Journal of Plant Environmental Physiology
ISSN: 7671-2423 (Print), 2783-4689 (Online) http://ecophysiologi.gorganiau.ac.ir

Doi: 10.30495/iper.2022.1950495.1766
Dor: 20.1001.1.24237671.1401.17.67.8.5

Islamic Azad University
Gorgan Branch

The effect of folic acid treatment on the post-harvest life of cucumber through influencing the activity of enzymes involved in the biosynthesis of proline, polyamine, and chlorophyll-degradation

Parviz Malekzadeh
Department of Biology, Faculty of Science, University of Qom, Qom, Iran, Email: p.malekzadeh@qom.ac.ir

Serial 67, 17th year, Number 3, Autumn 2022 (126-139)

Article type:
Research Full Paper

Article history
Received: 22.01.2022
Revised:15.03.2022
Accepted: 14.04.2022

Keywords
Arginine decarboxylase
Cucumber
Folic acid
Polyamine
Proline dehydrogenase

Abstract

In this study, the mechanism of cold stress tolerance in cucumber fruits pretreated with folic acid was investigated. Control group and the group treated with 5 mgL-1 folic acid were stored for 15 days at 4 °¬-C. The results showed that, in comparison with the control, treatment with folic acid resulted in reduced chilling injury and decreased electrolyte leakage. The cucumber fruits treated with folic acid showed higher chlorophyll contents in storage conditions with suppressed chlorophyllase enzyme activity. Exogenous folic acid treatment also increased the activity of arginine decarboxylase and ornithine decarboxylase resulting in the accumulation of polyamine contents. Also, higher levels of proline were observed in the fruits treated with folic acid, which is attributed to the increased activity of proline synthesizing enzymes △1-pyrroline-5-carboxylate syntheses and ornithine aminotransferase and also reduced activity of proline dehydrogenase enzyme that decompose proline. Generally, the results showed that folic acid treatment increased the resistance to the cold stress by regulating the activity of enzymes involved in the biosynthesis of proline, chlorophyll, and polyamines.

Please cite this article as Malekzadeh, P. 2022. The effect of folic acid treatment on the post-harvest life of cucumber through influencing the activity of enzymes involved in the biosynthesis of proline, polyamine, and chlorophyll-degradation. *Journal of Plant Environmental Physiology*. 65(3): 126-139.

© 2022. All Rights Reserved

نشریه فیزیولوژی محیطی گیاهی
http://ecophysiologi.gorganiau.ac.ir شاپا: (چاپی) ۲۴۲۳-۷۶۷۱ (آنلاین) ۴۶۸۹-۲۷۸۳،
Doi: 10.30495/iper.2022.1950495.1766
Dor: 20.1001.1.24237671.1401.17.67.8.5
دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان

اثر تیمار فولیک اسید بر عمر پس از برداشت میوه خیار (*Cucumis sativus* L.) از طریق تاثیر بر فعالیت آنزیم‌های دخیل در مسیر بیوسنتز پرولین، پلی‌آمین‌ها و آنزیم تجزیه کننده کلروفیل

پرویز ملک‌زاده

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه قم، قم، ایران، رایانامه: p.malekzadeh@qom.ac.ir

سال هفدهم، شماره ۶۷، پاییز ۱۴۰۱ / صفحات: ۱۳۹-۱۲۶

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی-پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۰۲
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۱۲/۲۴
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۱/۲۶

واژه‌های کلیدی:
آرژنین دکربوکسیلاز
پرولین دهیدروژناز
پلی‌آمین
فولیک اسید
خیار

چکیده

در این مطالعه مکانیسم تحمل به تنش سرما در میوهٔ خیار پیش تیمار شده با فولیک اسید مورد بررسی قرار گرفت. میوه‌های خیار شاهد و تیمار شده با ۵ میلی‌گرم در لیتر فولیک اسید به مدت ۱۵ روز در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. نتایج به دست آمده نشان داد که در مقایسه با نمونهٔ شاهد، تیمار فولیک اسید به‌طور معنی‌داری موجب کاهش آسیب سرمایی و نشت الکترولیت‌ها شد. در طی دوره انبارمانی، میوه‌های خیار تیمار شده با فولیک اسید از طریق سرکوب فعالیت آنزیم کلروفیلاز سبب کاهش تجزیه شدن کلروفیل شد. همچنین تیمار فولیک اسید فعالیت آنزیم آرژنین دکربوکسیلاز و اورنیتین دکربوکسیلاز را افزایش داد و از این طریق منجر به تجمع محتوای پلی‌آمین‌ها شد. همچنین در میوه‌های تیمار شده با فولیک اسید سطح پرولین بالاتری مشاهده شد که این امر از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های سنتز پرولین؛ Δ^1-پرولین -5 کربوکسیلات سنتتاز و اورنیتین آمینوترانسفراز و کاهش فعالیت آنزیم پرولین دهیدروژناز که موجب تجزیه پرولین می‌شود؛ حاصل شد. به طور کلی نتایج نشان داد که تیمار فولیک اسید با تنظیم فعالیت آنزیم‌های دخیل در بیوسنتز پرولین، کلروفیل و پلی‌آمین‌ها تحمل به تنش سرما را افزایش داد.

استناد: ملک‌زاده، پ. (۱۴۰۱). اثر تیمار فولیک اسید بر عمر پس از برداشت میوه خیار (*Cucumis sativus* L.) از طریق تاثیر بر فعالیت آنزیم‌های دخیل در مسیر بیوسنتز پرولین، پلی‌آمین‌ها و آنزیم تجزیه کننده کلروفیل. *نشریه فیزیولوژی محیطی گیاهی*، ٦٥ (۳)، ۱۳۹-۱۲۶.

مقدمه

خیار (*Cucumis sativus* L.) از خانواده Cucurbitaceae بوده و دارای ارزش غذایی بالایی بوده و به‌صورت میوه تازه مصرف می‌شود. نگهداری انواع مختلف محصولات باغی، از جمله خیار، در دمای زیر ۱۰ درجه سانتیگراد در معرض مشکلات مختلفی هستند. ذخیره‌سازی میوه در دمای پایین یکی از فناوری‌هایی است که برای کاهش تنفس سلولی و جلوگیری از خراب شدن و افزایش عمر مفید استفاده می‌شود (Hakim et al., 1999).

