اثر تیمار ملاتونین در بهبود سیستم آنتی اکسیدانی و افزایش عمر پس از برداشت میوه فلفل دلمه‌ای (Capsicum annuum L.)

پرویز ملک زاده [۱*]

۱*- دانشکده علوم پایه ، دانشگاه قم

*ایمیل نویسنده مسئول: p.malekzadeh@qom.ac.ir

تاریخ دریافت : ۱۴۰۱/۱۰/۱۲ تاریخ پذیرش : ۱۴۰۱/۱۱/۹

چکیده

روش نگهداری میوه و سبزی در دمای پایین موجب کند شدن متابولیسم سلولی می‌گردد و یکی از رایج‌ترین راه‌ها برای افزایش عمر پس از برداشت می‌باشد. با این وجود، دمای کمتر از ۱۳ درجه سانتی‌گراد منجر به سرمازدگی در محصولات گرمسیری می‌گردد که استفاده از برخی ترکیبات برونزا پیش از نگهداری باعث کاهش سرمازدگی در محصولات حساس می‌شود. در این پژوهش برای بررسی امکان کاهش خسارت سرمازدگی از تیمار ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین روی میوه فلفل دلمه‌ای در طی چهار هفته نگهداری در دمای ۱±٤ درجه سانتی‌گراد استفاده گردید. در این پژوهش درصد سرمازدگی، کاهش وزن، میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، محتوای گونه‌های اکسیژن فعال و محتوای فنول‌کل و فلاونوئید کل، فعالیت آنزیم‌های فنیل‌آلانین آمونیالیاز (PAL) و تیروزین آمونیالیاز (TAL) در زمان برداشت و چهار هفته انبارمانی و در سه تکرار مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که تیمار ملاتونین از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسیددیسموتاز، توانست محتوای رادیکال آزاد سوپراکسید و پراکسیدهیدروژن را کاهش دهد. همچنین نتایج نشان داد که تیمار ملاتونین از طریق افزایش میزان فعالیت آنزیم‌های فنیل‌آلانین آمونیالیاز و تیروزین آمونیالیاز توانست محتوای فنول کل و فلاونوئید کل را افزایش دهد. براساس نتایج این پژوهش تیمار ملاتونین می تواند از طریق افزایش محتوای ترکیبات آنتی‌اکسیدان آنزیمی و غیر آنزیمی روی ماندگاری فلفل‌دلمه‌ای موثر باشد.

کلمات کلیدی

"آنتی‌اکسیدان"، "تیروزین آمونیالیاز"، "فلفل‌دلمه‌ای"، "فنیل‌آلانین آمونیالیاز"، "ماندگاری".

1- مقدمه

میوه فلفل‌دلمه‌ای (Capsicum annuum L.) به دلیل ارزش غذایی، عطر و طعم عالی در سراسر جهان مورد پسند مصرف‌کنندگان می‌باشد. (Ge et al., 2020). میوه فلفل‌دلمه‌ای در مرحله بلوغ فیزیولوژیکی قابل برداشت است و روش حمل و نقل مناسب پس از برداشت و نیز تیمارهای قبل انبارداری اغلب برای افزایش عمر ماندگاری ضروری است (Wang et al., 2019). ذخیره سازی میوه و سبزی در دمای پایین متابولیسم سلولی را کند می‌کند و یکی از رایج‌ترین روش‌ها برای افزایش عمر پس از برداشت میوه‌های مختلف است. با این حال، دمای کمتر از ۱۳ درجه سانتی‌گراد منجر به سرمازدگی (CI) در محصولات گرمسیری می‌گردد. محصولاتی که دچار سرمازدگی می‌شوند دارای علائمی شامل سطح ناهموار، قهوه‌ای شدن پوست میوه، سوراخ شدن سطحی و ضایعات آغشته به آب می‌باشد (Krasnow and Ziv, 2022; Wang et al., 2019). بنابراین، روش‌هایی که این امکان را فراهم می‌کنند که فلفل‌ها را در دماهای پایین نگهداری کرد، در حالی که سرمازدگی را کاهش دهند، برای افزایش عمر مفید، دوره سالم نگهداشتن و حفظ زنجیره صادرات میوه مفید هستند. برای جلوگیری از سرمازدگی در فلفل‌دلمه‌ای که در دماهای پایین نگهداری شده روش‌های متعددی مانند کاربرد پیش از انبارمانی متیل جاسمونات (Ma et al., 2020; Wang et al., 2019)، اسید اگزالیک و اسیدسالیسیلیک (Ge et al., 2020)، اکسید نیتریک (Badem and Söylemez, 2022; Guevara et al., 2021)، و پوشش کیتوزان و پلی‌آمین (Ewais et al., 2022; Sathiyaseelan et al., 2021) انجام شده است. اگرچه این پژوهش‌ها نتایج جالبی نشان داده‌اند، ولی همچنان دارای اشکالاتی

هستند. به عنوان مثال، غلظت بالای ٢،٤-دی کلروفنوکسی استیک اسید به طور بالقوه برای انسان سمی است (Wang et al., 2008)، در حالی که اکسید نیتریک (Steelheart et al., 2019; Zheng et al., 2023) و پوشش کیتوزان و پلی آمین (Ewais et al., 2022) باعث کاهش تنفس و افزایش تولید اتیلن و در نتیجه کمرنگ شدن میوه می‌گردد. بنابراین، هنوز نیاز به بررسی ترکیبات طبیعی وجود دارد که بتواند نه تنها تحمل به سرما را در فلفل‌دلمه‌ای افزایش دهد، بلکه کیفیت کلی آن را در مدت زمان نگهداری حفظ نماید. ملاتونین (N-استیل-٥-متوکسی‌تریپتامین) یک ترکیب دوگانه دوست (آمفی پاتیک)، با وزن مولکولی کم است که در همه موجودات زنده دیده شده است (Raza et al., 2022; Wu et al., 2021). این ماده به عنوان یک محرک زیستی، آنتی‌اکسیدان و تنظیم‌کننده قدرتمند رشد و نمو تحت شرایط تنش‌های زیستی و غیرزنده عمل می‌کند (Hu et al., 2022). کاربرد پس از برداشت ملاتونین روی میوه‌های موز (Wang et al., 2021)، بروکلی (Shahbazi et al., 2022)، سیب (Verde et al., 2023) و توت فرنگی (Wu et al., 2021) به ترتیب نقش آن را در بهبود کیفیت، به تاخیر انداختن پیری، جلوگیری از قهوه‌ای شدن میوه و کاهش عفونت قارچی را نشان داده‌اند. همچنین تیمار برونزای ملاتونین روی میوه هلو (Cao et al., 2018)، گوجه‌فرنگی (Delgado-Vargas et al., 2022) و انار (Medina-Santamarina et al., 2021) اثر قابل‌توجهی در کاهش علائم سرمازدگی نشان داد. اثرات مثبت کاربرد آن با تجمع ملاتونین درون‌زا همراه است که به عنوان یک ترکیب آنتی‌اکسیدان با تحریک سیستم مهار گونه‌های اکسیژن فعال ، القای چرخه گابا (گاما آمینو بوتیریک اسید) و القای فعالیت مسیر پنتوز فسفات عمل می‌کند (Hayat et al., 2022; Madebo et al., 2021). ما در مطالعات قبل اثر کاربرد ملاتونین برونزا روی بروکلی گزارش گردید و نشان داد که اثر ملاتونین با متابولیسم پرولین و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان ارتباط دارد (Shahbazi et al., 2022). هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات تیمار ملاتونین بر کنترل علائم سرمازدگی در میوه فلفل دلمه‌ای در طول انبارداری در دمای ١±٤ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. در این پژوهش اثر تیمار ملاتونین روی متابولیسم ترکیبات آنتی‌اکسیدان آنزیمی و غیرآنزیمی در میوه فلفل-دلمه‌ای مورد ارزیابی قرار گرفت.

