

مقاله پژوهشی

کاهش آسیب سرمازدگی، پوسیدگی و افزایش عمر انبارمانی میوه انار رقم ملس ساوه با تیمار L-آرژنین

سیدمحمد حسینی ملا^۱، سیمه رستگار^{۲*}، ولی‌اله قاسمی‌عمران^۳ و اورنگ خادمی^۴

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱/۱۹ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۳/۲۳)

چکیده

انار از میوه‌های نیمه‌گرمسیری است که در ایران بصورت تجاری کشت می‌شود. از مهم‌ترین عوامل در کاهش کیفیت انار در زمان انبارمانی، آسیب سرمازدگی است. در این پژوهش کارایی تیمار غوطه‌وری در L-آرژنین بر میزان پوسیدگی، تولید اتیلن و فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانی میوه انار رقم ملس ساوه طی مدت ۱۲۰ روز نگهداری در دمای 4 ± 1 درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی حدود ۸۵-۸۰ ارزیابی شد. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی با ۳ تکرار به ازای هر تیمار بود. نتایج نشان داد که تیمار L-آرژنین باعث کاهش نشت یونی و آسیب سرمازدگی میوه انار گردید و همچنین میزان تولید اتیلن، توسعه پوسیدگی و افزایش پراکسید هیدروژن و پلی‌فنل‌اکسیداز پوست را مهار کرد. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، اسکوربات پراکسیداز، فنیل‌آلانین‌آمونیا لیاز در بافت پوست میوه انار تیمار شده با L-آرژنین افزایش یافت. این نتایج نشان داد که تیمار L-آرژنین مجموعه‌ای از پاسخ‌های فیزیولوژیکی را برای تأخیر در قهوه‌ای شدن پوست و بهبود کیفیت انبارمانی انار تحریک می‌کند. در مجموع، این یافته‌ها نشان داد که تیمار L-آرژنین (۱ میلی‌مولار) یک روش مفید برای بهبود کیفیت و به تأخیر انداختن سرمازدگی پس از برداشت میوه انار بوده و مسیر آنتی‌اکسیدانی نقش مهمی در این روند بازی می‌کند.

کلمات کلیدی: اتیلن، اسکوربات پراکسیداز، فنیل‌آلانین‌آمونیا لیاز، قهوه‌ای شدن، کیفیت پس از برداشت

۱- دانشجوی دکتری گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.

۲- دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.

۳- استادیار پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری طبهرستان، ساری، ایران.

۴- استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران.

* پست الکترونیک: rastegarhort@gmail.com

مقدمه

انار با نام علمی *Punica granatum* L. از مهم‌ترین میوه‌های مناطق نیمه‌گرمسیری است. منشاء آن کشور ایران و افغانستان است که از حدود ۲۰۰۰ سال پیش از میلاد مسیح در این منطقه کشت شده است (اوپارا^۱ و همکاران، ۲۰۱۵). میوه انار سرشار از مواد آنتی‌اکسیدانی (پاداکسندگی) و ترکیبات فنلی مانند فلاونوئیدها، آنتوسیانین، ویتامین C، A و E، فیبرها و مواد معدنی مانند کلسیم، پتاسیم، آهن بوده و نقش بسزایی در سلامتی انسان دارد. به همین دلیل تولید و مصرف این فرآورده باغبانی با اقبال عمومی در سطح جهان روبه‌رو شده و از ارزش تجاری و اقتصادی بالایی برخوردار هست (هولاند^۲ و همکاران، ۲۰۰۹؛ زارعی^۳ و همکاران، ۲۰۱۰). این میوه بر اساس الگوی تولید اتیلن و تنفس به‌عنوان یک میوه نافرارگرا طبقه‌بندی می‌شود و تولید اتیلن کمی دارد. منتهی حساس به حضور اتیلن بوده و اتیلن در کاهش عمر پس از برداشت آن موثر می‌باشد و منجر به تسریع فرآیند پیری و کاهش کیفیت و پازارپسندی در میوه انار می‌گردد (خادمی و همکاران، ۱۳۹۶). به‌دلیل حساسیت میوه انار به سرمازدگی در دماهای کمتر از ۵ درجه سانتی‌گراد، استفاده از سردخانه با ضایعات کمی و کیفی در مقیاس اقتصادی همراه خواهد بود (ا قدم^۴ و همکاران، ۲۰۲۰). در حالی که با اعمال تیمارهای مناسب پس از برداشت می‌توان ظاهر و کیفیت میوه لنار را حفظ و با عرضه میوه مطلوب این محصول به بازارهای مصرف داخلی و خارجی (در خارج از فصل تولید)، بهره‌وری اقتصادی بیشتری عاید کشور نمود. استفاده از مواد شیمیایی مختلفی جهت کنترل سرمازدگی و حفظ کیفیت میوه لنار مورد توجه محققان قرار گرفته است مانند کاربرد پلی‌آمین (میردهقان^۵ و همکاران، ۲۰۰۷)، سالیسیلیک اسید (سیاری^۶ و همکاران، ۲۰۰۹)، اگزالیک اسید (سیاری و همکاران، ۲۰۱۰)، سالیسیلیک ترکیب با کیتوزان^۷ (سیاری و همکاران،

۲۰۱۶)، فیلم و پوشش خوراکی کربوکسی‌متیل سلولوز و کیتوزان ترکیب با مالیک اسید و اگزالیک اسید (احتشامی^۸ و همکاران، ۲۰۱۹) و ملاتونین (جنتی‌زاده^۹، ۲۰۱۹؛ ا قدم و همکاران، ۲۰۲۰).

در دهه اخیر محققان تشویق به یافتن روش‌های ایمن جهت کاهش صدمات ناشی از سرمازدگی میوه انار حین انبار سرد شده‌اند (جنتی‌زاده، ۲۰۱۹). اخیراً کاربرد تیمار L-آرژنین^{۱۰} به‌عنوان روشی ایمن جهت کنترل سرمازدگی، کاهش پوسیدگی و حفظ کیفیت محصولات باغی نظر محققان را بخود اختصاص جلب کرده است (شو^{۱۱} و همکاران، ۲۰۲۰). آرژنین یک آمینو اسید متابولیکی با نسبت نیتروژن به کربن بالا است که در واحدهای ساختاری پروتئین گیاهان و حیوانات شرکت می‌کند (گولدرایج و پولاکسو^{۱۲}، ۲۰۰۰؛ جوبولوت^{۱۳} و همکاران، ۲۰۰۸). علاوه بر عنصر سازنده چندین پروتئین در تعدادی از فرآیندهای متابولیک به‌عنوان پیش‌ماده بیوسنتز اکسید نیتریک، پلی‌آمین‌ها، اسید آمینوبوتیریک، آگماتین، پرولین و گلوتامات نقش دارد (چن^{۱۴} و همکاران، ۲۰۰۴؛ جوبولوت و همکاران، ۲۰۰۸؛ گائو^{۱۵} و همکاران، ۲۰۰۹). تحقیقات پیشین نشان داد که اکسید نیتریک و پلی‌آمین‌ها (دارای پیش‌ماده مشابهی هستند) سبب کاهش تولید و عمل اتیلن می‌گردند. فعالیت آرژنین دکربوکسیلاز^{۱۶} (ADC) تحت تأثیر کاربرد بیرونی پلی‌آمین قرار می‌گیرد و با تأثیر بر آنزیم‌هایی که در بیوسنتز اتیلن دخالت دارند، منجر به تأخیر در پیری میوه می‌شود (شارما^{۱۷} و همکاران، ۲۰۱۷). در گیاهان، آرژنین هم برون‌زا و هم درون‌زا نقش مهمی در پاسخ به تنش گیاه مانند سرما، شوری و بیماری‌ها دارند (نسیبی^{۱۸} و همکاران، ۲۰۱۱؛ ژنگ^{۱۹} و همکاران، ۲۰۱۱). اثرات مثبت کاربرد تیمار پس از برداشت L-آرژنین در کاهش آسیب سرمایی و حفظ کیفیت پس از برداشت در محصولاتی مانند خیار (حسن^{۲۰} و همکاران، ۲۰۲۰)، توت‌فرنگی (شو و همکاران، ۲۰۲۰)، مارچوبه (وانگ^{۲۱} و

12. Goldraj and Polacco
13. Jubault
14. Chen
15. Gao
16. Arginine decarboxylase
17. Sharma
18. Nasibi
19. Zheng
20. Hasan
21. Wang

1. Opara
2. Holland
3. Zarei
4. Aghdam
5. Mirdehghan
6. Sayyari
7. Salicyloyl chitosan
8. Ehteshami
9. Jannatizadeh
10. L-arginine
11. Shu

میوه‌های انار رقم ملس ساوه در مرحله بلوغ تجاری به‌طور تصادفی از تمام قسمت‌های درختان انار ۱۰ ساله موجود در باغ تجاری واقع در حوالی دشت ناز شهرستان ساری (شرکت تعاونی گل‌انار صاحبی) دست‌چین شدند. یک روز پس از برداشت میوه‌های دارای نقایصی مانند ترک‌خوردگی، زخم و آفتاب سوختگی حذف شدند. میوه‌ها تقریباً یک شکل و یکدست با آب شیر شسته شدند تا آلودگی‌های سطح آن‌ها پاک شود. سپس تعداد ۱۸۰ عدد میوه، به‌طور تصادفی در سه گروه تیماری با سه تکرار به ازای هر تیمار و ۵ عدد میوه در هر تکرار، در محلول‌های L-آرژنین ۱ و ۲ میلی‌مولار به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد غوطه‌ور شدند. میوه‌های تیمار شاهد در آب مقطر غوطه‌ور شدند. پس از اعمال تیمار، میوه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق خشک شدند. نمونه‌ها در جعبه‌های پلاستیکی روباز قرار گرفتند و به سردخانه با دمای 4 ± 1 درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی حدود ۸۵-۸۰ درصد، برای مدت ۱۲۰ روز منتقل شدند. ارزیابی صفات مد نظر در آزمایشگاه پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان ساری انجام گردید. نمونه‌گیری از میوه در طی دوره انبارمانی به‌فواصل ۴۰ روزه انجام شد (به ترتیب ۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۲۰ روز). در هر مرحله، پس از خروج از سردخانه به مدت ۳ روز در دمای اتاق، به‌عنوان عمر قفسه‌ای قرار گرفتند تا نشانه و اثرات آسیب‌سرمازدگی ظاهر و بررسی شوند.

