

Evaluation of freezing tolerance in four olive cultivars (native and foreign) based on physiological indicators under cold acclimation conditions

Tayebeh Basaki ^{1*}, Seyed Mojtaba Khayam Nekouei ², Soraya Karami ¹, Sakineh Faraji ³,
Maryam Jalili ⁴

¹ Department of Agricultural Sciences, Payame Noor University, Tehran, Iran

² Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

³ Agricultural and Natural Resources Research Center of Markazi Province, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Arak, Iran

⁴ Department of Food research, Institute of Food Industries and Agricultural Products, Standard Research Institute (SRI), Karaj, Iran

Abstract

In order to evaluate the freezing tolerance of olive cultivars (native and foreign), samples of one-year-old shoots of cold-acclimated olive trees, were collected and transferred to the freezer thermo gradient to apply the cold stress. The percentage of electrolytes leakage and free proline content were then measured. The results showed significant differences ($P < 0.01$) among cultivars in terms of measured criteria. By applying freezing temperatures for 24 and 48 hours, the results showed that the electrolyte leakage percentage and the amount of free proline increased and decreased respectively with decreasing temperature in all studied cultivars. So that at $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, the highest and lowest percentage of electrolyte leakage was related to Koroneiki and Roghani cultivars, respectively and at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, the following descending order was obtained for the percentage of electrolyte leakage: Koroneiki>Mission-Roghani>Zard. However, in similar conditions, the highest and lowest amount of proline belonged to Zard and Koroneiki cultivars respectively. On the other hand, the proline content and electrolyte leakage will be helpful in discrimination of susceptible and resistant cultivars under freezing stress condition. Additionally, the native cultivar “Zard” showed a significant superiority to other cultivars, so that, at the critical point of $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 24 hours freezing time, this cultivar showed the lowest percentage of electrolyte leakage and the highest proline content as compared with the other cultivars. In one constant time, with a decrease in temperature, there was no significant difference in the amount of electrolyte leakage for this cultivar as well. Therefore, according to the results, the Zard cultivar could be recommended as the preferable and superior cultivar for cultivation in areas under freezing stress.

Keywords: Cellular membrane stability, Freezing stress, Native cultivars, Organic osmolytes

* Corresponding Author: T.basaki@pnu.ac.ir

Copyright©2019, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0>), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

ارزیابی تحمل به تنش یخ‌زدگی چهار رقم زیتون (بومی و خارجی) بر اساس شاخص‌های فیزیولوژیک در شرایط خوسرمایی

طیبه بساکی^{۱*}، سید مجتبی خیام نکویی^۲، ثریا کرمی^۱، سکینه فرجی^۳، مریم جلیلی^۴

^۱ گروه علوم کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

^۲ دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

^۳ مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان مرکزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اراک، ایران

^۴ گروه پژوهشی مواد غذایی، پژوهشکده صنایع غذایی و فراورده‌های کشاورزی، پژوهشگاه استاندارد، کرج، ایران

چکیده

برای بررسی تحمل به تنش یخ‌زدگی ارقام زیتون (بومی و خارجی)، از شاخه‌های یک‌ساله خوسرمایی شده، نمونه‌هایی انتخاب و پس از اعمال تنش، درصد نشت الکترولیت‌ها و محتوای پرولین اندازه‌گیری شدند. نتایج نشان دادند تفاوت بین ارقام از نظر درصد نشت الکترولیت‌ها و محتوای پرولین آزاد معنی‌دار بود ($P < 0.01$). نتایج اعمال تنش یخ‌زدگی به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت نشان دادند با کاهش دما درصد نشت الکترولیت‌ها و پرولین در همه ارقام بررسی شده به ترتیب افزایش و کاهش یافتند. همچنین در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد بیشترین و کمترین درصد نشت الکترولیت به ترتیب مربوط به ارقام کروناویکی و روغنی بودند و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد بیشترین درصد نشت الکترولیت‌ها به ترتیب مربوط به ارقام کروناویکی، میشن - روغنی و زرد و در شرایط مشابه، بیشترین و کمترین مقدار پرولین به ترتیب متعلق به ارقام زرد و کروناویکی بودند. از سوی دیگر، محتوای پرولین و نشت الکترولیت‌ها در جدا کردن ارقام مقاوم و حساس، کارایی خوبی داشتند. علاوه بر این، رقم بومی زرد در مقایسه با سایر ارقام، واکنش ویژه‌ای در شرایط یخ‌زدگی نشان داد؛ به طوری که در دمای بحرانی ۲۰- درجه سانتی‌گراد و ۲۴ ساعت سرمادهی کمترین میزان نشت الکترولیت‌ها و بیشترین میزان پرولین آزاد را داشت. از سوی دیگر، در مدت ثابت با کاهش دما تفاوت معنی‌داری در میزان نشت الکترولیت‌ها برای این رقم مشاهده نشد. در مجموع، شاید بتوان رقم بومی زرد را رقم با توانایی ویژه برای کشت در مناطق در معرض تنش یخ‌زدگی برای بررسی‌های تکمیلی پیشنهاد کرد.