٢- روش انجام تحقیق

٢-١- آماده‌سازی و آنالیز اولیه

در این پژوهش میوه فلفل‌دلمه‌ای در مرحله بلوغ فیزیولوژیکی، از یک تولید کننده محلی واقع در شهر تهران خریداری و بلافاصله به آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه قم منتقل گردید. در آزمایشگاه میوه‌هایی که آسیب و یا نقص ظاهری داشتند کنار گذاشته شدند، و بقیه از طریق غوطه‌ور کردن در محلول هیپوکلریت‌سدیم یک درصد (حجمی/حجمی) به مدت دو دقیقه ضد عفونی شدند. در یک آزمایش اولیه، فلفل دلمه ای با ٢٥، ٥٠، ١٠٠، ٢٠٠، ٢٥٠ و ٣٠٠ میل میکرومول بر لیتر ملاتونین تیمار شدند. نتایج آزمایش اولیه نشان داد که ١٠٠ میکرومول بر لیتر ملاتونین اثر قابل توجهی بر کیفیت ظاهری پس از برداشت داشت (نتایج آزمایش اولیه آورده نشده). تعداد ١٥٠ عدد میوه ضدعفونی شده را به طور تصادفی به دو گروه ٧٥ میوه‌ای تقسیم شدند. گروه اول در آب مقطر (گروه شاهد)، و گروه دوم در محلول ١٠٠ میکرومولار ملاتونین (گروه تیمار) به مدت دو ساعت، تحت شرایط نور کم و در دمای ٢±٢٣ درجه سانتی‌گراد غوطه‌ور گردیدند. میوه‌های گروه شاهد و تیمار به مدت دو ساعت در هوای آزاد در آزمایشگاه خشک شدند و سپس در دمای ١±٤ درجه سانتی‌گراد با رطوبت نسبی ٨٥ تا ٩٠ درصد به مدت ٢٨ روز نگهداری شدند. در زمان برداشت و همچنین پس از ٧، ١٤، ٢١ و ٢٨ روز نگهداری در سردخانه، به طور تصادفی سه نمونه از هر تکرار برداشته شد و به مدت سه روز در دمای ٢٠ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. آنالیزها در سه تکرار انجام شد که هر تکرار شامل سه عدد میوه بود. نمونه‌های بافتی گوشت میوه برای هر تکرار گرفته شد و سپس در نیتروژن مایع منجمد شد و برای آنالیزهای بعدی در دمای ٨٠- درجه سانتی‌گراد ذخیره گردید.

٢-٢- شاخص سرمازدگی

ارزیابی شاخص سرمازدگی (CI) با ظهور لکه‌های آبکی تیره و حفره‌های سطحی روی پوست میوه ارزیابی شد (Malekzadeh et al., 2017). برای این کار، از یک مقیاس رتبه‌بندی بر اساس نشانه‌های سرمازدگی به صورت چشمی (سوختگی مایل به خاکستری، حفره‌دار، تغییر رنگ پوست و غیره) استفاده شد که در آن رتبه صفر نشان دهنده بدون علائم، رتبه یک نشان دهنده یک تا ٢٠ درصد، رتبه دو نشان

دهنده ٢١ تا ٤٠ درصد، رتبه سه نشان دهنده ٤١ تا ٦٠ درصد، رتبه چهار نشان دهنده ٦١ تا ٨٠ درصد و رتبه پنج نشان دهنده ٨١ تا ١٠٠ درصد علائم سرمازدگی روی سطح میوه است. با توجه به مجموع حاصلضرب رتبه و تعداد میوه در آن مقیاس، تقسیم بر تعداد کل میوه مشاهده شده، بر اساس فرمول زیر سرمازدگی به صورت درصد (٪) گزارش شد:

١٠٠ × (٤ × تعداد کل میوه / (تعداد میوه دارای علائم سرمازدگی × سطح (نمرهٔ مربوطه))∑)= شاخص سرمازدگی

٢-٣- میزان کاهش وزن

در هر هفته از دوره نگهداری از هر تکرار و از هر تیمار برای تعیین میزان کاهش وزن انتخاب شد. درصد کاهش وزن با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد(Jiao et al., 2022):

١٠٠× وزن اولیه / (وزن هفته‌ای – وزن اولیه) = (٪) درصد کاهش وزن

٢-٤- محتوای رادیکال سوپراکسید ($O_2^{\bullet-}$) و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) مقدار تولید آنیون‌های سوپراکسید و پراکسید هیدروژن در طی دوره انبارمانی طبق روش توصیف شده اندازه‌گیری شد (Gao et al., 2016). پنج گرم نمونه فلفل‌دلمه‌ای در ٥ میلی‌لیتر بافر فسفات ٥٠ میلی‌مولار با pH 7.8 همگن شدند، سپس به مدت ١٥ دقیقه در ١٠٠٠٠ دور در دقیقه و دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. پس از آن، یک میلی‌لیتر مایع‌رویی به یک میلی‌لیتر بافر فسفات ٥٠ میلی‌مولار با pH 7.8 و یک میلی‌لیتر هیدروکسیل‌آمین هیدروکلراید (یک میلی‌مولار) اضافه شد. پس از نگهداری به مدت یک ساعت در دمای ٢٥ درجه‌سانتی‌گراد، یک میلی‌لیتر ٤-آمینو بنزن سولفونیک اسید ١٧ میلی‌مولار و یک میلی‌لیتر آلفا- نفتیل آمین ٧ میلی‌مولار به مخلوط واکنش اضافه شد و به مدت ٢٠ دقیقه نگهداری شد. جذب در طول موج ٥٣٠ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر (Optizen 3220 UV؛ ساخت کره جنوبی) اندازه‌گیری شد. منحنی استاندارد با نیتریت سدیم برای محاسبه نرخ تولیدرادیکال سوپراکسید از معادله واکنش سوپراکسید با هیدروکسیل آمین استفاده شد. نرخ تولید رادیکال سوپراکسید به صورتنانومول بر گرم بافت تر بیان شد. برای اندازه‌گیری محتوای H_2O_2، ٥ گرم پودر فلفل‌دلمه‌ای منجمد در ٥ میلی-لیتر استون از قبل خنک شده همگن شد. سپس مخلوط به مدت ١٥ دقیقه در دور ١٠٠٠٠ × گرم در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. پس از آن، یک میلی‌لیتر از مایع رویی به ٠/١ میلی لیتر اسید تیتانیوم تتراکلرید هیدروکلریک اسید ١٠ درصد و ٠/٢ میلی‌لیتر هیدروکسید آمونیوم اضافه شد، سپس به مدت ١٠ دقیقه در دور ١٠٠٠٠ × گرم در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. رسوب به دست آمده بارها با استون سرد شسته و در ٣ میلی لیتر H_2SO_4 ٢مولار حل شد. محتوای H_2O_2 با اندازه گیری جذب در طول موج ٤١٢ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر (Optizen 3220 UV؛ ساخت کره جنوبی) تعیین شد.

٢-٥- محتوای فنول و فلاونوئید کل

فنول و فلاونوئید کل با استفاده از روش توصیف شده اندازه-گیری شدند (Gao et al., 2016). به طور خلاصه ٠/٥ گرم فلفل‌دلمه‌ای به ١٠ میلی‌لیتر متانول ٨٠ درصد (حجمی/حجمی) اضافه شد و به مدت ٣٠ دقیقه داخل دستگاه التراسوند قرار گرفت. سپس مخلوط به مدت ٢٠ دقیقه در دور ١٠٠٠٠× گرم سانتریفیوژ شد و از مایع رویی جهت آنالیز مورد استفاده قرار گرفت. مخلوط واکنش برای فنول کل شامل یک میلی‌لیتر مایع رویی، یک میلی‌لیتر معرف فولین سیوکالتو و ٢ میلی‌لیتر بیکربنات سدیم ١٥ درصد (وزنی/حجمی) بود. سپس آب مقطر اضافه شد تا به حجم نهایی ١٠ میلی‌لیتر برسد. جذب مخلوط واکنش پس از یک ساعت نگهداری در دمای اتاق در طول موج ٧٦٠ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر (Optizen 3220 UV؛ ساخت کره جنوبی) اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری فلاوونوئید کل، یک میلی‌لیتر مایع رویی به ١ میلی‌لیتر $NaNO_2$٥ درصد (وزنی/حجمی) و ٠/٢٥ میلی‌لیتر ١٠ درصد (وزنی/حجمی) $AlCl_3$ اضافه شد. متعاقباً، یک میلی‌لیتر NaOHیک مولار به مخلوط واکنش اضافه شد. بعد از ٥ دقیقه جذب مخلوط واکنش در طول موج ٥١٠ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر (Optizen 3220 UV؛ ساخت کره جنوبی) اندازه‌گیری شد.

