایی گیاه در مواجهه با تنش خشکی با تغییر ترکیبات شیمیایی و تولید طیف متنوعی از متابولیت‌های ثانویه رخ می‌دهد. گیاهان از یک سیستم آنتی‌اکسیدانی برای کاهش آسیب غشای یاخته‌ای ناشی از رادیکال‌های آزاد با افزایش تجمع ترکیبات فنلی استفاده می‌کنند (Terzi et al., 2010). در میوه انار مهم‌ترین مکانیسم گیاهان در برابر تنش خشکی شامل تولید مواد آنتی‌اکسیدانی جهت کاهش خسارت اکسیداتیو توسط تولید رنگیزه‌های جذب‌کننده است. متابولیت‌های محافظ آن شامل پلی‌فنول‌هایی مثل الاجیتانین، تانن، آنتوسیانین و فلاونوئید می‌باشد. گزارش شده که با بررسی تاثیر کم آبیاری مداوم بر برخی ترکیبات بیواکتیو در میوه انار میزان ترکیبات فلاونوئیدی از جمله پروتوکاتکین اسید در میوه انار تحت تنش کم آبی، افزایش یافت (Pourghayoumi et al., 2017).

کربوهیدرات محلول کل

بر طبق نتایج در بین رقم‌ها بیشترین میزان کربوهیدرات کل در رقم ممتاز ساوه ($154/3 \text{ mg/g}^{-1} \text{FW}$) و کمترین میزان مربوط به رقم واندرفول ($97/6 \text{ mg/g}^{-1} \text{FW}$) بود (شکل ۴-الف). با افزایش سطح تنش خشکی از ۱۰۰ تا ۳۵ درصد ظرفیت زراعی، کربوهیدرات محلول کل افزایش نشان داد. بیشترین کربوهیدرات کل در سطح ۳۵ درصد نیاز آبی ($153/7 \text{ mg/g}^{-1} \text{FW}$) با $23/9$ درصد افزایش نسبت به شاهد و کمترین میزان کربوهیدرات کل نیز مربوط به شاهد (۱۰۰ درصد نیاز آبی) بود (شکل ۴-ب). در همه رقم‌ها با افزایش سطح تنش میزان کربوهیدرات کل نسبت به شاهد افزایش یافت ولی این افزایش در رقم‌های واندرفول، رباب، ممتاز ساوه و یوسف‌خانی در بین سطوح مختلف کم‌آبی معنی‌دار نبود و فقط در رقم تبریزی افزایش سطح خشکی به طور معنی‌داری میزان کربوهیدرات محلول کل را افزایش داد که نشان می‌دهد رقم تبریزی با استفاده از افزایش کربوهیدرات‌ها و قندهای محلول و تنظیم اسمزی نسبت به تنش خشکی واکنش نشان داده و تحمل می‌کند (شکل ۴-ج). پژوهشگران با بررسی میزان کربوهیدرات محلول کل در سایر درختان میوه و گونه‌های گیاهی تحت تنش خشکی از جمله انار (Eftekhari Shahabadi, 2017)، زیتون (Sheffield & Wood, 2008) و آلبالو (Javadi & Jafari, 2016) نشان دادند که تنش خشکی باعث افزایش کربوهیدرات محلول کل شده است. همچنین تنش خشکی در درخت سیب، سبب افزایش قندهای گلوکز و سوربیتول و اسید مالیک شده است (Gao et al., 2020) که نتایج حاصل از این پژوهش با نتایج ذکر شده همسو می‌باشد.

به نظر می‌رسد تجمع کربوهیدرات‌های محلول در برگ در شرایط تنش کم آبی به دلیل نیاز به آنها جهت تنظیم فشار اسمزی برگ و پایداری غشای یاخته‌ای باشد. در شرایط تنش کم‌آبی، کربوهیدرات‌های پیچیده به کربوهیدرات‌های ساده تجزیه شده و با تجزیه نشاسته و همچنین کاهش انتقال ساکارز به خارج از برگ باعث افزایش کربوهیدرات‌های ساده‌تر و محلول

همانند گلوکز، فروکتوز و سوربیتول می‌گردد. افزایش کربوهیدرات و قندهای محلول برگ در تنش خشکی در تعیین گونه‌های مقاوم مورد توجه می‌باشد. با کاهش فتوسنتز تحت تنش کم‌آبی، گیاه توسط مکانیسم‌هایی از جمله کاهش پتانسیل اسمزی، از یاخته در مقابل کم‌آبی محافظت نموده و با ایجاد پتانسیل اسمزی منفی‌تر، در صورت کمبود شدید آب منجر به جذب آب بیشتر می‌شود. ترکیبات کاهش‌دهنده پتانسیل اسمزی در گیاه با ایجاد پیوند با پروتئین‌ها، جایگزین مقدار آب هیدراته آن‌ها گردیده و از تجزیه شدن آن‌ها جلوگیری کرده و بدین شکل کمبود آب توسط گیاه بهتر تحمل می‌گردد. بعلاوه کاهش مصرف قند عامل دیگری جهت افزایش قند در یاخته بوده و کاهش رشد و توسعه یاخته نیز موجب کاهش تبدیل کربوهیدرات‌های محلول به پلی‌ساکاریدهای ساختمانی نظیر سلولز و همی‌سلولز می‌شود (Kannan & Kulandaivelu, 2011).



