

## بررسی مقاومت دو رقم زیتون به تنش سرما

منصور افشار محمدیان<sup>۱\*</sup>، شیوا رضایی<sup>۱</sup>، محمد رمضانی ملک روڈی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup>گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گیلان، <sup>۲</sup> ایستگاه تحقیقات زیتون رودبار، رشت، گیلان، ایران

### چکیده:

زیتون (*Olea europaea* L.) از گیاهان همیشه سبز و بومی نواحی مدیترانه‌ای است. این گیاه متحمل به شوری و خشکی است، اما در دماهای پایین مقاومت کمی دارد. در سال‌های اخیر به علت افزایش تقاضا برای روغن و میوه‌ی زیتون، کاشت درخت زیتون در ایران گسترش یافته است. ارقام مختلف زیتون واکنش‌های مقاومتی نسبت به سرما دارند و بنابراین انتخاب ارقام مقاوم، مؤثرترین روش برای اجتناب از خسارات سرما به شمار می‌رود. بدین منظور برای مقایسه تاثیر تنش سرما بر میزان پروتئین کل، پراکسیداسیون لیپیدی و محتوای کلروفیل دو رقم زیتون (سویالانا و فراتنئیو)، نهال‌های ۱ ساله، در معرض ۷ دمای ۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و دمای شاهد (۲۰ °C) به تدریج و برای ۱۲ ساعت قرار گرفتند. پس از هر مرحله‌ی دمایی، نمونه برداری از برگ گیاهان انجام شد. نتایج نشان داد که تا دمای صفر، تنش معنی‌داری به نمونه‌ها وارد نشد و هر دو رقم تا این دما مقاومت نشان دادند، اما وقتی دما به زیر صفر رسید، رقم فراتنئیو حتی تا دمای ۱۵ - قادر به حفظ ساختارهای فتوستزی خود بود و میزان مالون دی آلدھید نیز در آن افزایش چندانی در مقایسه با شاهد (demai ۰ °C)، نداشت. میزان پروتئین کل در فراتنئیو از دمای ۱۰ - به پایین کاهش معنی‌داری نشان داد، اما در رقم سویالانا این کاهش از دمای ۵ - به پایین دیده شد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که رقم فراتنئیو نسبت به سویالانا، رقم مقاومتری نسبت به تنش سرمایی است.

کلمات کلیدی: زیتون، تنش سرمایی، پروتئین کل، پراکسیداسیون لیپیدی، رنگدانه‌ها

معتدل رشد می‌کند. دمای کمتر از ۱۲ - درجه سانتی‌گراد می‌تواند آسیب‌های جدی به گیاه وارد کرده و حیات گیاه را مورد تهدید قرار دهد (Larcher, 1970). آسیب ناشی از پدیده‌ی یخ زدگی در دماهای زیر ۷ - درجه سانتی‌گراد در زیتون رخ می‌دهد و باعث کاهش تولید محصول آن می‌شود (Palliotti and Bongi, 1996). یخ زدگی در ابتدا سبب تشکیل بلورهای یخ در آوندهای گیاهان شده و سپس این بلورها به سرعت به همه قسمت‌های گیاه رسیده، به نواحی بین سلولی نفوذ کرده و باعث ایجاد اختلاف فشار اسمزی در بیرون و درون سلول شده و در

### مقدمه:

حدود دو سوم از مساحت زمین‌های جهان، سالانه در معرض دماهای زیر نقطه‌ی یخ زدگی قرار می‌گیرند. به علت افزایش تقاضا برای روغن و میوه‌ی زیتون، در سال‌های اخیر کاشت درخت زیتون به نواحی فراتر از نواحی معمول گسترش یافته است. همچنین دیده شده است که در مناطقی که در فصل پاییز هوا سردتر است، روغن زیتون با کیفیت بالاتری بدست می‌آید (Palliotti and Bongi, 1996). درخت زیتون از جمله گیاهان همیشه سبز و پایا بوده که در نواحی با آب و هوای گرم و یا

\*نویسنده مسئول، نشانی پست الکترونیکی: afshar@guilan.ac.ir

(۱۳۸۹)، طی پژوهشی به بررسی مقاومت برخی ارقام زیتون به تشن سرما، با استفاده از بررسی آسیب‌های ظاهری و فلورسانس کلروفیل پرداختند و دو دمای ۰ و ۵-درجه سانتی گراد، تنشی به نمونه‌ها وارد نکرده و همه ارقام در این دو دما مقاومت نشان می‌دهند. طی مطالعه‌ای، Bongi و Palliotti (۱۹۹۴)، درختان زیتون را به مدت ۴ هفته در معرض تنش دمای پایین قرار دادند و متوجه شدند که آنها می‌توانند در دماهای بالای دمای صفر درجه سانتی گراد مقاومت کنند. طی یک بررسی شدنده، آنها می‌توانند در دماهای بالای دمای صفر درجه سانتی گراد مقاومت کنند. با ارزیابی ۱۰ رقم زیتون به وجود تفاوت‌های زیادی بین ارقام، از لحاظ میزان مقاومت به سرما اشاره کردند. Li و همکاران Croftonweed (۲۰۰۸) پاسخ فیزیولوژیکی ارقام مختلف (Eupatorium adenophorum) را در تشن دمای پایین مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از تحقیق آنها نشان داد که میزان مالون دی‌آلدهید در ارقام مختلف متفاوت بود. بدین ترتیب که در برخی ارقام ابتدا روند کاهشی و سپس افزایشی داشت، اما در پاره‌ای دیگر روند از ابتدا صعودی بود که این موضوع حاکی از متفاوت بودن مقاومت ارقام مختلف به تشن سرما است. سویلاتا درخت زیتون زود رشد بومی اسپانیا است که به علت داشتن میوه‌های بسیار بزرگ مشهور بوده و تحت عنوان زیتون ملکه فروخته می‌شود. هسته‌ی میوه‌ی سویلاتا (Sevillana) چسبنده و به علت داشتن محتوای روغن پایین، بیشتر برای ترشی استفاده می‌شود. رقم فراتئیو (Frantoio)، مورد توجه ترین رقم زیتون در منطقه‌ی توسكانی ایتالیا است. این رقم زود رشد و سازگار به طیف وسیعی از خاک‌ها است و محصول زیتون قابل قبولی تولید می‌کند. سایز میوه‌ی آن متوسط (۲ تا ۳ گرم) و غنی از روغن (۱۸ تا ۲۲ درصد) می‌باشد و کیفیت بسیار مطلوبی دارد و هنگام چیدن، عطر دلپذیری دارد. این رقم خودلاقحی انجام می‌دهد، اما وقتی که توسط رقم

