مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد۱۰، شماره ٤، زمستان ۱۳۹۸

اندازه‌گیری فعالیت و بیان ژن برخی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت وصفات کیفی میوه‌های پرتقال تحت تیمارهای پوششی

طیبه باران‌زهی M.Sc.[1]، جلال غلام‌نژاد Ph.D.[1*]، مریم دهستانی Ph.D.[1]، اعظم جعفری Ph.D.[1]، فاطمه ناصری‌نصب Ph.D.[2]

۱- دانشگاه اردکان، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گروه باغبانی، اردکان، ایران
۲- دکتری بیماری شناسی گیاهی، جهاد کشاورزی، البرز، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: jgholamnezhad@ardakan.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۹/۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۲/۱۰

چکیده

هدف: هدف از این مطالعه بررسی تاثیر عصاره آبی و اتانولی گیاهان دارویی شامل چریش، میخک، آویشن و اسطوخودوس بر روی افزایش عمر انبارمانی پرتقال به‌وسیله کاهش اکسیژن‌های فعال و متعاقب آن کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت است.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش ابتدا از چریش، میخک، آویشن و اسطوخودوس با استفاده از حلال‌های آبی و اتانولی عصاره‌گیری شد، سپس میوه‌های پرتقال با غلظت‌های مختلف عصاره‌های گیاهی مذکور شامل ۱۰۰۰×۲، ۱۰۰۰×۴ و ۱۰۰۰×۶، و همچنین کیتوزان و واکس، تیمار شدند. بعد از اعمال تیمار، میوه‌ها در سردخانه با دمای ۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۸۰ تا ۹۰ درصد نگه‌داری شدند. میوه‌ها در ابتدای آزمایش و سپس هر بیست روز یک‌بار از انبار خارج و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز و همچنین میزان بیان ژن این دو آنزیم در میوه‌ها اندازه‌گیری شدند. در بخش دیگری از این مطالعه آزمون پنل انجام گرفت

نتایج: براساس نتایج، فعالیت هر دو آنزیم کاتالاز و پراکسیداز تحت تاثیر عصاره‌های گیاهی قرار گرفتند. در روز صدم، میوه‌های تیمار شده با عصاره اسطوخودوس اتانولی با غلظت ۱۰۰۰×۶ دارای کمترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز با مقدار ۲/۱۳، و کمترین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز مربوط به میوه‌های تیمار شده با غلظت ۱۰۰۰×۶ عصاره آبی اسطوخودوس، به‌میزان ۱/۵۴ بودند. عصاره‌های آبی و الکلی اسطوخودوس برروی میزان بیان هر دو ژن کاتالاز و پراکسیداز تاثیر داشتند به‌نحوی که کمترین میزان بیان ژن آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز در روز صدم، مربوط به تیمار ۱۰۰۰×۶ عصاره اتانولی اسطوخودوس به‌ترتیب با مقادیر ۶/۶۶ و ۵/۲۸ بود.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج این تحقیق مشخص شد که به‌طورکلی عصاره گیاهان‌چریش، میخک، آویشن و اسطوخودوس تاثیر بر روی فیزیولوژی میوه پرتقال داشته و با کاهش فعالیت فیزیولوژیکی باعث کاهش میزان فعالیت آنزیم‌ها و همچنین بیان ژن‌های متناظر آن‌ها می‌شوند.

واژگان کلیدی: بیان ژن، پراکسیداز، پرتقال، عصاره گیاهی، کاتالاز

مقدمه

پرتقال بومی مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری بوده و یکی از قدیمی‌ترین میوه‌هایی است که بشر همواره از آن استفاده می‌کرده است. از حدود ۰۰۵ سال قبل از میلاد مسیح کنفوسیوس از آن نام برده است (۱). ایران با دارا بودن ۰۹۲ هزار هکتار و تولید ۴/۲ میلیون تن مرکبات از نظر سطح زیرکشت و میزان تولید در بین کشورهای تولیدکننده مرکبات به‌ترتیب مقام هشتم و هفتم را داراست و این جایگاه خوبی در بین ۰۴۱ کشور مرکبات‌خیز دنیاست (۲). مرکبات از گیاهان مناطق نیمه-گرمسیری محسوب می‌شوند. در مناطق گرمسیری، میزان قند و اسید در این میوه‌ها کمتر شده و پوست آنان سبز باقی مانده و گلدهی نیز یکنواخت نمی‌باشد (۳). نظر به تولید این محصول در فصل خاصی از سال و همچنین تولید آن در مناطق خاصی از کشور نیاز به انبارداری آن امری اجتناب‌ناپذیر است. میوه‌جات از جمله مرکبات در طی انبارداری دستخوش تغییرات مختلف فیزیولوژیکی قرار می‌گیرند که باعث می‌شود کیفیت میوه در طی انبارداری کاهش یابد (۴). تغییرات بیوشیمیایی و فیزیولوژیک متعدد و هم‌چنین تغییر در ساختار بافت محصولات باغی در قبل و بعد از برداشت انجام می‌گیرد که شامل تغییر در میزان آب محصولات، تغییرات میزان قند در میوه و سبزی‌ها، تغییر میزان نشاسته در محصولات باغی، تغییر ترکیبات پکتینی، تغییر ویتامین‌های محصولات باغی، تغییرات سلولز و همی‌سلولز، تغییر اسیدهای آلی، تغییر ترکیبات نیتروژنه، تغییر ترکیبات پروتئینی، تغییر ترکیبات لیپیدی، تغییر ترکیبات فنولی، تغییر ترکیبات رنگی، تغییر میزان کلروفیل و تغییر در میزان آنتوسیانین‌ها می‌شود (۵). فساد پس‌از برداشت می‌تواند به‌دلیل عوامل قبل و بعد از برداشت باشد. مرکبات ممکن است قبل از برداشت و یا در طول برداشت دارای آلودگی پنهان باشد. به‌طورکلی ضایعات پس از برداشت میوه‌ها و سبزی‌ها به‌دلیل آسیب‌های مکانیکی، فیزیولوژیکی و محیطی و فساد آن‌ها به‌وسیله عوامل میکروبی و بیولوژیکی بروز می‌کند. عوامل فیزیولوژیکی شامل تنفس و تعرق در میوه و سبزی و عوامل محیطی عمده، همان درجه حرارت و رطوبت نسبی محیط نگه‌داری محصول است. فساد میکروبی و بیولوژیکی به ضایعات ایجاد شده در اثر باکتری‌ها، کپک‌ها، مخمرها، ویروس‌ها، آفات، جوندگان و سایر حیوانات اشاره کرد. آسیب‌های مکانیکی در اثر استفاده از روش‌های نامناسب برداشت و بسته‌بندی و حمل و نقل نادرست به‌وجود می‌آید (۶). در این میان میوه مرکبات، محصولی حساس به بیماری‌های پس از برداشت است، که توسط قارچ‌ها در شرایط نامناسب ایجاد می‌شوند. عامل‌های قارچی پس از برداشت شامل بوتیریتیس سینرا، آلترناریا، آسپرژیلوس، پنی‌سیلیوم، مونیلینا لاکسا و ریزوپوس استولونیفر می‌باشند. تعدادی از میوه‌جات توسط حشرات و حیوانات شکاف اولیه برداشته و در طی برداشت مکانیکی مستعد خسارت می‌شوند (۷). نظر به خسارتی که همواره میوه مرکبات همواره متحمل می‌شوند در نتیجه مطالعه و آگاهی از روش‌های مختلفی که منتج به کاهش میزان ضایعات شود از اهمیت بسیاری برخوردار است. جا دارد در ایران به مسائل پس از برداشت توجه بیشتری شده و با مراعات نکات فنی، از ایجاد ضایعات در محصول جلوگیری نموده و یا آن‌را به‌حداقل ممکن رساند. علاوه‌بر ضایعات فیزیکی محصول، هرگونه اختلال در کیفیت ظاهری، بافت و عطر و طعم محصول نیز جز ضایعات محصول محسوب می‌شود. بنابراین اهمیت و نقش فیزیولوژی و تکنولوژی پس از برداشت در کاهش ضایعات و حفظ کیفیت محصولات بیشتر می‌شود (۸ و ۹).

جهت افزایش عمر انبارمانی میوه جات و بالاخص مرکبات همواره از ترکیبات شیمیایی استفاده می‌شود که این امر علاوه‌براین که برای محیط زیست خطرآفرین است سلامت انسان را نیز به چالش می‌کشد. استفاده از عصاره‌های گیاهی می‌تواند به‌عنوان روشی ایمن و دوست‌دار محیط‌زیست باعث افزایش عمر انبارمانی میوه‌های مرکبات شود. عصاره‌های گیاهی علاوه بر اثر مستقیم قارچ‌کشی که دارند، حاوی ترکیباتی هستند که می‌تواند باعث القای سیستم دفاعی گیاه در برابر بیمارگرها شود

(۱۰). لذا در این مطالعه به‌منظور مطالعه اثر عصاره‌های گیاهی بر سیستم آنزیمی گیاه، تاثیر این ترکیبات طبیعی بر روی میزان فعالیت دو آنزیم آنتی‌اکسیدانت کاتالاز و پراکسیداز مورد بررسی قرار گرفت، در قسمت دوم تحقیق تاثیر عصاره آبی و اتانولی اسطوخودوس بر روی میزان بیان این دو ژن، و در نهایت جهت بررسی تاثیر عصاره‌های گیاهی بر روی کیفیت میوه‌ها آزمون پنل بر روی میوه‌های مورد بررسی انجام شد.

مواد و روش‌ها

مشخصات طرح و تیمارهای آزمایش: در این مطالعه فعالت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز میزان بیان این دو ژن، و همچنین تست پنل در میوه پرتقال رقم تامسون ناول، که تحت تیمارعصاره‌های تهیه‌شده با حلال آبی و اتانولی گیاهان مختلف شامل اسطوخودوس (Lavandula angostifolia)، میخک (Syzygium aromaticum) و چریش(Azadiratcha indica) در غلظت‌های متفاوت (دو در هزار، چهار در هزار و شش در هزار)، و همچنین پوشش خوراکی در سه غلظت نیم، یک و یک و نیم درصد از کیتوزان و واکس انباری بر روی پرتقال اندازه‌گیری شد. برای هر کدام از تیمارها، شاهد آب مقطر و برای کیتوزان هم شاهد کیتوزان در نظر گرفته شد (۱۱).

تهیه مواد گیاهی: برگ گیاه چریش از فضای سبز شهرستان چابهار برداشت شد و آویشن، میخک ، اسطوخودوس از محل رویش طبیعی آن‌ها تهیه شدند. واکس براق کننده پرتقال نیز از شرکت پوشان حیات سبز تهیه شد.گیاهان ابتدا شست و شوی سطحی شده و سپس به‌وسیله هیپوکلریت ۲ درصد به‌مدت ۵ دقیقه ضدعفونی و سپس با آب مقطر استریل سه مرتبه شسته شدند (۱۲). نمونه‌های گیاهی در شرایط آزمایشگاه و دور از تابش مستقیم نور آفتاب خشک شدند. سپس اندام‌های هوایی به‌وسیله خردکن پودر شده و از الک یک مش عبور داده شدند (۱۳).