شاخص‌های مورد ارزیابی

نشت یونی (الکترولیت) پوست

از پوست میوه انار تعداد ۶ عدد دیسک مدور به قطر ۱۰ میلی‌متر به ازای هر واحد آزمایشی بوسیله پانچ دستی تهیه شد و بر اساس روش مک‌کلوم و مک‌دونالد^۵ (۱۹۹۱) با استفاده از اتوکلاو، شیکر و دستگاه هدایت‌سنج الکتریکی (مدل ۶۶۴ Metrohm, Swiss) در دو مرحله نشت اولیه و نشت ثانویه قرائت گردید. با استفاده از رابطه (۱) درصد نشت یونی محاسبه گردید.

رابطه (۱) $\times 100$ [هدایت الکتریکی ثانویه /

هدایت الکتریکی اولیه] = درصد نشت یونی

همکاران، ۲۰۱۷) و گوجه‌فرنگی (ژانگ^۱ و همکاران، ۲۰۱۳) نشان داده شده است.

امروزه L-آرژنین به‌عنوان افزودنی غذایی بی‌خطر برای استفاده انسان به رسمیت شناخته شده است (حسن و همکاران، ۲۰۲۰؛ شو و همکاران، ۲۰۲۰)، همان‌طور که توسط ویلس و لی^۲ (۲۰۱۶) برای تأخیر در قهوه‌ای شدن و افزایش انبارمانی قطعات تازه بریده سیب و کاهو استفاده شده است و بطور موثری سبب کاهش آسیب‌سرمازدگی و میزان قهوه‌ای شدن قارچ خوراکی (لی^۳ و همکاران، ۲۰۱۹)، گوجه‌فرنگی (ژانگ و همکاران، ۲۰۱۷)، کلم گل (سهیل^۴ و همکاران، ۲۰۲۱) و سیب‌زمینی (علی^۵ و همکاران، ۲۰۱۶) گردید. بنابراین، استفاده از آن در صنعت میوه و سبزیجات در جهان بدون هیچ‌گونه خطرات احتمالی برای سلامتی امری ایمن تلقی می‌شود و به‌نظر می‌رسد به‌دلیل وضعیتی که به‌طور کلی به‌عنوان بی‌خطر و ایمن^۶ در نظر گرفته می‌شود، توسط سازمان‌های نظارتی قابل قبول است (حسن و همکاران، ۲۰۲۰). با وجود این، تحقیقات محدودی در مورد کاربرد این اسیدآمین برای حفظ کیفیت و افزایش عمر پس از برداشت محصولات باغی وجود دارد. اخیراً، بلبالار^۷ و همکاران (۲۰۱۸) گزارش دادند که وقتی سه بار با فاصله ۲۰ روز، تا قبل از برداشت تجاری، برگ و میوه در حال رشد انار با آرژنین محلول‌پاشی شد و همان میوه‌ها دوباره در پس از برداشت تیمار گردیدند، ویژگی‌های کمی و کیفی میوه‌ها در مقایسه با میوه شاهد بهبود یافت و سرمازدگی تقلیل پیدا کرد. با این حال، تاکنون هیچ اطلاعاتی در مورد مکانیزم تیمار غوطه‌وری پس از برداشت L-آرژنین در میوه و تأثیر آن بر تولید اتیلن، پوسیدگی پس از برداشت و کیفیت میوه انار در دسترس نیست. از این رو هدف از پژوهش حاضر، بررسی اثر بالقوه L-آرژنین برای کاهش آسیب‌سرمازدگی و حفظ کیفیت میوه انار رقم ملس ساوه که در شهرستان ساری پرورش یافته، انجام شده است.

مواد و روش‌ها

نمونه میوه و تیمارها

5. Ali
6. Generally Recognized as Safe (GRAS)
7. Babalar
8. McCollum and McDonald

1. Zhang
2. Wills and Li
3. Li
4. Sohail

شاخص آسیب سرمازدگی^۱

وجود نشانه‌های مربوط به نقاط فرورفته با رنگ قهوه‌ای و قهوه‌ای شدن پوست و پره‌ها به‌عنوان علائم قابل مشاهده خسارت سرمازدگی در نظر گرفته شد و با توجه به درصد آسیب دیدگی در ۴ مقیاس درجه‌بندی و امتیازبندی شدند: میوه بدون علائم خسارت سرمازدگی امتیاز صفر، بیشتر از ۱٪ و کمتر یا مساوی ۲۵٪ از سطح میوه دارای خسارت سرمازدگی امتیاز یک، بیشتر از ۲۶٪ و کمتر یا مساوی ۵۰٪ از سطح میوه دارای علامت آسیب دیدگی امتیاز دو، بیشتر از ۵۱٪ از سطح میوه دارای علامت آسیب دیدگی امتیاز سه نمره‌دهی شد و شاخص آسیب سرمازدگی با استفاده رابطه (۲) برای هر تکرار محاسبه گردید (سیاری و همکاران، ۲۰۰۹):

$$\text{رابطه (۲)} = \frac{\text{تعداد کل} \times (\text{تعداد میوه مربوط به آن}) \times (\text{سرمازدگی درجه})}{\text{میهوها} \times ۴}$$

ارزیابی شاخص پوسیدگی^۲

با مشاهده منطقه پوسیده شده (وجود پرگنه‌های کپک) روی سطح هر میوه به‌عنوان علائم آلودگی میوه در نظر گرفته شد. شدت پوسیدگی میوه به‌صورت مشاهده‌ای به پنج مقیاس تقسیم‌بندی شد (اقدام و فرد^۳، ۲۰۱۷). درجه شامل صفر: سطح بدون علامت پوسیدگی است، یک: ۱-۲۵٪ سطح میوه دارای علائم پوسیدگی و وجود پرگنه، دو: ۲۶-۵۰٪ سطح میوه دارای علائم پوسیدگی، سه: ۵۱-۷۵٪ سطح میوه دارای علائم پوسیدگی و وجود پرگنه، چهار: بیشتر از ۷۵٪ سطح میوه دارای علائم پوسیدگی، درجه‌بندی شد و در نهایت شاخص شدت پوسیدگی با استفاده از رابطه (۳) برآورد شد: رابطه (۳)

$$\text{رابطه (۳)} = \frac{\sum (\text{شاخص شدت پوسیدگی میوه} \times \text{تعداد})}{\text{تعداد کل میوه در هر درجه پوسیدگی} \times (\text{پوسیدگی کل میوه در هر تکرار} \times ۵)}$$

تولید اتیلن میوه

سه میوه از هر تکرار به‌طور تصادفی برای اندازه‌گیری تولید اتیلن انتخاب شد. میوه‌ها را در ظرف سربسته (۳۰۰۰ میلی‌لیتری) مجهز به یک سپتوم لاستیکی برای جمع‌آوری

گازها برای ۲۴ ساعت نگهداری شدند (حسینی ملا و همکاران، ۱۳۹۴). جهت شناسایی یک میلی‌لیتر از نمونه گاز توسط یک سرنگ همیلتون از فضای بالایی ظرف برداشته شد و برای اندازه‌گیری غلظت اتیلن با استفاده از دستگاه کروماتوگراف گازی (GC؛ Shimadzu 102، مدل ۲۰۱۴، کیوتو، ساخت ژاپن) با روش بسته استفاده شد. N₂ به‌عنوان گاز حامل استفاده شد. از رابطه (۴) برای محاسبه کمی مقدار تولید اتیلن استفاده گردید (سیاری و همکاران، ۲۰۱۶).

$$\text{رابطه (۴)} = \frac{(V_{\text{jar}} - V_{\text{fruit}}) / (W_{\text{fruit}} \times T \times 1000) \times (\text{Sample Area}) \times 50 / \text{Standard Area}}{\text{W}_{\text{fruit}} \text{ (mL) حجم ظرف میوه}} \times \frac{V_{\text{fruit}} \text{ (Kg) حجم میوه}}{T \text{ (mL) مدت زمان نگهداری میوه}} \times \frac{\text{Sample Area} \text{ (h) عدد قرائت شده توسط دستگاه}}{\text{Standard Area} \text{ عدد قرائت شده توسط دستگاه}} \times \frac{\text{GC}}{\text{توزیع شده است. نتایج به صورت nmol/kg/h بیان شدند.}}$$

اندازه‌گیری تجمع پراکسید هیدروژن^۴ پوست میوه
برای اندازه‌گیری میزان پراکسید هیدروژن (H₂O₂) پوست انار از روش ولیکووا^۵ و همکاران (۲۰۰۰) استفاده شد. میزان جذب محتویات درون لوله‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (طیف سنج نوری) در طول موج ۳۹۰ نانومتر خوانده شد. میزان H₂O₂ موجود در بافت پوست بر پایه نمودار استاندارد تهیه و مقدار H₂O₂ از روی آن برآورد شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های کاتالاز^۶، سوپراکسید دیسموتاز^۷ و اسکوربات پراکسیداز^۸ پوست میوه
مقدار پروتئین بافت با روش ابی^۹ (۱۹۸۴) و مقدار فعالیت کاتالاز (CAT) پوست با توجه به روش چنس و ماهلی^{۱۰} (۱۹۵۵) مورد سنجش قرار گرفت. به‌منظور اندازه‌گیری فعالیت آنزیم CAT با افزودن ۷۵ میکرولیتر عصاره آنزیم خام به محیط واکنش حاوی ۱۸۰۰ میکرولیتر ۵۰ میلی‌مولار بافر فسفات پتاسیم (pH=۷) و ۹۱۵ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۳۰ درصد بود. از بین رفتن H₂O₂ با ثبت مقدار جذب در ۲۴۰ نانومتر در یک دقیقه به فواصل ۲۰

6. Catalase (CAT)
7. Superoxide dismutase (SOD)
8. Ascorbate peroxidase (APX)
9. Aebi
10. Chance and Maehly

1. Chilling injury
2. Decay index
3. Aghdam and Fard
4. Hydrogen peroxide (H₂O₂)
5. Velikova

نانومتر اندازه‌گیری شد. آماده‌سازی آنزیم خام مخلوط شده با L-فنیل‌آلانین با انکوباسیون زمان صفر بود. فعالیت آنزیمی خاص به‌عنوان میلی‌گرم اسید سینامیک تولید شده در ساعت (mg cia/h.g.FW) با رسم منحنی استاندارد سیانامیک بیان شد.

فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز (PPO) پوست میوه انار بر اساس روش توصیف شده توسط خادمی^۵ و همکاران (۲۰۱۳) با برخی تغییرات اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش حاوی ۳۰۰۰ میکرولیتر ۵۰ میلی‌مولار بافر فسفات‌پتاسیم (pH=۷)، ۵۰ میکرولیتر محلول پیروگالول (۱۰ میلی‌مولار) و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیم بود. افزایش جذب در ۴۲۰ نانومتر و به‌مدت ۲ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر ثبت شد. یک واحد فعالیت آنزیمی PPO به‌عنوان میزان آنزیمی که باعث افزایش میزان جذب در طول موج ۴۲۰ نانومتر در دقیقه تحت شرایط سنجش می‌شود، تعریف شد. در نهایت میزان فعالیت آنزیم PPO بصورت U/gr.protein بیان شد.

طرح آزمایش و واکاوی آماری

آزمایش به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح کامل تصادفی با ۳ تکرار به‌ازای هر تیمار بود. فاکتورهای آزمایش عبارت بودند از: تیمار L-آرژنین (در سه سطح) و زمان نمونه‌برداری (برای ارزیابی شاخص سرمازدگی و تولید اتیلن میوه در ۳ سطح: ۴۰، ۸۰ و ۱۲۰ روز پس از انبارداری و برای ارزیابی بقیه پارامترها در ۴ سطح: شامل روز صفر و پس از ۴۰، ۸۰ و ۱۲۰ روز انبارداری) بودند. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS (V.9.1.3) و مقایسه میانگین با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد انجام شد و نمودارها با استفاده از نرم افزار اکسل ترسیم و نتایج تفسیر شدند.

نتایج و بحث

نتایج بدست آمده از جداول تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تمامی پارامترهای مورد اندازه‌گیری تحت تأثیر تیمار L-آرژنین، زمان انبارداری و برهم‌کنش تیمارهای اعمال شده قرار گرفتند (جدول ۱ و ۲).

ثابتهای تعیین شد. یک واحد فعالیت آنزیمی به‌عنوان ۰/۱ تغییر جذب در دقیقه و به‌عنوان U/mg. protein تعریف شد. فعالیت آنزیم اسکوربات پراکسیداز (APX) پوست با استفاده از روش رانیری^۱ و همکاران (۲۰۰۳) تعیین شد. برای تعیین APX، مخلوط واکنش حاوی ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیم خام در ۱۱۰۰ میکرولیتر ۵۰ میلی‌مولار بافر فسفات‌پتاسیم (pH=۷)، ۱۱۰۰ میکرومول اسیداسکوربیک ۰/۱ میلی‌مولار، ۶۰۰ میکرولیتر از EDTA ۰/۱ میلی‌مولار و ۵۰۰ میکرولیتر ۰/۱ میلی‌مولار H₂O₂ بود. فعالیت APX با اندازه‌گیری میزان جذب در ۲۹۰ نانومتر پس از ۱ دقیقه واکنش ارزیابی شد. یک واحد فعالیت آنزیمی APX به‌عنوان آنزیمی که ۱ میکرومول اسکوربات در دقیقه اکسید می‌کند. فعالیت ویژه آنزیم APX به‌عنوان پروتئین U/mg. protein تعریف شد.

فعالیت آنزیمی سوپراکسید دیسموتاز (SOD) پوست میوه انار با استفاده از روش توصیف شده توسط بیچامپ و فریدوویچ^۲ (۱۹۷۱) ارزیابی شد. مخلوط واکنش (۳ میلی لیتر) حاوی ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیم خام در ۵۰ میلی مولار بافر فسفات‌پتاسیم (pH=۸/۷)، به‌مراه ۱ میلی‌مولار نیتروبلوتترازولیوم (NBT)، ۰/۲ میلی‌مول ریبوفلاوین، ۰/۱ میلی‌مول EDTA و ۲۰ میلی‌مول متیونین بود. در دمای محیط میزان جذب در ۵۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. یک واحد فعالیت SOD به‌عنوان مقدار آنزیمی که باعث کاهش ۵۰ درصدی NBT شد، محاسبه شد و فعالیت ویژه SOD به‌عنوان U/gr. protein تعیین شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیا لیاز^۳ و

پلی‌فنل اکسیداز^۴ پوست میوه

در این روش از فنیل‌آلانین به‌عنوان پیش‌ماده آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیا لیاز (PAL) استفاده شد و فعالیت آنزیم بر حسب مقدار جذب ترانس سینامیک اسید در ۲۹۰ نانومتر تخمین زده شد. فعالیت این آنزیم طبق روش آسیس^۵ و همکاران (۲۰۰۱) با اندکی تغییر اندازه‌گیری گردید. مخلوط واکنش (۳ میلی‌لیتر) حاوی عصاره آنزیم (۰/۵ میلی‌لیتر) با ۵۰ میلی‌مولار بافر بورات سدیم (pH=۸/۸) و ۵۰۰ میکرولیتر ۲۰ میکرومولار لیتر فنیل‌آلانین به‌مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. واکنش اضافه‌کردن با ۱۰۰ میکرولیتر HCl (۶ نرمال) متوقف شد و جذب در ۲۹۰

4. Polyphenol oxidase (PPO)
5. Assis
6. Khademi

1. Ranieri
2. Beauchamp and Fridovich
3. Phenylalanine ammonia lyase (PAL)

جدول ۱- تجزیه واریانس داده‌ها در رابطه با اثر L-آرژنین و زمان انبارمانی بر صفات اندازه گیری شده میوه انار رقم ملس ساوه

میانگین مربعات (M.S)						منبع تغییر S.V
تولید اتیلین	شدت پوسیدگی	شاخص سرمازدگی	درجه آزادی	درجه آزادی	نشت یونی	
۰/۰۰۱۸**	۲۲۴۹/۳**	۴۰۶۸/۷**	۲	۱۳۹۴/۶**	۳	زمان انبارمانی
۰/۰۰۰۱**	۱۴۵/۳۴**	۱۳۰۰**	۲	۵۶۰/۲۶**	۲	تیمار L-آرژنین
۰/۰۰۰۰۲**	۲۹/۳۳**	۴۳/۷۵**	۴	۶۹/۰۰۱**	۶	برهم‌کنش زمان * تیمار
۰/۰۰۰۰۰۰۱	۴/۳۳	۶/۸۸	۱۸	۱۰/۹۱۱	۲۴	خطا
۱/۷۰۲	۱۳/۱۹	۷/۴۹	-	۶/۰۴۰		ضریب تغییرات (/)

** و * به ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح ۱ و ۵ درصد

شاخص آسیب سرمازدگی

اثر اصلی تیمار، زمان و اثر برهم‌کنش آن‌ها بر شاخص آسیب سرمازدگی میوه در سطح یک درصد معنی‌دار گردید (جدول ۱). در این آزمایش میزان آسیب سرمازدگی به‌صورت هر ۴۰ روز اندازه‌گیری شد که نتایج شاخص سرمازدگی پوست در شکل ۱ ب قابل مشاهده است. بر اساس این نتایج، نمونه شاهد دارای بیشترین میزان آسیب سرمازدگی پوست در تمامی دوره‌های انبارمانی می‌باشد و در روزهای مختلف از آزمون نیز میان غلظت‌های مختلف L-آرژنین اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($P < 0.01$). بهترین سطح در کاهش خسارت سرمازدگی (تأخیر در قهوه‌ای شدن پوست) با L-آرژنین ۱ میلی‌مولار حاصل گردید. یکی از مهم‌ترین عارضه‌های میوه انار طی مدت نگهداری در انبار سرد، سرمازدگی می‌باشد. در این تحقیق تیمار غوطه‌وری L-آرژنین بخوبی توانست آسیب سرمازدگی میوه انار را کاهش دهد. این نتایج مطابق با تحقیقات شو و همکاران (۲۰۲۰) در توت‌فرنگی، بلبلار همکاران (۲۰۱۸) در انار و ویلس و لی (۲۰۱۶) در قطعات تازه بریده سیب گرانی اسمیت می‌باشد.