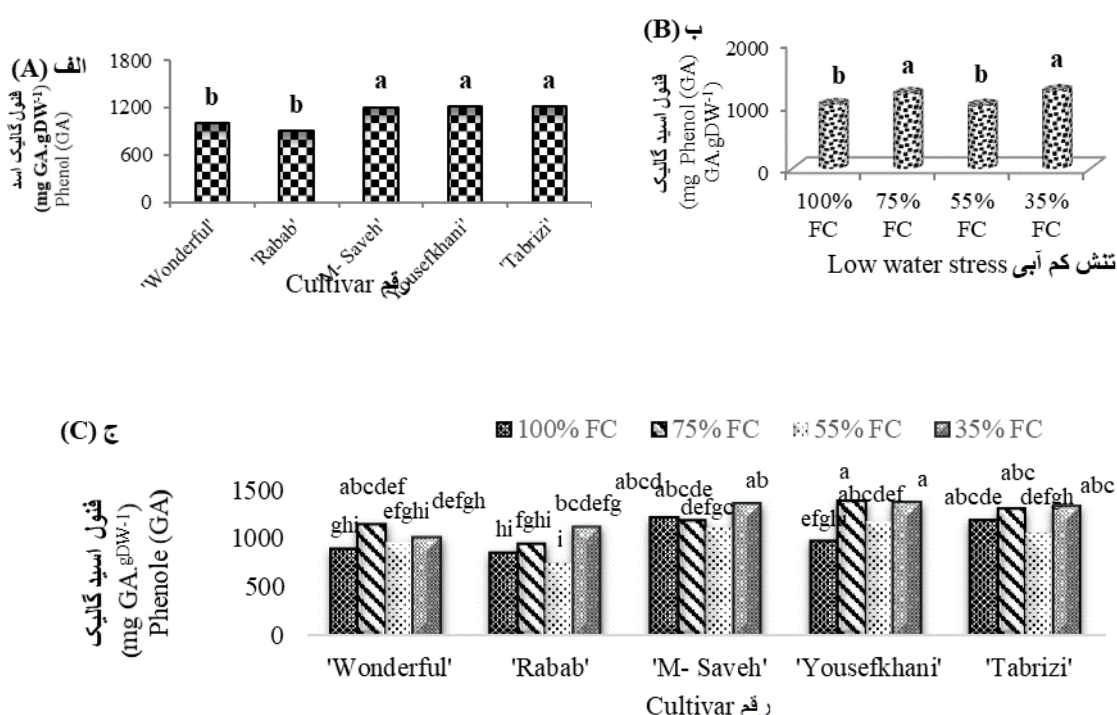
شکل ۴- اثر رقم انار بر کربوهیدرات محلول کل (الف)، اثر تنش کم‌آبی بر کربوهیدرات محلول کل (ب)، برهمکنش رقم و تنش کم‌آبی بر کربوهیدرات کل در ارقام انار تحت تنش کم‌آبی. † میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک، در سطح احتمال ۵٪ آزمون دانکن تفاوت معنی‌داری ندارند.

Fig. 4. (A) Effect of pomegranate cultivar on total carbohydrate, (B) Effect of low-water stress level on total carbohydrate, (C) Interaction effect of cultivar and stress levels on total carbohydrate in pomegranate cultivars under low-water stress. † In each chart, columns with atleast one similar letter indicate no significant difference among treatments according to Duncan test at 5% level of probability.

فنول کل براساس اسید گالیک

بر طبق نتایج در بین اثرهای اصلی رقم بر میزان میزان فنول کل برگ بر اساس اسید گالیک بیشترین میزان مربوط به رقم یوسف خانی ($1213 \text{ mg.GA.g}^{-1} \text{ FW}$) و کمترین میزان فنول کل براساس اسید گالیک نیز مربوط به رقم رباب ($910/2$) بود و رقم واندرفول $998/8$ بود (شکل ۵- الف). با افزایش سطح تنش خشکی از ۱۰۰ تا ۳۵٪ نیاز آبی، میزان فنول کل برگ بر اساس اسید گالیک افزایش نشان داد. بیشترین میزان فنول کل در سطح ۳۵٪ نیاز آبی (1231) با $21/4$ ٪ بود (شکل ۵- ب). فنول کل (گالیک اسید) همبستگی مثبت با کربوهیدرات محلول کل، و همبستگی منفی با ثبات غشاء و فنول کل (بر اساس اسید الاجیک) داشت (جدول ۲). همچنین نتایج مشابهی روی سایر درختان میوه و گونه‌های گیاهی تحت تنش خشکی از جمله بلوط (Jafarnia et al., 2018) به دست آمده که نتایج حاصل از این پژوهش با نتایج ذکر شده همسو می‌باشد. ترکیبات

فنولیک، متابولیت‌های ثانویه با فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی در یاخته هستند. تجمع این ترکیبات در یاخته‌های گیاهی یک پاسخ دفاعی مهم بوده که می‌تواند تحمل به خشکی گیاهان را افزایش دهد. ترکیبات فنولی، بیشتر شامل پروآنتوسیانیدین، آنتوسیانین‌ها، فلاونول‌ها، فلاونوئیدها و اسیدهای فنولی می‌باشد (Khaleghi *et al.*, 2019). تجمع و افزایش مقدار فنول و فلاونوئید در گیاهان تحت تنش کم آبی به دلیل تاثیر تنش بر فعال‌سازی و تغییر مسیر فنول پروپانوئید و در نتیجه افزایش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیز می‌باشد. در یافته‌ها رابطه خطی بین افزایش ترکیبات فنولی با افزایش فعالیت فنیل آلانین آمونیالیز گیاهان تحت تنش گزارش شده است (Jafarnia *et al.*, 2018). افزایش در ترکیبات فنولی به عنوان روش دفاعی گیاه برای به حداقل رساندن خسارت نوری است. تنش کم آبی باعث افزایش میزان فنول کل انار نسبت به آبیاری کامل شد. افزایش فنول کل نقش موثری در افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی دارند (Eftekhari Shahabadi, 2017). اسید الاجیک و اسید گالیک می‌توانند به صورت آزاد در مواد گیاهی وجود داشته باشند اما منابع اصلی این ترکیبات تانن‌های قابل هیدرولیز هستند (الاجیتانین‌ها و گالوتانین‌ها)، که پس از هیدرولیز، یک قند و یک قسمت اسیدی مربوطه آزاد می‌کنند (Parvizi *et al.*, 2016).



