

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه کشاورزی شیراز

دانشکده کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد فیزیولوژی و فناوری پس از برداشت  
محصولات باغبانی

## اثر 1-MCP بر بیان ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز اتیلن در گوجه‌فرنگی

نگارنده:

فاطمه طاهری

اساتید راهنما

دکتر حجت اله بداقی

دکتر امین ابراهیمی

استاد مشاور

دکتر زیبا قسیمی حق

بهمن ۱۳۹۶

## فرم شماره (۳) صورتجلسه نهایی دفاع از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد

با نام و یاد خداوند متعال، ارزیابی جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد خانم فاطمه طاهری با شماره دانشجویی ۹۴۱۱۴۹۴ رشته: باغبانی. گرایش: فیزیولوژی و فناوری پس از برشت محصولات تحت عنوان: اثر MCP-1 بر بیان ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز اتیلن در گوجه‌فرنگی که در تاریخ ۱۳۹۶/۱۱/۴

با حضور هیأت محترم داوران در دانشگاه صنعتی شاهرود برگزار گردید به شرح ذیل اعلام می‌گردد:

قبول (با درجه: خیلی خوب)  مردود

نوع تحقیق: نظری  عملی

امضاء	مرتبه علمی	نام و نام خانوادگی	عضو هیأت داوران
	استادیار	دکتر حجیاتاله بداقی	۱- استاد راهنمای اول
	استادیار	دکتر امین ابراهیمی	۲- استاد راهنمای دوم
	استادیار	دکتر زیبا قسیمي حق	۳- استاد مشاور
	استادیار	دکتر وجیهه درستکار	۴- نماینده تحصیلات تکمیلی
	استادیار	دکتر مهدی رضائی	۵- استاد ممتحن اول
	استادیار	دکتر پرویز حیدری	۶- استاد ممتحن دوم

نام و نام خانوادگی رئیس دانشکده: دکتر محمدرضا عامریان

تاریخ و امضاء و مهر دانشکده:

تبصره: در صورتی که کسی مردود شود حداکثر یکبار دیگر (در مدت مجاز تحصیل) می‌تواند از پایان نامه خود دفاع نماید (دفاع مجدد نباید زودتر از ۴ ماه برگزار شود).

تقدیم:

ماحصل آموختہ ایم را تقدیم می‌کنم به آنان که مرا آسمانی شان آرام بخش آلام زمینی ام است

به پدرم که راه را به من نشان داد

به مادرم که چگونه راه رفتن را به من آموخت

به همسرم نشانه لطف الهی در زندگی ام

به خواهرم همراه همیشگی ام

و به دوستان واقعی ام

تقدیر و تشکر

پاس بی کران پروردگار یکتا را که، هستی مان بخشید و به طریق علم و دانش، رهنمودمان شد و، به نشینی رحروان علم و دانش  
مستخرمان نمود و خوشه چینی از علم و معرفت را روزیمان ساخت

عالی ترین مراتب پاس و قدردانی خود را به محضر اساتید محترم جناب آقای دکتر حجت‌الهدایتی و جناب آقای دکتر امین ابراهیمی و  
استاد مشاور سرکار خانم دکتر زیبا قیسی حق که مراد طول تحصیل و نیز مراحل مختلف این تحقیق، صبورانه و مشتاقانه راهنمایی کردند و از  
محضر علمیشان مستفیض گردانیدند، پاسگزاری می‌نمایم.

## تعهد نامه

اینجانب **فاطمه طاهری** دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته **فیزیولوژی و فناوری پس از برداشت محصولات باغبانی**، دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه اثر **1-MCP** بر بیان ژن‌های درگیر در مسیر **بیوسنتز اتیلن در گوجه‌فرنگی** تحت راهنمایی **دکتر حجت‌الله بداقی** و **دکتر امین ابراهیمی** متعهد می‌شوم .

تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است .

- در استفاده از نتایج پژوهش‌های محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است .
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است .
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می‌باشد و مقالات مستخرج با نام « دانشگاه صنعتی شاهرود » و یا « Shahrood University of Technology » به چاپ خواهد رسید
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده‌اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می‌گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه ، در مواردی که از موجود زنده ( یا بافتهای آنها ) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است .
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری ، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است .

### تاریخ

### امضای دانشجو

#### مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج ، کتاب ، برنامه‌های رایانه‌ای ، نرم افزارها و تجهیزات ساخته شده است ) متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می‌باشد . این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود .
- استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی‌باشد.

## چکیده

گوجه‌فرنگی به عنوان یک میوه کلیماکتریک (فرازگرا)، یک سبزی فسادپذیر است که پس از برداشت در دمای محیط از بین می‌رود. اتیلن نقش مهمی در فرآیند رسیدگی و پیری در گوجه‌فرنگی ایفا می‌کند. این تحقیق به منظور بررسی اثرات 1-MCP و فیلم پلی‌اتیلن (بسته‌بندی) بر برخی ویژگی‌های دو لاین خالص گوجه‌فرنگی، گلابی زرد (Yellow pear beams) و نارنجی (Orange beery) و مطالعه چگونگی تغییرات پروفایل بیان تعدادی از ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز اتیلن انجام شد. در این پژوهش گوجه‌فرنگی‌ها در مرحله شکست رنگ از مزرعه برداشت شدند. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا شد. فاکتور اول شامل دو لاین گوجه‌فرنگی و فاکتور دوم شامل فیلم پلی‌اتیلن، 1-MCP به همراه فیلم پلی‌اتیلن و شاهد و فاکتور سوم شامل چهار زمان بود. آزمایش در سه تکرار انجام شد و گوجه‌فرنگی‌ها طی ۱۶ روز انبارداری در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. نتایج نشان داد که بین تیمار شاهد و دو تیمار دیگر در تمامی صفات (درصد کاهش وزن، pH عصاره، مواد جامد محلول و سفتی) اختلاف معنی‌داری وجود دارد. در مورد صفات سفتی، pH عصاره، مواد جامد محلول، تیمار 1-MCP به همراه فیلم پلی‌اتیلن و در صفت درصد کاهش وزن تیمار فیلم پلی‌اتیلن بهتر عمل کرد. در این پژوهش الگوی بیان چهار ژن دخیل در مسیر بیوسنتز اتیلن (*SAMI*، *ACO1*، *ACO5* و *ACS4*) بررسی شدند. نتایج نشان داد که تیمار فیلم پلی‌اتیلن و 1-MCP به همراه فیلم پلی‌اتیلن نسبت به شاهد بیان ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز اتیلن را به صورت معنی‌داری کاهش می‌دهند. در مجموع نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که تیمار فیلم پلی‌اتیلن و 1-MCP به همراه فیلم پلی‌اتیلن فرآیند رسیدگی و پیری را در گوجه‌فرنگی به تاخیر می‌اندازد.

**کلمات کلیدی:** گوجه‌فرنگی، 1-MCP، بیوسنتز اتیلن، بیان ژن و انبارمانی.

مقدمه.....	۲
۱- کلیات .....	۴
۱-۲- خاستگاه .....	۴
۱-۳- ارزش غذایی .....	۴
۱-۴- آمار تولید ایران و جهان .....	۵
۱-۵- گیاهشناسی .....	۵
۱-۶- اثر اتیلن در پس از برداشت محصولات .....	۶
۱-۶-۱- اثرات فیزیولوژیکی اتیلن .....	۶
۱-۶-۲- بیوسنتز اتیلن .....	۸
۱-۶-۳- عوامل موثر بر بیوسنتز اتیلن .....	۱۰
۱-۶-۴- کنترل اتیلن .....	۱۱
۱-۷- 1-MCP و نقش آن در مهار اتیلن .....	۱۱
۱-۸- نقش بسته بندی در عرضه محصولات کشاورزی .....	۱۲
۱-۹- بیان ژن .....	۱۳
۱-۱۰- <b>Real-Time PCR</b> .....	۱۳
۱-۱۱- مواد شیمیایی جهت آشکارسازی در <b>Real- Time PCR</b> .....	۱۴
۱-۱۲- آنالیز داده ها .....	۱۸
۱-۱۳- تعیین بهینه بودن یک آزمایش .....	۱۹
۱-۱۴- منحنی های تکثیر .....	۲۱
۱-۱۵- گزارش داده ها و آمار .....	۲۲
۱-۱۶- سنجش کمی نسبی .....	۲۳
۱-۱۷- نرمال سازی .....	۲۵
۱-۱۸- روش های محاسباتی .....	۲۶
۱-۱۹- کارایی واکنش تکثیر <b>Real- Time qPCR</b> .....	۲۸



۲۹	۱-۲۰- روش رقیق سازی
۳۲	۲- بررسی منابع
۳۲	۲-۱- تاثیر MCP-1 و فیلم پلی اتیلن در پس از برداشت
۳۶	۲-۲- بررسی بیان ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز اتیلن در فیلم‌های بسته‌بندی و MCP-1 در پس از برداشت
۴۲	۳- مواد و روش‌ها
۴۲	۳-۱- زمان و محل اجرای آزمایش
۴۲	۳-۲- نوع و قالب طرح
۴۲	۳-۳- پرورش گوجه‌فرنگی در مزرعه
۴۳	۳-۴- برداشت محصول و اعمال تیمارها
۴۳	۳-۵- اندازه‌گیری صفات فیزیولوژیکی
۴۳	۳-۵-۱- اندازه‌گیری درصد کاهش وزن
۴۴	۳-۵-۲- اندازه‌گیری pH
۴۴	۳-۵-۳- اندازه‌گیری مواد جامد محلول کل
۴۴	۳-۵-۴- اندازه‌گیری سفتی بافت
۴۴	۳-۶- بررسی بیان ژن‌های مسیر بیوسنتز اتیلن
۴۵	۳-۶-۱- استخراج RNA
۴۵	۳-۶-۲- ساخت cDNA
۴۶	۳-۶-۳- طراحی آغازگرها
۴۷	۳-۶-۴- بررسی صحت سنتز آغازگرها
۴۸	۳-۶-۵- انجام واکنش Real-Time PCR
۴۹	۳-۶-۶- استانداردسازی
۴۹	۳-۶-۷- ارزیابی اختصاصی بودن آغازگرها
۵۰	۳-۶-۸- تجزیه داده‌های Real-Time PCR
۵۲	۴- نتایج و بحث

۵۲	۴-۱- نتایج حاصل از صفات فیزیولوژیکی
۵۲	۴-۱-۱- درصد کاهش وزن
۵۴	۴-۱-۲- pH عصاره
۵۷	۴-۱-۳- مواد جامد محلول
۵۹	۴-۱-۴- سفتی بافت
۶۴	۴-۱-۵- همبستگی بین صفات
۶۵	۴-۲- نتایج بیان ژن
۶۵	۴-۲-۱- تغییرات سطوح بیان ژن ACO1
۶۸	۴-۲-۲- تغییرات سطوح بیان ژن ACO5
۷۰	۴-۲-۳- تغییرات سطوح بیان ژن SAM1
۷۲	۴-۲-۴- سطوح بیان ژن ACS4
۷۶	۵- نتیجه‌گیری و پیشنهادات
۷۶	۵-۱- نتیجه‌گیری کلی
۷۸	۵-۲- پیشنهادات
۸۵	منابع:

## فهرست جداول

## شماره صفحه

- جدول ۱-۳- ترکیبات مورد استفاده به منظور حذف DNA ژنومی ..... ۴۵
- جدول ۲-۳- ترکیبات مورد استفاده برای سنتز cDNA در مرحله اول ..... ۴۶
- جدول ۳-۳- ترکیبات مورد استفاده برای سنتز cDNA در مرحله دوم ..... ۴۶
- جدول ۴-۳- آغازگرها و مشخصات آنها ..... ۴۷
- جدول ۵-۳- ترکیبات مورد استفاده در واکنش PCR به منظور تایید سنتز cDNA ..... ۴۷
- جدول ۶-۳- برنامه ترمال سایکلر برای PCR ..... ۴۸
- جدول ۷-۳- ترکیبات مورد استفاده در واکنش PCR زمان واقعی ..... ۴۸
- جدول پیوست ۱- تجزیه واریانس اثرات لاین، تیمار، زمان بر صفات فیزیولوژیکی ارقام گوجه‌فرنگی. ۸۰
- جدول پیوست ۲- همبستگی بین صفات فیزیولوژیکی دو لاین خالص گوجه‌فرنگی ..... ۸۰
- جدول پیوست ۳- مقایسه میانگین برای دو لاین گوجه‌فرنگی ..... ۸۱
- جدول پیوست ۴- مقایسه میانگین برای تیمارهای بسته‌بندی ..... ۸۱
- جدول پیوست ۵- مقایسه میانگین برای زمان های مختلف پس از برداشت ..... ۸۱
- جدول پیوست ۶- مقایسه میانگین اثرات متقابل لاین در تیمار در دو لاین گوجه‌فرنگی ..... ۸۲
- جدول پیوست ۷- مقایسه میانگین اثرات متقابل لاین در زمان در دو لاین گوجه‌فرنگی ..... ۸۲
- جدول پیوست ۸- مقایسه میانگین اثرات متقابل تیمار در زمان در دو لاین گوجه‌فرنگی ..... ۸۳
- جدول پیوست ۹- مقایسه میانگین اثرات متقابل لاین در تیمار در زمان در دو لاین گوجه‌فرنگی ..... ۸۴

- شکل ۱-۱- مسیر بیوسنتر اتیلن ..... ۹
- شکل ۲-۱- تصویر شماتیک از نحوه عمل سایبرگرین در واکنش Real- Time PCR ..... ۱۵
- شکل ۳-۱- تصویر شماتیک از نحوه عمل تک من در واکنش Real- Time PCR ..... ۱۸
- شکل ۱-۴- مقایسه میانگین اثر متقابل لاین در تیمار بر درصد کاهش وزن (مقایسه میانگین با استفاده از آزمون دانکن و در سطح احتمال پنج درصد انجام شده است و علامت بار بر روی نمودارها نشان دهنده SD می باشد) ..... ۵۲
- شکل ۲-۴- مقایسه میانگین اثر متقابل تیمار در زمان بر درصد کاهش وزن (مقایسه میانگین با استفاده از آزمون دانکن و در سطح احتمال پنج درصد انجام شده است و علامت بار بر روی نمودارها نشان دهنده SD می باشد) ..... ۵۳
- شکل ۳-۴- مقایسه میانگین اثر متقابل لاین در تیمار بر pH عصاره (مقایسه میانگین با استفاده از آزمون دانکن و در سطح احتمال پنج درصد انجام شده است و علامت بار بر روی نمودارها نشان دهنده SD می باشد) ..... ۵۵
- شکل ۴-۴- مقایسه میانگین اثر متقابل لاین در زمان بر pH عصاره (مقایسه میانگین با استفاده از آزمون دانکن و در سطح احتمال پنج درصد انجام شده است و علامت بار بر روی نمودارها نشان دهنده SD می باشد) ..... ۵۵
- شکل ۵-۴- مقایسه میانگین اثر متقابل زمان در تیمار بر pH عصاره (مقایسه میانگین با استفاده از آزمون دانکن و در سطح احتمال پنج درصد انجام شده است و علامت بار بر روی نمودارها نشان دهنده SD می باشد) ..... ۵۶
- شکل ۶-۴- مقایسه میانگین اثر متقابل زمان در تیمار بر مواد جامد محلول (مقایسه میانگین با استفاده از آزمون دانکن و در سطح احتمال پنج درصد انجام شده است و علامت بار بر روی نمودارها نشان دهنده SD می باشد) ..... ۵۸
- شکل ۷-۴- مقایسه میانگین اثر متقابل لاین در زمان بر سفتی (مقایسه میانگین با استفاده از آزمون دانکن و در سطح احتمال پنج درصد انجام شده است و علامت بار بر روی نمودارها نشان دهنده SD می باشد) ..... ۶۰

- شکل ۴-۸- مقایسه میانگین اثر متقابل زمان در تیمار بر سفتی (مقایسه میانگین با استفاده از آزمون دانکن و در سطح احتمال پنج درصد انجام شده است و علامت بار بر روی نمودارها نشان دهنده SD می باشد) ..... ۶۱
- شکل ۴-۹- اثر تیمارهای مختلف بر تغییر رنگ دو لاین گوجه فرنگی ..... ۶۳
- شکل ۴-۱۰- منحنی تکثیر (سمت راست) و منحنی ذوب (سمت چپ) در تعدادی از ژن های بررسی شده در تیمارهای مختلف ..... ۶۶
- شکل ۴-۱۱- بیان نسبی ژن ACO1 در تیمارها و مراحل مختلف نمونه برداری (مقایسه میانگین با استفاده از آزمون دانکن و در سطح احتمال پنج درصد انجام شده است و علامت بار بر روی نمودارها نشان دهنده SE می باشد) ..... ۶۸
- شکل ۴-۱۲- بیان نسبی ژن ACO5 در تیمارها و مراحل مختلف نمونه برداری (مقایسه میانگین با استفاده از آزمون دانکن و در سطح احتمال پنج درصد انجام شده است و علامت بار بر روی نمودارها نشان دهنده SE می باشد) ..... ۷۰
- شکل ۴-۱۳- بیان نسبی SAM1 در تیمارها و مراحل مختلف نمونه برداری (مقایسه میانگین با استفاده از آزمون دانکن و در سطح احتمال پنج درصد انجام شده است و علامت بار بر روی نمودارها نشان دهنده SE می باشد) ..... ۷۲
- شکل ۴-۱۴- بیان نسبی ژن ACS4 در تیمارها و مراحل مختلف نمونه برداری (مقایسه میانگین با استفاده از آزمون دانکن و در سطح پنج درصد انجام شده است و علامت بار بر روی نمودارها نشان دهنده SE می باشد) ..... ۷۴



# فصل اول

## مقدمه و کلیات

امروزه از محل تولید تا بازار مصرف یا از زمان تولید تا زمان مصرف فاصله زیادی وجود دارد. بنابراین نیاز به یک فناوری که کیفیت و کمیت میوه و سبزی را پس از برداشت حفظ نماید، لازم است. این فناوری همان فناوری پس از برداشت است (دررودی، ۱۳۹۳). گوجه‌فرنگی *Lycopersicon esculentum Mill* از خانواده *Solanaceae* بومی آمریکا است. از حدود ۶ میلیون تن تولید سالانه گوجه‌فرنگی مقدار ضایعات گوجه‌فرنگی در کشور ۱/۸ میلیون تن است (آمارنامه سازمان جهاد کشاورزی، ۱۳۸۸) که این میزان نشان‌دهنده حجم قابل توجه ضایعات این محصول در کشور است (محمدی ثانی، ۱۳۹۴). گوجه‌فرنگی میوه‌ای فرازگرا است که افزایش قابل توجهی در تنفس و تولید اتیلن نشان می‌دهد (واتکین<sup>۱</sup> و همکاران، ۲۰۰۶). بنابراین حفظ کیفیت این محصول با توجه به تولید بالای اتیلن و نرم شدن میوه بسیار دشوار است. پس برای حفظ تازگی این محصول برای مصرف و صادر کردن، تولید مهارکننده‌های اتیلن بسیار مهم است (ویلز و کیو،<sup>۲</sup> ۲۰۰۲) اتیلن در نقش یک هورمون گیاهی، تنظیم برخی از فرآیندهای گیاهی مانند تنفس، باز شدن گل‌ها، رسیدن میوه و ریزش برگ‌ها را انجام می‌دهد (الکساندر و جریرسون،<sup>۳</sup> ۲۰۰۲). تجمع مقداری اندک از این گاز در هوای انبار، مشکل عمده انبارداری محصولات فرازگرا است و تسریع رسیدن میوه و واکنش‌های ناخواسته مانند افزایش طعم تلخ، زرد شدن سبزی‌های برگ‌ی و افزایش حساسیت آن‌ها را به بیماری‌های انباری به همراه دارد (آبیلز و مورگان، ۱۹۹۲؛ پیسیس،<sup>۴</sup> ۲۰۰۵). طی چند سال اخیر یافتن روش‌هایی برای به حداقل رساندن مصرف ترکیبات مضر و در عین حال حفظ میوه و سبزیجات در انبارهای نگهداری در شرایط مناسب مورد توجه قرار گرفته است که عبارتند از: تهویه هوای انبار، استفاده از پرمنگنات پتاسیم، اتمسفر هیپوبار، اکسندده‌های کاتالیتیک و ازن که البته هریک از این راه‌ها مشکلاتی به همراه دارند (گراهان و همکاران،<sup>۵</sup> ۱۹۹۸)

---

<sup>۱</sup> - Watkins, 2006

<sup>۲</sup> - Will and ku, 2002

<sup>۳</sup> - Alexander and Grierson, 2002

<sup>۴</sup> - Abele and Morgant, 1992.pesis,2005

<sup>۵</sup> - Graham et al.,1998



همچنین استفاده از مهر کننده‌های اتیلن، مانند تیوسولفات نقره (STS) و 1-MCP به عنوان مهر عمل اتیلن مورد بررسی قرار گرفته اند (کیم،<sup>۱</sup> ۲۰۱۰)، ۱- متیل سیکلو پروپین (1-MCP) در تعامل با گیرنده‌های اتیلن مانع از پاسخ‌های وابسته به اتیلن، مانند رسیدن و پیری می‌شود (سیسلر و سرک، ۱۹۹۷؛ واتکین<sup>۲</sup>، ۲۰۰۶). 1-MCP می‌تواند آثاری متفاوت بر تنفس، تولید اتیلن و ترکیبات فرار، تغییر رنگ، ماده خشک، اسیدپتیه، سفتی بافت و سرعت گسترش بیماری‌ها در محصول داشته باشد. بررسی‌ها نشان می‌دهد که کاربرد 1-MCP می‌تواند به یک تکنولوژی جدید در حفظ محصولات کشاورزی تبدیل شود (واتکین و همکاران<sup>۳</sup>، ۲۰۰۶).

### اهداف این تحقیق:

- ۱- بررسی اثر کاربرد فیلم پلی اتیلن و 1-MCP به همراه فیلم پلی اتیلن بر برخی صفات فیزیولوژیکی در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد در دو لاین گوجه‌فرنگی.
- ۲- بررسی اثر کاربرد فیلم پلی اتیلنی و 1-MCP به همراه فیلم پلی اتیلن بر تغییرات بیان تعدادی از ژن‌ها در مسیر بیوسنتز اتیلن.
- ۳- شناسایی ارتباط بین تغییرات بیان این ژن‌ها و رخدادهای فیزیولوژیکی در دوره انبارمانی در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد.

---

<sup>۱</sup> - Kim, 2010

<sup>۲</sup> - Sisler and Serek, 1997 .Watkins, 2006

<sup>۳</sup> - Watkins *et al.*, 2006

## ۱- کلیات

### ۱-۲- خاستگاه

گوجه‌فرنگی با نام علمی *Lycopersicon esculentum* Mill بومی ارتفاعات آمریکای جنوبی است که به صورت خودرو و آلبالویی شکل در آن نقاط می‌روید اهلی کردن گوجه‌فرنگی در مکزیک انجام شده است نام *Lycopersicon esculentum* Mill توسط میلر در سال ۱۳۷۸ تعیین گردید و بعدها به طور جهانی مورد قبول تمام محققین قرار گرفت. میلر جنس *Lycopersicon* را به دو زیر جنس *Eulypersicon* تیپ میوه قرمز و *Eripersicon* تیپ میوه سبز تقسیم بندی کرد. طبق اظهار ریک *Lycopersicon* دارای نه گونه است (پیوست، ۱۳۸۵).

### ۱-۳- ارزش غذایی

گوجه‌فرنگی دارای ویتامین‌های مختلف و مواد معدنی است. میوه دارای مقدار قابل توجهی ویتامین A و اسید اسکوربیک است و مقدار آن‌ها با رسیدن کامل روی بوته افزایش می‌یابد. گوجه‌فرنگی همچنین دارای اسید فولیک، اسید پنتوتنیک، بیوتین، ویتامین K، اسید نیکوتینیک، ریبوفلاوین و تیامین است. مواد جامد محلول میوه شامل قندها و اسیدهای آلی است که از نظر کیفی مهم هستند. قندها که بیش از ۶۰ درصد مواد جامد محلول را تشکیل می‌دهند عبارتند از گلوکز، فروکتوز و مقدار کمی ساکارز و رافینوز. گوجه‌فرنگی نارس دارای مقدار کمی نشاسته است. با رسیدن کامل میوه، فروکتوز و گلوکز میوه افزایش یافته و مقدار اسید مالیک آن کاهش می‌یابد. اسید سیتریک اسید غالب گوجه‌فرنگی است و pH میوه نیز کمتر از ۴/۵ است. میوه‌های نارس دارای مقدار کمی توماتین و سایر آلکالوئیدها بوده که با رسیدن میوه توسط آنزیم‌های میوه به مواد غیرسمی تبدیل می‌شود. گوجه‌فرنگی در مرحله رسیده سبز، دارای آلفا و بتا کاروتن است. بتا کاروتن و لیکوپن به ترتیب ۷ و ۸۷ درصد کارتنوئیدهای گوجه-فرنگی قرمز را تشکیل می‌دهند. رنگ قرمز میوه بستگی به مقدار کارتنوئیدهای کل و نسبت لیکوپن به

بتاکاروتن دارد. غلظت کارتنوئیدهای کل در قسمت بیرونی پریکارپ و غلظت بتاکاروتن در حجره‌های میوه بیشترین است. بعد از مرحله صورتی شدن گوجه‌فرنگی، مقدار بتاکاروتن کاهش می‌یابد (حسن‌دخت، ۱۳۹۱).

## ۱-۴- آمار تولید ایران و جهان

تولید سالانه گوجه‌فرنگی جهان در سال ۲۰۱۶ در حدود ۱۸۰ میلیون تن تخمین زده شده است. کشورهای آسیایی ۵۶ درصد تولید جهانی را تامین می‌کنند. میزان تولید گوجه‌فرنگی در ایران ۶۳۷۲۶۳۳ تن و میزان برداشت ۱۵۹۱۲۳ هکتار با عملکرد ۴۰۰۴۸۴ هکتار در سال ۲۰۱۶ تخمین زده شده است (فائو، ۲۰۱۶).

## ۱-۵- گیاه‌شناسی

گوجه‌فرنگی گیاهی است علفی و یکساله از خانواده بادمجانیان (*Solanaceae*) با کشت مستقیم تولید ریشه عمیق می‌کند و در زمین‌های نرم تا عمق بیش از ۲ متر نیز فرو می‌رود. ریشه اصلی در کاشت نشایی از رشدش کاسته می‌شود. ریشه‌های فرعی ابتدا به صورت افقی رشد کرده و در دراز مدت، نگهداری گیاه را به عهده می‌گیرد. ساقه گوجه‌فرنگی به صورت سیمپودیال (Sympodial) رشد می‌کند. برگ‌ها مرکب و متناوب است. برگ‌ها و ساقه پوشیده از کرک‌های ریز هستند. گل‌ها کامل، همافروdit و پنتامر است. دانه‌های گرده دو تا چهار روز زنده می‌مانند و کلاله ۱۵ تا ۲۰ ساعت قبل از باز شدن گل‌ها در حرارت اپتیمم ۱۸ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد آماده پذیرش می‌شود. گوجه‌فرنگی گیاهی خودگشن است اما ممکن است تحت شرایط مختلف ۱ تا ۴۷ درصد دگرگشنی طبیعی در آن رخ دهد. سیستم خودناسازگاری گامتوفیتی در گونه‌های وحشی مشاهده شده است. میوه گوجه‌فرنگی یک نوع سته است.

گوجه‌فرنگی دارای ارقام متنوعی است و تاکنون بیش از ۱۰۰۰ رقم از آن گزارش شده است (پیوست، ۱۳۸۵).

## ۱-۶- اثر اتیلن در پس از برداشت محصولات

اتیلن ساده‌ترین اولفین شناخته شده با وزن مولکولی ۲۸ بوده و تحت شرایط فیزیولوژیک سبک‌تر از هوا است. اتیلن در اکثر بافت‌های گیاهی سنتز می‌شود و به راحتی در حالت گازی از میان فضاهای بین‌سلولی به بیرون از بافت‌ها منتشر می‌شود. بالاترین سطح تولید اتیلن در بافت‌های پیر یا در میوه رسیده است. اتیلن از نظر بیولوژی حتی در غلظت‌های خیلی پایین‌تر از یک میکرولیتر در لیتر نیز فعال است (رضا درودی، ۱۳۹۳).

## ۱-۶-۱- اثرات فیزیولوژیکی اتیلن

۱) رسیدگی میوه: اضافه نمودن اتیلن به فضایی که میوه‌ها در آن قرار دارند رسیدگی را تسریع می‌کند. این در حالی است که افزایش شدید در تولید اتیلن با شروع رسیدگی میوه مشاهده می‌شود.

۲) رشد گیاهچه: در این حالت رشد طولی کاهش و انشعابات جانبی و رشد عرضی ساقه افزایش می‌یابد به نظر می‌رسد که القای ممانعت از رشد طولی ناشی از اتیلن و افزایش انشعابات جانبی سلول‌ها به علت تغییر در خصوصیات مکانیکی دیواره سلول است.

۳) خواب بذر و جوانه: اتیلن باعث شکستن خواب و آغاز جوانه‌زنی در بذر و پیازها و غده‌ها می‌شود.

۴) پیرشدن گل و برگ: اتیلن عامل پیری در برگ و گل است زیرا که کاربرد بازدارنده‌های تولید و عمل اتیلن باعث افزایش عمر برگ و گل می‌شود.

۵) ریشه‌زایی: بعضی مواقع تعداد زیادی ریشه نابجا روی ساقه می‌روید که نتیجه تسریع تقسیم سلولی در ناحیه لایه زاینده است. این قطعات سلولی، سازمان یافته یک مریستم ریشه را بوجود می‌آورد که به صورت ریشه از ساقه به خارج رشد می‌کند.

۶) ریزش: ریزش برگ بستگی به تشکیل سلولی اختصاصی در ناحیه ریزش درپایه دم‌برگ یا نزدیک به آن دارد. این ناحیه بسته به گونه گیاه ممکن است در اوایل رشد برگ یا بعد از آنکه کاملاً بالغ گردید تشکیل شود. سلول‌های پارانشیمی لایه ریزش اغلب از سلول‌های اطراف کوچکتر است، عناصر آوندی آن کوتاه‌تر بوده و در دسته‌های آوندی ناحیه ریزش فیبر وجود ندارد. این ویژگی‌های تشریحی ناحیه ریزش را به نقطه ضعیفی مبدل می‌کند (رضا دررودی، ۱۳۹۳).

