Iranian Journal of Horticultural Science
Vol 52, No 1, Spring 2021 (153-169)
DOI: 10.22059/ijhs.2019.285461.1680

علوم باغبانی ایران
دورهٔ ۵۲، شمارهٔ ۱، بهار ۱۴۰۰ (ص ۱۶۹-۱۵۳)

بررسی تغییرات میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ترکیبات فنلی، رنگیزه‌های فتوسنتزی و صفات کمی میوه در چهار ژنوتیپ وحشی تمشک سیاه (*Rubus sanctus*) در مراحل مختلف رسیدگی

زهرا شمس[۱]، سعید عشقی[۲*]، عنایت‌اله تفضلی[۲] و علی قرقانی[۳]
۱، ۲ و ۳. دانشجوی دکتری، استاد و دانشیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۵/۲ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۸/۱۷)

چکیده

مطالعه حاضر به‌منظور بررسی تنوع در ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی، ترکیبات فنلی، صفات کمی میوه و میزان رنگدانه‌های ژنوتیپ‌های وحشی تمشک‌سیاه ایران انجام‌گرفت. برای این منظور، چهار ژنوتیپ تمشک سیاه شامل بابلسر، نمک‌آبرود، بندرگز و ناهارخوران متعلق به گونه *Rubus sanctus* که از شمال ایران جمع آوری شده بودند و در کلکسیون تمشک سیاه دانشگاه شیراز نگهداری می‌شدند، انتخاب و در قالب آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی در چهار تکرار و در دو سال متوالی مورد بررسی قرارگرفتند. سپس در سه مرحله مختلف رسیدگی میوه (سبز، قرمز، سیاه) از ژنوتیپ‌های مورد نظر نمونه تهیه‌شد. براساس نتایج تفاوت معنی‌داری بین ژنوتیپ‌های مطالعه‌شده از لحاظ صفات IC50 (۲۵/۵۰-۴۶/۶۵درصد)، فنل کل (۳۵۰/۵۳-۲۲۴/۶۷میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم ماده خشک)، فلاونوئید (۸۱۲/۳۷ - ۵۳۱/۷۱ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم ماده خشک)، فلاونون (۷۵/۵۵-۱۸/۴۷ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم ماده خشک)، آنتوسیانین (۲۸۱/۵۷- ۹۲/۲۳ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم ماده تازه) به‌همراه دیگر صفات وجود داشت. علاوه بر این، میزان ترکیبات فنلی و آنتی‌اکسیدان میوه سیاه رنگ در مقایسه با دیگر مراحل رسیدگی بیشترین مقدار بود. همچنین ارتباط مثبت و معنی‌داری بین میزان آنتی‌اکسیدان و ترکیبات فنلی مشاهده شد. ژنوتیپ بابلسر با دارا بودن بیشترین میزان فنل (۳۵۰/۵۳ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم ماده خشک)، آنتوسیانین (۲۸۱/۵۷ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم ماده تازه)، فلاونون (۷۵/۵۵ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم ماده خشک)، فلاونوئید (۸۱۲/۳۷ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم ماده خشک) و کمترین میزان IC50 (۴۶/۲۵ درصد) به عنوان بهترین ژنوتیپ از لحاظ ارزش غذایی مشخص گردید.

واژه‌های کلیدی: تمشک سیاه، تجزیه رگرسیون، ژرم‌پلاسم.

Assessment of antioxidant activity, phenolic components, photosynthesis pigments and fruit quantitative traits in four blackberry (*Rubus sanctus*) accessions at different fruit maturity stages

Zahra Shams[1], Saied Eshghi[2*], Enayatollah Tafazoli[2] and Ali Gharaghani[3]
1, 2, 3. Ph. D. Candidate, Professor and Associate Professor, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran
(Received: Jul. 24, 2019- Accepted: Nov. 08, 2019)

ABSTRACT

This study was conducted in order to evaluate the variation of blackberry accession of Iran in terms of antioxidant activity, phenolic components, fruit quantitative traits and photosynthesis pigments. For this regards, four accessions of wild blackberry including Babolsar, Naharkhoran, BandarGaz and NamakAbroud belongs to *Rubus sanctus* species, which collected from the northern area of Iran and has been kept in Blackberry Collection of Horticulture Department of Shiraz University were selected and subjected to factorial design based on randomized complete block designs with four replications in two consecutive years. Then, the fruit sanmples were collected in three fruit maturity stages (Black, Red and Green). The results indicated significant differences between accessions in terms of half maximal inhibitory concentration (IC50) (range, 46.25-65.50 %), total phenolic content (TPC) (range, 224.67-350.53 mg/100 g DW), flavonoid (range, 531.71-812.37 mg/100 g DW), flavanone (range, 18.47-75.55 mg/100 g DW), anthocyanin (range, 92.23-281.57 mg/100 g FW) along with other traits. Furthermore, the highest quantity of abtioxidant and phenolic compounds were observed in complete fruit maturity stages (Black) compared to other maturity stages. There was a positive and significant association between antioxidant activity and phenolic compounds. Babolsar genotype with highest quantity of phenol (350.53 mg/100 g DW), anthocyanin (281.57 mg/100 g FW), flavanone (75.55 mg/100 g DW), flavonoids (812.37 mg/100 g DW) and lowest amount of IC50 (46.25 %) identified as the best genotype in terms of nutritional value.

Keywords: Blackberry, germplasm, regression analysis.

* Corresponding author E-mail: eshghi@shirazu.ac.ir

مقدمه

تمشک‌سیاه، از تیره Rosaceae و زیر تیره Rosoideae و متعلق به جنس *Rubus* است که یکی از متنوع‌ترین گیاهان با حدود ۷۴۰ گونه است و علی‌رغم گستردگی فراوان در بیشتر اقلیم‌ها، ازگیاهان مناطق معتدله محسوب می‌شود. جنس *Rubus* دارای دو زیرجنس تمشک‌سیاه (blackberry) و تمشک فرنگی (Ruspberry) می‌باشد (Finn, 2008). تمشک در ایران در مناطق متعدد و به‌خصوص منطقه نوار جنوبی دریای خزر و دامنه رشته کوه‌های زاگرس به صورت وحشی رشد می‌کند و از بین ۱۱ گونه‌ایی که به‌طور وحشی در ایران رویش دارند، گونه *R. sanctus* گسترده‌ترین گونه در ایران است که از آب‌وهوای مرطوب شمال تا آب‌وهوای سرد غرب و حتی برخی از اقلیم های نیمه‌خشک در جنوب‌غربی دیده‌می‌شود (Khatamsaz, 1992; Kaume *et al.*, 2011).

میوه تمشک‌سیاه، میوه‌ای مرکب از تعدادی شفتچه است که شفتچه‌ها به صورت منظم بر روی نهنج قرار گرفته‌اند و در مجموع قسمت خوراکی گیاه را تشکیل می‌دهند. در تمشک سیاه، میوه که شامل شفتچه‌ها به همراه نهنج است از گیاه جدا شده و برداشت می‌گردد. میوه‌های تمشک ۳۵-۶۰ روز پس از گرده افشانی به مرحله رسیدگی می‌رسند (Shires, 2015).

به‌طور کلی در ۲۰ سال اخیر مصرف تمشک سیاه افزایش یافته است. در سال،۱۹۹۰ سطح تولید تمشک سیاه در آمریکای شمالی ۴۳۸۵ هکتار بود که حدود ۷۵ درصد آن مربوط به شمال‌غربی اقیانوس آرام می‌شد و نزدیک به ۹۰ درصد محصول تولیدی این گیاه در صنایع فرآوری مصرف می‌شد. در اواخر دهه ۱۹۹۰، ارسال محصولات خارج از فصل از شیلی، گواتمالا و مکزیک به بازارهای آمریکای شمالی، افزایش یافت. از آن زمان، کالیفرنیا به یکی از تولیدکننده‌های بزرگ در بازار تازه خوری تمشک مبدل گشته است. لازم به ذکر است که گسترش سریع ذکرشده در زمینه تولید، شامل محصولات فرآوری نیز می‌شود. بر اساس برآوردهای صورت گرفته در سال ۲۰۰۵، کشت تجاری تمشک سیاه حدود ۲۰۰۳۵ هکتار بوده است (Finn & Clark, 2012). بایستی توجه داشت که اضافه بر کشت تجاری تمشک در سراسر جهان، از ۸۰۰۰ هکتار طبیعت وحشی نیز میوه برداشت شده که در مجموع بیش از ۱۴۰ هزار تن محصول در سال ۲۰۰۵ به مصرف‌کنندگان عرضه شده است (Strik *et al.*, 2007). افزایش سطح زیر کشت تمشک سیاه در ایران نیز شاهد رشد بوده است، به گونه‌ای که در سال ۲۰۱۴، برای اولین بار در آمارنامه جهادکشاورزی میزان تولید تمشک و سطح زیرکشت آن گزارش شده است (Ahmadi *et al.*, 2015). بر اساس گزارش مذکور، سطح کل باغ‌های تمشک ایران ۴۶ هکتار عنوان شده است ۱۶ هکتار از این مقدار را باغ‌های آبی تشکیل داده‌اند. بر اساس میزان تولید تمشک در ایران، استان مازندران با بیشترین تولید در رتبه نخست تولید تمشک در کشور قرار دارد (Hadadinejad *et al.*, 2017). میزان تولید تمشک سیاه از باغ‌های آبی کشور ۱۳ تن و با میانگین ۸۱۲ کیلوگرم در هکتار بیان شده است (Ahmadi *et al.*, 2015). با توجه به اینکه آمار ذکرشده در رابطه با میزان تولید تمشک با مشاهده‌های میدانی تفاوت داشته و نیازمند به‌روز رسانی است، اما میانگین تولید بیان شده از میانگین تولید تمشک سیاه رقم بی خار که برابر با ۸ تا ۱۲ تن در هکتار برای رقم‌های رونده، ۲۰ تا۳۰ تن در هکتار برای رقم‌های نیمه ایستاده و ۸ تا ۱۰ تن در هکتار در رقم‌های ایستاده گزارش شده است بسیار فاصله دارد (Strik *et al.*, 2012).

جدیدترین آمار سازمان فائو (FAO, 2014) نشان می‌دهد کشورهای روسیه، لهستان، آمریکا، صربستان و مکزیک به‌ترتیب با تولید ۱۴۴۰۰۰، ۱۰۳۵۱۰، ۱۲۵۸۵۹، ۶۱۷۱۵ و ۳۵۶۲۷ تن مقام اول تا پنجم تولید تمشک در دنیا را دارا می‌باشند، که این مقدار تولید با به‌کارگیری رقم‌های به‌نژادی‌شده، فراهم آمده است. درحالی‌که بیشترین تولید محصول در ایران برای استان مازندران به مقدار ۱۰۰ تن گزارش شده است (Ahmadi *et al.*, 2015).

