

کاهش سرمازدگی پس از برداشت میوه گوجه‌فرنگی با تیمار براسینواستروئید

مرتضی سلیمانی اقدم^{*} و محمد رضا اصغری^۲

^۱ کرج، دانشگاه تهران، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، گروه مهندسی علوم باغبانی و فضای سبز

^۲ ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده کشاورزی، گروه علوم باغبانی

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۰/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۱/۴/۱۱

چکیده

نگهداری میوه گوجه‌فرنگی در دمای زیر ۱۲ درجه سانتی‌گراد منجر به ایجاد آسیب سرمازدگی و کاهش کیفیت و عمر انبارمانی میوه می‌گردد. در این تحقیق تأثیر تیمار پس از برداشت براسینولید به عنوان یک براسینواستروئید فعال در غلظت‌های صفر (شاهد)، ۳ و ۶ میکرومولار بر روی شاخص سرمازدگی، نشت یونی، میزان مالون دی‌آلدئید، پروولین و فنل کل و فعالیت آنزیم‌های فسفولیپاز D (PLD)، لیپوکسیزناز (LOX) و فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) میوه گوجه‌فرنگی در طول سه هفته نگهداری در دمای سرمازدگی یک درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد که براسینولید در غلظت شش میکرومولار بیشترین تأثیر را در کاهش میزان سرمازدگی، نشت یونی و میزان مالون دی‌آلدئید و همچنین افزایش میزان پروولین میوه‌ها داشته است. میوه‌های گوجه‌فرنگی تیمار شده با براسینولید در غلظت شش میکرومولار بیشترین میزان فعالیت آنزیم PAL و محتوای فنل کل را نشان دادند. فعالیت آنزیم‌های PLD و LOX در طول دوره نگهداری در دمای سرمازدگی افزایش پیدا می‌کند که نشان‌دهنده افزایش تخریب غشای سلولی میوه‌ها می‌باشد و تیمار براسینولید به طور معنی‌داری باعث کاهش فعالیت این آنزیم‌ها در طول دوره نگهداری در دمای سرمازدگی شده و منجر به افزایش انسجام غشای سلولی می‌گردد. نتایج بدست آمده از این تحقیق نشان داد که تیمار براسینولید با افزایش انسجام غشایی از طریق کاهش فعالیت آنزیم‌های PLD و LOX و کاهش میزان مالون دی‌آلدئید و نشت یونی و همچنین از طریق فعال سازی مسیر فنیل پروپانوئید با افزایش فعالیت آنزیم PAL که منجر به افزایش میزان و تجمع فنل کل در میوه‌های گوجه‌فرنگی می‌گردد موجب افزایش مقاومت به سرمازدگی پس از برداشت گردید.

واژه‌های کلیدی: براسینولید، سرمازدگی، گوجه‌فرنگی، فسفولیپاز D، لیپوکسیزناز، فنیل آلانین آمونیالیاز

* نویسنده مسئول، تلفن: ۹۱۴۷۵۹۸۷۹۵، پست الکترونیکی: aghdamm@ut.ac.ir

مقدمه

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 (۲۵). فسفولیپاز D (PLD) مهمترین آنزیم در هیدرولیز فسفولیپیدهای غشا می‌باشد (۳۴). لیپوکسیزناز (LOX) پراکسیداسیون لیپیدهای غشا سلولی را افزایش داده و سیالیت غشا را تغییر می‌دهد و تأثیر مستقیم بر انسجام و

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 گوجه‌فرنگی حساسیت بالایی به سرمازدگی داشته و نگهداری در دمای زیر ۱۲ درجه سانتی‌گراد موجب ایجاد سرمازدگی می‌شود (۵۶). غشای سلولی اولین حسگر سرما

مواد و روشها

تهیه میوه‌ها و تیمار با براسینولید: میوه‌های گلخانه‌ای گوجه‌فرنگی رقم نیوتن که در دمای ۲۵–۳۰ درجه سانتی‌گراد روز و ۲۰–۲۵ درجه سانتی‌گراد شب و رطوبت ۵۵ درصد رشد کرده بودند در مرحله سبز بالغ برداشت شده و بلافضله به آزمایشگاه منتقل گردیدند. میوه‌های دارای آسیب فیزیکی حذف گردید و میوه‌های یکنواخت از لحاظ شکل، رنگ و اندازه برای انجام تیمار انتخاب گردیدند. تعداد ۲۷۰ عدد میوه انتخاب و به سه دسته مجزای نودتایی در سه تکرار که هر کدام ۳۰ میوه داشت تقسیم و تیمارهای شاهد و براسینولید در غلظت‌های ۳ و ۶ میکرومولار انجام شد. برای هر تیمار و تکرار میوه‌ها داخل محلول تازه با غلظت‌های ۳ و ۶ میکرومولار از براسینولید 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 ۸۵–۹۰ 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 سرمایزدگی ۳ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و ۵ عدد میوه دیگر برای انجام آنالیزهای بیوشیمیابی و فیزیولوژیکی به آزمایشگاه منتقل گردیدند.

فاکتورهای مورد بررسی

شاخص سرمایزدگی: برای اندازه‌گیری شاخص سرمایزدگی در هر زمان نمونه‌برداری ۵ میوه به صورت تصادفی از هر تیمار و تکرار انتخاب گردیده و به دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد آزمایشگاه به مدت ۳ روز منتقل گردیدند تا میزان شاخص سرمایزدگی میوه بر اساس میزان فرورفتگی سطحی میوه که مهمترین علامت سرمایزدگی در میوه گوجه‌فرنگی می‌باشد (۱۰) مورد ارزیابی قرار گیرد. شاخص سرمایزدگی بر اساس میزان سطحی از میوه که فرورفتگی سطحی را نشان داده مورد نمره‌دهی قرار گرفت،

نفوذپذیری غشای سلولی دارد (۴۷). پیشنهاد شده است که PLD و LOX آغازگر تجزیه غشای سلولی در طول پیری و تنش سرمایزدگی می‌باشند (۳۲ و ۳۳). افزایش در فعالیت PLD و LOX در پاسخ به تنش سرمایزدگی در ذرت نیز گزارش شده است (۳۶). کاهش فعالیت آنزیمی یا سطح بیان ژن PLD برای حفظ کیفیت و کاهش سرمایزدگی پس از برداشت محصولات باعثی از طریق افزایش انسجام غشای سلولی به عنوان یک تکنولوژی نوظهور در دنیا در حال گسترش می‌باشد.