اکسین و اتیلن هر دو در کنترل ریزش برگ دخالت دارند. اکسین ریزش را به تاخیر می‌اندازد ولی اتیلن عامل اصلی ریزش است. البته اکسین در غلظت بالا با تحرک تولید اتیلن می‌تواند عامل ریزش گردد. اتیلن هم ساخته شدن آنزیم سلولاز را سرعت می‌بخشد و هم راه یافتن سلولاز از پروتوپلاست به دیواره را افزایش می‌دهد و بدین طریق محرک ریزش است (رضا دررودی، ۱۳۹۳). اتیلن در تمامی مراحل و نمو بیشتر اندام‌های گیاهی تولید می‌شود. تجمع این گاز و دیگر مواد فرار مانند استالیدی و اتانول در هوای انبار یک مشکل عمده در مرحله انبارداری محصولات کشاورزی و خصوصاً انواع فرازگرای آنها است. وجود مقادیر کم اتیلن در محیط هوای انبارها سبب تسریع رسیدن میوه‌ها می‌شود. واکنش‌های ناخاسته‌ای مانند افزایش طعم تلخ، زرد شدن سبزی‌های برگ‌ی و افزایش قابلیت بیماری‌های انباری را به همراه دارد (آبیلز و همکاران<sup>۱</sup>، ۱۹۹۲). میوه‌های فرازگرا و نافرزگرا از لحاظ الگوی تولید اتیلن و پاسخ به اتیلن با هم متفاوت هستند. میوه‌های فرازگرا دارای یک پیک تولید اتیلن در هنگام رسیدن است که در میوه‌های نافرزگرا این پیک دیده

---

<sup>۱</sup> - Abeles and Morgan, 1992

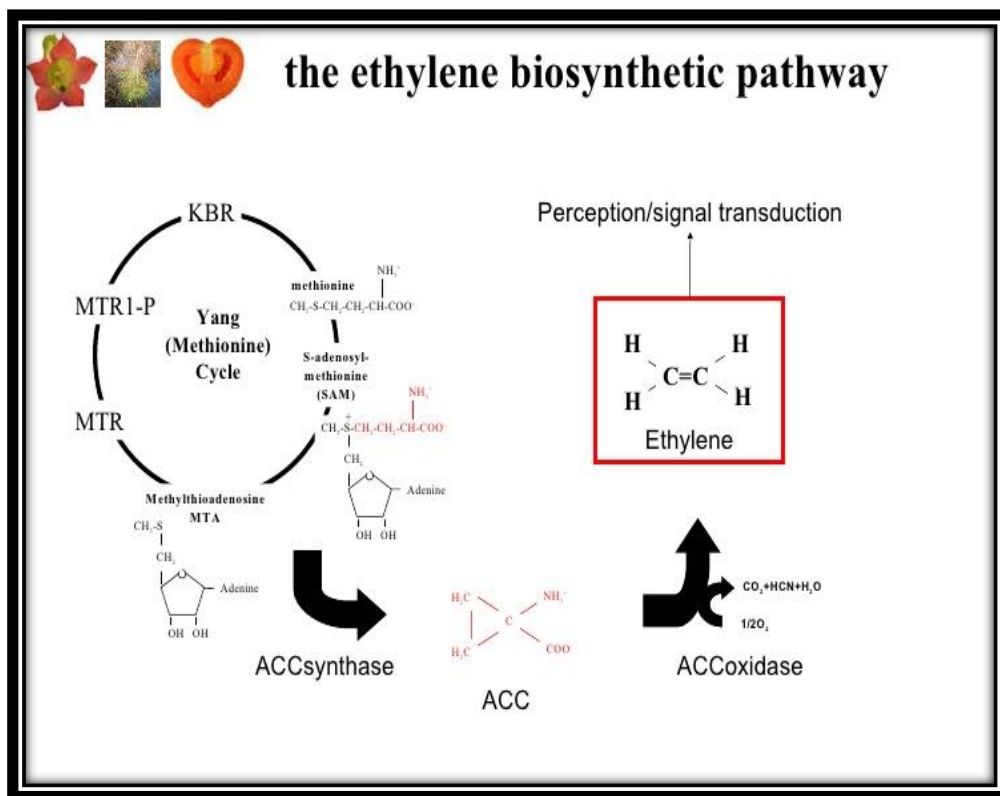
نمی‌شود. در میوه‌های فرازگرا غلظت اتیلن درونی در مراحل مختلف نمو متفاوت است. استفاده از اتیلن خارجی در غلظت کم (۱-۰/۱ میکرولیتر در مدت یک روز) موجب به جلو انداختن پیک تنفسی و تسریع در فرآیند رسیدن در میوه‌های فرازگرا می‌گردد. پیک تولید اتیلن در موز، طالبی، آووکادو و گوجه‌فرنگی قبل از اوج تنفس و در انبه، سیب و گلابی همزمان با اوج تنفس رخ می‌دهد (رضا درودی، ۱۳۹۳). دو سیستم برای تنظیم بیوسنتز اتیلن پیشنهاد شده است. سیستم نخست که به وسیله عاملی ناشناخته آغاز و یا کنترل می‌شود، در تنظیم پیری دخالت دارد، سیستم دوم که به کمک سیستم نخست آغاز می‌شود، در رسیدن میوه‌های فرازگرا دخالت دارد و باعث تولید مقدار زیادی اتیلن برای تکمیل رسیدن کامل میوه می‌شود. سیستم دوم فرآیندی اتوکاتالیزر است، که با تولید اتیلن، تولید بیش‌تر اتیلن را تشدید می‌کند. میوه‌های نافرزگرا سیستم فعال دوم را ندارد و در میوه‌های فرازگرا، کاربرد اتیلن موجب جلو انداختن سیستم نخست می‌شود (راحمی، ۱۳۸۷).

## ۱-۶-۲- بیوسنتز اتیلن

بیوسنتز اتیلن یکی از بهترین مسیرهای مشخص شده برای هر یک از مواد رشد گیاهی شناخته شده است. اولین گام اصلی در مسیر بیوسنتز اتیلن، تشکیل S-Adenosyl-Methionine (SAM) و ACC (Aminocyclopropane-1-carboxylic acid) به عنوان پیش-سازهای اتیلن هستند (یانگ و هافمن<sup>۱</sup>، ۱۹۸۴). آنزیم‌هایی که این واکنش را کاتالیز می‌کنند شناسایی شده و با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی خالص‌سازی شده‌اند. S-Adenosyl-Methionine (S-AdoMet)، پیش‌ساز بیوسنتز اتیلن در گیاهان بوده و به عنوان پیش‌ماده برای بسیاری از مسیرهای بیوشیمیایی شامل بیوسنتز پلی‌آمین‌ها و اتیلن بکار برده می‌شود. علاوه بر این، S-AdoMet در واکنش‌های متیلاسیون که لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک را تغییر می‌دهند، دخیل است. براساس این چرخه، اولین مرحله اختصاصی بیوسنتز اتیلن، تبدیل S-AdoMet به ACC به وسیله

<sup>۱</sup> - Yang and Haffman, 1984

ACC سینتاز است. ACC سینتاز در این واکنش، علاوه بر ACC، ۵-متیل تیوآدنوزین (MTA) نیز تولید می‌کند که بعدها با استفاده از چرخه تغییر متیونین به متیونین تبدیل می‌شود. این مسیر حفاظت شده، گروه متیل لازم برای دوره‌های بعدی تولید اتیلن را نیز فراهم می‌کند. از این رو، اتیلن می‌تواند به طور پیوسته و بدون نیاز به افزایش مخزن متیونین ساخته شود. در نهایت، ACC بوسیله ACC-اکسیداز، اکسیده می‌شود تا اتیلن، دی‌اکسیدکربن و سیانید تشکیل شود که توسط بتا-سیانوآلانین سینتاز به بتا-سیانوآلانین، دتوکسی می‌شود تا مانع سمیت تجمع سیانید در طی سنتز مقادیر بالای اتیلن شود (شکل ۱-۱). پس از سنتز اتیلن، اتیلن درک (حس) شده و پیام‌رسانی آن از طریق سیستم ارسال پیام، پاسخ‌های زیستی خاصی پدید می‌آورد (کیوین و همکاران<sup>۱</sup>، ۲۰۰۲).



شکل ۱-۱- مسیر بیوسنتز اتیلن

<sup>۱</sup> - Kevin et al., 2002

## ۱-۶-۳- عوامل موثر بر بیوسنتز اتیلن

عوامل محرک فعالیت ACC سنتاز و ACC اکسیداز: عواملی از قبیل رسیدن میوه، پیری میوه، زخم، هورمون‌های گیاهی و استرس‌های زیستی و غیر زیستی (آسیب‌های فیزیکی، حمله پاتوژن‌ها) باعث تحریک فعالیت این آنزیم‌ها می‌شوند (دررودی و مددی، ۱۳۹۳). عوامل بازدارنده فعالیت ACC سنتاز: موادی از قبیل آمینو اتوکسی وینیل گلاسیین (AVG)، آمینو اکسی استیک اسید (AOA)، ریزوبیوتوکسین و MVG بازدارنده فعالیت این آنزیم هستند. آنزیم ACC سنتاز دارای کوآنزیم پیریدوکسال فسفات است و علت اثر بازدارندگی AVG و AOA و ریزوبیوتوکسین روی این آنزیم، اثر بر این ویتامین است (دررودی و مددی، ۱۳۹۳). عوامل بازدارنده فعالیت آنزیم ACC اکسیداز: مواردی مانند دمای بالای ۳۵ درجه سانتیگراد، اکسیژن کم، سرمازدگی و یون کبالت اثر بازدارندگی بر این آنزیم دارند. اتیلن مانند بیش‌تر هورمون‌های گیاهی به ترکیباتی موسوم به پذیرنده (Receptor) متصل شده و بدین طریق عمل می‌نماید. پذیرنده‌های اتیلن روی غشاهای سلولی جای گرفته‌اند و ترکیباتی شبه پروتئینی دارای کوفاکتور مس است. اتصال اتیلن به پذیرنده می‌تواند از طریق کوفاکتور مس صورت می‌گیرد. ممانعت از اتصال اتیلن به پذیرنده می‌تواند از عمل اتیلن جلوگیری نماید و عمر پس از برداشت محصولات را افزایش دهد. یون نقره در قالب STS، آلفین‌ها، ۲، ۵-نوربونادین، 1-MCP، دی‌اکسیدکربن و DACP موادی هستند که روی پذیرنده قرار گرفته و از اتصال اتیلن به پذیرنده و در نتیجه عمل اتیلن جلوگیری می‌کنند. STS به لحاظ ایمنی مناسب نبوده و در مواد غذایی کاربرد ندارد و استفاده از آن به گل‌های زینتی محدود شده است، البته امروزه استفاده از STS در گل‌ها نیز مورد تردید واقع شده است (دررودی و مددی، ۱۳۹۳).



## ۱-۶-۴- کنترل اتیلن

روش هایی که در حال حاضر برای کنترل اتیلن انبارها متداول است عبارتند از: تهویه هوای انبار، استفاده از پرمنگنات پتاسیم، اتمسفر هیپوبار، اکسنده های کاتالیتیک و ازن. البته هر یک از این راه ها دارای مشکلاتی هستند. مثلاً هوادهی علیرغم نیازمندی به ادوات زیاد قادر به خارج کردن مقادیر کم اتیلن نیست. پرمنگنات سمی است و نیازمند تعویض مداوم است. اکسنده های کاتالیتیک نیازمند گرم کننده هستند تا اتیلن و اکسیژن را به آب و دی اکسید کربن تبدیل و هوای گرم شده انبار را دوباره سرد کند. انبارهای هیپوباریک موثر ولی بسیار گراندند. ازن هم اگرچه یک اکسنده بسیار پر قدرت است، اما به دلیل آنکه به بافت گیاه و میوه آسیب می زند، بافت را مجدداً برای تولید اتیلن تحریک می کند (باتو<sup>۱</sup>، ۲۰۰۴).

## ۱-۷- 1-MCP و نقش آن در مهار اتیلن

طی چند سال اخیر یافتن روش هایی برای به حداقل رساندن مصرف ترکیبات مضر و در عین حال حفظ میوه ها و سبزی ها در انبارهای نگهداری در شرایط مناسب مورد توجه قرار گرفته است. کاربرد ۱- متیل سیکلو پروپان (1-MCP) یکی از آخرین روش ها در این مورد است. 1-MCP یک سیکلوآلکن با فرمول مولکولی  $C_4H_6$  و مشتق از سیکلو پروپان است که به عنوان تنظیم کننده رشد گیاهی استفاده می شود، این گاز در دمای معمولی فرار و دارای نقطه جوش ۱۲ درجه سانتی گراد است. مکانیسم عمل 1-MCP ارتباط تنگاتنگی با گیرنده های اتیلن در گیاه و احتمالاً بلوک کردن آن ها در برابر اثرات اتیلن دارد (دیلی و شلتر<sup>۲</sup>، ۲۰۰۱) استفاده های عمده تجاری برای 1-MCP عبارتند از: ۱- حفظ تازگی گیاهان تزئینی و گل های شاخه بریده ۲- ممانعت از رسیدن طیف

<sup>1</sup> - Batu, 2004

<sup>2</sup> - Daly and Schluter, 2001

وسیع‌تری از میوه‌ها. غلظت موثر MCP-1 کم و در حدود ۲/۵ تا ۱۵۰۰ نانو لیتر است. این ماده می‌تواند به صورت ترکیب با دیگر مواد و سپس ممزوج شدن با مقدار معینی آب و در نهایت آزاد شدن تدریجی در هوای اطراف محصول به کار رود MCP-1 در کولرهای آبی، تاسیسات نگهداری و حمل محصولات کشاورزی، گلخانه‌ها و حتی در سطح خرده‌فروشی می‌تواند قابل استفاده باشد (دیلی و شلتر، ۲۰۰۱).

## ۸-۱- نقش بسته‌بندی در عرضه محصولات کشاورزی

بسته‌بندی عبارت است از هنر و علم آماده سازی مواد غذایی برای انبار کردن و در نهایت فروش. بسته‌بندی باید تا حد امکان ساده و ارزان باشد. ضمن اینکه اهداف اولیه بسته‌بندی یعنی خاصیت حفاظتی و جذابیت را نیز دارا باشد (اسکوت و همکاران،<sup>۱</sup> ۲۰۰۳). بسته‌بندی در اتمسفر تغییر یافته (MAP)، فرآیند دینامیکی فعال یا غیرفعال تغییر ترکیب گازی در داخل یک بسته است که بر تعامل بین سرعت تنفس محصول و انتقال گازها از طریق مواد بسته‌بندی متکی است (کالاب و همکاران<sup>۲</sup>، ۲۰۱۲) خواص مطلوبی که در پوشش‌های بسته‌بندی مهم هستند عبارتند از: شفافیت، میزان نفوذپذیری محصول نسبت به بخار آب و گازها از جمله اکسیژن (کوزما،<sup>۳</sup> ۲۰۰۶). انبارداری میوه‌ها و سبزیجات با استفاده از فیلم‌های بسته‌بندی منجر به حفظ کیفیت و افزایش عمر مفید محصولات می‌شود، که در نتیجه کاهش سرعت واکنش‌های شیمیایی و رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا را در پی دارد (ازتورک و همکاران<sup>۴</sup>، ۲۰۱۶). افزایش استفاده از فیلم‌های بسته‌بندی پلیاستیکی مانند پلی اتیلن با دانسیته کم (LDPE)، پلی وینیل کلرید (PVC) و پلی پروپیلن (PP)، برای میوه‌های تازه و سبزیجات به علت انعطاف پذیر بودن از مهم‌ترین پوشش‌ها هستند، این مواد

<sup>۱</sup> - Scott *et al.*, 2003

<sup>۲</sup> - Caleb *et al.*, 2012

<sup>۳</sup> - Kuzma, 2006

<sup>۴</sup> - Ozturk, 2116

به طور کلی شفاف هستند، مانع انتقال بخار آب می‌شوند و در نفوذپذیری گاز CO<sub>2</sub> به O<sub>2</sub> بسیار انتخابی عمل می‌کنند (لی و همکاران،<sup>۱</sup> ۱۹۹۶).

## ۹-۱- بیان ژن

روش‌های مختلفی جهت بررسی تغییرات ناشی از تاثیر تنش‌های مختلف زیستی و غیر زیستی در فرایند زیستی یک سلول وجود دارد. یکی از روش‌ها، بررسی تغییرات میزان رونوشت‌های سلولی است که می‌تواند تغییرات پروتئین‌های مرتبط با آن رونوشت‌ها را تعیین کند. در حالت دیگر، ممکن است حضور یا عدم حضور یک پاتوژن ویروسی یا باکتریایی مورد بررسی قرار گیرد. در این موارد تنها شناسایی پاتوژن ملاک نمی‌باشد، بلکه تعیین میزان (سطح) پاتوژن اطلاعات مفیدی در طراحی یک روش درمانی مهیا می‌سازد. در تمامی موارد ذکر شده فناوری Real-Time PCR کمی می‌تواند اطلاعات مورد نیاز را فراهم سازد (مهدیان و همکاران، ۱۳۹۳).

## ۱-۱۰- Real-Time PCR

هر دستگاه Real-Time PCR از سه بخش تشکیل شده است: ۱- منبع نور<sup>۲</sup>، که طیف رنگ‌های گزارش‌گر استفاده شده توسط دستگاه را تعیین می‌کند، ۲- سیستم آشکارساز<sup>۳</sup>، که طیف نوری و حساسیت هر نمونه آزمایشی را تعیین خواهد کرد، ۳- ترمال سایکلر<sup>۴</sup>، که سرعت انجام آزمایش، یکنواختی تغییرات دمایی از یک نمونه به نمونه دیگر و نمونه‌هایی که همزمان مورد آزمایش قرار می‌گیرند را تعیین می‌کند. در حال حاضر چهار نوع منبع نوری متفاوت در دستگاه Real-Time PCR وجود دارد که عبارتند از: لیزر یون- آرگون، لیزرهای LED، لامپ‌های کوارتز- هالوژن- تنگستن و

<sup>۱</sup> - Lee et al., 1996

<sup>۲</sup> - Source Light

<sup>۳</sup> - Detection system

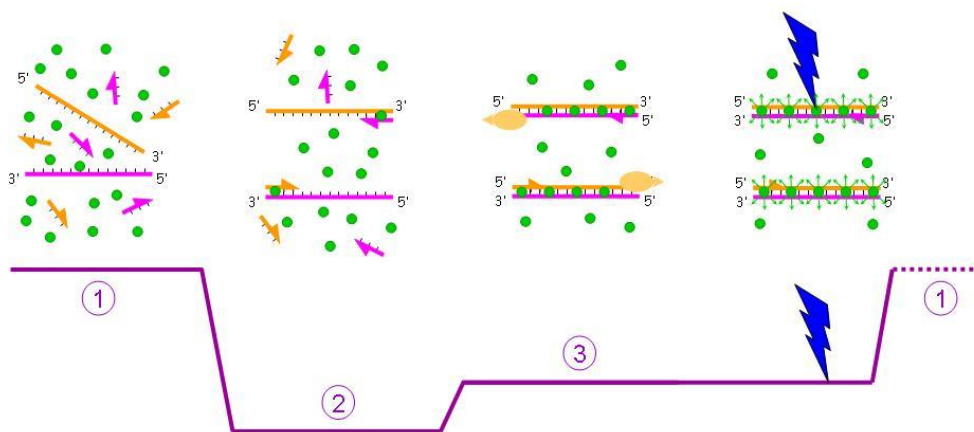
<sup>۴</sup> - Thermal cyler

لامپ‌های گزنون. استفاده از هر یک از این منابع نوری، قابلیت‌های ویژه‌ای را به دستگاه Real-Time PCR می‌دهند. علاوه بر بخش سخت‌افزاری دستگاه، مهم‌ترین جزء یک دستگاه Real-Time PCR بسته نرم‌افزاری می‌باشد. یک دستگاه با سخت‌افزار خوب اما با بسته نرم‌افزاری ضعیف می‌تواند دقت و مهارت کاربران را کاهش دهد. اگر چه برخی از بسته‌های نرم‌افزاری سطوح متفاوتی از آنالیز اطلاعات را به صورت اتوماتیک ارائه می‌دهد، اما بایستی ذکر شود که نتایج حاصل از روش اتومات به خوبی و مشابه تنظیمات دستی (آستانه و خط پایه) توسط کاربران باشند. بیش تر برنامه‌ها، روش‌هایی را برای استخراج اطلاعات خام به درون یک فایل (که می‌تواند با برنامه Excel مایکروسافت باز شود) و شکل‌ها و گراف‌ها را به درون فایل دیگری (که با یک یا چند فرمت گرافیکی می‌تواند باز شود) ارائه می‌دهند. این چنین روش‌هایی می‌توانند برای آنالیز اطلاعات (داده‌های) بسیار ارزشمندی در برنامه‌های دیگر و یکسان سازی اطلاعات یا اشکال در انتشارات (مقاله و کتاب) و ارائه مطالب (همایش‌ها) بسیار مفید باشند. به همین منظور، ضروری است که کاربران همه جوانب نرم‌افزار را جهت فراهم کردن اطلاعات اضافی از دستگاه Real-Time PCR مورد بررسی قرار دهند (مهدیان وهمکاران، ۱۳۹۳).

## ۱۱-۱- مواد شیمیایی جهت آشکارسازی در Real-Time PCR

جهت شناسایی و آشکارسازی مولکول‌های DNA و یا RNA از سه نوع رنگ فلورسانت استفاده می‌شود. در هر روش سیگنال فلورسانتی ضعیف اولیه طی هر سیکل PCR و با تکثیر محصول DNA به صورت تصاعدی افزایش می‌یابد. ساده‌ترین سیستم ارزیابی و شناسایی، استفاده از یک رنگ فلورسانت آزاد است که می‌تواند به مولکول DNA دو رشته‌ای متصل شود. معروف‌ترین رنگ با این ویژگی، رنگ سایبرگرین است. اگر رنگ سایبرگرین در محل واکنش به صورت آزاد و بدون اتصال به مولکول DNA باشد، با تحریک این رنگ، سیگنال فلورسانتی ضعیفی گسیل می‌شود. این امر مشابه استفاده از اسیدهای نوکلئیک تک رشته‌ای به عنوان الگو در Real-Time PCR است. وقتی که مولکول DNA سنتز شود و به صورت دو رشته‌ای درآید، رنگ سایبرگرین به شیار کوچک مولکول DNA دو رشته‌ای متصل می‌شود.

کمپلکس رنگ DNA منجر به افزایش سیگنال فلورسانت گسیل شده تا ۲۰۰ برابر خواهد شد (شکل ۱-۲). در سیستم (روش) سایبرگرین، نسبت سیگنال فلورسانتی گسیل شده به سیگنال پارازیت، بسیار بالا و در حد مطلوب است. به سه دلیل از رنگ سایبرگرین در Real-Time PCR استفاده می‌شود: ۱- ارزانی قیمت، ۲- انجام آزمایش تنها با جفت پرایمر (سهولت کار) و ۳- استفاده از روش‌های شناسایی مشابه برای هر آزمایش. در واکنش‌های Real-Time PCR با استفاده از رنگ سایبرگرین، هر محصول DNA دو رشته‌ای ساخته شده نظیر جفت شدن پرایمرها (پرایمر- دایمر) و محصولات غیراختصاصی یک سیگنال فلورسانتی تولید می‌کنند. بنابراین بایستی از پرایمرهای بسیار اختصاصی (مناسب) و مواد با کیفیت استفاده شود. به این منظور آنزیم DNA پلیمراز هات-استارت جهت حذف یا کاهش سیگنال-های اضافی به کار می‌رود.



شکل ۱-۲ - تصویر شماتیک از نحوه عمل سایبرگرین در واکنش Real-Time PCR

در آزمایشات Real-Time PCR از رنگ فلورسانت دیگری به نام اواگرین استفاده می‌شود که گران‌تر از رنگ سایبرگرین است و غلظت‌های بالای آن (برخلاف سایبرگرین) بر واکنش PCR اثر مهاری ندارد. همچنین میزان سیگنال فلورسانت گسیل شده توسط رنگ اواگرین بسیار بیش‌تر از رنگ سایبرگرین است. ویژگی‌های بارز این رنگ نسبت به سایبرگرین کاربران را جهت استفاده بیش‌تر از آن ترغیب

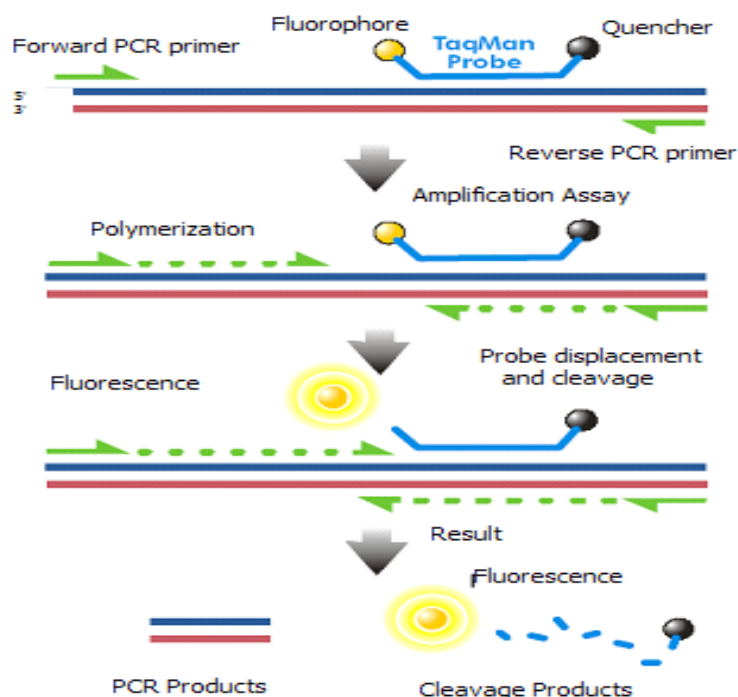
می‌نماید. سومین رنگ آزاد، رنگ بوکستو است که در بازار موجود می‌باشد. رنگ BOXTO در طول موج‌های بلندتری نسبت به سایبرگرین و اواگرین تحریک شده و نور گسیل می‌دهد. بنابراین این رنگ می‌تواند در واکنش‌های توام با پروب‌های متصل به FAM جهت شناسایی پرایمر دایمر یا آنالیز منحنی ذوب محصولات PCR به کار رود، در حالی که امکان بررسی هیچ یک از رنگ‌های قبل با پروب (به طور همزمان) وجود ندارد. چهارمین رنگ فلورسانت، رنگ ال سی گرین و ال سی گری پلاس هستند. در Real- Time PCR سیستم‌های سیگنال‌دهی (سیگنالینگ) متفاوتی بر مبنای پرایمر-رنگ وجود دارد. این سیستم‌ها شامل دامنه گسترده‌ای از پرایمرهای بسیار ساده مانند LUX (گسیل نور بر مبنای باز شدن ساختار) تا پرایمرهای مهاری پیچیده داخلی و خارجی و پرایمرهای عقربی بسیار پیچیده هستند. میزان اختصاصیت الگو در آزمایشات پرایمر-رنگ مشابه سایبرگرین است. برخلاف روش‌های سایبرگرین، اواگرین و BOXTO، روش‌های سنجش پرایمر-رنگ امکان آنالیز همزمان چند واکنشی در تیوب را مسیر می‌سازد و نیاز به طراحی پروب نشاندار نمی‌باشد. در انتهای ۵' پرایمرهای LUX، چهار تا شش باز ممتد (متوالی) وجود دارد که با توالی درونی و نزدیک به انتهای ۳' مکمل هستند. باز شدن پرایمر منجر به آزاد شدن موقعیت باز متصل به رنگ فلئورسین (FAM یا JOE) در انتهای ۳' پرایمر می‌شود. وقتی که پرایمرهای LUX در محلول واکنشی قرار دارند مولکول فلورسانت گزارشگر در مجاورت ساقه دو رشته‌ای تشکیل شده در پرایمر قرار می‌گیرد در نتیجه سیگنال فلورسانتی آن خاموش می‌شود. خاموش شدن سیگنال فلورسانت زمانی بیش‌تر می‌شود که مولکول گزارشگر در نزدیک یک باز گوانیدین قرار گیرد. طی اولین سیکل PCR پرایمر LUX به دو رشته الگو متصل می‌شود. در این لحظه ساختار سنجاق سر هنوز پایدار است. با این وجود در هنگام سنتز رشته جدید، ساختار سنجاق سر کاملاً باز شده و به صورت خطی در می‌آید. تغییر در ساختار پرایمر منجر به افزایش سیگنال فلورسانت تا ده برابر سیگنال زمینه می‌شود. سومین روش سیگنال‌دهی در تکنیک Real- Time PCR، الیگونوکلوئید نشاندار فلورسانتی است که در بین پرایمرها قرار می‌گیرد. این الیگونوکلوئید نشاندار، پروب نام دارد. بر خلاف روش‌های ذکر شده که تنها شامل یک جفت پرایمر هستند، در سیستم سنجش بر پایه پروب، علاوه

بر پرایمرها یک یا دو الیگونوکلوئوتید دیگر به نام پروب وجود دارد. پروب یک ترکیب نشاندار فلورسانتی است که در روش سنجش بر پایه پروب از آن استفاده می شود. مهم ترین مزیت این روش عدم شناسایی و آشکارسازی سیگنال های مربوط به جفت شدن پرایمرها (پرایمر - دایمر) است که در روش های پرایمر - رنگ و سیستم رنگ آزاد شناسایی می شوند. علاوه بر این سیگنال های مربوط به محصولات DNA غیراختصاصی بزرگتر از پرایمر - دایمر نیز شناسایی و آشکار نمی شوند. در روش سنجش بر پایه پروب تنها قطعه ای از مولکول DNA که پرایمرها و پروب های اختصاصی به آن متصل می شوند، قابل شناسایی هستند. در حال حاضر، از پنج پروب متفاوت در روش سنجش بر پایه پروب استفاده می شود، که شامل پروب های تک من<sup>۱</sup> (شکل ۱-۳)، بیگون های مولکولی، پروب های متصل شونده به شیار کوچک DNA، پروب های متصل شونده به اسید نوکلئیک و پروب های هیبریدی هستند. برای هر نوع پروب می توان از چند رنگ گزارشگر به همراه خاموشگرهای متفاوت جهت تشکیل اجزای FRET استفاده کرد، بنابراین می توان حالت های مختلف را به صورت مالتی پلکس (چندتایی) در روش سنجش بر پایه پروب آنالیز کرد. پروب های هیدرولیزی تک من، الیگونوکلوئوتیدهای خطی هستند که معمولا با یک مولکول گزارشگر در انتهای ۵' و یک مولکول خاموشگر در انتهای ۳' نشاندار شده اند. محل مولکول گزارشگر و خاموشگر می تواند عوض شود. هنگامی که مولکول گزارشگر و خاموشگر در نزدیکی یکدیگر قرار دارند، سیگنال مولکول گزارشگر خاموش می شود. میزان (شدت) خاموش شدن سیگنال فلورسانت به توالی پروب و دو انتهای آن بستگی دارد. هنگامی که پروب به توالی هدف مکمل خود متصل می شود، مولکول های گزارشگر و خاموشگر از یکدیگر جدا شده و سیگنال فلورسانت توسط دستگاه شناسایی آشکار می شود. هیبرید شدن و اتصال پروب های به توالی رشته هدف بایستی قبل از اتصال پرایمرها صورت گیرد. این امر منجر به تولید سیگنال فلورسانتی قوی از هر قطعه تکثیری می شود (کینزینگر<sup>۲</sup>، ۲۰۰۲).