٢-٦- عصاره های فنیل‌آلانین آمونیالیاز (PAL) و تیروزین آمونیالیاز(TAL)

میزان فعالیت هر دو آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) و تیروزین آمونیالیاز (TAL) بر اساس روش گزارش شده توسط عثمان مورد سنجش قرار گرفتند (Osman and El-Naggar, 2022). ابتدا عصاره‌ای که در آن ١ گرم از بافت فلفل‌دلمه‌ای در بافر Tris-HCl (٥٠ میلی مولار با pH8.5) حاوی ٥ درصد (وزن/حجم) پلی وینیل پلی پیرولیدون (PVPP)و ١٤/٤ میلی‌مولار بتا مرکاپتو اتانول که با یخ خنک

شده مخلوط کرده و سپس مخلوط به مدت ٢٠ دقیقه در دور ١٠٠٠٠ × گرم در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد و مایع رویی به دست آمده برای تعیین کمیت فعالیت های PALو TAL استفاده شد .

٢-٦-١- فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL)

مخلوط واکنش برای تعیین مقدار فعالیت آنزیم PAL شامل ٨٠٠ میکرولیتر بافر تریس (٠/٥ میلی مولار با pH8) ٦٠٠ میلی‌مولار ال- فنیل‌آلانین و ١٠٠ میکرولیتر عصاره آنزیمی می‌باشد. مخلوط فوق به مدت ١ ساعت در دمای ٤٠ درجه سانتی‌گراد نگهداری کرده و سپس ١٠٠ میکرولیتر اسید کلریدریک ٥ نرمال اضافه شد تا واکنش متوقف شود. جذب این محلول در ٢٩٠ نانومتر خوانده شد و برای محاسبه آنزیم استفاده شد. نتایج به صورت واحد فعالیت آنزیمی بیان شد، که در آن واحد فعالیت آنزیمی به عنوان مقدار آنزیمی که ١ نانومول اسید سینامیک در یک دقیقه تولید می‌کند؛ تعریف شد.

٢-٦-٢- تیروزین آمونیالیاز (TAL)

مخلوط واکنش برای تعیین مقدار فعالیت آنزیم TAL که حاوی ٨٠٠ میکرولیتر بافر تریس اسیدکلریدریک (٠/٥ میلی مولار با pH 8)، ١٠٠ میکرولیتر از آل-تیروزین٥/٥ میکرومولار و ١٠٠ میکرولیتر عصاره آنزیمی می‌باشد. مخلوط به مدت ١ ساعت در دمای ٤٠ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و ١٠٠ میکرولیتر اسید کلریدریک ٥ نرمال اضافه شد تا واکنش متوقف شود. میزان جذب این محلول در طول موج ٣٣٣ نانومتر خوانده شد و برای محاسبه فعالیت آنزیم استفاده شد. نتایج به صورت واحد فعالیت آنزیمی بیان شد، که در آن واحد فعالیت آنزیمی به عنوان مقدار آنزیمی که یک نانومول اسید کوماریک در یک دقیقه تولید می‌کند؛ تعریف شد.

٢-٧- آماده‌سازی عصاره مورد نیاز برای آنزیم‌های آنتی-اکسیدان

در ابتدا با همگن کردن ١ گرم از بافت میوه در بافر فسفات پتاسیم ٠/١ مولار (pH 7.0) از قبل خنک شده، عصاره‌ی تهیه شد. این مخلوط در دور ١٢٠٠٠ × گرم در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ٢٠ دقیقه سانتریفیوژ شد و مایع رویی جمع‌آوری شده و برای تعیین مقدار فعالیت آنزیم‌های آنتی-اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز(SOD)، کاتالاز (CAT)، پراکسیداز (POD)، آسکوربات پراکسیداز (APX) استفاده شد.

٢-٧-١- اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز با توجه به روش کاهش تترازولیوم نیتروبلو (NBT) که توسط Cao و همکارانش توضیح داده شد، اندازه‌گیری گردید (Cao et al., 2018). مخلوط واکنش حاوی٥٠ میلی‌مولار بافر کربنات سدیم (pH 10)، ٠/١ مولار تترازولیوم نیتروبلو و ٠/٦ درصد حجمی تریتونX می‌باشد. واکنش با افزودن ٢٠ میلی‌مولار هیدروکسی آمین هیدروکلراید (pH 6) شروع شد و مقدار فعالیت آنزیم SOD بعد از ٢ دقیقه با اندازه‌گیری جذب در طول موج ٥٤٠ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر (Optizen 3220 UV؛ ساخت کره جنوبی) تعیین شد. یک واحد فعالیت SOD به عنوان مقدار آنزیم مورد نیاز برای مهار تولید کروموژن تا ٥٠ درصد تعریف شده و به صورت واحد آنزیم بیان شد. فعالیت آنزیم کاتالاز با توجه به روش تجزیه H2O2 گزارش شده توسط Panda با کمی تغییرات جزئی اندازه‌گیری شد (Panda et al., 2006). مخلوط واکنش حاوی ٠/١ مولار بافر فسفات (pH 7) و ١٥٠ میلی مولار H2O2 می‌باشد. واکنش با افزودن عصاره آنزیمی آغاز گردید و بعد از گذشت زمان ١ دقیقه با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج ٢٤٠ نانومتر جذب اندازه‌گیری شد. یک واحد فعالیت آنزیم کاتالاز به عنوان مقدار آنزیم مورد نیاز برای کاتالیز نیمی از H2O2 موجود در مخلوط واکنش تعریف شد و به صورت واحد آنزیم بیان شد.

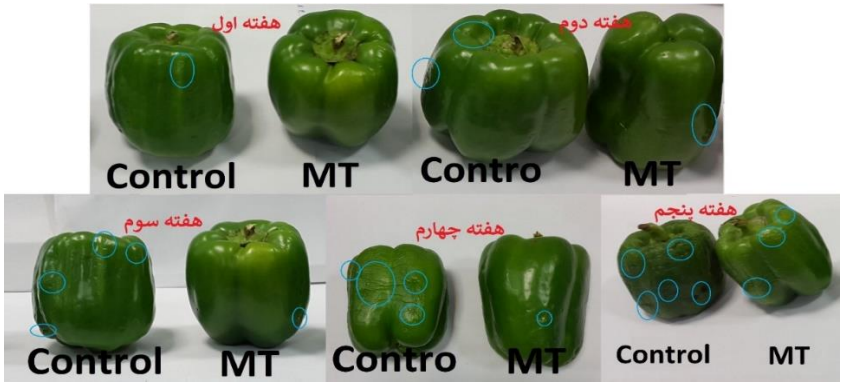
٢-٨- تجزیه و تحلیل‌های آماری

تمام آزمایشات شرح داده شده در سه تکرار و با استفاده از طرح کاملاً تصادفی انجام شد. برای تعیین تفاوت بین تیمارها از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و آزمون دانکن استفاده شد. تجزیه و تحلیل ها در SPSS (نسخه ٢٠) با سطح معنی‌داری پنج درصد انجام شد.

٣- نتایج و بحث

نگهداری فلفل‌دلمه‌ای در شرایط دمای پایین می‌تواند به افزایش عمر پس از برداشت و در دسترس بودن آن در بازار کمک شایانی داشته باشد، اما به خوبی شناخته شده است که نگهداری آنها در دمای کمتر از ١٣ درجه سانتی‌گراد منجر به علائم سرمازدگی می‌شود و این امر باعث کاهش بازارپسندی آنها می‌گردد (Wang et al., 2019). پژوهش-

های پیشین نشان داده‌اند که استفاده از تیمار ملاتونین در میوه هلو (Cao et al., 2018)، گوجه‌فرنگی (Jahan et al., 2019) و سیب‌زمینی (Li et al., 2022b) موجب افزایش تحمل به تنش سرما و کاهش میزان بروز علائم سرمازدگی می‌گردد. نتایج بدست آمده در این پژوهش موازی با این مقالات اثر تیمار ملاتونین برونزا را نشان داد.



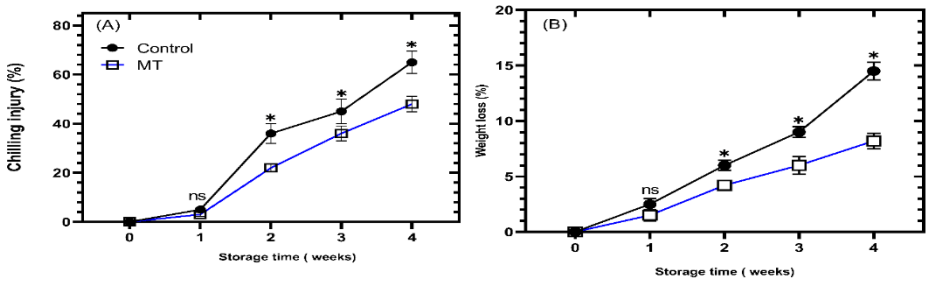
شکل ١- تغییر در شکل ظاهری فلفل دلمه ای تیمار شده با ملاتونین (MT) و شاهد (Control) در طی چهار هفته انبارمانی. علائم سرمازدگی بصورت دایره آبی رنگ نشان داده شده است.