تهیه عصاره: تهیه عصاره‌های گیاهی به دو روش استفاده از حلال الکلی (اتانولی) و آب انجام گرفت. در روش استفاده از اتانول، ۲۰ گرم از ماده خشک گیاهی در ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول خالص (شرکت مرک) خیسانده شد و بعد از ۲۴ ساعت ماندن در فضای آزمایشگاه به‌مدت ۲۴ ساعت روی شیکر با سرعت ۱۱۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. پس از اتمام زمان مورد نظر محلول‌های حاصل توسط پارچه ململ صاف شدند و در ۵۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و سپس ۷۵ میلی‌لیتر از محلول رویی به یک استوانه مدرج منتقل شده، ۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل به آن اضافه شد تا حجم آن به ۱۰۰ میلی‌لیتر برسد، سپس هم حجم با آن هگزان اضافه شد. این مخلوط دو ساعت روی شیکر قرار داده شده و پس از این مرحله، بخش‌های مختلف به کمک دکانتور جدا شده و بخش اتانولی جهت تبخیر اتانول و استحصال عصاره در زیر هود قرار داده شد (۱۴). در روش دوم بعد از ضدعفونی سطحی نمونه‌های گیاهی ۲۰ گرم از ماده خشک گیاهی در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل خیسانده شد و پس از ۲۴ ساعت از پارچه ململ عبور داده شده و سانتریفیوژ شد (۱۵).

تهیه کیتوزان: ابتدا کیتوزان از شرکت سیگما آلدریچ با درجه استیل‌زدایی ۸۰ درصد خریداری شد. برای تهیه غلظت ۰/۵ درصد کیتوزان، مقدار ۱/۲۵ گرم از پودر کیتوزان در ۱۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر اتوکلاو شده و ۱۲/۵ میلی‌لیتر اسیداستیک روی هات‌پلیت هم‌زده شد تا محلول یکنواختی حاصل شد. سپس pH این محلول توسط سود ۵ نرمال، روی۵/۴ تنظیم گردید. مقدار کیتوزان مورد استفاده برای غلظت ۱ درصد، ۲/۵ گرم و برای غلظت ۱/۵ درصد، ۳/۷۵ گرم از پودر کیتوزان بود. برای تهیه شاهد کیتوزان، همه موارد بالا تکرار شد ولی کیتوزان به این مواد افزوده نشد.

تهیه میوه پرتقال: میوه پرتقال رقم تامسون ناول بعد از تعیین زمان برداشت از یکی از باغ‌های تجاری واقع در شهرستان جیرفت جمع‌آوری شد. سعی براین شد که میوه‌های انتخاب شده یکنواخت و دارای اندازه یکسان و عاری از هرگونه زخم، خراش و یا عامل بیماری باشند.

عملیات پوشش‌دهی به‌روش غوطه‌وری انجام شد و پرتقال‌ها به‌مدت سه دقیقه در محلول عصاره و پوشش خوراکی در غلظت‌های معین قرار گرفتند. تیمارنمونه شاهد با استفاده از آب مقطر انجام شد. سپس میوه‌ها در مجاورت هوا خشک شده و بعد از توزین برچسب زده شدند. بعد از اعمال تیمار، میوه‌ها در سردخانه با دمای ۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۸۰ تا ۹۰ درصد نگه‌داری شدند. میوه‌ها در ابتدای آزمایش و سپس هر بیست روز یک‌بار از انبار خارج و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز و همچنین میزان بیان ژن این دو آنزیم داخل میوه اندازه‌گیری و با نمونه‌های بدون پوشش مقایسه شدند. بعد از نمونه‌برداری پوست میوه از قسمت گوشت جداسازی و بلافاصله قسمت گوشت تا زمان استفاده در نیتروژن مایع قرار داده و سپس به فریزر ۸۰- منتقل شد. نکته قابل ذکر این است که تیمارها حذفی بودند و در شروع آزمایش تعداد پرتقال‌ها طوری در نظر گرفته شده بودند که بعد از هر بیست روز که پرتقال‌ها برای اندازه‌گیری آنزیم و بیان ژن حذف می‌شوند، برای دوره‌های بعد از همان تیمارها میوه وجود داشته باشد. به‌عبارت دیگر برای ۲۴ تیماری که در این مطالعه بررسی شد (جدول ۳)، چهار تکرار در نظر گرفته شد، و با توجه به این‌که در هر مرحله‌ای تعداد ۹۶ عدد پرتقال حذف می‌شدند (۲۴ ضربدر ۴ تکرار)، در مجموع ۴۸۰ عدد پرتقال برای این آزمون در نظر گرفته شد.

اندازه‌گیری فعالیت کاتالاز و پرکسیداز: جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پرکسیداز ابتدا میزان پروتئین تام به روش بردفورد و همکاران (۱۶) انجام گرفت.

استخراج عصاره برای اندازه‌گیری آنزیم: استخراج عصاره پرتقال به‌منظور ارزیابی فعالیت آنزیم پراکسیداز، طبق روش گنگ و همکاران (۱۷)،، به‌شرح زیر انجام شد. یک گرم از بافت پرتقال جداشده و در سه میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۵ مولار با pH=۷ در یک هاون چینی کاملا له شد. برای این‌که یک مخلوط هموژن از عصاره به‌دست آید بلافاصله سوسپانیون حاضر را به ویال‌های دو میلی‌لیتری منتقل و در دستگاه میکروسانتریفیوژ به‌مدت ۱۵ دقیقه در rpm ۱۵۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. مخلوط رویی جهت بررسی میزان تغییرات آنزیم پراکسیداز برداشته شد و در فریزر در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد

میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز: جهت ارزیابی میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز به‌روش رونی و همکاران (۱۸)، دو میلی‌لیتر از مخلوط واکنش شامل مقداری از عصاره که دارای ۵۰ میلی‌گرم پروتئین باشد (این مقدار با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه شد)، ۵ میلی‌مولار گوایکول و مقدار کافی بافر فسفات ۲۵ میلی‌مول با pH=۷ را به حجم نهایی دو میلی‌لیتر رسید، در یک لوله آزمایش ریخته و دستگاه اسپکتروفتومتر با استفاده از این مخلوط در طول موج ۴۷۰ نانومتر صفر گردید. سپس پنج میکرولیتر پراکسیدهیدروژن (H_2O_2) ۳۰ درصد به این مخلوط اضافه شد و سریعا تغییرات جذب نور به فواصل ۱۰ ثانیه، به‌مدت یک دقیقه اندازه‌گیری شد. مقدار فعالیت آنزیم بر حسب تغییرات جذب نور بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین بیان شد.

میزان فعالیت آنزیم کاتالاز: فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس روش ارائه شده توسط دو و همکاران (۱۹) به شرح زیر ارزیابی شد. مقداری از عصاره که دارای ۴۰ میکروگرم پروتئین باشد (این مقدار با استفاده ازمنحنی استاندارد محاسبه شد)، با مقداری از بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی مولار با pH=۷ به حجم دو میلی‌لیتر رسانده و سپس در دستگاه اسپکتروفتومتر قرار داده شد و دستگاه با آن کالیبره شد. سپس به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از H_2O_2 سه درصد به مخلوط واکنش اضافه و میزان جذب نور

به‌مدت ۲ دقیقه اندازه‌گیری شد. میزان فعالیت آنزیم بر اساس مقدار تجزیه شدن H_2O_2 اندازه‌گیری می‌شود. جذب محلول‌ها در ۲۴۰ نانومتر نسبت به آب با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. فعالیت کاتالاز بر اساس میلی‌مولار پراکسیدهیدروژن در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین چهار تکرار اندازه‌گیری شد.

بررسی میزان بیان بعضی از ژن‌های دفاعی در سطح نسخه‌برداری: در این قسمت، بررسی بیان ژن دو آنزیمی که میزان فعالیت آن‌ها اندازه‌گیری شده بود، انجام شد. میوهای پرتقال مانند آزمون اندازه‌گیری آنزیم‌ها تیمار شدند، و در واقع همزمان با نمونه‌برداری برای اندازه‌گیری آنزیم‌ها نمونه برداری برای اندازه‌گیری فعالیت ژن‌ها نیز انجام شد (فقط از عصاره اسطوخودوس و کیتوزان غلظت ۰/۵ استفاده شد) تیمار شدند، و نمونه‌برداری در روزهای بیستم، چهلم، شصتم، هشتاد و ۱۰۰ روز بعد از آلودگی میوه‌ها صورت گرفت. بعد از نمونه‌برداری، پوست میوه از قسمت گوشت جداسازی و بلافاصله قسمت گوشت تا زمان استفاده در نیتروژن مایع قرار داده و سپس به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شد.

برای استخراج RNA کل، نمونه‌ها از فریزر خارج شده و بلافاصله در داخل ظرف حاوی نیتروژن مایع قرار گرفت و سپس در داخل هاون و نیتروژن مایع به‌خوبی کوبیده شدند. استخراجRNA توسط کیت RNXplus (سیناژن، ایران) و بر اساس دستورالعمل شرکت انجام پذیرفت (۲۰).

ساخت cDNA توسط آنزیم رونویسی معکوس: ساخت رشته cDNA از روی mRNAهای کل سلول با استفاده از آغازگر Oligo- (dt)18 تعبیه شده در کیتRevertAid Reverse Transcriptase (شرکت Thermo Scientific، آلمان) و بر اساس دستورالعمل ارایه شده در کیت انجام شد. به‌منظور اطمینان از عدم آلودگی RNA به DNA ژنومی، قبل از ساختcDNA با استفاده از آغازگرهای اختصاصی واکنش PCR با این RNA انجام شد و در مورد هیچ یک از RNAهای استخراجی، باندی در واکنش PCR آن‌ها مشاهده نشد.