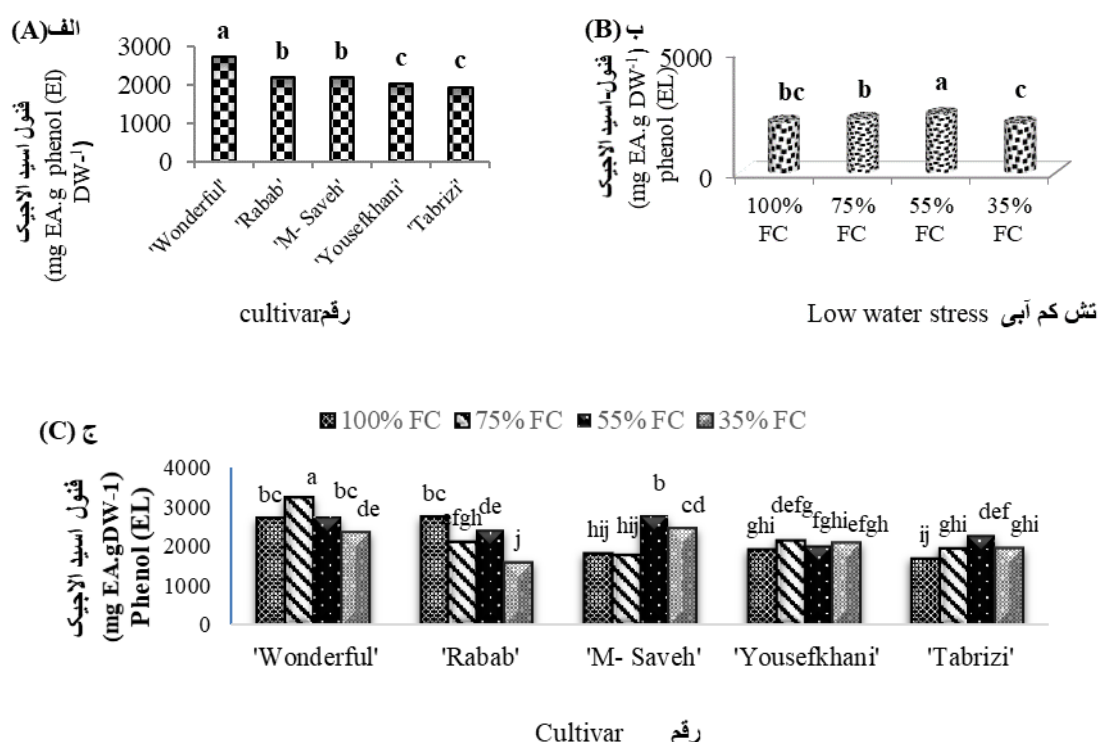
شکل ۵- اثر رقم انار بر میزان فنول (اسید گالیک) (الف)، اثر تنش کم آبی بر میزان فنول (اسید گالیک) (ب)، برهمکنش رقم و تنش کم آبی بر میزان فنول (اسید گالیک) در ارقام انار تحت تنش کم آبی. † In each chart, columns with atleast one similar letter indicate no significant difference among treatments according to Duncan test at 5% level of probability.

Fig. 5. (A) Effect of pomegranate cultivar on Phenol (gallic acid), (B) Effect of stress levels on Phenol (gallic acid), (C) Interaction effect of cultivar and stress levels on Phenol (gallic acid) in pomegranate cultivars under low-water stress. † In each chart, columns with atleast one similar letter indicate no significant difference among treatments according to Duncan test at 5% level of probability.

فنول کل بر اساس اسید الاجیک

نتایج نشان داد که در بین رقم‌ها بیشترین فنول کل برگ بر اساس اسید الاجیک مربوط به رقم واندرفول ($\text{mg.EA.g}^{-1} \text{DW}$) و کمترین میزان فنول کل بر اساس اسید الاجیک نیز مربوط به رقم تبریزی (۱۹۵۲) بود (شکل ۶-الف). بر طبق نتایج با افزایش سطح تنش خشکی از ۱۰۰ تا ۵۵ درصد نیاز آبی، میزان فنول کل برگ بر اساس اسید الاجیک افزایش نشان داد. بیشترین میزان فنول کل بر اساس اسید الاجیک در سطح ۵۵ درصد نیاز آبی (۲۴۲۵) با ۱۴ درصد افزایش نسبت به شاهد

مشاهده شد. کم‌ترین میزان فنول کل بر اساس اسید الاجیک نیز مربوط به سطح ۳۵ درصد نیاز آبی (۲۰۶۹) با ۲/۲ کاهش نسبت به شاهد بود که با شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت ولی به‌طور معنی‌داری کمتر از این میزان در سایر تیمارها بود (شکل ۶-ب). در رقم‌های واندرفول با افزایش سطح خشکی به ۳۵ درصد ظرفیت زراعی میزان فنول کل (اسید الاجیک) نسبت به شاهد کاهش یافت در حالی‌که در رقم‌های ممتاز ساوه، یوسف خانی و تبریزی این شاخص افزایش نشان داد (شکل ۶-ج). میزان فنول اسید الاجیک در این پژوهش دارای همبستگی منفی با میزان کربوهیدرات محلول کل و فنول کل بر اساس اسید گالیک بود (جدول ۲). اسید الاجیک به عنوان یک ترکیب فنولیک ضد باکتری و ضد سرطانزای رژیم غذایی با فعالیت‌های آنتی اکسیدانی و ضد التهابی قوی شناخته می‌شود (Owczarek et al., 2014). اسید گالیک پیش ساز رایج در بیوسنتز اسید الاجیک و سنتز پونیکالاجین است. اسید الاجیک یک ترکیب لاکتون فنولیکی قوی (پلی فنول) و یک دایمر مشتق شده از اسید گالیک است که در گیاهان به فرم تانن‌های هیدرولیز شونده که الاجی تانن‌ها نامیده می‌شوند، یافت می‌شود که این ترکیبات در ساختار دیواره یاخته‌ای گیاه و غشای یاخته‌ای وجود دارند. الاجی تانن‌ها با هیدرولیز شدن، اسید الاجیک را بوجود می‌آورند. انار محتوای بالایی از پلی فنول‌ها به خصوص پونیکالاجین‌ها، پونیکالین‌ها، گاسید الاجیک، اسید الاجیک و سایر ترکیبات بر پایه الاجی تانین دارد (Xiaoyue et al., 2020). اعمال تنش خشکی باعث افزایش میزان اسید الاجیک و پونیکالاجین در آب میوه انار و باعث افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی آب میوه می‌شود (Mirjalili, 2005) که نتایج حاصل از این پژوهش با نتایج ذکر شده همسو می‌باشد.