---

<sup>۱</sup>-Tag man

<sup>۲</sup>- Ginziger, 2002



شکل ۱-۳ تصویر شماتیک از نحوه عمل تک من در واکنش Real- Time PCR

## ۱-۱۲- آنالیز داده‌ها

آنالیز مناسب داده‌ها در به دست آوردن نتایج دقیق و مرتبط از هر سیستم آزمایشگاهی بسیار ضروری و لازم است (به ویژه در تعیین میزان تفاوت‌های بین مولکول‌های رونوشت شده). مقدار مولکول DNA در هر سلول و در طول زندگی موجود ثابت و پایدار است در حالی که مولکول RNA به طور گذرا بیان می‌شود و میزان آن متغییر است. یادآوری می‌شود که بیان مولکول mRNA همیشه دال بر بیان پروتئین نیست و بیان پروتئین همیشه دال بر عملکرد آن نمی‌باشد. صرف نظر از هر دستگاهی که آزمایش Real- Time PCR کمی را انجام می‌دهد بایستی شرایط پایه و اصلی نیز برقرار باشند. برای انجام هر آزمایشی مناسب بایستی تمام معیارها مهیا باشد. در ترسیم منحنی استاندارد با استفاده از یک الگوی معین نتایجی نظیر شیب خط، ضریب تعیین<sup>۱</sup> ( $R^2$ ) و عرض از مبدا<sup>۲</sup> (Y) حاصل می‌شوند که بیانگر دقت، حساسیت و کارایی یک واکنش می‌باشند. در آزمایشات بایستی خط پایه (زمینه) و خط آستانه

<sup>۱</sup> - Coefficient of Determination

<sup>۲</sup> - Intercept



به طور مناسبی تنظیم گردند. منحنی تکثیر بیانگر تکثیر تصاعدی و محدودیت‌های شناسایی (آشکارسازی) دستگاه می‌باشد. نمونه کنترل مناسب، آلودگی و حساسیت هر آزمایش را نشان می‌دهد که در صورت امکان بایستی آلودگی با DNA ژنومیک مشخص شود. گزارش داده‌ها به گونه‌ای می‌باشد که تفاوت در نتایج را نشان می‌دهد. در تجزیه و تحلیل نهایی داده‌ها از آنالیز آماری مناسب استفاده می‌شود. آنالیزها بر اساس تجزیه و تحلیل‌های دقیق اولیه بعد از آزمایش انجام می‌شود. بنابراین ابتدا بایستی درستی و نادرستی نمونه‌های آزمایش Real- Time PCR قبل از هرگونه تفسیر ممکن نتایج مشخص شود. سیکل آستانه (CT)، سیکلی از PCR است که شدت رنگ فلورسانت نمونه نسبت به رنگ فلورسانت زمینه افزایش می‌یابد. این سیکل به نقطه برخورد (CP) نیز معروف است. یک سیکل آستانه مثبت بیانگر تکثیر واقعی است در حالیکه برخی از سیکل‌های آستانه منجر به تکثیر واقعی نمی‌شود. سیکل آستانه از طریق تنظیمات خط پایه و خط آستانه تعیین می‌شود و ممکن است کاربر تنظیمات اولیه نرم‌افزار را تغییر دهد. در اکثر موارد جهت موازنه کردن تفاوت‌های بین چاهک‌ها، سیگنال گزارشگر نسبت به رنگ مرجع نرمالیزه می‌شود (نوسعید و همکاران<sup>۱</sup>، ۲۰۰۹).

## ۱-۱۳- تعیین بهینه بودن یک آزمایش

اگر مقدار DNA الگو بر حسب مولکول باشد از فرمول زیر می‌توان تعداد سیکل‌های لازم جهت تکثیر (تولید) تعداد مشخصی از مولکول‌ها را محاسبه کرد:

$$n = \log(Nn) - ([\log(N0)] / [\log(1+E)])$$

$N0$  = تعداد کپی الگو در سیکل صفر،  $Nn$  = تعداد کپی‌های الگو بعد از  $n$  سیکل،  $n$  = تعداد سیکل‌ها،  $E$  =

کارایی PCR

<sup>۱</sup> - Nosaeid, 2009

اگر آستانه شناسایی سیگنال فلورسانتی FAM آزاد در اکثر زمینه‌ها  $10^{10}$  تا  $10^{11}$  مولکول و میزان کارایی واکنش صددرصد فرض شود شناسایی سیگنال فلورسانتی مربوط به DNA تک نسخه‌ای بین سیگنال  $33/3$  تا  $36/5$  صورت می‌گیرد. بنابراین در یک آزمایش بهینه، شیب DNA خط منحنی استاندارد  $3/32$  - (کارایی تکثیر صددرصد) عرض از مبدا بین سیکل‌های  $33$  تا  $37$  و ضریب تعیین برابر  $1$  می‌باشد. هرگاه شیب خط منحنی استاندارد افزایش یابد (منفی‌تر) میزان کارایی واکنش کاهش و مقدار عرض از مبدا افزایش می‌یابد. در این حالت حساسیت واکنش کم می‌شود زیرا به تعداد کپی‌های بیش‌تری از الگو جهت رسیدن به آستانه شناسایی لازم است. به عبارتی دیگر شناسایی تعداد یکسانی از مولکول‌های الگو در سیکل‌های بالاتر امکان پذیر خواهد شد. در بررسی ژن‌هایی که بیان پایینی دارند این امر یک نقص بارز محسوب می‌شود. میزان کارایی واکنش تنها مقیاس ضروری در سنجش کیفیت واکنش نمی‌باشد. ممکن است در یک واکنش میزان کارایی تکثیر قابل قبول و  $95-100$  درصد باشد اما عرض از مبدا آن کمتر از  $33$  و یا بیش‌تر از سیکل  $37$  باشد. این حالت نشان می‌دهد که مقدار الگو به درستی تعیین نشده است. در مواردی که عرض از مبدا بالاست مقدار DNA الگو کم و کیفیت آن پایین است. تجزیه مولکول‌های DNA الگو در اثر تغییرات زیادی دمایی طی سیکل‌های PCR و یا نگهداری نمونه در غلظت‌های بسیار کم بدون مولکول ناقل صورت می‌گیرد. هرگاه واکنش مورد مطالعه با استفاده از منحنی استاندارد معتبر شود. سپس می‌توان با بررسی کارایی واکنش، از مولکول DNA مکمل یا RNA استاندارد در بهینه کردن مراحل آماده سازی نمونه و واکنش رونویسی معکوس استفاده کرد. البته در واقع هیچ آزمایشی بدون نقص و کامل نمی‌باشد با این وجود بایستی جهت بهبود آزمایش و یا حداقل جهت شناسایی نقایص سعی شود (کامیاب و همکاران<sup>1</sup>، ۲۰۱۲).

---

<sup>1</sup> - Kamyab et al., 2012

## ۱-۱۴- منحنی‌های تکثیر

قبل از هر نوع آنالیزی، ابتدا منحنی‌های تکثیر تجزیه و تحلیل خواهد شد. این پارامتر بر اساس لایه رنگی مشخص یا گزارشگر طراحی شده بررسی می‌شود. در ابتدا آنالیز این پارامتر ساده و آسان به نظر می‌رسد، در حالی که اگر هیچ منحنی تکثیری ترسیم نشود یا منحنی‌های عجیب مشاهده شود، آنالیز دشوار خواهد شد. این مشکل زمانی رخ می‌دهد که چندین کاربر از دستگاه Real- Time PCR استفاده می‌نمایند و یا از نمونه‌ها DNA الگو تکراری استفاده شود. نتایج حاصل از انتخاب الگوی مناسب و لایه رنگی اشتباه می‌تواند به صورت شدید و اساسی نمایان شود به گونه‌ای که منجر به کاهش شدید منحنی‌های تکثیر در بالای خط آستانه می‌شود. تنها با بررسی لایه رنگی صحیح انتخاب شده اختلاف آشکار خواهد شد. جهت کاهش احتمال انتخاب لایه رنگ اشتباه، کامپیوتر متصل به دستگاه Real- Time PCR برای هر آزمایش در حالت ری‌بوت قرار می‌گیرد که پارامترهای نرم‌افزار و الگو را به حالت اولیه بر می‌گرداند. در صورت مشاهده منحنی‌های تکثیری غیرعادی و خط آستانه غیر معمول چه باید کرد؟ این حالت در دستگاه Real- Time PCR مدل ABI ۷۷۰۰ زمانی رخ می‌دهد که چاهک‌ها فاقد رنگ فلورسنت باشند. این حالت می‌تواند در نتیجه انتخاب اشتباهی چاهک‌ها مورد نظر حاوی آب یا فاقد مواد واکنشگر باشد. با انتخاب چاهک‌ها و مشاهده منحنی طیف جذبی خام می‌توان چاهک‌های اشتباه را شناسایی کرد. این چاهک‌ها پس از انجام ۴۰ سیکل تکثیر قابل شناسایی هستند. چاهک‌های خالی (فاقد مواد واکنش‌گر) منحنی فلورسنتی صاف دارند. عدم سیگنال فلورسانت رنگ مرجع و یا رنگ پروب از طریق بررسی هریک از چاهک‌ها در بخش چند ترکیبی مشخص می‌شود که بیانگر فلورسانس خام هر چاهک است. این مشکل با حذف چاهک‌ها و آنالیز دوباره داده‌ها بدون چاهک‌های بلانک (فاقد مواد واکنش‌گر) قابل حل می‌باشد. در نهایت منحنی‌ها کاملاً استاندارد و قابل قبول خواهند بود (مهدیان وهمکاران، ۱۳۹۳).

## ۱-۱۵- گزارش داده‌ها و آمار

در آزمایشات Real- Time PCR حجم عظیمی از متغیرها وجود دارد که عبارتند از پروسه‌های کاری دشوار، روش‌های استخراج اسیدنوکلئیک، واکنش رونویسی معکوس، شرایط PCR، مواد و ترکیبات واکنش و غیره حاصل می‌شود. به همین دلیل گزارش داده‌ها و آمار از مراحل بسیار مهم در آماده سازی نتایج برای ترسیم نمودارها می‌باشد. ارائه داده‌ها به نوع مطالعه بستگی دارد. برای مثال در روش‌های تجربی ممکن است بیان نسبی ژن را قبل و بعد از تیمار، نرمال نسبت به تومور، مطالعه دوره‌ای برحسب زمان، پاسخ به التهاب یا بیماری بررسی کنند. ممکن است آزمایشات دیگر مقدار یا سوش ارگانسیم‌های موجود در غذا، آب و یا محیط را سنجش می‌نمایند. بررسی صحت و اعتبار نتایج حاصل از siRNA و ریز آرایه‌ها از کاربردهای متداول و عمومی روش Real- Time PCR است. صرف نظر از نوع آزمایش، بایستی داده‌ها به صورتی نمایش داده شوند که مقدار انحراف آزمایش برای مخاطب مشهود باشد، برای مثال میانگین انحراف از استاندارد و ضریب اختلاف. برخی از آنالیزهای آماری بایستی به منظور آگاهی مخاطب از احتمال تفاوت معنی‌دار بودن انجام شود. اکثر آزمایشات Real- Time PCR بر اساس فرضیه آزمون می‌باشند. احتمال انتخاب تصادفی نمونه‌هایی که نسبت به نمونه‌های مشاهده شده تفاوت بیشتری دارند، چقدر است؟ در برخی شرایط تفاوت در داده‌ها بارز و نیازی به آنالیزهای آماری نمی‌باشد. با این حال به دلیل انحراف و عدم دقت تجربی در سیستم‌های بیولوژیکی، گاهی اوقات آمار می‌تواند تفاوت‌های نامحسوس را نشان دهد به ویژه زمانی که حجم عظیمی از اطلاعات و داده‌ها وجود دارد. بنابراین بایستی در یک آزمایش، آنالیزهای آماری قرار گیرد و مطالعات بیشتر توسط یک متخصص آمار انجام شود (مهدیان وهمکاران، ۱۳۹۳).

## ۱-۱۶- سنجش کمی نسبی

نسخه برداری معکوس و به دنبال آن واکنش زنجیره پلی‌مراز، تکنولوژی قدرتمندی است که امکان تکثیر و شناسایی مقادیر ناچیز از mRNA را فراهم می‌آورد. روش کمی Real-Time Reverse Transcription-PCR روش منتخب برای اندازه‌گیری این مقادیر کم بیان ژن‌ها در هر ماتریکس بیولوژیکی است. این روش در مقایسه با روش‌های کمی مزایای متعددی نظیر حساسیت و اختصاصیت بالا، تکرار پذیری مناسب، دامنه کمی و دینامیکی گسترده دارد. از تکنیک qRT-PCR به عنوان حساسترین و قابل اعتمادترین روش جهت سنجش مقادیر کم رونویس‌ها (مانند بافت‌هایی که تعداد کپی RNA در آنها کم است، نمونه‌های RNA تخریب شده و یا مقادیر ناچیز بافت) می‌باشد. با توجه به پتانسیل چشم‌گیر این روش در آنالیز و اندازه‌گیری، درک جامع از اصول پایه این روش بسیار مهم است. صحت واکنش‌ها و قابل اعتماد بودن نتایج بستگی به استاندارد بودن مراحل پیش از آنالیز دارد. این مراحل شامل نمونه‌گیری از بافت و نگهداری آن، استخراج RNA و نگهداری آن، بهینه‌سازی واکنش PCR و RT، پردازش دقیق داده‌ها پس از PCR (جمع‌آوری داده‌ها، ارزیابی، محاسبه و آمار) می‌باشند. دو روش اندازه‌گیری کمی در qRT-PCR استفاده می‌شود. میزان ژن‌های بیان شده را می‌توان با روش مطلق یا نسبی سنجش نمود. در اندازه‌گیری مطلق سیگنال‌های PCR نسبت به تعداد کپی‌ها در یک منحنی کالیبراسیون بیان می‌شوند. منحنی کالیبراسیون می‌تواند براساس محصول DNA، PCR یا RNA خطی و یا نمونه‌های بافتی ترسیم شود. قابل اعتماد بودن سنجش‌های مطلق به همسان بودن کارایی تکثیر mRNA هدف و RNA یا DNA استاندارد در منحنی کالیبراسیون بستگی دارد. واژه کمی مطلق تا حدودی گمراه‌کننده است. زیرا اندازه‌گیری براساس منحنی کالیبراسیون بیان می‌شود. در گزارش تعداد نسخه‌های mRNA باید برخی از پارامترهای بیولوژیکی مانند مقدار بافت، مقدار RNA یا DNA نام، تعداد سلول‌ها و یا مقایسه تعداد کپی ژن هدف نسبت به تعداد کپی ژن مرجع (به عنوان مثال RNA ریبوزومی یا سایر ژن‌هایی که به‌طور معمول به عنوان ژن مرجع انتخاب می‌شوند = HKG)

در نظر گرفته شود. در روش سنجش مطلق از منحنی‌های کالیبراسیون متنوع استفاده می‌شود. در آنالیز سنجش کمی نسبی (مقایسه‌ای) میزان نسبی تغییرات بیان mRNA اندازه‌گیری می‌شود. در این روش میزان mRNA یک ژن در چندین نمونه و نسبت آن به RNA دیگری سنجش می‌شود. در اندازه‌گیری کمی نسبی به منحنی کالیبراسیون یا استاندارد با غلظت‌های مشخص نیاز نیست و از هر توالی شناخته شده می‌توان به عنوان ژن مرجع استفاده نمود. در آنالیز کمی نسبی، یکاها متفاوت هستند. بنابراین می‌توان مقادیر نسبی آزمایش‌های Real-Time PCR متفاوت را با یکدیگر مقایسه کرد. این امر امکان سنجش تغییرات فیزیولوژیکی کم در سطح بیان ژن را میسر می‌سازد. معمولاً از ژن‌هایی که بیان ثابتی دارند به عنوان ژن مرجع استفاده می‌شود. ژن‌های مرجع می‌توانند در یک تیوب به صورت مالتی‌پلکس یا در تیوب جداگانه (به عنوان کنترل داخلی) تکثیر شوند. بیان ژن هدف با یکی از پارامترهای زیر مقایسه می‌شود.

کنترل داخلی: مانند ژن مرجع با بیان ثابت یا یک GOI دیگر

کنترل خارجی: مانند RNA یا DNA کنترل (سنتزی یا جهانی)

ژن‌های هدف: شامل GOI آنالیز شده در مطالعه جهت سنجش بیان ژن، از اختلاف سیکل‌های آستانه (CT) یا نقطه تلاقی (CP) استفاده می‌شود. روش‌های آنالیزی ذکر شده را می‌توان تحت عنوان روش‌های  $\Delta CT$  معرفی نمود. درز این روش‌ها مراحل آنالیز پیچیده‌تر می‌گردد. در روش‌های کامل‌تر می‌توان یک پارامتر نسبی دیگر را به آنالیز کمی نسبی اضافه نمود. برای مثال سطح بیان GOI را نسبت به یک کنترل غیرتیماری، زمان صفر یا نمونه‌های سالم مقایسه کرد. در این حالت، روش آنالیزی را  $\Delta\Delta CT$  می‌نامند. (لیواک و شیمیتگن<sup>۱</sup>، ۲۰۰۱).

---

<sup>۱</sup> - Livak and Schmittgen, 2001

## ۱-۱۷- نرمال سازی

به منظور دستیابی به نتایج بهینه در آنالیز کمی نسبی، فرآیند نرمال سازی لازم و ضروری می باشد. این امر جهت کنترل خطاهای آزمایش و اطمینان از تکثیر مشابه ژن های مورد مطالعه صورت می گیرد. اغلب خطاها و انحرافات آزمایش طی مراحل مختلف استخراج یا پردازش RNA و در طول بهینه سازی PCR رخ می دهند. بنابراین می بایست تمام مقایسه های نسبی در شرایط ثابت صورت گیرد. بدین منظور نرمال سازی داده های کمی نسبت به متغیرهای زیر الزامی می باشد.

- حجم بافت یا اندازه ی نمونه
- مقدار RNA استخراج شده
- مقدار DNA ژنومیک
- RNA های ریبوزومی مرجع
- mRNA مرجع
- RNA یا DNA سنتز شده (استاندارد)

انتخاب نوع ژن خانه دار بسیار مهم است. زیرا برخی از ژن های مرجع متداول (ژن بتا- اکتین یا ۳- فسفوگلیسرآلدئید دهیدروژناز) دارای ژن های کاذب هستند. ژن های کاذب منجر به تشکیل محصولات غیراختصاصی در واکنش می شوند. به طور کلی بهینه سازی مواد واکنش لازم و ضروری است تا بتوان کارایی واکنش RT و سرعت PCR را پی گیری و بررسی نمود. معمولاً در مطالعات کمی نسبی چندین ژن مرجع استفاده می گردد تا بتوان داده های کمی را با آزمون همبستگی Pair-wise آنالیز نمود. در این روش حداقل به ۳ ژن مرجع نیاز می باشد تا نرمال سازی با دقت و صحت بیشتری انجام شود. جهت ارزیابی بیان ژن های مرجع، نرم افزارهای جدیدی طراحی شده اند. این سوال مطرح می شود که کدام ژن مرجع برای نرمال سازی مناسب است؟ و از کدام ژن خانه دار می توان به عنوان ژن مرجع در سنجش

کمی mRNA استفاده نمود؟ تاکنون در این زمینه جواب جامع و کلی به دست نیامده است. به طور کلی پژوهشگران باید نسبت به نوع تیمار و بافت مورد آزمایش، ژن مرجع مناسبی را برای مطالعات خود انتخاب نمایند. همچنین ترکیب پرایمر با پروب، رنگ فلورسانت، تیوب‌های واکنش و بلاک دستگاه Real-Time PCR از عوامل اثرگذار بر آزمایش هستند. با این حال، qRT-PCR توسط متغیرهای زیادی تحت تأثیر قرار می‌گیرد و به عنوان واکنش چند فاکتوری محسوب می‌شود. بنابراین لازم است ارزیابی سنجش کمی نسبی به خوبی صورت گیرد تا اطلاعات بیولوژیکی مفید و مرتبط حاصل گردد. از معایب اصلی استفاده از ژن‌های مرجع به عنوان استاندارد خارجی نداشتن کنترل داخلی برای شناسایی مهار کننده‌ها در PCR و RT است. در همه روش‌های PCR کمی، نمونه هدف و نمونه کنترل با کارایی مشابه تکثیر می‌یابند. اشکال استفاده از مرجع خارجی، حضور مواد موثر بر کارایی واکنش Real-Time PCR است. نرم‌افزارهای geNorm و Bestkeeper امکان نرمال سازی دقیق داده‌های حاصل از Rral-Time PCR چندین ژن مرجع را به طور همزمان فراهم می‌سازد. نرم‌افزار geNorm قادر به آنالیز همزمان ده ژن مرجع می‌باشد. این نرم‌افزار فرآیند نرمال سازی هر ژن را با تعریف یک فاکتور برای هر نمونه انجام می‌دهد. این امر براساس میانگین ژنومتریکی ژن‌های مرجع انجام می‌شود. نرمال سازی داده‌ها با استفاده از geNorm پیش زمینه‌ی مطالعه سرعت بیان در واکنش RT-PCR را فراهم می‌سازد (بورکات<sup>۱</sup>، ۲۰۰۰؛ دیدا<sup>۲</sup>، ۲۰۰۴).

## ۱-۱۸- روش‌های محاسباتی

بیان نسبی ژن GOI نسبت به ژن دیگر (معمولاً ژن رفرانس) را می‌توان براساس روش  $\Delta CT$  یا  $\Delta\Delta CT$  محاسبه کرد. امروزه روش‌های محاسباتی متفاوتی جهت سنجش نسبت بیان (R) ژن‌ها مبتنی

<sup>1</sup> - Burkardt, 2000

<sup>2</sup> - Dheda, 2004



سیکل‌های آستانه وجود دارند. مقدار Cp را می‌توان با الگوریتم‌های مختلفی محاسبه کرد. برای مثال مقدار Cp براساس میزان ثابتی از نور فلورسانت یا براساس الگوریتم ریاضی تعریف می‌شود.

جهت محاسبه‌ی کمی و نسبی بیان ژن سه روش متداول وجود دارد که شامل موارد زیر می‌باشند:

الف) روش  $\Delta CT$  یا  $\Delta\Delta CT$ : در این روش ضریب کارآیی واکنش PCR محاسبه نمی‌گردد. پایه و اساس روش  $\Delta CT$  یا  $\Delta\Delta CT$  مضاعف شدن DNA هدف طی سیکل‌های Real-Time PCR می‌باشد.

$$2^{[Cp\ sample - Cp\ control]} = R \quad \text{معادله ۱}$$

$$2^{\Delta CP} = R \quad \text{معادله ۲}$$

$$2^{[\Delta CP\ sample - \Delta CP\ control]} = R \quad \text{معادله ۳}$$

$$2^{-\Delta\Delta CP} = R \quad \text{معادله ۴}$$

ب) روش‌های مبتنی بر کارآیی واکنش PCR: در این روش‌ها محاسبه تغییرات بیان ژن بر پایه یک (معادله‌های ۵ و ۶) یا چند نمونه صورت می‌گیرد (معادله ۷). (پفل و همکاران<sup>۱</sup>، ۲۰۰۲؛ پفل<sup>۲</sup>، ۲۰۰۴)

$$Patio = \frac{(E_{target})^{\Delta cp_{target}(control-sample)}}{(E_{reference})^{\Delta cp_{reference}(control-sample)}} \quad \text{معادله ۵}$$

$$Patio = \frac{(E_{reference})^{Cp_{sample}}}{(E_{target})^{Cp_{sample}}} \div \frac{(E_{reference})^{Cp_{calibrator}}}{(E_{target})^{Cp_{calibrator}}} \quad \text{معادله ۶}$$

$$Ratio = \frac{(E_{target})^{\Delta cp_{target}(MEAN\ control - MEAN\ sample)}}{(E_{reference})^{\Delta cp_{reference}(MEAN\ control - MEAN\ sample)}} \quad \text{معادله ۷}$$

<sup>۱</sup> - Pfaffl et al, 2002

<sup>۲</sup> - Pfaffl, 2004

**روش‌های اندیکس REF:** اصول روش‌های اندیکس REF مبتنی بر کارایی واکنش PCR می‌باشد. در این روش‌ها تغییرات بیان ژن براساس چندین نمونه مورد آزمایش و چند ژن مرجع (حداقل ۳ ژن) محاسبه می‌گردد.

$$R = \frac{(E_{target})^{\Delta C_{p_{target}} (MEAN control - MEAN sample)}}{(E_{ref.index})^{\Delta C_{p_{ref.index}} (MEAN control - MEAN sample)}} \quad \text{معادله ۸}$$

در روش‌های اندیکس REF، بیان ژن هدف توسط یک یا چند ژن مرجع غیرتنظیمی نرمالیزه می‌شود.

## ۱-۱۹- کارایی واکنش تکثیر Real-Time qPCR

در مرحله آنالیز سیگنال فلورسانس برای هر نمونه یک منحنی تکثیر وجود دارد. تکرارهای بیولوژیکی و حتی تکنیکی منجر به انحراف در منحنی نمونه‌ها می‌شوند. تغییر در کارایی واکنش می‌تواند ناشی از حضور مهارکننده‌ها یا افزایش دهنده‌های واکنش (PCR و RT) و یا مراحل مختلف استخراج RNA باشد. بنابراین شکل منحنی‌های تکثیر در مرحله پس زمینه (به شکل نامنظم، ثابت یا افزایش یابنده)، نقطه‌ی اوج (زودتر یا دیرتر)، میزان شیب (با کارایی خوب یا بد)، تغییر شکل به حالت کفه (سریع یا کند) یا شکل ظاهری فاز کفه (ثابت یا کاهش یابنده) تغییر می‌یابد. کارایی واکنش PCR، بیشترین تأثیر را بر سرعت تکثیر دارد. این فاکتور خود به شدت تحت تأثیر مواد و ترکیبات واکنش قرار دارد. بنابراین تشخیص محل خط آستانه (Cp) و به دنبال آن صحت و دقت نتایج سنجش کمی نسبی تحت تأثیر کارایی واکنش قرار دارد. سنجش و محاسبه کارایی واکنش بسیار مهم و ضروری است. زیرا صحت و درستی آن در اندازه‌گیری بیان ژن با تکنیک Real-Time PCR حائز اهمیت است. عدم تغییر کارایی واکنش تکثیر در نمونه‌های مورد مطالعه ملاک مهمی جهت مقایسه نمونه‌ها محسوب می‌شود. این امر در مقایسه ژن مجهول با یک ژن مرجع از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در طراحی مطالعات کمی نسبی معمولاً یکسان بودن کارایی واکنش تکثیر ژن‌های مرجع و هدف نادیده گرفته می‌شود. البته در مطالعات اخیر بر تصحیح این امر تأکید فراوانی شده است. همان‌طور که در معادله‌های ۵ تا ۸ مشاهده می‌گردد

تصحیح کارآیی واکنش منجر به سنجش دقیق‌تر بیان ژن (در مقایسه با نتایج بدون تصحیح) می‌گردد. تفاوت جزئی در کارآیی واکنش ژن مرجع و هدف در نسبت بیان تأثیر می‌گذارد. این امر منجر به گزارش نادرست میزان بیان mRNA (کمتر یا بیشتر از مقدار واقعی) می‌شود. از نظر تئوری، اگر در کارآیی واکنش qPCR بین ژن هدف (با بیان کم) و ژن مرجع (با بیان متوسط) سه درصد اختلاف رخ دهد در نسبت بیان ژن (ratio) ۲۴۲ درصد خطا ایجاد می‌شود. جهت تصحیح انحراف کارآیی واکنش نرم‌افزارهای متعددی مانند، Lightcycler Q-Gene و qBase sofار وجود دارد. جهت محاسبه کارآیی واکنش توسط این برنامه‌ها لازم است نمونه‌ها به صورت سه تکرار انجام شوند. نهایتاً در سنجش کمی باید تصحیح کارآیی واکنش با نرم‌افزارهای اتوماتیک انجام شود (مهدیان وهمکاران، ۱۳۹۳).

## ۱-۲۰- روش رقیق سازی

سرعت واکنش تکثیر براساس شیب خطی و نزولی رقت‌ها محاسبه می‌شود. کارآیی واکنش را می‌توان با استفاده از معادله ۹ محاسبه کرد. اما کارآیی واکنش Real-Time PCR باید نمونه به نمونه سنجش شود که بسیار دشوار و پرهزینه می‌باشد. این امر منجر به هدر رفتن نمونه الگو و زمان می‌شود. بنابراین از مخلوط نمونه‌های RNA استفاده می‌شود تا اثرات مثبت و منفی بر کارآیی کنیتیک PCR جمع شود. با استفاده از این روش دامنه‌ی کارآیی واکنش از ۱/۶ تا بیش از ۲ تغییر می‌یابد.

$$E = 10^{\left(\frac{1}{\text{slope}}\right)} \quad \text{معادله ۹}$$

معمولاً ارتباط بین Cp و لگاریتم تعداد کپی‌های نمونه هدف به شکل منحنی خطی می‌باشد.

روش رقیق‌سازی، تکرار پذیری بالایی دارد و در سطح رونویس و بافت ثابت است. کارآیی واکنش در این روش بیش از دو می‌باشد که از نظر تئوری تکثیر غیرممکن می‌باشد. زیرا بیانگر کارآیی واکنش بیش از اندازه‌ی واقعی است (کامیاب و همکاران<sup>۱</sup>، ۲۰۱۲).