براسینواستروئیدها، براسینولید (BL) و کاستاسترون (CS) به عنوان هورمونهای گیاهی استروئیدی نقش بسیار مهمی در رشد و نمو گیاهی مانند رشد لوله گرده، رشد طولی ساقه، اپیناستی برگ، بیوسیترز اتیلن و نمو و رسیدن میوه بازی می‌کنند. براسینواستروئیدها همچنین در پاسخ گیاهان به تنش‌های زیستی و غیر زیستی مانند سرما (۱۳ و ۵۲)، شوری (۳۱)، گرما (۳۰) و فلزات سنگین (۱) نیز نقش بسیار مهمی دارند. زو و همکاران (۵۷) گزارش کردند که کاربرد براسینولید در غلظت ۵ میکرومولار باعث کاهش پوسیدگی پس از برداشت و به تأخیر انداختن پیری میوه جو جوبا از طریق کاهش بیوسیترز اتیلن و سرعت تنفس می‌گردد. نقش حفاظتی براسینواستروئیدها در مقابل تنش سرمایزدگی در گیاهچه‌های برنج، ذرت، خیار و بادمجان نیز گزارش شده است (۲۶، ۱۷ و ۱۹). وانگ و زنگ (۴۸) گزارش کردند که تیمار گیاهچه‌های برنج با براسینواستروئید از طریق حفظ انسجام غشایی و تجمع پرولین موجب افزایش مقاومت به سرمایزدگی می‌گردد. در این تحقیق تأثیر تیمار پس از برداشت براسینولید بر شاخص سرمایزدگی و میزان نشت یونی، فعالیت آنزیم‌های MDA، PLD و PAL و میزان مالون دی‌آلدئید (MDA)، پرولین و فنل کل میوه گوجه‌فرنگی در طول سه هفته نگهداری در دمای یک درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت.

ریو و همکاران (۴۰) اندازه‌گیری گردید و بر اساس واحد آنژیمی در میلی‌گرم پروتئین بیان شد. طبق تعریف یک واحد آنژیمی از آنژیم PLD به مقداری از آنژیم گفته می‌شود که توانایی تولید یک نانو مول دی‌نیتروفنول را در یک ساعت داشته باشد. طبق تعریف یک واحد آنژیمی از آنژیم LOX به مقداری از آنژیم گفته می‌شود که باعث افزایش جذب در یک صدم دقیقه در طول موج ۲۳۴ نانومتر و ۲۵ درجه سانتی‌گراد را زمانی که لینولئیک اسید به عنوان سوبسترا اضافه می‌گردد، داشته باشد. فعالیت آنژیم PAL با روش زو و همکاران (۵۷) اندازه‌گیری گردید. فعالیت آنژیم PAL با تولید سینامات تعیین گردید. میزان ۲۹۰ تولید سینامات با اندازه‌گیری جذب در طول موج نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر انجام شد. فعالیت آنژیم بر اساس نانومول سینامیک اسید در ساعت در میلی‌گرم پروتئین بیان گردید. میزان پروتئین با استفاده از روش برادفورد (۵) و با استفاده از سرم آلبومن گاوی (BSA) به عنوان استاندارد اندازه‌گیری شد.

تجزیه آماری داده‌ها: این آزمایش به صورت کرت‌های خردشده در زمان بر پایه طرح کاملاً تصادفی با فاکتور اصلی، غلطت براسینولید در سه سطح (۰، ۳ و ۶ میکرومولار) و فاکتور فرعی زمان در سه سطح (سه هفته طول دوره انبارمانی گوجه‌فرنگی) با سه تکرار انجام گردید. تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرمافزار SPSS نسخه ۱۶ انجام شد. 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

شاخص سرمازدگی و نشت یونی: نتایج این تحقیق نشان داد که براسینولید تاثیر معنی داری در کاهش شاخص سرمازدگی میوه گوجه فرنگی در طول دوره انبارمانی داشت ($P < 0.01$ ، نمودار ۱)، همچنین براسینولید بویژه در

بدین صورت که اگر فرورفتگی سطحی مشاهده نشد (صفر)، در صورت مشاهده فرورفتگی سطحی در کمتر از ۲۵ درصد، سطح میوه نمره ۱ (یک)، در صورت مشاهده فرورفتگی سطحی بین ۲۵ تا ۵۰ درصد سطح میوه نمره ۲ (دو) و مشاهده فرورفتگی سطحی بین ۵۰ تا ۷۵ درصد سطح میوه نمره ۳ (سه) و بیش از ۷۵ درصد فرورفتگی میوه نمره ۴ (چهار) داده شد و بعد با استفاده از فرمول زیر شاخص سرمازدگی ارزیابی گردید.

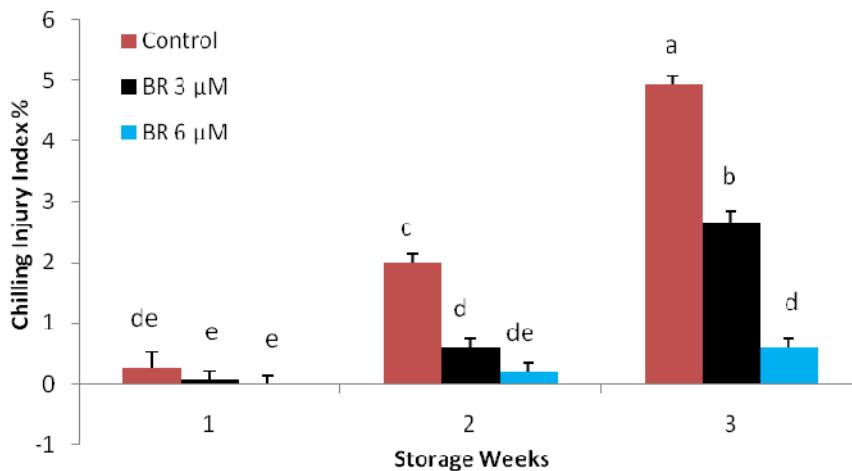
$$\text{شاخص سرمازدگی} = \frac{\text{تعداد کل میوه}}{\text{تعداد میوه دارای علائم سرمازدگی}} \times \text{سطح (نمره مربوطه)} (\sum)$$

نشست یونی، میزان پرولین، مالون دی‌آلدئید و فنل کل: نشت یونی طبق روش توصیف شده توسط زائو و همکاران (۵۶) 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) اندازه‌گیری شد. محلول سپس به مدت ۱۰ دقیقه جوشیده شد و بعد در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد سرد گردید و هدایت الکتریکی آن (L2) اندازه‌گیری شد. نشت یونی بر اساس نسبت L1 به L2 و بر اساس درصد بیان گردید. میزان پرولین بر اساس روش توصیف شده توسط زانگ و همکاران (۵۵) مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج به صورت میکروگرم بر گرم وزن تر میوه بیان گردید. MDA بر اساس روش تیوباریتوريک اسید که توسط زائو و همکاران (۵۶) توصیف شده است، اندازه‌گیری گردید و بر اساس میکرومول بر گرم وزن تر میوه بیان شد. میزان فنل کل بر اساس روش جین و همکاران (۲۰) اندازه‌گیری گردید و بر اساس میلی‌گرم گالیک اسید در ۱۰۰ گرم وزن تر میوه بیان گردید.