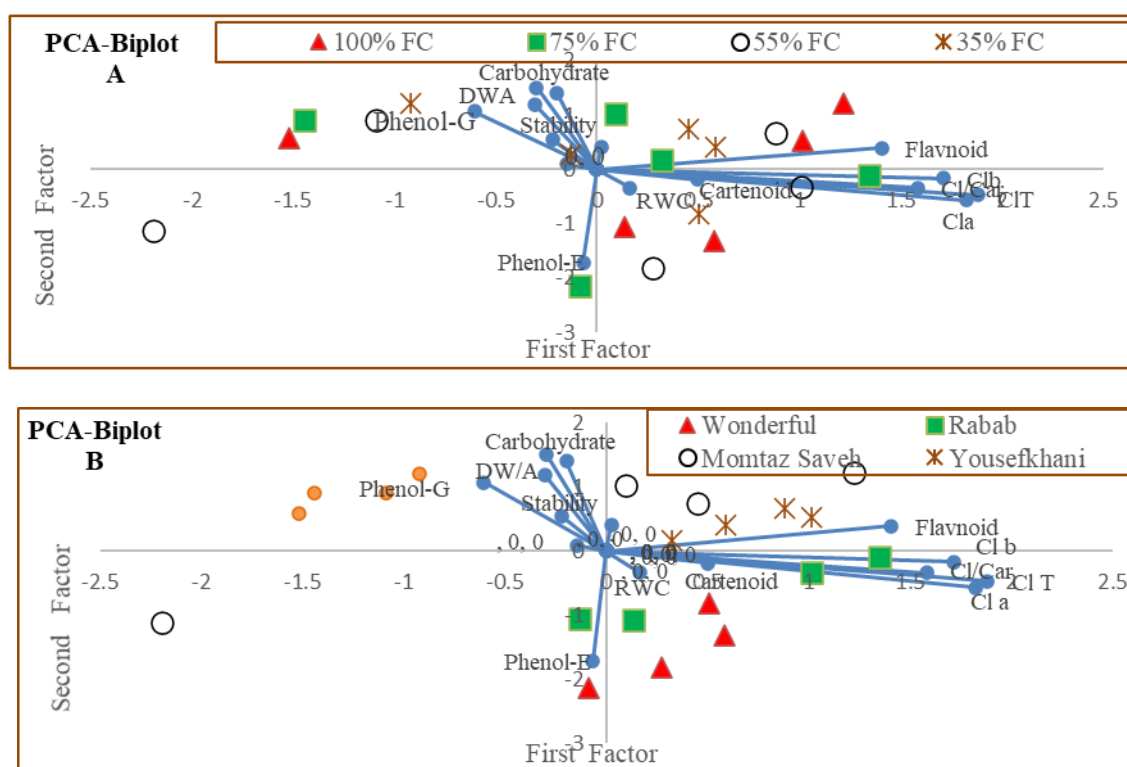


شکل ۶- اثر سطح تنش بر میزان فنول اسید الاجیک (الف)، اثر رقم انار بر میزان فنول (اسید الاجیک) (ب)، برهمکنش رقم و تنش خشکی بر میزان فنول (اسید الاجیک) در ارقام انار تحت تنش کم‌آبی. † میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک، در سطح احتمال ۵٪ آزمون دانکن تفاوت معنی‌داری ندارند.

Fig. 6. (A) Effect of pomegranate cultivar on Phenol (Ellagic acid), (B) Effect of stress levels on Phenol (Ellagic acid), (C) Interaction of cultivar effect and stress levels on Phenol (Ellagic acid) in pomegranate cultivars under low-water stress. † In each chart, columns with atleast one similar letter indicate no significant difference among treatments according to Duncan test at 5% level of probability.

واکاوی مولفه‌های اصلی (تحلیل عاملی)

در این تحلیل با در نظر گرفتن تمام متغیرهای فیزیولوژیکی و به کارگیری چرخش واریماکس، موثرترین متغیرها تعیین می‌شوند. با توجه به نتایج بدست آمده، مقادیر ویژه بالاتر از واحد چهار گام نخستین را برای بررسی کافی می‌داند. با در نظر گرفتن اولین فاکتور، تنها ۲۵/۴ درصد و چهار مولفه مورد نظر ۷۷/۲ درصد از تغییرات را می‌توان مدیریت نمود. از آنجا که متغیرهای موثر در هر فاکتور دارای ضریب بالتری در جدول هستند، بر این اساس کلروفیل کل در عامل اول، فنول اسید الاجیک در عامل دوم، کاروتنوئید در عامل سوم و RWC در عامل چهارم دارای بیش‌ترین ضرایب هستند. بنابراین می‌توان ادعا نمود که این فاکتورها موثرترین صفات فیزیولوژیکی در این پژوهش هستند. در ادامه برای تعیین روند متغیرها و تیمارها شکل بای پلات تنش خشکی و رقم رسم شده است. در شکل ۱۲-الف روند تغییرات در هر تنش و در شکل ۱۲-ب روند تغییرات در هر رقم مورد بررسی قرار گرفت. اندازه خطوط متغیرها و نزدیکی به محورهای اول و دوم نشان از نقش پررنگ متغیرهای کلروفیل a و کلروفیل کل، همچنین فنول اسید الاجیک در روند مشاهدات دارد. با توجه به شکل ۱۲-الف، در تمام سطوح تنش خشکی روند خاصی دیده نمی‌شود این مساله می‌تواند ناشی از برهمکنش‌ها بین تنش و رقم باشد. همچنین با توجه به نتایج شکل ۱۲-ب، در تمام رقم‌ها روند مثبت تغییرات تنش خشکی مشاهده شد.



شکل ۷- آنالیز مولفه‌های اصلی (PCA) و روند تغییرات در سطوح تنش کم آبی (الف) و در هر رقم (ب) در برگ ارقام انار تحت تنش کم آبی. کلروفیل a, b و کل: (Cl a, Cl b, Cl T)، کاروتنوئید: Carotenoid، نسبت کلروفیل کل به کاروتنوئید Cl T/Car، کلروفیل کل: فنول اسید الاجیک: Phenol E، فنول کل (اسید الاجیک): Phenol G، نسبت وزن خشک به سطح: DW/A، کربوهیدرات کل: Carbohydrate، فنول کل (اسید گالیک): Phenol G، فنول کل (اسید الاجیک): Phenol E.