نهایت منجر به نشت آب و پلاسمولیز شدید سلول‌ها می‌شود. کمبود آب مهمترین تنشی است که سلول‌های یخ‌زده از آن رنج می‌برند (Wisniewski *et al.*, 2003). افزایش رنوتیپ‌های مقاوم به یخ زدگی، به تشن خشکی نیز مقاومت نشان می‌دهند (Chen *et al.*, 1975). افزایش غلظت ترکیبات سلولی، رسوب پروتئین، تغییر در نفوذ پذیری غشای سلولی، کاهش حجم سلول و تغییر pH از جمله نتایج مستقیم یخ زدگی سلولی محسوب می‌شوند (Levitt, 1980). البته آسیب ناشی از تشکیل یخ، در مزرعه، به ندرت در سلول‌های گیاهان مقاوم به یخ زدگی رخ می‌دهد (Burke *et al.*, 1976). ارقام مختلف زیتون واکنش‌های متفاوتی نسبت به سرما دارند (Barranco *et al.*, 2005). انتخاب ارقام مقاوم به سرما، مؤثرترین روش برای اجتناب از خسارات سرما به شمار می‌رود. این مسئله، به ویژه در مناطقی مثل ایران که کشت زیتون به سرعت در حال گسترش است، اهمیت ویژه‌ای دارد (Bartolozzi *et al.*, 1999). اندام‌های مختلف زیتون مقاومت متفاوتی نسبت به یخ زدگی از خود نشان می‌دهند. طی یک مطالعه، Mancuso (۲۰۰۰)، نشان داد که ریشه و جوانه به ترتیب مقاوم‌ترین و حساس‌ترین اندام نسبت به یخ زدگی هستند. ریشه‌ها به دلیل اثر حفاظتی خاک، به ندرت در معرض یخ زدگی قرار می‌گیرند. آسیب برگ به صورت: انقباض و پیچش متقاطع صفحه‌ی برگ به سمت سطح زیرین، ظهور مناطق کلروزه شده در نیچه‌ی مرگ سلول‌های پارانشیم نرdbانی و خشکی جزئی یا کلی همراه با ایجاد رنگ قهوه‌ای در برگ ایجاد می‌شود (Pezzarossa, 1985; Denney *et al.*, 1993). درباره‌ی مکانیسم‌های پاسخ بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی در درختان زیتون تحت تشن شدید سرما، برخی مطالعات یک روند افزایشی در غلظت کلی قندهای محلول و پروتئین کل را در طی سازگاری مزرعه‌ای به سرما، در پاییز و زمستان نشان داده‌اند (Bartolozzi *et al.*, 1999). سیم‌کش‌زاده و همکاران

نیتروژن مایع شوک فریز شده و بلافصله به فریزر -۷۰ می‌ منتقل و تا زمان انجام آزمایش‌ها در آنجا نگهداری شدند. برای سنجش میزان پروتئین کل ابتدا ۱۰۰ گرم بافت تازه‌ی برگ به کمک نیتروژن مایع پودر شد و به آن بافر استخراج سففات اضافه شد. سپس نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور rpm ۱۴۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. بعد از سانتریفیوژ، محلول رویی با دقت برداشته شده به میکروتیوب دیگری انتقال داده و به مدت ۵ دقیقه به روش قبلی مجدد سانتریفیوژ و عصاره‌های تهیه شده، جهت انجام آزمایش سنجش پروتئین کل استفاده شدند. سنجش پروتئین کل، برطبق روش Bradford (۱۹۷۶) و با استفاده از آلبومین سرم گاوی به عنوان استاندارد انجام شد.

اندازه‌گیری میزان پراکسیداسیون لیپیدی براساس Heath سنجش میزان مالون دی آلدهید با استفاده از روش Packer و (۱۹۶۸) انجام شد. بدین منظور ۰/۵ گرم بافت تازه برگ با ازت مایع پودر شد و به آن ۵ میلی‌لیتر محلول تری کلرواستیک اسید (TCA) ۵ درصد اضافه شد. عصاره به دست آمده با سرعت (rpm) ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس میزان محلول شناور اندازه‌گرفته و حجم مساوی از محلول TCA ۲۰ درصد حاوی ۰/۵ درصد TBA به آن افزوده شد. مخلوط به مدت ۲۵ دقیقه در ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و بلافصله در بین ۷۵۰۰ (rpm) سانتریفیوژ و پس از اندازه‌گیری میزان جذب در دو طول موج ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر، غلظت MDA بر حسب رابطه‌ی ریز بدست آمد.

$$\text{MDA} = \frac{(A_{532} - A_{600})}{\times 1000}$$

برای محاسبه غلظت MDA از ضریب خاموشی معادل  $155 \text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$  استفاده شد و در نهایت مقدار MDA بر حسب میکرومول در گرم وزن تر محاسبه شد.