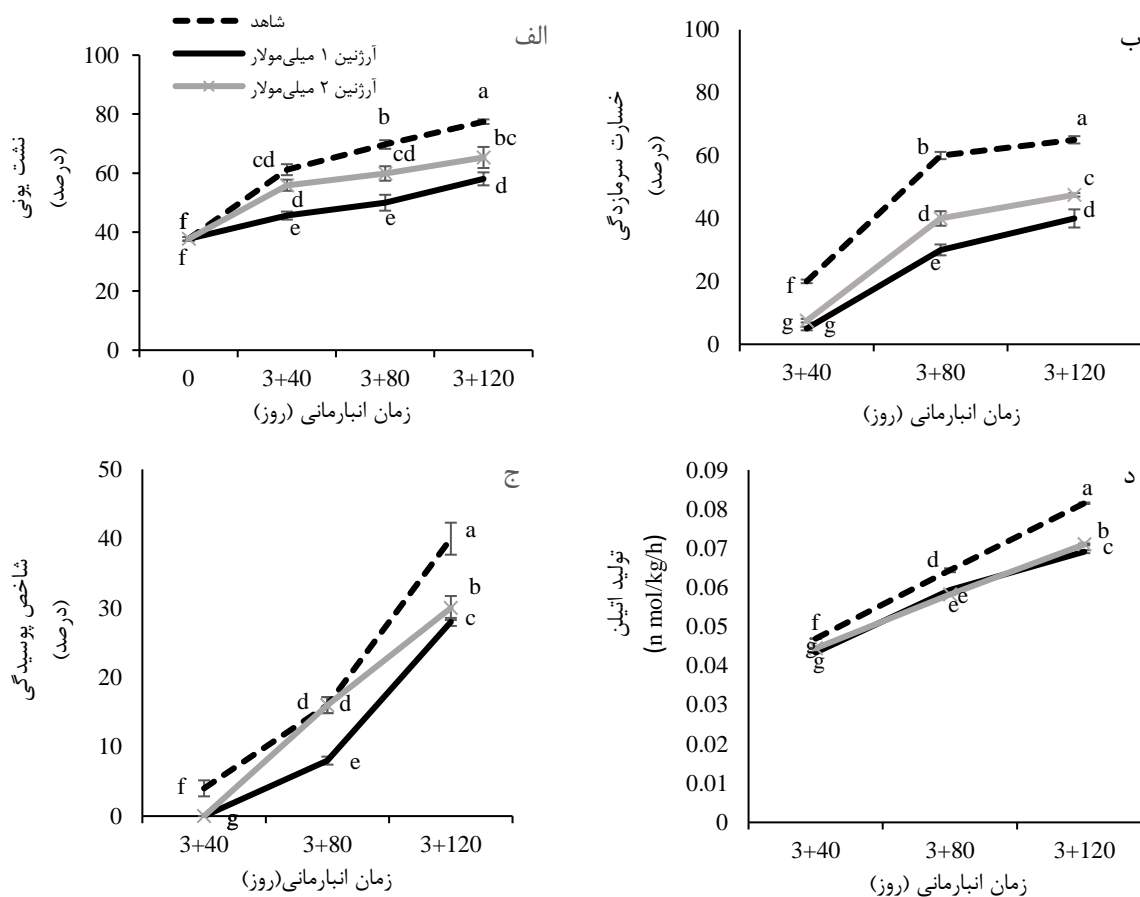
همچنین علی و همکاران (۲۰۱۶) در سیب‌زمینی، لی و همکاران (۲۰۱۹) در قارچ خوراکی و سوهیلا و همکاران (۲۰۲۱) در کلم گل گزارش دادند، کاربرد تیمار L-آرژنین منجر به کاهش قهوه‌ای‌شدن که از علائم ظاهری سرمازدگی بافت محصول، شد. تحقیقات پیشین نشان داد تیمار L-آرژنین از طریق فعالیت آنزیم‌های مختلفی سبب تولید پلی‌آمین‌ها، پرولین و نیتریک‌اکسید می‌شود که این ترکیبات خود مولکول‌های سیگنال می‌باشند که نقش بارزی در افزایش تحمل به خسارت سرمازدگی در محصولات باغبانی ایفاء می‌کنند (چن و همکاران، ۲۰۰۴؛

جوبولوت و همکاران، ۲۰۰۸؛ گائو و همکاران، ۲۰۰۹؛ ژانگ و همکاران، ۲۰۱۳).

نشت الکترولیت‌های پوست

نتایج جدول تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان می‌دهد که تأثیر تمامی فاکتورهای در سطح احتمال یک درصد بر مقدار نشت الکترولیت‌های پوست معنی‌دار است. مقایسه نتایج مربوط به میزان نشت الکترولیت‌های پوست میوه انار تیمار شده با غلظت‌های مختلف L-آرژنین نشان داد که با افزایش زمان نگهداری، تمامی نمونه‌ها به‌طور پیوسته افزایش نشت الکترولیتی ناشی از تنش سرمایی و آسیب غشاء را داشتند (شکل ۱ الف). بعد از پایان زمان انبارداری بیشترین میزان نشت یونی (۷۷٪/۴) در نمونه شاهد و کمترین آن (۵۸٪/۵) در نمونه‌های تیمار ۱ میلی‌مولار آرژنین مشاهده گردید. بنابراین تیمار کردن نمونه‌ها با L-آرژنین اثر مثبتی بر کاهش نشت یونی پوست میوه نسبت به تیمار شاهد داشت که با نتایج ژانگ و همکاران (۲۰۱۰) در میوه گوجه‌فرنگی مطابقت دارد. در چنین گزارشی بیان شد که تیمار L-آرژنین با کاهش واکنش‌های اکسیداتیو در غشای سلولی، نشت الکترولیت را به‌طور قابل توجهی کاهش می‌دهد. سرمازدگی باعث انتقال مستقیم فاز غشایی از حالت کریستالی مایع به جامد و سخت می‌شود که در پی آن منجر به کاهش نفوذپذیری انتخابی غشاءها می‌گردد (آغدم و همکاران، ۲۰۱۳).

از آنجایی که آرژنین پیشرو در سنتز پلی‌آمین‌ها و نیتریک‌اکساید است، کاهش خسارت سرمازدگی و نشت یونی در میوه انار تحت تیمار با L-آرژنین ممکن است به‌دلیل تجمع بیشتر پلی‌آمین و نیتریک‌اکساید درون‌زا باشد. بدیهی است که پلی‌آمین‌های درون‌زا به‌دلیل اتصال به فسفولیپیدهای غشایی و ظرفیت مهار ROS برای حفظ



شکل ۱- تأثیر تیمار L-آرژنین بر مقدار نشت یونی (الف)، شاخص خسارت سرمازدگی (ب)، شدت پوسیدگی (ج) و میزان تولید اتیلین (د) میوه انار رقم ملس ساوه در دوره انبارمانی دمای 4 ± 1 درجه سانتی‌گراد سپس ۳ روز نگهداری در ۲۰ درجه سانتی‌گراد. میانگین‌هایی (n=3) با حروف مشترک اختلاف معنی‌داری نسبت به یکدیگر از نظر آزمون دانکن در سطح احتمال ۱٪ ندارند. بارهای روی میانگین معرف خطای استاندارد (SE) است.

حدود ۲۵٪ و ۳۰٪ نسبت به شاهد کاهش مقدار پوسیدگی را نشان دادند ($P < 0.01$). در پایان مدت زمان نگهداری L-آرژنین ۱ میلی‌مولار، موثرترین تیمار در کاهش مقدار شدت پوسیدگی بود. اگرچه گزارشی در خصوص تأثیر آرژنین در پوسیدگی پس از برداشت میوه انار وجود ندارد، در سایر گیاهان نتایج مشابهی بدست آمده است. به‌عنوان مثال کاهش میزان پوسیدگی با اعمال تیمار L-آرژنین توسط گونگ^۱ و همکاران (۲۰۱۷) در مارچوبه، شو و همکاران (۲۰۲۰) در توت‌فرنگی و ژانگ و همکاران (۲۰۱۷) و (۲۰۱۳) در گوجه‌فرنگی، ژانگ و همکاران (۲۰۱۷) استدلال کردند که تیمار گوجه‌فرنگی با L-آرژنین (۱ میلی‌مولار) مقدار بروز و شدت بیماری میوه ناشی از بوتریتیس سینه‌۲ را کاهش داده و سطح بیان ژن PR-1 (که سبب مقاومت گیاه در برابر آلودگی پاتوژن هستند) را

یکپارچگی غشایی بسیار مهم هستند (شو و همکاران، ۲۰۲۰).

شاخص پوسیدگی

با توجه به آنچه در شکل ۱ ج مشاهده می‌شود، پوسیدگی میوه به‌طور معنی‌دار تحت تأثیر تیمار غوطه‌وری با L-آرژنین و زمان انبارمانی قرار گرفت. مقایسه میانگین بین تیمارها، حاکی از آن است که با افزایش زمان انبارمانی شدت پوسیدگی پوست افزایش یافته و تیمارهای اعمال شده سبب کاهش این مقدار طی مدت انبارمانی گردید. اولین نشانه‌های پوسیدگی در ۴۰ روز ابتدایی فقط در تیمار شاهد مشاهده گردید. بعد از آن به مرور زمان مقدار شدت پوسیدگی افزایش یافت. در روز ۸۰ بین تیمار شاهد و غلظت ۲ میلی‌مولار اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. در پایان مدت انبارمانی، L-آرژنین ۱ و ۲ میلی‌مولار به ترتیب