واژه‌های کلیدی: ارقام بومی، اسمولیت‌های آلی، پایداری غشای سلولی، تنش یخ‌زدگی

* نگارنده مسئول: نشانی پست الکترونیک: T.basaki@pnu.ac.ir، شماره تماس: ۰۸۶۳۴۰۶۲۶۵۱

مقدمه

درخت زیتون (*Olea europaea* L.)، گیاهی نیمه‌گرمسیری و تنها گونه جنس *Olea* با میوه‌های خوراکی در مناطق مدیترانه و شبه‌مدیترانه (Fernandez *et al.*, 1997) است. در حال حاضر، *O. europaea* به دلیل روغن‌کشی و تولید کنسرو از میوه‌های آن در صنایع غذایی و تبدیلی اهمیت دارد (Nikzad *et al.*, 2013). همچنین روغن زیتون به دلیل غیراشباع بودن و غنی بودن آن از آنتی‌اکسیدان‌های قوی، در درمان و جلوگیری از بیماری‌های قلبی، عروقی و نیز سرطان کاربرد فراوان دارد (Zribi, 2017; Ammar *et al.*, 2017). از سوی دیگر، در سال‌های گذشته، به کاشت زیتون به دلیل سازگاری زیاد این گونه درختی به شرایط محیطی و تحمل تنش شوری، خشکی و همیشه سبزبودن در فضای سبز توجه شده است (Simkeshzadeh *et al.*, 2011). با وجود این، از عوامل محدودکننده کاشت این گیاه در مناطق معتدله و سردسیر، مقاومت کم به دماهای کم در زمستان و اوایل بهار است (Mancuso, 2000).

نیاز سرمایی برای نمو گل در گیاه زیتون، عاملی حیاتی است و نوعی بهاره‌شدن (vernalization) تلقی می‌شود؛ به طوری که هرگاه سرمای زمستانی در مناطق زیر کشت این گیاه وجود نداشته باشد، گل‌دهی زیتون هرگز انجام نخواهد شد؛ ولی برای رشد رویشی جوانه‌ها به سرما نیازی نیست؛ با وجود این، آمارهای متفاوتی برای آستانه تحمل درخت زیتون نسبت به دماهای کم ارائه شده‌اند. براساس گزارش‌های منتشرشده، دماهای بحرانی ۸- تا ۱۰- درجه سانتی‌گراد به آسیب اندک و دماهای ۱۷- تا

۲۲- درجه سانتی‌گراد به نابودی کامل درخت زیتون منجر می‌شود (Ayerza and Sibbet, 2001). از سوی دیگر، گزارش شده است دماهای کمتر از ۷- درجه سانتی‌گراد در زمستان به آسیب‌دیدگی بخش‌های هوایی گیاه، خشکی سرشاخه‌ها و کاهش تولید و عملکرد گیاه منجر می‌شود و دمای کمتر از ۱۲- درجه سانتی‌گراد ممکن است آسیب‌های جدی به گیاه وارد کند و حیات درخت را تهدید کند (Barranco *et al.*, 2005).