Figure 1- Change in appearance of Bell pepper treated with melatonin (MT) and control. During four weeks of storage. Symptoms of chilling are shown as blue circles.

شکل ١ اثر تیمار ملاتونین روی میوه فلفل دلمه‌ای در طی پنج هفته انبارمانی در دمای چهار درجه سانتی‌گراد را نشان می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌شود سرمازدگی باعث تخریب سطح محصول شده و به دلیل از دست دادن آب فلفل‌ها چروکیده شده‌اند. لازم به ذکر است به دلیل آسیب گروه تیمار شده با ملاتونین تیمار در هفته پنجم برای نتایج این پژوهش مورد تحقیق و مطالعه قرار نگرفت و از داده‌ها خارج گردید.

٣-١- شاخص سرمازدگی و کاهش وزن تر

فلفل‌های تیمار شده با ١٠٠ میکرومولار ملاتونین کاهش معنی‌داری ($p\leq$ ٠/٠٥) در علائم سرمازدگی در طی ٤ هفته نگهداری در دمای پایین نشان دادند. همانطور که در شکل ٢-A مشاهده می‌شود در طی چهار هفته نگهداری در دمای ١±٤ درجه سانتی‌گراد شاخص سرمازدگی روند افزایشی در هر دو گروه شاهد و تیمارشده با ملاتونین نشان داد. همانطور که نتایج نشان می‌دهد این افزایش در گروه تیمار شده با ملاتونین با شیب ملایم‌تری مشاهده گردید. البته در هفته اول انبارمانی تفاوت معنی‌داری در شاخص سرمازدگی بین گروه شاهد و تیمار مشاهده نشد. بیشترین میانگین افزایش سرمازدگی در هفته چهارم انبارمانی در گروه شاهد مشاهده شد. تیمار ملاتونین در هفته‌های ٢، ٣ و ٤ انبارمانی به ترتیب ٣٩، ٢٠ و ٢٦/١٥ درصد در مقایسه با گروه شاهد کاهش یافت.



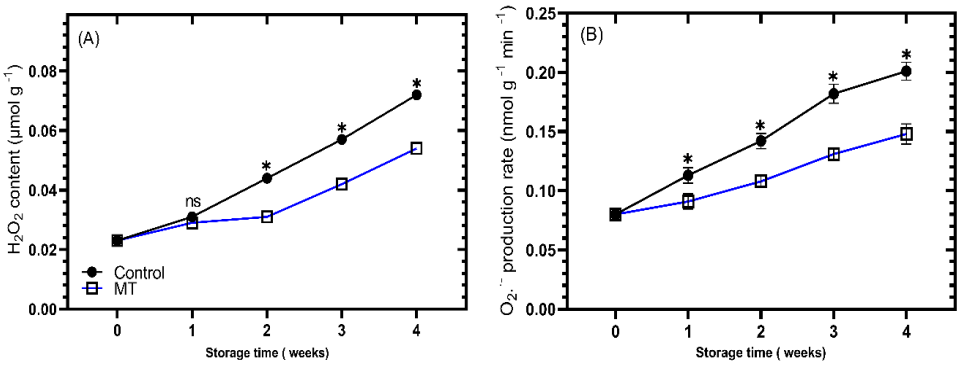
شکل ٢. اثرات تیمارملاتونین بر درصد سرمازدگی (A) و درصد کاهش وزن (B) در فلفل‌دلمه‌ای در طی انبارمانی.

Figure 2. The effect of melatonin treatment on chilling injury (A) and weight loss percentage (B) in bell pepper during storage period.

همانطور که در شکل B-٢ مشاهده می‌شود از هفته دوم نگهداری در دمای ٤±١ درجه سانتی‌گراد، درصد کاهش وزن‌تر در گروه شاهد یک روند کاهشی سریع داشت در حالی که میزان از دست دادن وزن در فلفل‌دلمه‌ای تیمار شده با ملاتونین نسبتاً پایین و با یک روند ملایم‌تری انجام شد. در پایان به ترتیب در هفته‌های دوم تا چهارم درصد کاهش وزن در گروه شاهد نسبت به گروه تیمار شده با ملاتونین به ترتیب ١/٤، ١/٥ و ١/٧٦ برابر بیشتر بود. در طی پیری نرخ تنفس سلولی پس از برداشت بالا میرود و این امر موجب سرعت بخشیدن به از دست دادن آب در فلفل‌دلمه‌ای می‌گردد (Wu et al., 2022). در مطالعه حاضر، تیمار برونزای ملاتونین سرعت کاهش وزن را در فلفل‌دلمه‌ای تعدیل بخشید، که این امر روی تأخیر افتادن مرحله پیری فلفل‌دلمه‌ای برداشت شده در طول انبارمانی موثر بود.

٢-٣- محتوای رادیکال سوپراکسید و پراکسید هیدروژن

در هردو گروه شاهد و تیمار شده با ملاتونین محتوای رادیکال پراکسیدهیدروژن و رادیکال سوپراکسید در طول چهار هفته انبارمانی در دمای ٤±١ درجه سانتی‌گراد افزایش معنی‌داری (p≤ ٠/٠٥) نشان داد (شکل ٣). با این وجود در هفته دوم، سوم و چهارم انبارمانی در فلفل‌دلمه‌های تیمار شده با ملاتونین مقدار پراکسیدهیدروژن بطور چشمگیری (p≤ ٠/٠٥) کمتر از گروه شاهد مشاهده شد. در مقایسه با گروه شاهد در فلفل‌دلمه‌ای تیمار شده با ملاتونین طی هفته دوم ذخیره‌سازی، بیشترین درصد کاهش در محتوای پراکسیدهیدروژن مشاهد شد.



شکل٣. اثرات تیمارملاتونین بر فعالیت رادیکال پراکسید هیدروژن (A) و سوپراکسید (B) در فلفل‌دلمه‌ای در طی انبارمانی.

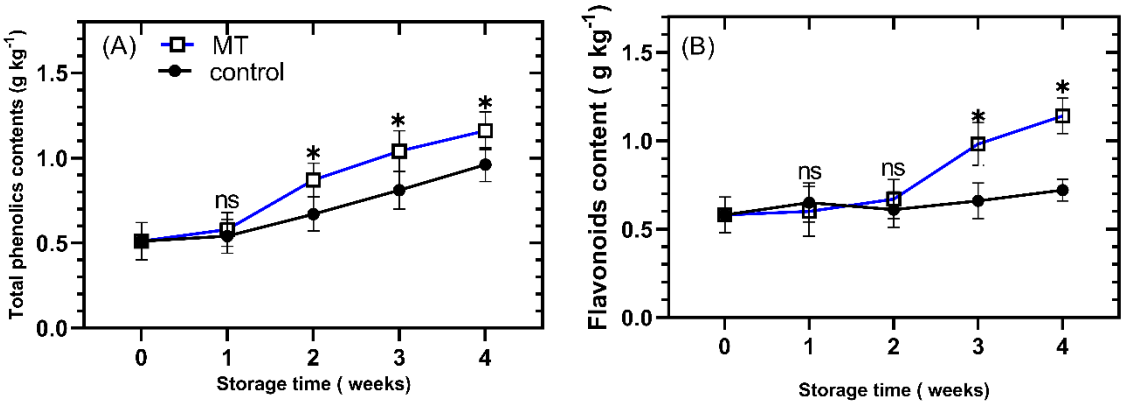
Figure 3. The effects of melatonin treatment on activity of hydrogen peroxide (A) and superoxide (B) in Bell pepper during storage period.