1. Gong

مقایسه با شاهد و ۲ میلی مولار L-آرژنین نشان دادند (شکل ۱ د، $P < 0.01$). در این زمان میزان اتیلن میوه‌های تیمار ۱ میلی مولار L-آرژنین (با میانگین $n \text{ mol/kg/h}$ ۰/۰۶۹)، میزان ۱۴/۸۱٪ نسبت به نمونه شاهد (با میانگین $n \text{ mol/kg/h}$ ۰/۰۸۱) کمتر بود. فاکتور پاسخ اتیلن توسط تیمار آرژنین در میوه انار هنوز بررسی نشده است. تنها مطالعه در مورد اثر کاربرد آن بر میزان تولید اتیلن توسط سوهیلا و همکاران (۲۰۲۱) ارائه شده است. مطابق با این نتایج، سوهیلا و همکاران (۲۰۲۱) نیز گزارش دادند که کاربرد این تیمار سبب کاهش تنفس و تولید اتیلن کلم بروکلی شده و طیف وسیعی از سیستم‌های متابولیکی مرتبط با پیری کلم بروکلی را تحت تأثیر قرار داد. تحقیقات پیشین گواه آن است که آرژنین از طریق حفظ ساختار غشایی و نفوذپذیری انتخابی آن و از طرفی سبب افزایش پلی‌آمین‌های درون‌زا (پوترسین و اسپرمیدین) و نیتریک اکسید شده و پلی‌آمین‌ها از طریق اتصال به غشای سیتوپلاسمی و همچنین به دلیل مختصات آنتی‌اکسیدانی فراوانی که دارند سبب حفظ سیالیت غشای سیتوپلاسمی، کاهش تنش اکسیداتیو و کاهش مقدار پراکسیداسیون لیپیدها می‌شوند و در نتیجه آن‌ها منجر به حفظ کیفیت میوه و کاهش تولید اتیلن و نشست یونی می‌گردند (شنگ^۵ و همکاران، ۲۰۱۶؛ بلبالار و همکاران، ۲۰۱۸). مکانیسم اثرات پلی‌آمین‌ها عمدتاً با کاهش اتیلن یا اصلاح پس از رونویسی آنزیم‌های بیوسنتز اتیلن به جای مهار بازخورد گزارش شده، مرتبط است (شارما و همکاران، ۲۰۱۷) و آرژنین یک پیشرو مشترک برای ترکیبات یاد شده، هستند (جوبولت و همکاران، ۲۰۰۸). چندین آنزیم نقش اساسی در کاتابولیسم آرژنین دارند. ممکن است ارتباط منطقی با میزان پلی‌آمین، نیتریک‌اکساید و پرولین داشته باشد چون آرژنین پیش‌ماده تولید آن‌هاست و با افزایش پلی‌آمین درونی اتیلن کمتری تولید می‌گردد که بیشتر ناشی از تسریع فعالیت دکربوکسیلاز آرژنین (ADC) باشد (شارما و همکاران، ۲۰۱۷؛ شو و همکاران، ۲۰۲۰) که نیاز به بررسی بیشتری دارد. بر اساس نتایج به‌دست آمده، کمترین میزان سرمازدگی، نشست یونی، پوسیدگی و تولید اتیلن میوه انار در غلظت ۱ میلی مولار L-آرژنین در مقایسه با

افزایش داد. مقاومت میوه در برابر عوامل بیماری‌زا مربوط به آنزیم‌های دفاعی از جمله CHI، GLU، PAL و PPO است. تخریب مستقیم دیواره سلولی سبب نفوذ بهتر عوامل بیماری‌زا یا با شروع مستقیم پاسخ دفاعی به عفونت‌های قارچی عمل می‌کند (لیو^۱ و همکاران، ۲۰۱۰). بسیاری از مطالعات نشان داد که نیتریک‌اکساید و پلی‌آمین‌ها فعالیت آنزیم‌های مقاومت در برابر بیماری (CHI، GLU، PAL) را افزایش داده و از پوسیدگی جلوگیری می‌کند (یان^۲ و همکاران، ۲۰۱۹؛ گوپتا^۳ و همکاران، ۲۰۱۳). چندین مطالعه نشان داد که در پاسخ به تنش‌های غیرزنده مختلف، در سلول‌های گیاهان پلی‌آمین تجمع می‌یابد که بیشتر ناشی از تسریع فعالیت آرژنین دکربوکسیلاز (ADC) بود (گروپا و بنویدز^۴، ۲۰۰۸). نیتریک‌اکساید نیز در افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و کاهش فعالیت PPO نقش مهمی ایفاء می‌کند (وانگ و همکاران، ۲۰۱۷). ممکن است از آنجایی که پیش‌ماده آن‌ها مشترک می‌باشد، تیمار با آرژنین سبب افزایش این ترکیبات شده باشد. سطح بالای آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در تأخیر در روند پیری و مقاومت به میوه در برابر حمله پاتوژن دخیل است. در این پژوهش سطح آنزیم آنتی‌اکسیدانی تحت تیمار، بیشتر بود. شو و همکاران (۲۰۲۰) نیز با بررسی اثر L-آرژنین در پس از برداشت توت‌فرنگی گزارش دادند، آنزیم‌های مقاومت در برابر بیماری (CHI، GLU و PAL) در پاسخ به ۱ میلی مولار تیمار L-آرژنین افزایش و شدت پوسیدگی کاهش یافت که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد.

تولید اتیلن میوه

نتایج مقایسه میانگین نشان داد در طی انبارمانی اثرات ساده (اصلی) و متقابل تیمارها بر میزان تولید اتیلن میوه معنی‌دار شد (جدول ۱). میزان اتیلن با افزایش مدت زمان انبارمانی یک روند کند صعودی نشان داد. به‌طوری که بیشترین مقدار اتیلن در تمامی زمان‌های مورد بررسی در تیمار شاهد مشاهده شد. اختلاف معنی‌داری در میزان تولید اتیلن بین میوه‌های تیمار شده با L-آرژنین ۱ و ۲ میلی مولار تا روز ۸۰ دیده نشد. در آخرین روز بررسی یعنی روز ۳+۱۲۰ میوه‌های تیمار شده با غلظت ۱ میلی مولار، بطور معنی‌داری کمترین تولید اتیلن را در

4. Groppa and Benavides
5. Sheng

1. Liu
2. Yan
3. Gupta

جدول ۲- تجزیه واریانس داده‌ها در رابطه با اثر L-آرژنین و زمان انبارمانی بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی پوست میوه انار رقم ملس

ساوه

میانگین مربعات (M.S)							منبع تغییر S.V
فعالیت پلی فنل اکسیداز	فعالیت فنیل آلانین آمونیا لیاز	فعالیت پراکسید هیدروژن	فعالیت آسکوربات پراکسیداز	فعالیت سوپراکسید دیسموتاز	فعالیت کاتالاز	درجه آزادی	
۷۶۳/۶۱۷**	۰/۰۱۱۱*	۸۶۵/۴۸۲**	۴۸۱۲/۲۸**	۱۷۷۵/۰۷**	۹۳/۶۲۸**	۳	زمان انبارمانی
۶۷۹/۵۹۱**	۰/۰۰۲۰**	۴۳۱/۷۲۸**	۸۱۷/۲۸۵**	۹۴۵/۳۳۷**	۳/۴۳۲**	۱	تیمار L-آرژنین
۱۴۲/۵۰۱**	۰/۰۰۰۸**	۷۶/۳۱۴**	۱۶۵/۱۹۱**	۱۱۵/۵۲۰**	۰/۳۸۲**	۳	برهمکنش زمان* تیمار
۰/۱۹۲	۰/۰۰۰۰۱	۳/۲۵۸	۱۳/۲۳۴	۶/۰۴۲	۰/۰۴۲	۱۶	خطای آزمایشی
۰/۹۳۳	۱/۲۸۷	۵/۶۷۸	۵/۵۳۲	۴/۲۶۹	۲/۴۲۷		ضریب تغییرات (%)

ns* و ** به ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح ۱ و ۵ درصد

فعالیت آنزیم‌های SOD و APX پوست تقریباً مشابه بود. در ۴۰ روز ابتدای بررسی تغییرات میزان فعالیت SOD پوست میوه‌های در تیمار ۱ میلی مولار L-آرژنین بسیار کندتر از شاهد طی ۴۰ روز اول بود (شکل ۲ ج ۱/۰۱ P). بعد از آن با شیب بیشتری نسبت به قبل ولی نسبت به شاهد کندتر تا پایان مدت زمان انبارمانی کاهش یافت. بنابراین تمامی نمونه‌های تیمار شده با L-آرژنین میزان فعالیت آنزیمی پوست بیشتری از نمونه شاهد نشان دادند. در این پژوهش اثر ساده تیمار و زمان انبارمانی و اثرات متقابل L-آرژنین با زمان انبارمانی در سطح احتمال یک درصد روی مقدار تولید H_2O_2 پوست معنی‌دار شدند (جدول ۲). نتایج نشان داد با افزایش زمان نگهداری مقدار تجمع H_2O_2 پوست افزایش یافت که در شکل ۲ د نشان داده شده است. همچنین، تیمار L-آرژنین به‌طور معنی‌دار سبب تأخیر در تجمع یا تولید H_2O_2 بافت پوست گردید. بدین صورت که میزان H_2O_2 پوست در زمان شروع انبارداری $19/251 \mu\text{mol/gr}$ بود که در طول مدت نگهداری ۱۲۰ روز فعالیت این آنزیم افزایش یافت، اما این افزایش در میوه‌های شاهد طی تمامی مراحل مورد بررسی، بطور معنی‌داری بیشتر بود (شکل ۲ د). در پایان دوره انبارداری (۱۲۰ روز) میوه‌های غوطه‌ور شده در تیمار ۱ میلی مولار L-آرژنین (با میانگین $38/164 \mu\text{mol/gr}$) حدود $29/62\%$ از H_2O_2 کمتری در مقایسه با شاهد (با میانگین $54/227 \mu\text{mol/gr}$) برخوردار بودند. H_2O_2 ترکیب سمی تولید شده در محصولات در شرایط تنش اکسیداتیو است. آرژنین یکی از متنوع‌ترین اسیدهای آمینه است و نقشی محوری در تنظیم فرآیندهای بیولوژیکی و متابولیکی در گیاهان و حیوانات دارد (شو و همکاران، ۲۰۲۰). در تحقیق حاضر

شاهد مشاهده شد. بنابراین صفات آنزیمی بین شاهد و غلظت بهینه (سطح ۱ میلی مولار) برای تجزیه و تحلیل بیشتر مقایسه شد.