بررسی الگوی بیان ژن‌های منتخب با روش Real time –PCR: الگوی بیان سه ژن شامل ژن‌های رمز کننده کاتالاز، پراکسیداز در سطح نسخه‌برداری با استفاده از آغازگرهای مناسب (جدول ۱) و روش PCR کمی از نوع کمیت‌سنجی نسبی بررسی شدند. ژن اکتین به‌عنوان ژن خانه‌دار انتخاب شد. تکثیر cDNA در واکنش کمی PCR از نوع کمیت‌سنجی نسبی، بر طبق دستورالعمل کیت(YTA SYBR Green qPCR Master Mix (2x (یکتا تجهیز آزما، ایران) و با استفاده از ترموسایکلر ویژه PCR کمی (Corbett RG-6000) انجام گرفت. برای تعیین میزان تغییرات بیان ژن‌ها در طی نقاط زمانی از روش Livak استفاده شد. در این روش فرض بر این است که بازده نمونه و کنترل داخلی برابر و ۱۰۰ درصد است و از فرمول $۲^{-\Delta\Delta CT}$ به‌منظور بررسی تغییر بیان ژن استفاده شد (۲۱). بلافاصله بعد از انجام واکنشReal time PCR، محصول واکنش روی ژل ران شد و از کارکرد اختصاصی واکنش اطمینان حاصل شد. الگوی بیان ژن‌ها با استفاده از دستگاه ترموسایکلر زمان واقعی (Corbett RG-6000) بررسی شد. برای تعیین میزان تغییرات بیان ژن‌ها در طی نقاط زمانی از روش Livak استفاده شد. در این روش فرض بر این است که بازده نمونه و کنترل داخلی برابر و ۱۰۰ درصد است و از فرمول $۲^{-\Delta\Delta CT}$ به‌منظور بررسی تغییر بیان ژن استفاده شد (۲۱).

میزان بیان ژن‌های دفاعی منتخب براساس ژن توبولین (ژن خانه دار) با بیان ثابت نرمال شده و سپس میزان تغییرات بیان ژن در همه تیمارها نسبت به شاهد سنجیده شد.

میانگین مربوط به هر ژن در قالب طرح کاملا تصادفی با چهار تکرار (دو تکرار زیستی و دو تکرار روشی) تجزیه واریانس شد. نتایج به‌دست آمده از Real time RT -PCR با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن در سطح خطای ۰/۰۵ و با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام گرفت. داده‌ها بر اساس آزمون Kurtosis و Skewness نرمال بودند.

جدول ۱: آغازگرهای مورد استفاده در آزمایش Real time PCR

Name of genes	Primers seqences
Catalase	TTGAACACGAACGTCGACACCT CTTGTACAGGAACGACAGCATC
Peroxidase	GATCTTCGTGCTCGTGTTCA TGCGAATGTTTTGCTGTCTC

ارزیابی کیفیت میوه بر اساس تست پنل: در انتهای آزمایش به‌منظور بررسی کیفیت ظاهری و حسی میوه‌ها از نظر مصرف‌کننده آزمایشی صورت پذیرفت که در آن فرد مورد نظر بدون آگاهی از نوع و مقدار ماده پوششی استفاده شده روی میوه‌ها، به سوالات پرسیده شده در فرم پرسش‌نامه پاسخ دهد. برای ارزیابی حسی میوه از تعداد ۹ نفر پانلیست شامل ۵ مرد و ۴ زن، در سنین بین ۲۵ تا ۴۵ سال استفاده شد. از افراد خواسته‌شد تا بعد از تست میوه‌های مذکور به‌جهت از بین بردن مزه‌ی دهان به‌مقدار کافی آب میل نمایند.

نتایج

بررسی فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز

کاتالاز

طبق جدول تجزیه واریانس (جدول ۲)، داده‌های آنزیم کاتالاز در سطح احتمال یک درصد دارای اختلاف معنی‌دار بودند. روند کلی داده‌های مربوط به آنزیم کاتالاز افزایشی است. طبق جدول مقایسه میانگین (جدول ۳)، از میان تیمارهای اعمال شده، تیمارهای شاهد کیتوزان با مقدار ۴/۳۱ دارای کم‌ترین میزان آنزیم کاتالاز هستند و بعد از آن کیتوزان یک و یک و نیم درصدی با مقدار ۱/۴۵ کم‌ترین میزان کاتالاز را دارا بود. در روز صدم، عصاره اسطوخودوس اتانولی با غلظت شش در هزار دارای کمترین میزان آنزیم کاتالاز با مقدار ۲/۱۳ می‌باشد. بعد از عصاره اسطوخودوس، پرتقال‌های تیمار شده با عصاره میخک و سپس عصاره چریش قرار دارند.

جدول ۲: تجزیه واریانس داده‌های کاتالاز پرتقال تامسون در طی زمان‌های انبارداری

منابع تغییرات	df	میانگین مربعات				
		دوره اول (روز ۲۰)	دوره دوم (روز ۴۰)	دوره سوم (روز ۶۰)	دوره چهارم (روز ۸۰)	دوره پنجم (روز ۱۰۰)
تیمارها	۲۳	۲/۰۸۷**	۱/۸۴**	۲/۰۱**	۲/۰۵**	۱/۸۷**
خطا	۴۸	۰/۰۰۲	۰/۰۳۷	۰/۰۰۳	۰/۰۰۳	۰/۰۰۴
CV%		۲/۲۶	۷/۷۸	۲/۳۷	۲/۰۱	۲/۱۶

** به‌احتمال ۹۹ درصد ($P\leq0.01$) اختلاف معنی دار بین تیمارهای مورد مطالعه وجود دارد.

جدول۳: مقایسه میانگین تیمارهای مختلف بر میزان فعالیت کاتالاز در پرتقال تامسون در طی دوره‌های انباری

تیمار	غلظت	دوره اول(روز ۲۰)	دوره دوم(روز ۴۰)	دوره سوم(روز ۶۰)	دوره چهارم(روز۸۰)	دوره پنجم(روز۱۰۰)
شاهد	۰	^{a}۳/۶۲	^{a}۳/۷۸	^{a}۴/۰۱	^{a}۴/۱۳	^{a}۴/۲۵
شاهد کیتوزان	۰	^{b}۳/۴۷	^{ab}۳/۶۲	^{a}۳/۹۶	^{a}۴/۱۲	^{a}۴/۳۱
اسطوخودوس (آبی)	۲×۱۰۰۰	^{l}۱/۹۵	^{ij}۲/۰۴	^{j}۲/۱۲	^{j}۲/۲۱	^{g}۲/۵۰
	۴×۱۰۰۰	^{m}۱/۷۷	^{j}۱/۷۷	^{j}۲/۰۴	^{jk}۲/۱۲	^{i}۲/۵۴
	۶×۱۰۰۰	^{m}۱/۷۰	^{j}۱/۸۲	^{j}۲/۰۲	^{jk}۲/۱۳	^{i}۲/۳۴
اسطوخودوس (اتانولی)	۲×۱۰۰۰	^{n}۱/۵۷	^{j}۱/۸۴	^{k}۱/۹۱	^{jk}۲/۱۱	^{i}۲/۲۲
	۴×۱۰۰۰	^{n}۱/۵۳	^{j}۱/۸۱	^{k}۱/۹۲	^{jk}۲/۱۳	^{h}۲/۳۵
	۶×۱۰۰۰	^{o}۱/۴۱	^{j}۱/۷۸	^{k}۱/۸۷	^{k}۲/۰۵	^{i}۲/۱۳
میخک (آبی)	۲×۱۰۰۰	^{d}۳/۲۴	^{ef}۲/۷۷	^{cd}۳/۴۰	^{d}۳/۵۰	^{d}۳/۵۴
	۴×۱۰۰۰	^{g}۲/۶۷	^{ed}۲/۹۱	^{f}۲/۸۱	^{g}۲/۸۶	^{e}۳/۱۰
	۶×۱۰۰۰	۲/۲۸^{i}	^{fgh}۲/۵۴	^{g}۲/۶۳	^{j}۲/۸۹	^{e}۳/۱۱
میخک (اتانولی)	۲×۱۰۰۰	^{j}۲/۶۷	^{ef}۲/۷۱	^{f}۲/۸۰	^{j}۲/۸۷	^{e}۳/۰۴
	۴×۱۰۰۰	^{h}۲/۴۴	^{fg}۲/۵۵	^{f}۲/۷۵	^{g}۲/۸۸	^{e}۳/۰۳
	۶×۱۰۰۰	۲/۱۷^{j}	^{hi}۲/۲۱	^{i}۲/۳۳	^{i}۲/۴۶	^{f}۲/۸۱
چریش (آبی)	۲×۱۰۰۰	^{c}۳/۳۶	^{bc}۳/۴۰	^{c}۳/۴۳	^{c}۳/۶۱	^{d}۳/۵۵
	۴×۱۰۰۰	^{d}۳/۱۷	^{cd}۳/۲۱	^{cd}۳/۳۴	^{e}۳/۳۹	^{d}۳/۵۶
	۶×۱۰۰۰	^{f}۲/۷۶	^{ef}۲/۸۴	^{e}۲/۹۴	^{f}۳/۰۶	^{e}۳/۱۱
چریش (اتانولی)	۲×۱۰۰۰	^{o}۳/۲۳	^{bc}۳/۲۷	^{o}۳/۳۱	^{cd}۳/۵۳	^{c}۳/۷۳
	۴×۱۰۰۰	^{c}۳/۸۳	^{abc}۳/۵۰	^{b}۳/۷۰	^{b}۳/۸۵	^{b}۳/۹۰
	۶×۱۰۰۰	^{e}۳/۰۸	^{bc}۳/۲۸	^{cd}۳/۴۰	^{cd}۳/۵۳	^{d}۳/۵۶
کیتوزان (۰/۵)	۱گرم	۲/۰۸^{k}	^{ghi}۲/۲۵	^{h}۲/۴۴	^{h}۲/۶۲	^{f}۲/۸۶
کیتوزان (۱/۰)	۲/۵گرم	^{q}۱/۰۶	^{k}۱/۲۵	^{l}۱/۲۶	^{m}۱/۳۵	^{k}۱/۴۵
کیتوزان (۱/۵)	۳/۷۵پرم	۱/۰۵^{q}	^{k}۱/۲۸	^{lm}۱/۳۵	^{m}۱/۳۶	^{k}۱/۴۵
واکس	۲میلی‌لیتر	^{p}۱/۱۸	^{k}۱/۲۸	^{l}۱/۴۳	^{l}۱/۵۹	^{j}۱/۹۶

میانگین‌های دارای حروف متفاوت در هر ستون بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشد

پراکسیداز: طبق نتایج جدول تجزیه واریانس، (جدول ۴) داده‌ها در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بودند. با گذشت زمان میزان آنزیم پراکسیداز در میوه‌های تیمار شده افزایشی بود. جدول مقایسه میانگین (جدول ۵)، نشان می‌دهد که در روز صدم، کمترین میزان آنزیم پراکسیداز بعد از تیمارهای کیتوزان یک و یک و نیم درصد و واکس، مربوط به تیمار اسطوخودوسآبی با غلظت شش در هزار و به‌میزان ۱/۵۴ بود و بعد از تیمار عصاره اسطوخودوس اتانولی قرار گرفت. تیمارهای گروه شاهد با مقدار ۳/۵۹ و ۳/۳۱ دارای میزان آنزیم پراکسیداز بالایی بودند. میوه‌های تیمار شده با پوشش‌های خوراکی کیتوزان یک درصد با مقدار ۱/۱۸ دارای کم‌ترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز بودند.