دیگری لقاح انجام می‌دهد، میوه‌ی فراوان‌تری تولید می‌کند. از عوامل محدود کننده رشد زیتون در مناطق معتدل و سردسیر، دماهای کم در زمستان و اوایل بهار است (Bartolozzi *et al.*, 1999). با توجه به خصوصیات مطلوب ذکر شده از دو رقم فرانتوئیو و سویلانا، هدف این تحقیق بررسی مقاومت این دو رقم در مقابل تنش سرما بود تا رقم مقاوم‌تر جهت استفاده در نواحی سردتر معرفی شود.

#### مواد و روش‌ها:

در این پژوهش اثر تنش سرما بر روی برگ‌های ۲ رقم زیتون (سویلانا و فرانتوئیو) به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۳ تکرار با ۷ تیمار دمایی ۱۰، ۵، ۰، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درجه سانتی‌گراد همراه با شاهد (دما ۲۰ درجه سانتی‌گراد) در آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه گیلان بررسی شد. این نحوه اعمال تنش، بر طبق روش Cansev و همکاران (۲۰۰۹)، با اندکی تغییرات بود. در این پژوهش از هر رقم تعداد ۶ نهال یک ساله از ایستگاه تحقیقات زیتون شمال کشور واقع در منطقه‌ی رودبار تهیه شد. نهال‌ها ابتدا به مدت ۲ ماه در شرایط گلخانه با متوسط دمای شب و روز به ترتیب ۱۴ و ۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفتند. نهال‌ها سپس جهت اعمال تیمار سرما به اتاقک رشد (Test Chamber) منتقل شدند و تیمار دمایی به ترتیب زیر اعمال شد: پس از انتقال نهال‌ها به اتاقک رشد، ابتدا دما در عرض ۶ ساعت از ۲۰ درجه به ۱۰ درجه سانتی‌گراد رسید و سپس به مدت ۱۲ ساعت در ۱۰ درجه سانتی‌گراد باقی ماند؛ پس از آن دما در طی ۲ ساعت به تدریج به ۵ درجه سانتی‌گراد رسید و دوباره ۱۲ ساعت در این دما باقی ماند. همین روند کاهش دما تا رسیدن به دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد اعمال شد. پس از پایان هر دوره‌ی ۱۲ ساعته، نمونه برداری از برگ گیاهان صورت گرفت و نمونه‌ها به کمک

گراد به طور معنی داری افزایشی و از دمای ۵- تا ۲۰- به طور معنی دار کاهشی بود. اما در رقم فراتنوئیو، روند افزایشی تا دمای ۱۰- حفظ شد و سپس کاهش معنی دار مشاهده شد. نظری همین نتایج، در گیاه سویا نیز گزارش شده است (Zeinali Yadegari *et al.*, 2007).

همچنین نتایج این بررسی با نتایج حاصل از بررسی های دیگر مطابقت داشت (Li *et al.*, 2008). تغییر محتوای پروتئین محلول برای درک تاثیر تنش بر روی پروتئولیز و سنتز پروتئین مهم است (Santos and Caldeira, 1999). در طی تنش، گیاهان متholm تغییرات فیزیولوژیکی بسیاری شده و ژن های متعددی جهت سازگاری در آنها فعال می شود (Ingram and Bartels, 1996). افزایش غلاظت پروتئین در تنش سرما ممکن است حاکی از افزایش فعالیت آنزیم های دفاعی دخیل در استرس اکسیداتیو باشد. تجمع پروتئین بعد از تنش سرما در برگ ممکن است به علت ذخیره پروتئین برای برگشت مجدد به حالت طبیعی باشد (Millard, 1988). کاهش غلاظت پروتئین در گیاهان تحت شنس خشکی نیز گزارش شده است (Moren *et al.*, 1994; Seel *et al.*, 1992) ROS تولید شده تحت تنش سرما به پروتئین، تولید کربونیل و دیگر آمینواسیدهای تغییر یافته می کند (Halliwell and Gutteridge, 1999). این تغییرات منجر به تغییر عملکرد متابولیسم سلول شده و سلول را با مشکل مواجه می کند. در هر دو رقم مورد آزمایش روند تغییرات پروتئین کل در ابتدا افزایشی بود و سپس رو به کاهش گذاشت. می توان چنین استنباط کرد که گیاه پس از رویارویی با تنش شروع به افزایش بیان ژن های دخیل در سنتز آنزیم های دفاعی می کند. DNA نیز یک هدف اصلی برای ROS هاست که هر آسیبی به تمامیت آن می تواند باعث عدم سنتز پروتئین هایی که برای عملکرد مناسب گیاه ضروری هستند شود (Mundree *et al.*, 2002). نتایج ما نشان داد که پس از افزایش ابتدایی، غلاظت پروتئین

برای سنجش کلروفیل از نمونه های برگ بدست آمده از موقعیت میانی برگ کنار رگبرگ اصلی، دیسک برگی با مساحت معین تهیه و با ۵ میلی لیتر استون ۸۰ درصد در هاون چینی آسیاب شد. عصاره حاصل به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۳۰۰۰ (rpm) در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. در نهایت عصاره استونی شفاف جدا و حجم آن با استون خالص به ۵ میلی لیتر (حجم اولیه) رسانده شد. سپس شدت جذب محلول در طول موج های ۶۴۶/۸، ۴۷۰ و ۶۶۳/۲ با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر، در مقابل شاهد قرائت شد و میزان کلروفیل a و b و همچنین کلروفیل کل با استفاده از روابط زیر بدست آمد (Lichtenthaler, 1994).

