سازوکارهای احتمالی تأثیر اسید سالیسیلیک بر کاهش سرمازدگی پس از برداشت میوه گوجه فرنگی

مرتضی سلیمانی اقدم[۱،*]، محمد رضا اصغری[۲]، اروجعلی خرسندی[۱]، هانیه مراد بیگی[۳]، نیر محمدخانی[۳]، مهدی مهیجی[۴] و محمد باقر حسن پور اقدم[۵]

[۱] اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اهر، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان

[۲] ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده کشاورزی، گروه علوم باغبانی

[۳] ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

[۴] تبریز، دانشگاه تبریز، دانشکده کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات

[۵] مراغه، دانشگاه مراغه، دانشکده کشاورزی، گروه علوم باغبانی

تاریخ دریافت: ۹۰/۵/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۰/۹/۲۱

چکیده

نگهداری گوجه فرنگی در دمای زیر ۱۲ درجه سانتی‌گراد منجر به ایجاد آسیب سرمازدگی و کاهش کیفیت و عمر انبارمانی میوه می گردد. در این تحقیق تأثیر تیمار پس از برداشت اسید سالیسیلیک در غلظت‌های صفر (شاهد)، یک و دو میلی مولار بر شاخص سرمازدگی و نشت یونی، فعالیت آنزیم‌های فسفولیپاز D، لیپوکسیژناز و فنیل آلانین آمونیالیاز و میزان فنل کل، مالون دی آلدئید و پرولین میوه گوجه فرنگی در طول سه هفته نگهداری در دمای یک درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت. بیشترین کاهش در میزان نشت یونی و میزان مالون دی آلدئید و همچنین افزایش میزان پرولین در میوه‌های تیمار شده با غلظت یک میلی مولار اسید سالیسیلیک مشاهده گردید ولی باوجوداین بیشترین کاهش در شاخص سرمازدگی در میوه‌های تیمار شده با غلظت دو میلی مولار اسید سالیسیلیک مشاهده شد. میزان فعالیت آنزیم‌های فسفولیپاز D و لیپوکسیژناز در طول دوره نگهداری در دمای سرمازدگی افزایش پیدا کرد که نشان‌دهنده افزایش تخریب غشای سلولی میوه‌ها بود. تیمار اسید سالیسیلیک با کاهش معنی‌دار فعالیت این آنزیم‌ها در طول دوره نگهداری در دمای سرمازدگی منجر به افزایش انسجام غشای سلولی گردید. فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز در میوه‌های گوجه فرنگی تیمار شده با اسید سالیسیلیک به طور معنی‌داری کاهش یافت اما تغییر معنی‌داری در میزان فنل کل میوه گوجه فرنگی مشاهده نشد. نتایج بدست آمده از این تحقیق نشان داد که تیمار اسید سالیسیلیک با افزایش انسجام غشای سلولی از طریق کاهش فعالیت آنزیم‌های فسفولیپاز D و لیپوکسیژناز، افزایش میزان پرولین و کاهش میزان مالون دی آلدئید و نشت یونی موجب افزایش مقاومت میوه گوجه فرنگی به سرمازدگی پس از برداشت گردید.

واژه‌های کلیدی: اسید سالیسیلیک، سرمازدگی، گوجه فرنگی، پرولین، فسفولیپاز D، لیپوکسیژناز

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۴۷۵۹۸۷۹۵، پست الکترونیکی: aghdam29176@yahoo.com

مقدمه

یکی از مشکلات اصلی محصولات گرمسیری و نیمه گرمسیری در دوره پس از برداشت حساسیت آنها به دمای پایین می‌باشد که منجر به ایجاد آسیب سرمازدگی می‌شود. آسیب سرمازدگی انبارمانی این محصولات را محدود کرده و منجر به کاهش معنی‌داری در کیفیت محصول می‌گردد. میوه گوجه فرنگی حساسیت بالایی به سرمازدگی داشته و

نگهداری آن در دمای زیر ۱۲ درجه سانتی‌گراد موجب ایجاد سرمازدگی می‌شود (۴۳). غشای سلولی اولین حسگر سرما در سلول بوده و اولین مکان برای توسعه آسیب سرمازدگی می‌باشد. غشاهای سلولی در بافت‌های محصولات باغبانی دارای آسیب سرمازدگی تحت انتقال فاز از مایع کریستالی انعطاف‌پذیر به ساختار ژلی جامد قرار می‌گیرند (۱۶). فسفولیپاز D (PLD) مهمترین آنزیم در هیدرولیز فسفولیپیدهای غشا می‌باشد (۲۵). لیپوکسیژناز (LOX) پراکسیداسیون لیپیدهای غشای سلولی را افزایش داده و سیالیت غشا را تغییر می‌دهد که تأثیر مستقیم بر انسجام و نفوذپذیری غشای سلولی دارد (۳۹). پیشنهاد شده است که PLD و LOX آغازگر تجزیه غشای سلولی در طول پیری و تنش سرمازدگی می‌باشند (۲۳،۲۲). افزایش در فعالیت PLD و LOX در پاسخ به تنش سرمازدگی در ذرت نیز گزارش شده است (۲۶). کاهش فعالیت آنزیمی یا سطح بیان ژن فسفولیپاز D برای حفظ کیفیت و کاهش سرمازدگی پس از برداشت محصولات باغبانی از طریق افزایش انسجام غشای سلولی به‌عنوان یک تکنولوژی نو ظهور در دنیا در حال گسترش می‌باشد (۲۴).

اسید سالیسیلیک به‌عنوان یک مولکول سیگنالی درونی نقش بسیار مهمی در رشد و نمو گیاهان و پاسخ به تنش‌های محیطی بازی می‌کند (۱ و ۲). اسید سالیسیلیک از طریق سازوکارهای مختلفی مانند افزایش بیان ژن اکسیداز جانشین (AOX) به‌عنوان یک آنزیم آنتی‌اکسیدان در میوه گوجه فرنگی (۱۱)، افزایش فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز (APX) و گلوتاتیون ردوکتاز (GR) و افزایش نسبت آسکوربات به دهیدروآسکوربات (AsA/DHAsA) و گلوتاتیون احیا شده به اکسید شده (GSH/GSSG) در میوه هلو (۳۶)، کاهش فعالیت آنزیم PAL در میوه انار (۳۱ و ۳) و افزایش بیان پروتئین‌های شوک حرارتی (HSPs) در میوه گوجه فرنگی (۸) و میوه هلو شده (۳۶) و مقاومت محصولات باغبانی به سرمازدگی را افزایش می‌دهد.