جدول ۴- تجزیه واریانس داده‌های پراکسیداز پرتقال تامسون در طی زمان‌های انبارداری

منابع تغییرات	df	میانگین مربعات				
		دوره اول(روز۲۰)	دوره دوم (روز ۴۰)	دوره سوم (روز ۶۰)	دوره چهارم(روز۸۰)	دوره پنجم(روز۱۰۰)
تیمارها	۲۳	۲/۱۲**	۲/۱۳**	۲/۲۷**	۲/۲۷**	۲/۲۹**
خطا	۴۸	۰/۰۰۰۲	۰/۰۱۵	۰/۰۰۰۳	۰/۰۰۰۵	۰/۰۰۰۲
CV%		۰/۶۷	۵/۱۳	۰/۷۲	۰/۹۱	۰/۶۲

** به‌احتمال ۹۹ درصد ($P\leq0.01$) اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مورد مطالعه وجود دارد.

جدول ۵: مقایسه میانگین تیمارهای مختلف بر میزان فعالیت پراکسیداز در پرتقال تامسون در طی دوره‌های انباری

تیمار	غلظت	دوره اول (روز	دوره دوم (روز ۴۰)	دوره سوم (روز ۶۰)	دوره چهارم (روز۸۰)	دوره پنجم (روز۱۰۰)

		(۲۰				
شاهد	۰	^{e}۳/۱۹	^{c}۳/۲۲	^{g}۳/۲۳	^{e}۳/۲۸	^{e}۳/۳۱
شاهد کیتوزان	۰	^{b}۳/۱۴	^{ab}۳/۴۷	^{c}۳/۵۳	^{b}۳/۵۸	^{b}۳/۵۹
اسطوخودوس (آبی)	۲×۱۰۰۰	^{q}۱/۵۱	^{ij}۱/۵۵	^{q}۱/۵۸	^{p}۱/۶۳	^{p}۱/۶۵
	۴×۱۰۰۰	^{q}۱/۴۹	^{ij}۱/۵۶	^{q}۱/۵۹	^{p}۱/۶۰	^{p}۱/۶۳
	۶×۱۰۰۰	^{r}۱/۳۴	^{jk}۱/۳۹	^{r}۱/۴۵	^{q}۱/۵۰	^{q}۱/۵۴
اسطوخودوس (اتانولی)	۲×۱۰۰۰	^{n}۱/۸۸	^{gh}۱/۹۶	^{n}۱/۹۸	^{m}۲/۰۱	^{m}۲/۰۰
	۴×۱۰۰۰	^{o}۱/۷۰	^{hi}۱/۷۶	^{o}۱/۸۲	^{n}۱/۸۲	^{n}۱/۸۲
	۶×۱۰۰۰	^{p}۱/۶۱	^{i}۱/۶۷	^{p}۱/۷۰	^{o}۱/۷۲	^{o}۱/۷۰
میخک (آبی)	۲×۱۰۰۰	^{i}۲/۶۵	^{d}۲/۷۰	^{i}۲/۷۶	^{g}۲/۸۱	^{g}۲/۸۶
	۴×۱۰۰۰	^{j}۲/۴۲	^{e}۲/۴۸	^{j}۲/۵۶	^{i}۲/۶۲	^{i}۲/۶۵
	۶×۱۰۰۰	^{l}۲/۱۱	^{f}۲/۱۸	^{l}۲/۲۳	^{k}۲/۲۹	^{k}۲/۳۳
میخک (اتانولی)	۲×۱۰۰۰	^{b}۳/۲۱	^{bc}۳/۲۷	^{f}۲/۳۲	^{d}۳/۳۷	^{d}۳/۳۹
	۴×۱۰۰۰	^{i}۲/۶۲	^{d}۲/۶۹	^{i}۲/۷۴	^{h}۲/۷۶	^{h}۲/۷۷
	۶×۱۰۰۰	۲/۲۴^{k}	^{ef}۲/۳۰	^{k}۲/۳۳	^{j}۲/۳۹	^{j}۲/۴۰
چریش (آبی)	۲×۱۰۰۰	^{c}۳/۳۳	^{bc}۳/۴۰	^{d}۳/۴۶	^{c}۳/۴۷	^{c}۳/۵۰
	۴×۱۰۰۰	^{f}۳/۱۴	^{c}۳/۱۹	^{g}۳/۲۳	^{e}۳/۲۷	^{e}۳/۲۹
	۶×۱۰۰۰	^{h}۲/۷۶	^{d}۲/۸۲	^{h}۲/۸۶	^{f}۲/۸۹	^{f}۲/۹۲
چریش (اتانولی)	۲×۱۰۰۰	^{a}۳/۶۰	^{a}۳/۶۶	^{a}۳/۷۴	^{a}۳/۷۲	^{a}۳/۷۴
	۴×۱۰۰۰	^{c}۳/۳۲	^{bc}۳/۳۹	^{e}۳/۴۲	^{c}۳/۵۰	^{c}۳/۵۲
	۶×۱۰۰۰	^{g}۳/۰۲	^{ab}۳/۴۹	^{b}۳/۶۹	^{a}۳/۷۵	^{a}۳/۷۶
کیتوزان (۰/۵)	۱گرم	۲/۰۲^{m}	^{fg}۲/۱۰	^{m}۲/۱۵	^{l}۲/۱۹	^{l}۲/۲۴
کیتوزان (۱/۰)	۲/۵گرم	۱/۰۳^{t}	^{jk}۱/۳۴	^{t}۱/۱۳	^{s}۱/۱۵	^{t}۱/۱۸
کیتوزان (۱/۵)	۳/۷۵پرم	^{t}۱/۰۲	^{l}۱/۰۸	^{t}۱/۱۳	^{s}۱/۱۹	^{s}۱/۲۱
واکس	۲میلی‌لیتر	^{s}۱/۱۳	^{kl}۱/۱۸	^{s}۱/۲۴	^{r}۱/۲۸	^{r}۱/۲۸

میانگین‌های دارای حروف متفاوت در هر ستون بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

بررسی میزان بیان ژن آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز: با ارزیابی منحنی‌های ذوب قطعات تکثیری و مشاهده‌ی تنها یک پیک برای هر ژن، از اختصاصی بودن تولیدات سنجش‌شده در آزمون کمی اطمینان حاصل شد (جدول ۶). میزان بیان ژن رمز کننده آنزیم کاتالاز در طول ۱۰۰ روز نگه‌داری در تمام تیمارها روند مشابهی را داشت و تا روز صدم پس از اعمال تیمارها، در تمام تیمارها افزایش نشان داد. کمترین میزان بیان ژن در بین تیمارها مربوط به تیمار ۶×۰۰۰۱ عصاره اسطوخودوس اتانولی، در تمام روزهای نمونه‌برداری بود، و در روز بیستم بعد از اعمال تیمارها، کمترین میزان را با مقدار ۶/۶۶ برابر میزان بیان در تیمارپرتقال سالم در روز اول، از خود نشان داد. میزان بیان این ژن با افزایش غلظت عصاره، نشان دهنده تاثیر مستقیم عصاره بر روی میزان بیان این ژن در سطح نسخه‌برداری می‌باشد (شکل ۱ و جدول ۷). در مورد عصاره آبی اسطوخودوس نیز دقیقا همین روال مورد مشاهده قرار گرفت، ولی همواره عصاره آبی تأثیر کمتری در میزان افزایش بیان ژن کاتالاز از خود نشان داد.

میزان ژن رمز کننده آنزیم پراکسیداز در طول ۱۰۰ روز آزمایش، در تمام تیمارها روند مشابهی داشت، به‌عبارت‌دیگر میزان بیان این ژن در طول آزمایش همواره افزیش یافت، اما تیمارهای استفاده از عصاره های آبی و اتانولی اسطوخودوس این روند را کند کردند (جدول ۸). غلظت ۶×۱۰۰۰ عصاره اتانولی کمترین میزان بیان ژن این آنزیم را بیست روز بعد از اعمال تیمار در پی داشت (۵/۲۶ برابر میزان بیان این ژن در پرتقال سالم در روز اول) و این مقدار کمترین میزان نسخه‌برداری نسبی ژن در بین همه تیمارهای غلظت‌ها بود. استفاده از عصاره آبی اسطوخودوس تاثیر مشابهی بر روی میزان بیان ژن پراکسیداز در طول این آزمون گذاشت و روند افزایشی فعالیت آنزیم را کند نمود، در مورد این تیمار استفاده از غلظت ۶×۱۰۰۰ این عصاره

بیشترین تاثیر را در بین غلظت‌های مختلف عصاره آبی در کاهش فعالیت آنزیم با به‌میزان ۷/۵۲ در روز بیستم نمونه برداری، از خود نشان داد (شکل ۲، جدول ۹).

جدول ۶: تجزیه واریانس داده‌های بیان ژن آنزیم کاتالاز پرتقال تامسون در طی زمان‌های انبارداری

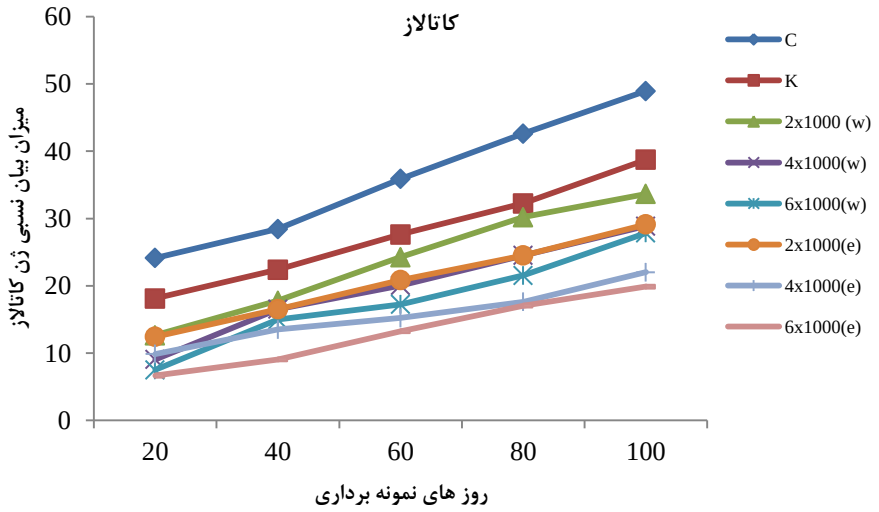
منابع تغییرات	df	میانگین مربعات				
		دوره اول (روز ۲۰)	دوره دوم (روز ۴۰)	دوره سوم (روز ۶۰)	دوره چهارم (روز ۸۰)	دوره پنجم (روز ۱۰۰)
تیمارها	۷	۱/۹۶**	۴/۷۴**	۲/۲۱**	۲/۲۵**	۱/۹۷**
خطا	۱۸	۰/۰۱۶	۰/۱۳۷	۰/۰۲۳	۰/۰۲۳	۰/۰۲۴
CV%		۸/۱۲	۵/۸۴	۲/۲۶	۲/۳۱	۲/۲۶