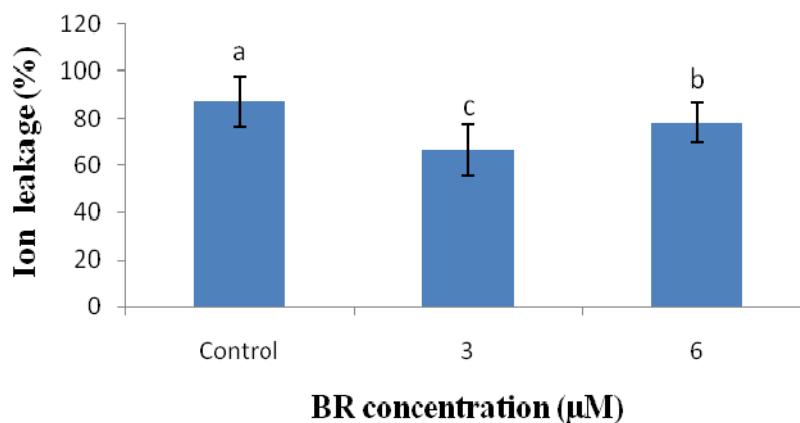
فعالیت آنژیم‌های فسفولیپاز D، لیپوکسیثاناز و فنیل آلانین آمونیالیاز: فعالیت آنژیم PLD و LOX طبق روش

شده است (۱۹، ۲۶). بر اساس بررسی منابع انجام شده نتایج گزارش شده در این تحقیق اولین گزارش در مورد کاربرد براسینواستروئید ها برای کاهش سرمادگی پس از برداشت محصولات با غبانی می باشد.

غذت ۳ میکرومولار به طور معنی داری موجب کاهش نشت یونی در میوه گوجه فرنگی شد ($P < 0.05$)، نمودار ۲). تاثیر مثبت براسینواستروئید ها در کاهش سرمادگی در گیاهچه های بادمجان، خیار، ذرت و برنج نیز گزارش دارد.



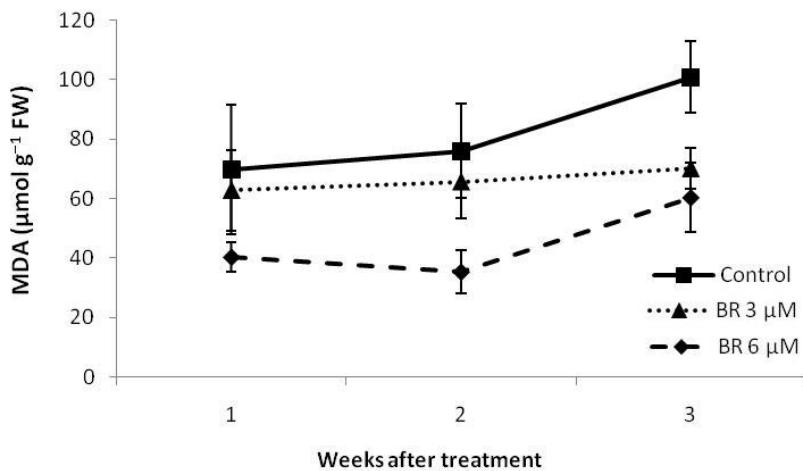
نمودار ۱- شاخص سرمادگی در میوه گوجه فرنگی در طول سه هفته نگهداری در دمای سرمادگی تحت تاثیر سطوح براسینولید



نمودار ۲- تاثیر سطوح براسینولید بر روی درصد نشت یونی میوه گوجه فرنگی تحت دمای سرمادگی

موردنمود توجه قرار گرفته اند و می توانند کاهش انسجام غشای سلولی و وقوع آسیب سرمادگی را در محصولات با غبانی نشان دهند (۴۳). پراکسیداسیون لیپید های غشای سلولی با تجمع MDA موجب ایجاد آسیب سرمادگی در محصولات با غبانی می گردد (۳) و نتایج این تحقیق نشان می دهد که تیمار براسینولید با کاهش تجمع MDA می تواند آسیب سرمادگی پس از برداشت را در میوه گوجه فرنگی کاهش دهد.

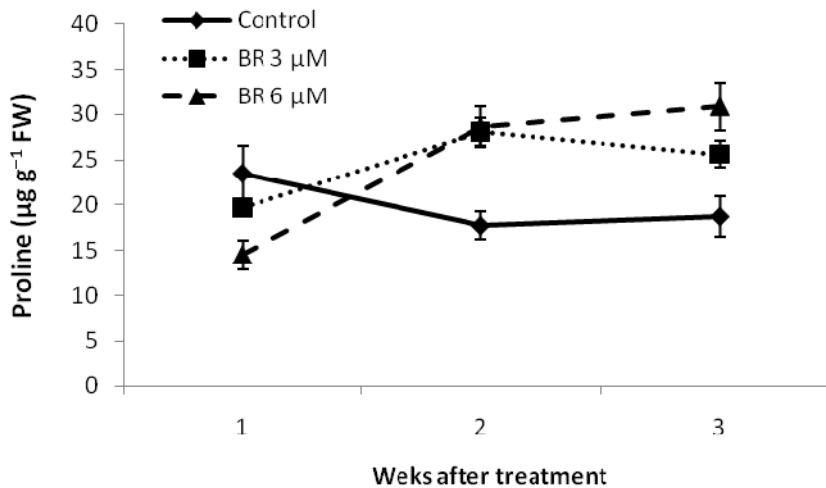
میزان مالون دی آلدیید: نتایج این تحقیق نشان داد که براسینولید بویژه در غذت ۶ میکرومولار تاثیر معنی داری در کاهش میزان MDA میوه گوجه فرنگی در طول دوره انبارمانی داشت ($P < 0.05$)، نمودار ۳). حفظ انسجام غشای سلولی در دمای پایین عامل مهمی در مقاومت به سرمادگی در محصولات با غبانی می باشد (۵۰). نشت یونی و محتوای MDA به عنوان شاخص های آسیب غشایی برای اندازه گیری غیر مستقیم انسجام غشای سلولی



نمودار ۳- تاثیر سطوح براسینولید بر روی میزان مالون دی الدهید میوه گوجه فرنگی تحت دمای سرمازدگی

براسینولید افزایش معنی داری نشان می دهد و در پایان دوره انبارمانی میزان پروولین بیشتری در میوه های تیمار شده با ۶ یکرومولار براسینولید مشاهده گردید ($P < 0.01$). نمودار ۴).