---

<sup>۱</sup> - kamyab *et al.*, 2012

# فصل دوم

## بررسی منابع

## ۲- بررسی منابع

### ۱-۲- تاثیر 1-MCP و فیلم پلی اتیلن در پس از برداشت

محمدی ثانی و همکاران (۱۳۹۴) اثر کاربرد 1-MCP را در کاهش ضایعات و افزایش عمر انبارداری گوجه‌فرنگی رقم "راپسونا" در مرحله شکستگی رنگ مورد بررسی قرار دادند که مشخص شد تیمار ۱ و ۰/۷ میکرولیتر در لیتر محلول 1-MCP به طور قابل ملاحظه‌ای اثر اتیلن موجود در محیط محصول گوجه‌فرنگی را کنترل و روند رسیدگی این محصول را با تاخیری ۱۲ تا ۱۸ روزه مواجه کردند. تاخیر ایجاد شده برای طولانی کردن دوره رسیدگی و تنظیم بازار مصرف محصول حائز اهمیت بوده و فرصت جلوگیری از اتلاف بخشی از محصول را فراهم می‌کند. تیمار یک میکرولیتر در لیتر متیل سیکلوپروپان کپک‌زدگی گوجه‌فرنگی را طی یک ماه نگهداری به ۲۴ درصد کاهش داد این مقدار برای تیمار ۱/۳۵ میکرولیتر برابر ۲۱ درصد محاسبه شد. جلوگیری از بروز آلودگی‌های کپکی در سطح این محصول امکان تولید فرآورده‌های گوجه‌فرنگی با احتمال آلودگی کمتر به سموم کپکی را نیز فراهم می‌کند. در پژوهش دیگری توسط (پارک و همکاران<sup>۱</sup>، ۲۰۱۶) اثر جاذب اتیلن و 1-MCP بر کیفیت گوجه‌فرنگی و محتوای آنتی‌اکسیدان در طول ذخیره‌سازی مورد بررسی قرار گرفت. در ابتدا گوجه‌فرنگی‌ها در مرحله breaker (شکست رنگ) برداشت و تحت تیمار جاذب اتیلن و 1-MCP با غلظت‌های یک و دو میکرولیتر بر لیتر قرار گرفتند و در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ روز ذخیره شدند و در نهایت درصد کاهش وزن، رنگ، TA، SSC و ... در میوه‌ها اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که TA در روزهای ششم، نهم و ۱۰ در تیمارهای 1-MCP با غلظت دو میکرولیتر بر لیتر از تیمارهای شاهد و جاذب اتیلن بیش‌تر بود. 1-MCP با تاخیر در رسیدن میوه‌ها، کاهش در اسیدیتته را کم می‌کند. SSC در پایان ذخیره‌سازی در تیمارهای مهار کننده اتیلن کمتر از شاهد بود. درصد کاهش وزن در همه تیمارها افزایش یافت و اختلاف معنی‌داری بین شاهد و تیمارها مشاهده نشد. تاخیر در توسعه رنگ در تیمار 1-MCP با غلظت

<sup>۱</sup> - Park et al., 2016

دو میکرولیتر برلیتر موثرتر از یک میکرولیتر برلیتر بود. در نتیجه تیمار با کیت کوچک 1-MCP مانع از رسیدن گوجه‌فرنگی از نظر ظاهر، رنگ، استحکام که مهار بیشتر آن با غلظت دو میکرولیتر برلیتر موثرتر است. این تیمارها در محتوای کل فنل و فلاونوئیدها در مقایسه با جاذب اتیلن و شاهد بی تاثیر بود. در پژوهش دیگری توسط شواخی و بهمدی (۱۳۹۴) بررسی اثر استفاده از 1-MCP در کیفیت پس از برداشت دو رقم سیب (قرمز و زرد لبنانی) در دو غلظت (صفر و یک پی‌پی‌ام) انجام شد و در سردخانه در دمای صفر درجه سانتی‌گراد با رطوبت نسبی ۹۰ درصد قرار داده شدند. نتایج آزمایش‌ها در پایان ماه پنجم نگهداری، نشان داد که کاربرد تیمار 1-MCP باعث جلوگیری از توسعه رنگ قرمز و حفظ سفتی بافت در هر دو واریته گردید. کمترین pH، بیشترین اسیدیته، پایین‌ترین مواد جامد محلول، بالاترین مقدار ویتامین ث و کمترین مقدار تولید اتیلن نیز در صورت اعمال تیمار 1-MCP، مشاهده شد. استفاده از این تیمار، موجب تأخیر در رسیدگی و در نتیجه حفظ بهتر کیفیت در هر دو واریته سیب شد. تحقیقات انجام شده در کاربرد مواد ضد اتیلن به منظور افزایش ماندگاری و حفظ کیفیت محصولات باغبانی در طول ذخیره‌سازی مثل کاربرد 1-OCP بر روی گوجه‌فرنگی نشان داد که در به تعویق انداختن زمان وقوع پیک تولید اتیلن و پیک تنفس و تأخیر در نرمی بافت و تغییرات مربوط به رنگ گوجه‌فرنگی و همچنین جلوگیری از افزایش مواد جامد محلول و کاهش اسیدیته قابل تیتراسیون موثر است و مانع بیان ژن  $L_eETR_1$  و  $L_eETR_4$  در گوجه‌فرنگی شده است (یو و همکاران<sup>۱</sup>، ۲۰۱۶). در پژوهش دیگری اثر پوترسین و 1-MCP بر خواص کیفی و عمر انبارمانی میوه توت‌فرنگی رقم "سلوا" مورد بررسی قرار گرفت، در این آزمایش تأثیر کاربرد غلظت‌های صفر (شاهد)، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ میکرولیتر بر لیتر 1-MCP و هم‌چنین پوترسین با غلظت‌های صفر (شاهد)، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌مولار بر عمر انبارمانی میوه توت‌فرنگی رقم سلوا در دمای یک درجه سانتی‌گراد به مدت بیست و یک روز بررسی شد. نتایج نشان داد که بالاترین درصد بازار پسندی، سفتی بافت میوه، اسیدهای آلی قابل تیتراسیون، مواد

---

<sup>۱</sup> - Fangxu Xu, 2016

جامد محلول و ویتامین ث و کمترین مقادیر صفات پوسیدگی ظاهری، pH و شاخص مزه (TSS/TA) در تیمار ۰/۷۵ و ۱ میکرولیتر بر لیتر 1-MCP و نیز ۱ و ۱/۵ پوترسین دیده شد. نتایج نشان دهنده تأثیر مثبت تیمارها بر عمر انبارمانی میوه توت‌فرنگی بود. استفاده از 1-MCP و پوترسین می‌تواند به‌عنوان راهبرد مؤثری در تکنولوژی پس از برداشت میوه توت‌فرنگی رقم سلوا معرفی شود (جعفرپور و امینی، ۱۳۹۴). پژوهش دیگری در تأثیر 1-MCP و کلرید کلسیم بر افزایش طول عمر انباری میوه رسیده سبز زیتون رقم "میشل" مورد بررسی قرار گرفت، در این آزمایش تغییرات شاخص‌های کلروفیل (SPAD)، راندمان کوانتومی فتوسیستم II (Fv/Fm) و رنگ پوست و همچنین سفتی گوشت میوه اندازه‌گیری شد. براساس نتایج مقایسه میانگین اثر تیمار 1-MCP به تنهایی یا در ترکیب با غلظت‌های مختلف کلرید کلسیم ۱/۵ و ۳ درصد به طور معنی‌داری نسبت به شاهد از کاهش شاخص کلروفیل پوست میوه زیتون جلوگیری کرد. راندمان کوانتومی فتوسیستم II با نسبت Fv/Fm، حداکثر عملکرد کوانتومی واکنش فتوشیمیایی فتوسیستم II را نشان می‌دهد و یک پارامتر مهم برای تعیین وضعیت دستگاه فتوسنتزی است. نتایج این پژوهش نشان داد که میوه‌های تیمار شده با ترکیب دو میکرولیتر در لیتر 1-MCP به همراه کلرید کلسیم ۱/۵ درصد، در طول مدت نگهداری در انبار نسبت به Fv/Fm بالاتری را در مقایسه با شاهد دارا بودند، اما بین این تیمار و تیمارهای دو میکرولیتر در لیتر 1-MCP و دو میکرولیتر در لیتر 1-MCP به همراه کلرید کلسیم سه درصد اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. کاربرد 1-MCP توانسته بود قرمز شدن، کاهش زردی، و افزایش تیرگی پوست میوه زیتون را به تأخیر بیندازد و به طور کلی از توسعه رنگ و بلوغ میوه جلوگیری کند. همچنین کاربرد 1-MCP و کلرید کلسیم هر دو باعث حفظ سفتی گوشت میوه زیتون رقم "میشل" به مقدار بیشتری نسبت به میوه‌های شاهد گردیدند و با افزایش سطوح غلظت ماده کلرید کلسیم بر میانگین سفتی بافت میوه افزوده شد. با توجه به کارایی ترکیب دو میکرولیتر در لیتر 1-MCP به علاوه کلرید کلسیم سه درصد، در حفظ رنگ سبز پوست و جلوگیری از نرم شدن بافت میوه زیتون در طی دوره انبارمانی در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد، همچنین سهولت کاربرد و سمی نبودن این ترکیب برای محیط زیست و انسان، می



توان از این ترکیب به عنوان یک تیمار کارآمد جهت کاهش ضایعات محصول زیتون در پس از برداشت استفاده کرد (مکوندی و همکاران، ۱۳۹۲). فیلم‌های بسته‌بندی می‌توانند به عنوان یک جایگزین جهت افزایش عمر پس از برداشت میوه‌ها و سبزیجات عمل کنند. تاثیر فیلم‌های بسته‌بندی پلی وینیل کلراید (PVC) و پلی اتیلن چگال سنگین (HDPE) بر روی تعدادی از خواص فیزیکی، مکانیکی و شیمیایی گوجه زیتونی بررسی شد. فیلم‌های بسته‌بندی جهت بسته‌بندی گوجه زیتونی به کار گرفته شدند و سپس در دو دمای (۲۵ و ۴) به مدت بیست روز نگهداری شدند. نتایج نشان داد که تفاوت معنی‌داری از نظر آماری برای پارامتر pH در فیلم‌های بسته‌بندی و بدون بسته‌بندی مشاهده نشد. در مقابل، فیلم‌های بسته‌بندی به طور معنی‌داری مانع افت وزن شد و همچنین فیلم‌های بسته‌بندی باعث استحکام (فرمنس) گوجه‌های زیتونی و کیفیت ذخیره سازی شدند. پلی وینیل کلراید و پلی اتیلن با چگالی بالا تاثیر معنی‌داری در روی پارامتر رنگ گذاشتند. رنگ گوجه‌های زیتونی بسته‌بندی شده تیره تر و محصولاتی که در دمای ۴ درجه بودند قرمزی کمتری در طول ذخیره سازی داشتند (سهرابی و همکاران، ۱۳۹۵). در پژوهشی در سال ۱۳۹۵ بررسی دو نوع فیلم پلی اتیلن (پلی اتیلن با دانسیته کم و نانوکامپوزیت رس) در عمر انبارمانی انگور سرخ فخری شاهرود مورد مطالعه قرار گرفت. میوه‌ها بعد از تیمار در سردخانه در دمای یک درجه سانتیگراد با رطوبت نسبی ۹۰-۸۰ درصد نگهداری شدند. میوه‌های تیمار شده هر ۱۵ روز یک بار فاکتورهای فیزیکوشیمیایی شامل pH، TA، کاهش وزن، سفتی بافت و محتوای فنل کل اندازه گیری شدند. نتایج بدست آمده بعد از ۵۰ روز انبارداری نشان داد که پوشش نانو کامپوزیت رس فاکتورهای سفتی میوه، کاهش وزن pH، TA و محتوای فنل کل را نسبت به پوشش پلی اتیلن بهتر حفظ و باعث افزایش کیفیت و عمر انبارمانی انگور سرخ فخری شاهرودی به مدت ۵۰ روز شد (بدافی و همکاران، ۱۳۹۵). در پژوهش انجام شده توسط آن و همکاران،<sup>۱</sup> (۲۰۰۷) اثر فیلم پلی اتیلن در شرایط اتمسفر تعدیل یافته در میوه هلو مورد بررسی قرار گرفت، در این آزمایش

---

<sup>۱</sup> - An et al., 2007

میوه‌ها در فیلم پلی‌اتیلن با دانسیته کم (LDPE) در سه ضخامت ۱۵، ۲۵، ۴۰ میلی‌متر بسته‌بندی شدند و شاهد بدون در نظر گرفته شد. میزان تنفس، غلظت O<sub>2</sub> و CO<sub>2</sub>، رنگ گوشت میوه، سفتی بافت، اسیدیته قابل تیتراسیون (TA)، مواد جامد محلول (TSS)، اندازه‌گیری شد. در مقایسه با شاهد، بسته‌بندی با اتمسفر تعدیل یافته باعث مهار پیک فرازگرایی شده که در نتیجه افزایش در توسعه رنگ و نرمی بافت کاهش می‌یابد همچنین مقدار (TA) و (TSS) میوه کاهش پیدا کرد. همچنین اختلاف معنی داری در کیفیت میوه‌ها بین سه فیلم پلی‌اتیلن و شاهد مشاهده شد. که پس از ۲۰ روز انبارداری بهترین کیفیت مربوط به (LDPE) با ضخامت ۲۵ میلی‌متر مشاهده شد. در بررسی دیگری توسط ابراهیمیان و همکاران (۱۳۹۱)، تاثیر دو نوع پوشش پلی‌اتیلنی و دو سطح دما (۴ و ۲۰) درجه‌سانتی-گراد، در بسته‌بندی با اتمسفر تعدیل یافته غیرفعال بر روی خصوصیات کیفی گوجه‌فرنگی نشان داد که پس از ۲۰ روز بسته‌بندی با هر دو پوشش و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تاثیر معنی‌داری در کاهش درصد افت وزن داشت. پوشش پلی‌اتیلن با منفذ میکرونی و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بهترین حفظ سفتی میوه را داشت. بین دو پوشش از نظر مواد جامد محلول اختلاف مشاهده نگردید که بیش‌ترین مقدار آن در شاهد مشاهده شد. همچنین بیش‌ترین مقدار pH در شاهد و بهترین حفظ اسیدیته در پلی‌اتیلن بدون منفذ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد.

## ۲-۲- بررسی بیان ژن‌های درگیر در مسیریوسنتز اتیلن در فیلم‌های

### بسته‌بندی و 1-MCP در پس از برداشت

در یک مطالعه که توسط یانگ و همکاران<sup>۱</sup> (۲۰۱۳) انجام شد اثرات کاربرد خارجی اتیلن و 1-MCP بر روی بیان ژن‌های درگیر در دریافت سیگنال و بیوسنتز اتیلن در طول دوره رسیدگی سیب بررسی شد. در این بررسی بیان ۲۰ ژن دخیل در این مسیر با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز

<sup>۱</sup> - Yang et al., 2013

زمان واقعی پس از تیمار ارزیابی شد. نتایج نشان داد که بیان ژن‌های EIL4, ERSs, ETR5, ETR2. ERFs همراه با ژن‌های ACS1 و ACO1 به صورت معنی‌داری در زمان رسیدگی میوه افزایش یافت. کاربرد تیمار خارجی اتیلن بیان ژن‌های ACO2, ETR1, CTR1 و EIN2A را بیشتر افزایش داد. درحالی‌که بیان ژن‌های ACS3 و ACO3 و ژن‌های EIN2B تنها مقدار کمی تحت تاثیر قرار گرفتند. تیمار 1-MCP بصورت معنی‌داری از بیان ژن‌های ACS1, ACO1 و ACO2 جلوگیری کرد، که با تولید اتیلن همزمان بود. تیمار 1-MCP تاثیر محدودی بر بیان ژن‌های ACS3, ACO3 و EIN2B داشت. این مطالعه پیچیدگی و تغییرات پویای پروفایل‌های رونویسی دریافت و بیوسنتز اتیلن در پاسخ به رسیدگی میوه، اتیلن و تیمار 1-MCP را ثابت کرد. درک تغییرات معنی‌دار این ژن‌ها و فعالیت آن‌ها ممکن است به توضیح مکانیسم‌های کنترل‌کننده رسیدگی میوه سیب و پاسخ آن به کاربرد اتیلن خارجی و فعالیت بازدارندگی در سطح گیرنده در مدت رسیدگی و پیری کمک کند. تحقیقی به وسیله تاتسوکي<sup>۱</sup> و همکاران (۲۰۰۷) بر روی اثر زمان‌های مختلف پس از برداشت و کاربرد 1-MCP بر روی کیفیت دو رقم سیب و بیان ژن‌های دخیل در بیوسنتز و گیرنده‌های دریافت سیگنال در اتیلن انجام شد. نتایج این پژوهش نشان داد که الگوی بیان این ژن‌های دو رقم سیب مورد مطالعه متفاوت بود. تولید اتیلن و بیان ژن‌های MdACS1, MdERS1 و MdERS2 در همه میوه‌های رقم فوجی تیمار شده با 1-MCP سرکوب گردید، اما در میوه رقم ارین، آخرین تیمار 1-MCP که پس از برداشت بکار رفت، اثر بازدارندگی کمی در تولید اتیلن و بیان این ژن‌ها داشت. بیان ژن MdERS1 و تولید اتیلن در رقم ارین و در سیب‌هایی که پس از هفت روز از برداشت تحت تاثیر 1-MCP قرار گرفتند، ابتدا به صورت اندکی کاهش و سپس افزایش یافت. از آنجایی که گیرنده‌های اتیلن به صورت منفی مسیر پیام‌رسانی اتیلن را تنظیم می‌کنند، افزایش سطوح تولید اتیلن و گیرنده‌های اتیلن بعد از تیمار 1-MCP ممکن است کارایی 1-MCP را کاهش دهد. در پژوهشی که به وسیله ژو و همکاران<sup>۲</sup> (۲۰۱۵) انجام شد اثر براسینواستروئید بر روی

---

<sup>1</sup> - Tatsuki, 2007

<sup>2</sup> - zhu *et al.*, 2015

کیفیت و سنتز اتیلن در گوجه‌فرنگی پس از برداشت بررسی شد. در این پژوهش میوه رسیده سبز گوجه‌فرنگی برداشت و با براسینولید (BL، براسینواستروئید فعال) یا برازینازول (BRZ، بازدارنده بیوسنتز برازینواستروئید) تیمار گردیدند. نتایج نشان داد که در مدت رسیدگی میوه، کاربرد برازینولید در القاء رسیدگی میوه گوجه‌فرنگی، افزایش قندهای محلول، آسکوربیک اسید، محتوی لیکوپن، نرخ تنفس و تولید اتیلن موثر بوده است، اما به شدت محتوی کلروفیل را در مقایسه با شاهد کاهش می‌دهد. همچنین، بیان ژن‌های LeACS2، LeACS4، LeACO1، LeACO4 و LePSY1 بوسیله تیمار با براسینولید افزایش و بیان ژن LeGLK2 کاهش یافت. با این وجود، میوه تیمار شده با برازینازول تاثیرات متضادی نشان داد، چرا که رسیدگی میوه گوجه‌فرنگی به تاخیر افتاد. این یافته‌ها نشان داد که براسینواستروئیدها در توسعه خصوصیات کیفی میوه و رسیدگی میوه گوجه‌فرنگی به واسطه اتیلن نقش دارند. کتسا و همکاران<sup>۱</sup> (۲۰۱۳) اثرات تیمار 1-MCP و بسته‌بندی (اتم‌سفر تغییر یافته) را در افزایش طول عمر و ماندگاری در میوه موز بررسی کردند. نتایج تحقیق آن‌ها نشان داد که میوه تیمار شده با 1-MCP به همراه بسته‌بندی دارای دوره نگهداری ۱۰۰ روزه بود. مدت نگهداری میوه شاهد (بدون 1-MCP و بسته‌بندی) در حدود ۲۰ روز بود. میوه نگهداری شده در کیسه‌های PE بدون تیمار 1-MCP دارای مدت ماندگاری ۴۰ روزه بودند و همین نتیجه در میوه تیمار شده با 1-MCP بدون بسته‌های PE دیده شد. در این تحقیق محتوی و فعالیت ACC و ACO در شرایط تیماری مختلف اندازه‌گیری گردید. 1-MCP بازدارنده فعالیت اتیلن است، بطوریکه تولید اتیلن را مهار می‌کند، که این عمل اساساً از طریق بازدارندگی فعالیت ACC اکسیداز در پوسته می‌باشد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که تیمار بسته‌بندی تولید اتیلن را از طریق بازدارندگی فعالیت ACC اکسیداز در پوسته و در پالپ مهار می‌کند. ترکیب تیمار 1-MCP و بسته‌بندی منجر به کاهش تولید اتیلن به علت بازدارندگی فعالیت ACC سنتاز و ACC اکسیداز می‌گردد. آمورنپوتی و همکاران<sup>۲</sup> (۲۰۱۶) چگونگی تاثیر 1-MCP را در مهار تولید

---

<sup>1</sup> - Ketsa *et al.*, 2013

<sup>2</sup> - Amornputti *et al.*, 2016

اتیلن در پوسته و پالپ در میوه درخت قهوه سودانی بررسی کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که پوسته (سیوس) نسبت به پالپ مقدار بیشتری اتیلن تولید می‌کند، از این‌رو، تاثیرات تیمار 1-MCP بر پوسته به احتمال زیاد هرگونه تاثیر بر پالپ را می‌پوشاند. در پوسته، تیمار 1-MCP تاثیری بر فعالیت ۱-آمینوسیکلوپروپن-۱-کربوکسیلیک اسید (ACC) سنتاز نداشت، اما فعالیت *ACO* را کاهش داد. سطوح *ACC* در پوسته بوسیله تیمار با 1-MCP در ۲۵ درجه سانتی‌گراد تحت تاثیر قرار نگرفت. در پالپ، فعالیت *ACO* تحت تاثیر قرار نگرفت. فعالیت *ACS* در ۲۵ درجه سانتی‌گراد مهار نشد و سطوح *ACC* بعد از تیمار با 1-MCP کاهش یافت. نتیجه‌گیری شد که تیمار 1-MCP احتمالاً تولید اتیلن میوه درخت قهوه را اساساً بواسطه مهار افزایش در فعالیت *ACC* اکسیداز در پوسته مهار می‌کند. در یک بررسی که به وسیله ژئی و همکاران<sup>۱</sup> (۲۰۱۴) به منظور بررسی اثرات 1-MCP بر روی سنتز اتیلن و رسیدگی گلابی انجام شد، اثر دماهای مختلف انبارداری نیز بر چگونگی اثرگذاری 1-MCP مورد بررسی قرار گرفت. در این پژوهش پوسیدگی قابل توجهی در میوه شاهد که برای مدت هفت روز در دمای ۱/۱- درجه سانتی‌گراد و سپس برای مدت پنج تا سه ماه در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند، مشاهده شد. درحالی‌که میوه‌های تیمار شده با 1-MCP و در دمای ۱/۱- درجه سانتی‌گراد به علت غلظت بسیار پایین اتیلن درونی و نرخ تولید اتیلن به مدت هشت ماه قابلیت نگهداری داشتند. میوه‌های تیمار شده با 1-MCP و ذخیره شده در دمای ۱/۱ درجه سانتی‌گراد مقدار قابل توجهی از اتیلن درونی را در مدت انبارداری تولید کردند و ظرفیت نگهداری آن‌ها به علت سطوح نسبتاً پایین پوسیدگی حدوداً شش تا هشت ماه بود. در شرایط تیمار با 1-MCP و دمای ۲/۲ درجه سانتی‌گراد به سرعت کیفیت میوه در مدت انبارداری از دست رفت. در مقایسه با شاهد، بیان ژن‌های دخیل در سنتز اتیلن (*PaACSI* و *PaACO1*) و ژن‌های سیگنالینگ (*PcETR1* و *PcETR2*) در تیمار 1-MCP و در دمای ۱/۱- درجه سانتی‌گراد در سطح بسیار پایینی حفظ شد. در مقابل، بیان این ژن‌ها در تیمار 1-MCP و در دمای ۱/۱

---

<sup>۱</sup> - Xie et al., 2014

درجه سانتی‌گراد افزایش یافت. بیان دیگر ژن‌ها (PcCTR1, PcACS2, PcACS4 و PcACS5) صرف نظر از توانایی میوه برای رسیدگی بسیار پایین بود. دمای نگهداری ۱/۱- درجه سانتی‌گراد می‌تواند القاء ظرفیت رسیدگی را در تیمار 1-MCP با سطوح نسبتاً پایین پوسیدگی بعد از شش تا هشت ماه انبارداری تسهیل کند، که این امر از طریق تغییر بیان ژن‌های معین در سنتز و سیگنالینگ اتیلن رخ می‌دهد. مانوز و همکاران<sup>۱</sup> (۲۰۱۲) در یک تحقیق اثر 1-MCP و AVG را بر روی بیان ژن‌های مسیر بیوسنتز اتیلن مورد بررسی قرار دادند. نتایج آن‌ها نشان داد که هر دو تیمار بازدارنده اتیلن در کاهش تولید اتیلن، نرخ تنفس و نرم شدن میوه موثر بودند. در این تحقیق آن‌ها سه ژن ۱-آمینوسیکلوپروپان-۱-کربوکسیلیک-اسید سنتاز (ACS) را شناسایی کردند، اما تنها بیان ACS2 به شدت بوسیله بازدارنده اتیلن کاهش پیدا کرد، که بیان‌کننده نقش کلیدی این ژن در سنتز اتیلن در زمان رسیدگی است. برعکس، ACS1 و ACS3 بیان بالایی تحت بازدارندگی اتیلن نشان دادند، بیان شد که ژن‌های مسئول به صورت انفرادی و به صورت اختصاصی تنظیم می‌شوند. در پایان، تغییرات در ژن‌های ۱-آمینوسیکلوپروپان-۱-کربوکسیلیک اکسیداز الگوی پایداری از تغییر در اتیلن را نشان ندادند.

---

<sup>۱</sup> - Muñoz *et al.*, 2012

# فصل سوم

## مواد و روش ها

## ۳- مواد و روش‌ها

### ۳-۱- زمان و محل اجرای آزمایش

این آزمایش در سال ۱۳۹۶ در آزمایشگاه علوم باغبانی و بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود به اجرا درآمد.

### ۳-۲- نوع و قالب طرح

این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. فاکتور اول شامل دو لاین خالص گوجه‌فرنگی، نارنجی (Orang berry) و گلابی زرد (Yellow pear beams) و فاکتور دوم شامل پوشش بسته‌بندی (فیلم پلی‌اتیلن، 1-MCP به همراه فیلم پلی‌اتیلن با غلظت پنج میکرولیتر بر لیتر و شاهد بدون بسته‌بندی) و فاکتور سوم شامل زمان های پس از برداشت (چهار، هشت، دوازده و شانزده روز پس از برداشت) بود.

### ۳-۳- پرورش گوجه‌فرنگی در مزرعه

بذور دو لاین خالص گوجه‌فرنگی، لاین نارنجی و لاین گلابی زرد از شرکت Nicky s nursery انتخاب و خریداری شدند. سپس در خزانه کشت شد، نشاءهای حاصل در خرداد ماه به زمین اصلی منتقل شد. قبل از انتقال نشاءها به زمین اصلی عمل مقاوم کردن نشاءها جهت مقاوم شدن آنها نسبت به شرایط مزرعه صورت گرفت. جهت آماده سازی اولیه، زمین با تراکتور شخم زده شد، سپس به وسیله دیسک سنگین کلوخه‌های حاصل از شخم نرم شدند. فاصله بوته‌ها در ردیف ۳۰ سانتی‌متر و فاصله ردیف‌ها ۱۰۰ سانتی‌متر در نظر گرفته شد. بعد از انتقال بلافاصله آبیاری انجام گرفت. عملیات داشت شامل قیم بستن، وجین علف‌های هرز، خاک دهی پای بوته‌ها، افزودن عناصر ماکرو و میکرو به خاک و محلول پاشی کلسیم بود. آبیاری هر هفت روز یکبار انجام گرفت. برداشت از اوایل شهریور آغاز شد.



### ۳-۴- برداشت محصول و اعمال تیمارها

برداشت در مرحله شکست رنگ و براساس شاخص استاندارد رسیدگی گوجه‌فرنگی انجام گرفت و میوه‌های کاملاً سالم برداشت شدند. پس از انتقال به آزمایشگاه گوجه‌فرنگی‌ها برای شست و شوی آلودگی‌های مزرعه با هیپوکلرید یک درصد به مدت یک دقیقه ضدعفونی گردید و در نهایت در محیط آزمایشگاه خشک شدند. برای اعمال تیمار 1-MCP، ابتدا مقدار مشخص از پودر 1-MCP وزن شد و در آب حل گردید سپس این محلول با (غلظت پنج میکرولیتر در لیتر) بر روی گوجه‌فرنگی‌های هر دو لاین اسپری شد به منظور انتخاب غلظت مناسب 1-MCP قبل از شروع آزمایش یک پیش‌تیمار با غلظت‌های یک، سه و پنج میکرولیتر در لیتر به کار گرفته شد و در نهایت بهترین غلظت موثر انتخاب گردید. نمونه‌های آغشته به 1-MCP به مدت ۴۸ ساعت در ظروف پلاستیکی چهار قفل با حجم یک لیتر، شرکت صنعت‌سازان قرار گرفتند و در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای یکسان سازی شرایط آزمایش در تمام تیمارها، برای اعمال تیمارهای بسته‌بندی با پلی اتیلن و شاهد هم گوجه‌فرنگی‌ها بعد از خشک شدن به مدت ۴۸ ساعت در ظروف مورد نظر قرار گرفتند. بعد از اتمام ۴۸ ساعت نمونه‌ها از ظروف خارج شده و در فیلم پلی اتیلن بسته‌بندی شدند و شاهد بدون بسته‌بندی در نظر گرفته شد. آزمایش با سه تکرار و هشت عدد گوجه‌فرنگی در هر تکرار قرار گرفتند. در این آزمایش هر چهار روز یک بار و در چهار مرحله در طول مدت ۱۶ روز انبارداری، داده برداری انجام شد.

### ۳-۵- اندازه‌گیری صفات فیزیولوژیکی

#### ۳-۵-۱- اندازه‌گیری درصد کاهش وزن

وزن گوجه‌فرنگی‌ها در ابتدا و انتهای مدت مشخص انبارداری با استفاده از ترازوی دیجیتالی با

دقت ۰/۱ گرم اندازه‌گیری شد و درصد کاهش وزن با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید.

$$\text{درصد کاهش وزن} = \frac{(\text{وزن ثانویه} - \text{وزن اولیه})}{\text{وزن اولیه}} \times 100$$

### ۳-۵-۲- اندازه‌گیری pH

در ابتدا پنج میلی‌لیتر آب گوجه‌فرنگی را به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده و بعد از آن pH عصاره با استفاده از pH متر اندازه‌گیری شد.

### ۳-۵-۳- اندازه‌گیری مواد جامد محلول کل

مواد جامد محلول به روش رفاکتومتری و با استفاده از رفاکتومتر دستی در دمای اتاق اندازه‌گیری شد. یک قطره از آب گوجه‌فرنگی روی منشور دستگاه قرار داده شد و عدد دستگاه برحسب درجه بریکس قرائت شد (هر درجه بریکس معادل یک درصد مواد جامد محلول در عصاره میوه است).

### ۳-۵-۴- اندازه‌گیری سفتی بافت

سفتی بافت با دستگاه سفتی سنج پرتابل با پروب ۲ میلی‌متری ساخت کشور کره مدل dfl اندازه‌گیری شد.

### ۳-۶- بررسی بیان ژن‌های مسیر بیوسنتز اتیلن

هر چهار روز یکبار همزمان با سنجش صفات فیزیولوژیکی، از گوجه‌فرنگی‌ها نمونه برداری به عمل آمده و بخشی از گوجه‌فرنگی‌ها بلافاصله در فریزر ۸۰- سانتی‌گراد تا زمان شروع آزمایشات مولکولی ذخیره شدند.

### ۳-۶-۱- استخراج RNA

برای استخراج RNA از کیت RNX Plus و با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده (سیناکلون) استفاده شد. کمیت و کیفیت RNA، به ترتیب با استفاده از دستگاه نانودراپ و ژل آگارز ۱ درصد تعیین شد. برای حذف آلودگی‌های DNA، پس از تعیین غلظت با دستگاه نانودراپ، ۱ µg از RNA استخراج شده تحت تیمار DNase طبق جدول (۱-۳) قرار گرفت. تیمار DNase با استفاده از آنزیم DNase I RNase-free (Fermentase) انجام شد. پس از مرحله‌ی اول ویال محتویات را در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت و پس از اضافه کردن EDTA، ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

جدول ۱-۳- ترکیبات مورد استفاده به منظور حذف DNA ژنومی

مرحله	ماده	حجم (µl)	غلظت
۱	RNA	-	-
	Reaction buffer	۱	۱۰X
	DNase I	۱	۱ uµl <sup>-1</sup>
	Water nuclease-free	-	-
	Total	۱۰	-
۲	EDTA	۱	۵۰ mM
	Total	۱۱	-

### ۳-۶-۲- ساخت cDNA

پس از اطمینان از کیفیت RNA و اندازه‌گیری کمیت آن مقدار مشخصی از RNA به عنوان الگو برای ساخت cDNA مورد استفاده قرار گرفت. برای ساخت cDNA، از کیت HyperScript Reverse transcriptase (GeneALL) (بتازن) استفاده شد. Master 1 طبق جدول (۲-۳) آماده شده و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در مرحله بعد Reaction buffer و آنزیم Reverse

transcriptase را بر طبق جدول (۳-۳) به Master 1 اضافه شد. سپس به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲

درجه سانتی‌گراد و پس از آن به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت.

جدول ۳-۲- ترکیبات مورد استفاده برای سنتز cDNA در مرحله اول

ماده	حجم (μl)	غلظت
RNA	۴	۲۵۰ ngμl <sup>-1</sup>
Oligo(dT)	۱	۱۰ pmolμl <sup>-1</sup>
DEPC Water	۷	-
Master 1 total volume	۱۲	-

جدول ۳-۳- ترکیبات مورد استفاده برای سنتز cDNA در مرحله دوم

ماده	حجم (μl)	غلظت
Master 1 total volume	۱۲	-
Reaction buffer	۴	۱۰X
Reverse transcriptase	۱	۲۰۰ muμl <sup>-1</sup>
Total volume	۲۰	-

### ۳-۶-۳- طراحی آغازگرها

آغازگرها برای تکثیر ژن‌های (ACO1, ACO5, ACS4, SAM1, EF) با استفاده از برنامه آنلاین Primer

3 Plus طراحی و صحت آن‌ها با Oligo Analyzer v.3.1 (<http://eu.idtdna.com/calc/analyzer>)

بررسی شد. پارامترهای بررسی شده در این برنامه شامل تشکیل ساختارهای سنجاق سری و دایمر

آغازگرهای مختلف است. آغازگرهای مستقیم و معکوس به گونه‌ای طراحی شدند که اختلاف دمای آن‌ها

کمتر از ۲-۳ درجه سانتی‌گراد باشد جدول (۳-۴).