ایران با قرارداشتن در زمرهٔ مناطق اصلی تنوع گیاهی جهان از ذخایر ژنتیکی مطلوبی در زمینه گیاهان و به‌خصوص محصولات باغبانی برخوردار است. تمشک سیاه نیز ازجمله ریزمیوه‌هایی است که به دلیل وجود جمعیت‌های وحشی و طبیعی در سراسر کشور و به‌خصوص در منطقه شمال مستعد انجام

پژوهش‌های اولیه شامل جمع‌آوری توده‌های مختلف و بررسی آنها در جهت شناسایی مزایا و معایب این گیاه مقاوم و قانع است (Hadadinejad *et al*., 2014).

با توجه به فعالیت بالای آنتی‌اکسیدانی میوه تمشک و همچنین نقش احتمالی آن در مقابله با بیماری‌های مختلف همانند اختلال‌های متابولیکی، سرطان، بیماری‌های قلبی و عروقی، گرایش به این گیاه در سطح جهانی افزایش یافته‌است (Eyduran *et al*., 2015; Akin *et al*., 2016). اضافه‌بر این میوه تمشک شامل اجزاء مختلف آنتی‌اکسیدانی شامل آنتوسیانین، فلاونوئید، فلاونون، الاگیتانین و پروآنتوسیانین می‌باشد (Cho *et al*., 2004; Siriwoharn & Wrolstad, 2004; Reyes-Carmona *et al*., 2005; Pantelidis *et al*., 2007). ترکیبات فنلی و فلانوئیدها در میوه تمشک اثرات ضدسرطانی و ضدالتهابی دارند (Wang, 2007). علاوه بر این نقش بیولوژیکی تمشک در مقابله با بیماری‌های دهان و سرطان مری به اثبات رسیده است. همچنین قرن ۱۶ در اروپا، از تمشک برای درمان عفونت دهان و چشم استفاده می‌کردند (Skrede & Wrolstad, 2002; Brennan & Graham, 2009; Cho *et al*., 2014; Dai *et al*., 2007).

به‌طور کلی کشت تمشک با استفاده از انتخاب شانسی در نمونه‌های وحشی منتخب آغاز گردید و در واقع این ژنوتیپ‌های آغاز برنامه‌های به‌نژادی برای بهبود ژنتیکی تمشک بودند (Clark & Finn, 2011). نخستین رقم تمشک تحت عنوان "دورچستر" در سال ۱۸۴۱ بود و پس از آن در سال ۱۸۵۴ رقم "نیوراشل" که دو رقم مذکور نخستین رقم‌هایی بودند که به‌صورت گسترده مورد کشت قرار گرفتند. در گیاه تمشک صدها رقم نام‌گذاری شده وجود دارد که از راه گزینش از میان نمونه‌های وحشی یا برنامه‌های به‌نژادی هدفمند به‌دست آمده‌اند (Clark & Finn, 2011).

کلیدی‌ترین و در واقع اصل حیاتی به‌نژادی گیاهان به منظور ایجاد ارقام برتر و مطلوب از لحاظ صفات اقتصادی وجود تنوع در این گیاهان برای صفات مد نظر است، که طبیعتاً گیاه تمشک هم از این اصل مستثنی نیست. در یک بررسی تنوع و خویشاوندی جنس تمشک در منطقهٔ شرق هیمالیا مورد بررسی قرار گرفته است که بر اساس یافته‌های این مطالعه ژنوتیپ‌های این منطقه به لحاظ تبارزایی (فیلوژنی) و ریخت‌شناختی (مورفولوژیکی) تنوع داشته و توانایی لازم در به‌کارگیری در برنامه‌های به‌نژادی را دارا می‌باشند (Alice *et al*., 2008). اضافه بر این، به‌منظور بررسی ۲۵۰ نمونه از جنس *Rubus* و مقایسهٔ رقم‌ها و پیشبرد برنامهٔ به‌نژادی تمشک از صفات مربوط به ریخت‌شناختی، گلدهی و جنبه‌های باغبانی استفاده شده است (Giongo *et al*., 2012). در همین راستا، در یک بررسی با بهره‌گیری از ویژگی‌های ریخت‌شناختی به ارزیابی تنوع و وراثت‌پذیری صفات رویشی و زایشی تمشک سیاه پرداخته شده و نتایج حاکی از این بوده است که این صفات کارایی خوبی برای نشان‌دادن تنوع در نخستین سال باردهی دارند (Dosset & Finn, 2008). در ایران نیز اولین پژوهش دامنه‌دار و مدون در زمینه تمشک سیاه در شیراز و در راستای اهداف قطب میوه‌های دیم ایران انجام شده است. در این زمینه پس از گردآوری و تهیهٔ کلکسیون ژنوتیپ‌های وحشی تمشک از شمال و جنوب کشور به بررسی صفات کمی و کیفی میوهٔ آن‌ها پرداخته شده است (Momeni *et al*., 2012). در ادامه نیز در یک مطالعه ویژگی‌های رشد و عملکرد ۳۸ ژنوتیپ تمشک گردآوری‌شده در کلکسیون ژنوتیپ‌های تمشک یادشده ارزیابی و در نهایت براساس تجزیه خوشه‌ای هر گونه به‌طور موفقیت‌آمیزی به‌صورت جداگانه دسته‌بندی و تفکیک شده است (Jafari *et al*., 2013).

با توجه به تأثیر به‌سزای میوه تمشک سیاه بر سلامت انسان و همچنین ارزش غذایی آن به‌واسطه غنی‌بودن از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و متابولیت‌های ثانویه از یک طرف و وجود ژرم‌پلاسم غنی این گونه گیاهی در کشور از طرف دیگر، شروع یک مطالعه جامع در رابطه با بررسی ویژگی‌های مهم این گونه گیاهی به‌ویژه بررسی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی آن ضروری است. همچنین بر اساس نتایج حاصل از مطالعات پیشین گونه *R. sanctus* گونه غالب در ایران است و به‌طور گسترده‌ای از آب‌وهوای مرطوب در شمال ایران (منطقه دریای خزر) تا سرد در غرب و حتی برخی از مناطق نیمه‌خشک و گرم در جنوب‌غرب کشور توزیع شده است. لذا مطالعه حاضر به‌منظور بررسی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، میزان فنل کل، آنتوسیانین،

فلاونون، فلاونوئید، محتوای رنگدانه‌های فتوسنتزی، کاروتنوئید و صفات کمی میوه شامل طول، قطر و وزن میوه در چهار ژنوتیپ وحشی تمشک سیاه از گونه *R. sanctus* در سه مرحله مختلف رسیدگی میوه انجام‌شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و طرح آزمایشی

آزمایشی به‌صورت فاکتوریل شامل دو فاکتور ژنوتیپ و مراحل مختلف رسیدگی میوه در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی (Randomized Complete Block Design) در دو سال (۱۳۹۴ و ۱۳۹۵) در ایستگاه تحقیقاتی بخش علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز واقع در منطقه باجگاه با مشخصات جغرافیایی ۲۹′ °۳۸ عرض جغرافیایی شمالی و ۵۲′ °۳۵ طول جغرافیایی شرقی با ارتفاع ۱۸۱۰ متر از سطح دریا، اجراشد. نمونه‌ها از چهار ژنوتیپ تمشک‌سیاه شامل بابلسر، بندرگز، ناهارخوران و نمک‌آبرود از گونه *R. sanctus* که از شمال ایران جمع‌آوری شده بودند و در کلکسیون تمشک‌سیاه دانشکده باغبانی دانشگاه شیراز واقع در منطقه باجگاه نگهداری می‌شدند در سه مرحله مختلف رسیدگی میوه (سبز، قرمز و سیاه) تهیه‌شدند و به آزمایشگاه انتقال‌یافتند. لازم به ذکر است نمونه‌های آزمایشی از میوه‌های تشکیل‌شده بر روی شاخه‌های دوساله یا Floricane در مراحل مختلف رسیدگی برداشت شدند. اطلاعات جغرافیایی مکان‌های نمونه‌های جمع‌آوری شده ژنوتیپ‌های وحشی تمشک سیاه در جدول ۱ آورده شده است.

ویژگی‌های اندازه‌گیری‌شده

تهیه عصاره گیاهی

به‌منظور عصاره‌گیری از نمونه‌ها جهت سنجش IC50، فنل کل، فلاونوئید و فلاونون نمونه‌ها پس از جمع‌آوری و انتقال به آزمایشگاه به‌مدت ۱۲ روز در آون در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد خشک و جهت عصاره‌گیری، ماده به ذرات ریز تبدیل شدند. سپس ۵ گرم نمونه خشک پودرشده به ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۷۰ درصد اضافه شد و به‌مدت ۲۴ ساعت روی شیکر با دور ۲۰۰ دور در دقیقه (rpm) نگهداری گردید. سپس به مدت ۱۵ دقیقه داخل سانتریفیوژ با دور ۶۰۰۰ دور در دقیقه قرارگرفت. در ادامه قسمت فاز رویی نمونه‌ها جدا شده و به‌عنوان عصاره جهت انجام آزمایش‌های بعدی در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد (Wojdyło *et al*., 2007).

IC50

برای اندازه‌گیری میزان خاصیت آنتی‌اکسیدانی گیاه از میزان مهارکنندگی رادیکال‌آزاد DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) استفاده‌شد. برای این منظور، ابتدا عصاره‌های گیاهی در غلظت‌های متفاوت در متانل خالص تهیه شد (ابتدا ۰/۰۰۳۲ گرم از عصاره را در ۱ میلی‌گرم متانول حل کرده، محلول حاصل را که دارای غلظت ۳۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد به‌عنوان استوک در نظر گرفته و با استفاده از روش رقیق‌سازی متوالی غلظت‌های از ۳۲۰۰-۱۲/۵ میکرو گرم بر میلی‌لیتر تهیه گردید). سپس مخلوطی به‌نسبت ۱:۱ از محلول DPPH (۸mg/100) و عصاره‌های گیاهی با غلظت‌های متفاوت تهیه‌شد. برای انجام این تست از میکروپلیت‌های ۹۶ خانه ای با چاهک‌های ته صاف استفاده شد، در ۴ عدد از چاهک‌ها ۲۰۰ میکرولیتر از محلول متانولی DPPH به ۲۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف عصاره اضافه‌شد (تست). در ۴ عدد از چاهک‌های دیگر ۲۰۰ میکرولیتر متانول به ۲۰ میکرولیتر محلول عصاره اضافه (بلانک) و در ۴ عدد از چاهک‌ها ۲۰۰ میکرولیتر از محلول DPPH به ۲۰ میکرولیتر اضافه می‌شود (کنترل). جذب نمونه‌ها بعد از ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه توسط دستگاه اسپکتوفتومتر مدل Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek Instruments, Inc., USA در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری‌شد. درصد مهار رادیکال‌آزاد DPPH نمونه‌ها با استفاده از رابطه (۱) محاسبه‌گردید (Ao *et al*., 2008):

رابطه ۱) نسبت بازداری (R%) =

$$100- ((A_{test} - A_{blank} / A_{control} \times 100))$$

A_{blank}، A_{test} و $A_{control}$ به‌ترتیب جذب بلانک، جذب نمونه تست‌شده و جذب نمونه کنترل می‌باشد. IC50 در واقع غلظتی از عصاره است که ۵۰ درصد رادیکال‌های آزاد را مهار می‌کند.