میزان پروولین: نتایج این تحقیق نشان داد که میزان پروولین در طول دوره انبارمانی در دمای سرمازدگی در میوه های تیمار شاهد کاهش می یابد و در هفته اول میوه های تیمار شاهد دارای بیشترین مقدار پروولین می باشند ولی در طول هفته دوم و سوم میزان پروولین در میوه های تیمار شده با



نمودار ۴- تاثیر سطوح براسینولید بر روی میزان پروولین میوه گوجه فرنگی تحت دمای سرمازدگی

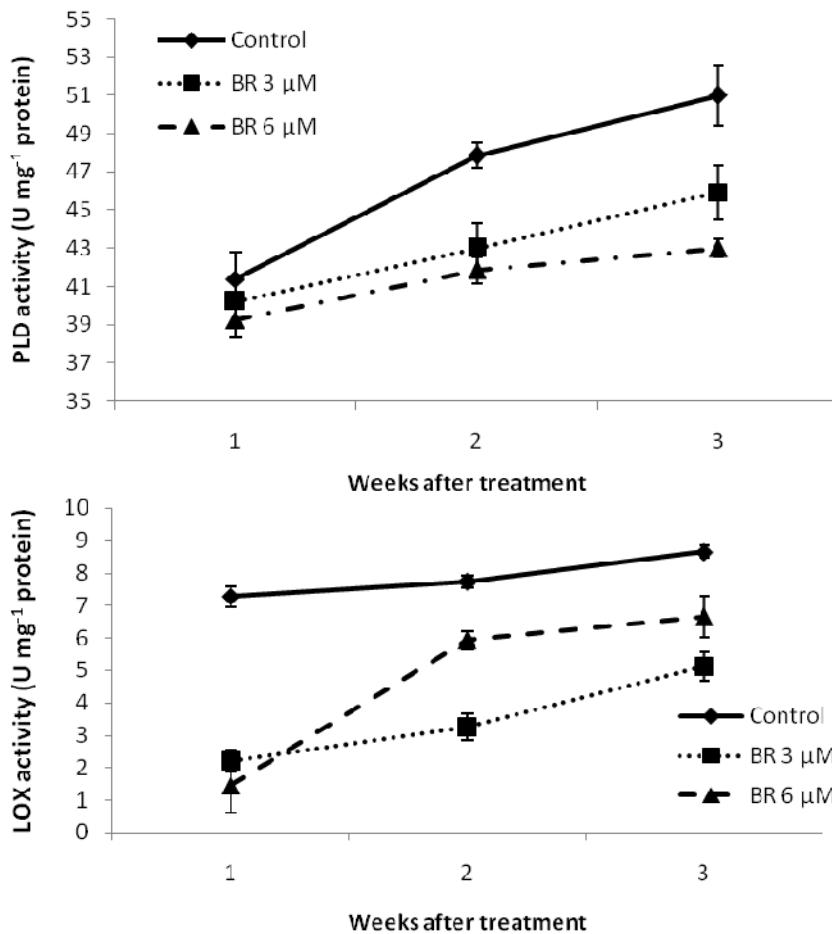
میوه گوجه فرنگی در اثر تیمار براسینولید به طور معنی داری کاهش پیدا کرد ($P < 0.01$). نمودار ۵).

فعالیت آنزیم **D** و **LOX**: نتایج این تحقیق نشان داد که فعالیت آنزیم های PLD و LOX در طول دوره نگهداری میوه گوجه فرنگی در دمای سرمازدگی افزایش یافت که نشان دهنده فعال شدن مسیر تجزیه غشای سلولی در پاسخ به سرمازدگی می باشد. روند افزایشی فعالیت PLD و LOX در طول دوره سرمازدگی

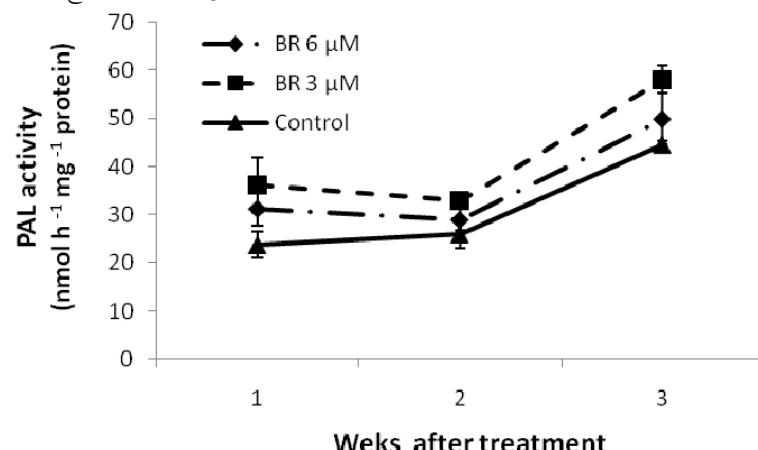
فعالیت آنزیم **PAL** و میزان فتل کل: نتایج این آزمایش نشان می دهد که فعالیت آنزیم PAL در میوه های گوجه فرنگی تیمار شاهد و تیمار براسینولید دارای روند افزایشی در طول دوره انبارمانی می باشد اما فعالیت آنزیم PAL در

کل میوه نیز افزایش معنی داری نشان می دهد ($P < 0.05$)^۷ نمودار ۷) که می تواند با افزایش فعالیت آنزیم PAL در ارتباط باشد.

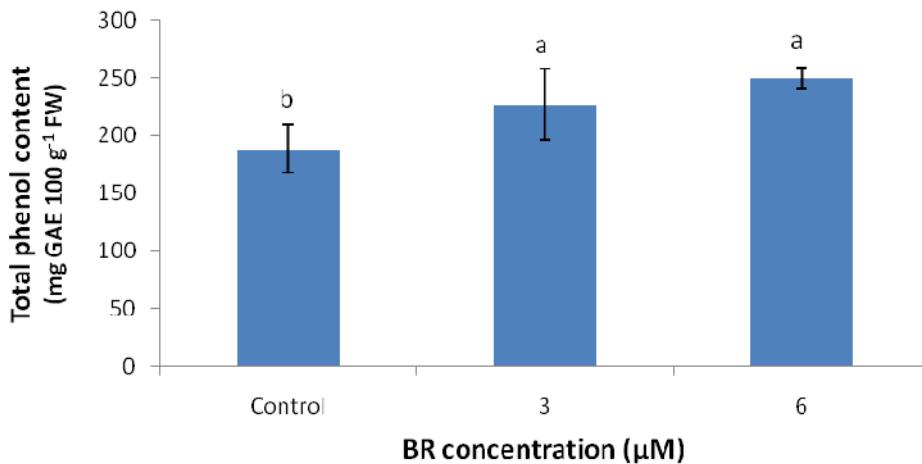
میوه گوجه فرنگی تیمار شده با براسینولید در طول دوره انبارمانی به طور معنی داری بیشتر می باشد ($P < 0.01$)^۶ نمودار ۶)، همچنین در میوه های تیمار شده با براسینولید، بدون تفاوت معنی دار بین ۳ و ۶ میکرو مولار، میزان فتل