Fig. 7. Principal components' analysis (PCA) of the low water stress treatments and cultivars. Biplot from pomegranate cultivars under to low water stress for 50 days. Groups were separated according their legend, A and B, based on stress level and cultivar. chlorophyll a, b, total: (Cl a, Cl b, Cl T), Carotenoid, chlorophyll to carotenoid ratio Cl T/Car, relative water content: RWC, Membrane stability, Dry weight to area ratio: DW/A, Carbohydrate, Phenol (Galic acid): Pjenol G, Phenol (Ellagic acid): Phenol E.

جدول ۳- تجزیه واریانس خصوصیات مورفوفیزیولوژیکی رقم‌های انار تحت تنش کم‌آبی.

Table 2. Variance analysis of morphophysiological characteristics of pomegranate cultivars under low water stress.

منابع تغییرات Variability source	درجه آزادی Degree of freedom	میانگین مربعات Square mean							
		محتوای نسبی آب (درصد) RWC (%)	وزن خشک در واحد سطح (Weight/Area)	کلروفیل a (میلی گرم/گرم وزن تر) chlorophyll a (mg/g fw)	کلروفیل b (میلی گرم/گرم وزن تر) chlorophyll b (mg/g fw)	کلروفیل کل (میلی گرم/گرم وزن تر) chlorophyll T (mg/g fw)	کاروتنوئید (میلی گرم/گرم وزن تر) carotenoid (mg/g fw)	کلروفیل کل / کاروتنوئید chlorophyll / carotenoid	آنتوسیانین (میلی گرم/گرم وزن تر) (mg/g fw) anthocyanin
رقم Cultivar	4	361.6 **	0.05 *	40.85 **	5.8 **	75.7 **	12.4 **	0.55 **	0.76 ns
سطح تنش Stress level	3	2048.5 **	0.02 ns	6.74 ns	0.6 ns	10.7 ns	10.9 **	0.53 **	0.5 ns
برهمکنش تنش و رقم interaction of cultivar and stress	12	73.2 **	0.01 ns	6.63 **	1.8 ns	12.3 **	1.3 ns	0.09 *	1.2 ns
خطای آزمایش experimental error	40	92.8	0.015	2.6	1.4	1.4	1.12	0.05	1.12
کل Total	59	-	-	-	-	-	-	-	-
ضریب تغییرات Coefficient of variation	-	14.5	16.7	14.4	21.2	12.6	10.2	13.03	18.6

††† به ترتیب معنی دار در سطح احتمال ۱٪، ۵٪ و ns عدم اختلاف معنی دار.

†††Respectively significant at 1% and 5% probability level, ns no significant difference.

جدول ۴- تجزیه واریانس خصوصیات فیزیولوژیکی رقم‌های انار تحت تنش کم‌آبی.

Table 3. Variance analysis of morphophysiological characteristics of pomegranate cultivars under low water stress.

منابع تغییرات Variability source	درجه آزادی Degree of freedom	میانگین مربعات Square mean				
		فلاونوئید (میلی گرم/گرم وزن تر) flavonoid (mg/g fw)	ثبات غشاء (درصد) Membrane stability (%)	کربوهیدرات کل (میلی- گرم/گرم وزن تر) Total carbohydrate (mg/g fw)	فنول کل (اسید گالیک) (میلی- گرم/گرم وزن خشک) Total phenol (gallic acid) (mg/g dw)	فنول (اسید الاجیک) (میلی- گرم/گرم وزن خشک) Total phenol (ellagic acid) (mg/g fw)
رقم Cultivar	4	107.7 **	206.6 **	12126.2 **	246658.5 **	1104417.9 **
سطح تنش Stress level	3	22.9 *	762.3 **	2559.2 **	209007.1 **	341355.9 **
برهمکنش رقم و تنش interaction of cultivar and stress	12	144.9 **	71.9 **	799.9 **	24310.4 ns	421771.4 **
خطای آزمایش experimental error	40	6.5	10.99	233.3	15018.2	30168.8
کل Total	59	-	-	-	-	-
ضریب تغییرات Coefficient of variation	-	7.5	14.2	10.9	11.1	7.8

††† به ترتیب معنی دار در سطح احتمال ۱٪ و ۵٪، ns عدم اختلاف معنی دار.

†††Respectively significant at 1% and 5% probability level, ns no significant difference.

نتیجه گیری

سیستم آنتی اکسیدانی غیرآنزیمی شامل رنگیزه‌های کلروفیل و کاروتنوئید و افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه همانند فلاونوئیدها و فنل‌ها از جمله اسید الاجیک و همچنین تجمع اسمولیت‌های تنظیم اسمزی و محافظ یاخته‌ای نظیر کربوهیدرات‌ها و قندهای محلول از برخی موارد مهم مقابله با تنش کم آبی و ایجاد تحمل به خشکی در گیاه انار می‌باشند. به طور کلی در این پژوهش همه رقم‌ها دارای تحمل نسبی در مقابل تنش کم آبی بودند ولیکن رقم واندرفول دارای بالاترین میزان کلروفیل a و کل، کاروتنوئید و محتوای نسبی آب برگ در مقایسه با سایر ارقام در پایان دوره تنش کم آبی بود که نشان‌دهنده این موضوع است که این رقم کمتر تحت تاثیر اثرات مضر تنش خشکی قرار گرفته است. در رقم واندرفول با بالاترین RWC و میزان ثبات غشاء به عنوان شاخص‌های مقاومت در مقابله با تنش خشکی و کم آبی، در مقایسه با سایر رقم‌ها، نشان داده شد که تنظیم اسمزی نقش عمده‌ای در این رقم در مقابله با تنش ایفاء می‌کند. بالا بودن میزان رنگیزه‌های کلروفیل a، b، کل، کاروتنوئیدها و میزان فنول کل براساس اسید الاجیک، نقش مهمی در فعالیت سیستم آنتی اکسیدانی غیر آنزیمی در رقم واندرفول داشتند. بنابراین رقم واندرفول نسبت به سایر ارقام تحمل به کم آبی بیشتری از خود نشان داد. همچنین رقم تبریزی به عنوان رقم حساس به تنش کم آبی در مقایسه با سایر رقم‌ها در این پژوهش شناخته شد.