اصطلاح فولیک اسید به تتراهیدروفولات و مشتقات آن اشاره دارد که به عنوان ویتامین B9 نیز شناخته می‌شود. این ماده ویتامین محلول در آب است که از پیریدین، اسید پاراآمینوبنزوئیک و اسید گلوتامیک تشکیل شده است (Farouk and Qados, 2018). کمبود فولیک اسید در انسان می‌تواند عواقب شدیدی از جمله اسپینا بیفیدا، آنسفالی و کم خونی و غیره داشته باشد (Lucock, 2000). مصرف فعلی توصیه شده روزانه فولیک اسید در بزرگسالان توسط سازمان بهداشت (WHO) ٤٠٠ میکروگرم در روز و ٦٠٠ میکروگرم در روز برای زنان باردار است (Shohag et al., 2011). انسان‌ها و حیوانات نمی‌توانند فولیک اسید را از دیدگاه ژنتیکی در درون سلول‌هایشان سنتز کنند و برای تامین نیاز روزانه فولیک اسید به طور کامل به منابع غذایی مانند سبزیجات سبز وابسته هستند (Hare et al., 2012). فولیک اسید به عنوان یک کوفاکتور ضروری در واکنش‌های انتقال واحدهای تک کربنی در گیاهان عمل می‌کند. فولیک اسید همچنین در بیوسنتز و متیلاسیون DNA نقش دارد که هر دو برای عملکرد طبیعی سلول بسیار مهم هستند (Shohag et al., 2011). عملکردهای جدید فولیک اسید در گیاهان نیز اخیراً کشف شده است. به عنوان مثال، گزارش شده است که فولیک اسید بیان ژن را از طریق مکانیسم ریبوسوئیچ تنظیم می‌کند، و همچنین در بیوسنتز کلروفیل و تحمل استرس اکسیداتیو نقش دارد (Li et al., 2012). فولیک اسید یک افزودنی غذایی است و از دیدگاه تحقیقاتی نیاز به توجه بسیاری دارد. با این حال، اطلاعات کمی در مورد تأثیر کاربرد خارجی فولیک بر فیزیولوژی پس از برداشت میوه‌ها و سبزیجات در طول ذخیره سازی در دسترس است (Xu et al., 2021).

در میان موجودات زنده، تنها گیاهان، قارچ‌ها و باکتری‌ها توانایی سنتز فولات را دارند. مراحل منفرد بیوسنتز فولات‌های گیاهی به خوبی توصیف شده‌اند و فرض بر این است که در بین موجودات کاملاً حفظ شده‌اند. این فرآیند در سیتوزول شروع می شود، جایی که پترین از گوانوزین تری فسفات (GTP) سنتز می‌شود.

از فولیک اسید به عنوان یک تنظیم کننده موثر در تنش سرما، یک پاک‌کننده رادیکال آزاد در گیاهان، تنظیم کننده رشد و موثر در تنش اکسیداتیو نام برده می‌شود (Joshi et al., 2001). بعلاوه، کاربرد برونزا فولیک اسید از طریق تاثیر در چرخه یانگ و در میوه گلابی، تیمار فولیک اسید با مهار سنتز اتیلن، آسیب ناشی از سرما (CI) را کاهش داد (Lucock, 2000). میزان هورمون اتیلن باعث بهبود رسیدن میوه موز شد (Hu et al., 2017; Scott et al., 2000). در میوه گلابی، تیمار فولیک اسید با مهار سنتز اتیلن، آسیب ناشی از سرما (CI) را کاهش داد (Lucock, 2000). به‌علاوه، قرار گرفتن در معرض فولیک اسید باعث کاهش CI و افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی در میوه‌های چوی‌سام (Hare et al., 2012) و انگور (Xu et al., 2018)؛ شد. همچنین تیمار فولیک اسید در میوه لیچی وقوع پیری را به تاخیر انداخته و قهوه‌ای شدن بافت پریکارپ میوه را به حداقل رساند (Stakhova

et al., 2000). پیش تیمار فولیک اسید در میوه هلو با کاهش مقدار پراکسیدهیدروژن (H_2O_2) تحمل به سرما را افزایش داد (Wang et al., 2022; Xu et al., 2021).

بررسی‌های انجام شده نشان داد که گزارش در زمینه اثر فولیک اسید در تحمل آسیب سرما در میوه خیار به ویژه بر روی محتوای پلی‌آمین‌ها، پرولین، و کلروفیل همراه با آنزیم‌های دخیل در سنتز آنها تمرکز کند، یافت نشد. بنابراین پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر تیمار فولیک اسید در تحمل سرما در طی دوران انبارمانی انجام شد. به نظر می‌رسد، یافته‌ها این پژوهش بتواند افق جدیدی را در مورد اثرات پس از برداشت تیمار فولیک اسید روی تجمع پلی‌آمین، محتوای پرولین و کلروفیل در میوه خیار، همراه با فعالیت‌های آنزیمی دخیل در سنتز این ترکیبات ارائه دهد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و تیمار: میوه خیار (رقم گرین مجیک) درمرحله بلوغ تجاری از یک مزرعه تجاری در منطقه قنوات قم در آبانماه ۱۳۹۸، برداشت شد و سریعاً به آزمایشگاه تحقیقات گیاهی گروه زیست‌شناسی دانشگاه قم منتقل شدند و سپس بر اساس اندازه و رنگ میوه‌های سالم و یک‌شکل انتخاب شدند. میوه‌های انتخاب شده به‌طور تصادفی در دو گروه ۱۶۵تایی که شامل سه تکرار بود، قرار گرفتند. گروه اول در محلول ۵ میلی گرم بر لیتر فولیک اسید (سیگما آلدریچ) غوطه‌ور شدند. غلظت‌های مورد استفاده در این پژوهش از طریق یک آزمایش اولیه بدست آمد (داده‌ها نشان داده نشده). گروه دوم به عنوان شاهد در آب مقطر غوطه‌ور شدند. هر دو گروه به مدت ۱۵ دقیقه خیسانده شدند و به مدت ۱ ساعت در هوای ازاد و در دمای آزمایشگاه خشک شدند. سپس میوه‌ها در یخچال با دمای (۱±٤) درجه سانتی-گراد و رطوبت نسبی ۹۰ تا ۹۵ درصد به مدت ۱۵ روز با فاصله نمونه‌برداری ۳ روزه نگهداری شدند. نمونه‌های میوه از اگزوکارپ (بافت پوست) و مزوکارپ (بافت پالپ) به‌طور جداگانه نمونه برداری شد. سپس نمونه‌ها در نیتروژن مایع منجمد شدند و به طور جداگانه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد برای آنالیزهای شیمیایی و آنزیمی و در ۸۰- درجه سانتی‌گراد برای آنالیزهای مولکولی نگهداری شدند. نمونه‌های منجمد اگزوکارپ برای اندازه‌گیری نشت یون، محتوای کلروفیلa (Chla)، کلروفیلb (Chlb) و اندازه‌گیری آنزیم کلروفیلاز استفاده شد، در حالی که مزوکارپ برای تمام اندازه‌گیری‌های دیگر استفاده شد.