** به‌احتمال ۹۹ درصد ($P\leq0.01$) اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مورد مطالعه وجود دارد.

جدول ۷: مقایسه میانگین تیمارهای مختلف بر میزان بیان ژن آنزیم کاتالاز در پرتقال تامسون در طی دوره‌های انباری

تیمار	غلظت	دوره اول (روز ۲۰)	دوره دوم (روز ۴۰)	دوره سوم (روز ۶۰)	دوره چهارم (روز ۸۰)	دوره پنجم (روز ۱۰۰)
شاهد	0	a۲۴/۱۵	a۲۸/۴۵	a۳۵/۸۹	a۴۲/۶۲	a۴۸/۹۵
شاهدکیتوزان	0	b۱۸/۱۲	b۲۲/۴۱	b۲۷/۶۳	b۳۲/۲۵	b۳۸/۷۴
اسطوخودوس (آبی)	۲×۱۰۰۰	cd۱۲/۶۶	cd۱۷/۸۰	bc۲۴/۲۵	bc۳۰/۲۱	c۳۶/۶۶
	۴×۱۰۰۰	def۹/۰۵	de۱۶/۵۲	d۲۰/۰۴	de۲۴/۵۲	ef۲۸/۸۷
	۶×۱۰۰۰	fg۷/۵۲	ef۱۴/۹۹	ef۱۷/۲۵	ef۲۱/۵۵	fg۲۷/۸۵
اسطوخودوس (اتانولی)	۲×۱۰۰۰	cd۱۲/۴۵	de۱۶/۵۲	d۲۰/۸۵	de۲۴/۵۲	de۲۹/۱۴
	۴×۱۰۰۰	de۹/۸۷	ef۱۳/۵۲	fg۱۵/۲۱	g۱۷/۶۳	hi۲۲/۰۱
	۶×۱۰۰۰	gh۶/۶۶	g۹/۰۶	g۱۳/۲۵	6g۱۷/۰۶	ij۱۹/۸۷

میانگین‌های دارای حروف متفاوت در هر ستون بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال یک‌درصد دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشد.



شکل ۱: تاثیر عصاره اسطوخودوس آبی (w) و اتانولی (e) و کیتوزان (k) غلظت ۰/۵ بر روی بیان ژن آنزیم‌های کاتالاز در میوه پرتقال. P: بیمارگر. داده‌ها میانگین سه تکرار هستند.

جدول ۸: تجزیه واریانس داده‌های بیان ژن آنزیم پراکسیداز پرتقال تامسون در طی زمان‌های انبارداری

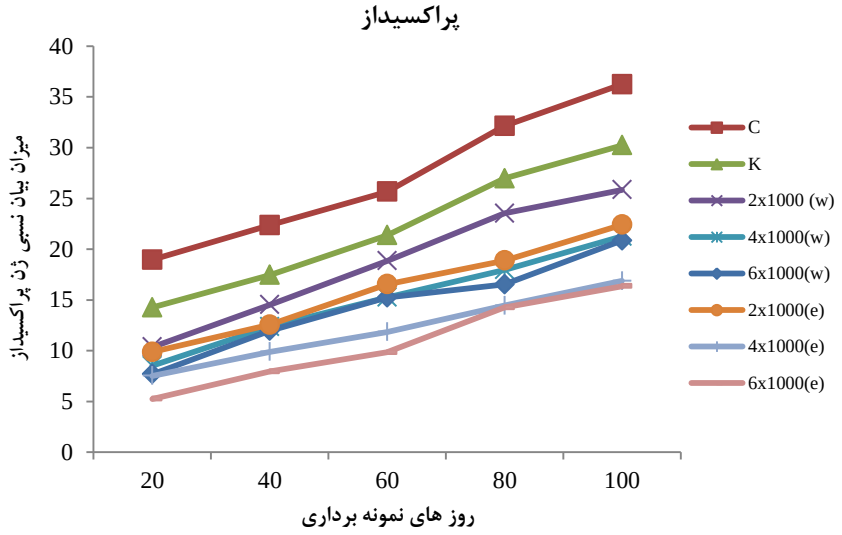
منابع تغییرات	df	میانگین مربعات				
		دوره اول (روز ۲۰)	دوره دوم (روز ۴۰)	دوره سوم (روز ۶۰)	دوره چهارم (روز ۸۰)	دوره پنجم (روز ۱۰۰)
تیمارها	۷	۲/۱۶**	۲/۲۶**	۲/۲۶**	۲/۵۱**	۵/۶۳**
خطا	۱۸	۰/۰۰۲۳	۰/۰۲۲	۰/۰۰۱۲	۰/۰۰۱۱	۰/۰۰۶۲
CV%		۶/۶۹	۵/۱۶	۵/۲۲	۶/۲۶	۴/۱۲

** به‌احتمال ۹۹ درصد ($P\leq0.01$) اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مورد مطالعه وجود دارد.

جدول ۹: مقایسه میانگین تیمارهای مختلف بر میزان بیان ژن آنزیم پراکسیداز در پرتقال تامسون در طی دوره‌های انباری

تیمار	غلظت	دوره اول (روز ۲۰)	دوره دوم (روز ۴۰)	دوره سوم (روز ۶۰)	دوره چهارم (روز ۸۰)	دوره پنجم (روز ۱۰۰)
شاهد	0	a۱۸/۹۶	a۲۲/۳۶	a۲۵/۶۵	a۳۲/۱۴	a۳۶/۲۴
شاهدکیتوزان	0	b۱۴/۲۵	b۱۷/۴۶	b۲۱/۳۶	bc۲۶/۹۶	b۳۰/۲۲
اسطوخدوس(آبی)	۲×۱۰۰۰	cd۱۰/۳۶	cd۱۴/۵۲	c۱۸/۸۵	cd۵۲.۲۳	c۲۵/۸۵
	۴×۱۰۰۰	ef۸/۵۲	de۱۲/۳۶	ef۱۵/۲۵	fg۱۷/۹۶	cde۲۱/۲۵
	۶×۱۰۰۰	fg۷/۶۹	ef۱۱/۹۶	ef۱۵/۲۳	gh۱۶/۵۲	de۲۰/۸۵
اسطوخودوس(اتانولی)	۲×۱۰۰۰	de۹/۸۸	de۱۲/۵۵	de۱۶/۵۴	ef۱۸/۸۸	cd۲۲/۴۱
	۴×۱۰۰۰	fg۷/۵۲	fg۹/۸۹	gh۱۱/۸۴	hi۱۴/۴۴	fg۱۶/۸۸
	۶×۱۰۰۰	h۵/۲۸	gh۷/۹۶	h۹/۸۵	i۱۴/۲۵	g۱۶/۳۶

میانگین‌های دارای حروف متفاوت در هر ستون بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشد.



شکل ۲: تاثیر عصاره اسطوخودس آبی (w) و اتانولی (e) و کیتوزان (k) غلظت ۰/۵ بر روی بیان ژن آنزیم‌های پراکسیداز در میوه پرتقال. P: بیمارگر. داده‌ها میانگین سه تکرار هستند.

تست پنل

بر اساس نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱۰)، اثر پوشش‌ها و عصاره‌های گیاهی بعد از گذشت ۱۰۰ روز از انبارداری میوه‌ها، بر رنگ پوست، بو و طعم میوه، کیفیت ظاهری، تصمیم به خرید و ارزیابی میوه به‌طورکلی در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود. براساس نتایج مقایسه میانگین، (جدول ۱۱ و ۱۲)، از نظر رنگ پوست تیمار واکس، میخک اتانولی و آبی با غلظت شش در هزار با مقدار ۴/۱۱ بیشترین نمره‌ها را به‌دست آوردند. تیمار عصاره اسطوخودوس و پوشش کیتوزان با غلظت‌های مختلف،

از این نظر در مرحله بعدی قرار گرفتند. از بین عصاره‌های اعمال شده میوه‌های تیمار شده با عصاره چریش با غلظت دو در هزار با غلظت ۳/۰۰ کم‌ترین نمرات را به‌دست آوردند. گروه شاهد آب مقطر و شاهد کیتوزان به‌ترتیب با مقدار ۳/۰۰ و ۲/۸۸ دارای کم‌ترین نمره‌ها هستند.

از نظر بوی میوه، اسطوخودوس اتانولی با غلظت چهار در هزار با مقدار ۳/۸۸ و غلظت شش در هزار با مقدار ۴/۰۰ و میخک آبی چهار در هزار با مقدار ۳/۸ و با غلظت شش در هزار با مقدار ۴/۰۰ بیش‌ترین نمره‌ها را به‌دست آوردند. تیمار چریش بعد از تیمار عصاره‌های اسطوخودوس و میخک قرار گرفت. از پوشش‌های کیتوزان استفاده شده، پوشش کیتوزان نیم درصد با مقدار ۳/۷۷ دارای نمره‌ی بیش‌تری بود.کم‌ترین نمره مربوط به تیمار شاهد کیتوزان با مقدار ۲/۸۸ و بعد از آن شاهد آب مقطر با مقدار ۳/۰۰ بود (جدول ۱۱). از نظر طعم چریش آبی شش در هزار با غلظت ۴/۰۰ و اسطوخودوس اتانولی با غلظت شش در هزار با مقدار ۳/۸۸ بیشترین نمره‌ها را به‌دست آوردند. واکس و شاهد آب مقطر با غلظت ۳/۰۰، و شاهد کیتوزان با غلظت ۲/۶۶، دارای کم‌ترین نمره‌ها هستند.

از نظر بافت میوه‌ها بین پوشش‌ها اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد اما از نظر عددی تیمار مربوط به شاهد کیتوزان با مقدار ۳/۳۳ مقدار کم‌تر و تیمار کیتوزان ۴/۰۰ مقدار بیشتری را از نظر عددی بدست آورد. از نظر میزان آب‌میوه نیز تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ولی از نظر عددی کم‌ترین نمرات میزان آب میوه مربوط به تیمار شاهد کیتوزان با غلظت ۳/۳۳ و بیش‌ترین کیتوزان با غلظت نیم درصد با مقدار ۴/۰۰ و واکس و تیمار عصاره آبی و اتانولی شش در هزار با غلظت ۳/۸۸، نمره-دهی شده است.

از نظر کیفیت ظاهری میوه‌ها، تیمار واکس و کیتوزان با غلظت نیم درصد با مقدار ۳/۷۷ بیش‌ترین نمره‌هارا دریافت کردند. از بین عصاره‌های استفاده شده، عصاره میخک با حلال آبی و حلال اتانولی با غلظت شش در هزار با مقدار ۳/۶۶ بیشترین نمره را از ارزیاب‌ها دریافت کردند، پس از آن تیمار عصاره اسطوخودوس و سپس عصاره چریش قرار گرفت. تیمارهای مربوط به گروه شاهد، به‌ترتیب شاهد آب مقطر و شاهد کیتوزان با مقدار ۳/۰۰ و ۲/۸۸ کم‌ترین نمرات را دریافت کردند.