$$\text{Chl.a} = (12.25 A_{663.2} - 2.79 A_{646.8}) \times V/A$$

$$\text{Chl.b} = (21.50 A_{646.8} - 5.1 A_{663.2}) \times V/A$$

$$\text{Chl.T} = \text{Chl.a} + \text{Chl.b}$$

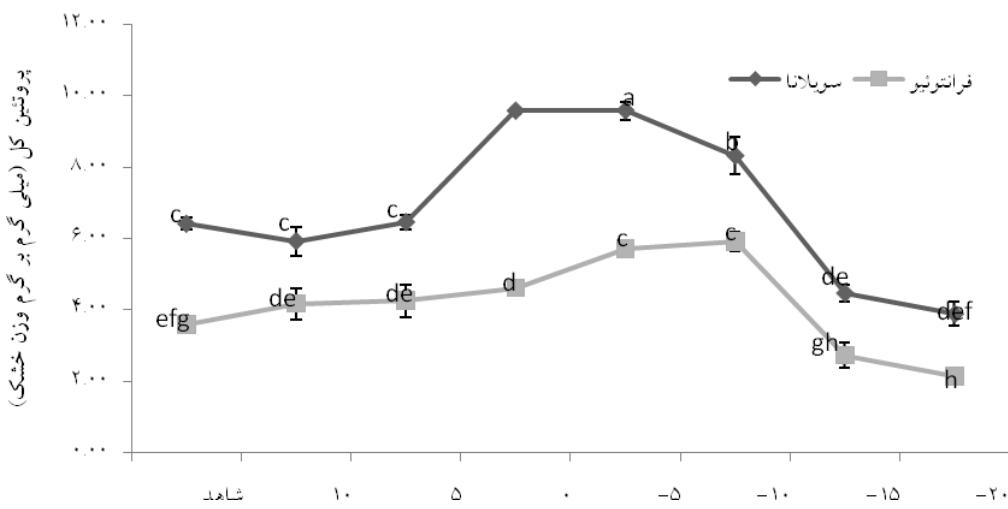
که در روابط بالا V حجم استون به میلی لیتر و A سطح دیسک بر حسب سانتی متر مربع می باشد. غلاظت کلروفیل بر حسب میکرو گرم در سانتی متر مربع سطح برگ بدست آمد.

کلیه ای آزمایش ها با سه تکرار انجام شد و سپس آنالیزهای آماری مربوطه با استفاده از آزمون دانکن و نرم افزار SAS صورت گرفت. برای رسم نمودارها از برنامه ای Excel استفاده شد.

## نتایج و بحث:

### پروتئین کل:

در هر دو رقم مورد آزمایش، مقدار پروتئین کل در طی تنش سرما به طور معنی داری، در مقایسه با تیمار شاهد تغییر نشان داده است (شکل ۱). روند تغییرات در ارقام آزمایش شده، تقریبا مشابه بود؛ با این تفاوت که در رقم سویلانا این روند از دمای ۵ تا دمای ۰ درجه سانتی

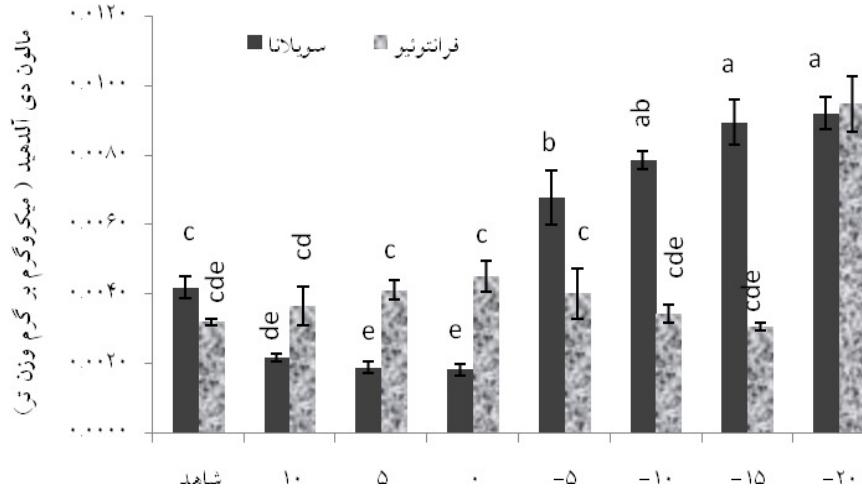
شکل ۱- اثر متقابل تیمارهای دمایی مختلف بر میزان پروتئین کل برگ ۲ رقم زیتون(میانگین $\pm$ SE).تفاوت‌های معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن با حروف مختلف نشان داده شده است ( $P<0.05$ ).

دمای ۲۰- ناگهان افزایش شدید و معنی‌داری نشان داد. با این حال همان طور که شکل ۱ نشان می‌دهد، با وجود تفاوت بین دو رقم، مشاهده می‌شود که میزان مالون دی آلدھید با شروع تیمار به تدریج کاهش و ناگهان در دمای خاصی افزایش شدید نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که اثر متقابل رقم و تیمار دمایی در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌داری داشتند. مشابه با این نتایج توسط Li و همکاران (۲۰۰۸) بدست آمد. یکی از نشانه‌های استرس اکسیداتیو افزایش پراکسیداسیون لیپیدی است. پراکسیداسیون لیپیدی یک فرآیند متابولیکی طبیعی در شرایط هوایی معمول است و یکی از بیشترین موارد بررسی شده در مورد عمل ROSها بر روی ساختار و عملکرد غشا است (Blokhina *et al.*, 2003). به علت آن که غشاهای سلولی تمامیت و پایداری تحت شرایط تنش یکی از مهمترین مولفه‌ها در مقاومت گیاه محسوب می‌شود. در سلول‌های گیاهی اکسیژن‌های فعل اغلب در اثر قرار گرفتن گیاه در دمای‌های پایین ایجاد می‌شوند. در طی سرمایزدگی ممکن است در شروع آسیب، شدت تنفس بالا رفته و در نتیجه با

سیر نزولی داشت که این کاهش می‌تواند به علت آسیب رادیکال‌های آزاد به ساختارهای سلولی باشد. در این حالت آنزیم‌های دفاعی و نیز ترکیبات آنتی‌اکسیدانی سلولی قادر به مهار آسیب نیستند. با توجه به این که افزایش میزان پروتئین، در رقم فرانتوئیو نسبت به سوریلانا تا دمای پایین‌تری ادامه داشته است، بنابراین می‌توان گفت احتمالاً رقم فرانتوئیو با اتخاذ چنین روشی سعی در مقاومت و سازگاری بیش‌تری نسبت به تنش سرما داشته و مکانیسم‌های مقابله با تنش در آن فعال‌تر بوده است.