اندازه‌گیری CI و نشت الکترولیت: آسیب سرما (CI) با ظهور لکه‌های آبکی تیره و حفره‌های سطحی روی پوست میوه ارزیابی شد (Malekzadeh et al., 2017). CI در میوه‌ها با نمرات ۰ تا ٤ به شرح زیر محاسبه شد: ۰؛ هیچ نشانه‌ای از حفره‌های سطحی یا لکه‌های آبکی تیره وجود ندارد. ۱؛ کمتر از ۲۵درصد از سطح میوه‌های تحت تاثیر قرارگرفته است. ۲؛ ۲۵-۵۰ درصد از سطح میوه‌ها تحت تاثیر قرار گرفته است. ۳؛۵۱-۷۵ درصد از سطح میوه‌ها تحت تاثیر قرار گرفته است. و ٤؛ بیش از ۷۵ درصد از سطح میوه‌ها تحت تاثیر قرارگرفته است. سپس از فرمول زیر برای محاسبه نتیجه استفاده شد:

شاخص سرمازدگی = (∑(نمرهٔ مربوطه) × سطح سرمازدگی) / (تعداد کل میوه × ٤) × ۱۰۰

نفوذپذیری نسبی غشاء که نشانگر نشت الکترولیت‌ها می‌باشد با روش تغییر داده شده وانگ و همکاران اندازه‌گیری شد (Wang et al., 2017). بافت پوست از دو طرف هر میوه جدا شد. ده دیسک به

قطر ۱۰ میلی‌متر جدا شد و در آب دیونیزه انکوبه شد. رسانایی محلول‌های انکوبه شده (E1) پس از ۳۰ دقیقه با استفاده از یک پل رسانایی اندازه‌گیری شد. سپس نمونه‌ها در محلول‌های انکوباسیون خود به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شدند. پس از سرد شدن، هدایت محلول (E2) اندازه‌گیری شد. نرخ نشت الکترولیت‌ها به عنوان درصد رسانایی کل توصیف شد و به صورت: E1/E2×100 محاسبه شد.

اندازه‌گیری محتوای کلروفیل و فعالیت آنزیم کلروفیلاز: محتوای کلروفیل کل با استفاده از بافت پوست میوه و استخراج کلروفیل به کمک استون۸۰ درصد به روش کای با تغییرات محدود اندازه‌گیری شد (Malekzadeh et al., 2017). مقدار جذب به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر (Optizen 3220 uv؛ ساخت کره‌جنوبی) در طول موج‌های ٦٦٣ و ٦٤٥ نانومتر اندازه‌گیری شد. سپس غلظت محاسبه شد و محتوای Chl a و b براساس میلی‌گرم در هر گرم وزن تر میوه بیان گردید.

فعالیت آنزیم کلروفیلاز بر اساس روش وانگ و همکاران با کمی تغییرات اندازه‌گیری شد (Mihailović et al., 1997; Wang et al., 2017). جهت تعیین فعالیت آنزیم کلروفیلاز؛ مقدار جذب در طول موج ٦٦٧ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتری (Optizen 3220 uv؛ ساخت کره‌جنوبی) اندازه‌گیری شد.

تعیین محتوای پلی‌آمین و فعالیت‌های آنزیم‌های آرژنین دکربوکسیلاز (ADC) و اورنیتین دکربوکسیلاز (ODC): اندازه‌گیری محتوای پلی‌آمین با کمی تغییر در روش وانگ انجام شد (Wang et al., 2017). ترکیبات مورد نظر توسط کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) با آشکارساز فوتودیود مجهز به ستون C18 شناسایی شدند (دستگاه مدل AZURA ساخت آلمان). برای جداسازی، متانول ٦٥ درصد در سرعت جریان ۰/۸ میلی‌لیتر در دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و حجم تزریق ۲۰ میکرولیتر استفاده شد ، جذب پلی‌آمین‌ها با طول موج ٢٥٤ نانومتر شناسایی و با استانداردهای خارجی کمی‌سازی شدند. نتایج به صورت نانومول در هر گرم وزن تر بیان شد.

فعالیت‌های آنزیمی ADC و ODC با روش وانگ (Wang et al., 2017) با کمی تغییر اندازه‌گیری شد. یک واحد فعالیت ADC یا ODC به عنوان مقدار آنزیمی که ۱ میکرومولPut تولید می‌کرد تعریف شد و به‌صورت نانومول در هر گرم وزن تازه بیان شد.

تعیین محتوای پرولین و Δ^1-پرولین -5-کربوکسیلات سنتتاز (P5CS) و اورنیتین آمینوترانسفراز (OAT) و پرولین دهیدروژناز (PDH): محتوای اسید آمینه پرولین با استفاده از روش کائو با مقدار جزئی تغییر مورد سنجش قرار گرفت (Cao et al., 2012; Wang et al., 2017). نتایج به صورت میکروگرم در هر گرم وزن تر بیان شد. فعالیت آنزیم‌های OAT، P5CS و PDH از روش کائو با مقدار جزئی تغییر مورد سنجش قرار گرفت (Cao et al., 2016).

تحلیل آماری

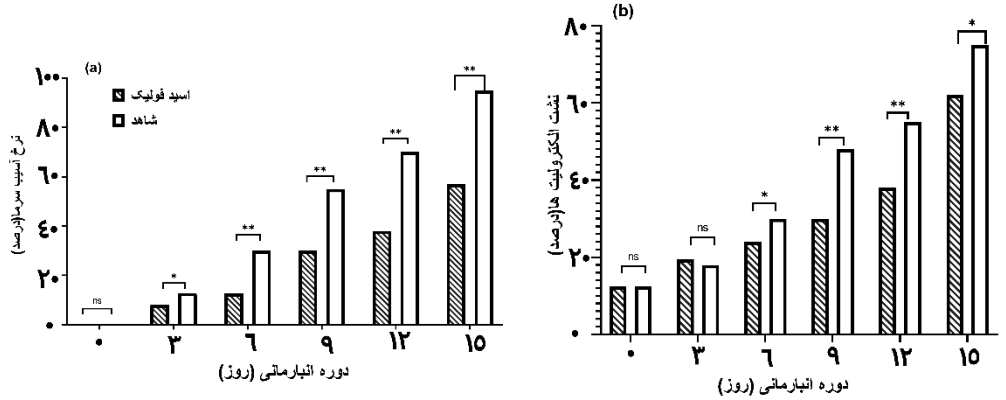
این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی (CRD) با سه تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) در نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۵ برای تجزیه و تحلیل استفاده شد. میانگین تفکیک‌ها با استفاده از آزمون‌های تفاوت معنی‌دار فیشر (LSD) در سطح معنی‌داری ۵ درصد مقایسه شد.

نتایج

CI و نشت الکترولیت: در مقایسه با میوه‌های شاهد سطح آسیب سرما (CI) در میوه خیار که با فولیک

اسید تیمار شده بود کاهش معنی‌داری در طی دوره انبارمانی نشان داد (شکل۱a). علاوه بر این، سطح CI پس از ۷ روز نگهداری در تمام تیمارها به شدت افزایش یافت. از این رو، پیش تیمار فولیک اسید در طی انبارمانی منجر به کاهش ٤٥ درصدی CI در میوه تیمار شده در مقایسه با شاهد طی ۱۵ روز ذخیره‌سازی شد.