در این تحقیق تأثیر تیمار پس از برداشت اسید سالیسیلیک بر شاخص سرمازدگی و میزان نشت یونی، فعالیت آنزیم‌های PLD ، LOX و PAL و میزان مالون دی آلدئید (MDA) و همچنین بر میزان پرولین و فنل کل میوه گوجه فرنگی در طول سه هفته نگهداری در دمای سرمازدگی یک درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

تهیه میوه‌ها و تیمار با اسید سالیسیلیک: میوه‌های گلخانه‌ای گوجه فرنگی رقم نیوتن که در دمای ۳۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد روز و ۲۵-۲۰ درجه سانتی‌گراد شب و رطوب ۵۵ درصد رشد کرده بودند در مرحله سبز بالغ برداشت شده و بلافاصله به آزمایشگاه منتقل گردیدند. میوه‌های دارای آسیب فیزیکی حذف گردید و میوه‌های یکنواخت از لحاظ شکل و رنگ برای انجام تیمار انتخاب گردیدند. تعداد ۲۷۰ عدد میوه انتخاب و به سه دسته مجزای نودتایی در سه تکرار که هر کدام ۳۰ میوه داشتند تقسیم و تیمارهای شاهد و اسید سالیسیلیک در غلظت‌های یک و دو میلی مولار انجام شد. برای هر تیمار و تکرار میوه‌ها داخل محلول تازه با غلظت‌های اشاره شده از اسید سالیسیلیک به مدت ۵ دقیقه غوطه‌ور شدند. برای تیمار شاهد از آب مقطر استفاده شد. میوه‌ها قبل از نگهداری در انبار ۱ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۹۰-۸۵ درصد به مدت سه ساعت در دمای آزمایشگاه هوادهی و خشک شدند. پس از یک، دو و سه هفته تعداد ۱۰ میوه از هر تیمار و تکرار به صورت تصادفی انتخاب و ۵ عدد میوه برای ارزیابی شاخص سرمازدگی ۳ روز در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد قرار گرفتند و ۵ عدد میوه دیگر برای انجام آنالیزهای زیر به آزمایشگاه منتقل گردیدند.

فاکتورهای مورد بررسی

شاخص سرمازدگی: برای اندازه‌گیری شاخص سرمازدگی در هر زمان نمونه‌برداری ۵ میوه به صورت تصادفی از هر

تیمار و تکرار انتخاب گردید و به دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد آزمایشگاه به مدت ۳ روز منتقل گردیدند تا میزان شاخص سرمازدگی میوه براساس میزان فرورفتگی سطحی میوه که مهمترین علامت سرمازدگی در میوه گوجه فرنگی می‌باشد (۹) مورد ارزیابی قرار گیرد. شاخص سرمازدگی براساس میزان سطحی از میوه که فرورفتگی سطحی را نشان داده مورد نمره‌دهی قرار گرفت، بدین صورت که اگر فرورفتگی سطحی مشاهده نشد (صفر)، در صورت مشاهده فرورفتگی سطحی در کمتر از ۲۵ درصد سطح میوه نمره ی ۱ (یک)، در صورت مشاهده فرورفتگی سطحی بین ۲۵ تا ۵۰ درصد سطح میوه نمره ی ۲ (دو) و مشاهده فرورفتگی سطحی بین ۵۰ تا ۷۵ درصد سطح میوه نمره ی۳ (سه) و بیش از ۷۵ درصد فرورفتگی میوه نمره ی ۴ (چهار) داده شد و بعد با استفاده از فرمول زیر شاخص سرمازدگی ارزیابی گردید.

۴ × تعداد کل میوه / (تعداد میوه دارای علائم سرمازدگی × سطح (نمره ی مربوطه))∑)= شاخص سرمازدگی

نشت یونی، میزان پرولین، مالون دی آلدئید و فنل کل: نشت یونی طبق روش توصیف شده توسط زائو و همکاران (۴۳) مورد ارزیابی قرار گرفت. ضخامت ۳ میلی‌متر از مزوکارپ بخش استوایی میوه جدا گردید و در داخل محلول یک دهم مولار مانیتول قرار گرفت و با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه به مدت دو ساعت به هم زده شد. هدایت الکتریکی محلول (L1) اندازه گیری شد. محلول سپس به مدت ۱۰ دقیقه جوشیده شد و بعد در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد سرد گردید و هدایت الکتریکی آن (L2) اندازه گیری شد. نشت یونی براساس نسبت L1 به L2 و براساس درصد بیان گردید. میزان پرولین براساس روش توصیف شده توسط زانگ و همکاران (۲۰۱۰) مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج به صورت میکروگرم بر گرم وزن تر میوه بیان گردید. MDA براساس روش تیوباربیتوریک اسید که توسط زائو و همکاران (۴۳) توصیف شده است اندازه‌گیری گردید و براساس میکرومول بر گرم وزن تر میوه بیان شد. میزان فنل کل براساس روش چن و همکاران (۶) اندازه‌گیری گردید و براساس میزان اسید گالیک در میلی‌گرم به ازای هر گرم وزن تر میوه با رسم منحنی استاندارد اسید گالیک بیان گردید.

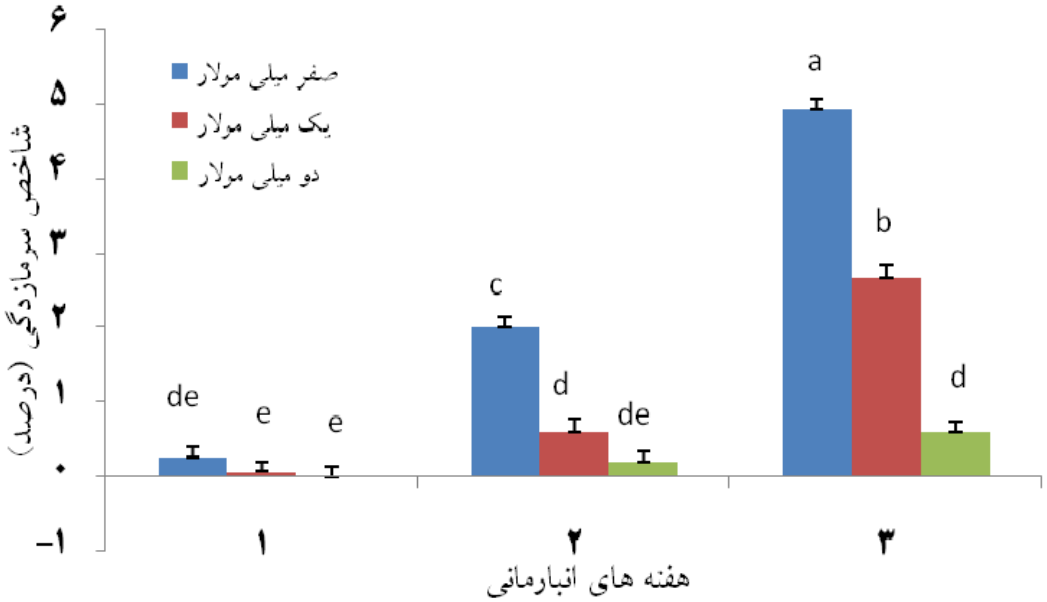
فعالیت آنزیم‌های فسفولیپاز D، لیپوکسیژناز و فنیل آلانین آمونیالیاز: فعالیت آنزیم PLD و LOX طبق روش ریو و همکاران (۲۸) اندازه‌گیری گردید و براساس واحد آنزیمی بیان شد. طبق تعریف یک واحد آنزیمی از آنزیم PLD به مقداری از آنزیم گفته می‌شود که توانایی تولید یک نانو مول دی نیتروفنول را در یک ساعت داشته باشد. طبق تعریف یک واحد آنزیمی از آنزیم LOX به مقداری از آنزیم گفته می‌شود که باعث افزایش جذب در یک صدم دقیقه در طول موج ۲۳۴ نانومتر و ۲۵ درجه سانتی‌گراد را زمانی که لینولئیک اسید به‌عنوان سوبسترا اضافه می‌گردد داشته باشد. فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز با روش گالوز و همکاران (۱۲) اندازه‌گیری گردید. فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز با تولید سینامات تعیین گردید. میزان تولید سینامات با اندازه‌گیری جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر انجام شد. فعالیت آنزیم براساس میکروومول سینامات در ساعت با رسم منحنی استاندارد اسید سینامیک بیان گردید.