جدول ۱. اطلاعات مکان‌های جمع‌آوری نمونه‌های ژنوتیپ‌های وحشی تمشک سیاه.

Table 1. Information on localities investigated and sample size of the studied wild blackberry accessions.

Species	Accession	Province	E (Longitude)	N (Latitude)	Altitude
R. sanctus	Naharkhoran	Golestan	54°27'45.60"	36°47'2.595"	413.4 m
	NamakAbroud	Mazandaran	51°20'47.38"	36°38'24.21"	1625.1 m
	Babolsar	Mazandaran	52°45'29.09"	36°38'26.80"	-22.2 m
	BandarGaz	Golestan	53°56'13.67"	36°46'28.74"	409.0 m

فنل کل

میزان فنل‌کل بر اساس ماده خشک با استفاده از فولین-سیوکالتیو ۱۰ درصد اندازه‌گیری‌شد. برای سنجش مقدار فنل کل، از عصاره متانولی استفاده‌شد. سپس میزان ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره‌ای که با متانول رقیق‌شده ($g\ ml^{-1}$ ۱:۱۰) را جدا نموده و به آن ۵ میلی‌لیتر فولین ۵۰ درصد و سپس چهار میلی‌لیتر کربنات‌سدیم (Na_2CO_3) آبی (۱M) اضافه شد و نمونه‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه باقی ماندند. در نهایت جذب در طول موج ۷۶۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek Instruments, Inc., USA خوانده‌شد. منحنی استاندارد توسط غلظت‌های مختلف ($mg.l^{-1}$ ۰-۵۰۰) تهیه‌شده از اسیدگالیک در متانول تهیه‌گردید. نتایج براساس واحد میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم ماده خشک بیان‌گردید (Wojdyło *et al.*, 2007).

رابطه ۲) $Y= 0.01x - 0.0101$

که در آن Y عدد جذب عصاره در طول موج ۷۶۵ نانومتر است و X میزان فنل میوه در مراحل مختلف رشد را بیان می‌کند.

فلاونوئید و فلاونون

میزان فلاونوئید و فلاونون بر طبق روش Menichini *et al.* (2009) براساس روش رنگ‌سنجی کلرید آلومینیوم تعیین‌شد. برای تعیین میزان فلاونوئید، ۵۰۰ میکرلیتر از عصاره متانولی را با ۵۱۵۰ میکرلیتر از نیتریت سدیم ۵ درصد مخلوط کرده، سپس به آن ۳۰۰ میکرولیتر کلرید آلومینیوم ۱۰ درصدی اضافه گردید و پس از گذشت ۶ دقیقه ۲ میلی‌لیتر سود ۱ نرمال و ۲ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه گردید، سپس محلول‌ها در دمای اتاق به‌مدت ۳۰ دقیقه قرارگرفتند. جذب در۵۱۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری‌شد. منحنی استاندارد با محلول‌های کوئرستین (Quercetin, Sigma Chemical Co.) متانولی در غلظت‌های μgml^{-1} ۲۵۰-۱۰۰۰ تهیه‌گردید و در نهایت نتایج برحسب میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم ماده خشک محاسبه‌شد. فلاونون نیز براساس روش Menichini *et al.*(2009) با مخلوط کردن ۱ میلی‌لیتر عصاره متانولی با ۱ میلی‌لیتر کلرید آلومنیوم ۲ درصد و ۵۰۰ میکرولیتر متانول ۷۰ درصد عصاره آماده شده و پس ازقرارگیری به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق، جذب هر ترکیب واکنشی در ۴۲۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek Instruments, Inc., USA) اندازه‌گیری و براساس میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم ماده خشک بیان‌شد.

آنتوسیانین

برای اندازه‌گیری آنتوسیانین کل از روش pH افتراقی (اختلاف جذب‌های متفاوت) استفاده شد. میزان جذب آنتوسیانین در دو طول pH (بافرهای ۱/۵ و ۴/۵) در موج ۵۲۰ و ۷۰۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شد (Giusti & Wrolstad, 2001).

رنگدانه‌های فتوسنتزی و کارتنوئید

محتوای کلروفیل a، b، کل و کاروتنوئید میوه‌ها با استفاده از روش دی‌متیل‌سولفوکساید (Dimethyl sulfoxide (DMSO) استخراج‌شد (Hiscox & Israelstam, 1979) و با استفاده از روش اسپکتروفتومتر(Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek Instruments, Inc., USA) جذب عصاره‌ها در طول‌موج‌های ۶۴۵، ۶۶۳ و ۴۷۰ نانومتر خوانده شدند. از DMSO به‌عنوان بلانک دستگاه استفاده شد. محتوای کلروفیل و کاروتنوئید نمونه‌ها به‌صورت میلی‌گرم در هر گرم وزن تازه میوه، با استفاده از رابطه‌های زیر محاسبه گردیدند (Gross, 2012):

رابطه ۲) $$\text{Chlorophyll a} = \frac{12.7(A_{663}) - 2.69(A_{645}) \times \text{Volume made}}{\text{Wt of the sample}}$$

رابطه ۳) $$\text{Chlorophyll b} = \frac{22.9(A_{645}) - 4.68(A_{663}) \times \text{Volume made}}{\text{Wt of the sample}}.$$

رابطه ۴) $$\text{Carotenoid} = \frac{1000(A_{470}) - 1.82\,C_a - 85.02\,C_b}{198}.$$

رابطه ۵) $$\text{Total Chlorophyll} = \text{Chlorophyll a} + \text{Chlorophyll b}$$

که C_a، C_b، $A\lambda$، Volume made و Wt of the Sample به‌ترتیب میزان کلروفیل a، میزان کلروفیل b، جذب در طول‌موج λ (نانومتر)، میزان حجم DMSO مصرفی و وزن تازه نمونه می‌باشد.

ویژگی‌های کمی میوه

به‌منظور اندازه‌گیری صفات کمی شامل طول، قطر و وزن میوه، میوه‌های تمشک سیاه در مراحل مختلف رسیدگی (سبز، قرمز و سیاه) از هر تکرار از مزرعه برداشت و سپس به آزمایشگاه منتقل گردید. وزن میوه توسط ترازوی دیجیتالی اندازه گیری شده و بر حسب گرم گزارش گردید. طول و قطر میوه نیز توسط کولیس اندازه‌گیری شده و برحسب سانتی‌متر گزارش گردید. لازم به ذکر است که صفات مذکور حاصل میانگین ۱۰ عدد میوه از هر تکرار در مراحل مختلف رسیدگی میوه بود.

تجزیه و تحلیل آماری

در ابتدا نرمال بودن توزیع خطاهای (Residuals) آزمایشی براساس آزمون شاپیرو-ویلک (Shapiro-Wilk) و همگن‌بودن واریانس‌های درون تیماری (Homogeneity of variances) توسط آزمون لون (Levene's Test) مورد آزمون قرار گرفت. به‌منظور بررسی تفاوت بین ژنوتیپ‌ها از نظر ویژگی‌های اندازه‌گیری‌شده تجزیه واریانس مرکب انجام‌گردید. به‌منظور بررسی مقایسات میانگین از آزمون LSMEANS استفاده‌شد. همچنین برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel 2016 استفاده‌شد. به‌منظور بررسی ارتباط بین ویژگی‌های مختلف از تجزیه همبستگی و تجزیه رگرسیون مرحله‌ای به‌روش گام‌به‌گام استفاده گردید. در نهایت ارتباط بین ژنوتیپ‌های تمشک سیاه و همچنین ویژگی‌های اندازه‌گیری با استفاده از روش آماری چندمتغیره تجزیه به مؤلفه‌های اصلی تعیین‌گردید. به منظور انجام تجزیه‌های ذکرشده از نرم‌افزارهای IBM SPSS V. 21، SAS V. 9.4 و Minitab V. 16 استفاده شد.

نتایج و بحث

براساس نتایج به‌دست‌آمده از تجزیه واریانس مرکب (جدول ۲) اثر سال در تمامی صفات تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. در ژنوتیپ‌های بررسی‌شده از نظر کلیه صفات مورد ارزیابی تفاوت معنی‌دار مشاهده شد که این امر نشانگر وجود تنوع ژنتیکی بالا در بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بود. اثر متقابل ژنوتیپ و مرحله رسیدگی حاکی از وجود تفاوت معنی‌دار در تمام صفات اندازه‌گیری‌شده بود که واکنش متفاوت ژنوتیپ‌ها در مراحل مختلف رسیدگی را از نظر صفات اندازه‌گیری‌شده نشان داد. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده کمترین میزان ضریب تغییرات مربوط به آنتوسیانین (۰/۵ درصد)، IC50 (۱/۶۰ درصد) و فلاونون (۱/۶۳ درصد) بود. بیشترین ضریب تغییرات نیز به ترتیب مربوط به ویژگی‌های فلاونوئید (۱۱/۴۱ درصد)، فنل کل (۷/۴۶ درصد) و کارتنوئید (۵/۶۲ درصد) بود. نظر به معنی‌داربودن اثر ژنوتیپ و مرحله رسیدگی در تمامی ویژگی‌های بررسی‌شده لذا مقایسه میانگین از نظر اثر ذکر شده بررسی و گزارش‌گردید.

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از مقایسه میانگین بیشترین میزان IC50 به میوه ژنوتیپ بندر گز (۶۵/۵۰ppm) در مرحله سبز رنگی تعلق داشت و با دیگر ژنوتیپ‌ها در مراحل مختلف رسیدگی، تفاوت معنی‌داری بود. کمترین میزان IC50 هم به ژنوتیپ بابلسر (۴۶/۲۵) و در مرحله سیاه رنگ بودن میوه اختصاص داشت که با دیگر ژنوتیپ‌ها در مراحل مختلف رسیدگی تفاوت معنی‌دار نشان‌داد (شکل ۱).

از نظر میزان فنل کل و آنتوسیانین بیشترین و کمترین مقدار به‌ترتیب به ژنوتیپ بابلسر (۳۵۰/۵۳ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم ماده خشک، ۲۸۱/۵۷ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم ماده تازه) در مرحله سیاه رنگ بودن میوه و بندرگز (۲۲۴/۶۷ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم ماده خشک، ۲۳/ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم ماده تازه) در مرحله سبزرنگ‌بودن میوه اختصاص داشت.