سپاسگزاری

حمایت مالی از این پژوهش توسط دانشگاه شیراز و وزارت علوم، تحقیقات و فناوری (MSRT) انجام شده است.

References

منابع

- Adiba, A., Razouk, R., Charafi, J., Haddioui A., & Hamdani, A. (2021a.). Assessment of water stress tolerance in eleven pomegranate cultivars based on agronomic traits. *Agricultural Water Management*, 243, 106419.
- Adiba, A., Hssaini, L., Haddioui, A., Hamdani, A., Charafi, J., Iraqui, S. El., & Razouk, R. (2021b). Pomegranate plasticity to water stress: attempt to understand interactions between cultivar, year and stress level. *Heliyon*, 7(6), e07403.
- Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S., & Karanova, E. (2001). The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell and Environment*, 24(12), 1337-1344.
- Assar, P., Shekafandeh, A., Taghipour, L. (2021). Physiological and biochemical responses of citrus seedling rootstocks to drought stress and after rewatering. *Iranian Journal of Horticultural Science and Technology*, 22(3), 349-370. (In Persian)
- Banks, J. M. (2018). Chlorophyll fluorescence as a tool to identify drought stress in Acer genotypes. *Environmental and Experimental Botany*, 155, 118-127.
- Bastam, N. (2011). Effect of salicylic acid and ascorbic acid on pistachio seedlings growth under salinity stress. M.S. Thesis, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology, Iran.
- Bertin, P., Bouharmont, J., & Kinet, J. M. (1996). Somaclonal variation and improvement in chilling tolerance in rice: changes in chilling- induced electrolyte leakage. *Plant Breeding*, 115, 268-272.
- Bhusal, N., Lee, M., Han, R., Han, A., & Kim, H. (2020). Responses to drought stress in *Prunus sargentii* and *Larix kaempferi* seedlings using morphological and physiological parameters. *Forest Ecology and Management*, 465, 118099.
- Chang, C., Yang, M., Wen, H., & Chern, J. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food Drug Analysis*, 10, 178- 182.
- Cheuk, A., Ouellet, F., Houde, M. (2020). The barley stripe mosaic virus expression system reveals the wheat C₂H₂ zinc finger protein TaZFP1B as a key regulator of drought tolerance. *BMC Plant Biology*, 20, 1-34.
- Conceicao dos Santos, I., Furtado de Almeida, A. A., Priminho Pirovani, C., Gilberto, M., Costa, C., Santos da Conceicao, A., Soares, Filho, W.S., Coelho Filho, M.A. & Silva Gesteira, A. (2019). Physiological, biochemical and molecular responses to drought conditions in field-grown grafted and ungrafted citrus. *Environmental and Experimental Botany*, 3733, 42 P.
- Dastborhan, S., & Ghassemi-Golezani, K. (2015). Influence of seed priming and water stress on selected physiological traits of borage. *Folia Horticulturae*, 27, 151-159.

- Davarpanah, S., Tehranifar, A., Abadía, J., Val, J., Davarynejad, G., Aran, M., & Khorassani, R. (2018). Foliar calcium fertilization reduces fruit cracking in pomegranate (*Punica granatum* cv. Ardestani). *Scientia Horticulturae*, 230, 86-91.
- Eftekhari Shahabadi, A. (2017). Interaction of drought stress and foliar application of salicylic acid and kaolin on morphophysiological and biochemical responses of two pomegranate cultivars. Master Thesis, Shiraz University. (In Persian)
- Fathi, A., & Tari D. B., (2016). Effect of Drought Stress and its Mechanism in Plants. *International Journal of Life Sciences*, 10, 1-6.
- Galindo, A., Rodríguez, P., Mellisho, C. D., Torrecillas, E., Moriana, A., Cruz, Z. N., Conejero, W., Moreno, F., & Torrecillas, A. (2013). Assessment of discretely measured indicators and maximum daily trunk shrinkage for detecting water stress in pomegranate trees. *Agricultural and Forest Meteorology*, 180, 58–65.
- Gao, T., Zhang, Z., Liu, X., Wu, Q., Chen, Q., Liu, Q., Nocker, S. V., Ma, F., & li, C. (2020). Physiological and transcriptome analyses of the effects of exogenous dopamine on drought tolerance in apple. *Plant Physiology and Biochemistry*, 148, 260–272.
- Gholami, M. Rahemi, M., Rastegar, S. (2012). Use of rapid screening methods for detecting drought tolerant cultivars of fig (*Ficus carica* L.). *Scientia Horticulturae*, 143, 7-14
- Giancarla, V., Madosa, E., Sumalan, R., Ciulca, S. (2012). Evaluation of some indirect indices to identify drought tolerance in barley. *Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology*, 16, 239-241.
- Hanci, F., & Cebeci E. (2014). Investigation of proline, chlorophyll and carotenoids changes under drought stress in some onion (*Allium Cepa* L.) cultivars. *Turkish Journal of Agricultural and Natural Sciences*, 2, 1499-1504.
- He, J. D., Zou, Y. N., Wu, Q. S., & Kca, K. (2019). Mycorrhizas enhance drought tolerance of trifoliate orange by enhancing activities and gene expression of antioxidant enzymes. *Scientia Horticulturae*, 256, 108745.
- Hosseini, F., Mosaddeghi, M. R. Dexter, A. R. (2017). Effect of the fungus *Piriformospora indica* on physiological characteristics and root morphology of wheat under combined drought and mechanical stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*, 118, 107–112.
- Huseynova, I. M. (2012). Photosynthetic characteristics and enzymatic antioxidant capacity of leaves from wheat cultivars exposed to drought. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1817, 1516-1523.
- Irigoyen, J. J., Emerich, D. W., & Sanchez Diaz, M. (1992). Alfalfa leaf senescence induced by drought stress: Photosynthesis, hydrogen peroxide metabolism, lipid peroxidation and ethylene evolution. *Physiologiae Plantarum*, 84, 67-72.
- Isfendiyaroglu, M., & Zeker, E. (2002). The relation between phenolic compound and seed dormancy in *Pistacia* spp. In: AKB. E. (Ed.). 11 Grema Serr Pistachios and Almond. *Chieres Optins Mediterraneenes*, 232-277 PP.
- Jafarnia, S., Akbarinia, M., Hosseinpour, B. Modarres Sanavi, S. A. M., & Salami, S. A. (2018). Effect of drought stress on some growth, morphological, physiological, and biochemical parameters of two different populations of *Quercus brantii*. *Forest-Biogeosciences and Forestry*, 11, 212-220.
- Jaleel, C.A., Riadh, K., Gopi, R., Manivannan, P., Ines, J., Al-Juburi, H. J., Chang-Xing, Z., Hong-Bo, S., & Panneerselvam, R. (2009). Antioxidant defense responses: physiological plasticity in higher plants under abiotic constraints. *Acta Physiologiae Plantarum*, 31(3), 427-436.
- Javadi, T., Jafari, M. (2016). Effects of drought stress on growth and physiological characteristics of Sour Cherry cv. "Mykrez" saplings. *Journal of Pomology Research*, 1(1), 70-88. (In Persian).
- Kannan, N. D. & Kulandaivelu, G. (2011). Drought induced changes in physiological, biochemical and phytochemical properties of *Withania somnifera* Dun. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(16), 3929-3935.
- Karimi, S., Yadollahi, A., Arzani, K. (2013). Responses of almond genotypes to osmotic stress induced in vitro. *Journal of Nuts*, 4(4), 1-7. (In Persian).
- Karimi, R. A., Mirzaye, F., Rasoli, M. (2017). Phenolic acids, flavonoids, antioxidant capacity and minerals content in fruit of five grapevine cultivars. *Iranian Journal of Horticultural Science and Technology*, 18(1), 89-102. (In Persian).
- Karimi, S., Karimi, H., Vahdati, K., & Mokhtassi-Bidgoli, A. (2020). Antioxidative responses to short-term salinity stress induce drought tolerance in walnut. *Scientia Horticulturae*, 267, 1-10.