میوه‌های مختلف در برابر تیمار برونزا ملاتونین پاسخ‌های متنوعی نشان می‌دهند. این پاسخ متنوع ممکن است به دلیل تغییراتی در سطح فیزیولوژیکی، هورمونی و مولکولی از طریق مکانیسم‌هایی باشد که سرمازدگی را تنظیم می‌نماید (Cao et al., 2016; Li et al., 2022a; Liu et al., 2022; Magri and Petriccione, 2022). برخی از این عوامل شامل مولکول‌هایی است که در مجموع به عنوان گونه‌های اکسیژن فعال (Reactive oxygen species) شناخته می‌شوند. تولید نامتوازن این ترکیبات در اثر تنش سرمازدگی انجام می‌شود و تجمع آنها از طریق تخریب غشاهای زیستی باعث آسیب به سلول‌ها می‌شود (Chen et al., 2021; Liu et al., 2022; Toor and Savage, 2005). تنش اکسیداتیو ناشی از غلظت بالای گونه‌های اکسیژن فعال به اندازه قوی است که متابولیسم سلولی در محصولات باغی را مختل می‌نماید (Batory and Rotsztejn, 2022; Gao et al., 2016). همراستا با این مطالب، همانطور که در شکل ٣ مشاهد می‌گردد، در هردو گروه شاهد و تیمار شده با افزایش زمان ذخیره‌سازی محتوای رادیکال‌های آزاد پراکسیدهیدروژن و سوپراکسید افزایش می‌یابد. استرس اکسیداتیو به دلیل پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی، مهار فعالیت‌های آنزیم‌ها، اکسیداسیون پروتئین و آسیب به ساختار DNA و RNA و بخصوص روی ساختار و عملکرد غشاهای سلولی اثر کرده و پیری

زودرس را در سلول القاء می‌کند (Cao et al., 2018; Golnari et al., 2021; Li et al., 2022b).

٣-٤- محتوای فنول کل و محتوای فلاونوئید کل

به منظور بررسی تأثیر ملاتونین بر فنول و فلاونوئید کل به عنوان متابولیت‌های ثانویه؛ محتوای این ترکیبات در طی چهار هفته انبارمانی در فلفل‌دلمه‌ای اندازه‌گیری شدند. در طی انبارمانی محتوای فنول کل روند افزایشی نسبی نشان داد.



شکل٤. اثرات تیمارملاتونین بر محتوای فنول کل (A) و فلاوونوئیدها (B) در فلفل‌دلمه‌ای در طی انبارمانی.

Figure 4. The effects of melatonin treatment on contents of total phenolic (A) and flavonoids (B) in Bell pepper during storage period.

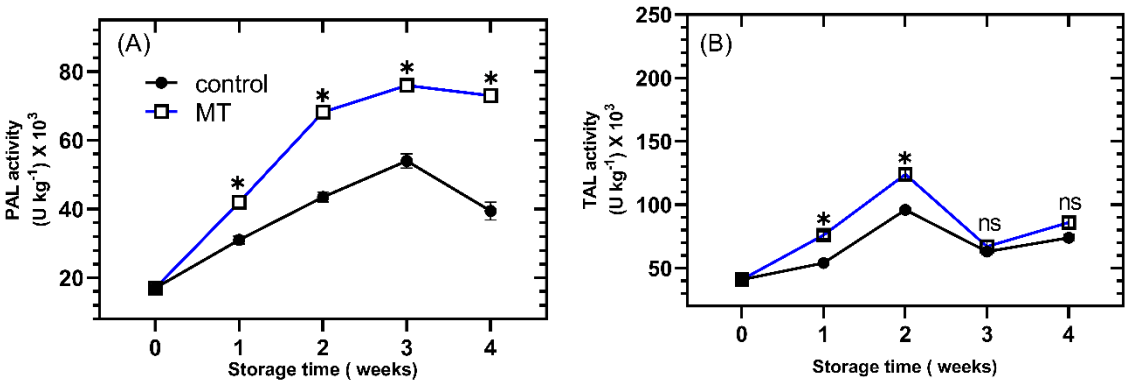
محتوای فنل کل در فلفل‌دلمه‌ای در طول چهار هفته انبارمانی در دمای چهار درجه سانتی‌گراد در نمونه شاهد و تیمارشده با ملاتونین مورد ارزیابی قرار گرفت. همانطور که شکل٤-A نشان داد در طول هفته اول انبارمانی تفاوت معنی‌داری بین گروه شاهد و تیمار شده با ملاتونین مشاهده نشد. با این وجود در هفته‌های دوم، سوم و چهارم انبارمانی با وجود روند افزایش در هر دوگروه شاهد و تیمارشده؛ اما گروه تیمار شده با ملاتونین محتوای فنل کل بیشتری داشت و تفاوت معنی‌داری ($p\leq$ ٠/٠٥) مشاهده شد. محتوای فلاوونوئیدها در فلفل‌دلمه‌ای تیمار شده با ملاتونین روند افزایشی را نشان داد، نتایج داده‌ها نشان داد در طول هفته اول و دوم انبارمانی تفاوت معنی‌داری بین گروه شاهد و تیمار شده با ملاتونین مشاهده نشد اما در هفته سوم و چهارم انبارمانی تفاوت معنی‌داری ($p\leq$ ٠/٠٥) بین گروه شاهد و تیمار شده با ملاتونین مشاهده گردید (شکل٤-B). ارزش تغذیه‌ای میوه فلفل‌دلمه‌ای به محتوای بالای ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی آن نسبت داده شده است (Wang et al., 2019). هر دوی این ترکیبات جزو متابولیت‌های ثانویه هستند که علاوه بر اینکه سبب ایجاد رنگ، بو و طعمی غنی در میوه می‌شوند، همچنین سلولها در پاسخ به تنش‌های اکسیداتیو با افزایش محتوای این ترکیبات باعث ایجاد ویژگی آنتی‌اکسیدانی می‌شوند (Zhang et al., 2018). محتوای فنل کل در فلفل‌دلمه‌ای تیمار شده با ملاتونین برونزا از طریق تنظیم مثبت روی بیان ژن و پروتئین آنزیم فنیل‌آلانین آمینالیاز و تیروزین آمینالیاز که هر دو جزو آنزیم‌های کلیدی بیوسنتز ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی در مسیر شیکمیک‌اسید و فنیل‌پروپانوئید هستند، حفظ یا افزایش می‌یابد (Batory and Rotsztejn, 2022). محتوای بالاتر فنل‌کل و فلاونوئیدکل در گوشت میوه تیمار شده با ملاتونین ممکن است با فعالیت آنزیم PAL و TAL مرتبط باشد (شکل٣). این مشاهدات با مطالعات قبلی انجام شده روی میوه توت‌فرنگی (Hayat et al., 2022)، کیوی (Jiao et al., 2022) و خیار (Zhao et al., 2017) مطابقت دارد.

فعالیت آنزیم‌های مرتبط با متابولیسم آنتی‌اکسیدان

٣-٥-١- فنیل‌آلانین آمونیا لیاز و تیروزین آمونیا لیاز

آنزیم‌های PAL و TAL هر دو بخشی از مسیر فنیل پروپانوئید هستند. فلفل تیمار شده با ملاتونین دارای فعالیت بالاتر آنزیم PAL در مقایسه با گروه شاهد می‌باشد. همانطور که در شکل ٥-A مشاهده می‌شود فعالیت

آنزیم PAL از هفته اول انبارمانی در هر دو گروه شاهد و تیمار شده افزایش یافت اما این افزایش در گروه تیمار شده بطور قابل توجهی معنی‌دار (p≤ ٠/٠٥) بود. افزایش فعالیت آنزیم PAL در گروه تیمار شده در طی هفته اول و دوم با شیب زیادی افزایش یافت اما در هفته سوم و چهار تاحدودی ثابت ماند.



شکل ٥. اثرات تیمارملاتونین بر فعالیت آنزیم PAL (A) و TAL (B) در فلفل‌دلمه‌ای در طی انبارمانی.

Figure 5. The effects of melatonin treatment on PAL (A) and TAL (B) activity in Bell pepper during storage period.

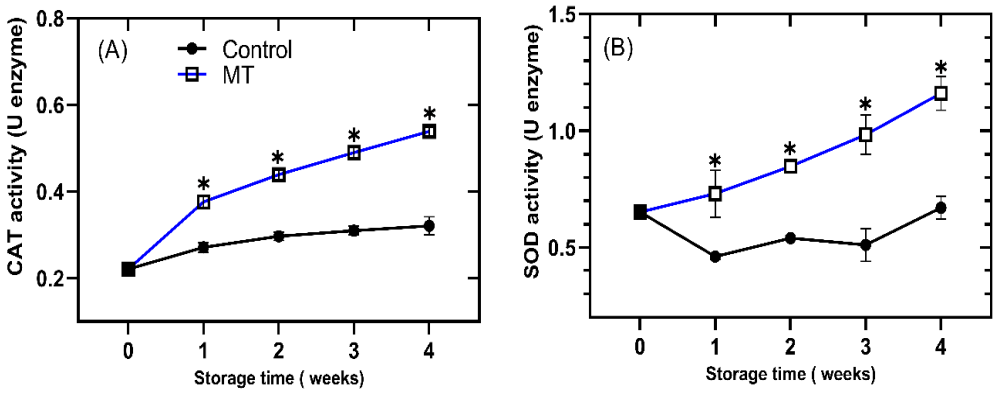
بر اساس این داده‌ها، فعالیت آنزیم TAL عمدتاً در هر دور گروه شاهد و تیمار شده با ملاتونین در طول چهار هفته انبارمانی تقریبا بدون تغییر باقی ماند. مقایسه میانگین فعالیت آنزیم TAL در هفته اول و دوم بین گروه شاهد و تیمار معنی‌دار بود اما در هفته سوم و چهارم تفاوت معنی-داری بین این دو گروه مشاهد نشد (شکل٥-B).