براساس نظرسنجی مربوط به تصمیم به خرید میوه‌های تیمارشده، تیمار اسطوخودوس اتانولی با غلظت چهار در هزار و کیتوزان نیم درصد با مقدار ۳/۶۶ بیشترین امتیاز را کسب کردند. به‌طورکلی، تیمار شاهد با مقدار ۲/۵۵ دارای کم‌ترین نمرات و کم‌ترین تمایل به خرید بودند. به‌طورکلی از بین عصاره‌های اعمال شده، میخک اتانولی و اسطوخودوس دارای امتیاز بالاتری بودند. براساس نظرسنجی مربوط به ارزیابی کلی میوه‌های تیمارشده، تیمار اسطوخودوس اتانولی و میخک اتانولی با غلظت شش در هزار بیش‌ترین امتیاز را کسب کردند. کم‌ترین امتیاز از این نظر مربوط به تیمار شاهد کیتوزان با مقدار۲/۴۴ و شاهد آب مقطر با مقدار ۲/۵۵ بود. به‌طورکلی، تیمار شاهد دارای کم‌ترین نمرات و میخک اتانولی شش در هزار و اسطوخودوس اتانولی شش در هزار دارای امتیاز بالاتری بودند.

جدول ۱۰: تجزیه واریانس داده‌های تست پنل پرتقال تامسون در طی زمان‌های انبارداری

منابع تغییرات	df	میانگین مربعات							
		رنگ پوست	بوی میوه	طعم	بافت	میزان آب میوه	کیفیت ظاهری	تصمیم خرید	به‌طورکلی
تیمارها	۲۳	۱/۱۹*	۰/۹۷*	۰/۶۵*	۰/۳۲ ns	۰/۳۲ ns	۱/۰۴*	۱/۱۲*	۱/۰۷*
خطا	۱۹۲	۰/۵۸	۰/۵۳	۰/۴۸	۰/۵۴	۰/۵۴	۰/۵۵	۰/۴۹	۰/۴۸
Cv%		۲۱/۶۹	۲۰/۸۷	۱۹/۹۷	۲۰/۳۶	۲۰/۳۶	۲۲/۶۱	۲۲/۳۸	۲۲/۱۸

** به‌احتمال ۹۵ درصد ($P\leq0.05$) اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مورد مطالعه وجود دارد.

ns: سطوح معنی‌داری وجود ندارد.

جدول ۱۱: مقایسه میانگین تیمارهای مختلف بر تست پنل در پرتقال تامسون در طی دوره‌های انباری

تیمار	غلظت	رنگ	بوی	طعم	بافت
شاهد	۰	۳/۰۰ de	۳/۰۰ bc	۳/۰۰ bc	۳/۴۴ a
شاهدکیتوزان	۰	۲/۸۸ a	۲/۸۸ c	۲/۶۶ c	۳/۳۳ a
اسطوخودوس(آبی)	۲×۱۰۰۰	۳/۴۴ abcde	۳/۲۲ abc	۳/۳۳ abc	۳/۶۶ a
	۴×۱۰۰۰	۳/۶۶ abcde	۳/۵۵ abc	۳/۵۵ ab	۳/۸۸ a
	۶×۱۰۰۰	۳/۸۸ abc	۳/۶۶ abc	۳/۵۵ ab	۳/۷۷ a
اسطوخودوس(اتانولی)	۲×۱۰۰۰	۳/۳۳ abcde	۳/۴۴ abc	۳/۶۶ ab	۳/۴۴ a
	۴×۱۰۰۰	۳/۵۵ abcde	۳/۸۸ a	۳/۷۷ ab	۳/۴۴ a
	۶×۱۰۰۰	۳/۷۷ abcd	۴/۰۰ a	۳/۸۸ a	۳/۸۹ a
میخک(آبی)	۲×۱۰۰۰	۳/۴۴ abcde	۳/۴۴ abc	۳/۳۳ abc	۳/۵۵ a
	۴×۱۰۰۰	۴/۰۰ ab	۳/۸۸ a	۳/۵۵ ab	۳/۶۶ a
	۶×۱۰۰۰	۴/۱۱ a	۴/۰۰ a	۳/۵۵ ab	۳/۷۷ a
میخک(اتانولی)	۲×۱۰۰۰	۳/۲۲ bcde	۳/۲۲ abc	۳/۳۳ abc	۳/۷۷ a
	۴×۱۰۰۰	۳/۲۲ bcde	۳/۴۴ abc	۳/۴۴ ab	۳/۷۷ a
	۶×۱۰۰۰	۴/۱۱ a	۳/۸۸ a	۳/۵۵ ab	۳/۶۶ a
چریش(آبی)	۲×۱۰۰۰	۳/۰۰ de	۳/۲۲ abc	۳/۴۴ ab	۳/۴۴ a
	۴×۱۰۰۰	۳/۲۲ bcde	۳/۳۳ abc	۳/۲۲ abc	۳/۶۶ a
	۶×۱۰۰۰	۳/۵۵ abcde	۳/۷۷ ab	۴/۰۰ a	۳/۷۷ a
چریش(اتانولی)	۲×۱۰۰۰	۳/۳۳ abcde	۳/۴۴ abc	۳/۶۶ ab	۳/۴۴ a
	۴×۱۰۰۰	۳/۵۵ abcde	۳/۰۰ bc	۳/۴۴ ab	۳/۴۴ a
	۶×۱۰۰۰	۳/۵۵ abcde	۳/۷۷ ab	۳/۵۵ ab	۳/۶۶ a
کیتوزان(۰/۵)	g۱	۳/۷۷ abcde	۳/۷۷ ab	۳/۵۵ ab	۴/۰۰ a
کیتوزان(۱/۰)	g۲/۵	۳/۸۸ abc	۳/۶۶ abc	۳/۵۵ ab	۳/۵۵ a
کیتوزان(۱/۵)	g۳/۷۵	۳/۱۱ cde	۳/۲۲ abc	۳/۴۴ ab	۳/۵۵ a
واکس	cc ۲	۴/۱۱ a	۳/۶۶ abc	۳/۰۰ bc	۳/۸۸ a

میانگین‌های دارای حروف متفاوت در هر ستون بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

جدول ۱۲: مقایسه میانگین تیمارهای مختلف بر تست پنل در پرتقال تامسون در طی دوره‌های انباری

تیمار	غلظت	میزان آب میوه	کیفیت ظاهری	تصمیم به خرید	به‌طورکلی
شاهد	۰	۳/۴۴ a	۲/۸۸ bcd	۲/۵۵ c	۲/۵۵ de
شاهدکیتوزان	۰	۳/۳۳ a	۳/۰۰ abcd	۲/۵۵ c	۲/۴۴ e
اسطوخودوس(آبی)	۲×۱۰۰۰	۳/۴۴ a	۳/۲۲ abcd	۳/۰۰ abc	۳/۰۰ abcde
	۴×۱۰۰۰	۳/۷۷ a	۳/۵۵ ab	۳/۰۰ abc	۳/۱۱ abcde
	۶×۱۰۰۰	۳/۸۸ a	۳/۳۳ abcd	۳/۲۲ abc	۳/۳۳ abcd
اسطوخودوس(اتانولی)	۲×۱۰۰۰	۳/۴۴ a	۳/۳۳ abcd	۳/۵۵ a	۳/۵۵ ab
	۴×۱۰۰۰	۳/۶۶ a	۳/۳۳ abcd	۳/۶۶ a	۳/۳۳ abcd
	۶×۱۰۰۰	۳/۸۸ a	۳/۱۱ abcd	۳/۵۵ a	۳/۶۶ a
میخک(آبی)	۲×۱۰۰۰	۳/۵۵ a	۳/۲۲ abcd	۳/۵۵ a	۳/۱۱ abcde
	۴×۱۰۰۰	۳/۶۶ a	۳/۲۲ abcd	۳/۳۳ abc	۳/۴۴ abc
	۶×۱۰۰۰	۳/۷۷ a	۳/۶۶ ab	۳/۲۲ abc	۳/۰۰ abcde
میخک(اتانولی)	۲×۱۰۰۰	۳/۷۷ a	۳/۲۲ abcd	۳/۴۴ ab	۳/۴۴ abc
	۴×۱۰۰۰	۳/۳۳ a	۳/۴۴ abc	۳/۱۱ abc	۳/۲۲ abcde
	۶×۱۰۰۰	۳/۶۶ a	۳/۶۶ ab	۳/۲۲ abc	۳/۶۶ a
چریش(آبی)	۲×۱۰۰۰	۳/۴۴ a	۲/۸۸ bcd	۲/۶۶ bc	۲/۶۶ cde
	۴×۱۰۰۰	۳/۶۶ a	۳/۲۲ abcd	۲/۶۶ bc	۲/۷۷ bcde
	۶×۱۰۰۰	۳/۷۷ a	۳/۱۱ abcd	۲/۸۸ abc	۲/۷۷ bcde
چریش(اتانولی)	۲×۱۰۰۰	۳/۴۴ a	۳/۴۴ abc	۳/۱۱ abc	۳/۰۰ abcde
	۴×۱۰۰۰	۳/۴۴ a	۲/۵۵ d	۲/۶۶ bc	۲/۷۷ bcde
	۶×۱۰۰۰	۳/۶۶ a	۲/۶۶ cd	۲/۸۸ abc	۳/۰۰ abcde
کیتوزان(۰/۵)	g۱	۴/۰۰ a	۳/۷۷ a	۳/۶۶ a	۳/۴۴ abc
کیتوزان(۱/۰)	g۲/۵	۳/۵۵ a	۳/۶۶ ab	۳/۲۲ abc	۳/۲۲ abcde
کیتوزان(۱/۵)	g۳/۷۵	۳/۵۵ a	۳/۶۶ ab	۳/۳۳ abc	۳/۴۴ abc

واکس	۲ cc	^{a}۳/۸۸	^{a}۳/۷۷	^{ab}۳/۴۴	^{abcd}۳/۳۳

میانگین‌های دارای حروف متفاوت در هر ستون بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشد

بحث

میوه‌ها و سبزیجات به‌علت فعالیت آنزیمی بالا بیشترین درصد ضایعات را به‌خود اختصاص داده‌اند. کاهش و به‌حداقل رساندن چنین ضایعاتی به‌عنوان برداشت مخفی می‌تواند یکی از راه‌های موثر در تامین مواد غذایی برای جامعه محسوب شود (راحمی، ۱۳۸۳). میوه‌ها در مرحله پس از برداشت هنوز زنده هستند و تنفس می‌کنند. به‌هر حال آن‌ها از منابع آب و غذای اصلی جدا شده‌اند و بنابراین درصورتی‌که ارزیابی‌ها به‌صورت دقیق صورت نگیرد، بسیار سریع دچار فساد می‌شوند (۲۲).