تجزیه آماری داده‌ها: این آزمایش به صورت کرت‌های خردشده در زمان بر پایه طرح کاملا تصادفی با فاکتور اصلی، غلظت اسید سالیسیلیک در سه سطح (۰، ۱ و ۲ میلی مولار) و فاکتور فرعی زمان در سه سطح (سه هفته طول دوره انبارمانی گوجه فرنگی) با سه تکرار انجام گردید. تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام شد و نتایج تجزیه واریانس در جدول ۱ ارائه گردیده است. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد

انجام گردید. تمامی نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel رسم شدند.

نتایج و بحث

شاخص سرمازدگی و نشت یونی: نتایج این تحقیق نشان داد که اسید سالیسیلیک تأثیر معنی‌داری در کاهش شاخص سرمازدگی میوه گوجه فرنگی در طول دوره انبارمانی داشت ($P < 0.01$، نمودار ۱).



نمودار ۱- شاخص سرمازدگی در میوه گوجه فرنگی در طول سه هفته نگهداری در دمای سرمازدگی تحت تأثیر سطوح اسید سالیسیلیک

جدول ۱- تجزیه واریانس تأثیر اسید سالیسیلیک بر سرمازدگی پس از برداشت میوه گوجه فرنگی

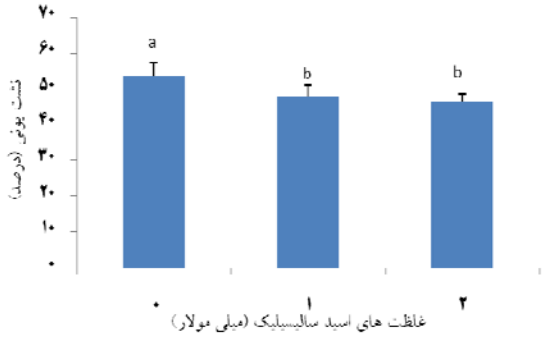
منبع تغییرات	درجه آزادی	شاخص سرمازدگی	نشت یونی	لون دی آلدئید	پرولین	فنل کل	PAL	PLD	LOX
زمان نمونه‌برداری	۲	۱۶,۱۸۸**	۱۸۹,۴۶**	۶۰,۱۰۱*	۲,۵۶ ns	۱۰۷۲,۰۰۵*	۱۳,۴۴۶*	۷,۹۹۲×۱۰$^{-۴}$ **	۸,۲۷×۱۰$^{-۳}$ **
غلظت SA	۲	۱۰,۳۸۸**	۱۳۱,۵۲۵**	۶۴,۱۷۵*	۲۲,۹۹۴**	۶۰۶۳۲۹۳ns	۱۳,۹۳۱*	.۰۱۴**	۳,۰۴۲×۱۰$^{-۲}$ **
زمان × غلظت	۴	۳,۲۲۱**	۷۲,۹۱ns	۱۳,۵۷ ns	۲,۵۳۲ ns	۴۶۳,۱۲۹ ns	۲,۲۰۹ ns	۲,۱×۱۰$^{-۴}$ **	۱,۲۲۴×۱۰$^{-۳}$ **

* و ** به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک در صد

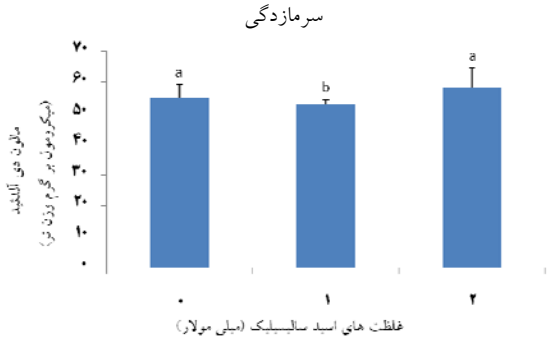
همچنین اسید سالیسیلیک به طور معنی‌داری موجب کاهش نشت یونی در میوه گوجه فرنگی شد ولی تفاوت معنی‌داری در بین دو غلظت یک و دو میلی مولار بکار رفته در این تحقیق مشاهده نشد ($P < 0.01$، نمودار ۲). سیاری و همکاران (۳۰) تأثیر تیمار استیل سالیسیلیک اسید (ASA) بر روی سرمازدگی پس از برداشت میوه انار را بررسی نموده و نشان دادند که میوه‌های تیمار شده با ASA به طور معنی‌داری درصد سرمازدگی و نشت یونی کمتری داشتند. به طور کلی آسیب سرمازدگی ابتدا در غشای سلولی همراه با تغییر در ترکیب اسیدهای چرب فسفولیپیدها اتفاق می‌افتد و بعد آسیب غشایی موجب شروع آبشاری از واکنش‌های ثانویه می‌گردد که منجر به تخریب ساختار سلولی می‌شود. این آسیب غشایی می‌تواند بوسیله نشت یونی مورد برآورد قرار بگیرد (۱۹). سیاری و

همکاران (۳۰) نشان دادند که ASA با کاهش میزان نشت یونی همراه با افزایش سفتی و کاهش سرعت تنفس میوه‌ها موجب کاهش سرمازدگی گردید. نتایج گزارش شده بوسیله سیاری و همکاران (۳۰) نقش ASA در حفظ انسجام غشای سلول را نشان می‌دهد، نقشی که توسط چای و همکاران (۳) نیز به آن اشاره شده بود. در تحقیق دیگری سیاری و همکاران (۳۱) تأثیر تیمار اسید سالیسیلیک را بر فعالیت آنزیم PAL و میزان سرمازدگی میوه انار بررسی کردند. نتایج این تحقیق نشان داد که اسید سالسیلیک در غلظت ۲ میلی مولار موجب کاهش فعالیت آنزیم PAL و شاخص سرمازدگی و نشت یونی میوه گردید.

میزان مالون دی آلدئید: نتایج این تحقیق نشان داد که غلظت یک میلی مولار اسید سالیسیلیک موجب کاهش معنی‌داری در میزان MDA میوه گوجه فرنگی گردید ($P < 0.05$) ولی تفاوت معنی‌داری در میزان MDA بین میوه‌های تیمار شده با اسید سالیسیلیک ۲ میلی مولار و میوه‌های تیمار شاهد مشاهده نگردید (نمودار ۳). وانگ و همکاران (۳۶) گزارش کردند که اسید سالیسیلیک در غلظت ۱ میلی مولار در میوه‌های هلو به طور معنی‌داری موجب حفظ سفتی و کاهش سرمازدگی، پوسیدگی و محتوای MDA شده است.