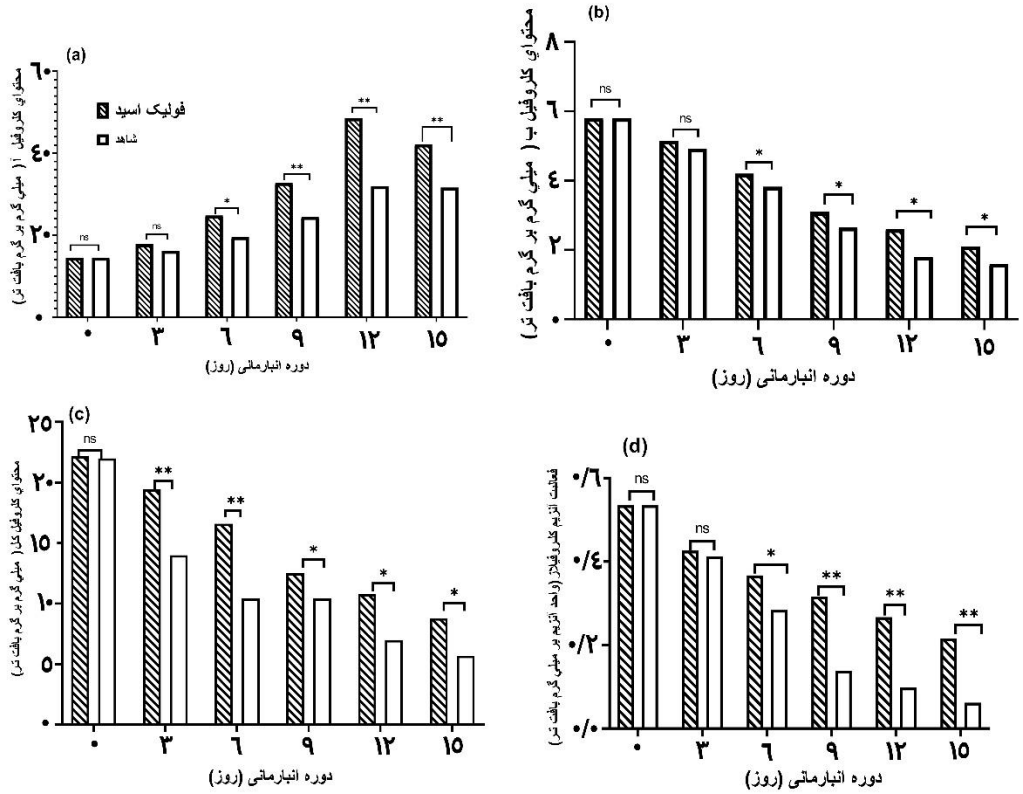
افزایش سریع نشت یون پس از ۳ روز نگهداری در دمای سرد در هر دو گروه میوه تیمار شده با فولیک اسید و شاهد ثبت شد (شکل b۱) با این حال، میوه‌های تیمار شده با فولیک اسید نرخ نشت الکترولیت کمتری در مقایسه با میوه‌های شاهد نشان دادند. از روز ششم انبارمانی تیمار فولیک اسید به طور معنی‌داری (P< ۰/۰۵) نرخ نشت الکترولیت‌ها را در مقایسه با گروه شاهد کاهش داد.



شکل۱: اثرات تیمار فولیک اسید بر شاخص آسیب سرماخوردگی (a) و نشت الکترولیت (b) در میوه خیار در طی نگهداری در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ روز که در ادامه به مدت ۳ روز به دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد منتقل شد. میله‌های عمودی نشان‌دهنده خطاهای استاندارد میانگین سنجش‌های سه‌گانه هستند.

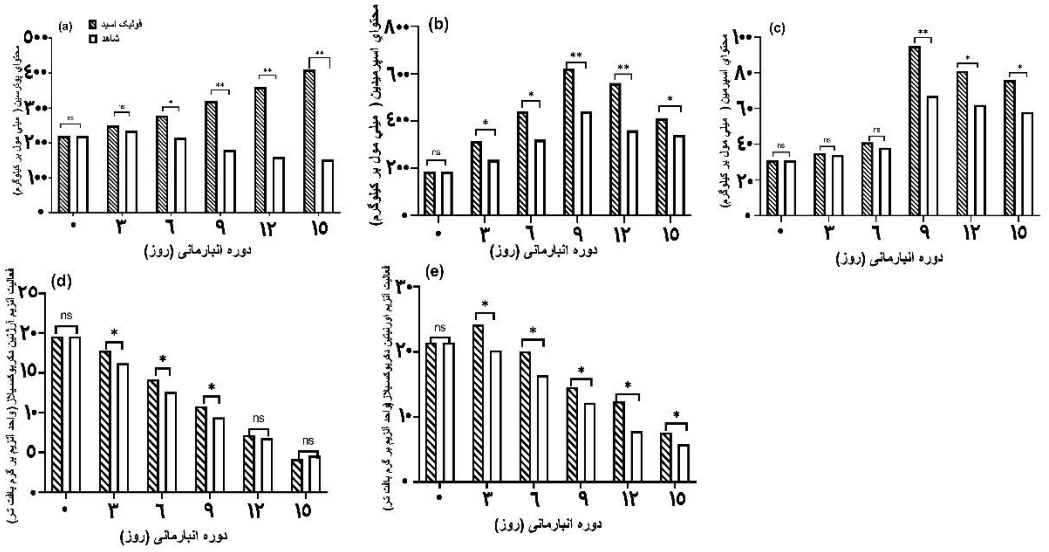
محتوای کلروفیل a و b، و کلروفیل کل و فعالیت آنزیم کلروفیلاز: همانطور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود در طی ۱۵ روز انبارمانی، محتوای کلروفیلa روند کاهشی را هم در میوه‌های تیمار شده با فولیک اسید و هم در میوه‌های شاهد نشان داد (شکل۲a). میوه‌های تیمار فولیک اسید نسبت به میوه‌های شاهد به طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) سطح کلروفیل بالاتری را نشان داد. بعلاوه، میوه تیمار شده با فولیک اسید محتوای Chl b بیشتری نسبت به گروه شاهد نشان داد. با این حال، تفاوت معنی‌داری (P< ۰/۰۵) در محتوای Chl b در مراحل اولیه ذخیره‌سازی وجود نداشت (شکل۲b). بنابراین، در میوه تیمار شده با فولیک اسید در شرایط دمایی پایین در مقایسه با میوه‌های شاهد سطح بالاتری از محتوای کلروفیل کل را نشان داد (شکل۲c).

فعالیت آنزیم کلروفیلاز به طور قابل توجهی(P< ۰/۰۵) در کل دوره انبارمانی سرکوب شد (شکل۲d). اثرات فولیک اسید بر فعالیت آنزیم کلروفیلاز در میوه تیمارشده و شاهد روند کاهشی نشان داد، هرچند در میوه‌های تیمار شده فعالیت کمتری برای آنزیم کلروفیلاز نسبت به شاهد مشاهده شد. تیمار فولیک اسید منجر به کاهش فعالیت آنزیم کلروفیلاز شد.



شکل۲: اثرات تیمار فولیک اسید بر محتوای کلروفیل آ (a)، محتوای کلروفیل ب(b)، محتوای ک (c) و فعالیت کلروفیلاز (d) در میوه خیار در طول نگهداری در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ روز و سپس به مدت ۳ روز به ۲۰ درجه سانتی‌گراد منتقل شد.