نمودار ۵- فعالیت PLD و LOX در طول سه هفته نگهداری در دمای سرمازدگی تحت تاثیر سطوح براسینولید



نمودار ۶- تاثیر سطوح براسینولید بر روی فعالیت آنزیم PAL در میوه گوجه فرنگی تحت دمای سرمازدگی



نمودار ۷- تاثیر سطوح براسینولید بر روی محتوای فل کل میوه گوجه فرنگی تحت دمای سرمازدگی

کاهش سطوح MDA و H_2O_2 در گیاهچه های گوجه فرنگی تحت تنش خشکی می گردد. هاما (۱۶) گزارش نمود که براسینواستروند موجب حفظ ساختار و انسجام غشای سلولی در گیاهان می گردد. بر این اساس، تیمار براسینواستروئید در گیاه لوپیا، در حضور یا عدم حضور سمیت کادمیوم، موجب افزایش شاخص انسجام غشای سلولی و کاهش پراکسیداسیون لیپید های غشا و تجمع MDA می گردد (۳۸). بهنام نیا و همکاران (۴) نشان دادند که تیمار براسینواستروئید موجب کاهش سطوح MDA و H_2O_2 ، افزایش فعالیت سیستم آنتی اکسیدانی و کاهش تنش اکسیداتیو بوجود آمده در اثر تنش خشکی در گیاه گوجه فرنگی می گردد. لیو و همکاران (۲۴) گزارش کردند که در کشت سوسپانسیون سلولی *Chorispora bungeana* تحت تنش سرمازدگی تیمار براسینواستروئید فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی کاتالاز (CAT)، آسکوربیات پراکسیداز (APX)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و سطوح آسکوربیک اسید (AsA) و گلوتاتیون (GSH) را افزایش داده و موجب تجمع ROS گردیده و پراسیداسیون لیپید و تجمع MDA را کاهش می دهد. پیشنهاد شده است که تجمع پرولین به عنوان یک مکانیسم مقاومت در برابر تنش سرمازدگی در گیاهان مطرح می باشد (۵۱).

بحث

به طور کلی آسیب سرمازدگی ابتدا در غشای سلولی همراه با تغییر در ترکیب اسیدهای چرب فسفولیپیدها اتفاق می افتد و آسیب غشایی موجب شروع آبشاری از واکنش های ثانویه می گردد که منجر به تخریب ساختار سلولی می شود. این آسیب غشایی می تواند بوسیله نشت یونی مورد برآورد قرار گیرد. (۲۸). کاهش نشت یونی در میوه های گوجه فرنگی تیمار شده با براسینولید را می توان به تأثیر آن در حفظ انسجام غشای سلولی مربوط دانست که توسط وانگ و زنگ (۴۸) نیز گزارش شده است. هادگ و همکاران (۱۸) بیان نمودند که MDA محصول نهایی اکسیداسیون اسیدهای چرب می باشد و می تواند به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپید غشای سلولی که در اثر تولید گونه های فعال اکسیژن (ROS) بوجود می آید مورد توجه قرار گیرد. گزارش شده است که تیمار براسینواستروئید ها می تواند سطوح پراکسیداسیون لیپید و تجمع MDA را که توسط تنش های محیطی مانند شرایط غیر هوایی یا کمبود اکسیژن (۱۲)، سمیت کادمیوم (۲)، گرما (۳۰) و خشکی (۳۹) القا می گردد کاهش دهد و موجب به حداقل رسیدن آسیب تنش های محیطی در گیاهان گردد. یوآن و همکاران (۵۳) گزارش کردند که تیمار براسینواستروئید موجب

سرمازدگی بوسیله تخریب غشا و مسیر سیگنال دهی در پاسخ به دمای سرمازدگی همراه می‌باشد. ریو و همکاران (۴۰) گزارش نمودند که در میوه لاکوآت فعالیت آنزیم های PLD و LOX در پاسخ به تنش سرمازدگی افزایش می‌یابد و کاهش قهوه ای شدن درونی (IB) که از علاجی 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 (۷) تاثیر تیمار ۱-متیل سیکلوبیرون (۱-MCP) بر سرمازدگی میوه لاکوآت (Loquat) را بررسی نموده و بیان کردند که تیمار ۱-MCP به طور معنی داری میزان سرمازدگی را در میوه لاکوآت کاهش می‌دهد. تیمار ۱-MCP از تجمع مالون دی آلدید، رادیکال سوپر اکسید و پراکسید هیدروژن و افزایش نشت یونی جلوگیری می‌کند. علاوه بر این میوه های تیمار شده با ۱-MCP دارای فعالیت بالای CAT و فعالیت پایین LOX و PLD و فسفولیپاز C (PLC) بودند. این نتایج پیشنهاد می‌کنند که LOX و PLC و PLD عامل اصلی آسیب سرمازدگی می‌باشند و تاثیر ۱-MCP در کاهش سرمازدگی ممکن است مربوط به کاهش فعالیت این آنزیم ها باشد. ۱-MCP با کاهش تولید LOX و 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 (۷). 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 آنزیم ها را کاهش دهد می‌تواند به عنوان یک ابزار قدرتمند برای کاهش سرمازدگی مورد استفاده قرار گیرد و نتایج بدست آمده در این تحقیق گواهی بر این مدعاست. PAL به عنوان آنزیم کلیدی در متابولیسم فنیل پروپانوئید تبدیل فنیل آلانین به ترانس سینامیک اسید را کاتالیز

در گیاهان پرولین تجمع یافته در پاسخ به تنش سرمازدگی نقش مهمی در تنظیم اسمز سلولی بین سیتوپلاسم و واکوئل، تنظیم نسبت NAD⁺/NADH، سمیت زدایی ROS و حفظ انسجام غشای سلولی ایفا می‌کند (۵۱). یوسف و Vigna radiata با براسینواستروئید در حضور یا عدم حضور سمیت بر (Boron) فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی را افزایش داده و موجب تجمع معنی دار در میزان پرولین می‌گردد. رادی (۳۸) نشان داد که تیمار گیاه لوپیا با براسینواستروئید در حضور یا عدم حضور سمیت کادمیوم موجب تجمع معنی دار در میزان پرولین می‌گردد. و فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی را افزایش می‌دهد. واردھینی و رائو (۴۶) گزارش نمودند که تیمار براسینواستروئید میزان پرولین را در گیاه سورگوم تحت تنش شوری افزایش می‌دهد. در برنج افزایش مقاومت به تنش سرمازدگی در اثر تیمار براسینوایلید به علت افزایش میزان پرولین توسط وانگ و زنگ (۴۸) نیز گزارش شده است.