جدول ۳-۴- آغازگرها و مشخصات آنها

نام	توالی آغازگر (۳' - ۵') Forward	توالی آغازگر (۳' - ۵') Reverse	طول قطعه bp	دمای اتصال (سانتی‌گراد)
<i>ACO1</i>	GGAGGCATCATACTTCTGT	CATCACTTCCTGGATTGTA	210	F:60 R:61
<i>ACO5</i>	ACGAACAAGTTCCAGGTC	GGTGACAGGGATAACAAGAG	230	F:60 R:61
<i>ACS4</i>	GGGGTTATTCAGATGGGTC	CCACCAGCCATTACTACAC	220	F:62 R:61
<i>SAMI</i>	CGAGGAGATTGGTGCTGGTG	TCGTGTTGGGTGGAGATAAG	230	F:61 R:61
<i>EF</i>	GGAACCTTGAGAAGGAGCCTAA G	CAACACCAACAGCAACAGTCT	160	F:59 R:60

### ۳-۶-۴- بررسی صحت سنتز آغازگرها

به منظور اطمینان از سنتز صحیح cDNA و کارکرد آغازگرهای طراحی شده قبل از بررسی بیان ژن‌های مورد نظر، ابتدا سنتز توسط PCR معمولی و با مشخصات نمایش داده شده در جدول (۳-۵) انجام شد. برای انجام واکنش PCR از آنزیم  $\alpha$ -Taq DNA Polymerase (GeneALL) و دستگاه ترمال سایکلر شرکت Bio RAD استفاده شد (جدول ۳-۶).

جدول ۳-۵ ترکیبات مورد استفاده در واکنش PCR به منظور تایید سنتز cDNA

ماده	حجم ( $\mu$ l)	غلظت
H <sub>2</sub> O	۴/۵	-
HQ buffer	۲	۵X
dNTP	۴	۱۰ mM
$\alpha$ -Taq Buffer	۵	۵X
$\alpha$ -Taq DNA Polymerase	۰/۵	۲/۵ $\mu$ l <sup>-1</sup>
cDNA	۲	۵۰ ng $\mu$ l <sup>-1</sup>
Forward Primer	۱	۱۰ pmol $\mu$ l <sup>-1</sup>
Reverse Primer	۱	۱۰ pmol $\mu$ l <sup>-1</sup>
Total Volume	۲۰	-

جدول ۳-۶ برنامه ترمال سایکلر برای PCR

مرحله	دما (°C)	زمان
Denaturation	۹۵	۲ min
Denaturation	۹۵	۲۰ sec
۳۵ چرخه Annealing	۶۰	۲۰ sec
Elongation	۷۲	۵ min
Elongation	۷۲	۵ min

پس از انجام واکنش PCR، محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد بارگذاری گردید.

### ۳-۶-۵- انجام واکنش Real-Time PCR

همه‌ی cDNAها در حجم ۲۰  $\mu\text{l}$  و با غلظت نهایی  $50 \text{ ng}\mu\text{l}^{-1}$  سنتز شدند. برای واکنش qRT-PCR، SYBR®Green PCR Master Mix 2X (Ampliqon) مورد استفاده قرار گرفت. واکنش‌ها در حجم ۱۰  $\mu\text{l}$  و با سه تکرار انجام شدند (جدول ۳-۷). برای هر ژن، آزمایش کنترل منفی با واکنش qRT-PCR انجام شد. همچنین برای اطمینان از کارکرد آنزیم DNase و حذف تمام آلودگی‌های DNA، واکنش qRT-PCR بر RNA و RNA تیمار شده با DNase انجام شد. واکنش PCR زمان واقعی، با استفاده از دستگاه ABI Step one (Applied Biosystems Stepone) و مطابق با ترکیبات موجود در جدول (۳-۷) انجام شد.

جدول ۳-۷ ترکیبات مورد استفاده در واکنش PCR زمان واقعی

ماده	حجم ( $\mu\text{l}$ )	غلظت
Nuclease Free Water	۳	-
cDNA	۱	$50 \text{ ng}\mu\text{l}^{-1}$
Forward Primer	۰/۵	$10 \text{ pmol}\mu\text{l}^{-1}$
Reverse Primer	۰/۵	$10 \text{ pmol}\mu\text{l}^{-1}$
SYBR®Green PCR Master Mix	۵	۲X
Total	۱۰	-

واکنش Real-Time PCR در حجم واکنش ۲۵ میکرولیتر حاوی مواد موجود در جدول (۳-۷) و با شرایط واکنش زنجیره ای پلیمرز انجام شد: ۱۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و ۳۵ تکرار با چرخه‌های ۱۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۱۵ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد (دمای  $T_m$  آغازگر) و ۱۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد. در این واکنش از Green Supermix خریداری شده از شرکت Amplicon استفاده گردید.

### ۳-۶-۶- استانداریسازی

برای استاندارد کردن از سری رقت<sup>۱</sup> استفاده شد. تهیه سری رقت برای تنظیم دستگاه و بدست آوردن کارایی مناسب انجام می‌گیرد. سری رقت میزان متفاوت از غلظت های cDNA شامل  $10^{-1}$ ،  $10^{-2}$ ،  $10^{-3}$ ،  $10^{-4}$  بود که این عمل برای کلیه ژن‌ها و برای ژن‌های مرجع آزمون شد. در انتها کارایی<sup>۲</sup> PCR و میزان Ct هر نمونه و منحنی استاندارد بدست آمد. اگر کارایی بدست آمده از سری رقت کمتر یا بیشتر از ۹۵ تا ۱۰۰ باشد می‌بایست برنامه دستگاه تغییر یابد (مثل تغییر زمان و دمای اتصال یا حتی توالی آغازگر) تا جایی که کارایی مناسب برای نمونه‌های اصلی حاصل شود.

### ۳-۶-۷- ارزیابی اختصاصی بودن آغازگرها

به منظور تأیید اختصاصی بودن آغازگرها از تجزیه منحنی‌های ذوب<sup>۳</sup> استفاده شد. منحنی ذوب با اندازه‌گیری تغییرات فلورسنت در دماهای مختلف به دست می‌آید. یکی از مزایای ویژه Real-Time PCR توانایی ترسیم منحنی ذوب است. در نقطه ذوب، ۵۰ درصد از پیوندهای هیدروژنی در DNAهای دورشته‌ای از هم جدا می‌شوند و میزان فلورسانس بطور ناگهانی تغییر می‌یابد. دمای ذوب مولکول DNA یک عامل ویژه است و به عوامل مختلفی از جمله تعداد نوکلئوتید (هر چه بیشتر باشد دمای ذوب بیشتر

<sup>۱</sup> - Serial dilution

<sup>۲</sup> - Efficiency

<sup>۳</sup> - Melt curve analysis

است)، درصد GC (هر چه بیشتر باشد دمای ذوب بیشتر است) و میزان نمک بستگی دارد. ترسیم منحنی ذوب پس از اتمام فرآیند PCR توسط نرم‌افزار موجود بر روی دستگاه انجام می‌شود. برای رسم منحنی، دستگاه دمای نمونه‌ها را در فواصل زمانی مشخص (مثلاً هر ۵ ثانیه) به مقدار معین (مثلاً ۰/۵ درجه سانتی‌گراد) کاهش می‌دهد و در این دمای جدید، ۵ ثانیه ثابت می‌ماند و همزمان منحنی تغییرات فلورسنت بر حسب دما را که همان منحنی ذوب است ترسیم می‌کند. نرم‌افزار تغییرات فلورسنت را روی محور Y و دمای دستگاه را روی محور X نشان می‌دهد.

### ۳-۶-۸- تجزیه داده‌های Real-Time PCR

به منظور تجزیه داده‌های Real-Time PCR، بیان نسبی هر ژن بر اساس روش منحنی استاندارد نسبی<sup>۱</sup> بر پایه فرمول  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (لیواک و اش‌میتگن،<sup>۲</sup> ۲۰۰۱) و نرم‌افزار محاسباتی با کمک صفحات Excel 2007 و برنامه REST طراحی شد. که مطابق آن میزان ژن (cDNA حاصل از رونوشت) برابر با ۲ به توان منفی تفاوت آستانه سیکل ژن هدف تحت تنش و ژن مرجع متناظر آن منهای تفاوت میانگین‌های آستانه سیکل ژن هدف بدون تنش و ژن مرجع متناظر آن است. پایه ۲ به سبب دو برابر شدن میزان cDNA در هر چرخه PCR است.

---

<sup>۱</sup>- Relative standard curve method

<sup>۲</sup>- Livak, and Schmittgen, 2001



# فصل چہارم

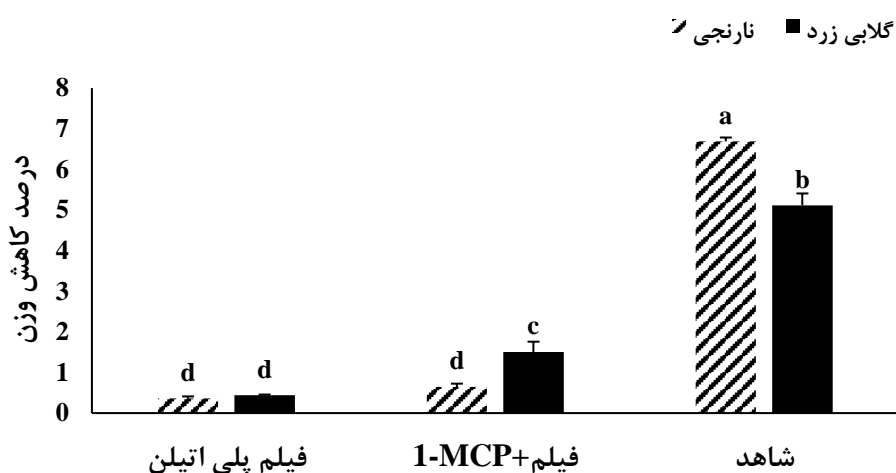
## نتیجہ و بحث

## ۴- نتایج و بحث

### ۴-۱- نتایج حاصل از صفات فیزیولوژیکی

#### ۴-۱-۱- درصد کاهش وزن

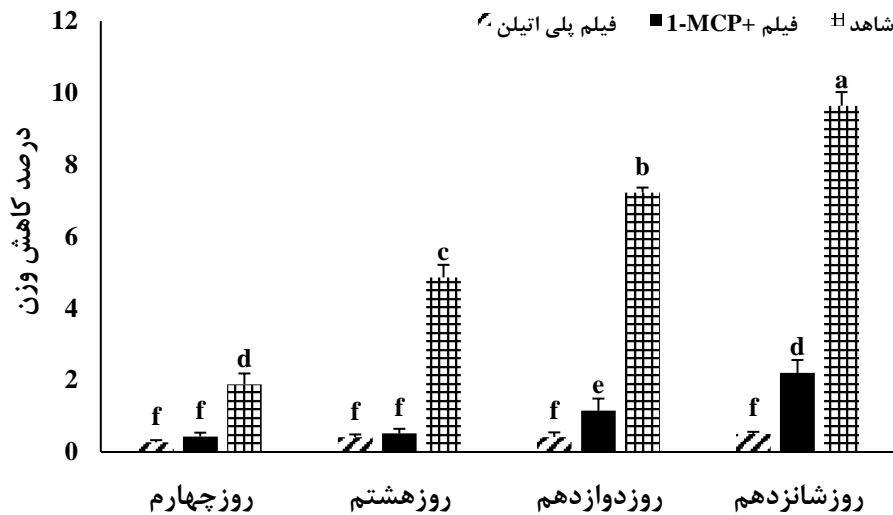
نتایج حاصل از تجزیه واریانس (جدول پیوست ۱) نشان داد که درصد کاهش وزن گوجه فرنگی‌ها در اثرات تیمار، زمان، اثرات دوجانبه لاین در تیمار، تیمار در زمان و اثرات سه جانبه در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود و اثر اصلی لاین، اثر دوجانبه زمان در لاین معنی‌دار نبود. در مقایسه میانگین اثر متقابل لاین در تیمار (شکل ۴-۱) بیش‌ترین درصد کاهش وزن در تیمار شاهد لاین نارنجی حدود ۶/۶۸ درصد و کمترین درصد کاهش وزن در تیمار فیلم پلی‌اتیلن مشاهده شد (جدول پیوست ۶).



شکل ۴-۱- مقایسه میانگین اثر متقابل لاین در تیمار بر درصد کاهش وزن (مقایسه میانگین با استفاده از آزمون دانکن و در سطح احتمال پنج درصد انجام شده است و علامت بار بر روی نمودارها نشان دهنده SD می‌باشد)

همچنین مقایسه میانگین اثر متقابل تیمار در زمان (شکل ۴-۲) در طی دوره نگهداری نشان داد که درصد کاهش وزن با افزایش دوره نگهداری افزایش یافته است و این افزایش در تیمار شاهد بیش‌تر از هر دو نوع بسته‌بندی بوده است طوری که در روز شانزدهم آزمایشات تیمار شاهد تقریباً چهار برابر

درصد کاهش وزن بیش‌تری نسبت به فیلم پلی اتیلن داشته است. در روز شانزدهم اختلاف معنی‌داری بین تیمارها مشاهده می‌شود که تیمار فیلم پلی اتیلن در حفظ درصد کاهش وزن موثرتر از 1-MCP به همراه فیلم پلی اتیلن بوده است (جدول پیوست ۹).



شکل ۴-۲- مقایسه میانگین اثر متقابل تیمار در زمان بر درصد کاهش وزن (مقایسه میانگین با استفاده از آزمون دانکن و در سطح احتمال پنج درصد انجام شده است و علامت بار بر روی نمودارها نشان دهنده SD می‌باشد)

بررسی نتایج نشان داد که در طول مدت انبارداری درصد کاهش وزن در نمونه‌های شاهد با اختلاف معنی‌داری بیش‌تر از نمونه‌های تیمار شده است و تیمار فیلم پلی اتیلن موثرتر از تیمار 1-MCP به همراه فیلم پلی اتیلن است. با گذشت زمان و تشدید تبخیر و تعرق به دلیل یکسان نبودن فشار بخار آب در فضاهای بین سلولی بافت‌ها و اتمسفر احاطه کننده میوه از یک‌سو و نیز تشدید فرآیند تنفسی از سوی دیگر، درصد کاهش وزن در طی زمان امری طبیعی است (مستوفی و همکاران،<sup>۱</sup> ۲۰۱۰). شدت تنفس بالا به‌موجب تسریع فرآیندهای رسیدگی و پیری، سبب مصرف مواد غذایی میوه می‌شود (گو و همکاران،<sup>۲</sup> ۲۰۱۳) و این خود سبب کاهش درصد وزن میوه طی انبارداری می‌شود (والرو و همکاران،<sup>۳</sup>

<sup>1</sup> - Mostofi *et al.*, 2012

<sup>2</sup> - Gao *et al.*, 2013

<sup>3</sup> - Valero, 2006

۲۰۰۶). درصد کاهش وزن یکی از مهم‌ترین عوامل در از بین رفتن کیفیت میوه‌ها است (گیلن و همکاران،<sup>۱</sup> ۲۰۰۷). در استفاده از فیلم پلی اتیلن، میزان پایین بودن درصد کاهش وزن به دلیل نفوذپذیری کمتر پوشش بسته‌بندی است و اتمسفر اصلاح شده مناسبی برای حفاظت از میوه‌ها ایجاد نموده است (آلیک و همکاران،<sup>۲</sup> ۲۰۰۳). طبیعت نفوذپذیری مواد بسته‌بندی، رطوبت نسبی درون بسته‌ها را تغییر می‌دهد که منجر به کاهش اتلاف رطوبت و میزان تنفس محصول می‌شود، کاهش میزان تنفس سبب پایین آمدن درصد کاهش وزن محصول می‌شود (کادور و واتکین،<sup>۳</sup> ۲۰۰۰). گوجه‌فرنگی‌های بسته‌بندی شده در اتمسفر تعدیل یافته فعال، فعالیت پلی‌گالاکتروناز را به تاخیر انداخته و منجر به کاهش اساسی در از دست دادن وزن و فساد آن در مقایسه با میوه‌های بسته‌بندی نشده می‌شود (ناخاسی و همکاران،<sup>۴</sup> ۱۹۹۱). که در پژوهش حاضر استفاده از فیلم پلی‌اتیلن در کاهش افت وزن موثرتر از شاهد بود. گوجه‌فرنگی در حال رسیدن از متابولیسم تنفسی بالایی برخوردار است و کاربرد 1-MCP می‌تواند با کند نمودن متابولیسم میوه، درصد کاهش وزن آن را نیز کمتر کند (نعمت‌پور و مرتضوی، ۱۳۹۱) در پژوهش حاضر کاربرد ۵ میکرولیتر در لیتر 1-MCP به همراه فیلم پلی‌اتیلن اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد داشت. کاربرد ۵ میکرولیتر در لیتر 1-MCP در جلوگیری از کاهش درصد وزن موثر بوده، که با کاهش نسبت تنفس ارتباط معنی‌داری دارد

#### ۴-۱-۲- pH عصاره

براساس جدول تجزیه واریانس (جدول پیوست ۱)، pH عصاره نمونه‌ها در تمامی اثرات به جز اثر سه جانبه لاین در تیمار در زمان، در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد. مقایسه میانگین اثر متقابل لاین در تیمار (شکل ۴-۳) نشان داد که بین دو لاین اختلاف معنی‌داری وجود دارد و لاین گلابی زرد pH بالاتری

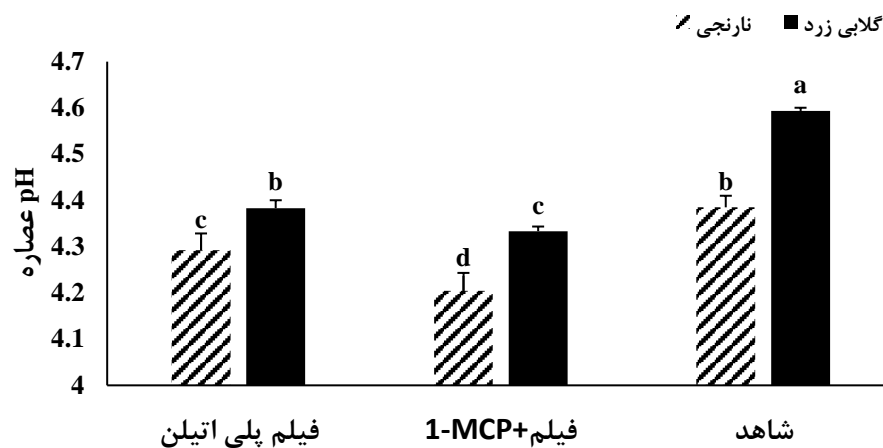
<sup>1</sup> - Guillén., 2007

<sup>2</sup> - Alique., 2003

<sup>3</sup> - Kader and Watkins., 2000

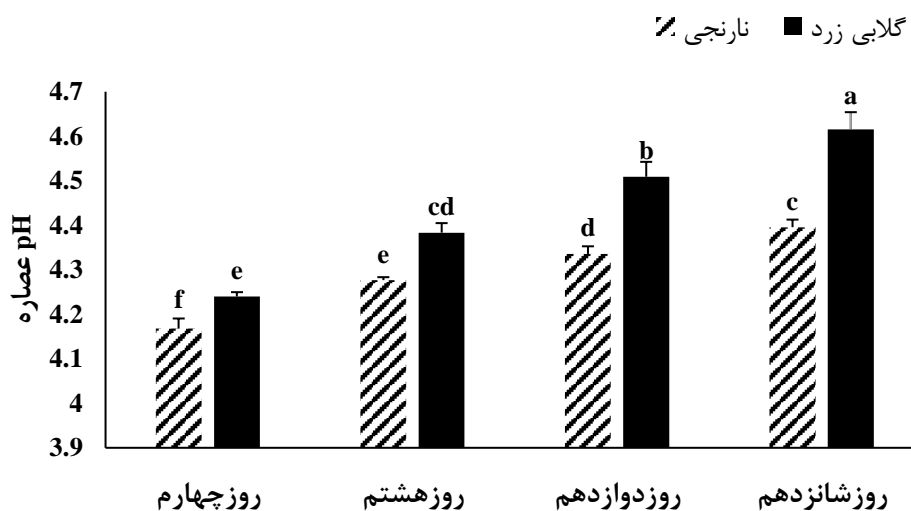
<sup>4</sup> - Nakhasi., 1991

نسبت به لاین نارنجی دارد. و تیمار 1-MCP به همراه فیلم پلی اتیلن در حفظ pH موثرتر از فیلم پلی اتیلن است (جدول پیوست ۶).



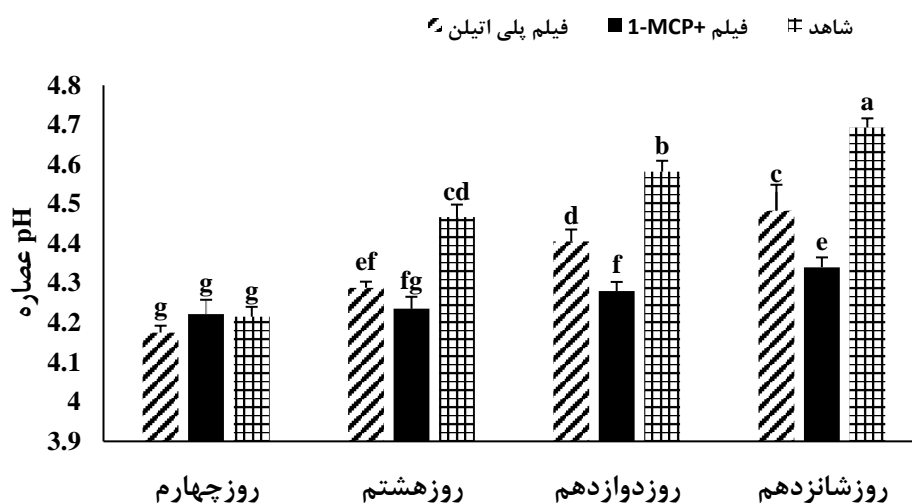
شکل ۴-۳- مقایسه میانگین اثر متقابل لاین در تیمار بر pH عصاره (مقایسه میانگین با استفاده از آزمون دانکن و در سطح احتمال پنج درصد انجام شده است و علامت بار بر روی نمودارها نشان دهنده SD می باشد)

نتایج مقایسه میانگین لاین در زمان (شکل ۴-۴) نشان داد که در طول مدت انبارداری، pH عصاره افزایش پیدا کرده و در روز شانزدهم آزمایشات افزایش pH عصاره لاین گلایی زرد به طور معنی داری بیش تر از لاین نارنجی بود (جدول پیوست ۷).



شکل ۴-۴- مقایسه میانگین اثر متقابل لاین در زمان بر pH عصاره (مقایسه میانگین با استفاده از آزمون دانکن و در سطح احتمال پنج درصد انجام شده است و علامت بار بر روی نمودارها نشان دهنده SD می باشد)

مقایسه میانگین اثر متقابل تیمار در زمان (شکل ۴-۵) نشان داد، با افزایش مدت زمان انبارداری میزان pH عصاره نمونه‌ها افزایش یافت. که در بین تیمارها، بیش‌ترین افزایش در تیمار شاهد به میزان ۴/۶۹، در تیمار فیلم پلی اتیلن به میزان ۴/۴۸ و در تیمار 1-MCP به همراه فیلم پلی اتیلن به میزان ۴/۳۴ مشاهده شد. نتایج نشان داد که تیمار 1-MCP به همراه فیلم پلی اتیلن در حفظ pH عصاره نمونه‌ها موثرتر عمل کرده است (جدول پیوست ۸).



شکل ۴-۵- مقایسه میانگین اثر متقابل زمان در تیمار pH عصاره (مقایسه میانگین با استفاده از آزمون دانکن و در سطح احتمال پنج درصد انجام شده است و علامت بار بر روی نمودارها نشان دهنده SD می‌باشد)

pH بیانگر درجه ی اسیدی آب‌میوه است. هر چقدر که میزان اسیدهای آلی بیش‌تر باشد، pH کمتر خواهد بود. بنابراین کاهش pH در اثر تیمارهای مختلف، نسبت به شاهد بیانگر حفظ اسیدهای آلی در میوه طی مدت انبارداری است (علیخانی و همکاران<sup>۱</sup>، ۲۰۰۹). مقایسه میانگین صفت pH و اسیدیته قابل تیتر نشان داده که طی دوره انبارمانی میزان pH افزایش و میزان اسیدیته قابل تیتر با گذشت زمان طی دوره انبارداری کاهش می‌یابد (پاشازاده و همکاران، ۱۳۹۴) از آنجا که یکی از مواد اولیه مورد مصرف در تنفس، اسیدهای آلی است با توجه به کاهش اسیدیته و افزایش pH در طول نگهداری در

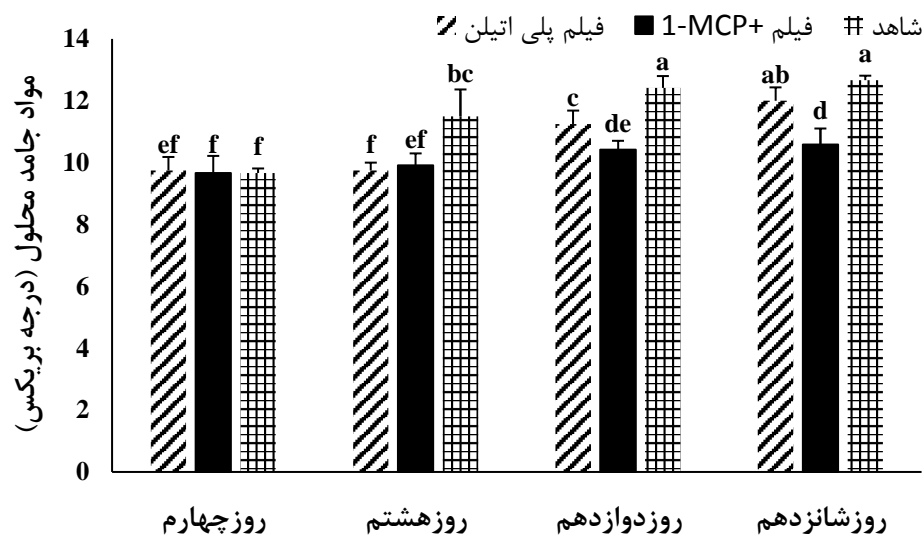
<sup>۱</sup>- Alikhani *et al.*, 2009

سردخانه، به نظر می‌رسد این تغییرات به دلیل مصرف اسیدهای آلی در سوخت و ساز میوه یا تبدیل آن‌ها به قند باشد (گنجی مقدم و شیخ الاسلامی، ۱۳۸۴). استفاده از تیمار 1-MCP با غلظت 1ppm اثر معنی‌داری در کاهش pH عصاره دو رقم سیب (ولثی، دیررس مشهد) داشت که علت آن تاثیر 1-MCP بر اتیلن است که باعث حفظ اسیدهای آلی در سیب می‌شود. که در پژوهش حاضر کاربرد 1-MCP در کنترل روند تغییرات pH مشابه با نتایج (پاشازاده و همکاران، ۱۳۹۴) در دو رقم سیب و (مدرس، ۱۳۹۳) در میوه توت فرنگی بود. روند تغییرات pH می‌تواند ناشی از تغییرات بیوشیمیایی درون میوه باشد که در تیمار شاهد بسیار شدید و در تیمار ۱ میکرولیتر برلیتر 1-MCP بسیار خفیف بوده است. همچنین بررسی‌ها نشان داد که استفاده از فیلم‌های بسته‌بندی با اتمسفر تغییر یافته سبب کاهش تنفس و به تاخیر انداختن تغییرات کیفی از جمله pH می‌شود (طباطبایی کلور و همکاران<sup>۱</sup>، ۲۰۱۶).

#### ۳-۱-۴- مواد جامد محلول

جدول تجزیه واریانس (جدول پیوست ۱) نشان داد که اثر اصلی لاین و تیمار و زمان و اثر متقابل تیمار در زمان در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد و اثر متقابل لاین در تیمار، لاین در زمان و اثر سه جانبه لاین در زمان در تیمار معنی‌دار نبود. در مقایسه میانگین اثر متقابل تیمار در زمان (شکل ۴-۶) مشاهده شد که در طی دوره انبارمانی در ۲۰ درجه سانتی‌گراد در تمام تیمارها مواد جامد محلول روند رو به افزایشی داشته اما این روند در تیمار شاهد بیش‌تر بوده است و تیمار 1-MCP به همراه فیلم پلی‌اتیلن در حفظ مواد جامد محلول موثرتر بود (جدول پیوست ۸). روند افزایشی مشاهده شده در مواد جامد محلول در تیمارها به نظر می‌رسد که در اثر تنفس محصول در طی زمان نگهداری و متابولیسم تبدیل نشاسته به قند است.

<sup>۱</sup> - Tabatabaekolor, 2016



شکل ۴-۶- مقایسه میانگین اثر متقابل زمان در تیمار مواد جامد محلول (مقایسه میانگین با استفاده از آزمون دانکن و در سطح احتمال پنج درصد انجام شده است و علامت بار بر روی نمودارها نشان دهنده SD می باشد)

قسمت اعظم مواد جامد محلول در میوه‌ها شامل قندها و درصد کمی نیز شامل اسیدهای آمینه، اسیدهای آلی، ویتامین‌ها و مواد معدنی است. رسیدن میوه و افت رطوبت در میوه گوجه‌فرنگی معمولاً باعث افزایش مقدار مواد جامد محلول در آن می‌شود (رونک یو و یوا ون،<sup>۱</sup> ۲۰۰۳). در گوجه‌فرنگی‌های شاهد به دلیل پیشرفت پدیده پیری پلی‌ساکاریدهای دیواره سلولی هضم شده و مواد جامد محلول افزایش می‌یابد (سیرین واسا و همکاران،<sup>۲</sup> ۲۰۰۲). همچنین احمدی و همکاران (۱۳۹۵) بیان کردند افزایش مواد جامد محلول موجود در گوجه‌فرنگی طی مدت زمان نگهداری را می‌توان به تبدیل درشت مولکول‌هایی مانند نشاسته به ریز مولکول‌هایی مانند مالتوز، گلوکز و دکستروزها و کاهش رطوبت محصول نسبت داد. در بررسی انجام شده توسط شواخی و بهمدی (۱۳۹۴) در میوه سیب، تیمار 1-MCP با غلظت ۱ ppm در جلوگیری از افزایش مواد جامد محلول بهتر از شاهد بود. نتایج حاصل از پژوهش مهرزاد و محمدی ثانی (۱۳۹۴) نشان داد که با افزایش زمان نگهداری، درصد مواد جامد محلول

<sup>۱</sup> - Rong-yu and Yao-wen 2003

<sup>۲</sup> - Srinivasa *et al* 2002



گوجه فرنگی‌های تیمارهای مختلف افزایش یافت که این وضعیت با توسعه فعالیت آنزیم پلی-گالاکتوروناز و انحلال پکتین موجود در بافت گوجه‌فرنگی همراه است. همچنین نتایج این پژوهش نشان داد که تیمار 1-MCP در غلظت ۱ و ۱/۳۵ میکرولیتر بر لیتر بیش‌تر از سایر تیمارها از افزایش مواد جامد محلول گوجه‌فرنگی‌ها طی دوره نگهداری جلوگیری می‌کند. همچنین دفلیپی و همکاران<sup>۱</sup> (۲۰۰۴) بیان کردند که افزایش مقدار ساکاروز در میوه‌های تیمار شده با 1-MCP نسبت به میوه‌های تیمار نشده به کندی صورت می‌گیرد و تیمار 1-MCP با جلوگیری از تولید قندهای احیا کننده و هم‌زمان با کاهش تنفس، مانع از رسیدن مواد جامد محلول به حداکثر مقدار خود می‌شود. با توجه به اینکه شدت تنفس در محصولات تیمار شده با 1-MCP کاهش می‌یابد (جونگ و همکاران،<sup>۲</sup> ۲۰۰۲)، پس به دنبال آن، کاهش مواد جامد محلول هم کمتر می‌شود (جعفرپور و همکاران، ۱۳۹۴) که با پژوهش حاضر مطابقت دارد. در نتیجه اثر تیمار 1-MCP به همراه فیلم پلی اتیلن به طور موثری از افزایش مواد جامد محلول ممانعت می‌کند.