افزایش فعالیت آنزیم PAL و TAL به ویژه در هفته‌های اولیه ذخیره‌سازی، ممکن است به دلیل اثر ملاتونین برونزا روی بیان و بیوسنتز ژن‌های دخیل در مسیر پروپانوئیک اسید باشد و در نتیجه آن منجر به افزایش فعالیت آنزیم-های PAL و TAL گردد (Mahmoudi et al., 2022; Verde et al., 2023). داده‌های گزارش شده در مطالعه حاضر با این مطلب مطابقت دارد.

٢-٥-٣- فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

فعالیت آنزیم کاتالاز افزایش تدریجی را در گروه شاهد در طول چهار هفته انبارمانی در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نشان داد (شکل ٦-A). در گروه تیمار شده با ١٠٠ میکرومولار ملاتونین این افزایش در فعالیت آنزیم کاتالاز با شیب تندتری انجام گرفت. در هفته اول تا چهارم نگهداری، فعالیت کاتالاز در فلفل دلمه‌ای تیمار شده با ملاتونین به طور معنی‌داری (p<٠/٠٥) بیش از گروه شاهد بود. در پایان چهار هفته نگهداری، فعالیت آنزیم در گروه شاهد از هفته اول تا چهارم به ترتیب ٢٤، ٢٨/٣، ٣٤/٢ و٤١/٢ درصد و در گروه تیمار شده با ملاتونین به ترتیب ٦٧/٨، ٩٨/٦، ١٢١/٧ و ١٤٣/٨ درصد افزایش یافت (شکل ٦-A).

شکل٦. اثرات



تیمارملاتونین بر فعالیت آنزیم CAT (A) و SOD (B) در فلفل‌دلمه‌ای در طی انبارمانی.

Figure 6. The effects of melatonin treatment on SOD (A) and CAT (B) activity in Bell pepper during storage period.

در طی دوره نگهداری فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در هر دو گروه تیمار شده با ملاتونین و شاهد روند افزایش را نشان داد (شکل ٦-B). با این حال در گروه شاهد طی هفته سوم نسبت به هفته دوم افزایش معنی داری مشاهده نگردید. به طور کلی، در گروه تیمار شده با ملاتونین فعالیت SODدر هفته اول، دوم، سوم و چهارم به ترتیب١٢/٣، ٣٠/٣، ٤٤/٣ و ٧٨/٤ درصد نسبت به روز اول افزایش یافت. فلفل‌دلمه‌ای برداشت شده در طول انبارمانی مستعد تنش سرمازدگی می‌باشد که باعث افزایش تجمع گونه-های فعال اکسیژن همچون رادیکال سوپراکسید و پراکسید هیدروژن می‌شود و این ترکیبات از طریق تخریب غشاهای زیستی موجب القاء پیری شده و کاهش کیفیت و بازارپسندی محصولات کشاورزی می‌گردد (Helaly et al., 2022; Ma et al., 2020; Wang et al., 2019). سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی در گیاهان برای محدود کردن تجمع ROS و تسکین آسیب اکسیداتیو بکار برده می‌شود (Chen et al., 2021; Sun et al., 2020). در شرایط تنش‌های غیرزیستی مولکول اکسیژن با دریافت یک الکترون تبدیل به رادیکال منفی سوپراکسید می‌شود که این ترکیب توانایی عبور از غشاهای زیستی را ندارد و تجمع این ترکیب در داخل سلول که میل ترکیبی بالایی دارد، باعث آسیب به اندامک‌ها و ترکیبات درون سلولی همچون غشاهای زیستی و DNA می‌گردد (Joshi et al., 2001). اگر این رادیکال سوپراکسید یک الکترون دیگر دریافت نماید تبدیل به پراکسید هیدروژن (H_2O_2) می‌شوند که این واکنش توسط آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) انجام می‌شود (Malekzadeh et al., 2014; Wang et al., 2022). محصول حاصل از این واکنش (H_2O_2) به راحتی می‌تواند از غشاهای زیستی عبور کند و همچنین H_2O_2 باقیمانده در درون سلول می‌تواند به کمک آنزیم کاتالاز به آب و اکسیژن تبدیل شود. بنابراین آنزیم‌های CAT و SOD گونه‌های فعال اکسیژن اضافی را که در نتیجهٔ پاسخ به تنش تجمع پیدا می‌کند، پاکسازی می‌کنند (Masia, 1998; Mukhtar et al., 2022). گزارش‌های مطالعات گذشته کهحاکی از آن است که ملاتونین ممکن است به عنوان یک ترکیب آنتی‌اکسیدان عمل کند که می‌تواند با از بین بردن رادیکال‌های آزاد همچون سوپراکسید و پراکسیدهیدروژن از مولکول‌های زیستی محافظت کند (Li et al., 2022a; Zhao et al., 2017). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که سطح فعالیت آنزیم SOD و CAT در فلفل-دلمه‌ای تیمار شده با ملاتونین بیشتر از فلفل‌دلمه‌ای تیمار نشده (شاهد) بود، این نتایج موازی با یافته‌های گذشته و تایید کننده نتایج مربوط به رادیکال سوپراکسید و پراکسیدهیدروژن می باشد. این داده‌ها نشان داد که ملاتونین از طریق توسعه و القاء متابولیسم ترکیبات و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی تولید گونه‌های فعال اکسیژن را کاهش میدهد و از این طریق آسیب ناشی از تنش اکسیداتیو به غشاها را تسکین می‌کند و در نتیجه آن پیری در میوه را به تأخیر میاندازد.

نتیجه‌گیری:
قبل انبارداری فلفل‌دلمه‌ای با ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین تیمار شد و سپس در دمای ٤±١ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤هفته نگهداری شدند تا اثر تسکین کننده ملاتونین روی آن مشخص شود. براساس نتایج بدست آمده در این پژوهش تا هفته چهارم از دوره انبارمانی، بهترین کیفیت و میزان ماندگاری در فلفل دلمه‌ای تیمار شده مشاهد گردید و تا این زمان بیشترین کاهش سرمازدگی دیده شد. در پاسخ به کاربرد ملاتونین برونزا افزایش تولید سیستم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیر آنزیمی و فعالسازی آنزیم‌های کلیدی مسیر فنیل پروپانوئید و ترکیبات فنل و فلاونوئید کل مشاهده گردید. به نظر میرسد که سیستم آنتی‌اکسیدانی تقویت شده پایداری سلولی را با کاهش غلظت گونه‌های فعال اکسیژن حفظ کرده است و باعث افزایش تحمل میوه به تنش سرمازدگی شده است.