غشای سلولی اولین حسگر سرما در سلول بوده و اولین مکان برای توسعه آسیب سرمازدگی می‌باشد. غشاهای سلولی در بافت های محصولات باغبانی دارای آسیب سرمازدگی تحت انتقال فاز از مایع کریستالی انعطاف پذیر به ساختار ژلی جامد قرار می‌گیرند (۲۵). در طول پیری و سرمازدگی تخریب لیپیدهای غشایی با فعالیت آنزیم های لیپولیتیک غشایی مانند PLD و LOX همراه می‌باشد (۳۶). PLD و LOX با پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشبع غشایی عامل اصلی تخریب غشا در طول دوره سرمازدگی می‌باشند (۴۷، ۳۶). ماثو و همکاران (۲۷) 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 می‌یابد. این نتایج پیشنهاد می‌کند که آنزیم های PLD و LOX با آغاز آسیب

۴ درجه سانتی گراد موجب افزایش فعالیت PAL گردیده و موجب کاهش آسیب سرمادگی میوه گوجه فرنگی می‌شود. چن و همکاران (۸) گزارش کردند که تیمار گرمایی در ۳۸ درجه سانتی گراد به مدت سه روز قبل از نگهداری در دمای ۸ درجه سانتی گراد مقاومت به سرمادگی را در میوه موز افزایش می‌دهد. میزان رونوشت های *MaPAL1* و *MaPAL2* و میزان فعالیت آنزیم PAL در میوه های تیمار شده با گرما افزایش یافته و میزان نشت یونی و میزان مالون دی آلدید کاهش می یابد و موجب کاهش آسیب سرمادگی در میوه موز می گردد. پس از فعال سازی آنزیم PAL ترکیبات فنلی مانند فلاونوئیدها و آنتوسیانین ها در بافت های در معرض تنش افزایش یافته و به عنوان سیستم دفاعی در برابر تنش عمل می کنند (۱۱). افزایش در فعالیت PAL و میزان فنل کل همراه با افزایش مقاومت گیاهان به سرما می باشد. چن و همکاران (۸) نشان دادند که تیمار پس از برداشت میوه انگور با اسید سالیسیلیک موجب تجمع mRNAی PAL و افزایش سترز پروتئین جدید PAL و افزایش فعالیت آنزیم PAL و متعاقباً تجمع فنیل پروپانوئید ها در میوه می گردد که موجب تقویت سیستم دفاعی میوه می گردد.

نتیجه‌گیری نهایی:

بر اساس نتایج این تحقیق می‌توان بیان کرد که براسینولید می‌تواند به عنوان یک تکنولوژی پس از برداشت توانمند برای کاهش آسیب سرمادگی در میوه گوجه فرنگی مورد استفاده قرار گیرد. تأثیر تیمار براسینولید در کاهش آسیب سرمادگی در میوه گوجه فرنگی می‌تواند به افزایش انسجام غشای سلولی در اثر کاهش فعالیت آنزیم های PLD و LOX و کاهش پراکسیداسیون غشای سلولی مربوط باشد که با کاهش میزان نشت یونی و مالون دی آلدید همراه می‌باشد. افزایش میزان پرولین در میوه های تیمار شده با براسینولید نیز می‌تواند دلیلی بر افزایش مقاومت به سرمادگی در میوه ها باشد. همچنین تأثیر تیمار

می نماید که اولین مرحله در بیوستر فنیل پروپانوئید ها بوده و منجر به تولید متابولیت های ثانویه مانند لیگنین، فیتوالکسین ها و فلاونوئید ها می گردد. در واقع PAL به عنوان آنزیم حدواتسط متابولیسم اولیه (مسیر اسید شیکمیک) و متابولیسم ثانویه (مسیر فنیل پروپانوئید) محاسب می گردد (۱۱). علاوه بر این PAL بوسیله استرس های زیستی مانند سرمادگی (۴۱، ۴۲)، نور UV-C (۴۴) و UV-B (۳۷)، زخم (۶)، ازن (۴۲) و هورمون های گیاهی مانند اسید جاسمونیک، اسید سالیسیلیک، اسید ابیسیزیک و اتیلن (۴۹) تحریک می گردد. این یافته ها پیشنهاد می کنند که PAL نقش مهم و ضروری در مقاومت گیاه به تنش های محیطی بازی می کند (۱۱) و القای PAL می تواند به عنوان یک مکانیسم دفاعی در برابر سرمادگی پس از برداشت محصولات باغبانی مورد توجه قرار گیرد (۲۲). در حالت کلی افزایش فعالیت PAL در میوه های نگهداری شده در دمای سرمادگی به عنوان یک مکانیسم برای کاهش اثرات سرمادگی پذیرفته شده است (۲۳) و تیمار گرمایی با افزایش فعالیت PAL موجب کاهش سرمادگی در میوه موز می گردد (۸). پیشنهاد شده است که تجمع رونوشت های PAL می تواند به عنوان یک مارکر مولکولی برای مقاومت به سرمادگی در مرکبات مورد استفاده قرار گیرد (۴۱). شرایط تنش می تواند موجب افزایش فعالیت PAL گردد که به عنوان اولین آنزیم محدود کننده سرعت مسیر فنیل پروپانوئید ها مطرح می باشد (۳۵). افزایش فعالیت آنزیم PAL موجب افزایش فعالیت مسیر فنیل پروپانوئید گردیده و مقاومت گیاه در برابر تنش های محیطی را افزایش می دهد (۱۱، ۲۲). محصولات مسیر فنیل پروپانوئید مانند فنل ها دارای خاصیت آنتی اکسیدانی بوده و می توانند نقش حفاظتی مهمی در برابر تنش های اکسیداتیو مانند سرمادگی بازی کنند (۲۳، ۱۵). گالوز و همکاران (۱۴) گزارش کردند که انبار با کاهش تدریجی دما از ۱۲ تا

این تحقیق بر اساس طرح پژوهشی باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر انجام شده است و لازم است از ریاست و معاون محترم پژوهشی و ریاست محترم باشگاه پژوهشگران جوان آن واحد نهایت تشکر و قدردانی را داشته باشم.

براسینواستروئید در کاهش سرمادگی در میوه گوجه‌فرنگی می‌تواند در نتیجه افزایش میزان فتل کل میوه در اثر افزایش فعالیت آنزیم PAL باشد.