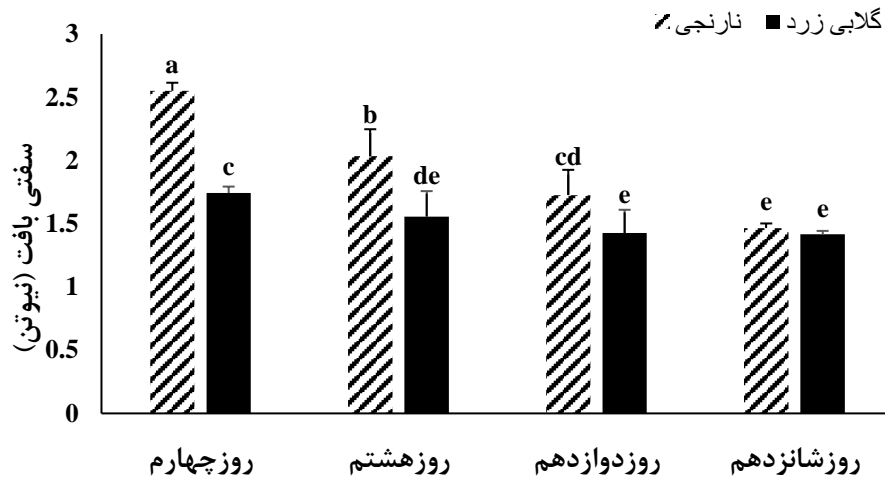
#### ۴-۱-۴ - سفتی بافت

بر اساس جدول تجزیه واریانس (جدول پیوست ۱) سفتی بافت گوجه‌فرنگی‌ها در اثرات اصلی و در اثرات متقابل لاین در زمان و تیمار در زمان با سطح ۱ درصد معنی‌دار شد و در اثر متقابل لاین در تیمار و اثر سه جانبه لاین در تیمار در زمان معنی‌دار نبود. مقایسه میانگین اثر متقابل لاین در زمان (شکل ۴-۷) نشان داد که با گذشت زمان مقدار سفتی بافت لاین‌های گوجه‌فرنگی کاهش می‌یابد و تغییرات سفتی بافت لاین گلابی زرد در طی دوره نگهداری کمتر از لاین نارنجی، تغییرات کاهشی داشت. در

<sup>۱</sup> - Defilippi 2004

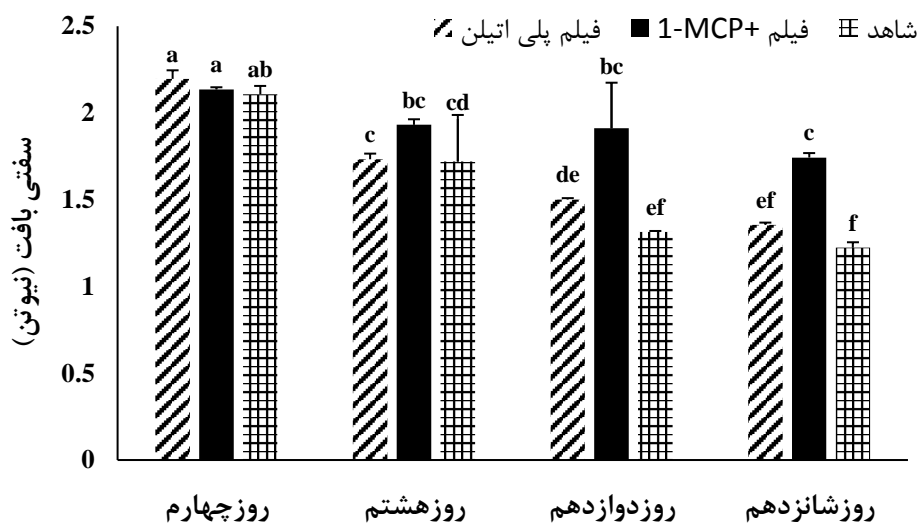
<sup>۲</sup> - Jeong et al 2002

پایان دوره انبارمانی تقریباً در حدود ۱ درصد در لاین نارنجی و ۵ درصد در لاین گلابی زرد نسبت به روز چهارم کاهش سفتی در هر دو لاین دیده می‌شود (جدول پیوست ۷).



شکل ۴-۷- مقایسه میانگین اثر متقابل لاین در زمان بر سفتی (مقایسه میانگین با استفاده از آزمون دانکن و در سطح احتمال پنج درصد انجام شده است و علامت بار بر روی نمودارها نشان دهنده SD می‌باشد)

در بررسی مقایسه میانگین اثر متقابل تیمار در زمان (شکل ۴-۸)، با گذشت زمان مقدار سفتی بافت نمونه‌های گوجه‌فرنگی کاهش یافت و تیمار 1-MCP به همراه فیلم پلی اتیلن توانست کاهش میزان سفتی بافت را به حداقل رساند. تیمار فیلم پلی اتیلن در کاهش سفتی بافت با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری نداشتند. پس در نتیجه سفتی بافت نمونه‌های گوجه‌فرنگی در روز شانزدهم در تیمار 1-MCP به همراه فیلم پلی اتیلن بیش‌تر از تیمار فیلم پلی اتیلن و تیمار شاهد بود (جدول پیوست ۸).



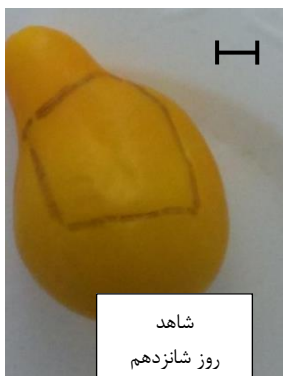
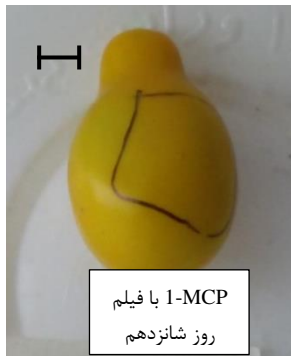
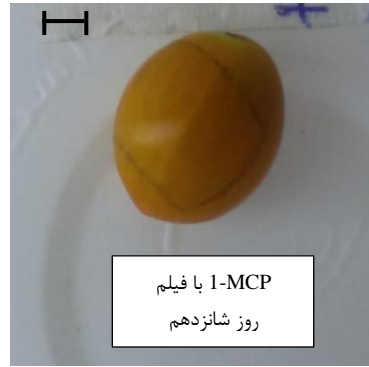
شکل ۴-۸- مقایسه میانگین اثر متقابل زمان در تیمار بر سفتی (مقایسه میانگین با استفاده از آزمون دانکن و در سطح احتمال پنج درصد انجام شده است و علامت بار بر روی نمودارها نشان دهنده SD می باشد)

با افزایش مدت زمان نگهداری و همزمان با توسعه فعالیت‌های آنزیمی و پیشرفت مراحل رسیدگی، سفتی بافت میوه کاهش می‌یابد (گودرزی، ۱۳۹۳). سفتی یکی از ویژگی‌های کیفی مهم گوجه‌فرنگی است که بیانگر خواص سطحی و داخلی آن است. سفتی بافت گوجه‌فرنگی در طول فرآیند رسیدگی در اثر تجزیه پروتوپکتین‌های نامحلول به اسید پکتیک و پکتین‌های محلول کاهش می‌یابد (میدانی<sup>۱</sup>، ۲۰۰۳). کاهش تنفس و کاهش در از دست دادن رطوبت گوجه‌فرنگی در حفظ سفتی بافت در طول دوره انبارمانی نقش دارند. استفاده از پوشش و دمای مناسب در رسیدن به این هدف موثر است (تازدلی و بیندرلی<sup>۲</sup>، ۱۹۹۸). در بررسی انجام شده توسط طباطبایی کلور و همکاران (۱۳۹۳) بین دو نوع بسته‌بندی پلی‌اتیلن و پلی‌پروپیلن با دماهای مختلف در گوجه‌فرنگی مشخص شد که پوشش پلی‌اتیلن و دمای چهار درجه سانتی‌گراد سفتی بافت محصول را بهتر حفظ کرد. نتایج حاصل از پژوهش ابراهیمیان و همکاران (۱۳۹۱) نشان داد که بهترین حفظ سفتی بافت در پوشش پلی‌اتیلن با منفذ میکرونی و دمای چهار درجه سانتی‌گراد و کمترین حفظ سفتی بافت در شاهد و دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد رخ


<sup>۱</sup> -Meidani, 2003

<sup>۲</sup> - Taşdelen and Bayindirli, 1998

داد. مهم‌ترین عوامل نرم شدن بافت میوه فعالیت آنزیم‌های پلی‌گالاکتورناز، گالاکتوسیداز و پکتین متیل استراز است. هر عاملی که سبب جلوگیری از فعالیت این آنزیم‌ها گردد باعث حفظ بهتر سفتی می‌شود. همچنین مارتینز و همکاران (۲۰۰۳) بیان کردند که افزایش غلظت دی‌اکسید کربن و کاهش غلظت اکسیژن، شدت تنفس و فعالیت‌های متابولیکی میوه را به حداقل می‌رساند و بسته‌بندی در اتمسفر اصلاح شده با کاهش یا جلوگیری از فعالیت‌های آنزیم‌های تجزیه‌کننده پکتین موجب حفظ سفتی بافت می‌شوند. که در پژوهش حاضر لاین‌های گوجه‌فرنگی‌های بسته‌بندی شده در فیلم پلی‌اتیلن با گوجه‌فرنگی‌های بدون بسته‌بندی اختلاف معنی‌داری داشتند. همچنین در پژوهش انجام شده توسط مکوندی (۱۳۹۲) تیمار دو میکرولیتر در لیتر 1-MCP به علاوه کلرید کلسیم سه درصد نسبت به سایر تیمارها به طور موثرتری از کاهش سفتی و در نتیجه نرم شدن بافت میوه‌ها در طول انبارداری جلوگیری می‌کند. همچنین کاربرد 1-MCP با غلظت ۱ PPM اثر قابل توجهی در جلوگیری از کاهش سفتی بافت نسبت به شاهد در سیب داشت (شواخی و بهمدی، ۱۳۹۴). بنابراین در پژوهش حاضر کاربرد فیلم پلی‌اتیلن و تیمار 1-MCP با یکدیگر اثر مطلوب تری در حفظ سفتی بافت دارند.



شکل ۴-۹- اثر تیمارهای مختلف بر تغییر رنگ دو لاین گوجه فرنگی

مقیاس  برابر با نیم سانتی متر

#### ۴-۱-۵- همبستگی بین صفات

یکی از دلایل همبستگی بین دو صفت می تواند به علت قرار گرفتن ژن های کنترل کننده آن دو صفت روی یک کروموزوم باشد. در خصوص صفات کیفی همبستگی بین صفات منحصرأ به مکان ژنی کنترل کننده آن صفات و ارتباط آن ها روی کروموزوم بستگی دارد که این ارتباط می تواند بصورت لینکاژ ژن ها یا اثر متقابل غیر آلی (اپی ستازی) و یا ترکیبی از این حالات جلوه کند. در مورد صفات کمی علاوه بر ژن های کنترل کننده صفت، پارامترهای مختلف از جمله عوامل اقلیمی می تواند موجب همبستگی بین صفات شود. وجود همبستگی بین زوج صفات، در کارهای اصلاحی بخصوص در امر گزینش بر اساس تعدادی از صفات بسیار ضروری می باشد. بنابراین از روش های انتخاب غیر مستقیم نیز در جهت بهبود صفات می توان بهره برد. در حقیقت به کمک روش های اصلاح کلاسیک و تلاقی بین برخی از این گونه ها که قابل تلاقی می باشند می توان این صفات را در ارقام زراعی بهبود بخشید. در پژوهش حاضر، بررسی اثر همبستگی (جدول پیوست ۲) مشخص کرد که درصد کاهش وزن با pH و مواد جامد محلول همبستگی مثبت و معنی داری دارند که در واقع ارتباط مستقیمی بین درصد کاهش وزن با pH و مواد جامد محلول وجود دارد و با افزایش یا کاهش این صفت، pH و مواد جامد محلول به ترتیب افزایش یا کاهش می یابند. در صورتی که با سفتی همبستگی منفی مشاهده شد و با افزایش درصد کاهش وزن، سفتی کاهش می یابد در بررسی صفت pH با مواد جامد محلول همبستگی مثبت معنی داری مشاهده شد.

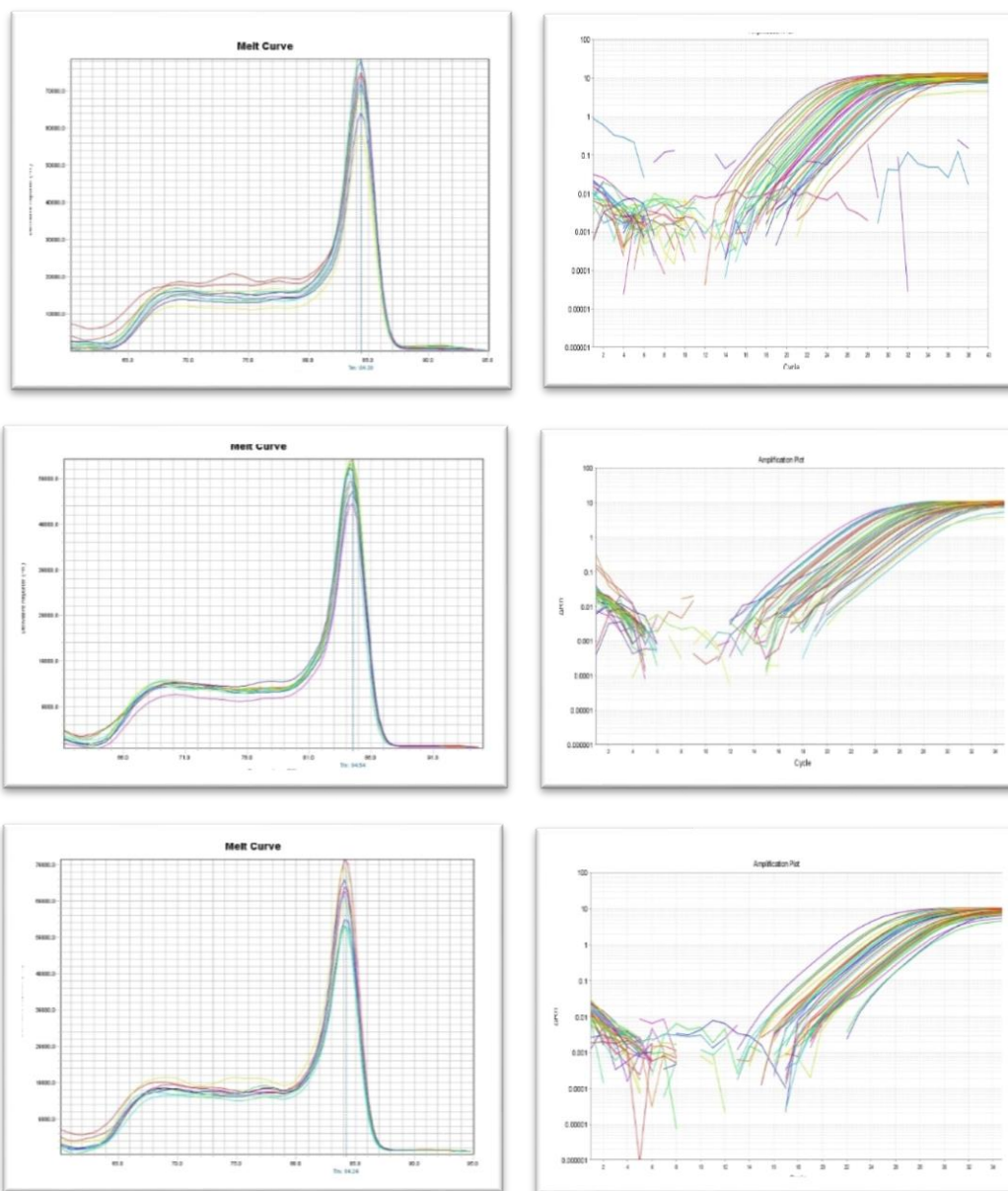
## ۴-۲- نتایج بیان ژن

با توجه به نتایج آزمایشات فیزیولوژیکی یکی از لاین‌های مقاوم (لاین نارنجی) برای بررسی بیان ژن‌ها و آنالیز پروفایل ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز اتیلن در شرایط تیماری مختلف انتخاب شد. در حقیقت مبنای انتخاب این ژن‌ها اهمیت آن‌ها در مسیر بیوسنتز اتیلن بود با توجه به اینکه در این مسیر زیرخانواده‌های متفاوتی وجود دارد، در این تحقیق تعدادی از زیرخانواده‌های مهم که با توجه به مرور منابع، بیش تر تحت تاثیر قرار می‌گرفتند بررسی شدند.

## ۴-۲-۱- تغییرات سطوح بیان ژن ACO1

در تحقیق حاضر به منظور اطمینان از اختصاصیت آغازگرها و تکثیر صحیح، آنالیز منحنی ذوب و

تکثیر شکل (۴-۱۰) استفاده شد



شکل (۴-۱۰) منحنی تکثیر (سمت راست) و منحنی ذوب (سمت چپ) در تعدادی از ژن های بررسی شده در تیمارهای مختلف

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تیمارهای فیلم پلی اتیلن و 1-MCP به همراه فیلم پلی اتیلن در مقایسه با شاهد میزان بیان ژن ACO1 را کاهش دادند (شکل ۴-۱۱). میزان بیان ژن ACO1 و در نتیجه تولید اتیلن در تیمار شاهد در چهار روز پس از برداشت در سطح پایینی قرار داشت و در روز هشتم میزان بیان ژن مذکور افزایش و به دنبال آن در روز ۱۲ و ۱۶ نیز کاهش نشان داد. تاثیر تیمار 1-MCP به



همراه فیلم پلی اتیلن در چهار روز پس از برداشت بهتر از تیمار فیلم پلی اتیلن بود. اما در هشت روز پس از برداشت که بیان ژن ACO1 در مقایسه با زمان‌های دیگر بیشتر شده است، تیمار فیلم پلی اتیلن تاثیر بهتری در کنترل ژن ACO1 نشان داد. در سایر زمان‌ها، تیمار 1-MCP به همراه فیلم پلی اتیلن بر بهتر عمل کرد. این می‌تواند نشان دهنده تاثیر دراز مدت تیمار 1-MCP به همراه فیلم پلی اتیلن بر مهار بیان ژن ACO1 باشد. در حقیقت تیمار بسته‌بندی تولید اتیلن را از طریق بازدارندگی فعالیت ACC اکسیداز در پوسته و در پالپ میوه موز مهار می‌کند. ترکیب تیمار 1-MCP و بسته‌بندی منجر به کاهش تولید اتیلن به علت بازدارندگی فعالیت ACC سنتاز و ACC اکسیداز می‌شود (کتسا و همکاران<sup>۱</sup>، ۲۰۱۳). اتیلن نقش مهمی در تنظیم رسیدگی میوه و پیری دارد و به صورت مستقیم کیفیت خوراکی شامل ظاهر، رنگ، بافت و مزه سیب‌های تازه را تحت تاثیر قرار می‌دهد (یانگ و همکاران<sup>۲</sup>، ۲۰۱۳). ژن‌های رمزگذار ۱-آمینوسیکلوپروپان-کربوکسیلاز (ACC) سنتاز (ACS) و ACC اکسیداز (ACO)، دو آنزیم کلیدی کاتالیز کننده مراحل آخر مسیر بیوسنتز اتیلن هستند، و اهداف اولیه مطالعات رسیدگی میوه و دست‌ورزی در گوجه‌فرنگی و گونه‌های دیگر هستند (جیووانیون<sup>۳</sup>، ۲۰۰۴؛ تئولوژیس<sup>۴</sup>، ۱۹۹۴). در مطالعه‌ای مشخص شد که تولید اتیلن همبستگی نزدیکی با بیان ACO1 در گیاه سیب دارد و این موضوع از طریق تولید لاین ترا ریخت *anti-ACO1* تأیید گردید که بازدارندگی بیان ACO1 منجر به تولید سطوح پائین اتیلن شد (شافر<sup>۵</sup>، ۲۰۰۷). رز و همکاران (۱۹۹۲) گزارش نمودند که بیان *MdACO1* با تولید اتیلن در مدت رسیدگی میوه افزایش پیدا می‌یابد. یانگ و همکاران (۲۰۱۳) نیز در مطالعه خود سه ژن ACO را شناسایی کردند. در تحقیق آن‌ها، بیان ژن ACO1 در مدت رسیدگی میوه افزایش پیدا کرد اما بیان ژن ACO2 تغییری نشان نداد و بیان ژن ACO3 نیز کاهش یافت. نتایج آن‌ها

---

<sup>۱</sup> - Ketsa *et al.*, 2013

<sup>۲</sup> - Yang *et al.*, 2013

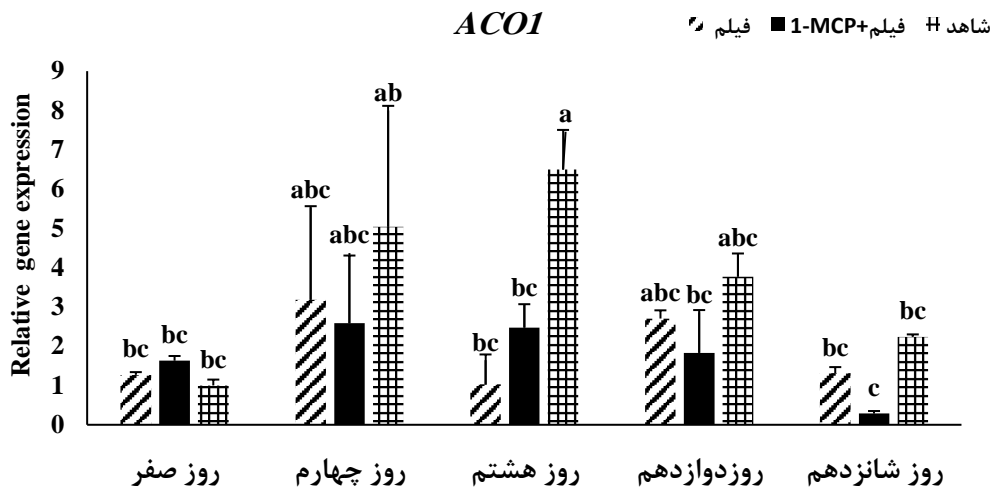
<sup>۳</sup> - Giovannoni, 2004

<sup>۴</sup> - Theologis, 1994

<sup>۵</sup> - Schaffer, 2007

<sup>۶</sup> - Rose, 1992

نشان داد که تیمار 1-MCP تاثیر شدیدی بر تولید و دریافت اتیلن در میوه سیب دارد و بیان ژن ACO1 بوسیله تیمار 1-MCP بطور معنی داری مهار شد. واکاس<sup>۱</sup> و همکاران (۲۰۰۶) بیان داشتند که بیان *MdACO1* بوسیله تیمار 1-MCP مهار می شود.



شکل ۴-۱۱- بیان نسبی ژن ACO1 در تیمارها و مراحل مختلف نمونه برداری (مقایسه میانگین با استفاده از آزمون دانکن و در سطح پنج درصد انجام شده است و علامت بار بر روی نمودارها نشان دهنده SE می باشد)

#### ۴-۲-۲- تغییرات سطوح بیان ژن ACO5

با توجه به نتایج بدست آمده می توان اظهار داشت که ژن ACO5 در مقایسه با ژن ACO1 بیان کمتری در نمونه شاهد داشت (شکل ۴-۱۲). بیان این ژن در چهار روز پس از برداشت در تمامی تیمارها تقریباً یکسان بود. اما در روز هشتم و دوازدهم و چهاردهم که بیان این ژن در شاهد افزایش یافت، هر دو تیمار 1-MCP به همراه فیلم پلی اتیلن و فیلم پلی اتیلن به صورت موثری سطح بیان ژن را کاهش دادند. از 1-MCP به عنوان یک آنتاگونیست قوی با اتیلن در جایگاه های اتصال گیرنده، در فاز پس از برداشت استفاده می شود (بلیکر و کند<sup>۲</sup>، ۲۰۰۰). تحقیقات نشان داده است در کنار جلوگیری از پاسخ های وابسته به اتیلن بواسطه اتصال به گیرنده های اتیلن، 1-MCP می تواند از طریق بازدارندگی بیان ژن برای

<sup>۱</sup> - Wakasa *et al.*, 2004

<sup>۲</sup> - Bleecker and Kende, 2000

بیوسنتز اتیلن، تولید آن را متوقف کند (کیبر و همکاران،<sup>۱</sup> ۱۹۹۳؛ تاتسوکوی و اندو، ۲۰۰۶). تحقیقات قبلی در میوه گوجه‌فرنگی نشان دادند که حداقل ۹ زیرخانواده *LeACS* و ۵ زیرخانواده *LeACO* در تنظیم سنتز پروتئین *ACS* و *ACO* نقش دارند درحالی‌که *LeACS2*، *LeASC4*، *LeACO1* و *LeACO4* مسئول ویژه برای تولید زیاد اتیلن هستند (باری و همکاران، ۱۹۹۶<sup>۳</sup>، ۲۰۰۰؛ کلی و جیووانیون<sup>۴</sup>، ۲۰۱۱) نکته جالب در مورد این ژن و ژن قبلی نشان داد بیان هر دو ژن مذکور در حالت شاهد در ۱۰ روز پس از برداشت به بالاترین میزان خود رسید و در انتهای دوره کاهش یافت. بسته‌بندی (اتم‌سفر تغییر یافته) غلظت اکسیژن را کاهش و غلظت دی‌اکسید کربن را افزایش می‌دهد (هرتوگ و همکاران<sup>۵</sup>، ۱۹۹۸) و شروع فعالیت خود کاتالیزوری در تولید اتیلن را مهار می‌کند. در حقیقت در این حالت غلظت‌های پایین اکسیژن ممکن است تشکیل اتیلن را در سطح *ACC* اکسیداز که نیازمند اکسیژن می‌باشد، کاهش دهد (کادر<sup>۶</sup>، ۱۹۹۴). دی‌اکسید کربن بالا نیز تولید اتیلن را کاهش می‌دهد. این موضوع احتمالاً بواسطه تاثیرگذاری بر تبدیل *ACC* به اتیلن از طریق *ACC* اکسیداز عمل می‌کند (دی واید و همکاران<sup>۷</sup>، ۲۰۰۳). اتم‌سفر تغییریافته برای میوه موز به صورت قرار دادن میوه در کیسه‌های پلی‌اتیلن حاوی جاذب اتیلن بکار رفت (اسکات و همکاران،<sup>۸</sup> ۱۹۷۰). کتسا و همکاران<sup>۹</sup> (۲۰۰۰) گزارش دادند که موزهای رقم *Sucrier* که در کیسه‌های پلی‌اتیلن حاوی جاذب اتیلن و تمیز کننده دی‌اکسید کربن قرار گرفته بودند، دارای دوره ماندگاری بیش از ۶ هفته بودند.

---

<sup>1</sup> - Kieber *et al.*, 1993

<sup>2</sup> - Tatsuki and Endo, 2006

<sup>3</sup> - Barry *et al.*, 1996, 2000

<sup>4</sup> - Klee and Giovannoni, 2011

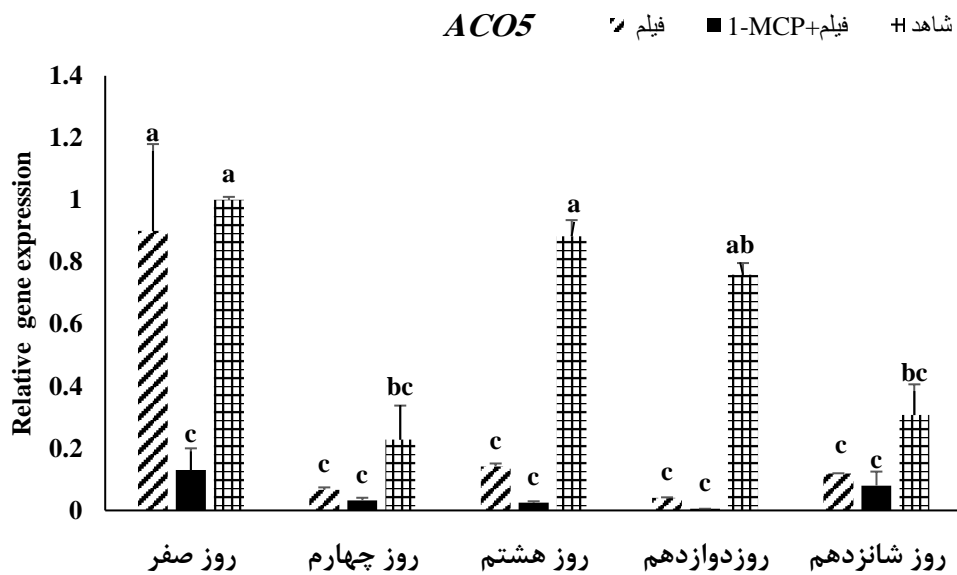
<sup>5</sup> - Hertog *et al.*, 1998

<sup>6</sup> - kader, 1994

<sup>7</sup> - De Wild *et al.*, 2003

<sup>8</sup> - Scott *et al.*, 1970

<sup>9</sup> - Ketsa *et al.*, 2000



شکل ۴-۱۲- بیان نسبی ژن *ACO5* در تیمارها و مراحل مختلف نمونه برداری (مقایسه میانگین با استفاده از آزمون دانکن و در سطح پنج درصد انجام شده است و علامت بار بر روی نمودارها نشان دهنده SE می باشد)

#### ۴-۲-۳- تغییرات سطوح بیان ژن *SAM1*

نتایج بدست آمده نشان داد که ژن *SAM1* نیز در مراحل مختلف پس از برداشت دارای مقادیر متفاوتی از بیان نسبی است که به نوبه خود میزان تولید اتیلن را نیز تحت تاثیر قرار می دهد (شکل ۴-۱۳). بیان این ژن در تیمار شاهد و در روزهای چهارم و هشتم نمونه برداری در بالاترین میزان خود قرار داشت و در مراحل بعد کاهش یافت. روزهای چهارم و هشتم نمونه برداری، پس از اعمال تیمار، تیمار 1-MCP به همراه فیلم پلی اتیلن نسبت به تیمار فیلم پلی اتیلن در مقایسه با شاهد تاثیر بیشتری در بازدارندگی بیان این ژن داشت. اطلاعات حاضر نشان می دهد که به کارگیری تیمارهای مذکور موجب افزایش کیفیت ماندگاری گوجه فرنگی شده است. افزایش دوره ماندگاری و حفظ کیفیت و کمیت محصول، هنگامی که ترکیب درستی (صحيحی) از دما، اتمسفر تغییر یافته و تیمار با 1-MCP بکار گرفته شود، بدست می آید. کتسا و همکاران<sup>۱</sup> (۲۰۱۳) نشان دادند که تاثیرات بسته بندی و 1-MCP افزایشی

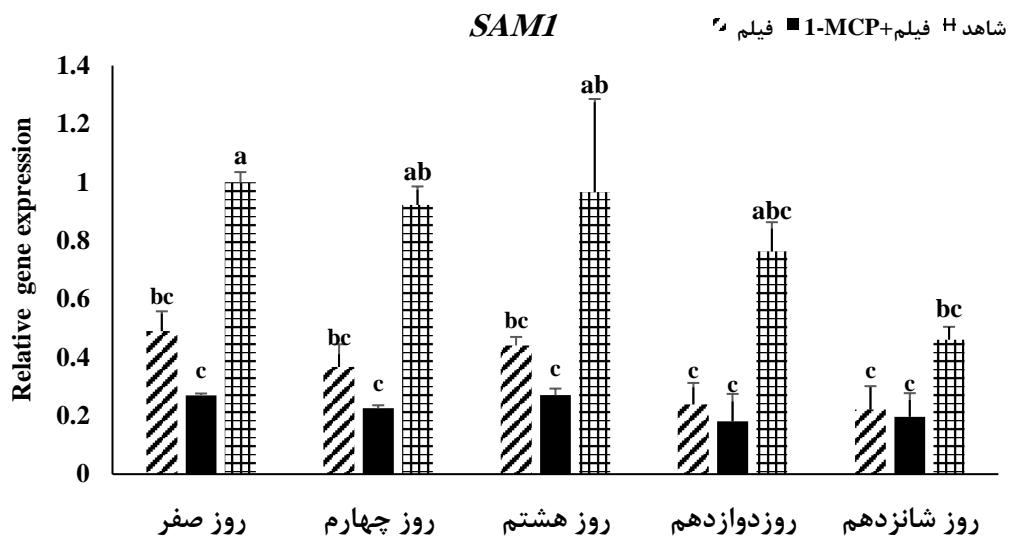
<sup>۱</sup> - Ketsa et al., 2013

است، چراکه تاثیرات بسته‌بندی و 1-MCP دارای سینرژی مثبت بوده، بطوری‌که تیمار ترکیبی دارای طول دوره ماندگاری بالاتری نسبت به مجموع تیمارهای جداگانه بود. در تحقیق حاضر نیز در بخش بیان ژن تیمار 1-MCP به همراه فیلم پلی‌اتیلن به صورت موثرتری تولید و سنتز اتیلن را مهار کرد اتیلن از تبدیل اس-آدنوزیل متیونین (SAM) به 1-آمینوسیکلوپروپین-1-کربوکسیلیک اسید (ACC)، پیش‌ساز مستقیم اتیلن، مشتق می‌شود. دو آنزیم ACC سنتاز و ACC اکسیداز در مسیر سنتز اتیلن وجود دارند. هر یک از این آنزیم‌ها می‌تواند نرخ تولید اتیلن را محدود کند. نکته مهم در این تحقیق این است که تیمارهای مورد استفاده به صورت موثری بیان آنزیم‌های ACC سنتاز (ACS4) و ACC اکسیداز (ACO1) را کاهش دادند. در حالیکه بیان دیگر ژن‌های ACC اکسیداز یعنی ACO5 و SAM تحت تاثیر قرار نگرفت. در حقیقت بیان این ژن‌ها (SAM و ACO5) در تیمار شاهد و سایر تیمارهای به کار گرفته شده تغییر چندانی نداشت. کارایی 1-MCP بواسطه کولتیوار، شرایط نگهداری، دما و مدت تیمار، رسیدگی میوه و زمان برداشت تحت تاثیر قرار می‌گیرد (بلنشیپ و دول<sup>۱</sup>، ۲۰۰۳). موثر بودن 1-MCP تا حدودی با زمان‌های اواخر برداشت کاهش می‌یابد (میر و همکاران<sup>۲</sup>، ۲۰۰۱). تولید اتیلن در میوه سیب در زمان تیمار 1-MCP ممکن است کارایی 1-MCP را تحت تاثیر قرار دهد (واتکین و همکاران، ۲۰۰۰). نتیجه تحقیق حاضر نشان داد کارایی تیمارهای 1-MCP به همراه فیلم پلی‌اتیلن و فیلم پلی‌اتیلن، به خصوص 1-MCP به همراه فیلم پلی‌اتیلن با گذشت زمان پس از انبارداری کاهش می‌یابد که شاید بتوان دلیل این امر را کاهش قدرت و یا تمایل 1-MCP برای اتصال به گیرنده‌های اتیلن عنوان کرد. با توجه به اینکه بیان این ژن و ژن‌های ACO1 و ACS4 در تیمار شاهد و در روز هشتم به بالاترین میزان خود رسید و در سایر مراحل کاهش یافت، شاید بتوان این گونه عنوان کرد که این ژن‌ها در این لاین خاص دارای الگوی بیان یکسانی هستند.