جدول ۲. نتایج تجزیه واریانس صفات بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و صفات کمی در اندام میوه ژنوتیپ‌های تمشک سیاه مطالعه‌شده

Table 2. Results of variance analysis of different biochemical, physiological and fruit quantitative traits of blackberry genotypes in fruit organ

Source of variation	d.f.	Mean of square				
		IC50	Phenol	Flavonoid	Anthocyanin	Flavanone
Year	1	$0.05^{n.s}$	$1.03^{n.s}$	$0.0099^{n.s}$	$0.001^{n.s}$	$0.01^{n.s}$
Error	6	1.30	493.97	5102.13	2.45	0.06
Genotype	3	60.67^{**}	16711.68^{**}	56515.45^{**}	5617.90^{**}	532.01^{**}
Maturity stages	2	1541.22^{**}	62521.09^{**}	275989.48^{**}	254359.12^{**}	18282.96^{**}
Genotype* Maturity stages	6	24.06^{**}	5511.71^{**}	21100.54^{**}	2226.44^{**}	57.35^{**}
Year*Genotype	3	$0.07^{n.s}$	$0.61^{n.s}$	$0.038^{n.s}$	$0.039^{n.s}$	$0.02^{n.s}$
Year* Maturity stages	2	$0.02^{n.s}$	$0.72^{n.s}$	$0.0074^{n.s}$	$0.050^{n.s}$	$0.037^{n.s}$
Year*Genotype* Maturity stages	6	$0.03^{n.s}$	$1.09^{n.s}$	$0.0067^{n.s}$	$0.047^{n.s}$	$0.041^{n.s}$
Error	66	0.77	490.13	6072.78	0.78	0.55
C.V (%)	-	1.60	7.46	11.41	0.50	1.63

n.s و **: به ترتیب نبود تفاوت معنی‌دار و تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

n.s, **: Non-significantly difference and significantly difference at 1% of probability level, respectively.

ادامه جدول ۲. نتایج تجزیه واریانس صفات بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و صفات کمی در اندام میوه ژنوتیپ‌های تمشک سیاه مطالعه‌شده

Continued table 2. Results of variance analysis of different biochemical, physiological and fruit quantitative traits of blackberry genotypes in fruit organ

Source of variation	d.f.	Mean of square						
		Chl A	Chl B	Car	Total Chl	Fruit Length	Fruit Width	Fruit Weight
Year	1	$1.01\text{-}E8^{n.s}$	$9.0\text{-}E8^{n.s}$	$4.4\text{-}E4^{n.s}$	$1.5\text{-}E7^{n.s}$	$0.00387^{n.s}$	$7.04\text{-}E6^{n.s}$	$2.370\text{-}E5^{n.s}$
Error	6	1.01-E8	2.0-E8	0.0090	5.0-E8	0.00223	0.00145	0.00233
Genotype	3	$4.2\text{-}E5^{**}$	$1.7\text{-}E5^{**}$	6.7148^{**}	$1.1\text{-}E4^{**}$	0.398^{**}	0.1577^{**}	0.2275^{**}
Maturity stages	2	$9.5\text{-}E5^{**}$	$3.7\text{-}E4^{**}$	53.81^{**}	0.0025^{**}	2.283^{**}	1.3985^{**}	3.1093^{**}
Genotype* Maturity stages	6	$8.2\text{-}E6^{**}$	$1.1\text{-}E6^{**}$	3.38^{**}	$8.6\text{-}E6^{**}$	0.0253^{**}	0.0297^{**}	0.0171^{**}
Year*Genotype	3	$2.3\text{-}E5^{n.s}$	$1.07\text{-}E8^{n.s}$	$5.3\text{-}E4^{n.s}$	$1.03\text{-}E8^{n.s}$	$0.000342^{n.s}$	$0.000858^{n.s}$	$6.710\text{-}E5^{n.s}$
Year* Maturity stages	2	$2.8\text{-}E5^{n.s}$	$1.03\text{-}E8^{n.s}$	$3.3\text{-}E4^{n.s}$	$1.03\text{-}E8^{n.s}$	$0.000654^{n.s}$	$0.000210^{n.s}$	$0.000820^{n.s}$
Year*Genotype* Maturity stages	6	$6.3\text{-}E4^{n.s}$	$1.06\text{-}E7^{n.s}$	$6.2\text{-}E4^{n.s}$	$1.07\text{-}E8^{n.s}$	$0.000687^{n.s}$	$0.000141^{n.s}$	$0.000252^{n.s}$
Error	66	5.05-E8	6.0-E8	0.0059	1.04-E7	0.00157	0.001060	0.00131
C.V (%)	-	2.45	4.04	5.62	2.02	3.47	2.79	3.83

n.s و **: به ترتیب نبود تفاوت معنی‌دار و تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

n.s, **: Non-significantly difference and significantly difference at 1% of probability level, respectively.

قابل توجه است که تفاوت بین کمترین و بیشترین ژنوتیپ برای میزان فنل کل و آنتوسیانین به‌ترتیب ۳۵/۹۰ و ۶۷/۲۴ درصد بود. ژنوتیپ ۹۲ بابلسر در مرحله سیاه رنگ بوده میوه برای ویژگی‌های فلاونوئید (۸۱۲/۳۷ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم ماده خشک) و فلاونون (۷۵/۵۵ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم ماده خشک) نیز بیشترین مقدار را نشان‌داد. کمترین میزان نیز از نظر صفات ذکر شده در ژنوتیپ نهارخوران (به‌ترتیب ۵۳۱/۷۱ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم ماده خشک، ۱۸/۴۷میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم ماده خشک) در مرحله سبز رنگ بودن میوه مشاهده‌گردید. بایستی توجه داشت که تفاوت بین کمترین و بیشترین مقدار از لحاظ فلاونوئید ۳۴/۵۴ درصد و از نظر فلاونون ۷۵/۵۵ درصد بود.

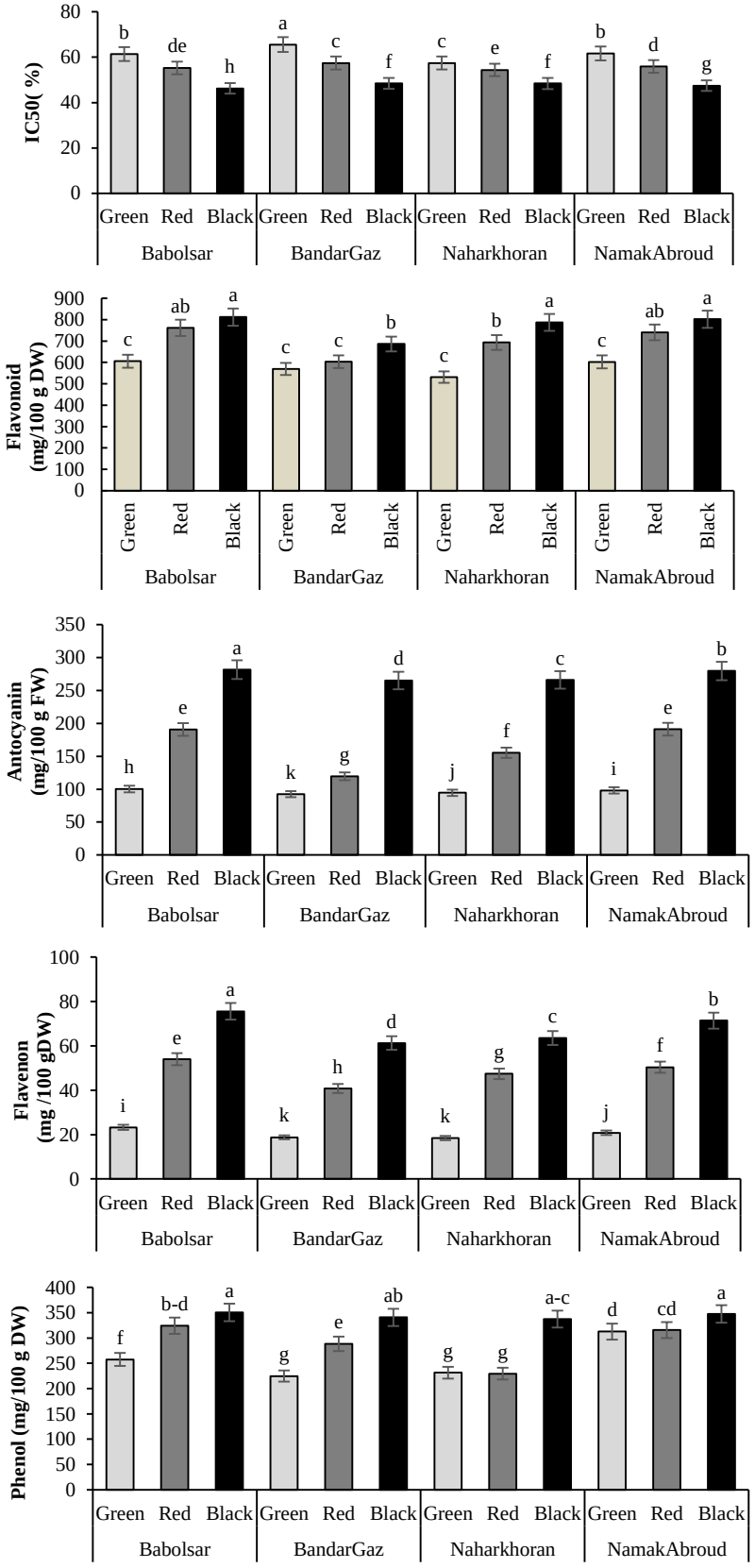
مطالعات قبلی نشان داده‌اند که انواع تمشک‌ها منبع خوبی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی می‌باشند (Curi *et al.*, 2014; Heinonen *et al.*, 1998). این آنتی‌اکسیدان‌ها شامل ترکیبات فنلی از جمله فلاونویید، آنتوسیانین و فلاونون است که اثرات مفیدی در مهار رادیکال‌های آزاد دارند و محافظت سلول در برابر آسیب‌های اکسیداتیو دارند (Wada & Ou, 2002; Wang & Lin, 2000). براساس نتایج به‌دست‌آمده در مطالعه حاضر تنوع بالایی از نظر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدان و ترکیبات فنلی مشاهده گردید. بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش ژنوتیپ‌های بابلسر، نهارخوران، بندر گز و نمک‌آبرود دارای مقادیر متفاوتی از ترکیبات فنلی بوده و از این جهت خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها متغیر بود. که این نتایج با نتایج حاصل از پژوهش‌های Kähkönen (2001) و Weber *et al.* (2008)، که گزارش کرده‌اند انواع تمشک معمولی از لحاظ صفات آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات فنلی مانند محتوای آنتوسیانین و فلاونویید متنوع هستند و تحت تأثیر ژنوتیپ، شرایط آب‌وهوایی و گونه و منشأ جغرافیایی و مرحله برداشت قرار می‌گیرد همراستا است (Maro *et al.*, 2014). همچنین

میزان‌های مختلفی از لحاظ فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات فنلی و آنتوسیانین و فلاونویید در تمشک‌سیاه مشاهده شده است (Guedes *et al*., 2013; Curi *et al*., 2015). لازم به ذکر است که تنوع مشاهده‌شده از نظر صفات اندازه‌گیری‌شده در مراحل مختلف رسیدگی متفاوت بود که این نتیجه با نتایج Kaume *et al.* (2011) همراستا است. همچنین براساس مطالعه صورت‌گرفته بر روی خصوصیات مورفولوژیکی و فیتوشیمیایی تمشک محلی مازندران در دو منطقه کوهپایه و دشت، نتایج حاکی از وجود تنوع و تفاوت معنی‌دار از لحاظ محتوای آنتوسیانین این تمشک‌ها بود (Esmaeili *et al*., 2013). بر اساس مطالعه انجام شده توسط Acosta-Montoya *et al* (2010) تمشک‌های مناطق مرتفع گرمسیری از لحاظ ترکیبات مختلف فنلی در سه مرحله مختلف رسیدگی تفاوت معنی‌داری داشتند. به‌طورکلی گونه‌های تمشک‌سیاه حاوی میزان بالایی از ترکیبات پلی فنلی در اندام میوه می‌باشند (Brennan & Graham, 2009; Cuevas-Rodriguez *et al*., 2010 Zozio *et al*., 2011; Maro *et al*. 2013).