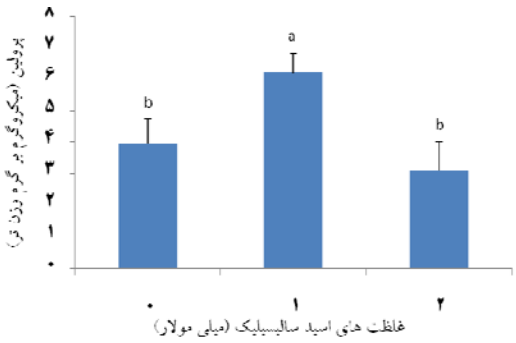
نمودار ۲- تأثیر سطوح اسید سالیسیلیک بر درصد نشت یونی در میوه گوجه فرنگی تحت تیمار سرمازدگی



نمودار ۳- تأثیر سطوح اسید سالیسیلیک بر روی میزان مالون دی آلدئید در میوه گوجه فرنگی تحت تیمار سرمازدگی

حفظ انسجام غشای سلولی در دمای پایین عامل مهمی در مقاومت به سرمازدگی در محصولات باغبانی می‌باشد (۳۸). نشت یونی و محتوای MDA به‌عنوان شاخص‌های آسیب غشایی برای اندازه‌گیری غیرمستقیم انسجام غشای سلولی مورد توجه قرار گرفته‌اند و می‌توانند کاهش انسجام غشای سلولی و وقوع آسیب سرمازدگی را در محصولات باغبانی نشان دهند (۳۲). پراکسیداسیون لیپیدهای غشای سلولی با تجمع MDA موجب ایجاد آسیب سرمازدگی در محصولات باغبانی می‌گردد و تیمار اسید سالیسیلیک با کاهش تجمع MDA می‌تواند آسیب سرمازدگی را کاهش دهد (۱). هادگ و همکاران (۱۴) بیان کردند که MDA محصول نهایی اکسیداسیون اسیدهای چرب می‌باشد و می‌تواند به‌عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپید غشای سلولی که در اثر تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) بوجود می‌آید مورد توجه قرار گیرد.

میزان پرولین: نتایج این تحقیق نشان داد که غلظت یک میلی مولار اسید سالیسیلیک موجب افزایش معنی‌داری در میزان پرولین میوه گوجه فرنگی گردید ($P < 0.01$، نمودار ۴). پیشنهاد شده که تجمع پرولین به‌عنوان یک سازوکار مقاومت در برابر تنش سرمازدگی در گیاهان مطرح می‌باشد (۴۱). در گیاهان پرولین تجمع یافته در پاسخ به تنش سرمازدگی نقش مهمی در سمیت‌زدایی ROS و حفظ انسجام غشای سلولی ایفا می‌کند (۴۱).



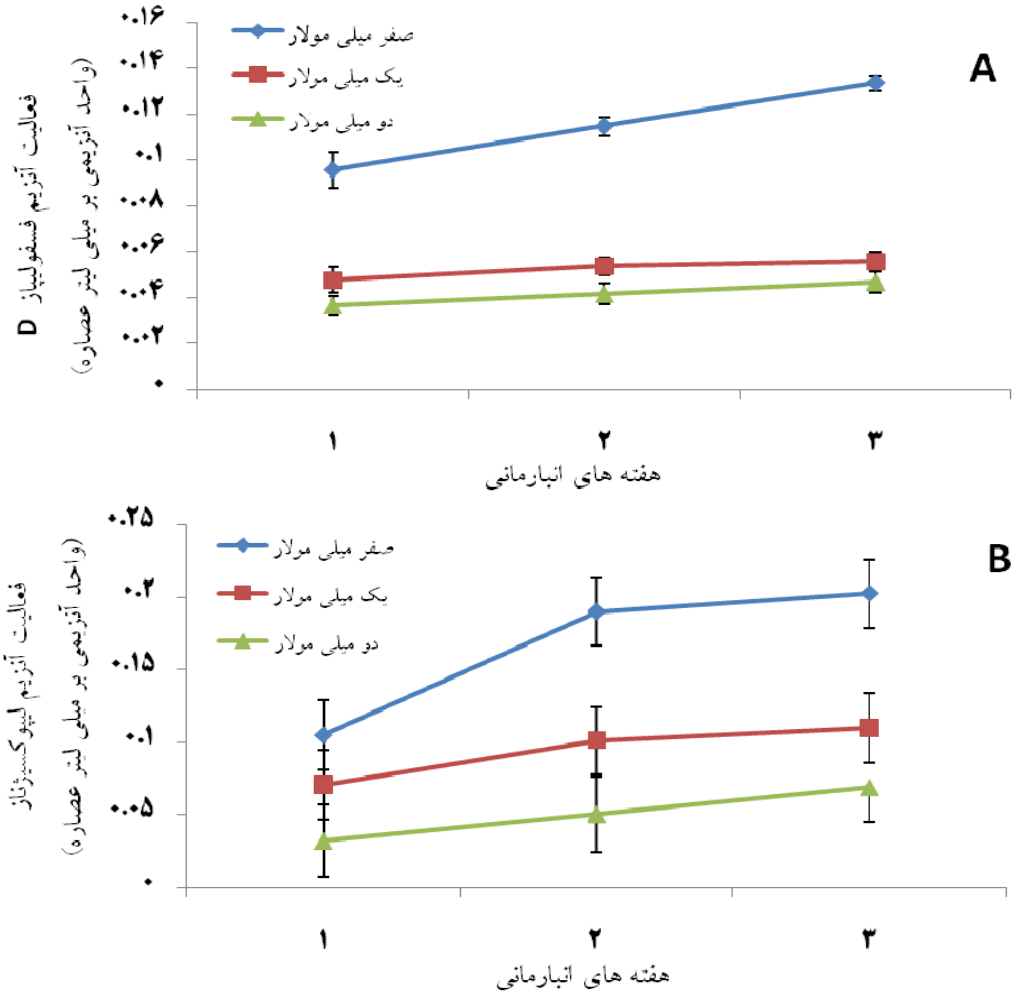
نمودار ۴- تأثیر سطوح اسید سالیسیلیک بر روی میزان پرولین در میوه گوجه فرنگی تحت تیمار سرمازدگی