سپاسگزاری

منابع

- 1- Ali, B., Hasan, S.A., Hayat, S., Hayat, Q., Yadav, S., Fariduddin, Q., Ahmad, A., 2008. A role for brassinosteroids in the amelioration of aluminium stress through antioxidant system in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilczek). *Environ. Exp. Bot.* 62: 153–159.
- 2- Anuradha, S., Rao, S.S.R., 2007. The effect of brassinosteroids on radish (*Raphanus sativus* L.) seedlings growing under cadmium stress. *Plant. Soil. Environ.* 53: 465–472.
- 3- Asghari, M.R., Aghdam, M.S., 2010. Impact of salicylic acid on post-harvest physiology of horticultural crops. *Trends Food. Sci. Technol.* 21:502-509.
- 4- Behnamnia, M., Kalantari, K.M., Rezanejad, F., 2009. Exogenous application of brassinosteroid alleviates drought-induced oxidative stress in *Lycopersicon esculentum* L. *Gen. Appl. Plant Physiol.* 35: 22–34.
- 5- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of micro-gram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248–254.
- 6- Campos-Vargas, R., Nonogaki, H., Suslow, T., Saltveit, M.E., 2005. Heat shock treatments delay the increase in wound induced phenylalanine ammonia-ammonia-lyase activity by altering its expression, not its induction in Romaine lettuce (*Lactuca sativa*) tissue. *Physiol Plant.* 132: 82–91
- 7- Cao, S., Zheng, Y., Wang, K., Rui, H., Tang, S., 2009. Effects of 1-methylcyclopropene on oxidative damage, phospholipases and chilling injury in loquat fruit. *J Sci Food Agric.* 89: 2214–2220.
- 8- Chen, J.Y., He, L.H., Jiang, Y.M., Wang, Y., Joyce, D.C., Ji, Z.L., Lu, W.J., 2008. Role of phenylalanine ammonia-lyase in heat pretreatment-induced chilling tolerance in banana fruit. *Physiol Plant.* 132: 318–328.
- 9- Chen, J.Y., Wen, P.F., Kong, W.F., Pan, Q.H., Zhan, J.C., Li, J.M., Wan, S.B., Huang W.D., 2006. Effect of salicylic acid on phenylpropanoid and phenylalanine ammonia-lyase in harvested grape berries. *Postharvest Biol. Technol.* 40: 64–72.
- 10-Ding, C.K., Wang, C.Y., Gross, K.C., Smith, D.L., 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.
- 11-Dixon, R.A., Paiva, N.L., 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell.* 7: 1085–1097.
- 12-Ershova, A., Khripach, V., 1996. Effect of epibrassinolide on lipid peroxidation in *Pisum sativum* at normal aeration and under oxygen deficiency. *Russ J. Plant Physiol.* 43: 750–752.
- 13-Fariduddin, Q., Yusuf, M., Chalkoo, S., Hayat, S., Ahmad, A., 2011. 28-homobrassinolide improves growth and photosynthesis in *Cucumis sativus* L. through an enhanced antioxidant system in the presence of chilling stress. *Photosynthetica* 49, 55–64.
- 14-Galvez, A.B., Garcia, M.V., Corrales, J.C., Lopez, A.C., Valenzuela, J.A.L., 2010. Effect of gradual cooling storage on chilling injury and phenylalanine ammonia-lyase activity in tomato fruit. *J Food Biochem.* 34: 295–307.
- 15-Gonzalez-Aguilar, G.A., Tiznado-Hernandez, M.E., Zavaleta-Gatica, R., Martinez-Tellez, M.A., 2004. Methyl jasmonate treatments reduce chilling injury and activate the defense response of guava fruits. *Biochem Biophys Res. Comm.* 313: 694–701.
- 16-Hamada, K., 1986. Brassinolide in crop cultivation. In: Macgregor, P. (Ed.), *Plant Growth Regulators in Agriculture. Food Fertility Technology, Central Asia Pacific Region.*, pp. 190–196.
- 17-He, R.Y., Wang, G.J., Wang, X.S., 1991. Effects of brassinolide on growth and chilling resistance

- of maize seedlings. In: Cutler HG, Yokota T, Adam G, editors. *Brassinosteroids—chemistry, bioactivity and application*. Washington: ACS Symposium Series, American Chemical Society, p. 220–30.
- 18-Hedges, D., Delong, J.M., Forney, C.F., Prange, R.K., 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.
- 19-Hotta, Y., Tanaka, T., Luo, B.S., Takeuchi, Y., Konnai, M., 1998. Improvement of cold resistance in rice seedlings by 5-aminolevulinic acid. *J Pestic. Sci.* 23, 29–33.
- 20-Jin, P., Zheng, Y., Tang, S., Rui, H., Wang, CY. 2009. A combination of hot air and methyl jasmonate vapor treatment alleviates chilling injury of peach fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 52, 24–29.
- 21-Jones, D.H., 1984. Phenylalanine ammonia-lyase: regulation of its induction, and role in plant development. *Phytochemistry* 23: 1349–1359
- 22-Lafuente, M.T., Zacarias, L., Martinez-Tellez, M.A., Sanchez-Ballesta, M.T., 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.
- 23-Lafuente, M. T., Zacarias, L., Martinez-Tellez, M. A., Sanchez- Ballesta, M. T., Dupille, E., 2001. Phenylalanine ammonia-lyase as related to ethylene in the development of chilling symptoms during cold storage of citrus fruits. *J. Agric. Food Chem.* 49: 6020-6025.
- 24-Liu, Y.J., Zhao, Z.G., Si, J., Di, C.X., Han, J., An, L.Z., 2009. Brassinosteroids alleviate chilling-induced oxidative damage by enhancing antioxidant defense system in suspension cultured cells of *Chorispora bungeana*. *Plant Growth Regul.* 59, 207–214.
- 25-Lyons, J.M., 1973. Chilling injury in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 24: 445–466.
- 26-Mandava, N.B., 1988. Plant growth-promoting brassinosteroids. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol Biol.* 39, 23–52.
- 27-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.
- 28-Mirdehghan, S.H., Rahemi, M., Castillo, S., Martinez-Romero, D., Serrano, M., 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.
- 29-Nguyen, T. B. T., Ketsa, S., van Doorn, W. G., 2003. Relationship between browning and the activities of polyphenol oxidase and phenylalanine ammonia lyase in banana peel during low temperature storage. *Postharvest Biol. Technol.* 30:187-193.
- 30-Ogweno, J.O., Song, X.S., Shi, K., Hu, W.H., Mao, W.H., Zhou, Y.H., Yu, J.Q., Nogues, S., 2008. Brassinosteroids alleviate heat-induced inhibition of photosynthesis by increasing carboxylation efficiency and enhancing antioxidant systems in *Lycopersicon esculentum*. *Plant Growth Regul.* 27, 49–57.
- 31-Ozdemir, F., Bor, M., Demiral, T., Turkan, I., 2004. Effects of 24-epibrassinolide on seed germination, seedling growth, lipid peroxidation, proline content and antioxidative system of rice (*Oryza sativa* L) under salinity stress. *Plant Growth Regul.* 42, 203–211.
- 32-Paliyath, G., Droillard, M.J., 1992. The mechanisms of membrane deterioration and disassembly during senescence. *Plant Physiol. Biochem.* 30: 789–812.
- 33-Paliyath, G., Thompson, J.E., 1987. Calcium and calmodulin regulated breakdown of phospholipid by microsomal membranes from bean cotyledons. *Plant Physiol.* 83:63-68.
- 34-Paliyath, G., Whiting, M.D., Stasiak, M.A., Murr, D.P., Clegg, B.S., 1997. Volatile production and fruit quality during development of superficial scald in Red Delicious apples. *Food Res. Int.* 30: 95–103.
- 35-Pereyra, L., Roura, S.I. And Del Valle, C.E. 2005. Phenylalanine ammonia lyase activity in minimally processed Romaine lettuce. *Lebensm.-Wiss. Technol.* 38: 67–72.
- 36-Pinhero, R.G., Paliyath, G., Yada, R.Y., Murr, D.P., 1998. Modulation of phospholipase D and lipoxygenase activities during chilling. Relation to chilling tolerance of maize seedlings. *Plant Physiol. Biochem.* 36:213–224.
- 37-Pongprasert, N., Sekozawa, Y., Sugaya, S., Gemma, H., 2011. The role and mode of action of UV-C hormesis in reducing cellular oxidative stress and the consequential chilling injury of banana fruit peel. *Int. Food Res. J.* 18: 721-729.