به‌طور کلی براساس نتایج حاصل از مقایسه میانگین در صفات فلاونوئید، آنتوسیانین، فنل کل و فلاونون در مراحل مختلف رسیدگی میوه با گذر میوه از رنگ سبز به‌سمت رنگ سیاه یک روند افزایشی مشاهده‌شد. بالعکس، از نظر IC50 با گذر میوه از سبز رنگی به‌سمت سیاه رنگ بودن یک روند نزولی به‌چشم خورد. ژنوتیپ بابلسر در زمان رسیدگی کامل (سیاه) با ۳۵۰/۵۳ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم ماده خشک دارای بیشترین میزان فنل بود. میزان فنل از مقدار ۱۱۴ تا ۱۰۵۶ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن‌تر در میوه تمشک گزارش شده‌است (Kaume *et al*., 2011)، این در حالی است که Shiow & Hsin-Shan (2000) میزان فنل را در مراحل مختلف رسیدگی میوه از سبز رنگ تا سیاه تمشک‌سیاه از ۸۲/۸-۹۱/۶ میلی‌گرم در گرم میوه خشک گزارش کردند. بر اساس نتایج حاصل از این آزمایش مشاهده شد که مقدار فنل کل به‌طور قابل ملاحظه ای از مرحله سبز تا رسیده دارای تنوع می‌باشد. تنوع در میزان فنل کل ممکن است بیش از ژنوتیپ، زمان برداشت، مدت و نوع نگهداری وابسته به مرحله رشد میوه باشد که در انگورسیاه، زغال‌اخته، تمشک و توت‌فرنگی در میوه‌ها و برگ‌ها نیز قبلا گزارش‌شده‌است (de Ancos *et al*., 2000; Kähkönen *et al*., 2001; Rubinskiene *et al*., 2006).

آنتوسیانین ها یک گروه از ترکیبات فنلی مسئول رنگ قرمز-آبی بسیاری از میوه‌ها و سبزی ها هستند که اثرات سودمندی بر سلامت انسان دارند (García-Alonso *et al*., 2004). براساس نتایج به‌دست‌آمده میزان آنتوسیانین در مراحل مختلف رسیدگی متفاوت بود، اما میزان آن در بافت میوه رسیده به‌طور چشمگیری بیشتر بود که این می‌تواند یکی از دلایل رنگ سیاه میوه‌های رسیده باشد که با نتایج Shiow & Hsin-Shan (2000) که میزان آنتوسیانین را در مراحل مختلف رسیدگی از میوه سبز تا سیاه (۰/۹-۱۵۸/۲میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم میوه تازه)گزارش کردند همراستا است و همچنین وجود همبستگی مثبت بین مرحله رسیدگی با میزان آنتوسیانین و ترکیبات فنلی موجود در میوه تمشک گزارش شده‌است (Caproni *et al*., 2016; Bilyk & Sapers, 1986). همچنین نتایج حاصل از مطالعات قبلی در این زمینه نیز همسو با نتایج به‌دست‌آمده در این تحقیق بود که گزارش شده است، در میوه مربوط به رقم های مختلف توت سیاه، تمشک (Rassberry) و توت فرنگی مقدار فنل کل، آنتوسیانین و همچنین فلاونوئید در مراحل مختلف رسیدگی میوه از سبز- صورتی به سمت قرمز- سیاه به صورت معنی‌داری افزایش پیدا کرده است و همبستگی مثبی بین میزان آنتی‌اکسیدان آن‌ها با میزان فنل کل، آنتوسیانین و فلاونوئید وجود داشته است (Perkins-Veazie *et al*., 2000; Wang & Lin, 2000; Guerrero *et al*., 2010; Atala *et al*., 2009).

در یک بررسی انجام‌شده بر روی ویژگی‌های فیتوشیمیایی ژنوتیپ‌های تمشک و تأثیر آن بر سلامت بدن، نتایج حاکی وجود تنوع از لحاظ اندازهٔ میوه و ترکیبات میوه بوده، به‌طوری که تمشک‌های سیاه معمولی با داشتن ۴۰۰ میلیگرم آنتوسیانین در ۱۰۰گرم بافت تازه بیشترین میزان آنتوسیانین کل را نشان دادند (Weber *et al*., 2008).



شکل ۱. تغییرات IC50، فنل، فلاونوئید، فلاونون و آنتوسیانین در طی دوره‌ی رسیدگی میوه در ژنوتیپ‌های تمشک. نمونه‌برداری در مرداد ماه، انجام گرفته است.

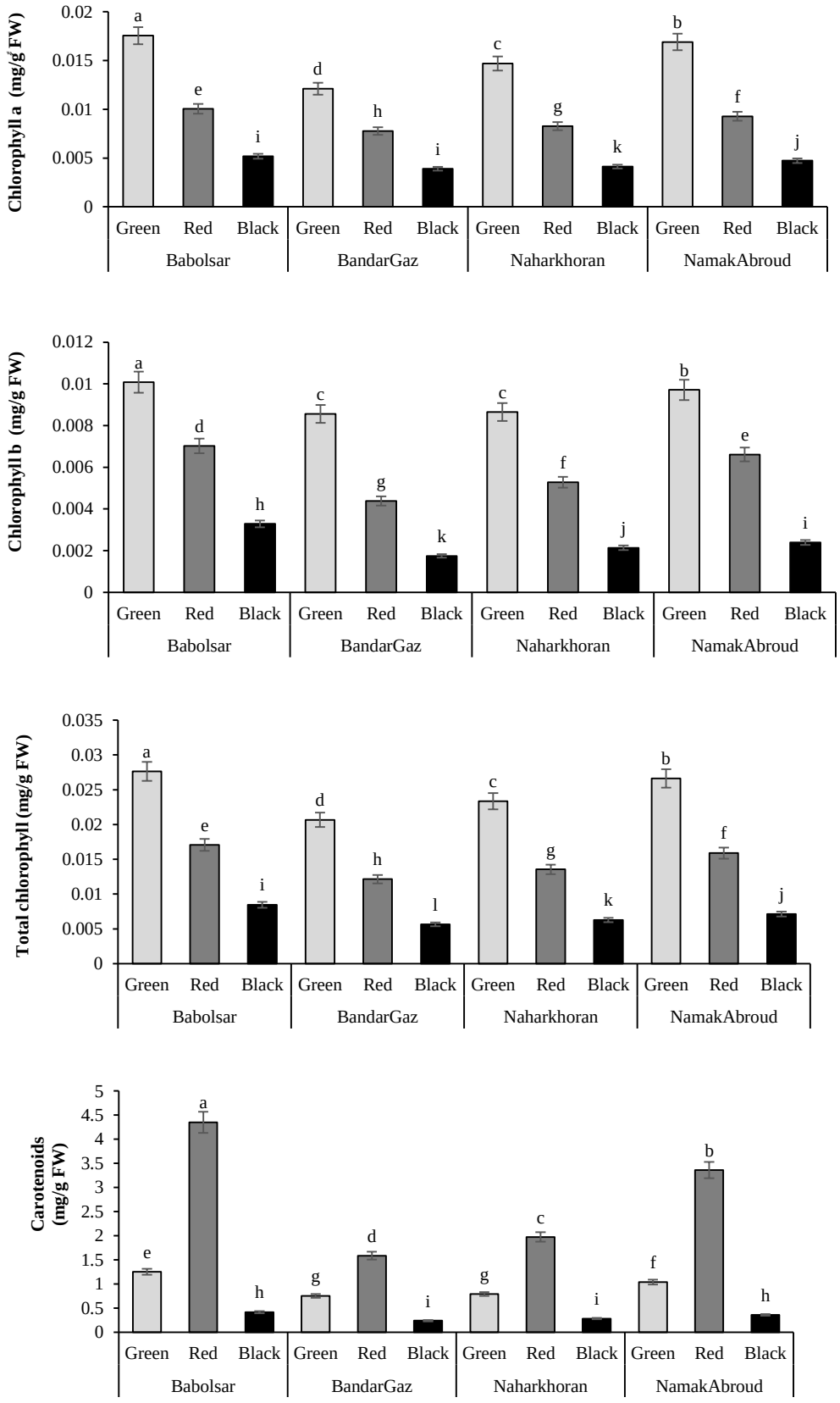
Figure 1. Change of IC50, phenol, flavonoid, flavanone and anthocyanin in different fruit maturity stages in blackberry accessions. Sampling date was in June.

براساس نتایج حاصل از مقایسه میانگین برای ویژگی‌های رنگ‌دانه از نظر کلروفیل a، b و کل به‌ترتیب بیشترین مقدار به ژنوتیپ بابلسر (۰/۰۱۷، ۰/۰۱۰، ۰/۰۲۷میلی‌گرم بر گرم ماده تر) در مرحله سبزرنگ‌بودن میوه و کمترین مقدار نیز به ژنوتیپ بندرگز (۰/۰۰۳۸، ۰/۰۰۱۷، ۰/۰۰۵۶ میلی‌گرم بر گرم ماده تر) تعلق داشت. تفاوت بین کمترین و بیشترین مقدار نیز برای صفات کلروفیل a، b و کل به‌ترتیب ۷۷/۶۴، ۸۳/۰۰ و ۷۹/۲۵ میلی‌گرم بر گرم ماده تر درصد بود. از نظر صفت کارتنوئید بیشترین مقدار به ژنوتیپ بابلسر (۴/۳۵ میلی‌گرم بر گرم ماده تر) در مرحله قرمز رنگ بوده میوه و کمترین مقدار نیز به ژنوتیپ بندرگز در مرحله سیاه رنگ بودن میوه (۰/۲۳۶) اختصاص داشت که تفاوت بین آن‌ها ۹۴/۵۷ درصد بود (شکل ۲). از نظر صفت کارتنوئید مشاهده‌گردید که به‌طور کلی میزان کارتنوئید در ژنوتیپ‌های تمشک سیاه مطالعه‌شده در مرحله قرمز رنگ بودن میوه، بیشترین مقدار را دارد. به‌طور کلی کارتنوئید به‌عنوان رنگیزه‌ای در بافت گیاهی است که مسئول رنگ زرد و نارنجی در گیاه می‌باشد و همچنین دارای خواص آنتی‌اکسیدانی است. بنابراین افزایش آن در میوه‌های قرمز می‌تواند به‌دلیل رنگ میوه باشد (Mayne, 1996; Oliver & Palou, 2000; Kanofsky & Sima, 2007).