محتوای پلی‌آمین (PA)، فعالیت آنزیم ADC و ODC: در این پژوهش، محتوای پلی‌آمین‌ها، یعنی پوترسین (Put)، اسپرمیدین (Spd) و اسپرمین (Spm)، در شرایط نگهداری در دمای پایین اندازه‌گیری شد. همانطور که در شکل ۳-a تا c نشان داده شده است، محتوای پوترسین در طی دوره انبارمانی به سرعت افزایش یافت. پس از ۹ روز نگهداری، سطح Put در میوه‌های تیمار شده با فولیک اسید نسبت به میوه‌های شاهد به طور قابل توجهی بالاتر بود (شکل۳b). این روند در نتایج مربوط به محتوای Spd با الگوی نسبتاً مشابه Put نشان داده شد (شکل۳B). تحت تنش سرما، تیمار فولیک اسید سطح Spd را در طی دوره انبارمانی افزایش داد (شکل ۳c). علاوه بر این، محتوای Spd افزایش آهسته‌ای را تا روز ۹ ذخیره نشان داد و پس از آن در مرحله بعدی ذخیره‌سازی سرد کاهش یافت. با توجه به محتوایSpm، تیمار فولیک اسید سطح Spm را نسبت به شاهد تحریک کرد. مقدار Spm تا روز نهم کمی افزایش یافت و سپس تا روز ۱۵ انبارمانی کاهش یافت. به‌طورکلی، محتوای پلی آمین به طور قابل توجهی توسط تیمار فولیک اسید در شرایط نگهداری سرد القا شد.



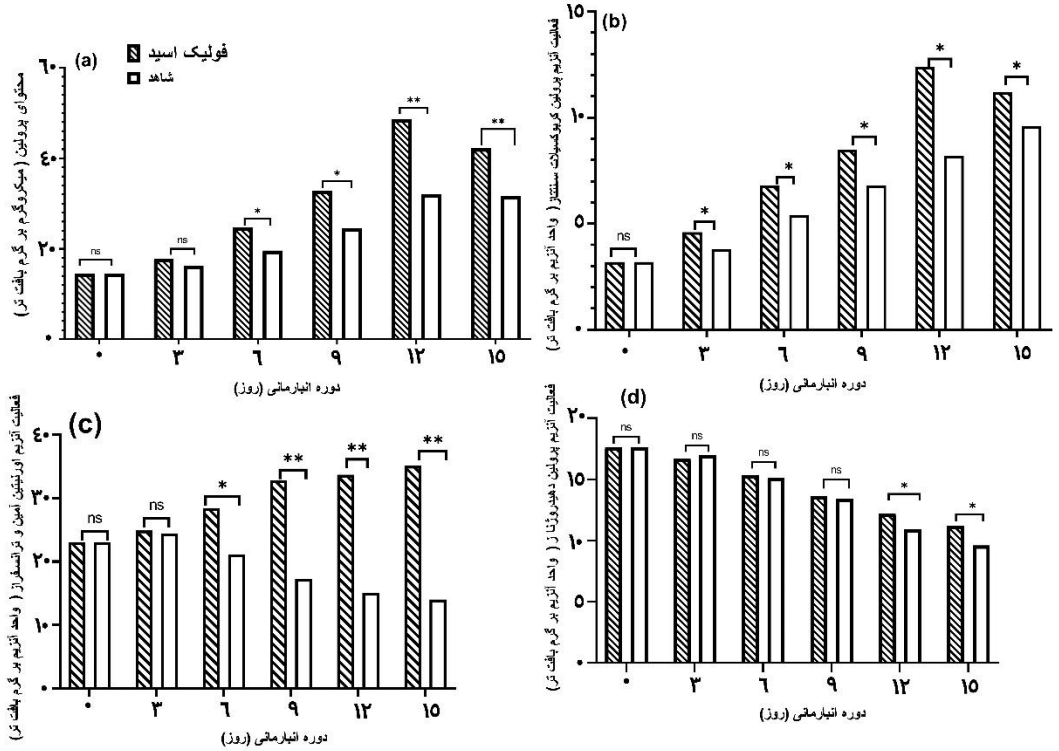
شکل۳: اثرات تیمار فولیک اسید بر محتوای پوترسین (a)، محتوای اسپرمیدین (b)، محتوای اسپرمین (c) و فعالیت آنزیم آرژنین دکربوکسیلاز(ADC) (d) ، فعالیت آنزیم اورنیتین دکربوکسیلاز(ODC) (e) در میوه خیار در طول نگهداری در دمای ٤ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ روز و متعاقباً به مدت ۳ روز به دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد منتقل شد.

فعالیت آنزیم‌های ADC و ODC جهت سنتز ترکیبات پلی‌آمین در شکل d۳ و e برای میوه‌های شاهد و تیمار شده با فولیک اسید نشان داده شده است. فعالیت آنزیم ADC در طول دوره‌های انبارمانی به آرامی کاهش یافت. فعالیت ODCنیز در ابتدا تغییرات چندان نشان نداد اما پس از شش روز انبارمانی به سرعت کاهش یافت (شکل۳ e). آنزیم‌های ADC وODC در میوه‌های تیمار شده با فولیک اسید میزان فعالیت بالاتر نسبت به میوه‌های شاهد نشان دادند. نتایج نشان داد که پیش تیمار فولیک اسید فعالیت آنزیمهای ADC و ODC را در پاسخ به تنش سرما تقویت کرد.

محتوای پرولین و فعالیت P5CS و OAT و PDH:

محتوای پرولین در هر دو گروه تیمار شده و شاهد روند افزایشی را با گذشت مدت زمان نگهداری در دمای پایین نشان داد (شکل٤ a). تیمار فولیک اسید در میوه‌ها به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) باعث افزایش محتوای پرولین در مقایسه با میوه‌های شاهد شد. همانطور که در شکل b٤ مشاهده می‌شود، میزان فعالیت P5CS روند افزایشی را در طول کل دوره انبارمانی نشان داد. میزان فعالیت P5CS در میوه‌های تیمار شده طی نگهداری در دمای پایین به سرعت افزایش یافت.

با توجه به فعالیتOAT، هم در میوه‌های شاهد و هم در میوه‌های تیمار شده با فولیک اسید افزایش تدریجی تا ۹ روز ذخیره‌سازی را نشان دادند و در نتیجه کاهش سریع در طول مدت نگهداری باقی‌مانده را نشان دادند. میوه‌های تیمار شده با فولیک اسید فعالیت OAT بالاتر نسبت به میوه‌های شاهد نشان دادند (شکل٤ c). در مقابل، فعالیت آنزیم PDH الگوی متفاوتی از تغییر را نسبت به OAT و P5CS نشان داد (شکل٤ d) در میوه شاهد، فعالیت PDH بیشتر از میوه‌های تیمار شده با فولیک اسید بود.



شکل ٤: اثرات درمان فولیک اسید بر محتوای پرولین (a)، فعالیت Δ^1-پرولین -5-کربوکسیلات سنتتاز (P5CS) (b)، فعالیت آنزیم اورنیتین آمینوترانسفراز (OAT) (c) و پرولین دهیدروژناز (PDH) (d) در خیار میوه در طول نگهداری در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ روز و متعاقباً به مدت ۳ روز به دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد منتقل می‌شود.