#### سنجهش میزان مالون دی آلدھید:

محتوای مالون دی آلدھید در پاسخ به تنش سرما بین دو رقم مورد مطالعه و در تیمارهای مختلف، تفاوت معنی‌داری نشان داد (شکل ۲)؛ به طوری که میزان MDA در رقم سوریلانا، تا دمای ۵ و ۰ درجه روند کاهشی و سپس تا دمای ۲۰- به طور معنی‌داری روند افزایشی داشت. در رقم فرانتوئیو، MDA در دمای ۱۰ و ۱۵- درجه سانتی گراد، تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد نداشت، ولی در



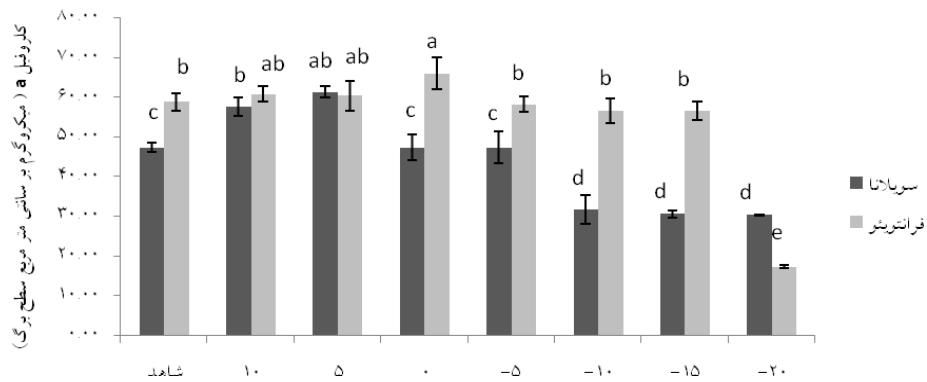
شکل ۲- اثر متقابل تیمارهای دمایی مختلف بر میزان مالون دی آلدھید برگ ۲ رقم زیتون(میانگین  $\pm$  SE).

تفاوت‌های معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن با حروف مختلف نشان داده شده است ( $P<0.05$ ).

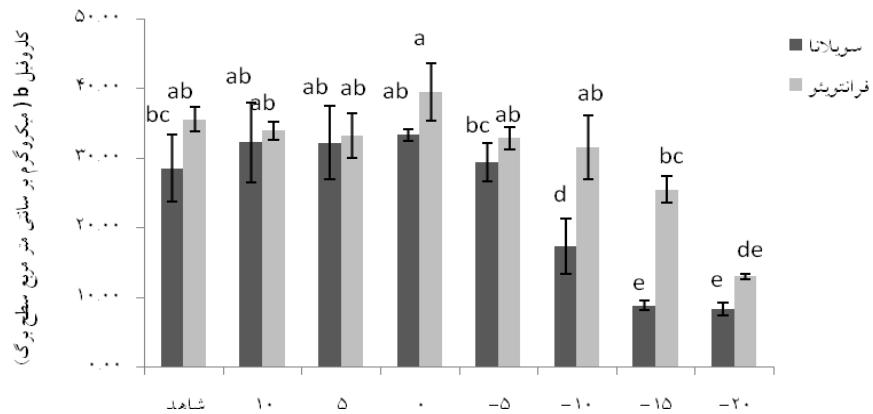
#### محتوای کلروفیل برگ:

بر اساس نتایج حاصل از این آزمایش، اختلاف معنی داری در غلظت کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل بین دو رقم زیتون مورد مطالعه مشاهده شد (شکل ۳، ۴ و ۵). در رقم سویلانا از دمای -۱۰- درجه سانتی گراد، کاهش معنی‌داری در مقایسه با گیاهان کترل دیده شد؛ اما در رقم فرانتوئیو، مشاهده شد که در دمای -۵ و -۱۰ و -۱۵ میزان کلروفیل کل در مقایسه با گیاهان کترل کاهش نیافت. نتایج مشابه در گیاه (*Lactuca sativa L.*) تحت تنش سرما (Giannakoula *et al.*, 2006) و نیز در دو رقم زیتون و در گیاهان آفتاب‌گردان تحت تنش کم آبی مشاهده شد (Manivannan *et al.*, 2007; Guerfel *et al.*, 2009; Farooq *et al.*, 2009; Anjum *et al.*, 2011). رنگیزه‌های فتوستتری در گیاهان نقش مهمی در به دام انداختن نور بر عهده دارند. هر دو کلروفیل a و b نسبت به تنش‌های محیطی حساس می‌باشند که فتوستتر تحت تنش سرما کاهش می‌یابد، احیا شدن