منابع

- Badem, A., Söylemez, S., 2022. Effects of nitric oxide and silicon application on growth and productivity of pepper under salinity stress. Journal of King Saud University-Science 34, 102189.
- Batory, M., Rotsztejn, H., 2022. Shikimic acid in the light of current knowledge. Journal of Cosmetic Dermatology 21, 501-505.
- Cao, S., Shao, J., Shi, L., Xu, L., Shen, Z., Chen, W., Yang, Z., 2018. Melatonin increases chilling tolerance in postharvest peach fruit by alleviating oxidative damage. Scientific reports 8.۱۱-۱ ,
- Cao, S., Song, C., Shao, J., Bian, K., Chen, W., 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, 52.۵۲۲۲-۱۵
- Chen, L.-L., Shan, W., Cai, D.-L., Chen, J.-Y., Lu, W.-J., Su, X.-G., Kuang, J.-F., 2021. Postharvest application of glycine betaine ameliorates chilling injury in cold-stored banana fruit by enhancing antioxidant system. Scientia Horticulturae 2.۱۱۰۲٦٤ ,۸۷
- Delgado-Vargas, F., Vega-Álvarez, M., Landeros Sánchez, A., López-Angulo, G., Salazar-Salas, N.Y., Quintero-Soto, M.F., Pineda-Hidalgo, K.V., López-Valenzuela, J.A., 2022. Metabolic changes associated with chilling injury tolerance in tomato fruit with hot water pretreatment. Journal of Food Biochemistry, e14056.
- Ewais, A.H., Raslan, M.M., Hassanein, R.A., Zidan, I.T., 2022. Nanoparticles and irradiated chitosan impact on sweet green bell pepper (Capsicum annum L.) under cold storage conditions. Arab Journal of Nuclear Sciences and Applications.
- Gao, H., Zhang, Z.K., Chai, H.K., Cheng, N., Yang, Y., Wang, D.N., Yang, T., Cao, W., 2016. Melatonin treatment delays postharvest senescence and regulates reactive oxygen species metabolism in peach fruit. Postharvest Biology and Technology 118, 103-110.
- Ge, W., Zhao, Y., Kong, X., Sun, H., Luo, M., Yao, M., Wei, B., Ji, S., 2020. Combining salicylic acid and trisodium phosphate alleviates chilling injury in bell pepper (Capsicum annuum L.) through enhancing fatty-acid desaturation efficiency and water retention. Food Chemistry 327, 127057.
- Golnari, S., Vafaee, Y., Nazari, F., Ghaderi, N., 2021. Gamma-aminobutyric acid (GABA) and salinity impacts antioxidative response and expression of stress-related genes in strawberry cv. Aromas. Brazilian Journal of Botany 44, 639-651.

- Guevara, L., Domínguez-Anaya, M.Á., Ortigosa, A., González-Gordo, S., Díaz, C., Vicente, F., Corpas, F.J., Pérez del Palacio, J., Palma, J.M., 2021. Identification of compounds with potential therapeutic uses from sweet pepper (Capsicum annuum L.) fruits and their modulation by nitric oxide (no). International Journal of Molecular Sciences 22, 4476.
- Hayat, F., Sun, Z., Ni, Z., Iqbal, S., Xu, W., Gao, Z., Qiao, Y., Tufail, M.A., Jahan, M.S., Khan, U., 2022. Exogenous melatonin improves cold tolerance of strawberry (Fragaria× ananassa Duch.) through modulation of DREB/CBF-COR pathway and antioxidant defense system. Horticulturae 8, 194.
- Helaly, M.N., El-Hoseiny, H.M., Elsheery, N.I ,.Kalaji, H.M., de Los Santos-Villalobos, S., Wróbel, J., Hassan, I.F., Gaballah, M.S., Abdelrhman, L.A., Mira, A.M., 2022. 5-Aminolevulinic acid and 24-epibrassinolide improve the drought stress resilience and productivity of banana plants. Plants 11, 743.
- Hu, H., Luo, S., An, R., Li, P., 2022. Endogenous melatonin delays sepal senescence and extends the storage life of broccoli florets by decreasing ethylene biosynthesis. Postharvest Biology and Technology 188, 111894.
- Jahan, M.S., Shu, S., Wang, Y., Chen ,Z., He, M., Tao, M., Sun, J., 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.
- Jiao, J., Jin, M., Liu, H., Suo ,J., Yin, X., Zhu, Q., Rao, J., 2022. Application of melatonin in kiwifruit (Actinidia chinensis) alleviated chilling injury during cold storage. Scientia Horticulturae 296, 110876.
- Joshi, R., Adhikari, S., Patro, B., Chattopadhyay, S., Mukherjee, T., 200 .١Free radical scavenging behavior of folic acid: evidence for possible antioxidant activity. Free Radical Biology and Medicine 30, 1390-1399.
- Krasnow, C., Ziv, C., 2022. Non-Chemical Approaches to Control Postharvest Gray Mold Disease in Bell Peppers. Agronomy 12, 216.
- Li, J., Liu, Y., Zhang, M., Xu, H., Ning, K., Wang, B., Chen, M., 2022a. Melatonin increases growth and salt tolerance of Limonium bicolor by improving photosynthetic and antioxidant capacity. BMC plant biology 22, 1-14.
- Li, Y., Zhang, L ,.Zhang, L., Nawaz, G., Zhao, C., Zhang, J., Cao, Q., Dong, T., Xu, T., 2022b. Exogenous melatonin alleviates browning of fresh-cut sweetpotato by enhancing anti-oxidative process. Scientia Horticulturae 297, 110937.
- Liu, J., Wu, H., Wang, B., Zhang, Y ,.Wang, J., Cheng, C., Huang, Y., 2022. Exogenous Melatonin Enhances Cold Resistance by Improving Antioxidant Defense and Cold-Responsive Genes' Expression in Banana. Horticulturae 8, 260.
- Ma, M., Zhu, Z., Cheng, S., Zhou, Q., Zhou, X., Kong, X., Hu, M., Yin, X., Wei, B., Ji, S., 2020. Methyl jasmonate alleviates chilling injury by regulating membrane lipid composition in green bell pepper. Scientia Horticulturae 266, 109308.
- Madebo, M.P., LUO, S.-m., Li, W., ZHENG, Y.-h., 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.
- Magri, A., Petriccione, M., 2022. Melatonin treatment reduces qualitative decay and improves antioxidant system in highbush blueberry fruit during cold storage. Journal of the Science of Food and Agriculture.

- Mahmoudi, R., Razavi, F., Rabiei, V., Gohari, G., Palou, L., 2022. Application of Glycine betaine coated chitosan nanoparticles alleviate chilling injury and maintain quality of plum (Prunus domestica L.) fruit. International Journal of Biological Macromolecules.
- Malekzadeh, P., Khara, J., Heydari, R., 2014. Alleviating effects of exogenous Gamma-aminobutiric acid on tomato seedling under chilling stress. Physiology and Molecular Biology of Plants 20, 133-137.
- Malekzadeh, P., Khosravi-Nejad, F., Hatamnia, A.A., 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.
- Masia, A., 1998. Superoxide dismutase and catalase activities in apple fruit during ripening and post-harvest and with special reference to ethylene. Physiologia Plantarum 104–٦٦٨ , .٦٧٢
- Medina-Santamarina, J., Serrano, M., Lorente-Mento, J.M., García-Pastor, M.E., Zapata, P.J., Valero, D., Guillén, F., 2021. Melatonin treatment of pomegranate trees increases crop yield and quality parameters at harvest and during storage. Agronomy 11, 861.
- Mukhtar, A., Latif, S., Salvatierra-Rojas, A., Müller, J., 2022. Catalase Activity in Hot-Air Dried Mango as an Indicator of Heat Exposure for Rapid Detection of Heat Stress. Applied Sciences 12, 1305.
- Osman, A.R., El-Naggar, H.M., 2022. Enhancing salinity stress tolerance and phenylalanine ammonia lyase gene activity using osmolytes in Moringa seedling production. Annals of Agricultural Sciences 67, 127-135.
- Panda, A.K., Rao, S.V.R., Raju, M.V., SHARMA, S.R., 2006. In methods of Enzymatic Analysis In methods of Enzymatic Analysis, 1974. The journal of poultry science 43, 235-240.
- Raza, A., Charagh, S., García-Caparrós, P., Rahman, M.A., Ogwugwa, V.H., Saeed, F., Jin, W., 2022. Melatonin-mediated temperature stress tolerance in plants. GM Crops & Food 13, 196-217.
- Sathiyaseelan, A., Saravanakumar, K., Mariadoss, A.V.A., Ramachandran, C., Hu, X., Oh, D.-H., Wang, M.-H., 2021. Chitosan-tea tree oil nanoemulsion and calcium chloride tailored edible coating increase the shelf life of fresh cut red bell pepper. Progress in Organic Coatings 151, 106010.
- Shahbazi, S., Hatamnia, A.A., Malekzadeh, P., 2022. Effect of melatonin treatment on post-harvest life of broccoli during storage. Journal of Vegetables Sciences.
- Steelheart, C., Galatro, A., Bartoli ,C.G., Gergoff Grozeff, G.E., 2019. Nitric oxide and hydrogen peroxide: signals in fruit ripening, Nitric oxide and hydrogen peroxide signaling in higher plants. Springer, pp. 175-199.
- Sun, H., Luo, M., Zhou, X., Zhou, Q., Sun, Y., Ge, W., Wei, B., Cheng ,S., Ji, S., 2020. Exogenous glycine betaine treatment alleviates low temperature-induced pericarp browning of 'Nanguo'pears by regulating antioxidant enzymes and proline metabolism. Food chemistry 306, 125626.
- Toor, R.K., Savage, G.P., 2005. Antioxidant activity in different fractions of tomatoes. Food research international 38, 487-494.
- Verde, A., Míguez, J.M., Gallardo, M., 2023. Melatonin stimulates postharvest ripening of apples by up-regulating gene expression of ethylene synthesis enzymes. Postharvest Biology and Technology 195, 112133.