- Khaleghi, A., Naderi, R., Brunetti, C., Maserti, B. E. & Babalar, M. (2019). Morphological, physiochemical and antioxidant responses of *Maclura pomifera* to drought stress. *Scientific Reports*, 9, 19250.
- Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic bio-membranes. In: Methods in Enzymol. Colowick, S.P. and Kaplan, N.O. (Eds). Academic Press. New York, 48, 350-382.
- Liu, J., Lin Deng, J. & Tian, Y. (2020). Transcriptome sequencing of the apricot (*Prunus armeniaca* L.) and identification of differentially expressed genes involved in drought stress. *Phytochemistry*, 171, 112226. 10P.
- Mellisho, C. D., Egea, I., Galindo, A., Rodriguez, P., Rodriguez, J., Conejero, W., Romojaro, F., & Torrecillas, A. (2012). Pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit response to different deficit irrigation conditions. *Agricultural Water Management*, 114, 30–36.
- Mena, P., Vilaplana, A. G., Marti, N. & Vigner, C. G. (2013). Changes on indigenous microbiota, colour, bioactive compounds and antioxidant activity of pasteurised pomegranate juice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(8), 1922-1927.
- Mirjalili, A. (2005). Plants in stressful environments. Noorbakhsh Publishers, Tehran, 230 P. (in persian)
- Mitra, J. 2001. Genetics and genetic improvement of drought resistance in crop plants. *Current Science*, 80(6), 758-762.
- Nasrabadi, M., Ramezani, A., Eshghi, S., Kamgar-Haghighi, A. A., Vazifeshenas, M. R., & Valero, D. (2019). Biochemical changes and winter hardiness in pomegranate (*Punica granatum* L.) trees grown under deficit irrigation. *Scientia Horticulturae*, 251, 39-47.
- Nowak, R., & Tuzimski, T. (2007). Polyphenols of Rosa L. Leaves Extracts and their Radical Scavenging Activity. *Journal Zeitschrift für Naturforschung C*, 62(1-2), 32-38.
- Owczarek, A., Olszewska, M. A., & Gudej, J. (2014). Quantitative determination of ellagic acid and gallic acid in *Geum Rivale* L. and *G. Urbanum* L. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 56(2), 74-78.
- Parvizi, H., Sepaskhah, A.R., Ahmadi, S. H. (2016). Physiological and growth responses of pomegranate tree (*Punica granatum* cv. Rabab) under partial root zone drying and deficit irrigation regimes. *Agricultural Water Management*, 163, 146–158.
- Pena, M.E., Artés-Hernández, F., Aguayo, E., Martínez-Hernández, G. B., Galindo, A., Artes, F. & Gomez, P.A. (2013). Effect of sustained deficit irrigation on physicochemical properties, bioactive compounds and postharvest life of pomegranate fruit (cv. 'Mollar de Elche'). *Postharvest Biology and Technology*, 86, 171–180.
- Pourghayoumi, M., Bakhshi, D., Rahemi, M., Kamgar-Haghighi, A. A., & Aalami, A. (2017). The physiological responses of various pomegranate cultivars to drought stress and recovery in order to screen for drought tolerance. *Scientia Horticulturae*, 217, 164-172.
- Qian, J., Zhang, X., Yan, Y., Wang, N., Ge, W., Zhou, Q., & Yang, Y. (2020). Unravelling the molecular mechanisms of abscisic acid-mediated drought-stress alleviation in pomegranate (*Punica granatum* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 157, 211-218.
- Rezayian, M., Niknam, V., & Ebrahimzadeh, H. (2018). Effects of drought stress on the seedling growth, development, and metabolic activity in different cultivars of canola. *Soil Science and Plant Nutrition*, 64(3), 360-369.
- Rad M. H., Asghari, M. R., & Asareh, M. H. (2015). The effects of drought stress on growth, yield and fruit quality of pomegranate (*punica granatum* l.) cv. rababe niriz under dry climate condition. *Seed and Plant Production*. 31(1), 75-90. (In Persian).
- Rodríguez-González, V. M., Femenia, A., Minjares-Fuentes, R., & González-Laredo, R. F. (2012). Functional properties of pasteurized samples of Aloe barbadensis Miller: Optimization using response surface methodology. *LWT-Food Science and Technology*, 47, 225-232.
- Santos, C., Fragoeiro, S.m, & Phillips, A. (2005). Physiological response of grapevine cultivars and a rootstock to infection with *Phaeoacremonium* and *Phaeomoniella* isolates: an in vitro approach using plants and calluses. *Scientia Horticulturae*, 103, 187-198.
- Sarker, U. & Oba, S. H. (2018). Drought stress enhances nutritional and bioactive compounds, phenolic acids and antioxidant capacity of Amaranthus leafy vegetable. *BMC Plant Biology*, 18(258), 2-15.
- Shafiei, N. (2016). Response of young olive trees of 'Conservalia' Cultivar to salicylic acid and Low water stress. Master's thesis. Chamran University. 190 P.