به‌طورکلی، در رنگدانه‌های کلروفیل a، b و کل میوه تمشک سیاه در ژنوتیپ‌های بررسی‌شده با گذر از رنگ سبز به‌سمت رنگ سیاه، یک روند نزولی را نشان‌داد در حالی‌که این روند برای صفت کارتنوئید دارای نوسان بود، به‌طوری‌که در ژنوتیپ‌های بررسی‌شده با گذر از مرحله سبز به‌سمت مرحله قرمز رنگ بودن یک روند صعودی و با گذر از مرحله قرمز رنگی به‌سمت مرحله سیاه رنگی یک روند نزولی مشاهده شد (شکل ۲).

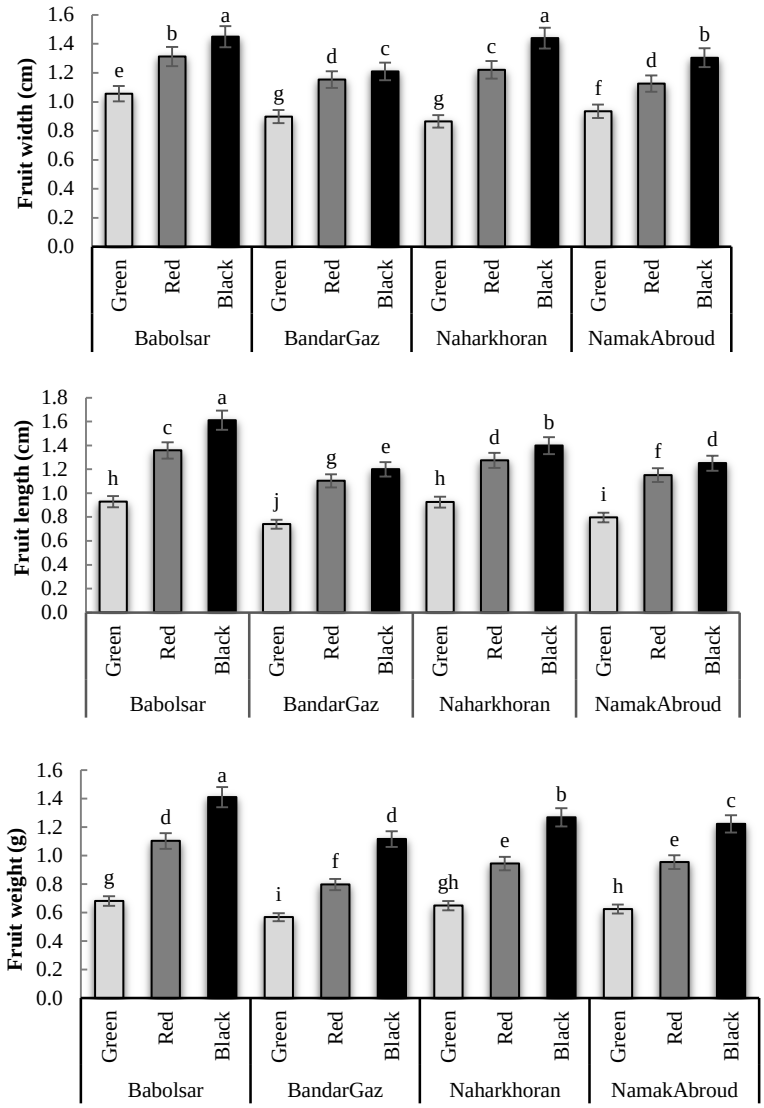
براساس نتایج حاصل از مقایسه میانگین برای ویژگی‌های کمی میوه از نظر طول، قطر و وزن میوه (شکل ۳) به‌ترتیب بیشترین مقدار به ژنوتیپ بابلسر (۱/۶۱سانتی‌متر، ۱/۴۵ سانتی‌متر، ۱/۴۱ گرم) در مرحله سیاه رنگ بودن میوه و کمترین مقدار برای صفات طول و وزن میوه نیز به ژنوتیپ بندرگز (۰/۷۴، ۰/۵۷) تعلق داشت. از لحاظ قطر میوه نیز دو ژنوتیپ نهارخوران (۰/۸۶) و بندرگز (۰/۸۹) دارای کمترین میزان بودند (شکل ۳). علاوه براین، بین کمترین و بیشترین مقدار از نظر صفات طول، قطر و وزن میوه به‌ترتیب ۵۴/۰۳، ۴۰/۶۸ و ۶۰/۲۸ درصد تفاوت مشاهده شد. با توجه به یافته‌های این تحقیق طول و قطر میوه تمشک سیاه در مراحل مختلف در چهار ژنوتیپ مختلف دارای تنوع بودند به گونه‌ای که دامنه تغییرات طول میوه بین ۰/۷۴ تا ۱/۶۱ سانتی‌متر و برای قطر میوه بین ۰/۸۶ تا ۱/۴۵ سانتی‌متر مشاهده گردید. بر اساس نتایج حاصل از بررسی یک جمعیت وحشی از گیاه *R. fruticosus* نشان داد که طول و قطر میوه به ترتیب بین ۷/۸ تا ۱۱/۴ و ۹/۴ تا ۱۳/۰ میلی‌متر متغیر می‌باشد (Yilmaz *et al*, 2009). همچنین از نظر صفت طول میوه در بررسی‌های انجام شده نشان داده شده است که میانگین طول میوه تمشک سیاه (*Rubus glaucus* Benth) دارای تنوع می‌باشد به گونه‌ای که در مطالعه انجام‌شده توسط García (2012) طول میوه در فصل بارش ۳۱/۲ میلی‌متر می‌باشد در حالی‌که Vergara *et al*. (2016) میانگین طول میوه را ۲۶/۵ میلی‌متر گزارش کردند. در مطالعه حاضر، وزن میوه بین ۰/۵۶ گرم تا ۱/۴۱ گرم در ژنوتیپ‌های تمشک سیاه بررسی شده متغیر بود. همراستا با نتایج به‌دست آمده، وزن میوه در ژنوتیپ‌های وحشی تمشک سیاه ترکیه، میزان وزن میوه بین ۰/۴ گرم تا ۱/۲ گرم گزارش شده است (Yilmaz *et al.*, 2009)، درحالی‌که این میزان در ارقام تجاری بررسی شده بالاتر بود (۱/۲ گرم تا ۵/۴ گرم).

براساس نتایج مشاهده‌شده با گذر از مرحله سبز رنگ بودن میوه به‌سمت مرحله سیاه رنگ بودن یک روند صعودی در صفات طول، قطر و وزن میوه مشاهده گردید. به عبارتی، ژنوتیپ‌های بررسی شده تمشک سیاه در این مطالعه، با گذر از مرحله سبز رنگ بودن میوه به سمت سیاه رنگ‌شدن از لحاظ ویژگی‌های کمی میوه افزایشی معنی‌دار نشان دادند.



شکل ۲. تغییرات کلروفیلa، کلروفیلb، کلروفیل کل و کارتنویید در طی مراحل مختلف رسیدگی میوه در ژنوتیپ‌های تمشک سیاه. نمونه‌برداری در مرداد ماه، انجام گرفته است.

Figure 2. Change of chlorophyll a, chlorophyll b, total chlorophyll and carotenoids in different fruit maturity stages in blackberry accessions. Sampling date was in June.



شکل ۳. تغییرات وزن، طول و عرض میوه در طی دوره رسیدگی میوه در ژنوتیپ‌های تمشک. نمونه‌برداری در مرداد ماه، انجام گرفته است.

Figure 3. Change of fruit weight, fruit length and fruit width in different fruit maturity stages in blackberry accessions. Sampling date was in June.

براساس نتایج حاصل از تجزیه همبستگی بین صفات اندازه‌گیری شده، مشاهده‌گردید که بین IC50 با تمامی صفات به‌استثنای رنگیزه‌های فتوسنتزی (کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل) همبستگی منفی و معنی‌داری وجود داشت. فلاونوئید همبستگی مثبت معنی‌داری با صفات آنتوسیانین، فلاونون و رنگیزه‌های فتوسنتزی داشت. در نهایت رنگیزه‌های فتوسنتزی نیز همبستگی مثبت معنی‌داری با یکدیگر داشتند. دیگر مقایسه‌های دوتایی بین صفات همبستگی معنی‌داری را نشان نداد (جدول ۳).

براساس نتایج تجزیه رگرسیونی گام به گام، یک ارتباط خطی، منفی و معنی‌دار بین IC50 با دیگر صفات باقی‌مانده وجود داشت (جدول ۴). براساس نتایج حاصل، صفات آنتوسیانین، فنل و فلاونون در نهایت در مدل رگرسیونی باقی‌مانده و در مجموع ۹۱/۷ درصد از تغییرات مربوط به IC50 را توجیه نمودند (جدول ۵). لازم به ذکر است که علامت ضریب رگرسیون مربوط به تمامی این صفات در این مدل رگرسیونی منفی و بیانگر ارتباط منفی معنی‌دار آن‌ها با IC50 بود در نتیجه می‌توان براساس این صفات روند تغییرات مربوط به IC50 را پیش‌بینی نمود.

براساس نتایج حاصل از تجزیه همبستگی و

رگرسیون گام‌به‌گام، صفات فنل، فلاونوئید، آنتوسیانین و فلاونون دارای ارتباط منفی و معنی‌داری با میزان IC50 بودند. در واقع با افزایش میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی میوه، میزان فنل کل، فلاونوئید و فلاونون بیشتر خواهدشد و بالعکس. به گونه‌ای که در ژنوتیپ‌های بررسی شده به خصوص بابلسر این مساله کاملاً مشهود بود. به عبارتی در ژنوتیپ بابلسر کمترین میزان IC50 به همراه بیشترین میزان فنل کل، فلاونوئید و فلاونون در مقایسه با دیگر ژنوتیپ‌ها مشاهده گردید که حاکی از خاصیت بالای آنتی‌اکسیدانی در این ژنوتیپ بود. بر اساس بررسی انجام شده مشخص شده است که میزان ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی و فلاونون می‌تواند با فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه رابطه معنی‌دار داشته باشند (Vagiri *et al.*, 2015).

نتایج حاصل از این پژوهش با Guedes (2017) و Prior *et al.* (1998) که گزارش‌کرده‌است، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تمشک‌سیاه به اسیدهای فنولیک، آنتوسیانین و سایر ترکیبات فلاونوئیدی بستگی دارد همراستاست. علاوه بر این، ارتباط بین میزان فنل‌ها و آنتوسیانین نیز مهم است چراکه آنتوسیانین از مهم ترین ترکیبات فنلی موجود در تمشک است (Macheix *et al.*,1990). میزان بالای آنتوسیانین در کنار سایر فاکتورها از جمله فنل، فلاونوئید و فلاونون در زمان رسیدگی کامل خود دلیلی بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالای میوه در این مرحله از رسیدگی میوه تمشک می‌باشد (Cho *et al.*,2004; Johansson *et al.*,2014). براساس گزارش‌هایی که در مورد شناسایی پلی‌فنول‌های تمشک صورت گرفته، مشخص شده‌است که فلاونون و فلاونوییدها از ترکیبات عمده‌ی فنولی این میوه می‌باشند (Wald *et al.*, 1986; Arts *et al.*, 2000; Sellappan *et al.*, 2002).