با توجه به نتایج به‌دست آمده، میزان کاتالاز با گذشت زمان روند افزایشی دارد و تیمار کیتوزان ۱/۵ درصد دارای کم‌ترین میزان و تیمار شاهد دارای بیشترین میزان کاتالاز بود. از میان عصاره‌ها، عصاره اسطوخودوس دارای کم‌ترین میزان فعالیت آنزیم هستند. افزایش اکسیژن فعال و رادیکال‌های آزاد در طی فرایند رسیدن میوه‌ها و در اثر تنفس سلولی، هم‌چنین متابولیسم اکسیداتیو که در میوه‌ها به‌خصوص میوه‌های فرازگرا صورت می‌گیرد، می‌تواند منجر به ایجاد خسارت به غشاهای زیستی گردد. برای جلوگیری از ایجاد خسارت توسط رادیکال‌های آزاد، سلول‌ها از استراتژی جالبی بهره می‌گیرندکه توسعه سیستم آنتی‌اکسیدانتی می‌باشد (۲۳). آنتی‌اکسیدانت‌ها با دادن الکترون به رادیکال‌های آزاد، خود اکسیده شده و قدرت اکسیدکنندگی و ایجاد خسارت توسط رادیکال‌های آزاد را از بین می‌برند (۲۴). به‌نظر می‌رسد که کیتوزان ۱/۵ درصد با کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی، مثل کاتالاز باعث افزایش H_2O_2 و برخی از گونه‌های اکسیژن فعال می‌گردد که این مولکول‌ها برای فعال کردن ژن‌های عامل مقاومت به شرایط استرس و بیماری وارد عمل می‌شوند، بعد از فعال شدن ژن‌های عامل مقاومت، رادیکال‌های آزاد باید از سلول حذف شوند که ترکیبات آنتی‌اکسیدانتی در تیمار کیتوزان، برای حذف آن‌ها مصرف شده و میزان آن‌ها کاهش می‌یابد، کاتالاز آنزیم سم‌زدای مهمی است که با آنزیم‌های دیگر فعالیت حذف کنندگی رادیکال‌های آزاد را تحریک می‌کند (۲۵).

در تحقیقی به‌عنوان اثر پس‌از برداشت اسیدسالیسیلیک بر برخی ویژگی‌های کیفی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی میوه کیوی رقم هایوارد، انجام شد. نتایج این مطالعه نشان داد که با گذشت زمان اثر سالیسیلیک اسید در افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز موثرتر بوده است میزان فعالیت آنزیم کاتالاز نیز پس از ۱۶ هفته در غلظت یک میلی مولار بالاتر بود (۲۶).

با توجه به نتایج این مطالعه، کم‌ترین میزان آنزیم پراکسیداز مربوط به تیمار کیتوزان و از عصاره‌ها، عصاره اسطوخودوس دارای میزان کمی از فعالیت آنزیم بود. با گذشت زمان فعالیت آنزیم پراکسیداز افزایش یافت. گیاهان در برابر تنش‌های محیطی رادیکال‌های اکسیژن، آزاد تولید می‌کنند که خود روند پیری را افزایش می‌دهد. برای محافظت سلول در برابر تنش‌های اکسایشی (اکسیداتیو)، بافت‌های گیاهی آنزیم‌های حذف کننده‌ی گونه‌های فعال اکسیژن مانند سوپراکسیداتیو دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز، ترکیب‌های سمیت‌زدا در برابر لیپوکسیژنازها (گلوتاتیون اس ترانسفراز، آسکوربات پراکسیداز) و شبکه‌ای از پاداکسنده‌های کم وزن (آسکوربات، گلوتاتیون ترکیب فنلی و توکوفرل‌ها) دارند (۲۷).برای خنثی کردن اثر سمی گونه‌های اکسیژن فعال یک سیستم آنتی اکسیدانتی خیلی موثر مورد نیاز است که در سلول‌های گیاهی دو سیستم غیرآنزیمی و آنزیمی این نقش را بر عهده دارند (۲۸).

لی و همکاران (۲۹) اثر پوشش‌های مبتنی بر پلی‌ساکارید (آلژینات، پولولان و کیتوزان) را بر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی توت‌فرنگی مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که فعالیت آنزیم کاتالاز در تمام میوه‌ها در طول انبارداری سرد، کاهش یافته است اما فعالیت آنزیم در میوه شاهد کاهش بیشتری نسبت به میوه‌های پوشش داده شده با پلی‌ساکاریدها داشت. میوه-های پوشش داده شده با کیتوزان بیشترین فعالیت کاتالاز را در میان سه تیمار پلی‌ساکاریدی نشان دادند. میوه‌های پوشش

داده شده با پلی‌ساکارید فعالیت‌های متفاوتی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی در طول انبارمانی در دمای پایین نشان دادند که ضرورت تحقیقات بیش‌تر روی اثرات آن‌ها بر بیان ژن مربوط به این آنزیم‌ها نشان می‌دهد.

ترش در سال ۱۳۹۴، اثر اسانس مرزه باغی، صمغ عربی و آب گرم بر پوسیدگی کپک سبز در لیمو ترش را بررسی کرد. نتایج نشان داد که تیمار اسانس مرزه باغی در غلظت ۸۰۰ میکرولیتر در لیتر، بهترین تیمار برای حفظ ترکیبات زیست فعال مانند فنول و فعالیت آنتی‌اکسیدانتی بود و هم‌چنین باعث کاهش فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز پراکسیداز وکاتالاز در پوست میوه شد. تیمارهای مختلف تاثیر چندانی بر چگالی میوه و چگالی آب‌میوه نداشتند. نتایج نشان داد که به‌طورکلی میوه‌های تیمار شده توسط آب گرم ۴۰ درجه سلسیوس کمترین تغییرات فیزیکوشیمیایی را در طی انبار داشتند.

در این بررسی، عصاره‌های گیاهی فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز را در طول آزمایش نسبت به شاهد کاهش دادند. کاهش فعالیت آنزیم‌های دفاعی به‌وسیله عصاره‌های گیاهی در اثر کاهش تنفس و اثر پوشش‌دهی میوه‌ها می‌باشد. در تحقیقی که به‌وسیله زاهدی و همکاران انجام شد نتایج نشان داد که میزان ترکیبات فنلی در میوه‌های انبه تیمار شده با پوشش خوراکی کیتوزان، ابتدا افزایش و سپس کاهش پیدا کرد و در نهایت میزان ماندگاری میوه های انبه افزایش یافت (۳۰).

در آزمون بررسی تغییرات بیان ژن‌های کاتالاز و پراکسیداز میزان بیان نسبی این دو ژن دقیقا روندی مانند میزان فعالیت دو آنزیم مورد بررسی داشتند. در مورد هر دو ژن میزان فعالیت در طی روزهای نمونه‌برداری در تیمار شاهد افزایش یافت. عصاره‌های گیاهی در این مورد هم باعث کاهش میزان بیان دو ژن مورد بررسی، یعنی کاتالاز و پرکسیداز شدند. در این آزمون، با افزایش میزان غلظت استفاده از عصاره گیاهی، میزان نسخه‌برداری ژن و میزان فعالیت آنزیم‌ها کاهش پیدا کرد. با توجه به این مطالب می‌توان به‌این نتیجه رسید که عصاره‌های گیاهی با پوششی که بر روی میوه ایجاد کردند توانستند فیزیولوژی گیاه را به‌سمتی هدایت کنند که میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت کاهش یابد (۳۱).

عصاره بعضی گیاهان می‌تواند بر روی فیزیولوژی میوه ها تاثیر بگذارد. در این مطالعه، هماهنگی کاملی بین میزان بیان ژن‌های کاتالاز و پراکسیداز و فعالیت این دو آنزیم وجود داشت. میزان بیان ژن و همچنین فعالیت آنزیم‌های مربوطه در این مطالعه افزایش یافت، ولی عصاره گیاه اسطوخودوس روند افزایشی را هم در مورد فعالیت آنزیم و هم میزان بیان آن‌ها کاهش داد. تحقیقی دیگر با عنوان اثر پوشش خوراکی اسانس برازنبیل با پایه روغن زیتون بر ماندگاری و صفات فیزیکوشیمیایی میوه خرمالو انجام شد نتایج نشان داد فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز و کاتالاز در میوه‌های پوشش داده شده نسبت به شاهد کمتر بود. در نتیجه در محدوده پژوهش انجام شده ترکیب تیماری فیلم پی وی سی با اسانس برازنبیل را می‌توان به‌عنوان ترکیب تیماری مناسب معرفی کرد (۱۵).

در رابطه با هماهنگی فعالیت آنزیم‌ها و میزان بیان ژن‌های متناظر با آن‌ها، نتایج این تحقیق هماهنگی کامل بین این عامل را نشان داد. زمانی‌که میزان فعالیت آنزیم افزایش پیدا کرد به‌طور کاملا هماهنگ و هم راستا با آن افزایش بیان ژن‌ها را در این مطالعه ما شاهد بودیم. به‌عبارت‌دیگر، با بالا رفتن بیان ژن‌های دفاعی، میزان پروتئین متناظر آن‌ها نیز افزایش می‌یابد، و افزایش میزان پروتئین‌های پیام‌دهنده باعث بالا رفتن میزان فعالیت آنزیم‌های درگیر در این واکنش‌ها می‌گردد.

فاکتورهای مهم در کیفیت فراورده از نظر مصرف کننده شامل وضع ظاهر (اندازه و شکل و رنگ)، حالت محصول و بی‌عیب بودن، بافت و احساس آن در دهان، طعم و ارزش غذایی می‌باشد (۳۲). بر همین اساس در آزمون پانل، رنگ پوست، بو، طعم، بافت، آب‌دار بودن میوه، کیفیت ظاهری و میزان مشتری‌پسندی محصول اندازه‌گیری شد.

بر اساس نتایج، از نظر رنگ پوست تیمار واکس، میخک اتانولی و آبی با غلظت ۶۰۰۰ بیشترین نمره‌ها را به‌دست آوردند. از نظر بوی میوه، اسطوخودوس اتانولی۴۰۰۰ و ۶۰۰۰ و میخک آبی ۴۰۰۰ و ۶۰۰۰ بیشترین نمره‌ها را بدست آوردند. از نظر

طعم چریش آبی۶۰۰۰ و اسطوخودوس اتانولی ۶۰۰۰ بیش‌ترین نمره‌ها را به‌دست آوردند. از نظر کیفیت ظاهری میوه‌ها، تیمار واکس بیش‌ترین نمره را دریافت کرد پس از آن تیمار کیتوزان قرار گرفت. از بین عصاره‌های استفاده شده، عصاره میخک بیش‌ترین نمره را از ارزیاب‌ها دریافت کرد.