- Sheffield, J. & Wood, E. F. (2008). Projected changes in drought occurrence under future global warming from multi-model, multi-scenario, IPCC AR4 simulations. *Climate Dynamics*, 31, 79–105.
- Slabbert, M., Kruger, G. (2014). Antioxidant enzyme activity, proline accumulation, leaf area and cell membrane stability in water stressed *Amaranthus* leaves. *South African Journal of Botany*, 95, 123–128.
- Taiz, L. & Zeiger, E. (2006). *Plant physiology*. 4th Edition, Sinauer Associates, Inc., Sunderland.
- Taiz, L., Zeiger, E. (2015). *Plant Physiology and Development*; Sinauer Associates: Sunderland, MA, USA.
- Terzi, R., Saglam, A., Kutlu, N., Nar, H., & Kadioglu, A. (2010). Impact of soil drought stress on photochemical efficiency of photosystem II and antioxidant enzyme activities of *Phaseolus vulgaris* cultivars. *Turkish Journal of Botany*, 34, 1-10.
- Varone, L., Ribas-Carbo, M., Galle, A., Medrano, H., Grataniand, L., Flexas, J. (2012). Stomatal and non-stomatal limitations to photosynthesis in seedlings and samplings of Mediterranean species pre-conditioned and aged in nurseries: Different response to water stress. *Environmental and Experiment Botany*, 75, 235-247.
- Wang, S., Liang, D., Li, C., Hao, Y., Ma, F., & Shu, H. (2012). Influence of drought stress on the cellular ultrastructure and antioxidant system in leaves of drought-tolerant and drought-sensitive apple rootstocks. *Plant Physiology and Biochemistry*, 51, 81–89.
- Wu, Q. S., & Xia, R. X. (2006). Arbuscular mycorrhizal fungi influence growth, osmotic adjustment and photosynthesis of citrus under well-watered and water stress conditions. *Journal of Plant Physiology*, 163, 417–425.
- Xiaoyue, c., Jianan, X., Bo, Z., Chengcheng, C., Yunyun, T., Pingying, Z., Jianxia, Z. (2020). Physiological change and screening of differentially expressed genes of wild Chinese *Vitis yeshanensis* and American *Vitis riparia* in response to drought stress. *Scientia Horticulturae*, 266, 109140.
- Yang, X., Lu, M., Wang, Y., Wang, Y., Liu, Z. & Chen, S. (2021). Response Mechanism of Plants to Drought Stress. *Horticulturae*, 7(3), 50.
- Yordanov, V., & Velikova, T. T. (2003). Plant responses to drought and stress tolerance. *Bulgarin Journal of Plant Physiology*, Special Issue, 187-206.
- Zahedi, S. M., Hosseini, M. S., Daneshvar Hakimi Meybodi, N., & Peijnenburg, W. (2021). Mitigation of the effect of drought on growth and yield of pomegranates by foliar spraying of different sizes of selenium nanoparticles. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(12), 5202-5213.
- Zahedi, S. M., Hosseini, M. S., Meybodi, N. D. H. Abadía, J., Germ, M., Gholami, R., & Abdelrahman, M. (2022). Evaluation of drought tolerance in three commercial pomegranate cultivars using photosynthetic pigments, yield parameters and biochemical traits as biomarkers. *Agricultural Water Management*, 261, 107357.
- Zarafshar, M., Akbarinia, M., Askari, H., Hosseini, S. M., Rahaie, M., Struve, D., Striker, G. G. (2014). Morphological physiological and biochemical responses to soil water deficit in seedlings of three populations of wild pear tree (*Pyrus boissieriana*). *Biotechnology Agronomy Society and Environment*, 18(3), 353-366.
- Zhu, J. K. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 53, 247–273.

Evaluation of Physiological and Biochemical Responses of Some Iranian Pomegranate Cultivars in Comparison with Introduced ‘Wonderful’ Cultivar Under Low Irrigation Condition

Farzaneh Paimard^{1*}, Abdolrahman Mohammadkhani¹, Ali Niazi², Alireza Shamsavar³ and Mohammad Reza Nouri Imamzadei⁴

1. Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.

2. Institute of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran

3. Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.

4. Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.

* Corresponding Author, Email: (fpimard@yahoo.com)

Climate changes have led to drought stress, which is a threat to the production of agricultural products, including pomegranate, which is one of the important horticultural products of Iran. This research aimed at to evaluate the effects of low water stress on the physiological and biochemical characteristics of pomegranate in a factorial experiment in the form of a completely randomized design with two factors including irrigation level (100, 75, 55 and 35% of field capacity) and five pomegranate cultivars (‘Rabab Niriz’, ‘Malas Momtaz Saveh’, ‘Malas Yusef Khani’, ‘Tabrizi’ and ‘Wonderful’). The results showed that low water stress decreased the relative water content (35% decrease), cell membrane stability (42.9% decrease), chlorophyll a and total chlorophyll, and increased carotenoid (19.5% increase), flavonoid (7.9% increase), total soluble carbohydrate (23.9 percent increase) and total phenol (21.4 percent increase), at the level of 35 percent of the field capacity compared to the control. Among the cultivars, ‘Wonderful’ had the highest relative content of water, chlorophyll a, b and total chlorophyll, carotenoid, membrane stability and total phenol based on ellagic acid, which has effective roles in activity of the non-enzymatic antioxidant and defense system of this cultivar, in comparison with cultivar ‘Tabrizi’ that showed less tolerance to stress compared with other pomegranate cultivars.

Keywords: Chlorophyll, low water stress, membrane stability, secondary metabolites.