جدول ۳. ضرایب همبستگی صفات فیتوشیمایی اندازه‌گیری‌شده و رنگیزه‌های فتوسنتزی در اندام میوه ژنوتیپ‌های تمشک سیاه بررسی‌شده

Table 3. Correlation coefficient of different phytochemical and photosynthesis pigments traits of fruit blackberry genotypes

	IC50	Phenol	Flavonoid	Anthocyanin	Flavanone	Chl a	Chl b	Total Chl
IC50	1							
Phenol	0.899**	1						
Flavonoid	0.634**	0.692n.s	1					
Anthocyanin	0.556**	0.764n.s	0.994**	1				
Flavanone	0.505**	0.720n.s	0.963*	0.960*	1			
Chl a	0.570n.s	0.719n.s	0.991**	0.988*	0.990**	1		
Chl b	0.474n.s	0.752n.s	0.962*	0.965*	0.999*	0.990*	1	
Total Chl	0.534n.s	0.734n.s	0.982*	0.981*	0.996*	0.998**	0.996**	1

n.s، * و **: به ترتیب نبود تفاوت معنی‌دار و تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

n.s, *, **: Non-significantly difference and significantly difference at 5 and 1% of probability level, respectively.

جدول ۴. نتایج تجزیه واریانس مدل رگرسیونی گام به گام صفات مطالعه شده برروی IC50 در میوه ژنوتیپ‌های تمشک سیاه بررسی‌شده

Table 4. Results of variance analysis for stepwise regression model of studied traits on IC50 trait in fruit of blackberry accessions

Source	df	Sum of squares	Mean of squares	F Value	Pr > F
Regression model	5	3195.382	639.076	210.783**	<.0001
Error	90	272.873	3.032		
Corrected total	95	3468.254			

**: Significantly difference at 1% of probability level. ** تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

جدول ۵. نتایج رگرسیون گام به گام صفات مطالعه شده بر روی IC50 در میوه تمشک

Table 5. Results of the stepwise regression of studied traits on IC50 trait, in fruit blackberry accessions

Variable	Coefficients	Standard error	t value	Pr > t	R^2 of model
α (intercept)	62.103	1.791	34.671	<.0001	0.917
Anthocyanin (β_1)	-.085**	.008	-10.299	<.0001	-
Phenol (β_2)	-.019**	.006	3.318	0.001	-
Flavanone (β_3)	-.036*	.014	2.512	0.014	

n.s، * و **: به ترتیب نبود تفاوت معنی‌دار و تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

n.s, *, **: Non-significantly difference and significantly difference at 5 and 1% of probability level, respectively.

همچنین نتایج حاصل از تجزیه همبستگی بین صفات اندازه‌گیری شده، مشاهده‌گردید که بین IC50 با رنگیزه‌های فتوسنتزی (کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل) همبستگی مثبت و معنی‌داری وجود داشت به این معنی که میزان افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی با کاهش رنگیزه‌های فتوسنتزی همراه بود که می‌تواند به دلیل کاهش فتوسنتز و رنگیزه‌های فتوسنتزی در طی رسیدگی و تمایز کروموپلاست از کلروپلاست باشد(Fosket, 1994).

نتیجه‌گیری کلی

براساس نتایج به‌دست‌آمده بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی تنوع بالایی از لحاظ خصوصیات آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات فنلی وجود داشت. به‌طورکلی، در بین ژنوتیپ‌های تمشک سیاه مورد بررسی ژنوتیپ بابلسر به عنوان بهترین ژنوتیپ از لحاظ درصد آنتی‌اکسیدان (کمترین میزان IC50) (۴۶/۲۵ درصد) و ترکیبات فنلی (فنل کل (۳۵۰/۵۳)، فلاونون (۷۵/۵۴)، فلاونوئید (۸۱۲/۳۶) و آنتوسیانین (۲۸۱/۵۷) میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم ماده خشک) شناسایی گردید که دارای میزان بالای خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ارزش غذایی می‌باشد و بهتر است از نظر سایر صفات و ترکیبات فنلی همانند Ellagic acid، Gallic acid، Catechin و Gallocatechin نیز مورد بررسی قرارگیرد. همچنین ژنوتیپ بندرگز به عنوان ضعیف‌ترین ژنوتیپ از لحاظ درصد آنتی‌اکسیدان (۴۸/۴۶ درصد)، فلاونون (۶۱/۲۲)، فلاونوئید (۶۸۶/۵۲) و آنتوسیانین (۲۶۵/۰۲) میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم ماده تازه) و متعاقباً ارزش پایین‌تر تغذیه‌ای شناخته شد.

سپاسگزاری

از حمایت‌های دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز برای انجام پژوهش حاضر، تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1. Acosta-Montoya, Ó., Vaillant, F., Cozzano, S., Mertz, C., Pérez, A.M. & Castro, M.V. (2010). Phenolic content and antioxidant capacity of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichus* Schltdl.) during three edible maturity stages. *Food Chemistry*, *119*(4), 1497-1501.
2. Ahmadi, K., Gholizadeh, H., Ebadzadeh, H. R., Hosseinpour, R., Hatami, F., Abdshah, H., Rezaei, M. M., Kazemifard, R. & Fazli Estabragh, M. (2015). *Agricultural Statistics in 2013*. Center for Information and Communication Technology, Department of Planning and Economic, Ministry of Agriculture, 147. (in Farsi)
3. Akin, M., Eyduran, S.P., Ercisli, S., Kapchina-Toteva, V. & Eyduran, E. (2016). Phytochemical profiles of wild blackberries, black and white mulberries from southern Bulgaria. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 30(5), 899-906.
4. Alice, L. A., Dodson, T. M. & Sutherland, B. L. (2008). Diversity and relationship of butanese rubus, *Acta Horticulturae*, 777, 63-70.
5. Ao, C., Li, A., Elzaawely, A.A., Xuan, T.D. & Tawata, S. (2008). Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of *Ficus microcarpa* L. extract. *Food Control*, 19(10), 940-948.
6. Arts, I.C., van de Putte, B. & Hollman, P.C. (2000). Catechin contents of foods commonly consumed in The Netherlands. 1. Fruits, vegetables, staple foods, and processed foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(5), 1746-1751.
7. Atala, E., Vásquez, L., Speisky, H., Lissi, E. & López-Alarcón, C. (2009). Ascorbic acid contribution to ORAC values in berry extracts: An evaluation by the ORAC-pyrogallol red methodology. *Food Chemistry*, *113*(1), 331-335.
8. Bilyk, A. & Sapers, G.M. (1986). Varietal differences in the quercetin, kaempferol, and myricetin contents of highbush blueberry, cranberry, and thornless blackberry fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34(4), 585-588.
9. Brennan, R. & Graham, J. (2009). Improving fruit quality in *Rubus* and *Ribes* through breeding. *Functional Plant Science and Biotechnology*, 3(1), 22-29.
10. Caproni, C. M., Curi, P. N., Moura, P. H. A., Pio, R., Gonçalves, E. D. & Pasqual, M. (2016). Blackberry and redberry production in crop and intercrop in Pouso Alegre, southern Minas Gerais, Brazil. *Ciência Rural*, *46*(10), 1723-1728.
11. Cho, B.O., Lee, C.W., So, Y., Jin, C.H., Yook, H.S., Byun, M.W., Jeong, Y.W., Park, J.C. & Jeong, I.Y. (2014). Protective effect of radiation-induced new blackberry mutant γ-B201 on H_2O_2-induced oxidative damage in HepG2 cells. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 46(3), 384-389.

12. Cho, M.J., Howard, L.R., Prior, R.L. & Clark, J.R. (2004). Flavonoid glycosides and antioxidant capacity of various blackberry, blueberry and red grape genotypes determined by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(13), 1771-1782.
13. Clark, J.R., Stafne, E.T., Hall, H. & Finn, C.E. (2007). Blackberry breeding and genetics. *Plant Breeding Reviews*, 29, 19-144
14. Clark, J. R. & Finn, C. E. (2011). Blackberry breeding and genetics. Fruit, vegetable and cereal science and biotechnology. *Global Science Books*, 5(1), 27-43.
15. Clark, J.R., Howard, L. & Talcott, S. (2001). July. Antioxidant activity of blackberry genotypes. In VIII *International Rubus and Ribes Symposium*, 585, 475-480.
16. Cuevas-Rodriguez, E.O., Yousef, G.G., Garcia-Saucedo, P.A., Lopez-Medina, J., Paredes-López, O. & Lila, M.A. (2010). Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in wild and domesticated Mexican blackberries (*Rubus* spp.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(12), 7458-7464.
17. Curi, P.N., Pio, R., Moura, P.H.A., Lima, L.C.O. & Valle, M.H.R. (2014). Qualidade de framboesas sem cobertura ou cobertas sobre o dossel e em diferentes espaçamentos. *Revista Brasileira de Fruticultura*, *36*(1), 199-205.
18. Curi, P. N., Pio, R., Moura, P. H. A., Tadeu, M. H., Nogueira, P. V. & Pasqual, M. (2015). Produção de amora-preta e amora-vermelha em Lavras-MG. *Ciência Rural*, *45*(8), 1368-1374.
19. Dai, J., Patel, J.D. & Mumper, R.J. (2007). Characterization of blackberry extract and its antiproliferative and anti-inflammatory properties. *Journal of Medicinal Food*, 10(2), 258-265.
20. de Ancos, B., González, E.M. & Cano, M.P. (2000). Ellagic acid, vitamin C, and total phenolic contents and radical scavenging capacity affected by freezing and frozen storage in raspberry fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(10), 4565-4570.
21. Dossett, M.P. & Finn, C.E. (2008). Variation and inheritance of vegetative characteristics and reproductive traits in black raspberry. *Acta Horticulturae*, 777, 147-152.
22. Esmaeili, S. Z., Dianati, M., Cherati, A. & Moradi, H. (2012). Evaluation of some morphologic and biochemical characters of wild black berry in mountain foot and plain. In: Proceedings of *National Congress of Medicinal Plants*, 20-21 Nov., Islamic Azad University, Amol, Iran, pp. 1-5. (in Farsi).
23. Eyduran, S.P., Ercisli, S. & Akin, M. (2015). Organic acids, sugars, vitamin C, antioxidant capacity, and phenolic compounds in fruits of white (*Morus alba* L.) and black (*Morus nigra* L.) mulberry genotypes. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 88, 134-138.
24. FAO. (2014). FAOSTAT database collections. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome. Access date: 2013-04-22. URL: http://faostat.fao.or.
25. Finn, C. E. (2008). Blackberries. In: J. F. Hancock (Ed), *Temperate fruit crop breeding*. (pp. 83-114.) Springer Science.
26. Finn, C. E. & Clark, J. R. (2012). Blackberry. In *Fruit breeding* (pp. 151-190). Springer, Boston, MA.
27. Fosket, D. E. (1994). *Plant growth and development: a molecular approach*. Academic Press Inc.
28. García, G. (2012). *Elaboración de un paquete tecnológico para productores, en manejo, cosecha y poscosecha de mora (Rubus glaucus Benth.) aplicando ingeniería de calidad y determinación de las características nutraceúticas de la fruta en precosecha, en el municipio de Silvania Cundinamarca*. Departamento de Ingeniería Agrícola, Universidad Nacional de Colombia, Bogota, from https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/11149.
29. García-Alonso, M., de Pascual-Teresa, S., Santos-Buelga, C. & Rivas-Gonzalo, J.C. (2004). Evaluation of the antioxidant properties of fruits. *Food Chemistry*, 84(1), 13-18.
30. Giongo, L., Palmieri, L., Grassi, A., Grisenti, M., Poncetta, P. & Velasco, R. (2012). Phenotyping and genotyping of rubus germplasm for the improvement of quality traits in raspberry breeding program. *Acta Horticultureae*, 946, 77-81.
31. Giusti, M.M. & Wrolstad, R.E. (2001). Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, (1), F1-2.
32. Gross, J. (2012). *Pigments in vegetables: chlorophylls and carotenoids*. Springer Science & Business Media.
33. Guedes, M. N. S., Abreu, C. M. P. D., Maro, L. A. C., Pio, R., Abreu, J. R. D. & Oliveira, J. O. D. (2013). Chemical characterization and mineral levels in the fruits of blackberry cultivars grown in a tropical climate at an elevation. *Acta Scientiarum Agronomy*, *35*(2), 191-196.
34. Guedes, M. N. S., Pio, R., Maro, L. A. C., Lage, F. F., Abreu, C. M. P. D. & Saczk, A. A. (2017). Antioxidant activity and total phenol content of blackberries cultivated in a highland tropical climate. *Acta Scientiarum Agronomy*, *39*(1), 43-48.
35. Guerrero, J., Ciampi, L., Castilla, A., Medel, F., Schalchli, H., Hormazabal, E., ... & Alberdi, M. (2010). Antioxidant capacity, anthocyanins, and total phenols of wild and cultivated berries in Chile. *Chilean Journal of Agricultural Research*, *70*(4), 537-544.
36. Hadadinejad, M. (2014). Establishment of research collection of blackberries in east of mazandaran. In: Proceedings of *3rd National Congress of Organic and Customary Agriculture*, 20-21 Aug., University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran, pp. 1-4. (in Farsi)