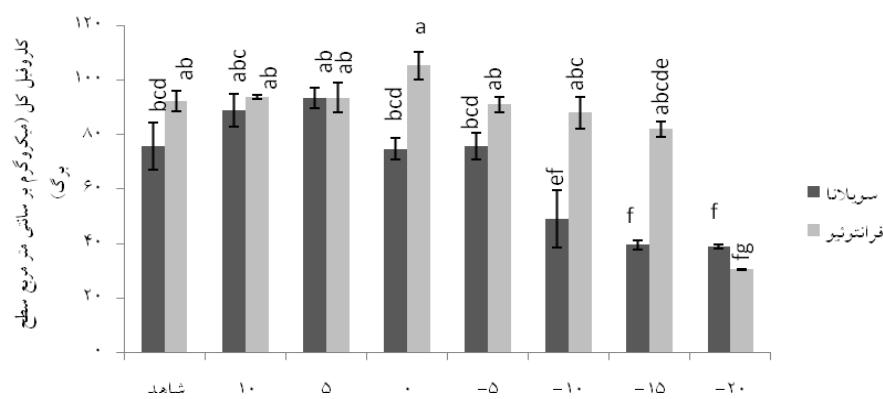
افزایش تنفس، جذب اکسیژن در ساعت‌های اولیه سرما بسیار بالا رود، در حالی که خروج دی اکسید کربن به مقدار کمتری افزایش می‌یابد. به عبارتی در اثر سرمادگی میزان تنفس بالاتر رفته و سطح اکسیژن زیاد می‌شود (McKersie *et al.*, 1988; McKersie, 1991; Hausladen., 1994) سوپراکسید یک اکسیده بسیار قوی است و می‌تواند لیپید ها و اسیدهای چرب غیراشباع را پراکسیده کند که این منجر به خسارت سریع و برگشت ناپذیر غشا می‌شود (Kaniuga *et al.*, 1979; Taylor *et al.*, 1979) به نتایج حاصله از این آزمایش و با نظر به این که میزان مالون دی آلدھید که شاخصی از تنش محسوب می‌شود، در رقم فرانتوئیو نسبت به سویلانا در دمای پایین‌تری افزایش ناگهانی داشته است، بنابراین می‌توان چنین در نظر گرفت که رقم فرانتوئیو قابلیت مقاومت و سازگاری بیشتری تحت تنش سرما از خود نشان می‌دهد. غلظت MDA بالاتر در برگ‌های رقم سویلانا نشانه‌های آسیب اکسیداتیو را نمایان می‌کند.



شکل ۳- اثر مقابل تیمارهای دمایی مختلف بر میزان کلروفیل a برگ ۲ رقم زیتون(میانگین  $\pm$  SE). تفاوت های معنی دار بر اساس آزمون دانکن با حروف مختلف نشان داده شده است ( $P<0.05$ ).



شکل ۴- اثر مقابل تیمارهای دمایی مختلف بر میزان کلروفیل b برگ ۲ رقم زیتون(میانگین  $\pm$  SE). تفاوت های معنی دار بر اساس آزمون دانکن با حروف مختلف نشان داده شده است ( $P<0.05$ ).



شکل ۵- اثر مقابل تیمارهای دمایی مختلف بر میزان کلروفیل کل برگ ۲ رقم زیتون (میانگین  $\pm$  SE). تفاوت های معنی دار بر اساس آزمون دانکن با حروف مختلف نشان داده شده است ( $P<0.05$ ).

تنشی به گیاهان زیتون وارد نمی‌کند که پژوهش ما نیز چنین نتیجه‌ای را تایید کرد.

#### نتیجه‌گیری:

بررسی اثر متقابل دما و رقم در مقدار تنش وارد به گیاه، نشان دهنده‌ی مقاومت دو رقم زیتون مورد بررسی به سرما تا دمای + درجه سانتی‌گراد بود. آسیب ناشی از سرمادگی در رقم سویلانا از دمای - درجه سانتی‌گراد شروع شده و در دمای - درجه سانتی‌گراد تشدید شد، اما در رقم فرانتوئیو آسیب سرمادگی از دمای - شروع شد در واقع غلظت بالای کلروفیل و پراکسیداسیون لیپیدی کمتر در رقم فرانتوئیو نشان دهنده آسیب کمتر ناشی از تنش اکسیداتیو نسبت به رقم سویلانای تحت تنش سرما است. غلظت MDA بالاتر در برگ‌های رقم سویلانا در مقایسه با گیاهان شاهد، نشانه‌های آسیب اکسیداتیو را نشان می‌دهد. بنابراین، با وجود این‌که زیتون به عنوان گیاهی نیمه گرم‌سیری شناخته می‌شود اما، برخی از ارقام زیتون قادر به تحمل دماهای پائین می‌باشند. با توجه به این‌که رقم فرانتوئیو در مقایسه با رقم سویلانا نشانه‌های آسیب اکسیداتیو کمتری نشان داد، می‌توان نتیجه گرفت که رقم مقاوم‌تری نسبت به تنش سرمایی است. جهت کاهش خسارات ناشی از سرما در مناطقی که با خطر سرمادگی مواجه هستند، می‌توان از ارقام مقاوم‌تر از جمله فرانتوئیو استفاده کرد. در مجموع، می‌توان بیان کرد که تحمل ارقام زیتون با اندازه‌گیری فلورسانس کلروفیل و آسیب ایجاد شده در آن می‌تواند میزان مقاومت به سرما در برخی ارقام زیتون را بهتر تحمل می‌کند.

ارقام زیتون با اندازه‌گیری فلورسانس کلروفیل و آسیب ایجاد شده در آن می‌تواند میزان مقاومت به سرما در برخی ارقام زیتون را بهتر تحمل می‌کند.