- 38-Rady, M.M., 2011. Effect of 24-epibrassinolide on growth, yield, antioxidant system and cadmium content of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants under salinity and cadmium stress. *Sci. Hortic.* 129: 232–237.
- 39-Robinson, J.M., Bunce, J.A., 2000. Influence of drought-induced water stress on soybean and spinach leaf ascorbate-dehydroascorbate level and redox status. *Int. J. Plant Sci.* 161, 271–279.
- 40-Rui, H., Cao, S., Shang, H., Jin, P., Wang, K., 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.
- 41-Sanchez-Ballesta, M.T., Zacarias, L., Granell, A., Lafuente, M.T., 2000. Accumulation of PAL transcript and PAL activity as affected by heat-conditioning and low-temperature storage and its relation to chilling sensitivity in mandarin fruits. *J. Agric. Food Chem.* 48: 2726–2731.
- 42-Sgarbi, E., Fornasiero, R.B., Lins, A.P., Bonatti, P.M., 2003. Phenol metabolism is differentially affected by ozone in two cell lines from grape (*Vitis vinifera* L.) leaf. *Plant Sci.* 165: 951–957
- 43-Shewfelt, R.L., Purvis, A.C., 1995. Toward a comprehensive model for lipid peroxidation in plant tissue. *Hortscience* 30: 213–218.
- 44-Teklemariam, T.A., Blake, T.J., 2004. Phenylalanine ammonia-lyase-induced freezing tolerance in jack pine (*Pinus banksiana*) seedlings treated with low, ambient levels of ultraviolet-B radiation. *Physiol Plant.* 122: 244–253.
- 45-Tomas-Barberan, F.A., Espin, J. C., 2001. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *J. Sci. Food Agric.* 81:853-876.
- 46-Vardhini, B.V., Rao, S.S.R., 2003. Amelioration of osmotic stress by brassinosteroids on seed germination and seedling growth of three varieties of sorghum. *Plant Growth Regul.* 41:25–31.
- 47-Wang, X., 2001. Plant phospholipases. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 52:211–231.
- 48-Wang, B.K., Zeng, G.W., 1993. Effect of epibrassinolide on the resistance of rice seedlings to chilling injury. *Acta Phytophysiol. Sinica.* 19, 38–42.
- 49-Wen, P.F., Chen, J.Y., Kong, W.F., Pan, Q.H., Wan, S.B., Huang, W.D., 2005. Salicylic acid induced the expression of phenylalanine ammonia-lyase gene in grape berry. *Plant Sci.* 169: 928–934.
- 50-Wonsheree, T., Kesta, S., van Doorn, W.G., 2009. The relationship between chilling injury and membrane damage in lemon basil (*Ocimum citriodourum*) leaves. *Postharvest Biol. Technol.* 51: 91–96.
- 51-Yadegari, L.Z., Heidari, R., 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.
- 52-Yu, J.Q., Zhou, Y.H., Ye, S.F., Huang, L.F., 2002. 24-Epibrassinolide and abscisic acid protect cucumber seedlings from chilling injury. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 77, 470–473.
- 53-Yuan, G.F., Jia, C.G., Li, Z., Sun, B., Zhang, L.P., Liu, N., Wang, Q.M., 2010. Effect of brassinosteroids on drought resistance and abscisic acid concentration in tomato under water stress. *Sci. Hortic.* 126, 103–108.
- 54-Yusuf, M., Fariduddin, Q., Ahmad, A., 2011. 28-Homobrassinolide mitigates boron induced toxicity through enhanced antioxidant system in *Vigna radiata* plants. *Chemosphere* 85: 1574–1584.
- 55-Zhang, X., Shen, L., Li, F., Zhang, Y., Menga, D., 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.
- 56-Zhao, D.Y., Shen, L., Fan, B., Liu, K.L., Yu, M.M., Zheng, Y., Ding, Y., Sheng, J.P., 2009. Physiological and genetic properties of tomato fruits from 2 cultivars differing in chilling tolerance at cold storage. *Food Chem.* 74: 348–352.
- 57-Zhu, Z., Zhang, Z., Qin, G., Tian, S., 2010. Effects of brassinosteroids on postharvest disease and senescence of jujube fruit in storage. *Postharvest Biol. Technol.* 56, 50-58.

Amelioration of postharvest chilling injury in tomato fruit by brassinosteroids treatment

Soleimani Aghdam M.¹ and Asghari M.R.²

¹ Horticultural Science Dept., University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, I.R. of Iran

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

Abstract

To develop an effective technique to reduce chilling injury (CI) in tomato fruit, the effects of treatments with 0 (Control), 3 and 6 μM brassinosteroids (BRs) on chilling injury, electrolyte leakage, contents of malondialdehyde, proline and total phenol and activities of phospholipase D (PLD), lipoxygenase (LOX) and phenylalanine ammonia-lyase (PAL), were investigated in tomato fruits stored at 1°C for 21 days. Treatments with BRs, especially at 6 μM , significantly ameliorated chilling injury, reduced electrolyte leakage and malondialdehyde content and increased proline content. PLD and LOX activities in fruits treated with BRs were significantly lower as compared with the control fruits. Also, fruits treated with BRs exhibited significantly higher PAL activity and total phenol content. These results suggest that that brassinosteroids has potential postharvest technology in ameliorating the chilling injury in tomato fruit.

Key words: Brassinosteroids, Chilling, Tomato, Proline, Phospholipase D, Lipoxygenase