افزایش محتوای پرولین همبستگی مثبتی با افزایش مقاومت به سرمازدگی پس از برداشت در میوه‌های گریپ فروت (۲۷) و گوجه فرنگی (۴۳) نشان داده است. در گیاهان پرولین از طریق گلوتامات یا اورنیتین و با فعالیت آنزیم‌های پیرولین-۵-کربوکسیلات سنتتاز (P5CS) و یا اورنیتین آمینوترانسفراز (OAT) سنتز می‌گردد. میزان تجمع پرولین همچنان به تجزیه شدن بوسیله آنزیم پرولین دهیدروژناز (PDH) بستگی دارد. فابرو و همکاران (۱۱) گزارش کردند که اسید سالیسیلیک از طریق فعالسازی P5CS2 می‌تواند منجر به افزایش بیوسنتز و تجمع پرولین گردد. افزایش میزان پرولین در محصولات باغبانی در اثر تیمارهای پس از برداشت می‌تواند منجر به افزایش مقاومت به سرمازدگی گردد. شانگ و همکاران (۳۳) گزارش کردند که تیمار پس از برداشت میوه هلو با گاما آمینو بوتیریک اسید (GABA) موجب افزایش فعالیت OAT و P5CS و کاهش فعالیت PDH در میوه هلو و افزایش معنی‌داری در میزان پرولین می‌گردد. چون میوه‌های تیمار شده با GABA مقاومت بالایی به سرمازدگی نشان می‌دادند و در آنها میزان قهوه‌ای شدن درونی کاهش معنی‌داری یافته بود. شانگ و همکاران (۳۳) نتیجه‌گیری کردند که افزایش مقاومت به سرمازدگی در اثر افزایش میزان پرولین بوده است. آرژیناز هیدرولیز آرژینین به اورنیتین و اوره کاتالیز می‌کند (۲۰). افزایش در فعالیت آرژیناز می‌تواند از طریق مسیر آرژیناز/اورنیتین دکربوکسیلاز (ODC) منجر به افزایش بیوسنتز پلی‌آمین‌ها گردد و یا اینکه از طریق مسیر آرژیناز/OAT بیوسنتز پرولین را تحریک کند. زانگ و همکاران (۴۲) تأثیر تیمار پس از برداشت آرژینین بر روی مقاومت به سرمازدگی میوه گوجه فرنگی را بررسی نموده و بیان کردند که میزان نشت یونی و MDA و در نتیجه میزان سرمازدگی میوه‌های تیمار شده با آرژینین به طور معنی‌داری کاهش یافته است. این محققان همچنین بیان نمودند که فعالیت آنزیم آرژیناز در میوه‌های تیمار شده افزایش یافته و از طریق مسیر آرژیناز/OAT منجر به افزایش میزان پرولین در میوه‌های گوجه فرنگی می‌گردد. نتایج این تحقیق با نتایج شانگ و همکاران (۳۳) و زانگ و همکاران (۴۲) همخوانی دارد که نشان دادند افزایش میزان پرولین نقش بسیار مهمی در مقاومت محصولات باغبانی به سرمازدگی پس از برداشت دارد.

فعالیت آنزیم فسفولیپاز D و لیپوکسیژناز: نتایج این تحقیق نشان داد که فعالیت آنزیم‌های PLD و LOX در طول دوره نگهداری میوه گوجه فرنگی در دمای سرمازدگی افزایش یافت که نشان‌دهنده فعال شدن آبشار لیپولیتیک غشایی در پاسخ به سرمازدگی می‌باشد. روند افزایشی فعالیت PLD و LOX در طول دوره سرمازدگی میوه گوجه فرنگی در اثر تیمار اسید سالیسیلیک به طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد ($P < 0.01$، نمودار ۵). براساس بررسی منابع انجام شده تاکنون گزارشی مبنی بر تأثیر تیمار اسید سالیسیلیک در کنترل سرمازدگی پس از برداشت میوه گوجه فرنگی از طریق کنترل فعالیت آنزیم PLD وجود ندارد.

غشای سلولی اولین حسگر سرما در سلول بوده و اولین مکان برای توسعه آسیب سرمازدگی می‌باشد. غشاهای سلولی در بافت‌های محصولات باغبانی دارای آسیب سرمازدگی تحت انتقال فاز از مایع کریستالی انعطاف‌پذیر به ساختار ژلی جامد قرار می‌گیرند (۱۶). در طول پیری و

سرمازدگی تخریب لیپیدهای غشایی با فعالیت آنزیم‌های لیپولیتیک غشایی مانند PLD و LOX همراه می‌باشد (۲۶). PLD و LOX با پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع غشایی عامل اصلی تخریب غشا در طول دوره سرمازدگی می‌باشند (۲۶ و ۳۹). مائو و همکاران (۱۷) بیان کردند که توسعه سرمازدگی در میوه خیار با افزایش فعالیت PLD و LOX در دمای سرمازدگی همراه می‌باشد و تیمار گرمایی مقاومت به سرمازدگی را در میوه خیار با کاهش فعالیت PLD و LOX افزایش می‌دهد.



نمودار ۵- فعالیت PLD (A) و LOX (B) در طول سه هفته نگهداری در دمای سرمازدگی تحت تأثیر سطوح اسید سالیسیلیک

این نتایج پیشنهاد می‌کند که آنزیم‌های PLD و LOX با آغاز آسیب سرمازدگی بوسیله تخریب غشا و مسیر سیگنال‌دهی در پاسخ به دمای سرمازدگی همراه می‌باشند. ریو و همکاران (۲۸) گزارش نمودند که در میوه لاکوآت فعالیت آنزیم‌های PLD و LOX در پاسخ به تنش سرمازدگی افزایش می‌یابد و کاهش قهوه‌ای شدن درونی (IB) که از علائم اصلی سرمازدگی در میوه لاکوآت می‌باشد در اثر تیمار گرمایی همراه با کاهش فعالیت PLD و LOX و همچنین کاهش نشت یونی و میزان MDA می‌باشد.

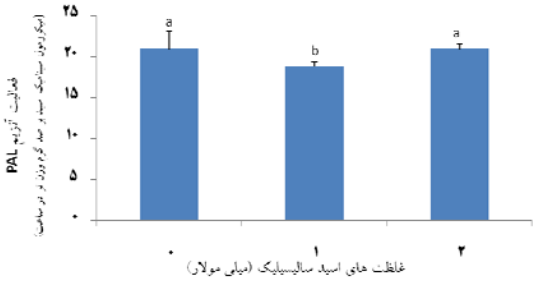
چائو و همکاران (۴) تأثیر تیمار گرمایی را در ترکیب با اسید سالیسیلیک بر قهوه‌ای شدن درونی میوه هلو را که یکی از علائم سرمازدگی در این میوه می‌باشد بررسی