- Wang, B., Wang, J., Liang, H., Yi, J., Zhang, J., Lin, L., Wu, Y., Feng, X., Cao, J., Jiang, W., 2008. Reduced chilling injury in mango fruit by 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid and the antioxidant response. Postharvest Biology and Technology 48, 172-181.
- Wang, J., Mao, S., Liang, M., Zhang, W., Chen, F., Huang, K., Wu, Q., 2022. Preharvest Methyl Jasmonate Treatment Increased Glucosinolate Biosynthesis, Sulforaphane Accumulation, and Antioxidant Activity of Broccoli. Antioxidants 11, 1298.
- Wang, Y., Gao, L., Wang, Q., Zuo, J., 2019. Low temperature conditioning combined with methyl jasmonate can reduce chilling injury in bell pepper. Scientia Horticulturae 243, 434-439.
- Wang, Z., Pu, H., Shan, S., Zhang, P., Li, J ,.Song, H., Xu, X., 2021. Melatonin enhanced chilling tolerance and alleviated peel browning of banana fruit under low temperature storage. Postharvest Biology and Technology 179, 111571.
- Wu, Q., Wang, J., Huang, H., Mao, S., Wu, Q., Huang, K., 2022. Exogenous Selenium Treatment Promotes Glucosinolate and Glucoraphanin Accumulation in Broccoli by Activating Their Biosynthesis and Transport Pathways. Applied Sciences 12, 4101.
- Wu, S., Wang, Y., Zhang, J., Gong, X., Zhang, Z., Sun, J., Chen, X., Wang, Y., 2 .٠٢١ Exogenous melatonin improves physiological characteristics and promotes growth of strawberry seedlings under cadmium stress. Horticultural Plant Journal 7, 13-22.
- Zhang, H., YANG, Y.-f., ZHOU, Z.-q., 2018. Phenolic and flavonoid contents of mandarin (Citrus reticulata Blanco) fruit tissues and their antioxidant capacity as evaluated by DPPH and ABTS methods. Journal of Integrative Agriculture 17, 256-263.
- Zhao, H., Zhang, K., Zhou, X., Xi, L., Wang, Y., Xu, H., Pan, T., 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.
- Zheng, S., Xu, R., Wei, J., Tian, J., He, Q., Zhang, F., Li, J., Wu, B., Guan, J., 2023. Nitric oxide effects on postharvest and Alternaria-infected pear fruit. Postharvest Biology and Technology 195, 112118.

The effect of melatonin treatment in improving the antioxidant system and increasing the shelf life of post-harvesting of bell peppers (Capsicum annuum L.)

Parviz Malekzadeh[1*]

[*]1- Assistant Professor, Faculty of Science, University of Qom, Qom, Iran

[*]Email Address : p.malekzadeh@qom.ac.ir

Abstract

Introduction:

Bell pepper (Capsicum annuum L.) belongs to the Solanaceae family, it contains high amounts of bioactive compounds such as phenolic, flavonoid, and antioxidant compounds. These nutrients have anti-cancer properties. However, bell pepper can usually be stored for several days during transport or at the time of sale in the store, or after purchase by consumers. In this period of time, the surface of the fruit loses its appearance and begins to lose its nutritional content. In order to postpone the senescence of bell pepper, various methods can be used, such as the atmosphere changing during the storage period, using chemical compounds, or natural compounds treatment. Researchers are looking for a compound that, while having the least harmful effect on human health, can give pepper the longest lifespan. Melatonin is an organic compound that has been studied in recent years on various biotic and abiotic stresses. The purpose of this study is to investigate the effect of melatonin treatment on the physiology of post-harvesting of bell pepper through its effect on the content of enzymatic and non-enzymatic antioxidant compounds during four weeks of storage time.

Materials and methods

In this research, bell pepper fruit at the stage of physiological maturity was purchased from a local producer located in Tehran and immediately transferred to the research laboratory of Qom University. In the laboratory, the fruits that had damage or defects in appearance were discarded, and the rest were disinfected by immersing in a 1% (v/v) sodium hypochlorite solution for two minutes. In a preliminary experiment, bell peppers were treated with 25, 50, 100, 200, 250 and 300 µmol/L melatonin. Preliminary test results showed that 100 µmol/L melatonin had a significant effect on post-harvest appearance quality (primary test results not shown). Based on an initial experiment and selection of the best effective concentration in maintaining fruit quality, the treatment of 100 micromol/liter melatonin was used as a reference for the studies in this article. Bell peppers were divided into two groups, control and treatment, and after 2 hours immersion in 100 µmol/L as the treatment group and distilled water as the control group. Then it was kept for 4 weeks at a temperature of 4±1 degrees Celsius. In this research, the indicators of weight loss percentage, chilling injury percentage, antioxidant enzyme activity such as CAT and SOD, free radical content such as H_2O_2 and superoxide free radicals, and total phenol content, flavonoid content, and Phenylalanine amino lyase (PAL) and Tyrosine ammonia lyase (TAL) enzyme activity as enzymes controlling the phenylpropanoid pathway in weeks 0, 1, 2, 3 and 4 were evaluated after storage and with three repetitions.

Results and discussion:

The results of this study showed that the melatonin treatment of bell peppers was more effective in maintaining fresh weight during storage compared to the control group. In the first to the fourth week, the weight loss percentage of the melatonin treatment in the 2nd, 3rd and 4th weeks of storage was reduced by 39, 20 and 26.15%, respectively, compared to the control group. The results showed that there is a significant difference in the percentage of chilling injury in different weeks of storage between the control and the melatonin-treated group. The results showed that there is a significant difference in total phenol and flavonoid content between the control group and the melatonin-treated group during storage, and this increase was in line with the effect on the activity of PAL and Tal enzymes as key enzymes in the propanoid pathway. In both control and treated groups with melatonin, the content of hydrogen peroxide radical and superoxide radical showed a significant increase ($p \geq$

0.05) during four weeks of storage at 4 ± 1 °C (Figure 3). However, in the second, third and fourth weeks of storage, the amount of hydrogen peroxide was significantly ($p \geq 0.05$) lower in bell peppers treated with melatonin than in the control group. Compared to the control group, in bell peppers treated with melatonin during the second week of storage, the highest percentage decrease in hydrogen peroxide content was observed.The content of H_2O_2 and superoxide free radicals during the storage period showed a significant decrease compared to the control group, which showed that this result is consistent with the data obtained with the activity of antioxidant enzymes CAT and SOD.

Conclusion:

The results of this research showed that the treatment of bell pepper with melatonin significantly reduced the effect on enzymatic and non-enzymatic antioxidant compounds compared to a control group, and these results confirm the results and the findings of previous studies about exogenous effect of melatonin. Harvested bell peppers during storage are susceptible to freezing stress, which increases the accumulation of reactive oxygen species such as superoxide radicals and hydrogen peroxide, and these compounds induce aging and reduce quality and marketability of agricultural products. The increase in the activity of PAL and TAL enzymes, especially in the first weeks of storage, may be due to the effect of exogenous melatonin on the expression and biosynthesis of genes involved in the phenylpropanoid pathway, and as a result, it leads to an increase in the activity of PAL and TAL enzymes. Increased production of enzymatic and non-enzymatic antioxidant system and activation of key enzymes of phenylpropanoid pathway (PAL and TAL) and increasing the content of total phenol and flavonoid compounds were observed. It seems that the enhanced antioxidant system has maintained the cell stability by reducing the concentration of reactive oxygen species and has increased the tolerance of the fruit to chilling stress. Phenolic and flavonoid compounds make plants resistant to abiotic and biotic stresses. In this study, the decrease in phenolic and flavonoid content due to storage at cold temperature in control group; was significantly increased in the pericarp of pepper treated with melatonin treatment. Based on the results obtained in this research, it can be said that melatonin treatment is beneficial on the post harvesting life of bell peppers and maintaining the appearance as well as the quality and levels of nutrients. Of course, for the final confirmation of this result, we need more studies on this or other fruits.

Key words:

Antioxidant , Bell pepper, Phenylalanine amino lyase, Shelf life, Tyrosine ammonia lyase