بحث

فولیک اسید یک مولکول علامت‌دهنده با کارکرد متنوع در تنظیم جنبه‌های مختلف تحمل به تنش در سیستم گیاهی است (Scott et al., 2000). به‌دلیل نقش زیستی گسترده فولیک اسید که به‌عنوان تنظیم‌کننده اصلی در سیستم گیاهی فعالیت می‌کند و همچنین نقش دفاعی برجسته‌ای در شرایط محیطی غیرقابل پیش‌بینی مانند تنش سرما ایفا می‌کند؛ پس از کشف آن در سلول‌های گیاهی علاقه تحقیقاتی در مورد فولیک اسید افزایش یافت (Hu et al., 2017; Xu et al., 2018).

نگهداری میوه در شرایط محیطی با دمای سرد مکانیزمی است که به طور گسترده برای افزایش ماندگاری محصولات باغی تازه مورد استفاده قرار می‌گیرد. بنابراین، اگر خیار در دماهای پایین‌تر از ۱۳-درجه سانتی‌گراد نگهداری شود، ممکن است علائم آسیب سرما ایجاد شود که مشخصه آن حفره‌دار شدن سطح میوه بوده و به دنبال آن علائم پوسیدگی در میوه نمایان شد. در این پژوهش، تیمار فولیک اسید به‌طور چشم‌گیری سطح آسیب سرما را در میوه خیار ذخیره شده در دمای (٤±۱) درجه سانتی‌گراد کاهش داد. مشابه یافته‌های این پژوهش، علائم آسیب سرما با تیمار فولیک اسید (۵ میلی‌گرم بر مول) در کلم بروکلی کاهش یافت (Xu et al., 2018).

در شرایط انبارمانی میزان نشت یون‌ها جهت حفظ یکپارچگی غشای سلولی که روی سیالیت غشا و فعالیت‌های آنزیمی تأثیر می‌گذارد؛ دارای اهمیت ویژه‌ای است (Mishra et al., 2022; Xu et al., 2021). در پژوهش انجام شده، نشت یون با گذشت طول انبارمانی میوه روند افزایش داشت. با این وجود،

تیمار فولیک اسید مقدار نشت یون‌ها را به حداقل رساند. همچنین در مقایسه با شاهد، تیمار فولیک اسید باعث کاهش نشت الکترولیت‌ها شد (Zhao et al., 2017). از این رو، کاملاً منطقی است که پیشنهاد کنیم که تیمار فولیک اسید از غشاء پلاسمایی در مقابل تنش سرما محافظت می‌کند و یکپارچگی واحدهای سلولی را حفظ می‌کند، و منجر به کاهش آسیب سرما در شرایط انبارمانی میوه در دمای پایین می‌گردد.

در طی عمر پس از برداشت میوه‌ها علائم پیری از طریق تخریب نوعی پروتئین غشایی مرتبط با محتوای کلروفیل افزایش می‌یابد. آنزیم کلروفیلاز نقش تعیین کننده در بیوسنتز کلروفیل دارد (Malekzadeh et al., 2017). گزارش شده است که کاربرد برونزای فولیک اسید باعث تاخیر در پیری کلم گلدار چینی، همراه با کاهش بیان ژن‌های تجزیه کننده کلروفیل می‌شود (Xu et al., 2021) همانطور که نتایج این پژوهش نشان داد، به واسطه تیمار فولیک اسید پیری میوه خیار از طریق مهار تخریب کلروفیل و کاهش فعالیت آنزیم کلروفیلاز به تعویق انداخته شد. توسعه کلروپلاست‌ها و افزایش بازده فتوسنتزی کاملاً از طریق محتوای کلروفیل و رنگیزه‌های دخیل در فتوسنتز تعیین می‌شود (Li et al., 2012). تنش‌های غیرزیستی مختلف، تخریب کلروفیل را تسریع می‌کنند و بر مصرف انرژی ذخیره شده در محصولات زراعی تأثیر منفی می‌گذارند (Li et al., 2022; Malekzadeh et al., 2017). با این حال، تیمار برونزای فولیک اسید به‌طور قابل توجهی محتویات کلروفیل را افزایش داد. یافته‌های این پژوهش تکمیل کننده یافته‌های نویسندگان قبلی می‌باشد (Anwar et al., 2018; Malekzadeh et al., 2017; Wang et al., 2012) که گزارش کرده‌اند تیمار ۲و٤- اپی‌براسینواستروئید روی گیاهچهٔ در خیار سبب افزایش محتوای کلروفیل از طریق تاثیر روی فعالیت آنزیم‌های تجزیه کننده کلروفیل شده و رشد را بهبود می‌بخشد. در این پژوهش فعالیت آنزیم کلروفیلاز کاهش یافت و از آنجایی که این آنزیم به‌دلیل اینکه در تجزیه رنگدانه‌های فتوسنتزی در سیستم‌های زیستی نقش کلیدی ایفا می‌کند؛ برای تعیین محتوای کلروفیل نقش حیاتی دارد. نتایج پژوهش حاضر همبستگی مثبت بین محتوای کلروفیل و کاهش فعالیت آنزیم کلروفیلاز در میوه‌های تیمار شده با فولیک اسید را نشان داد که حاکی از آن است که در مقایسه با میوه‌های شاهد، در میوه‌های تیمار شده با فولیک اسید پتانسیل تخریب محتوای کلروفیل آهسته‌تر شده است. افزایش محتوای کلروفیل می‌تواند به دلیل تحریک فعالیت آنزیم‌های بیوسنتزی مرتبط با بیوسنتز کلروفیل در شرایط استرس نسبت داده شود (Farouk and Qados, 2018).

پلی‌آمین‌ها ترکیبات آمین‌دار آلیفاتیک هستند که از طریق مهار ROS و حفظ یکپارچگی غشاء، فعالیت‌های آنزیمی، ساختارهای اسید نوکلئیک و پروتئین، یکپارچگی غشاء را تامین می‌کنند (Jahan et al., 2019). به‌علاوه، پلی‌آمین‌ها دارای عملکردهای مختلف در فرآیند فیزیولوژیکی و تنظیم تنش‌های زیستی و غیرزیستی هستند (Jahan et al., 2019; Zhao et al., 2017) برای حفظ pH فیزیولوژیکی، پلی‌آمین‌ها به ترکیبات درون سلول متصل شده و از این طریق در حفظ همئوستازی سلول در شرایط تنش‌های محیطی نقش مهمی را ایفا می‌کنند (Mirdehghan et al., 2007).