نموده و گزارش کردند که ترکیب تیمار گرمایی با اسید سالیسیلیک در مقایسه با هریک از تیمارها به تنهایی تأثیر بیشتری در کنترل قهوه‌ای شدن درونی میوه هلو دارد. این محققان همچنین بیان نمودند که فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان SOD، CAT، APX و GR در اثر تیمار ترکیبی افزایش یافته، درحالی‌که فعالیت آنزیم LOX کاهش یافته است. میزان پلی آمین‌های پوترسین، اسپرمیدین و اسپرمین در میوه‌های هلوی تیمار شده با گرما در ترکیب با اسید سالیسیلیک نسبت به هریک از تیمارها به تنهایی افزایش بیشتری نشان دادند. سرمازدگی محصولات باغبانی به‌عنوان یک تنش اکسیداتیو با تولید ROSها مانند رادیکال سوپراکسید و پراکسید هیدروژن همراه می‌باشد (۱۶). حفاظت سلول‌ها از خسارت اکسیداتیو تحت شرایط سرمازدگی به فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان بستگی دارد (۴۰). چائو و همکاران (۴) بیان نمودند که تیمار گرمایی در ترکیب با اسید سالیسیلیک فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان SOD، CAT، APX و GR را در سطح بالا و فعالیت LOX را در سطح پایین حفظ می‌کند. LOX به‌عنوان آنزیم مسئول برای تولید رادیکال سوپراکسید شناخته می‌شود (۳۴). رادیکال سوپراکسید می‌تواند بوسیله آنزیم SOD به پراکسید هیدروژن تبدیل شود. تجزیه پراکسید هیدروژن بر عهده آنزیم‌های CAT، APX و GR می‌باشد (۱۸). سطوح بالای SOD و سطوح پایین LOX در میوه‌های هلوی تیمار شده با گرما در ترکیب با اسید سالیسیلیک می‌تواند سطوح رادیکال سوپراکسید را پایین نگه دارد، درحالی که افزایش فعالیت CAT، APX و GR در تیمار ترکیبی سطوح پراکسید هیدروژن را کاهش می‌دهد. چائو و همکاران (۴) نتیجه‌گیری کردند که تیمار گرما در ترکیب با اسید سالیسیلیک با تقویت سیستم آنتی اکسیدانی موجب کاهش سرمازدگی در میوه هلو می‌گردد. نتایج این تحقیق با نتایج چائو و همکاران (۴) در مورد تأثیر تیمار اسید سالیسیلیک بر فعالیت آنزیم LOX در مورد کاهش خسارت سرمازدگی همخوانی کاملی دارد.

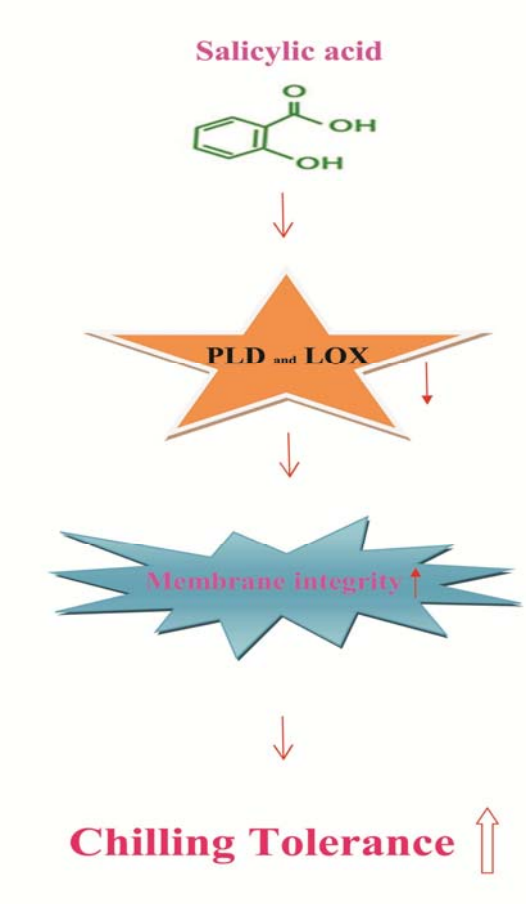
چائو و همکاران (۵) تأثیر تیمار 1-MCP بر سرمازدگی میوه لاکوآت را بررسی نموده و بیان کردند که تیمار 1-MCP به طور معنی‌داری میزان سرمازدگی را در میوه لاکوآت کاهش می‌دهد. تیمار 1-MCP از تجمع مالون دی آلدئید، رادیکال سوپر اکسید و پراکسید هیدروژن و افزایش نشت یونی جلوگیری می‌کند. علاوه بر این میوه‌های تیمار شده با 1-MCP دارای فعالیت بالای CAT و فعالیت پایین LOX و PLD و فسفولیپاز C (PLC) بودند. این نتایج پیشنهاد می‌کنند که LOX، PLD و PLC عامل اصلی آسیب سرمازدگی می‌باشند و تأثیر 1-MCP در کاهش سرمازدگی ممکن است مربوط به کاهش فعالیت این آنزیم‌ها باشد. 1-MCP با کاهش تولید رادیکال سوپر اکسید از طریق کاهش فعالیت LOX و افزایش تجزیه پراکسید هیدروژن از طریق افزایش فعالیت CAT باعث کاهش تنش اکسیداتیو در میوه لاکوآت می‌گردد (۵). نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که فعالیت فسفولیپازها مانند PLD و PLC عامل اصلی در تخریب غشای سلولی محصولات باغبانی در دمای سرمازدگی می‌باشد و هر تیمار پس از برداشت که بتواند فعالیت این آنزیم‌ها را کاهش دهد می‌تواند به‌عنوان یک ابزار قدرتمند برای کاهش سرمازدگی مورد استفاده قرار بگیرد و نتایج بدست‌آمده در این تحقیق گواهی بر این مدعاست.

فعالیت آنزیم PAL : PAL به‌عنوان آنزیم کلیدی در متابولیسم فنیل پروپانوئید تبدیل فنیل آلانین به ترانس سینامیک اسید را کاتالیز می‌نماید که اولین مرحله در بیوسنتز فنیل پروپانوئیدها بوده و منجر به تولید متابولیت‌های ثانویه مانند لیگنین، فیتوالکسین‌ها و فلاونوئیدها می‌گردد. در واقع PAL به‌عنوان آنزیم حدواسط متابولیسم اولیه (مسیر اسید شیکمیک) و متابولیسم ثانویه (مسیر فنیل پروپانوئید) محسوب می‌گردد (۱۰ و ۳۵). در حالت کلی افزایش فعالیت PAL در میوه‌های نگهداری شده در دمای سرمازدگی به‌عنوان یک سازوکار برای کاهش اثرات سرمازگی پذیرفته شده است

(۱۵) و تیمار گرمایی با افزایش فعالیت PAL موجب کاهش سرمازدگی در میوه موز می‌گردد (۶). به‌هرحال نتایج این آزمایش نشان می‌دهد که تیمار اسید سالیسیلیک موجب کاهش فعالیت آنزیم PAL در میوه گوجه فرنگی می‌گردد ($P < 0.05$، نمودار ۶). این نتایج با یافته‌های چای و همکاران (۳)، دانگچام و همکاران (۷) و سیاری و همکاران (۳۱) همخوانی دارد. سیاری و همکاران (۳۱) تأثیر تیمار اسید سالیسیلیک را بر فعالیت آنزیم PAL و میزان سرمازدگی میوه انار بررسی کرده و نشان دادند که اسید سالسیلیک در غلظت ۲ میلی مولار موجب کاهش شاخص سرمازدگی و نشت یونی میوه می‌گردد. فعالیت آنزیم PAL در طول دوره انبارمانی افزایش می‌یابد ولی تیمار اسید سالیسیلیک موجب کاهش فعالیت این آنزیم می‌گردد. چای و همکاران (۳) نشان دادند که تیمار پس از برداشت میوه لاکوآت با ASA می‌تواند سرمازدگی را از طریق جلوگیری از تجمع رادیکال آزاد سوپراکسید و کاهش فعالیت آنزیم‌های PAL و سینامیل الکل دهیدروژناز (CAD) و گایاکول پراکسیداز (GOX) کاهش دهد. نگوین و همکاران (۲۱) گزارش کردند که تیمار بسته‌بندی با اتمسفر تغییریافته میزان سرمازدگی و فعالیت آنزیم PAL را در میوه موز کاهش می‌دهد و سانچز-بالستا و همکاران (۲۹) گزارش کردند که تیمار گرمایی از آسیب سرمازدگی و افزایش فعالیت PAL که به طور معمول در نارنگی‌های فورتن نگهداری شده در دمای پایین دیده می‌شود جلوگیری می‌کند. کاهش فعالیت آنزیم PAL در میوه گوجه فرنگی در اثر تیمار اسید سالیسیلیک پیشنهاد می‌کند که افزایش انسجام غشای سلولی در اثر کاهش فعالیت آنزیم‌های PLD و LOX که در تیمار اسید سالیسیلیک مشاهده شده است نقش مهمتری در مقایسه با فعالیت آنزیم PAL در ایجاد مقاومت به سرمازدگی در میوه‌های گوجه فرنگی تیمار شده با اسید سالیسیلیک بازی می‌کند.