37. Haddadinejad, M., Abdi, N. & Moradi, H. (2017). Evaluation of morphological diversity in thorn less blackberry in Mazandaran. *Iranian Journal of Horticultural Science*, 49 (1), 281-292. (in Farsi)
38. Heinonen, I.M., Meyer, A.S. & Frankel, E.N. (1998). Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(10), 4107-4112.
39. Hiscox, J.D. & Israelstam, G.F. (1979). A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Canadian Journal of Botany*, 57(12), 1332-1334.
40. Jafari, Z. & Gharaghani, A. (2013). *Study of growth and yield of some blackberry's species from throughout Iran in Bajgah*. M.Sc. Thesis. Department of Horticulture, Shiraz University, Iran.
41. Johansson, E., Hussain, A., Kuktaite, R., Andersson, S. & Olsson, M. (2014). Contribution of organically grown crops to human health. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11(4), 3870-3893.
42. Kähkönen, M.P., Hopia, A.I. & Heinonen, M. (2001). Berry phenolics and their antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*(8), 4076-4082.
43. Kähkönen, M.P., Hopia, A.I. & Heinonen, M. (2001). Berry phenolics and their antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8), 4076-4082.
44. Kanofsky, J.R. & Sima, P.D. (2007). Activity of a cationic carotenoid derivative in a mouse model of protoporphyria. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 87(2), 124-129.
45. Kaume, L., Howard, L.R. & Devareddy, L. (2011). The blackberry fruit: a review on its composition and chemistry, metabolism and bioavailability, and health benefits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(23), 5716-5727.
46. Khatamsaz, M. (1992). Flora of Iran (family Rosaceae). Res. Inst. For. Rangelands Press, 6, 274-315.
47. Macheix, J.J., Fleuriet, A. & Billot, J., 1990. Phenolic compounds in fruit processing. *Fruit Phenolics*, 1, 295-358.
48. Maro, L.A.C., Pio, R., Guedes, M.N.S., Abreu, C.M.P.D. & Moura, P.H.A. (2014). Environmental and genetic variation in the post-harvest quality of raspberries in subtropical areas in Brazil. *Acta Scientiarum Agronomy*, *36*(3), 323-328.
49. Maro, L. A. C., Pio, R., Guedes, M. N. S., de Abreu, C. M. P. & Curi, P. N. (2013). Bioactive compounds, antioxidant activity and mineral composition of fruits of raspberry cultivars grown in subtropical areas in Brazil. *Fruits*, *68*(3), 209-217.
50. Mayne, S.T. (1996). Beta-carotene, carotenoids, and disease prevention in humans. *The FASEB Journal*, 10(7), 690-701.
51. Menichini, F., Tundis, R., Bonesi, M., Loizzo, M.R., Conforti, F., Statti, G., De Cindio, B., Houghton, P.J. & Menichini, F. (2009). The influence of fruit ripening on the phytochemical content and biological activity of *Capsicum chinense* Jacq. cv Habanero. *Food Chemistry*, 114(2), 553-560.
52. Momeni, S. H. A. & Gharaghani, A. (2012). *Study the growth chractristics and fruit quantitative and qualitative traits of some blackberries from north and south of Iran*. M.Sc. Thesis. Department of Horticulture, Shiraz Univeristy, Iran.
53. Moyer, R.A., Hummer, K.E., Finn, C.E., Frei, B. & Wrolstad, R.E. (2002). Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(3), 519-525.
54. Oliver, J. & Palou, A. (2000). Chromatographic determination of carotenoids in foods. *Journal of Chromatography*, 881(1-2), 543-555.
55. Pantelidis, G.E., Vasilakakis, M., Manganaris, G.A. & Diamantidis, G.R. (2007). Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries. *Food Chemistry*, 102(3), 777-783.
56. Perkins-Veazie, P., Clark, J.R., Huber, D.J. & Baldwin, E.A. (2000). Ripening physiology in 'Navaho' thornless blackberries: color, respiration, ethylene production, softening, and compositional changes. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 125(3), 357-363.
57. Prior, R.L., Cao, G., Martin, A., Sofic, E., McEwen, J., O'Brien, C., Lischner, N., Ehlenfeldt, M., Kalt, W., Krewer, G. & Mainland, C.M. (1998). Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(7), 2686-2693.
58. Reyes-Carmona, J., Yousef, G.G., Martínez-Peniche, R.A. & Lila, M.A. (2005). Antioxidant capacity of fruit extracts of blackberry (*Rubus* sp.) produced in different climatic regions. *Journal of Food Science*, 70(7), s497-s503.
59. Rubinskiene, M., Viskelis, P., Jasutiene, I., Duchovskis, P. & Bobinas, C. (2006). Changes in biologically active constituents during ripening in black currants. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 14, p.237.

60. Sellappan, S., Akoh, C.C. & Krewer, G. (2002). Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(8), 2432-2438.
61. Shiow, Y. W. & Hsin-Shan, L. (2000). Antioxidant activity in fruit and leaves of blackberry, raspberry and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*(2), 140-146.
62. Shires, D. (2015). Impact of bud/lateral thinning on subsequent growth and yield of erect blackberry. Presentation, tour XI International Rubus and Ribes Symposium, Asheville, North Carolina, June 21.
63. Siriwoharn, T. & Wrolstad, R.E. (2004). Polyphenolic composition of Marion and Evergreen blackberries. *Journal of Food Science*, 69(4), 233-240.
64. Skrede, G. & Wrolstad, R.E. (2002). Flavonoids from berries and grapes. Functional foods: *Biochemical and Processing Aspects*, 2, 71-133.
65. Strik, B.C., Clark, J.R., Finn, C.E. & Buller, G. (2012). Management of primocane-fruiting blackberry: Impacts on yield, fruiting season, and cane architecture. *HortScience*, *47*(5), pp. 593-598.
66. Strik, B.C., Clark, J.R., Finn, C.E. & Bañados, M.P. (2007). Worldwide blackberry production. *Journal of HortTechnology*, 17, 205-213.
67. Vagiri, M., Ekholm, A., Johansson, E., Andersson, S.C. & Rumpunen, K. (2015). Major phenolic compounds in black currant (*Ribes nigrum* L.) buds: Variation due to genotype, ontogenetic stage and location. *LWT-Food Science and Technology*, 63(2), 1274-1280.
68. Vergara, M. F., Vargas, J. & Acuña, J. F. (2016). Physicochemical characteristics of blackberry (*Rubus glaucus* Benth.) fruits from four production zones of Cundinamarca, Colombia. *Agronomía Colombiana*, 34(3), 336-345.
69. Wada, L. & Ou, B. (2002). Antioxidant activity and phenolic content of Oregon caneberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(12), 3495-3500.
70. Wald, B., Galensa, R., Herrmann, K., Grotjahn, L. & Wray, V. (1986). Quercetin 3-O-[6 ″-(3-hydroxy-3-methylglutaroyl)-β-galactoside] from blackberries. *Phytochemistry*, 25(12), 2904-2905.
71. Wang S.Y. (2007): Antioxidant capacity and phenolic content of berry fruits as affected by genotype, preharvest conditions, maturity, and handling. In: Zhao Y. (ed.): *Berry Fruit: Valueadded Products for Health Promotion*. Taylor and Francis Group, Boca Raton, p. 147-186.
72. Wang, H., Cao, G. & Prior, R.L. (1996). Total antioxidant capacity of fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(3), 701-705.
73. Wang, S.Y. & Lin, H.S. (2000). Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(2), 140-146.
74. Weber, C.A., Perkins-Veazie, P., Moore, P.P. & Howard, L. (2008). Variability of antioxidant content in raspberry germplasm, *Acta Horticultureae*, 777, 493-498.
75. Wojdyło, A., Oszmiański, J. & Czemerys, R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, 105(3), 940-949.
76. Yilmaz, K. U., Zengin, Y., Ercisli, S., Serce, S., Gunduz, K., Sengul, M. & Asma, B. M. (2009). Some selected physico-chemical characteristics of wild and cultivated blackberry fruits (*Rubus fruticosus* L.) from Turkey. *Romanian Biotechnological Lettersm Biotech*, 14(1), 4152-4163.
77. Zozio, S., Pallet, D. & Dornier, M. (2011). Evaluation of anthocyanin stability during storage of a coloured drink made from extracts of the Andean blackberry (*Rubus glaucus* Benth.), açai (*Euterpe oleracea* Mart.) and black carrot (*Daucus carota* L.). *Fruits*, *66*(3), 203-215.