در مقالات پیشین تحمل به آسیب سرما ناشی از طریق تجمع پلی‌آمین‌ها در موز (Hu et al., 2017)، میوه انار (Mirdehghan et al., 2007) و گوجه‌فرنگی (Jannatizadeh et al., 2019)، پیشنهاد شده است. محتویات پلی‌آمین در موز نگهداری شده در دمای پایین با افزایش فعالیت آنزیم‌های ADC و ODC افزایش یافت (Hu et al., 2017). اسیدهای آمینه

آرژنین و اورنیتین پیش‌ساز بیوسنتز پلی‌آمین‌ها می‌باشند. به‌علاوه، اورنیتین توسط آنزیم ODC به پوترسین تبدیل و آرژنین توسط دکربوکسیلاسیون ADC به اسپرمین و اسپرمیدین تبدیل می‌شود (Mirdehghan et al., 2007). در این پژوهش تیمار فولیک اسید از طریق تاثیر روی میزان فعالیت آنزیم‌های دخیل در بیوسنتز پلی‌آمین، موازی با تحقیقات محققین فوق، محتویات پلی‌آمین را افزایش داد (شکل ۳).

تیمار پلی‌آمین در میوه خیار با افزایش محتوای سنتز پوترسین، اسپرمین و اسپرمیدین به‌طور معنی‌داری آسیب سرما را کاهش داد (Wang et al., 2017). همچنین در تیمار میوه هلو با فولیک اسید محتوای پلی‌آمین (پوترسین، اسپرمین و اسپرمیدین) به عنوان یک مکانیسم دفاعی در برابر تنش سرما؛ افزایش یافت (Cao et al., 2016). گزارش سالهای قبل محققین نشان داد که متابولیسم پلی‌آمین توسط سه آنزیم سنتز کننده ADC ، ODC و SAMDC تنظیم می‌شود و فعالیت این آنزیم‌ها برای کاهش تنش سرما در گیاهچه خیار نقش بسزایی دارد. همچنین القاء فعالیت آنزیم‌های ADC و ODC و رابطه مستقیمی روی تجمع پلی‌آمین‌ها دارد (Cao et al., 2016; Madebo et al., 2021; Mishra et al., 2022). نتایج این پژوهش موازی با مطالعات مذکور نشان داد که افزایش محتوای پلی‌آمین می‌تواند در افزایش عمر پس از برداشت میوه تاثیرگذار باشد. به طور خلاصه، تیمار فولیک اسید با تاثیر روی فعالیت‌های آنزیمی دخیل در بیوسنتز پلی‌آمین باعث افزایش محتوای پلی‌آمین‌ها شد و بنابراین، این کار می‌تواند به عنوان یکی از مکانیسم‌های احتمالی نقش فولیک اسید در تنش سرما در نظر گرفته شود.

پرولین یک اسید آمینه مفید برای تحمل تنش‌های محیطی مختلف در گیاهان است. در گیاهان عالی، مکانسیم سنتز پرولین شامل؛ تبدیل گلوتامات به P5C با فعالیت آنزیم P5CS، که این واکنش در میتوکندری انجام می‌شود و واکنش دیگر که در سیتوزول انجام می شود تبدیل اورنیتین به P5C به کمک آنزیم OAT می‌باشد. در ادامه P5C به کمک آنزیم PYCR به پرولین تبدیل می‌گردد (Cao et al., 2012; Madebo et al., 2021; Wang et al., 2017). پرولین که به‌عنوان یک ترکیب تثبیت کننده پتانسیل اسمزی سلول استفاده می‌شود، نوعی عملکرد کنترلی روی پایداری آنزیم مهارکننده ROS نشان می‌دهد. به‌علاوه، پرولین مهار مستقیم فعالیت ROS تاثیر دارد، که برای القای تحمل به آسیب سرما با حفظ یکپارچگی غشا ضروری است (Malekzadeh et al., 2017). در گیاهان عالی، P5CS، OAT و PDH آنزیم‌های حیاتی هستند که در متابولیسم پرولین نقش دارند. آنزیم‌های P5CS و OAT بیوسنتز پرولین را تنظیم می‌کنند، در حالی که PDH در تخریب پرولین نقش را ایفا می‌کند (Mishra et al., 2022; Yan et al., 2022). مطالعات قبلی روی لوکوات (Cao et al., 2012) تأیید کردند که متابولیسم پرولین به کاهش اثرات تنش سرما در طی انبارمانی میوه کمک می‌کند. مشابه با یافته‌های این پژوهش تیمار فولیک اسید از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های P5CS و OAT و متعاقباً با کاهش فعالیت آنزیم PDH باعث تجمع پرولین در این پژوهش شد که موازی با یافته‌های تیمار میوه موز با NO بود (Wang et al., 2017). یکی از مسیرهای تولید پرولین از طریق NO می‌باشد. اعتقاد بر این است که سنتز پرولین از گلوتامات یا اورنیتین به ترتیب توسط آنزیم‌های کاتالیزور P5CS و OAT انجام می‌شود. در میوه هلو ذخیره شده در شرایط سردخانه، کاربرد فولیک اسید باعث تجمع پرولین شد (Cao et al., 2016). مشابه یافته‌های این پژوهش، فعالیت‌های آنزیمی P5CS و OAT با فعالیت‌های کم PDH بسیار

تنظیم می‌شود، که بیشتر باعث تجمع پرولین در موز (Hu et al., 2017) و لوکوات (Cao et al., 2012) می‌شود. آزمایش ما نشان داد که فولیک اسید از طریق هماهنگی P5CS ، OAT و PDH، با تجمع پرولین، مقدار قابل توجهی از تحمل به تنش سرما را در میوه خیار ایجاد کرد. بنابراین، ایجاد حفاظت در برابر آسیب در میوه خیار، از طریق افزایش سرعت سنتز پرولین و کاهش نرخ تجزیه پرولین و افزایش محتوای پرولین در میوه‌های تیمار شده با فولیک اسید مرتبط بوده، که ممکن است نقش اساسی در تحمل تنش سرما در میوه خیار در طول انبارمانی داشته باشد.

نتیجه‌گیری نهایی

این پژوهش نقش تعیین کننده تیمار فولیک اسید را در کاهش آسیب سرما در میوه خیار در طی دوره انبارمانی را نشان داد. تحمل به آسیب توسط مکانیسم تجمع پلی‌آمین بالا، که توسط افزایش فعالیت آنزیم سنتز کننده ADC و ODC ایجاد می‌شود، افزایش یافت. محتوای پرولین توسط فعالیت آنزیم P5CS و فعالیت آنزیم OAT، که همزمان با فعالیت پایین‌ترآنزیم PDH بود، ایجاد شد و این فرایند منجر به سطح پرولین بالا شد.تیمار فولیک اسید باعث کاهش فعالیت آنزیم کلروفیلاز شد و در نتیجهٔ تخریب کمتر کلروفیلی، ترکیبات لازم جهت تامین انرژی مورد نیاز سلول‌ها فراهم شد. به طور خلاصه، ۵ میلی‌گرم بر لیتر فولیک اسید در تحمل به ممانعت از توسعه آسیب سرما در میوه خیار نقش برجسته‌ای داشت که احتمالاً با افزایش متابولیسم پلی‌آمین‌ها و پرولین مرتبط است.

References

Anwar, A., Bai, L., Miao, L., Liu, Y., Li, S., Yu, X. and Li, Y. (2018). 24-Epibrassinolide ameliorates endogenous hormone levels to enhance low-temperature stress tolerance in cucumber seedlings. International Journal of Molecular Sciences, 19: 2497.