مقدار تجمع H_2O_2 و فعالیت آنزیم‌های CAT، SOD و APX پوست میوه

اثر اصلی تیمار L-آرژنین، زمان انبارمانی و اثرات متقابل آن‌ها بر میزان فعالیت آنزیم‌های فعالیت کاتالاز، فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز آریل در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). مقایسه میانگین بین تیمارها نشان داد که با افزایش مدت زمان انبارمانی میزان فعالیت آنزیم‌های CAT، SOD و APX پوست میوه، کاهش پیدا کرد. به‌طور کلی تیمار غوطه‌وری با ۱ میلی مولار سبب حفظ میزان فعالیت آنزیم‌های یاد شده گردید ($P < 0/01$). کاتالاز به‌طور پیوسته روند کاهشی داشت، اما در هر دوره میزان آن در تیمار L-آرژنین بیشتر از مقدار شاهد بود (شکل ۲ الف). به‌طوری‌که در پایان دوره انبارداری فعالیت آنزیم کاتالاز در پوست میوه‌های شاهد $4/027 \text{ U/mg Protein}$ بود و نسبت به روز شروع انبارداری $70/33\%$ درصد کاهش نشان داد. این در حالی بود که فعالیت آن در پوست میوه تحت تیمار آرژنین تقریباً 5 U/mg Protein بود که حدود $63/17\%$ درصد نسبت به شروع زمان انبارداری کاهش یافت. همانطور که در شکل ۲ ب نشان داده شده است، فعالیت APX پوست در طول زمان کاهش یافت. در آخرین روز بررسی یعنی روز $120+3$ میزان فعالیت APX پوست میوه‌های تیمار ۱ میلی مولار L-آرژنین (با میانگین $46/127 \text{ U/mg Protein}$) $113/71\%$ نسبت به نمونه شاهد (با میانگین $54/227 \text{ U/mg Protein}$) بیشتر بود (شکل ۲ ب). الگوی روند تغییرات

انباشت H_2O_2 کمتر در پوست میوه انار ناشی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان بالا، فعالیت‌های بیشتر CAT، APX و SOD همراه با تولید اتیلن و نشست یونی کمتر می‌باشد. نتایج حاصل از محتوای فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی با یافته‌های لیلبار و همکاران (۲۰۱۸) مطابقت داشت. سطح بالاتر فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی متأثر از کاربرد آرژنین با کاهش مقدار تجمع H_2O_2 و کاهش سرمازدگی ارتباط دارد. علاوه بر این، استفاده برون‌زای L-آرژنین باعث بهبود فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (مانند کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز) می‌شود که نقش مهمی در بهبود آسیب اکسیداتیو با مهار رادیکال‌های آزاد دارند (ال‌حسن و همکاران، ۲۰۲۰). شو و همکاران (۲۰۲۰) گزارش دادند تیمار ۱ میلی‌مولار L-آرژنین محتوای فنلی و آنتوسیانین کل، میزان بیان FaPR1 و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (CAT، POD، SOD و APX) و آنزیم‌های مقاومت در برابر بیماری (PAL، GLU، CHI) در پاسخ به ۱ میلی‌مولار تیمار L-آرژنین افزایش داد. فعالیت‌های بیشتر آنزیم CAT، APX و SOD پوست می‌تواند انباشت H_2O_2 را کاهش دهد (فویر و نکتور^۱، ۲۰۰۵). مطالعات قبلی حاکی از آن بود که آرژنین پیش‌ساز فوری نیتریک‌اکسید (NO) است که در پاسخ گیاهان مانند بهبود مقاومت گیاه، مهار پیری، افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و کاهش فعالیت PPO نقش مهمی ایفا می‌کند (وانگ و همکاران، ۲۰۱۷).

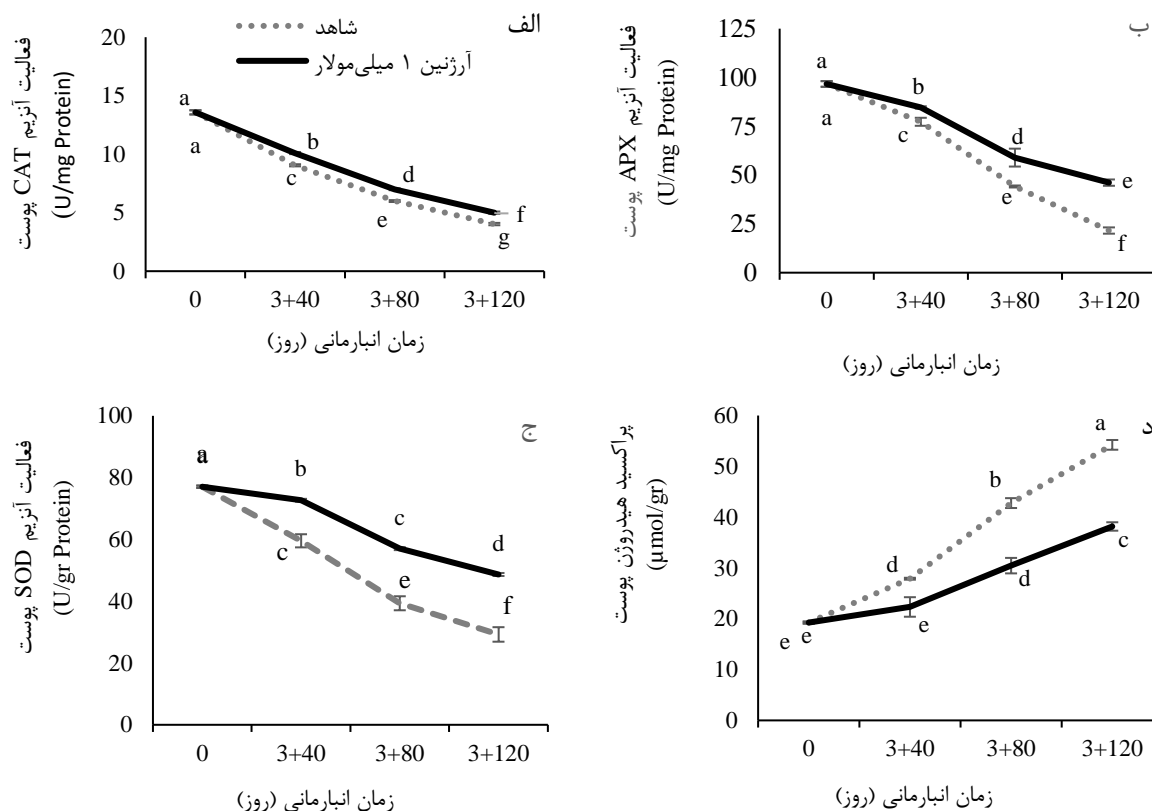
میزان فعالیت آنزیم PAL و PPO پوست میوه

نتایج مربوط به تغییرات فعالیت آنزیم PAL بافت پوست در طول نگهداری در شکل ۳ الف آمده است. با افزایش زمان نگهداری میوه انار، مقدار فعالیت آنزیم PAL بافت پوست به‌طور معنی‌دار کاهش یافت. تمامی نمونه‌های تیمار شده با L-آرژنین میزان فعالیت آنزیمی بیشتری از نمونه شاهد نشان دادند ($P \leq 0.01$). در پایان دوره انبارداری فعالیت آنزیم PAL در پوست میوه‌های شاهد ۰/۲۳۵mg cia/h.g.FW بود که نسبت به روز شروع انبارداری ۰/۳۴/۷۲٪ کاهش نشان داد. این در حالی بود که فعالیت آن در پوست میوه تحت تیمار L-آرژنین تقریباً

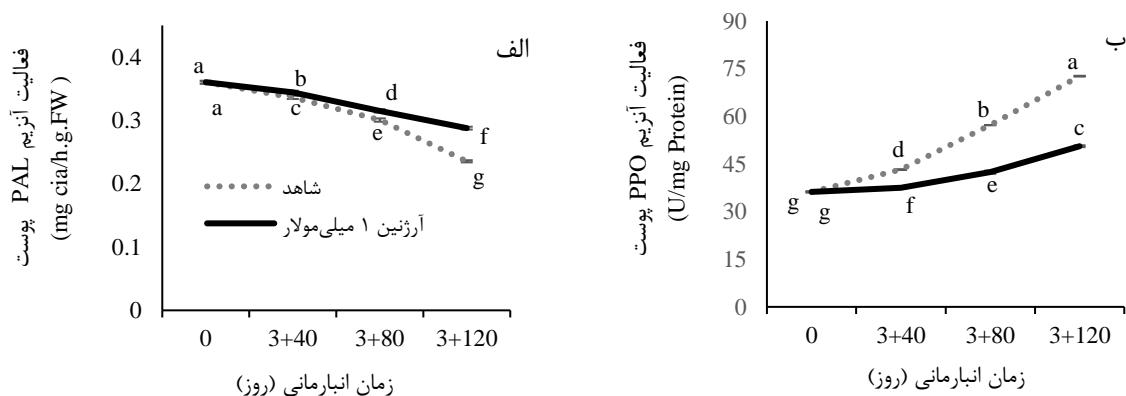
آنزیم نسبت به شاهد شده است. PAL یک آنزیم اصلی در متابولیسم مرتبط با مسیر فنیل پروپانویید است که تبدیل فنیل‌آلانین به اسید ترانس سینامیک را کاتالیز می‌کند و مقدار آن در سلول نقش مهمی در دفاع از بیماری دارد (جو^۲ و همکاران، ۲۰۱۲). فعالیت PAL نقش مهمی در سنتز ترکیبات فنلی دارد. PPO آنزیمی حاوی مس است که در اکسیداسیون ترکیبات فنلی به کینون‌ها شرکت می‌کند که باعث کاهش توسعه عوامل بیماری‌زا در بافت میزبان می‌شود (دیکسون^۳ و همکاران، ۲۰۰۲). طبق گزارش مینگ^۴ و همکاران (۲۰۰۹) در شرایط تنش سرمایی و کاهش یکپارچگی غشاء، فنل‌ها و آنتوسیانین‌ها می‌توانند توسط PPO اکسید شوند و منجر به قهوه‌ای شدن شوند. قهوه‌ای شدن به‌عنوان علایم خسارت سرمازدگی در محصولات باغبانی است. بنابراین هر عاملی که اثرات مهاری بر PPO داشته باشد، می‌تواند محتوای پلی‌فنل‌ها را افزایش دهد. در استحکام یکپارچگی غشاء بالاتر، فنل‌ها نه‌تنها برای خواص مواد مغذی^۵ سبزی‌ها و میوه‌ها مهم بوده بلکه با توجه به ظرفیت جاروبرگری ROS و کمک به سلامت انسان، همچنین می‌تواند با تأخیر در اکسیداسیون اسید چرب غیراشباع غشاء بوسیله مهار آغاز یا انتشار (گسترش) زنجیره اکسید کننده کمک کند (رایورو^۶ و همکاران، ۲۰۰۱؛ کای^۷ و