بیش از حد زنجیره‌ی انتقال الکترون فتوستتری منجر به تشکیل ROS شده که ممکن است آسیب اکسیداتیو ایجاد کند. در این آزمایش، برگ‌های تحت تنش سرما نشانه‌های تنش اکسیداتیو را نشان می‌دهند. یکی از این نشانه‌ها کاهش شدید کلروفیل a و کلروفیل کل بود. بر طبق گفته‌ی Ashworth (۱۹۹۳)، کاهش محتوای کلروفیل، یک نشانه‌ی شاخص تنش اکسیداتیو بوده و ممکن است در نتیجه‌ی تخریب کلروفیل و یا در نتیجه‌ی نقص در سنتز کلروفیل همراه با تغییر ساختار غشایی تیلاکوئیدی باشد. نتایج این تحقیق نشان داد که کاهش فتوستتر در دو رقم متفاوت بود که می‌تواند به ژنتیپ متفاوت دو رقم نسبت داده شود. شرایط محیطی از قبیل تنش سرما ممکن است رشد گیاه را نسبت به کاهش سرعت فتوستتر محدود کند. تحت چنین شرایطی ترکیبات فنلی بیشتری تولید می‌شود (Bryant *et al.*, 1983). احتمالاً رقم فرانتوئیو، به علت دارا بودن مکانیسم‌های دفاعی مقاوم تری در مقایسه با رقم سویلانا، تا دماهای پایین تری قادر به حفظ ساختار کلروفیل خود بوده است. طی مطالعه‌ای Fontanazza (۱۹۸۶) گزارش کرد که با کاهش دمای زمستان کمتر از - درجه سانتی‌گراد، بخش‌های هوایی درختان زیتون می‌توانند به درجات متفاوتی آسیب بینند. گزارشات نشان داده است که در گیاهان نواحی مدیترانه، در شرایط زمستان، با تخریب ساختارهای فتوستتری، فرآیند بازدارندگی نوری رخ داده و مقدار فتوستتر کاهش می‌یابد. مقدار این بازدارندگی، در روزهای سردتر افزایش یافته که همین امر باعث تشدید کاهش فتوستتر می‌شود (Oliveira and Penuelas, 2000). گزارش کردنده که دمای - درجه سانتی‌گراد، (۱۳۸۹)، گزارش کرده که دمای - درجه سانتی‌گراد،

#### منابع:

سیم کش زاده، ن، مبلی، م، اعتمادی، ن. و بانی نسب، ب. (۱۳۸۹) ارزیابی میزان مقاومت به سرما در برخی

- at chilling temperatures on the function of the photosynthetic apparatus under high and low irradiance in leaves of lettuce (*Lactuca sativa* L.), Proceedings of the 5th WSEAS International Conference on Environment, Ecosystems and Development, Venice, Italy.
- Gomez-del- Campo, M. and Barranco, D. (2007) Field evaluation of frost tolerance in 10 olive cultivars. *Plant Genetics Resourc* 3: 385-390.
- Guerfel, M., Boujnah, D. and Zarrouk, M. (2009) Photosynthesis parameters and activities of enzymes of oxidative stress in two young 'Chemlali' and 'Chetoui' olive trees under water deficit. *Photosynthetica* 47: 340-346.
- Guerfel, M., Baccouri, O., Boujnah, D., Chaibi, W., and Zarrouk, M. (2009) Impacts of water stress on gas exchange, water relations, chlorophyll content and leaf structure in the two main Tunisian olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *Science Horticulturae* 119: 257-263.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1999) Free Radicals in Biology and Medicine, 3rd edition. Oxford University Press, Oxford, 936 p.
- Hausladen, A. and Alscher, R. G. (1994) Cold-hardiness-specific glutathione reductase isozymes in red spruce. Thermal dependence of kinetic parameters and possible regulatory mechanisms. *Plant Physiology* 105: 215-223.
- Heath, R.L. and Packer, L. (1969). Photoperoxidation in isolated chloroplast.I Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arches of Biochemistry and Biophysics*. 125:189- 198.
- Ingram, J. and Bartels, D. (1996). The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review of Plant Physiology* 47: 377-403.
- Kaniuga, Z., Zabek, J. and Michalski, W. P. (1979) Photosynthetic apparatus in chilling sensitive plants. VI. Cold and dark induced change in superoxide dismutase activity in relation to loose la bound manganese content. *Planta* 145: 145-150.
- Larcher, W. (1970) Okophysiologie der Pflanzen. *Oecologia Plantarum* 5: 267-286.
- Levit, J. (1980) Response of plant to environmental stress; chilling, freezing a hightemperatures. 2nd ed. Vol. 1. Academic, New York.520.
- Levitt, J. (1980) Response of plants to environmental stress, Vol. 1, 2nd edn. New York: Academic Press.
- Li, H., Qiang, S. and Qian, Y. (2008) Physiological response of different croftonweed (*Eupatorium adenophorum*) populations to low temperature. *Weed Science* 56:196-202.
- Lichtenthaler, K.H. (1994) Chlorophyll and carotenoids pigments of photosynthetic Anjum, S. A., Xie, X., Wang, L., Saleem, M. F., Man, C. and Lei, W. (2011) Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *African Journal of Agricultural Research* 6: 2026-2032.
- Ashworth, E.N. (1993) Deep supercooling in woody plant tissues. In: li, ph and christersson, l (eds. Boca Raton, F.L.) 203-213. *Advances in Plant Cold Hardiness*: CRC Press, Boca Raton, pp 203-213.
- Barranco, D., Ruiz, N., and Gomez-del Campo, M. (2005) Frost tolerance of eight olive cultivars. *Horticultural Sciences* 40: 558-560.
- Bartolozzi, F. and Fontanazza, G. (1999) Assessment of frost tolerance in olive (*Olea europaea* L.). *Science Horticulturae* - Amsterdam 81: 309-319.
- Blokchina, O., Virolainen, E. and Fagerstedt, K.V., 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annual Biochemistry* 91: 179-194.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram of protein utilizing of protein- day binding. *Annual Biochemistry* 72: 248-54.
- Bryant, J.P., Chapin, F.S. and Klein, D.R. (1983) Carbon/nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivore. *Oikos* 40: 357-368.
- Burke, M. J., Gusta, L.V., Quamme. H. A., Weiser. C. J., and Li, P. H. (1976) Freezing and injury in plants. *Annual Review of Plant Physiology* 27: 507-528.
- Cansev, A., Gulen Hand Eris, A. (2009) Cold-hardiness of olive (*Olea europaea* L.) cultivars in cold-acclimated and non-acclimated stages: seasonal alteration of antioxidative enzymes and dehydrin-like proteins. *Journal of Agricultural Science* 147: 51-61
- Chen, P., Li, P.H. and Weiser, C.J. (1975) Induction of frost hardiness in red-osiler dogwood stems by water stress. *Horticultural Sciences* 10: 372-374.
- Denney, J.O., Martin, G.C., Kammereck, R., Ketchie, D.O., Connell, J.H., Krueger. W.H., Osgood, J.W., Sibbett, G.S. and Nour, G.A. (1993) Some olives show damage; many, coldhardiness. *California Agriculture* 47: 2-12.
- Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D. AND Basra, S.M.A. (2009) Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agronomy for Sustainable Development* 29: 185-212.
- Fontanazza, G. (1986) Rinnovamento dell olivi coltura. Colita da freddo: orientamenti tecnici-In L olivo dopo la gelata. *Science Horticulturae* Amsterdam. 81: 309-319.
- Giannakoula, A., Ilias I., Papastergiou, A. and Hatzigaidas. (2006) The effects of development