---

<sup>۱</sup> - Blankenship and Dole, 2003

<sup>۲</sup> - Mir et al., 2001



شکل ۴-۱۳- بیان نسبی SAMI در تیمارها و مراحل مختلف نمونه برداری (مقایسه میانگین با استفاده از آزمون دانکن و در سطح پنج درصد انجام شده است و علامت بار بر روی نمودارها نشان دهنده SE می باشد)

#### ۴-۲-۴- سطوح بیان ژن ACS4

همانطور که قبلا اشاره شد ژن های رمزگذار ۱- آمینوسیکلوپروپان-کربوکسیلاز (ACC) سنتاز (ACS) و ACC اکسیداز (ACO)، دو آنزیم کلیدی کاتالیز کننده مراحل آخر مسیر بیوسنتز اتیلن هستند (جیووانیون، ۲۰۰۴؛ تئولوژیس، ۱۹۹۴). مهار تولید اتیلن بوسیله خاموشی بیان ACS و ACO منجر به بازدارندگی شدید فرآیند رسیدگی می شود (گرای و همکاران<sup>۱</sup>، ۱۹۹۲؛ هامیلتون و همکاران<sup>۲</sup>، ۱۹۹۰) نتایج تحقیق حاضر نشان داد که بیان ژن ACS4 بر خلاف سایر ژن ها در تیمار شاهد روند کاهشی داشت. تیمارهای فیلم پلی اتیلن و 1-MCP به همراه فیلم پلی اتیلن، نسبت به شاهد به صورت موثری بیان ژن مذکور را در مراحل مختلف نمونه برداری کاهش دادند (شکل ۴-۱۴). مطالعات نشان می دهد که بیان زیاد ژن های ACS و یا ACO و افزایش فعالیت این دو آنزیم حداقل تا حدودی مسئول افزایش نرخ تولید اتیلن است (واتکین، ۲۰۰۶<sup>۳</sup>). بنابراین افزایش خودبخودی در نرخ تولید اتیلن در طی

<sup>۱</sup> - Gray et al., 1992

<sup>۲</sup> - Hamilton et al., 1990

<sup>۳</sup> - Watkins, 2006

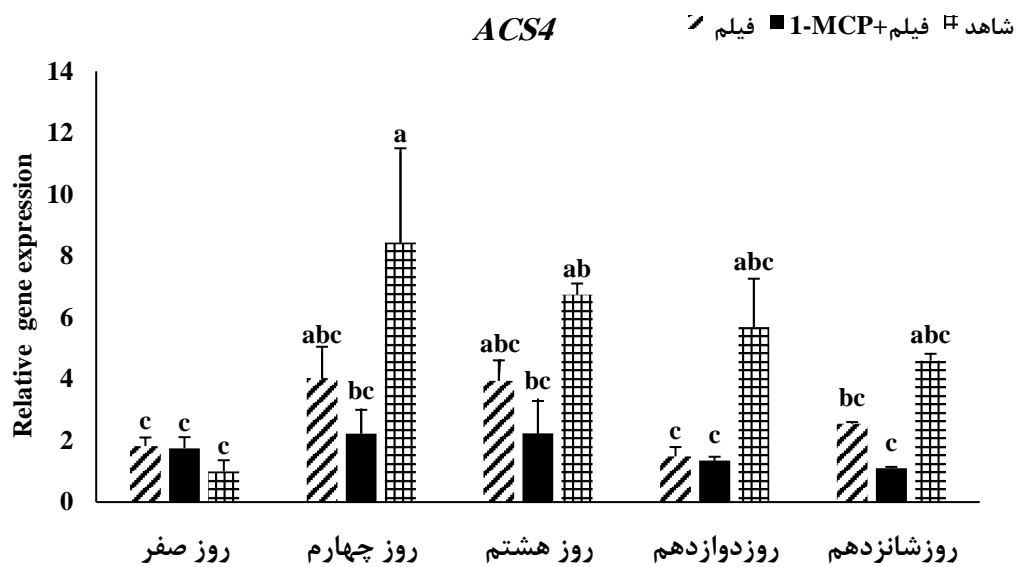
دوره رسیدگی و انبارداری بوسیله تیمار فیلم پلی اتیلن و خصوصاً تیمار 1-MCP به همراه فیلم پلی-اتیلن به ویژه در اواخر دوره انبارداری به خوبی مهار شد. هرچند راهبردهایی مانند تیمار 1-MCP و بسته‌بندی برای به تاخیر انداختن نرمی میوه بکار می‌روند و تا حدود زیادی نیز موفق بوده‌اند. با این وجود، مکانیسم‌های درگیر در فرآیند نرم شدن و رسیدگی میوه هنوز نامشخص است. مطالعات نشان داده‌اند که ژن‌های LeACS2، LeACS4، LeACO1 و LeACO4 مسئول تولید اتیلن در مدت رسیدگی میوه گوجه‌فرنگی هستند (ناکاتوکا و همکاران<sup>۱</sup>، ۱۹۹۸) و گوجه‌فرنگی‌های تراریخت حامل آنتی‌سنس LeACS2 با بازدارندگی ژن‌های LeACS2 و LeACS4 اتیلن کمتری تولید کرده و رسیدگی آنها با مشکل مواجه می‌شود (هامیلتون و همکاران، ۱۹۹۰). در مرحله اول پس از نمونه‌برداری بیان ژن ACS4 به مراتب بیشتر از مراحل دوم تا چهارم پس از برداشت بود که با مطالعاتی که عنوان کردند این ژن نقش اصلی در سنتز اتیلن بازی می‌کند، همخوانی دارد (ناکاتوکا و همکاران، ۱۹۹۸). در مرحله اول پس از اعمال تیمار، تیمار 1-MCP به همراه فیلم پلی اتیلن نسبت به تیمار فیلم پلی اتیلن تاثیر بیشتری در بازدارندگی ژن داشت که به نوبه خود می‌تواند میزان تولید اتیلن را نیز کاهش دهد. در کلیه مراحل پس از اعمال تیمار، تاثیر تیمار 1-MCP به همراه فیلم پلی اتیلن بهتر از تیمار فیلم پلی اتیلن بود. ژو و همکاران<sup>۲</sup> (۲۰۱۵) در تحقیق خود نشان دادند که بیان ژن ACS4 در اثر تیمار 1-MCP کاهش می‌یابد. در مراحل آخر پس از اعمال تیمار اگرچه میزان بیان ژن در نمونه شاهد کاهش پیدا کرده است، اما تیمار فیلم پلی اتیلن تاثیر کمتری بر کاهش میزان بیان ژن داشت، از این رو می‌توان بیان نمود که کارایی این تیمار در دراز مدت کاهش پیدا می‌یابد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که نرم شدن و رسیدگی میوه معمولاً با تولید اتیلن بیشتر همراه است. تیمار 1-MCP در رقابت با گیرنده اتیلن نقش دارد و تولید اتیلن را کاهش داد. در حقیقت می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که ماندگاری بیشتر گوجه‌فرنگی در تیمارهای به کار رفته احتمالاً با کاهش بیان ژن‌های مذکور بررسی شده در این پژوهش

---

<sup>1</sup> - Nakatsuka *et al.*, 1998

<sup>2</sup> - Zhou *et al.*, 2015

دارای همبستگی می‌باشد. اگرچه جهت تایید نتایج زیر نیاز است در تحقیقات آتی میزان و محتوی آنزیم‌های ACC و ACO و میزان اتیلن تولید شده در هر یک از تیمارهای مذکور را اندازه‌گیری کرد تا بتوان با دقت بیشتری درباره چگونگی بیان و کنترل ژن‌های دخیل در مسیر سنتز اتیلن در طی دوران انبارداری و به کارگیری تیمارهای مختلف اظهار نظر کرد. در ضمن وجود تعداد زیادی از عناصر پاسخ دهنده به اتیلن در گیاهان درک مکانیسم‌های مولکولی در این مسیر را پیچیده‌تر خواهد کرد.



شکل ۴-۱۴- بیان نسبی ژن ACS4 در تیمارها و مراحل مختلف برداری (مقایسه میانگین با استفاده از آزمون دانکن و در سطح پنج درصد انجام شده است و علامت بار بر روی نمودارها نشان دهنده SE می‌باشد)



# فصل پنجم

## نتیجہ گیری و پیشہادات

## ۵- نتیجه‌گیری و پیشنهادات

### ۵-۱- نتیجه‌گیری کلی

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که درصد کاهش وزن در هر دو لاین مذکور با گذشت زمان کاهش یافت. اگرچه اختلاف معنی داری بین دو لاین از لحاظ درصد کاهش وزن وجود نداشت. با توجه به اینکه هر دو لاین جزء لاین‌های مقاوم بودند این نتیجه قابل انتظار بود. در مورد این صفت بین دو تیمار فیلم پلی‌اتیلن و 1-MCP به همراه فیلم پلی‌اتیلن اختلاف معنی داری وجود داشت و تیمار فیلم پلی‌اتیلن در حفظ درصد کاهش وزن عملکرد بهتری از خود نشان داد. pH عصاره با گذر زمان در طول دوره انبارداری افزایش یافت، و pH لاین گلابی زرد بیش‌تر از لاین نارنجی بود. در این صفت بین شاهد و دو تیمار دیگر اختلاف معنی داری مشاهده شد. هر چند تیمار فیلم پلی‌اتیلن به همراه 1-MCP به صورت معنی داری توانست نسبت به تیمار فیلم پلی‌اتیلن تغییرات عصاره را کنترل کند. بین دو لاین گوجه‌فرنگی، اختلاف معنی داری از لحاظ میزان مواد جامد محلول وجود نداشت و در طول دوره انبارداری تیمار فیلم پلی‌اتیلن به همراه 1-MCP به صورت موثر و معنی داری تغییرات این صفت را کنترل کرد.

بین دو لاین از نظر صفت سفیدی بافت اختلاف معنی داری مشاهده شد و لاین نارنجی سفیدی بافت بیش‌تری نسبت به لاین زرد داشت. بین شاهد و تیمار فیلم پلی‌اتیلن از نظر این صفت اختلاف معنی داری مشاهده نشد. در حالیکه تیمار فیلم پلی‌اتیلن به همراه 1-MCP به صورت موثری این صفت را کنترل کرد.

نتایج حاصل از این تحقیق در قسمت بیان ژن نشان داد که هر دو تیمار به کار رفته در این تحقیق یعنی فیلم پلی‌اتیلن و 1-MCP به همراه فیلم پلی‌اتیلن به خوبی توانستند بیان ژن‌های دخیل در سنتز اتیلن را کاهش دهند. اگرچه در تمامی زمان‌های مختلف پس از برداشت بین شاهد و دو تیمار دیگر اختلاف معنی داری وجود داشت، اما در اکثر ژن‌ها و زمان‌های مختلف پس از برداشت اختلاف

معنی داری بین دو تیمار فیلم پلی اتیلن و 1-MCP به همراه فیلم پلی اتیلن وجود نداشت. نتایج نشان داد که بین دو لاین گوجه فرنگی در pH عصاره و سفتی بافت اختلاف معنی وجود دارد و لاین نارنجی مقاوم تر از لاین گلابی زرد است. پروفایل بیان ژن های مذکور در زمان های مختلف انبارداری در تمامی تیمارها تا حدودی متفاوت بود، هر چند در تمامی ژن های مورد مطالعه و در هر سه تیمار بیان ژن ها به تدریج افزایش و سپس در پایان دوره کاهش یافت. این نتایج تا حدودی مورد انتظار بود، چراکه روند تولید و سنتز اتیلن در میوه و سبزیجات به صورت تصاعدی افزایش یافته سپس در یک زمان خاص به پیک خود رسیده و سرانجام کاهش می یابد. در این تحقیق دو ژن ACO1 و ACS4 در تیمار شاهد، بیان بالایی داشتند و تیمارهای مختلف به صورت معنی داری بیان این دو ژن را کاهش دادند. این در حالی است که دو ژن SAM1 و ACO5 در شرایط نرمال بیان زیادی نداشتند، هر چند که در این سطوح کم از بیان، تیمارهای مذکور به خوبی و به صورت معنی داری بیان آنها را کاهش دادند. پایین بودن بیان بعضی از ژن های دخیل در مسیر سنتز اتیلن در گیاهان قبلا نیز توسط محققین مختلف گزارش شده است. در مجموع نتایج این تحقیق نشان داده که استفاده از فیلم پلی اتیلن و 1-MCP به همراه فیلم پلی اتیلن در طی زمان های مختلف انبارداری به علت اثرات بازدارنده در سنتز اتیلن و جلوگیری از تنفس در طول دوره انبارداری، قادر به حفظ کیفیت و کمیت محصولات ذخیره شده در طول دوره انبارداری میگردد.

## ۵-۲- پیشنهادات

- ۱- استفاده از تیمارهای مختلف 1-MCP به منظور شناسایی بهترین غلظتی که در آن رسیدگی به تعویق افتد و کمترین کاهش در کیفیت محصول حاصل گردد.
- ۲- اندازه‌گیری سایر صفات مرتبط با رسیدگی از قبیل صفات آنزیمی مانند سلولاز و پکتیناز.
- ۳- بررسی بیان سایر ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز اتیلن به همراه ژن‌های گیرنده اتیلن و زیر خانواده‌های مختلف ژن‌های مذکور به منظور پی بردن به پروفایل بیان ژن‌ها تحت شرایط نرمال و تیمارهای مختلف.
- ۴- افزایش دوره‌ها و زمان‌های مختلف انبارداری (مدت انبارداری در این تحقیق ۱۶ روز بود) و مطالعه روند تغییرات صفات مختلف.
- ۵- استفاده از بازه‌های دمایی مختلف در انبارداری به منظور تعیین بهترین دما و بررسی اثرات دمایی مختلف به همراه تیمارهای موجود در این آزمایش.
- ۶- کاربرد فیلم‌های مختلف با جنس و ضخامت متفاوت در بسته‌بندی گوجه‌فرنگی.

پوست‌ها

جدول پیوست ۱- تجزیه واریانس اثرات لاین، تیمار، زمان بر صفات فیزیولوژیکی ارقام گوجه‌فرنگی.

منابع تغییرات	درجه آزادی	درصد کاهش وزن	pH عصاره	مواد جامد محلول	سفتی
MS					
لاین (C)	۱	۰/۰۰۹ <sup>ns</sup>	۰/۳۶ <sup>**</sup>	۲/۱۷ <sup>**</sup>	۳/۰۱ <sup>**</sup>
تیمار (T)	۲	۱۵/۵۳ <sup>**</sup>	۰/۳۰ <sup>**</sup>	۱۲/۲۶ <sup>**</sup>	۰/۷۲ <sup>**</sup>
زمان (S)	۳	۱/۹۵ <sup>**</sup>	۰/۳۰ <sup>**</sup>	۱۵/۶۵ <sup>**</sup>	۱/۷۰ <sup>**</sup>
C×T	۲	۰/۴۴ <sup>**</sup>	۰/۰۲ <sup>**</sup>	۰/۰۹ <sup>ns</sup>	۰/۰۳ <sup>ns</sup>
C×S	۳	۰/۰۲۴ <sup>ns</sup>	۰/۰۱ <sup>**</sup>	۰/۱۶ <sup>ns</sup>	۰/۴۵ <sup>**</sup>
T×S	۶	۰/۶۷۹ <sup>**</sup>	۰/۰۳ <sup>**</sup>	۲/۰۶ <sup>**</sup>	۰/۱۲ <sup>**</sup>
C×T×S	۶	۰/۲۳۱ <sup>**</sup>	۰/۰۰۲ <sup>ns</sup>	۰/۱۵ <sup>ns</sup>	۰/۰۶ <sup>ns</sup>
خطا	۴۸	۰/۰۳۵	۰/۰۰۲	۰/۲۵	۰/۰۲۹
کل	۷۱				
درصد CV		۱۲/۳	۱/۰۸	۴/۶	۹/۸۰

ns عدم معنی‌داری، \* در سطح ۵ درصد معنی‌داری، \*\* در سطح ۱ درصد معنی‌داری

جدول پیوست ۲- همبستگی بین صفات فیزیولوژیکی دو لاین خالص گوجه‌فرنگی

صفت	درصد کاهش وزن	pH محلول	مواد جامد محلول	سفتی
درصد کاهش وزن	۱	۰/۶۷۷ <sup>**</sup>	۰/۶۹۳ <sup>**</sup>	-۰/۴۵۳ <sup>*</sup>
pH محلول		۱	۰/۹۱۰ <sup>**</sup>	۰/۷۸۷ <sup>**</sup>
مواد جامد محلول			۱	۰/۷۸۴ <sup>**</sup>
سفتی				۱

ns عدم معنی‌داری، \* در سطح ۵ درصد معنی‌داری، \*\* در سطح ۱ درصد معنی‌داری

جدول پیوست ۳- مقایسه میانگین برای دولاین گوجه فرنگی

نام لاین	درصد کاهش وزن	مواد جامد محلول	pH عصاره	سفتی
لاین ۱ (C1)	۲/۵۶ <sup>a</sup>	۱۰/۹۷ <sup>a</sup>	۴/۴۳ <sup>a</sup>	۱/۹۴ <sup>a</sup>
لاین ۲ (C2)	۲/۳۵ <sup>a</sup>	۱۰/۶۰ <sup>b</sup>	۴/۲۷ <sup>b</sup>	۱/۵۳ <sup>a</sup>

در هر ستون حروف مشترک نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار می باشد (مقایسه میانگین با استفاده از آزمون دانکن و در سطح احتمال پنج درصد انجام شده است).

جدول پیوست ۴- مقایسه میانگین برای تیمارهای بسته بندی

تیمار (T)	درصد کاهش وزن	مواد جامد محلول	pH عصاره	سفتی
شاهد	۵/۹۰ <sup>a</sup>	۱۱/۵۶ <sup>a</sup>	۴/۴۸ <sup>a</sup>	۱/۵۹ <sup>c</sup>
فیلم پلی اتیلن	۰/۳۹ <sup>c</sup>	۱۰/۶۸ <sup>b</sup>	۴/۳۳ <sup>b</sup>	۱/۶۹ <sup>b</sup>
فیلم پلی اتیلن همراه با 1-MCP	۱/۰۷۲ <sup>b</sup>	۱۰/۱۴ <sup>c</sup>	۴/۲۶ <sup>c</sup>	۱/۹۳ <sup>a</sup>

در هر ستون حروف مشترک نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار می باشد (مقایسه میانگین با استفاده از آزمون دانکن و در سطح احتمال پنج درصد انجام شده است).

جدول پیوست ۵- مقایسه میانگین برای زمان های مختلف پس از برداشت

روز	درصد کاهش وزن	مواد جامد محلول	pH عصاره	سفتی
۴ روز	۰/۸۶ <sup>d</sup>	۹/۶۹ <sup>d</sup>	۴/۲ <sup>d</sup>	۲/۱۴ <sup>a</sup>
۸ روز	۱/۹۲ <sup>c</sup>	۱۰/۳۸ <sup>c</sup>	۴/۳۳ <sup>c</sup>	۱/۸ <sup>a</sup>
۱۲ روز	۲/۹۲ <sup>b</sup>	۱۱/۳۶ <sup>b</sup>	۴/۴۲ <sup>b</sup>	۱/۵۷ <sup>c</sup>
۱۶ روز	۴/۱۱ <sup>a</sup>	۱۱/۷۵ <sup>a</sup>	۴/۵ <sup>a</sup>	۱/۴۴ <sup>d</sup>

در هر ستون حروف مشترک نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار می باشد (مقایسه میانگین با استفاده از آزمون دانکن و در سطح احتمال پنج درصد انجام شده است).

جدول پیوست ۶- میانگین اثرات متقابل لاین در تیمار در دو لاین گوجه‌فرنگی

لاین × تیمار	درصد کاهش وزن	مواد جامد محلول	pH عصاره	سفتی
لاین ۱ × تیمار ۱	۰/۳۵ <sup>d</sup>	۱۰/۴۵ <sup>c</sup>	۴/۲۹ <sup>c</sup>	۱/۸۸ <sup>b</sup>
لاین ۱ × تیمار ۲	۰/۶۴ <sup>d</sup>	۱۰/۰۴ <sup>d</sup>	۴/۲ <sup>d</sup>	۲/۱۸ <sup>a</sup>
لاین ۱ × تیمار ۳	۶/۶۸ <sup>a</sup>	۱۱/۳۷ <sup>a</sup>	۴/۳۸ <sup>b</sup>	۱/۷۶ <sup>bc</sup>
لاین ۲ × تیمار ۱	۰/۴۳ <sup>d</sup>	۱۰/۹۱ <sup>b</sup>	۴/۳۸ <sup>b</sup>	۱/۵ <sup>d</sup>
لاین ۲ × تیمار ۲	۱/۵۰ <sup>c</sup>	۱۰/۲۵ <sup>cd</sup>	۴/۳۳ <sup>c</sup>	۱/۶۸ <sup>c</sup>
لاین ۲ × تیمار ۳	۵/۱۱ <sup>b</sup>	۱۱/۷۵ <sup>a</sup>	۴/۵۹ <sup>a</sup>	۱/۴۱ <sup>d</sup>

در هر ستون حروف مشترک نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار می‌باشد (مقایسه میانگین با استفاده از آزمون دانکن و در سطح احتمال پنج درصد انجام شده است).

جدول پیوست ۷- میانگین اثرات متقابل لاین در زمان در دو لاین گوجه‌فرنگی

لاین × زمان	درصد کاهش وزن	مواد جامد محلول	pH عصاره	سفتی
لاین ۱ × زمان ۱	۰/۸۷ <sup>d</sup>	۹/۵۵ <sup>e</sup>	۴/۱۶ <sup>f</sup>	۲/۵۵ <sup>a</sup>
لاین ۱ × زمان ۲	۱/۹۹ <sup>c</sup>	۱۰/۲۲ <sup>cd</sup>	۴/۲۷ <sup>e</sup>	۲/۰۳ <sup>b</sup>
لاین ۱ × زمان ۳	۳/۰۹ <sup>b</sup>	۱۱/۰۵ <sup>b</sup>	۴/۳۳ <sup>d</sup>	۱/۷۳ <sup>cd</sup>
لاین ۱ × زمان ۴	۴/۲۹ <sup>ab</sup>	۱۱/۶۶ <sup>a</sup>	۴/۳۹ <sup>c</sup>	۱/۴۶ <sup>e</sup>
لاین ۲ × زمان ۱	۰/۸۵ <sup>d</sup>	۹/۸۳ <sup>de</sup>	۴/۲۴ <sup>e</sup>	۱/۷۴ <sup>c</sup>
لاین ۲ × زمان ۲	۱/۸۶ <sup>c</sup>	۱۰/۵۵ <sup>bc</sup>	۴/۳۸ <sup>cd</sup>	۱/۵۵ <sup>de</sup>
لاین ۲ × زمان ۳	۲/۷۶ <sup>b</sup>	۱۱/۶۶ <sup>a</sup>	۴/۵ <sup>b</sup>	۱/۴۳ <sup>e</sup>
لاین ۲ × زمان ۴	۳/۹۳ <sup>a</sup>	۱۱/۸۳ <sup>a</sup>	۴/۶۱ <sup>a</sup>	۱/۴۱ <sup>e</sup>

در هر ستون حروف مشترک نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار می‌باشد (مقایسه میانگین با استفاده از آزمون دانکن و در سطح احتمال پنج درصد انجام شده است).



جدول پیوست ۸- میانگین اثرات متقابل تیمار در زمان در دو لاین گوجه‌فرنگی

تیمار × زمان	درصد کاهش وزن	مواد جامد محلول	pH عصاره	سفتی
تیمار ۱ × زمان ۱	۰/۲۶ <sup>f</sup>	۹/۷۵ <sup>ef</sup>	۴/۱۷ <sup>g</sup>	۲/۱۹ <sup>a</sup>
تیمار ۱ × زمان ۲	۰/۴۰ <sup>f</sup>	۹/۷۵ <sup>f</sup>	۴/۲۸ <sup>ef</sup>	۱/۷۳ <sup>c</sup>
تیمار ۱ × زمان ۳	۰/۴۱ <sup>f</sup>	۱۱/۲۵ <sup>c</sup>	۴/۴۰ <sup>d</sup>	۱/۵۰ <sup>de</sup>
تیمار ۱ × زمان ۴	۰/۵۰ <sup>f</sup>	۱۲/۰ <sup>ab</sup>	۴/۴۸ <sup>c</sup>	۱/۳۵ <sup>ef</sup>
تیمار ۲ × زمان ۱	۰/۴۲ <sup>f</sup>	۹/۶۶ <sup>f</sup>	۴/۲۲ <sup>g</sup>	۲/۱۳ <sup>a</sup>
تیمار ۲ × زمان ۲	۰/۵۱ <sup>f</sup>	۹/۹۱ <sup>ef</sup>	۴/۲۳ <sup>fg</sup>	۱/۹۳ <sup>bc</sup>
تیمار ۲ × زمان ۳	۱/۱۴ <sup>e</sup>	۱۰/۴۱ <sup>de</sup>	۴/۲۸ <sup>f</sup>	۱/۹۱ <sup>bc</sup>
تیمار ۲ × زمان ۴	۲/۲۰ <sup>d</sup>	۱۰/۵۸ <sup>d</sup>	۴/۳۴ <sup>e</sup>	۱/۷۴ <sup>c</sup>
تیمار ۳ × زمان ۱	۱/۸۸ <sup>d</sup>	۹/۶۶ <sup>f</sup>	۴/۲۱ <sup>g</sup>	۲/۱۰ <sup>ab</sup>
تیمار ۳ × زمان ۲	۴/۸۶ <sup>c</sup>	۱۱/۵۰ <sup>bc</sup>	۴/۴۶ <sup>cd</sup>	۱/۷۲ <sup>cd</sup>
تیمار ۳ × زمان ۳	۷/۲۲ <sup>b</sup>	۱۲/۴۱ <sup>a</sup>	۴/۵۸ <sup>b</sup>	۱/۳۱ <sup>ef</sup>
تیمار ۳ × زمان ۴	۹/۶۴ <sup>a</sup>	۱۲/۶۶ <sup>a</sup>	۴/۶۹ <sup>a</sup>	۱/۲۲ <sup>f</sup>

در هر ستون حروف مشترک نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار می‌باشد (مقایسه میانگین با استفاده از آزمون دانکن و در سطح احتمال پنج درصد انجام شده است).