5. Nutraceutical properties
6. Rivero
7. Kay

1. Foyer and Noctor
2. Joe
3. Dixon
4. Meng



شکل ۲- تأثیر تیمار L-آرژنین بر مقدار فعالیت آنزیم CAT (الف)، APX (ب)، SOD (ج) بخش پوست و مقدار انباشت H_2O_2 (د) پوست میوه انار رقم ملس ساوه در دوره انبارمانی در دمای 1 ± 4 درجه سانتی‌گراد، سپس ۳ روز نگهداری در 20 درجه سانتی‌گراد. میانگین‌هایی با حروف مشترک اختلاف معنی‌داری نسبت به یکدیگر از نظر آزمون دانکن در سطح احتمال ۱٪ ندارند. بارهای روی میانگین معرف خطای استاندارد (SE) است.



شکل ۳- تأثیر تیمار L-آرژنین بر مقدار فعالیت آنزیم PAL (الف) و PPO (ب) پوست میوه انار رقم ملس ساوه در دوره انبارمانی در دمای 1 ± 4 درجه سانتی‌گراد سپس ۳ روز نگهداری در 20 درجه سانتی‌گراد. میانگین‌هایی با حروف مشترک اختلاف معنی‌داری نسبت به یکدیگر از نظر آزمون دانکن در سطح احتمال ۱٪ ندارند. بارهای روی میانگین معرف خطای استاندارد (SE) است.

کارهای کاهش سرمازدگی میوه باشد (سیاری و همکاران، ۲۰۰۹). تحقیقات پیشین نیز افزایش در فعالیت PAL و تجمع فنیل پروپانویدها را در گیاهان سازگار شده با استرس سرمایی را نشان داده‌اند. نتایج تحقیق حاضر با

همکاران، (۲۰۱۷). در مطالعه حاضر، تیمار آرژنین تا حدودی فعالیت آنزیم PAL را افزایش داد که می‌تواند موجب افزایش تجمع فنل کل گردد. افزایش فعالیت PAL ممکن است یکی از سازو

نتیجه‌گیری کلی

استفاده از L-آرژنین در نگهداری و انبارمانی میوه انار موثر واقع گردید. نتایج حاصل از آزمایش نشان داد که تیمار غوطه‌وری L-آرژنین در تحمل سرمازدگی، کاهش تولید اتیلن و شدت پوسیدگی اثر بسزایی داد. یکپارچگی غشاء بالاتر در میوه‌های انار تحت تیمار با L-آرژنین ناشی از فعالیت بیشتر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شامل CAT، SOD، APX و PAL از طرف دیگر فعالیت کمتر آنزیم PPO می‌باشد که در مجموع منجر به کاهش تجمع میزان پراکسید هیدروژن (H_2O_2) پوست شده است. این مطالعه نشان داد که کاربرد تیمار برون‌زای ۱ میلی‌مولار L-آرژنین سبب حفظ کیفیت و بهبود انبارمانی میوه انار رقم ملس ساوه می‌شود. بنابراین می‌تواند به‌عنوان راهکاری در افزایش عمر مفید پس از برداشت میوه انار در دستور کار قرار گیرد.

نتایج بابالار و همکاران (۲۰۱۸) مطابقت دارد. در پژوهشی دیگر پرباساری^۱ و همکاران (۲۰۲۰) گزارش دادند کاربرد L-آرژنین از سنتز ترکیباتی که سبب قهوه‌ای شدن آنزیمی میوه مار (سالاکا) می‌گردد، جلوگیری می‌نماید. گزارش‌های منتشر شده با آرژنین، سیستئین و متیونین به عنوان یک تیمار پس از برداشت، نقش آن‌ها را در حفظ رنگ سبز، افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی و کاهش فعالیت آنزیم‌های اکسیدکننده پلی‌فنل‌اکسیداز (PPO) وجود دارد (سهیل و همکاران، ۲۰۲۱). نتایج پژوهش ما با اثر تیمار با آرژنین برونزا بر کاهش میزان تجمع فنل همراه با کاهش میزان آنزیم PAL و PPO قطعات تازه بریده کلم قرمز مطابقت نداشت (نیلپراپرک^۲، ۲۰۲۰). کاهش قهوه‌ای شدن پوست میوه انار با آرژنین را می‌توان به تولید NO نسبت داد، با توجه به اینکه آرژنین یک پیش‌ماده اولیه بیوسنتز NO است. نقش NO در مهار قهوه‌ای شدن قطعات سیب تازه بریده شده به فعالیت کمتر آنزیم PPO در مقایسه با گروه کنترل نسبت داده شد (هوکیو^۳ و همکاران، ۲۰۱۳).

منابع

- حسینی ملا، س.م.، رضایی، آ.، عسکری سرچشمه، م.ع و خادمی، ا. ۱۳۹۴. اثر محلول پاشی آهن بر برخی خصوصیات کیفی و فیزیولوژیکی میوه هلو (*Prunus persica* CV. Alberta). مجله فرآیند و کارکرد گیاهی، ۴(۱۴): ۱۱۵-۱۲۴.
- خادمی، ا.، حسینی ملا، س.م.، طالعی، د. و سپهوند، ع. ۱۳۹۶. تأثیر اتیلن و ۱-متیل‌سیکلوپروپن بر عمر انبارمانی میوه انار رقم 'ملس یوسف‌خانی'. تولیدات گیاهی، ۴۰(۲): ۲۵-۳۶.
- Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. *Methods in enzymology*, 105: 121-126. Academic Press.
- Aghdam, M.S. and Bodbodak, S. 2013. Physiological and biochemical mechanisms regulating chilling tolerance in fruits and vegetables under postharvest salicylates and jasmonates treatments. *Scientia Horticulturae*, 156: 73-85.
- Aghdam, M.S. and Fard, J.R. 2017. Melatonin treatment attenuates postharvest decay and maintains nutritional quality of strawberry fruits (*Fragaria × ananassa* cv. Selva) by enhancing GABA shunt activity. *Food Chemistry*, 221: 1650-1657.
- Aghdam, M.S., Luo, Z., Li, L., Jannatizadeh, A., Fard, J.R. and Pirzad, F., 2020. Melatonin treatment maintains nutraceutical properties of pomegranate fruits during cold storage. *Food Chemistry*, 303: 125385.
- Ali, H.M., El-Gizawy, A.M., El-Bassiouny, R.E. and Saleh, M.A. 2016. The role of various amino acids in enzymatic browning process in potato tubers, and identifying the browning products. *Food Chemistry*, 192: 879-885.
- Assis, J.S., Maldonado, R., Muñoz, T., Escribano, M.I. and Merodio, C. 2001. Effect of high carbon dioxide concentration on PAL activity and phenolic contents in ripening cherimoya fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 23(1): 33-39.
- Babalar, M., Pirzad, F., Sarcheshmeh, M. A. A., Talaei, A. and Lessani, H. 2018. Arginine treatment attenuates chilling injury of pomegranate fruit during cold storage by enhancing antioxidant system activity. *Postharvest Biology and Technology*, 137: 31-37.