- Oliveira, G. and Penuelas, J. (2000) Comparative photochemical and phenomorphological responses to winter stress of an evergreen (*Quercus ilex* L.) and a semi-deciduous (*Cistus albidus* L.) Mediterranean woody species. *Acta Oecologica* 21: 97-107.
- Pallioti, A. and Bongi, G. (1996) Freezing injury in the olive leaf and effects of mefluidide treatment. *Journal of American Society for Horticultural Science* 71:57-63.
- Pezzarossa, B. (1985) Danni da freddo all'olivo nei vivai del pescantino. *Rivista di Frutticoltura* 8: 68-70.
- Santos, C.V. and Caldeira, G. (1999) Comparative responses of *Helianthus annuus* plants and calli exposed to NaCl. I. Growth rate and osmotic adjustment in intact plants and calli. *Journal of Plant Physiology* 155: 769-777.
- Seel, W. E., Hendry, G. A. F. and Lee, J. A. (1992) The combined effect of desiccation and irradiance on mosses from xeric and hydric habitats. *Journal of Experimental Botany* 43: 1023-1030.
- Taylor, A. O., Slack, C. R. and McPherson, H. G (1979) Plant under climatic stress.VI. chilling and light effects on photosynthetic enzymes of sorghum and maize. *Plant Physiology* 54: 696-701.
- Wisniewski, M., Carole, B. and Gusta, L.V. (2003) An overview of cold hardiness in woody plants: seeing the forest through the trees. *Horticultural Science* 38: 952-959.
- Zeinali Yadegari, L., Heidari, R. and Carapetian, J. (2007) The influence of cold acclimation on proline, malondialdehyde (MDA), total protein and pigments in soybean (*glycine max*) seedlings. *Journal of Biological Sciences* 7: 1436-1441.
- biomembranes. *Methods in Enzymology*. 148: 350-382
- Mancuso, S. (2000) Electrical resistance in olive tree. *Plant Cell and Environment* 23: 291-299
- Manivannan, P., Jaleel, C. A., Sankar, B., Kishorekumar, A., Somasundaram, R., Alagu Lakshmanan ,G. M. and Panneerselvam, R. (2007). Growth, biochemical modifications and proline metabolism in *Helianthus annuus* L. as induced by drought stress. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 59: 141-149.
- McKersie, B.D. (1991) The role of oxygen free radicals in mediating freezing and desiccation stress in plants. In: activ oxygen/oxidative stress and plant metabolism. (Eds. Pell, E. and Steffen, K.) 107-118. American Society of Plant Physiology.
- McKersie, B.D., Senaratna, T., Walter, M.A., Kendall, E.J. and Hetherington, P.R. (1988) Deterioration of membranes during aging in plants: Evidence of free radical mediation. In: Senescence and Aging in Plants (Eds L.D. Nooden and A.C. Leopold). 441-464. Academic Press.
- Millard, P. (1988) The accumulation and storage of nitrogen by herbaceous plants. *Plant Cell and Environment* 11:1-8.
- Moran, J.F., Becana, M., Iturbe-Ormaetxe, I., Frechilla, S., Klucas, R.V. and Aparicio-Tejo, P. (1994). Drought induces oxidative stress in pea plants. *Planta* 194: 346-352.
- Mundree, S.G., Baker, B., Mowla, S., Peters, S., Marais, S., Willigen, C.V., Govender, K., Marenda, A., Muyanga, S., Farrant, J.M. and Thomson, J.A. (2002) Physiological and molecular insights into drought tolerance. *African Journal of Biotechnolony* 1: 28-38.

## The impact of cold stress on two olive cultivars

<sup>۱\*</sup>Mansour Afshar Mohammadian, <sup>۱</sup>Shiva Rezaei and <sup>۲</sup>Mohammd Ramezani Malekroudi

<sup>۱</sup> Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, Guilan, Iran

<sup>۲</sup> Olive Research Station, Rudbar, Guilan, Rasht, Iran

\*Corresponding Author: afshar@guilan.ac.ir

### Abstract:

Olive (*Olea europaea* L.) is an evergreen tree traditionally cultivated in the Mediterranean area, relatively tolerant to salinity and drought conditions. However, olive trees are not so resistant to low temperatures. In recent years, because of high demands for olive oil and its fruit, the cultivation of olive trees has been widely spread in Iran. Different cultivars of olives show diverse reactions to cold stress and so, the selection of cold resistant cultivars is the most effective method to avoid frost damages. In order to compare the impact of cold stress on the content of total protein, lipid peroxidation and photosynthetic pigments, one-years old olive cultivars of Sevillana and Frantoio, were exposed to low temperatures of 10, 5, 0, -5, -10, -15, -20 and the control to 20 °C for 12 h. The results indicated that both cultivars were resistant to 0 °C temperature with no adverse effects. The photosynthetic pigments of Frantoio did not change even at -15 °C and malondialdehyde levels were slightly increased compared with the control (20 °C). Total protein content in Frantoio showed significant decrease below -10 °C, while in Sevillana cultivar there was significant decline of total protein content from -5 °C. Therefore, it could be concluded that the Frantoio cultivar was more resistant to cold stress than Sevillana.

Keywords: cold stress, lipid peroxidation, olive, pigment, protein.