نمودار ۶- تأثیر سطوح اسید سالیسیلیک بر روی فعالیت آنزیم PAL در میوه گوجه فرنگی تحت تیمار سرمازدگی



شکل ۱- سازوکار پیشنهادی تأثیر اسید سالیسیلیک در کاهش سرمازدگی میوه گوجه فرنگی

نتیجه‌گیری کلی

براساس نتایج این تحقیق می‌توان بیان کرد که اسید سالیسیلیک می‌تواند به‌عنوان یک تکنولوژی پس از برداشت توانمند برای کاهش آسیب سرمازدگی در میوه گوجه فرنگی مورد استفاده قرار گیرد. تأثیر تیمار اسید

سالیسیلیک در کاهش آسیب سرمازدگی در میوه گوجه فرنگی می‌تواند به افزایش انسجام غشای سلولی در اثر کاهش فعالیت آنزیم‌های PLD و LOX و کاهش پراکسیداسیون غشای سلولی مربوط باشد که با کاهش میزان نشت یونی و مالون دی آلدئید همراه می‌باشد. افزایش میزان پرولین در میوه‌های تیمار شده با اسید سالیسیلیک نیز می‌تواند دلیلی بر افزایش مقاومت به سرمازدگی در میوه‌ها باشد. سازوکار پیشنهادی در شکل شماتیکی ۱ نشان داده شده است. نتایج این تحقیق نشان داد که نقش انسجام غشای سلولی در مقاومت به سرمازدگی بیشتر از متابولیسم فنیل پروپانوئید، فعالیت آنزیم PAL و تجمع فنل کل در میوه‌های گوجه فرنگی تیمار شده با اسید سالیسیلیک می‌باشد.

سپاسگزاری

این تحقیق براساس طرح پژوهشی باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر انجام گردیده است و لازم است تا از ریاست و معاون محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر و ریاست محترم باشگاه پژوهشگران جوان آن واحد نهایت تشکر و قدردانی را داشته باشیم.

منابع

1. Asgharia MR and Aghdam MS, 2010. Impact of salicylic acid on post-harvest physiology of horticultural crops. Trends in Food Science and Technology, 21:502-509.
2. Babalar M, Asghari M, Talaei A and Khosroshahi A, 2007. Effect of pre- and postharvest salicylic acid treatment on ethylene production, fungal decay and overall quality of Selva strawberry fruit. Food chemistry, 105: 449-453.
3. Cai C, Li X and Chen K, 2006. Acetyl salicylic acid alleviates chilling injury of postharvest loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) fruit. Eur. Food Res. Technol, 223: 533–539.
4. Cao S, Hu Z, Zheng Y and Lu B, 2010. Synergistic effect of heat treatment and salicylic acid on alleviating internal browning in cold-stored peach fruit. Postharvest Biology and Technology, 58: 93–97.
5. Cao S, Zheng Y, Wang K, Rui H and Tang S, 2009. Effects of 1-methylcyclopropene on oxidative damage, phospholipases and chilling injury in loquat fruit. J Sci Food Agric, 89: 2214–2220.
6. Chen JY, He LH, Jiang YM, Wang Y, Joyce DC, Ji ZL and Lu WJ, 2008. Role of phenylalanine ammonia-lyase in heat pretreatment-induced chilling tolerance in banana fruit. Physiol. Plant, 132: 318–328.
7. Dangcham S, Bowen J, Ferguson IB and Ketsa S, 2008. Effect of temperature and low oxygen on pericarp hardening of mangosteen fruit stored at low temperature. Postharvest Biol. Technol, 50: 37–44.
8. Ding CK, Wang CY, Gross KC and Smith DL, 2001. Reduction of chilling injury and transcript accumulation of heat shock proteins in tomato fruit by methyl jasmonate and methyl salicylate. Plant Sci, 161: 1153–1159.
9. Ding CK, Wang CY, Gross KC and Smith DL, 2002. Jasmonate and salicylate induce the expression of pathogenesis-related-protein genes and increase resistance to chilling injury in tomato fruit. Planta, 214: 895–901.
10. Dixon RA and Paiva NL, 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. Plant Cell, 7: 1085–1097.
11. Fabro G, Kovacs I, Pavet V, Szabados L and Alvarez ME, 2004. Proline accumulation and AtP5CS2 gene activation are induced by plant-pathogen incompatible interactions in Arabidopsis. Mol. Plant–Microbe Interact, 17: 343–350.
12. Fung RWM, Wang CY, Smith DL, Gross KC and Tian M, 2004. MeSA and MeJA increase steady–state transcript levels of alternative oxidase and resistance against chilling injury in sweet peppers. Plant science, 166: 711-719.
13. Galvez AB, Garcia MV, Corrales JC, Lopez AC and Valenzuela JAL, 2010. Effect of gradual cooling storage on chilling injury and phenylalanine ammonia-lyase activity in tomato fruit. J Food Biochem, 34: 295–307.

14. Hodges D, Delong JM, Forney CF and Prange RK, 1999. Improving the thiobarbituric acid-reactive substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. Planta, 207: 604–611.

15. Lafuente MT, Zacarias L, Martinez-Tellez MA, Sanchez-Ballesta MT and Granell A, 2003. Phenylalanine ammonia-lyase and ethylene in relation to chilling injury as affected by fruit age in citrus. Postharvest Biol. Technol, 29: 308–317.

16. Lyons JM, 1973. Chilling injury in plants. Ann. Rev. Plant Physiol, 24: 445–466.

17. Mao LC, Pang HG, Wang GZ and Zhu CG, 2007. Phospholipase D and lipoxygenase activity of cucumber fruit in response to chilling stress. Postharvest Biol Technol, 44:42–47.

18. Mittler R, 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends Plant Sci, 7:405-410.

19. Mirdehghan SH, Rahemi M, Castillo S, Martínez-Romero D, Serrano M and Valero D, 2007. Pre-storage application of polyamines by pressure or immersion improves shelf life of pomegranate stored at chilling temperature by increasing endogenous polyamine levels. Postharvest Biol. Technol, 44, 26–33.