Cao, S., Cai, Y., Yang, Z. and Zheng, Y. (2012). MeJA induces chilling tolerance in loquat fruit by regulating proline and γ-aminobutyric acid contents. Food Chemistry, 133: 1466-1470.

Cao, S., Song, C., Shao, J., Bian, K., Chen, W. and Yang, Z. (2016). Exogenous melatonin treatment increases chilling tolerance and induces defense response in harvested peach fruit during cold storage. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 64: 5215-5222.

Farouk, S. and Qados, A.M.A. (2018). Enhancing seed quality and productivity as well as physio-anatomical responses of pea plants by folic acid and/or hydrogen peroxide application. Scientia Horticulturae, 240: 29-37.

Hakim, A., Purvis, A.C. and Mullinix, B.G. (1999). Differences in chilling sensitivity of cucumber varieties depends on storage temperature and the physiological dysfunction evaluated. Postharvest Biology and Technology, 17: 97-104.

Hare, T., Pyke, M., Scheelings, P., Eaglesham, G., Wong, L., Houlihan, A. and Graham, G. (2012). Impact of low temperature storage on active and storage forms of folate in choy sum (*Brassica rapa* subsp. parachinensis). Postharvest Biology and Technology, 74: 85-90.

Hu, W., Yang, H., Tie, W., Yan, Y., Ding, Z., Liu, Y., Wu, C., Wang, J., Reiter, R.J. and Tan, D.X. (2017). Natural variation in banana varieties highlights the role of melatonin in postharvest ripening and quality. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 65: 9987-9994.

Jahan, M.S., Shu, S., Wang, Y., Chen, Z., He, M., Tao, M., Sun, J. and Guo, S. (2019). Melatonin alleviates heat-induced damage of tomato seedlings by balancing redox homeostasis and modulating polyamine and nitric oxide biosynthesis. BMC Plant Biology, 19: 1-16.

Jannatizadeh, A., Aghdam, M.S., Luo, Z. and Razavi, F. (2019). Impact of exogenous melatonin application on chilling injury in tomato fruits during cold storage. Food and Bioprocess Technology, 12: 741-750.

Joshi, R., Adhikari, S., Patro, B., Chattopadhyay, S. and Mukherjee, T. (2001). Free radical scavenging behavior of folic acid: evidence for possible antioxidant activity. Free Radical Biology and Medicine, 30: 1390-1399.

Li, J., Liu, Y., Zhang, M., Xu, H., Ning, K., Wang, B. and Chen, M. (2022). Melatonin increases growth and salt tolerance of Limonium bicolor by improving photosynthetic and antioxidant capacity. BMC Plant Biology, 22: 1-14.

Li, S., Jiang, L., Wang, C. and Zhang, C. (2012). Research advances in the functions of plant folates. Chinese Bulletin of Botany, 47: 525.

Lucock, M. (2000). Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. Molecular Genetics and Metabolism, 71: 121-138.

Madebo, M.P., LUO, S.m., Li, W., ZHENG, Y.h. and Peng, J. (2021). Melatonin treatment induces chilling tolerance by regulating the contents of polyamine, γ-aminobutyric acid, and proline in cucumber fruit. Journal of Integrative Agriculture, 20: 3060-3074.

Malekzadeh, P., Khosravi-Nejad, F., Hatamnia, A.A. and Sheikhakbari Mehr, R. (2017). Impact of postharvest exogenous γ-aminobutyric acid treatment on cucumber fruit in response to chilling tolerance. Physiology and Molecular Biology of Plants, 23: 827-836.

Mihailovic, N., Lazarevic, M., Dzeletovic, Z., Vuckovic, M. and Durdevic, M. (1997). Chlorophyllase activity in wheat, *Triticum aestivum* L. leaves during drought and its dependence on the nitrogen ion form applied. Plant Science, 129: 141-146.

Mirdehghan, S., Rahemi, M., Martinez-Romero, D., Guillen, F., Valverde, J., Zapata, P., Serrano, M. and Valero, D. (2007). Reduction of pomegranate chilling injury during storage after heat treatment: role of polyamines. Postharvest Biology and Technology, 44: 19-25.

Mishra, S., Barman, K., Singh, A.K. and Kole, B. (2022). Exogenous polyamine treatment preserves postharvest quality, antioxidant compounds and reduces lipid peroxidation in black plum fruit. South African Journal of Botany, 146: 662-668.

Scott, J., Rebeille, F. and Fletcher, J. (2000). Folic acid and folates: the feasibility for nutritional enhancement in plant foods. Journal of the Science of Food and Agriculture, 80: 795-824.

Shohag, M. Wei, Y.Y., Yu, N., Zhang, J., Wang, K., Patring, J., He, Z. and Yang, X.e. (2011). Natural variation of folate content and composition in spinach (*Spinacia oleracea*) germplasm. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59: 12520-12526.

Stakhova, L., Stakhov, L. and Ladygin, V. (2000). Effects of exogenous folic acid on the yield and amino acid content of the seed of *Pisum sativum* L. and *Hordeum vulgare* L. Applied Biochemistry and Microbiology, 36: 85-89.

Wang, B., Li, Y. and Zhang, W.H. (2012). Brassinosteroids are involved in response of cucumber (Cucumis sativus) to iron deficiency. Annals of Botany, 110, 681-688.

Wang, D., Li, L., Xu, Y., Limwachiranon, J., Li, D., Ban, Z. and Luo, Z. (2017). Effect of exogenous nitro oxide on chilling tolerance, polyamine, proline, and γ-aminobutyric acid in bamboo shoots (*Phyllostachys praecox* f. prevernalis). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 65: 5607-5613.

Wang, Y., Wang, G., Xu, W., Zhang, Z., Sun, X. and Zhang, S. (2022). Exogenous melatonin improves pear resistance to Botryosphaeria dothidea by increasing autophagic activity and sugar/organic acid levels. Phytopathology, 33(9): 1150-1160.

Xu, D., Zuo, J., Fang, Y., Yan, Z., Shi, J., Gao, L., Wang, Q. and Jiang, A.

(2021). Effect of folic acid on the postharvest physiology of broccoli during storage. Food Chemistry, 339: 127981.

Xu, L., Yue, Q., Xiang, G., Bian, F.E. and Yao, Y. (2018). Melatonin promotes ripening of grape berry via increasing the levels of ABA, H_2O_2, and particularly ethylene. Horticulture research. DOI 10.1038/s41438-018-0045-y.

Yan, R., Xu, Q., Dong, J., Kebbeh, M., Shen, S., Huan, C. and Zheng, X. (2022). Effects of exogenous melatonin on ripening and decay incidence in plums (*Prunus salicina* L. cv. Taoxingli) during storage at room temperature. Scientia Horticulturae, 292:110655.

Zhao, H., Zhang, K., Zhou, X., Xi, L., Wang, Y., Xu, H., Pan, T. and Zou, Z. (2017). Melatonin alleviates chilling stress in cucumber seedlings by up-regulation of CsZat12 and modulation of polyamine and abscisic acid metabolism. Scientific Reports, 7: 1-12.