- Beauchamp, C. and Fridovich, I. 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical biochemistry*, 44(1): 276-287.
- Chance, B. and Maehly, A.C. 1955. Assay of catalases and peroxidases. *Methods Enzymol*, 2:764-775.
- Chen, H., McCaig, B.C., Melotto, M., He, S.Y. and Howe, G.A. 2004. Regulation of plant arginase by wounding, jasmonate, and the phytotoxin coronatine. *Journal of Biological Chemistry*, 279(44): 45998-46007.
- Dixon, R.A., Achnine, L., Kota, P., Liu, C.J., Reddy, M.S. and Wang, L. 2002. The phenylpropanoid pathway and plant defence-a genomics perspective. *Molecular Plant Pathology*, 3(5): 371-390.
- Ehteshami, S., Abdollahi, F., Ramezani, A., Dastjerdi, A.M. and Rahimzadeh, M. 2019. Enhanced chilling tolerance of pomegranate fruit by edible coatings combined with malic and oxalic acid treatments. *Scientia Horticulturae*, 250: 388-398.
- Foyer, C.H. and Noctor, G. 2005. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell and Environment*, 28(8): 1056-1071.
- Gao, H.J., Yang, H.Q. and Wang, J.X. 2009. Arginine metabolism in roots and leaves of apple (*Malus domestica* Borkh.): the tissue-specific formation of both nitric oxide and polyamines. *Scientia Horticulturae*, 119(2): 147-152.
- Goldraij, A. and Polacco, J.C. 2000. Arginine degradation by arginase in mitochondria of soybean seedling cotyledons. *Planta*, 210(4): 652-658.
- Gong, J., Chen, B., Dong, H. and Wang, X. 2017. Effects of L-arginine on storage qualities and physio-biochemical characteristics of *Asparagus officinalis* L. *Storage and Process*, 17(1): 7-11.
- Groppa, M.D. and Benavides, M.P. 2008. Polyamines and abiotic stress: recent advances. *Amino acids*, 34(1): 35- 45.
- Gupta, N.S., Banerjee, M., Basu, S.K. and Acharya, K. 2013. Involvement of nitric oxide signal in *Alternaria alternata* toxin induced defense response in *Rauvolfia serpentina* Benth. ex Kurz calli. *Plant Omics*, 6(3): 157-164.
- Hasan, M.U., Rehman, R.N.U., Malik, A.U., Haider, M.W., Ahmed, Z., Khan, A.S. and Anwar, R. 2019. Pre-storage application of L-arginine alleviates chilling injury and maintains postharvest quality of cucumber (*Cucumis sativus*). *International Journal of Horticultural Science and Technology*, 2: 102-108.
- Holland, D., Hatib, K. and Bar-Ya'akov, I. 2009. Pomegranate: Botany, horticulture, breeding. *Horticultural reviews*, 35(2): 127-191.
- Huque, R., Wills, R.B.H., Pristijono, P. and Golding, J.B. 2013. Effect of nitric oxide (NO) and associated control treatments on the metabolism of fresh-cut apple slices in relation to development of surface browning. *Postharvest Biology and Technology*, 78:16-23.
- Jannatizadeh, A. 2019. Exogenous melatonin applying confers chilling tolerance in pomegranate fruit during cold storage. *Scientia Horticulturae*, 246: 544-549.
- Joe, M.M., Islam, M.R., Karthikeyan, B., Bradeepa, K., Sivakumaar, P.K. and Sa, T. 2012. Resistance responses of rice to rice blast fungus after seed treatment with the endophytic *Achromobacter xylosoxidans* AUM54 strains. *Crop Protection*, 42: 141-148.
- Jubault, M., Hamon, C., Gravot, A., Lariagon, C., Delourme, R., Bouchereau, A. and Manzanares-Dauleux, M.J. 2008. Differential regulation of root arginine catabolism and polyamine metabolism in clubroot-susceptible and partially resistant Arabidopsis genotypes. *Plant Physiology*, 146(4): 2008-2019.
- Kay, C.D., Pereira-Caro, G., Ludwig, I.A., Clifford, M.N. and Crozier, A. 2017. Anthocyanins and flavanones are more bioavailable than previously perceived: A review of recent evidence. *Annual Review of Food Science and Technology*, 8: 155-180.
- Khademi, O., Salvador, A., Zamani, Z. and Besada, C. 2013. Effects of hot water treatments on antioxidant enzymatic system in reducing flesh browning of persimmon. *Food and Bioprocess Technology*, 6(11): 3038-3046.
- Li, B., Ding, Y., Tang, X., Wang, G., Wu, S., Li, X., Huang, X., Qu, T., Chen, J. and Tang, X. 2019. Effect of l-arginine on maintaining storage quality of the white button mushroom (*agaricus bisporus*). *Food and Bioprocess Technology*, 12(4): 563-574.
- Liu, B., Xue, X., Cui, S., Zhang, X., Han, Q., Zhu, L., Liang, X., Wang, X., Huang, L., Chen, X. and Kang, Z. 2010. Cloning and characterization of a wheat β -1, 3-glucanase gene induced by the stripe rust pathogen *Puccinia striiformis* f. sp. tritici. *Molecular Biology Reports*, 37(2):1045.

- McCollum, T.G. and McDonald, R.E. 1991. Electrolyte leakage, respiration, and ethylene production as indices of chilling injury in grapefruit. *HortScience*, 26(9): 1191-1192.
- Meng, X., Han, J., Wang, Q. and Tian, S. 2009. Changes in physiology and quality of peach fruits treated by methyl jasmonate under low temperature stress. *Food Chemistry*, 114(3): 1028-1035.
- Mirdehghan, S.H., 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 Biology and Technology*, 44(1): 26-33.
- Nasibi, F., Yaghoobi, M.M. and Kalantari, K.M. 2011. Effect of exogenous arginine on alleviation of oxidative damage in tomato plant underwater stress. *Journal of Plant Interactions*, 6(4): 291-296.
- Nilprapruck, P. 2020. Exogenous arginine treatment for inhibiting browning symptom and improving the quality of fresh-cut red cabbage. *Asia-Pacific Journal of Science and Technology*, 25(2): 1-10
- Opara, U.L., Atukuri, J. and Fawole, O.A. 2015. Application of physical and chemical postharvest treatments to enhance storage and shelf life of pomegranate fruit-A review. *Scientia Horticulturae*, 197: 41-49.
- Prabasari, I., Utama, N.A., Wijayanti, E.P., Hasanah, N.A.U., Riyadi, S. and Hariadi, T.K. 2020. L-Arginine to inhibit browning on fresh-cut salacca (*Salacca edulis* Reinw). In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 458(1): 012027. IOP Publishing.
- Ranieri, A., Castagna, A., Pacini, J., Baldan, B., Mensuali Sodi, A. and Soldatini, G.F. 2003. Early production and scavenging of hydrogen peroxide in the apoplast of sunflower plants exposed to ozone. *Journal of Experimental Botany*, 54(392): 2529-2540.
- Rivero, R.M., Ruiz, J.M., Garcia, P.C., Lopez-Lefebvre, L.R., Sánchez, E. and Romero, L. 2001. Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. *Plant Science*, 160(2):315-321.
- Sayyari, M., Aghdam, M.S., Salehi, F. and Ghanbari, F. 2016. Salicyloyl chitosan alleviates chilling injury and maintains antioxidant capacity of pomegranate fruits during cold storage. *Scientia Horticulturae*, 211: 110-117.
- 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 Biology and Technology*, 53(3):152-154.
- Sayyari, M., Valero, D., Babalar, M., Kalantari, S., Zapata, P.J. and Serrano, M. 2010. Prestorage oxalic acid treatment maintained visual quality, bioactive compounds, and antioxidant potential of pomegranate after long-term storage at 2 C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(11): 6804-6808.
- Sharma, S., Pareek, S., Sagar, N.A., Valero, D. and Serrano, M. 2017. Modulatory effects of exogenously applied polyamines on postharvest physiology, antioxidant system and shelf life of fruits: a review. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(8): 1789.
- Sheng, L., Zhou, X., Liu, Z.Y., Wang, J.W., Zhou, Q., Wang, L., Zhang, Q. and Ji, S.J. 2016. Changed activities of enzymes crucial to membrane lipid metabolism accompany pericarp browning in 'Nanguo' pears during refrigeration and subsequent shelf life at room temperature. *Postharvest Biology and Technology*, 117: 1-8.
- Shi, J., Gao, L., Zuo, J., Wang, Q., Wang, Q. and Fan, L. 2016. Exogenous sodium nitroprusside treatment of broccoli florets extends shelf life, enhances antioxidant enzyme activity, and inhibits chlorophyll-degradation. *Postharvest Biology and Technology*, 116: 98-104.
- Shu, P., Min, D., Ai, W., Li, J., Zhou, J., Li, Z., Zhang, X., Shi, Z., Sun, Y., Jiang, Y. and Li, F. 2020. L-Arginine treatment attenuates postharvest decay and maintains quality of strawberry fruit by promoting nitric oxide synthase pathway. *Postharvest Biology and Technology*, 168: 111253.
- Sohail, M., Wills, R.B.H., Bowyer, M.C. and Pristijono, P. 2021. Beneficial impact of exogenous arginine, cysteine and methionine on postharvest senescence of broccoli. *Food Chemistry*, 338: 128055.
- Velikova, V., Yordanov, I. and Edreva, A. 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. *Plant Science*, 151(1): 59-66.
- Wang, X., Gu, S., Chen, B., Huang, J. and Xing, J. 2017. Effect of postharvest L-arginine or cholesterol treatment on the quality of green asparagus (*Asparagus officinalis* L.) spears during low temperature storage. *Scientia Horticulturae*, 225: 788-794.

- Wills, R.B.H. and Li, Y. 2016. Use of arginine to inhibit browning on fresh cut apple and lettuce. *Postharvest Biology and Technology*, 113: 66-68.
- Yan, B., Zhang, Z., Zhang, P., Zhu, X., Jing, Y., Wei, J. and Wu, B. 2019. Nitric oxide enhances resistance against black spot disease in muskmelon and the possible mechanisms involved. *Scientia Horticulturae*, 256: 108650.
- Zarei, M., Azizi, M. and Bashiri-Sadr, Z. 2010. Studies on physico-chemical properties and bioactive compounds of six pomegranate cultivars grown in Iran. *Journal of Food Technology*, 8(3): 112-117.
- Zhang, X., Min, D., Li, F., Ji, N., Meng, D. and Li, L. 2017. Synergistic effects of L-arginine and methyl salicylate on alleviating postharvest disease caused by *Botrytis cinerea* in tomato fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(24): 4890-4896.
- Zhang, X., Shen, L., Li, F., Meng, D. and Sheng, J. 2013. Amelioration of chilling stress by arginine in tomato fruit: Changes in endogenous arginine catabolism. *Postharvest Biology and Technology*, 76: 106-111.
- Zhang, X., Shen, L., Li, F., Zhang, Y., Meng, D. and Sheng, J. 2010. Up-regulating arginase contributes to amelioration of chilling stress and the antioxidant system in cherry tomato fruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(13): 2195-2202.
- Zheng, Y., Sheng, J., Zhao, R., Zhang, J., Lv, S., Liu, L. and Shen, L. 2011. Preharvest L-arginine treatment induced postharvest disease resistance to *Botrytis cinerea* in tomato fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(12): 6543-6549.