جدول پیوست ۹- میانگین اثرات متقابل لاین در تیمار در زمان در دو لاین گوجه‌فرنگی

سفتی	pH عصاره	مواد جامد محلول	درصد کاهش وزن	لاین × تیمار × زمان
۲/۶۳ <sup>a</sup>	۴/۱۵ <sup>m</sup>	۹/۳۳ <sup>k</sup>	۰/۲۵ <sup>i</sup>	لاین ۱ × تیمار ۱ × زمان ۱
۱/۹۰ <sup>ef</sup>	۴/۲۸ <sup>ghij</sup>	۹/۶۶ <sup>ijk</sup>	۰/۴۱ <sup>ghi</sup>	لاین ۱ × تیمار ۱ × زمان ۲
۱/۵۶ <sup>ghijk</sup>	۴/۳۴ <sup>fgh</sup>	۱۱/۰ <sup>defg</sup>	۰/۲۹ <sup>hi</sup>	لاین ۱ × تیمار ۱ × زمان ۳
۱/۴۳ <sup>ijkl</sup>	۴/۳۸ <sup>def</sup>	۱۱/۸۳ <sup>abc</sup>	۰/۴۵ <sup>ghi</sup>	لاین ۱ × تیمار ۱ × زمان ۴
۲/۵۳ <sup>ab</sup>	۴/۱۸ <sup>klm</sup>	۹/۶۶ <sup>jk</sup>	۰/۳۸ <sup>hi</sup>	لاین ۱ × تیمار ۲ × زمان ۱
۲/۲۳ <sup>cd</sup>	۴/۱۷ <sup>klm</sup>	۹/۶۶ <sup>jk</sup>	۰/۵۱ <sup>ghi</sup>	لاین ۱ × تیمار ۲ × زمان ۲
۲/۲۵ <sup>bcd</sup>	۴/۲۱ <sup>ijklm</sup>	۱۰/۱۶ <sup>ghijk</sup>	۱/۰۸ <sup>fgh</sup>	لاین ۱ × تیمار ۲ × زمان ۳
۱/۶۹ <sup>efghi</sup>	۴/۲۴ <sup>ijkl</sup>	۱۰/۶۶ <sup>efgh</sup>	۰/۵۷ <sup>ghi</sup>	لاین ۱ × تیمار ۲ × زمان ۴
۲/۴۸ <sup>abc</sup>	۴/۱۶ <sup>lm</sup>	۹/۶۶ <sup>jk</sup>	۱/۹۶ <sup>e</sup>	لاین ۱ × تیمار ۳ × زمان ۱
۱/۹۵ <sup>de</sup>	۴/۳۶ <sup>efg</sup>	۱۱/۳۳ <sup>cdef</sup>	۵/۰۴ <sup>cd</sup>	لاین ۱ × تیمار ۳ × زمان ۲
۱/۳۶ <sup>ijkl</sup>	۴/۴۵ <sup>d</sup>	۱۲/۰ <sup>abc</sup>	۷/۸۸ <sup>b</sup>	لاین ۱ × تیمار ۳ × زمان ۳
۱/۲۷ <sup>kl</sup>	۴/۵۵ <sup>c</sup>	۱۲/۵۰ <sup>ab</sup>	۱۱/۸۵ <sup>a</sup>	لاین ۱ × تیمار ۳ × زمان ۴
۱/۷۶ <sup>efgh</sup>	۴/۲۰ <sup>jklm</sup>	۱۰/۱۶ <sup>ghijk</sup>	۰/۲۸ <sup>hi</sup>	لاین ۲ × تیمار ۱ × زمان ۱
۱/۵۶ <sup>ghijk</sup>	۴/۲۹ <sup>ghi</sup>	۹/۸۳ <sup>hijk</sup>	۰/۳۹ <sup>hi</sup>	لاین ۲ × تیمار ۱ × زمان ۲
۱/۴۳ <sup>ijkl</sup>	۴/۴۶ <sup>d</sup>	۱۱/۵۰ <sup>cde</sup>	۰/۵۳ <sup>ghi</sup>	لاین ۲ × تیمار ۱ × زمان ۳
۱/۲۸ <sup>kl</sup>	۴/۵۸ <sup>c</sup>	۱۲/۱۶ <sup>abc</sup>	۰/۵۴ <sup>ghi</sup>	لاین ۲ × تیمار ۱ × زمان ۴
۱/۷۳ <sup>efgh</sup>	۴/۲۵ <sup>hijkl</sup>	۹/۶۶ <sup>jk</sup>	۰/۴۶ <sup>ghi</sup>	لاین ۲ × تیمار ۲ × زمان ۱
۱/۶۲ <sup>fghij</sup>	۴/۲۹ <sup>fghi</sup>	۱۰/۱۶ <sup>ghijk</sup>	۰/۵۱ <sup>ghi</sup>	لاین ۲ × تیمار ۲ × زمان ۲
۱/۵۷ <sup>fghijk</sup>	۴/۳۵ <sup>fg</sup>	۱۰/۶۶ <sup>efghi</sup>	۱/۲۰ <sup>efg</sup>	لاین ۲ × تیمار ۲ × زمان ۳
۱/۷۹ <sup>efg</sup>	۴/۴۳ <sup>de</sup>	۱۰/۵۰ <sup>fghij</sup>	۳/۸۲ <sup>d</sup>	لاین ۲ × تیمار ۲ × زمان ۴
۱/۷۳ <sup>efghi</sup>	۴/۲۶ <sup>hijk</sup>	۹/۶۶ <sup>k</sup>	۱/۸۰ <sup>ef</sup>	لاین ۲ × تیمار ۳ × زمان ۱
۱/۴۸ <sup>hijk</sup>	۴/۵۶	۱۱/۶۶ <sup>bcd</sup>	۴/۶۷ <sup>d</sup>	لاین ۲ × تیمار ۳ × زمان ۲
۱/۲۷ <sup>kl</sup>	۴/۷۱ <sup>b</sup>	۱۲/۸۳ <sup>a</sup>	۶/۵۵ <sup>bc</sup>	لاین ۲ × تیمار ۳ × زمان ۳
۱/۱۷ <sup>l</sup>	۴/۸۳ <sup>a</sup>	۱۲/۸۳ <sup>a</sup>	۷/۴۲ <sup>b</sup>	لاین ۲ × تیمار ۳ × زمان ۴

در هر ستون حروف مشترک نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار می‌باشد (مقایسه میانگین با استفاده از آزمون دانکن و در سطح پنج درصد انجام شده است).

## منابع:

ابراهیمیان، آ. طباطبایی کلور، ر. و هاشمی، ج. (۱۳۹۱) "تاثیر دو نوع پوشش پلی اتیلنی و دو سطح در بسته بندی با اتمسفر تعدیل یافته غیرفعال بر روی خصوصیات کیفی گوجه فرنگی". دومین سمینار ملی امنیت غذایی.

احمدی، ب. تاج الدین، ب. احمدی چنارین، ح. (۱۳۹۵) "بررسی کیفیت گوجه فرنگی زیتونی (رقم سانتا) بسته بندی شده در فیلم های پلی اتیلنی و نانوپلیمر سیلیکونی به روش اتمسفر تغییر یافته". علوم و صنایع غذایی، جلد ۱۵، شماره ۷۴، ص ۲۸-۱۳.

آمارنامه کشاورزی. (۱۳۸۸)، انتشارات روابط عمومی سازمان جهاد کشاورزی استان همدان، ص ۱۱۲-۱۲۰.

پاشازاده، ب. نجاری، ح. شواخی، ف. سیدین اردبیلی، م. اسدی، غ. همدی، ه. (۱۳۹۴) "تاثیر ۱- متیل سیکلوپروپین و نانوجاذب اتیلن بر خصوصیات کیفی و ماندگاری دو رقم سیب". بیست و یکمین کنگره ملی علوم و صنایع غذایی/ایران، شماره ۱، ص ۸۱-۹۵.

پیوست، غ. (۱۳۸۵)، "سبزیکاری"، چاپ پنجم، انتشارات دانش پذیر، ص ۳۹۲.

جعفرپور، م. امینی، د. مرتضایی نژاد، ف. گل پرور، ا. خوشبخت، د. (۱۳۹۴) "اثر پوترسین و ۱- متیل سیکلوپروپان بر خواص کیفی و عمر انبارمانی میوه توت فرنگی". نشریه تولید و فرآوری محصولات زراعی و باغی، شماره ۱۷، ص ۲۸۳-۲۷۳.

حسن دخت، م. (۱۳۹۱)، "تکنولوژی تولید سبزی"، چاپ سوم انتشارات سلسله ص ۱۱۲.

درودی، ر. و مددی، م. (۱۳۹۳) "فیزیولوژی گیاهی و فیزیولوژی پس از برداشت" چاپ اول. انتشارات آموزش و ترویج کشاورزی، ص ۲۱۰.

راحی، م. (۱۳۸۷)، "فیزیولوژی پس از برداشت". چاپ پنجم. مرکز نشر دانشگاه شیراز ص ۴۷.

رنجبر، ا. احمدی، ن. (۱۳۹۳) "بررسی میزان عمل بازدارندگی ۱- متیل سیکلوپروپن از اثرات اتیلن خارجی در گل‌های شاخه بریده میخک رقم فورچون". *اولین کنگره ملی گل و گیاهان زینتی ایران*.

سهرابی، م. احمدی، ا. محمدی منور، ح. (۱۳۹۵) "تاثیر فیلم‌های بسته‌بندی پلی وینیل کلراید و پلی اتیلن با چگالی بالا بر روی کیفیت و ماندگاری گوجه‌زیتونی در طی فرآیندهای انبارمانی". *علوم و صنایع غذایی ایران*.

شواخی، ف. و بهمدی، ه. (۱۳۹۴) "بررسی اثر ۱- متیل سیکلوپروپن در کیفیت پس از برداشت سیب". *ویژه نامه علوم و صنایع غذایی، جلد ۱۳، شماره ۱، ص ۱۷۵-۱۸۴*.

طباطبایی کلور، ر. ابراهیمیان، آ. هاشمی، ج. (۱۳۹۵) "بررسی تاثیر دما، نوع بسته‌بندی و اتمسفر اصلاح شده بر خصوصیات کیفی گوجه‌فرنگی". *فصلنامه علوم و صنایع غذایی، جلد ۱۳، شماره ۵۱*.

گنجی‌مقدم، ا. شیخ‌الاسلامی، ز. (۱۳۸۴). "اثرات زمان برداشت و مدت انبارداری بر خواص کمی و کیفی زردآلو (رقم شاهرودی)". *مجله تحقیقات مهندسی کشاورزی، جلد ۶، شماره ۲۵، ص ۴۴-۳۱*.

گودرزی، ف. شواخی، ف. (۱۳۹۳) "تاثیر ۱-متیل سیکلوپروپن بر زمان رسیدن گوجه‌فرنگی در انبار". *مجله تحقیقات مهندسی کشاورزی، جلد ۱۵، شماره ۲، ص ۸۹-۹۸*.

محمدی ثانی، ع. و مهرزاد، س. (۱۳۹۴) "ارزیابی اثر ۱- متیل سیکلو پروپن بر خواص فیزیکوشیمیایی گوجه فرنگی رقم راپسونا". *علوم غذایی و تغذیه، سال دوازده، شماره ۴، ص ۸۵-۱۰۰*.

مدرس، ب. رامین، ع. قبادی، س. (۱۳۹۳). "اثر ۱-متیل سیکلوپروپن بر عمر انبارمانی و قفسه‌ای میوه توت فرنگی رقم کاماروسا". *مجله تولید و فرآوری محصولات زراعی و باغی، سال ۴، شماره ۱۱، ص ۲۶۷-۲۵۳*.

مکوندی، م. شاهپوری، س. رامین، ع. (۱۳۹۲) "تاثیر ۱- متیل سیکلوپروپین و کلرید کلسیم بر افزایش طول عمر انباری میوه رسیده سبز زیتون رقم میشن" نشریه علوم باغبانی، جلد ۲۷، شماره ۴، ص ۴۸۴-۴۹۴.

ملاحسنی، م. بدافی، ح. اصغری، ح. (۱۳۹۵) "ارزیابی انواع فیلم‌های بسته‌بندی بر عمر انبارمانی انگور سرخ فخری شاهرودی". همایش ملی یافته‌های پژوهش و فناوری در اکوسیستم‌های طبیعی و کشاورزی

مهدیان، ر. کامیاب، ر. امیرزگز، ع. (۱۳۹۳). "اصول و کاربردهای تکنیک *Real-Time PCR*". چاپ اول. آرتین طب ص ۱۶.

نعمت‌پور، س. مرتضوی، ح. (۱۳۹۱) "تاثیر سطوح مختلف ۱- متیل سیکلوپروپین و اتفن بر عمر انباری و کیفیت پس از برداشت میوه گوجه‌فرنگی رقم ورنه" مجله علوم و فنون باغبانی ایران، جلد ۱۳، شماره ۲، ص ۱۳۸-۱۲۷.

Abeles, F. B., Morgan, P. W., and Saltveit Jr, M. E. (1992) "*Ethylene in plant biology*". Academic press.

Abeles, F. B., Morgan, P. W., and Saltveit Jr, M. E. (2012) "*Ethylene in plant biology*". Academic press.

Adams, D.O., Yang, S.F., (1979) "Ethylene biosynthesis: identification of ACC as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, 170-174.

Alexander, L and Grierson, D. (2002) "Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening". *Journal of experimental botany*, 53(377), 2039-2055.

Alikhani, M., Sharifani, M., Azizi, M., Musavizadeh, S.J. and Rahimi, M. (2009) "Increasing shelf life and maintaining quality of strawberry (*Fragaria ananassa* L.) with application of mucilage edible coating and plant essential oil". *Journal of Agriculture Science and Natural Resources*, 16(2), 1-10. (in Farsi)

- Alique, R., Martínez, M. A and Alonso, J. (2003) "Influence of the modified atmosphere packaging on shelf life and quality of Navalinda sweet cherry". *European Food Research and Technology*, 217(5), 416-420.
- Amornputti, S., Ketsa, S., and van Doorn, W. G. (2016) "1-Methylcyclopropene (1-MCP) inhibits ethylene production of durian fruit which is correlated with a decrease in ACC oxidase activity in the peel". *Postharvest Biology and Technology*, 114, 69-75.
- An, J., Zhang, M and Zhan, Z. (2007). "Effect of packaging film on the quality of 'Chaoyang' honey peach fruit in modified atmosphere packages". *Packaging Technology and Science*, 20(1), 71-76.
- Barry, C.S., Blume, B., Bouzayen, M., Cooper, W., Hamilton, A.J., Grierson, D., (1996) "Differential expression of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene family of tomato". *Plant Journal*. 9, 525–535.
- Barry, C.S., Llop-Tous, M.I., Grierson, D., (2000) "The regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene expression during the transition from system-1 to system-2 ethylene synthesis in tomato". *Plant Physiology*. 123, 979–986.
- Batu, A. (2004) "Determination of acceptable firmness and colour values of tomatoes". *Journal of food engineering*, 61(3), 471-475.
- De Wild, H. P., Otma, E. C., and Peppelenbos, H. W. (2003) "Carbon dioxide action on ethylene biosynthesis of preclimacteric and climacteric pear fruit". *Journal of Experimental Botany*, 54(387), 1537-1544.
- Blankenship, S.M., Dole, J.M., (2003) "1-Methylcyclopropene": a review. *Postharvest Biology. Technology*. 28, 1–25.
- Bleecker, A.B., Kende, H., (2000) "Ethylene: a gaseous signal molecule in plants". *Annual. Review. Cell. Developmental. Biology*. 16, 1–18.
- Borsani, O., Valpuesta, V and Botella, M. A. (2001) "Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stress in Arabidopsis seedlings". *Plant Physiology*, 126(3), 1024-1030.
- Burkardt, H. J. (2000) "Standardization and quality control of PCR analyses". *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 38(2), 87-91.
- Caleb, O. J., Opara, U. L and Witthuhn, C. R. (2012) " Modified atmosphere packaging of pomegranate fruit and arils": a review. *Food and Bioprocess Technology*, 5(1), 15-30.

- Daly, J., and Schluter, A. (2001) "EthylBloc™-an industry perspective". *Perishable Handling Quarterly*, 5-7.
- Defilippi, B. G., Dandekar, A. M., and Kader, A. A. (2004) "Impact of suppression of ethylene action or biosynthesis on flavor metabolites in apple (*Malus domestica* Borkh) fruits". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(18), 5694-5701.
- Dheda, K., Huggett, J. F., Bustin, S. A., Johnson, M. A., Rook, G., and Zumla, A. (2004) "Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR". *Biotechniques*, 37(1), 112-119.
- Eckhardt, U., Grimm, B., & Hörtensteiner, S. (2004) "Recent advances in chlorophyll biosynthesis and breakdown in higher plants". *Plant molecular biology*, 56(1), 1-14.
- Gao, P., Zhu, Z., & Zhang, P. (2013) "Effects of chitosan–glucose complex coating on postharvest quality and shelf life of table grapes". *Carbohydrate polymers*, 95(1), 371-378.
- Ginzinger, DG. (2002) "Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream". *Exp. Hematol.* 30: 503-512
- Giovannoni, J.J., (2004) "Genetic regulation of fruit development and ripening". *Plant Cell*. 16, S170–S180.
- Gong, Y., and Mattheis, J. P. (2003) "Effect of ethylene and 1-methylcyclopropene on chlorophyll catabolism of broccoli florets". *Plant Growth Regulation*, 40(1), 33-38.
- Graham, T. K., Veenstra, J. N., and Armstrong, P. R. (1998) "Ethylene removal in fruit and vegetable storages using a plasma reactor". *Transactions of the ASAE*, 41(6), 1767.
- Gray, J., Picton, S., Shabbeer, J., Schuch, W., Grierson, D., (1992). "Molecular biology of fruit ripening and its manipulation with antisense genes". *Plant Molecular Biology*. 19, 69–87.
- Guillén, F., Castillo, S., Zapata, P. J., Martínez-Romero, D., Serrano, M., and Valero, D. (2007) "Efficacy of 1-MCP treatment in tomato fruit: 1. Duration and concentration of 1-MCP treatment to gain an effective delay of postharvest ripening". *Postharvest biology and technology*, 43(1), 23-27.

- Guo, L., Arteca, R. N., PHillips, A. T., and Liu, Y. (1992) "Purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate N-malonyltransferase from etiolated mung bean hypocotyls". *Plant pHyiology*, 100(4), 2041-2045.
- Guo, L., PHillips, A. T., and Arteca, R. N. (1993) "Amino acid N-malonyltransferases from mung beans. Action on 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and D-phenylalanine". *Journal of Biological Chemistry*, 268(34), 25389-25394.
- Hamilton, A.J., Lycett, G.W., Grierson, D., (1990) "Antisense gene that inhibits synthesis of the hormone ethylene in transgenic plants". *Nature* 346, 284–287.
- Hamilton, A.J., Lycett, G.W., Grierson, D., (1990) "Antisense gene that inhibits synthesis of the hormone ethylene in transgenic plants". *Nature* 346, 284–287.
- Hertog, M. L. A. T. M., Peppelenbos, H. W., Evelo, R. G., and Tijskens, L. M. M. (1998) "A dynamic and generic model of gas exchange of respiring produce: the effects of oxygen, carbon dioxide and temperature". *Postharvest Biology and Technology*, 14(3), 335-349.
- Jeong, J., Huber, D. J., and Sargent, S. A. (2002) "Influence of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on ripening and cell-wall matrix polysaccharides of avocado (*Persea americana*) fruit". *Postharvest Biology and Technology*, 25(3), 241-256.
- Kader, A. A., and Watkins, C. B. (2000) "Modified atmosphere packaging—toward 2000 and beyond". *HortTechnology*, 10(3), 483-486.
- Kader, A. A. (1994) "Regulation of fruit physiology by controlled/modified atmospheres". *Postharvest Physiology of Fruits* 398, 59-70.
- Kamyab, A. R., shahrokhi.F., Shamsian, E., Nosaied, M., Dibajnia, P., Hashemi, M., Mahdian, R. (2012) "determination of sensitivity and specificity of a navel gene dosage assay for prenatal screening of trisomy 21 syndrome". *Clinical Biochemistre*. 45: 267-271
- Kende, H. (1993). "Ethylene biosynthesis". *Annual. Review. Plant PHysiology. Plant Molecular. Biology*. 44:283-307
- Ketsa, S., Wongs-aree, C., and Klein, J. D. (2000) "Storage life and quality of Klui Khai banana fruit affected by modified atmosphere using bulk packaging". *Thai Journal of Agricultural Science*, 33(1/2), 37-44.
- Ketsa, S., Wisutiamonkul, A., and van Doorn, W. G. (2013) "Apparent synergism between the positive effects of 1-MCP and modified atmosphere on storage life of banana fruit". *Postharvest biology and technology*, 85, 173-178.



- Kevin, L. Wang, Li, H. And Ecker, J. R. (2002) "Ethylene biosynthesis and signaling networks". *The plant cell*, 14(suppl 1), S131-S151.
- Kieber, J.J., Rothenberg, M., Roman, G., Feldmann, K.A., Ecker, J.R., (1993) "CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Aarabidopsis*, encodes a member of the Raf family of protein kinases". *Cell* 72, 427–441.
- Kim, J.S., H.R. Choi, D.S. Chung, and Y.S. Lee. (2010) "Current research status of postharvest and packaging technology of oriental melon (*Cucumis melo* var. Makuwa) in Korea". *Korean Journal. Horticultural. Science. Technology*. 28:902-911.
- Klee, H.J., Giovannoni, J.J., (2011) "Genetics and control of tomato fruit ripening and quality attributes". *Annual. Review. Genetice*. 45, 41–59.
- Kuzma, J. (2006). "Nano technology in agricutrure and food products", *Final report, project on nanotechnologies Woodrow Wilson International center*
- Lee, L., Arul, J., Lencki, R., and Castaigne, F. (1996). "A review on modified atmoSphere packaging and preservation of fresh fruits and vegetables: PHysiological basis and practical aspects—part II". *Packaging technology and science*, 9(1), 1-17.
- Lentini, Z., Mussell, H., Mutschler, M.A., Earle, E. D., (1988) "Ethylene generation and reversal of ethylene effects during development in vitro rapid-cycling Brassica campertis L". *Plant Science*. 54: 75-81.
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001) "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2–  $\Delta\Delta$ CT method". *methods*, 25(4), 402-408.
- Martínez-Romero, D., Guillén, F., Castillo, S., Valero, D., and Serrano, M. (2003) "Modified atmoSphere packaging maintains quality of table grapes". *Journal of Food Science*, 68(5), 1838-1843.
- Meidani, J. (2003) " Introduction to the processing & storage of agricultural products". *Shahid Chamran University Press Ahvaz-Iran*
- Mir, N.A., Curell, E., Khan, N., Whitaker, M., Beaudry, R.M., (2001)." Harvest maturity, storage temperature, and 1-MCP application Frequency alter firmness retention and chloropHyll fluorescence of ‘Redchief Delicious’ apples". *Journal. American. Society. Horticultural. Science*. 126, 618–624.

- Mostofi, Y., Mosayebzadeh, A., Emamjomeh, Z., Nikkhah, M. J. and Dehestaniardakani, M. (2010). "Effect of modified atmosphere packaging (MAP) on storage life and maintainance quality grapes cv. Shahroodi". *Iranian Journal of Horticultural Science*, 41(2), 163-172. (in Farsi)
- Muñoz-Robredo, P., Rubio, P., Infante, R., Campos-Vargas, R., Manríquez, D., González-Agüero, M., and Defilippi, B. G. (2012) "Ethylene biosynthesis in apricot: Identification of a ripening-related 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase (ACS) gene". *Postharvest biology and technology*, 63(1), 85-90.
- Nakatsuka, A., Murachi, S., Okunishi, H., Shiomi, S., Nakano, R., Kubo, Y., Inaba, A., (1998) "Differential expression and internal feedback regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, 1-aminocyclopropane-1- carboxylate oxidase, and ethylene receptor genes in tomato fruit during development and ripening". *Plant PHysiology*. 118, 1295–1305.
- Nakhasi, S., Schlimme, D., and Solomos, T. (1991) "Storage potential of tomatoes harvested at the breaker stage using modified atmosphere packaging". *Journal of Food Science*, 56(1), 55-59.
- Nosaeid, M. H., Mahdian, R., Jamali, S., Maryami, F., Babashah, S., Maryami, F., and Zeinali, S. (2009) "Validation and comparison of two quantitative real-time PCR assays for direct detection of DMD/BMD carriers". *Clinical biochemistry*, 42(12), 1291-1299.
- Ozturk, I., Sagdic, O., Yalcin, H., Capar, T. D., and Asyali, M. H. (2016) "The effects of packaging type on the quality characteristics of fresh raw pistachios (*Pistacia vera* L.) during the storage". *LWT-Food Science and Technology*, 65, 457-463.
- Pfaffl, M. W. (2004) " Quantification strategies in real-time PCR. in A-Z of quantitative PCR"., *International university line (IUL), La Jolla, CA. USA.* pp. 89-112
- Pfaffl, M.W., Horgan GW., Dempfle L. (2002). "Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR". *Nucleic Acids Reserch*: 30: e36
- Park, C. Y., Kim, Y. J., and Shin, Y. (2016) "Effects of an ethylene absorbent and 1-methylcyclopropene on tomato quality and antioxidant contents during storage". *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 57(1), 38-45.

- Pesis, E. (2005) "The role of the anaerobic metabolites, acetaldehyde and ethanol, in fruit ripening, enhancement of fruit quality and fruit deterioration". *Postharvest Biology and Technology*, 37(1), 1-19.
- Rong-yu, Z., and Yao-wen, H. (2003). "Influence of hydroxypropyl methylcellulose edible coating on fresh-keeping and storability of tomato". *Journal of Zhejiang University-SCIENCE A*, 4(1), 109-113.
- Ross, G.S., Knighton, M.L., Lay-Yee, M., (1992). "An ethylene-related cDNA from ripening apples". *Plant Molecular Biology*. 19, 231–238.
- Schaffer, R.J., Friel, E.N., Souleyre, E.J.F., Bolitho, K., Thodey, K., Ledger, S., Bowen, J.H., Ma, J.H., Nain, B., Cohen, D., Gleave, A.P., Crowhurst, R.N., Janssen, B.J., Yao, J.L., Newcomb, R.D., (2007). "A genomics approach reveals that aroma production in apple is controlled by ethylene predominantly at the final step in each biosynthetic pathway". *Plant Physiology*. 144, 1899–1912.
- Scott, K. J., McGlasson, W. B., and Roberts, E. A. (1970) "Potassium permanganate as an ethylene absorbent in polyethylene bags to delay ripening of bananas during storage". *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 10(43), 237-240.
- Scott, N. and Chen, H. (2003) "Nanoscale science and engineering for agriculture and food systems". National Planning Workshop November 18-19, (2002) Washington, DC. Cornell University
- Sisler, E. C., and Serek, M. (1997) "Inhibitors of ethylene responses in plants at the receptor level: recent developments". *Physiologia plantarum*, 100(3), 577-582.
- Srinivasa, P., Baskaran, R., Ramesh, M., Prashanth, K. H., and Tharanathan, R. (2002). "Storage studies of mango packed using biodegradable chitosan film". *European Food Research and Technology*, 215(6), 504-508.
- Sun, B., Yan, H., Liu, N., Wei, J., and Wang, Q. (2012). "Effect of 1-MCP treatment on postharvest quality characters, antioxidants and glucosinolates of Chinese kale". *Food Chemistry*, 131(2), 519-526.
- Tabatabaekolor, R., Ebrahimian, A., and Hashemi, S. J. (2016). "Investigation on the effect of temperature, packaging material and modified atmosphere on the quality of tomato". *Journal of Food Science & Technology (2008-8787)*, 13(51).

- Taşdelen, Ö., and Bayindirli, L. (1998) "Controlled atmosphere storage and edible coating effects on storage life and quality of tomatoes". *Journal of food processing and preservation*, 22(4), 303-320.
- Tatsuki, M., Endo, A. and Ohkawa, H. (2007) "Influence of time from harvest to 1-MCP treatment on apple fruit quality and expression of genes for ethylene biosynthesis enzymes and ethylene receptors". *Postharvest Biology and Technology* 43 (2007) 28–35.
- Tatsuki, M., Endo, A., (2006) "Analyses of expression patterns of ethylene receptor genes in apple (*Malus domestica* Borkh.) fruits treated with or without 1-methylcyclopropene (1-MCP)". *Journal. Japanes. Society. Horticultural. Science.* 75, 481–487.
- Theologis, A., (1994). "Control of ripening". *Current. Opinion. Biotechnology.* 5, 152–157.
- Valero, D., Valverde, J. M., Martínez-Romero, D., Guillén, F., Castillo, S., and Serrano, M. (2006). "The combination of modified atmosphere packaging with eugenol or thymol to maintain quality, safety and functional properties of table grapes". *Postharvest Biology and Technology*, 41(3), 317-327.
- Wakasa, Y., Kudo, H., Ishikawa, R., Akada, S., Senda, M., Niizeki, M., Harada, T., (2006) "Low expression of an endopolygalacturonase gene in apple fruit with long-term storage potential". *Postharvest Biology. Technology.* 39, 193–198.
- Watkins, C. B. (2006) "The use of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on fruits and vegetables". *Biotechnology advances*, 24(4), 389-409.
- Watkins, C. B., Nocka, J. F. and Whitaker, B. D. (2006) "Responses of early, mid and late season apple cultivars to postharvest application of 1-MCP under air and controlled atmosphere storage conditions". *Postharvest Biology. Technology.* 19(1): 17-32
- Watkins, C.B., Nock, J.F., Whitaker, B.D., (2000). "Responses of early, mid and late season apple cultivars to postharvest application of 1- methylcyclopropene (1-MCP) under air and controlled atmosphere storage conditions". *Postharvest Biology. Technology.* 19, 17–32.
- Wills, R., McGlasson, B., Graham, D., and Joyce, D. (1998). *"Postharvest: an introduction to the physiology and handling of fruit, vegetables and ornamentals* (No. Ed. 4). CAB international.

- Xie, X., Song, J., Wang, Y., and Sugar, D. (2014) " Ethylene synthesis, ripening capacity, and superficial scald inhibition in 1-MCP treated 'd'Anjou' pears are affected by storage temperature". *Postharvest Biology and Technology*, 97, 1-10.
- Xu, F., Liu, S., and Feng, X. (2016) "Effect of 1-octylcyclopropene on pPhysiological responses and expression of ethylene receptors gene in harvested tomato fruit". *Postharvest Biology and Technology*, 117, 30-37.
- Yang, S. F., and Hoffman, N. E. (1984) "Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants". *Annual review of plant pHysiology*, 35(1), 155-189.
- Yang, x., Song, J., Campbell-Plamer, L., Fillmore, S. and Zhang, Z. (2013) "Effect of ethylene and 1-MCP on expression of genes involved in ethylene biosynthesis and perception during ripening of apple fruit". *Postharvest Biology and Technology*. 78 (2013) 55–66.
- Yun, S.D. and S.K. Lee. (1996). "Effect of ethylene removal and sulfur dioxide fumigation on grape quality during MA storage". *Journal. Korean Science. Horticultural. Science*. 37:696-699
- Zhou, T., Tan, W.R., Deng, X.G., Zheng, T., Zhang, D.W. and Lin, H.H. (2015) "Effects of brassinosteroids on quality attributes and ethylene synthesis in postharvest tomato fruit". *Postharvest Biology and Technology*. 100 (2015) 196–204.
- Zhu, T., Tan, W. R., Deng, X. G., Zheng, T., Zhang, D. W., and Lin, H. H. (2015). "Effects of brassinosteroids on quality attributes and ethylene synthesis in postharvest tomato fruit". *Postharvest Biology and Technology*, 100, 196-204.

## **Abstract**

As a typical climacteric fruit, fresh tomato is a perishable vegetable which senesces after harvest at ambient temperature. Ethylene plays a crucial role in the process of the ripening and senescence of tomato fruit. This study was conducted in order to investigate the effect of 1-MCP and film (Packing) on some characters of two tomato lines (Yellow pear beams and Orange beery) and evaluates the expression profiling of few genes involved in the ethylene biosynthesis. In the current study, tomatoes at the stage of colour defect from field were harvested. Experiment was done as a factorial design in a completely randomized design. The first factor was two tomato lines, the second factor included film, film with 1-MCP and control and third factor was four time points after harvesting. The assay was performed in three replications and tomato was kept at 20°C during 16 days storing period. The obtained results showed that there were significant differences between control treatment and other mentioned ones in terms of weight loss, pH, soluble solids and firmness. Regarding to weight loss, treatment with film was more effective than 1-MCP with film. However, the treatment with 1-MCP with film functions better than in other measured character. In gene expression profiling section, gene expression patterns of four genes (*ACS4*, *ACO5*, *ACO1* and *SAMI*) involved in ethylene biosynthesis were investigated. The gained results demonstrated that the film and film with 1-MCP treatments reduced the expression level of mentioned genes compared with that of control. In total, the results showed that the film and film with 1-MCP treatments delayed the processes of the ripening and senescence of tomato fruit.

**Key word:** Tomato, 1-MCP, Ethylene biosynthesis, Gene expression and storage



Faculty of Agriculture

M.Sc. Thesis in Postharvest Physiology and Technology of  
Horticultural Products

**The effect of 1-MCP on gene expression of involved in the  
of biosynthesis of ethylene in tomato**

By: Fatemeh Taheri

Supervisor

Dr. Hojatollah Bodaghi

Dr. Amin Ebrahimi

Advisor

Dr. Ziba Ghasimi Hagh

February, 2018