نتیجه‌گیری

امروزه در عرصه جهانی، جایگزین‌های مختلفی برای پوشش‌های و همچنین سموم و آفت‌کش‌های شیمیایی مورد توجه قرار گرفته است. به‌عنوان مثال می‌توان عصاره‌های گیاهی را نام برد که از گیاهان عالی به‌دست آمده و گزینه خوب و نوید بخشی جهت جایگزینی مواد شیمیایی سنتزی، که برای تیمار میوه‌ها در انبار استفاده می‌شوند، هستند. از طرف دیگر تولید محصولات ارگانیک به‌دلیل نقش آن‌ها در سلامتی انسان رو به افزایش است که این خود نیازمند عدم استفاده از مواد شیمیایی در خلال مرحله پس‌از برداشت می‌باشد. روش‌های مختلفی جهت حفظ این محصولات به‌کار می‌رود و عصاره‌های طبیعی با توجه به خواص ضدمیکروبی و آنتی اکسیدانتی می‌توانند جایگزین روش‌ها معمول گردند. تاثیر ضد میکروبی و افزایش خواص کیفی محصولات توسط برخی از ترکیبات طبیعی ثابت گردیده، ولی به‌منظور استفاده تجاری، این نتایج به‌صورت پوشش‌دار کردن میوه یا تغییر اتمسفر انبار (MA)، در غلظت‌های مختلفی روی محصولات تازه در سطح تجاری آزمایش گردد. هدف از انجام این پژوهش اثبات این موضوع بود که عصاره‌های گیاهی علاوه بر این‌که خاصیت ضدمیکروبی مستقیم دارند که در تعداد زیادی از مقالات این موضوع به اثبات رسیده است، نیز می‌توانند با کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت باعث افزایش ماندگاری میوه در انبار شوند. به‌عبارت‌دیگر با خاصیت پوشش‌دهی وکاهش تنفس که عصاره‌های گیاهی بر روی میوه پرتقال ایجاد کردند توانستند روند افزایشی تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن را در طول زمان کندتر کنند، که متعاقب آن روند افزایشی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت هم با شیب ملایم‌تری نسبت به شاهد ادامه یافت، که این نکته دقیقا در مورد بیان ژن دو آنزیم کاتالاز و پراکسیداز که در این مطالعه بررسی شدند نیز اتفاق افتاد.

منابع

1. Curk F, Ollitrault F, Garcia-Lor A, Luro F. et al. Phylogenetic origin of limes and lemons revealed by cytoplasmic and nuclear markers. Ann Bot. 2016; 117(4): 565–583.
2. Adetuyi FO, Ibrahim TA, Ajalia L, Oloye DA. Waxing Effect on the Physical Attributes, Antioxidant and Sugar Contents of Orange (*Citrus sinensis* L. osbeek) stored at Room Temperature in Nigeria. Bangladesh J Sci Ind Res. 2010; 45(2): 111-116.
3. Hutton RJ., Loveys, BR. A partial root zone drying irrigation strategy for citrus—Effects on water use efficiency and fruit characteristics. Agricultural Water Management, 2011; 98: 1485–1496.
4. Gholamnejad J, Etebarian HR, Roustaee A. Sahebani N. Biological control of apple blue mold by isolates of *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Plant Protection research, 2009; 49:270-275.
5. Azarakhshi M, Farzad Mehr J, Eslah M, Sahabi H. An investigation on trends of annual and seasonal rainfall and temperature in different climatologically regions of Iran. Journal of Range and Watershed Management, 2013; 66(1): 1-16.
6. Kirda C, Topaloglu F, Topcu S, Kaman, H. Mandarin yield response to partial root drying and conventional deficit irrigation. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 2012; 31: 1-10.

7. Obagwa J, Korsten L. Control of citrus and green and blue molds with garlic extracts. Plant Pathology. 2002; 109: 221- 225.
8. Gholamnezhad J. Transcriptomics and useful techniques of defense gene expression evalution of plant. Appl biol. 2016; 6(4): 21-42.
9. Kader AA. Postharvest Technology of Horticultural Crops - An Overview from Farm to Fork. Ethiop .J. Appl. Sci. Technol, 2013; (1): 1- 8.
10. Gholamnejad J, Etebarian HR, Naserinasab F. Induction of defense responses and biological control of blue mold of apple fruit (*Penicillium expansum*) with Rhodotorula mucilaginosa A1. Res plant pathol. 2013; 1(4): 47-60.
11. Gholamnezhad J. Effect of plant extracts on activity of some defense enzymes of apple fruit in interaction with *Botrytis cinerea*. J Integ Agr. 2019; 17(0): 1-10.
12. Alam P. Mohammad, A. Ahmad, MM. Khan, MA.etal., Efficient method for Agrobacterium mediated transformation of Artemisia annua L. Recent Pat Biotechnol. 2014; 8(1): 102-107.
13. Abdul Aziz H, Omran A, Zakaria WR. H_2O_2 Oxidation of Pre-Coagulated Semi Aerobic Leachate. Int J Environ Res. 2010; 4 (2): 209-216.
14. Bahraminejad S, Asenstorfer RE, Riley IT, Schultz CJ. Analysis of the antimicrobial activity of flavonoids and saponins isolated from the shoots oats (*Avena sativa* L.) J Phytopathol. 2008; 156(1): 1-7.
15. Azimim AA. Delnavaz HB, Mansour GA. Antifungal effect of aqueous alcoholic and phenolic extracts of seed and leaves of Sorghum bicoloragainst Fusarium solani Fusarium poa in Persian. Med Plant Res J. 2006; 6(1): 26 - 32.
16. Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal Biochem. 1976; 72(1-2): 248-254.
17. Gong M, Li Y, Dai X, Tian M, et al. Involvment of calcium and calmodulin in the acquisition of HS inuced thermotolerance in maize seedling. J Plant Physiol. 1997; 150(5): 615-621.
18. Reuveni R. 1995. Biochemical marker of disease resistance. p. 99–114. In: “Molecular Methods in Plant Pathology” (R.P. Singh, U.S. Singh, eds.). Boca Raton, CRC Press, Florida, USA, 1995; 507 pp.
19. Du Z, Bramlage WJ. Peroxidativeactivity of apples peel in relation todevelopment of poststorage disorders. Hort Sci. 1995; 30(2): 205-208.
20. Zangoei E, Bazgir E, Gholamnezhad J, Darvishnia M. Investigation of the peroxidase and catalase enzymes activity and expression level of it’s encoding genes in pathogen stress (*Penicillium expansum*) and Walnut green skin extract condition in apple fruits. Cell tissue j. 2018; 9(2): 397-415.
21. Livak KL, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression Data using Real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. Methodes. 2001; 25: 402–408.
22. Adiani V, Gupta S, Padole R, Variyar PS, etal. Artocarpus heterophyllus bulbs. Postharvest Biol Technol. 2014; 98: 34–40.
23. Spinardi MA. Effect of Harvest Date and Storage on Antioxidant Systems in Pears. Int Postharvest Symp. 2005; 682(682):135-140

24. Gholamnezhad J, Sanjarian F, Mohammadi goltapeh E, Safaei N, et al. Study of defense genes expression profile pattern of wheat in response to infection by Mycosphaerella graminicola. Iran J Plant Biol. 2016; 8(30): 43-55.
25. Hernandez JA, Ferrer MA, Jimenez A, Barcelo AR, Sevilla F. Antioxidant systems and O2-/ H_2O_2 production the apoplast of pea leaves. Its relation with salt- induced necrotic lesions in minor veins. Plant Physiol. 2001; 127: 827-831.
26. Janowska B, Jerzy M. Effect of Gibberllic acid on the post – harvest Flower Longevity of Zantedeschia elliottiana (W.Wats) Engl. Acta Sci Pol Hortorum cultus. 2004; 3(1): 3-9.
27. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils–a review. Food chem toxicol. 2008; 46(2): 446-475.
28. Sonboli A, Salehi P, Yousefzadi M. Antimicrobial Activity and Chemical Composition of the Essential Oil of Nepeta crispa Willd. from Iran. Z Naturforsch. 2004; 59(9-10): 653-656.
29. Li H, Wang Y, Liu F, Yang Y, et al. Effects of chitosan on control of postharvest blue mold decay of apple fruit and the possible mechanisms involved. Sci Hortic. 2015; 186: 77-83.
30. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. Pharmacogn Rev. 2010; 4, 118–126.
31. Abebe, Z., Tola, Y.B., Mohammed, A. 2017. Effects of edible coating materials and stages of maturity at harvest on storage life and quality of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruits. African journal of Agricultural Research, 2017; 12(8), 550-565.
32. Zahedi S M, Ehteshami S, Aazami M. A. Effect of Edible Chitosan Coating on some Qualitative Characteristics and Storage Life of Mango. Plant prod technol. 2019; 17(2): 143-154.

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Winter 2020; 10(4) *Original Article*

The evolution of activity and gene expression of some antioxidant enzymes and qualitative characters of orange fruits under cover treatments

Baran zehi T, M.SC[1], Gholam nezhad J, Ph.D.[1*], Dehestani M, Ph.D.[1], Jafari A, Ph.D.[1], Naseri nasab F, Ph.D.[2]

1. Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture & Natural Resources, Ardakan University, Ardakan, Iran
2. plant pathology, Agriculture Jehad, Alborz, Iran

* Email corresponding author: jgholamnezhad@ardakan.ac.ir

Received: 25 Nov. 2019 Accepted: 29 Feb. 2020

Abstract

Aim: Thepurpose of this study is the investigation of the effect of aqueous and ehanolic plant extracts including neem, clove, thyme and lavender on the increase storage life via decrease of reactive oxygen and the activity of antioxidant enzymes.

Material and methods: In this study, it was extracted of the neem, clove, thyme and lavender with aqueous and ehanolic solution, then the orange fruits was treated with 2×1000, 4×1000 and 6×1000 concentration of plant extract and chitosan and vax. The treated fruits were stored in the storage with 7C and 80-90% humidity. The enzyme activity and the related genes expression was evaluated per twenty days to 100 days in the orange fruits. In the other section of study, it was done the panel test.

Results: The results showed the activity of catalase was affected with plant extracts. The treated orange fruits with 6×1000 concentration of ethanolic lavender extract showed the least catalase activity, with 2.13; the least peroxidase activity was observed in the fruits treated with aqueous lavender extract with 6×1000 concentration. The ethanolic and aqueous of lavender extract affected on the catalase and peroxidase gene expression with 5.28 and 6.66 respectively.

Conclusion: the results of this study showed the extracts of neem, clove, thyme and lavender have highly effect on the plant physiology and they decreased the enzyme activity and the genes expression.

Key Words: Catalase, Gene expression, Orange, Peroxidase, Plant extract