20. Munder M, 2009. Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system: review. Br J Pharmacology, 158: 638–651.

21. Nguyen TBT, Ketsa S, Van-Doorn WG, 2004. Effect of modified atmosphere packaging on chilling-induced peel browning in banana. Postharvest Biol. Technol, 31:313–317.

22. Paliyath G and Droillard MJ, 1992. The mechanisms of membrane deterioration and disassembly during senescence. Plant Physiol. Biochem, 30: 789–812.

23. Paliyath G and Thompson JE, 1987. Calcium and calmodulin regulated breakdown of phospholipid by microsomal membranes from bean cotyledons. Plant Physiol, 83:63-68.

24. Paliyath G and Subramanian J, 2010. Phospholipase D inhibition technology for enhancing shelf life and quality. In: Postharvest biology and technology of fruits, vegetables, and flowers Ed. Paliyath G, Murr DP, Handa AK and Lurie S, Wiley-Blackwell Publishing 497 pp.

25. Paliyath G, Whiting MD, Stasiak MA, Murr DP and Clegg BS, 1997. Volatile production and fruit quality during development of superficial scald in Red Delicious apples. Food Res. Int, 30: 95–103.

26. Pinhero RG, Paliyath G, Yada RY and Murr DP, 1998. Modulation of phospholipase D and lipoxygenase activities during chilling. Relation to chilling tolerance of maize seedlings. Plant Physiol Biochem, 36:213–224.

27. Purvis AC, 1981. Free proline in peel of grapefruit and resistance to chilling injury during cold storage. HortScience, 16: 160–161.

28. Rui H, Cao S, Shang H, Jin P, Wang K and Zheng Y, 2010. Effects of heat treatment on internal browning and membrane fatty acid in loquat fruit in response to chilling stress. J. Sci. Food Agric, 90: 1557–1561.

29. Sanchez-Ballesta MT, Lafuente MT, Zacarias L and Granell A, 2000. Involvement of phenylalanine ammonia-lyase in the response of fortune mandarin fruits to cold temperature. Physiol Plant, 108: 382–389.

30. Sayyari M, Babalar M, Kalantari S, Martinez-Romero D, Guillen F, Serrano M and Valero D, 2011. Vapour treatments with methyl salicylate or methyl jasmonate alleviated chilling injury and enhanced antioxidant potential during postharvest storage of pomegranates. Food Chem, 124: 964–970.

31. Sayyari M, Babalar M, Kalantari S, Serrano M and Valero D, 2009. Effect of salicylic acid treatment on reducing chilling injury in stored pomegranates. Postharvest Biol. Technol, 53: 152-154.

32. Shewfelt RL and Purvis AC, 1995. Toward a comprehensive model for lipid peroxidation in plant tissue. Hortscience, 30: 213–218.

33. Shang H, Cao S, Yang Z, Cai Y and Zheng Y, 2011. Effect of exogenous γ-Aminobutyric acid treatment on proline accumulation and chilling injury in peach fruit after long-term cold storage. J. Agric. Food Chem, 59: 1264–1268.

34. Siedow JN, 1991. Plant lipoxygenase: structure and function. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol, 42: 145–188.

35. Strack D, 1997. Phenolic metabolism. In: Dey, P.M., Harborne, J.B. (Eds.), Plant Biochemistry. Academic Press, San Diego, pp. 387–416.

36. Wang, L., Chen, S., Kong, W., Li, S., & Archbold, D. D. (2006). Salicylic acid pretreatment alleviates chilling injury and affects the antioxidant system and heat shock proteins of peaches during cold storage. *Postharvest Biology and Technology*, 41, 244-251.

37. Wang LJ and Li SHH, 2006. Salicylic acid-induced heat or cold tolerance in relation to Ca^{2+} homeostasis and antioxidant systems in young grape plants. Plant Science, 170: 685-694.

38. Wonsheree T, Kesta S and van Doorn WG, 2009. The relationship between chilling injury and membrane damage in lemon basil (*Ocimum citriodourum*) leaves. Postharvest Biol. Technol, 51: 91–96.

39. Wang X, 2001. Plant phospholipases. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 52:211–231.

40. Wang CY and Baker JE, 1979. Effects of two free radical scavengers and intermittent warming on chilling injury and polar lipid composition of cucumbers and sweet pepper fruits. Plant Cell Physiol, 20: 243–251.

41. Yadegari LZ, Heidari R and Carapetian J, 2007. The influence of cold acclimation on proline, malondialdehyde (MDA), total protein and pigments contents in soybean (*Glycine max*) seedlings. J Biol Sci, 7:1436–1441.

42. Zhang X, Shen L, Li F, Zhang Y, Menga D and Sheng J, 2010. Up-regulating arginase contributes to amelioration of chilling stress and the antioxidant system in cherry tomato fruits. J. Sci. Food Agric, 90: 2195–2202.

43. Zhao DY, Shen L, Fan B, Liu KL, Yu MM, Zheng Y, Ding Y and Sheng JP, 2009. Physiological and genetic properties of tomato fruits from 2 cultivars differing in chilling tolerance at cold storage. Food Chem, 74: 348–352.

Possible Mechanisms of Salicylic Acid Effects for Alleviation of Postharvest Chilling Injury on Tomato Fruit

Morteza Soleimani Aghdam[1], Mohammadreza Asghari[2], Orojali Khorsandi[1], Hanieh Moradbeygi[3], Nayer Mohammadkhani[3], Mehdi Mohayeji[4], Mohammad Baghaer Hassanpouraghdam[5]

[1]Young Researchers Club, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, I.R. of Iran

[2] Horticulture Dept., Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, I.R. of Iran

[3] Biology Dept., Faculty of Science, Urmia University, Urmia, I.R. of Iran

[4] Agronomy Dept., Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, I.R. of Iran

[5] Horticultural Science Dept., Faculty of Agriculture, University of Maragheh, Maragheh, I.R. of Iran

Abstract

Tomato fruit harvested at mature green stage and treated with salicylic acid at different concentration (0, 1 and 2 mM) and analyzed for chilling injury, electrolyte leakage, malondialdehyde, proline and total phenol contents and phospholipase D , lipoxygenase and phenylalanine ammonia-lyase activities during cold storage. Phospholipase D and lipoxygenase activities were significantly reduced by salicylic acid treatment. Compared with the control fruit, salicylic acid treatment alleviated chilling injury, reduced electrolyte leakage, malondialdehyde content and increased proline content. Salicylic acid application had no significant effect on total phenol content but phenylalanine ammonia-lyase activity was significantly reduced in treated fruits. Our result suggest that the reduce activity of PLD and LOX, by salicylic acid may be a chilling tolerance strategy in tomato fruit. Inhibition of PLD and LOX activity during low temperature storage could ameliorate chilling injury and oxidation damage and enhance membrane integrity in tomato fruit.

Keywords: Salicylic acid, Chilling, Tomato, Proline, Phospholipase D, Lipoxygenase