تنش سرما و یخ‌زدگی از جمله مهم‌ترین تنش‌های محیطی است که با از بین بردن پروتئین‌های سلولی، اختلال در سوخت‌وساز و تغییر در پایداری و نفوذپذیری غشای سلولی؛ بر رشد و عملکرد گیاهان اثر می‌گذارد (Harding *et al.*, 1999). با وجود این، گیاهان با سازوکارهای متعدد و با فرایندهای فیزیولوژیک، سلولی - مولکولی و بیوشیمیایی به تنش یخ‌زدگی پاسخ می‌دهند و بدین ترتیب خود را با شرایط محیطی منطبق می‌کنند و میزان متفاوتی از تحمل را نشان می‌دهند (Filippi *et al.*, 2007). از واکنش‌هایی که گیاهان در رویارویی با این نوع تنش‌ها از خود نشان می‌دهند، واکنش‌های متابولیک هستند که به تجمع اسمولیت‌های آلی منجر می‌شود. پرولین یکی از این اسمولیت‌های آلی است (Rayapati and Stewart, 1991). در تنش‌های اسمزی، بیوستز پرولین افزایش می‌یابد و این مسئله به حفاظت غشا و پروتئین‌های حیاتی دیگر در برابر آثار مختلف غلظت‌های زیاد یون‌های معدنی در دماهای کم منجر می‌شود (Dibax *et al.*, 2010). بررسی‌های

شده است (Barranco *et al.*, 2005; Mousavi *et al.*, 2011)

از آنجا که کشت زیتون، گونه درختی نیمه گرمسیری در استان مرکزی با زمستان‌های نسبتاً سرد در سال‌های گذشته افزایش و اهمیت یافته است، تعیین ارقام مقاوم به سرما یکی از معیارهای مهم در افزایش کاربری این درخت در صنایع غذایی، تبدیلی، دارویی و حتی فضای سبز شهری به شمار می‌رود. با وجود این، در این استان به‌ویژه در شهرستان ساوه، قطب مهم کشاورزی، سرمازدگی وسیع در زمستان سال ۱۳۹۲ به صدمات جبران‌ناپذیری به باغ‌های زیتون، انار، انجیر و انگور منجر شد. گفتنی است بیشترین سطح زیر کشت باغ‌های زیتون در این منطقه به ارقام خارجی تجاری از جمله ارقام کرونا یکی و میشن به دلیل داشتن کیفیت و کمیت زیاد روغن میوه مربوط بود. با توجه به وجود ذخایر ژنتیکی غنی ارقام بومی زیتون در ایران و همچنین موفقیت کشت این ارقام در مقایسه با ارقام خارجی در سایر نقاط سردسیر و هم‌جوار با این استان، اهداف از پژوهش حاضر، مقایسه توانایی مقاومتی ارقام بومی و خارجی - تجاری زیتون به تنش یخزدگی در شرایط شاهد و خوسرمایی و نیز بررسی توانایی دو شاخص فیزیولوژیک فعال در تنش یخزدگی (نشت الکترولیت و محتوای پرولین آزاد) در تفکیک ارقام حساس و مقاوم زیتون هستند.

مواد و روش‌ها

برای ارزیابی میزان مقاومت به یخزدگی ارقام زیتون با شاخص‌های فیزیولوژیک نشت الکترولیت

انجام شده در گیاهانی مانند سیب‌زمینی، جو، گندم و تنباکو نشان داده‌اند در گیاهان مقاوم به دماهای کم، میزان پرولین افزایش می‌یابد (Konstantinova *et al.*, 2002; Dörffling *et al.*, 1990). بدین ترتیب در بسیاری از پژوهش‌ها از پرولین به صورت نشانگری بیوشیمیایی برای تمایز ارقام حساس و متحمل به سرما استفاده می‌شود (Dörffling *et al.*, 1990).

از سوی دیگر به نظر می‌رسد تداوم غشای پلاسمایی یکی از عوامل مهم در بقای گیاهان در تنش یخزدگی است و هرگونه اختلال در ساختار غشای پلاسمایی به بروز خسارت و حتی مرگ گیاه منجر می‌شود؛ بنابراین این صفت یکی دیگر از ملاک‌های ارزیابی تحمل به یخزدگی در گیاهان است. بدین ترتیب، شاخص نشت الکترولیت‌ها یکی از روش‌های ارزان، ساده، تکرارپذیر و نسبتاً ساده در بررسی درجه خسارت ناشی از تنش سرما به غشای سلولی و میزان تحمل سرما در گیاهان در شرایط آزمایشگاهی معرفی شده است (Arvin and Donnelly, 2008). به طور کلی، در صورت آسیب بافت‌های گیاهی در اثر تنش سرما، فعالیت غشا مختل می‌شود و تخریب غشای سلولی رخ می‌دهد که این پدیده به نشت الکترولیت‌های درون‌سلولی به فضای خارج سلولی منجر می‌شود. در صورت شدت گرفتن این پدیده، مرگ سلول و در نهایت، مرگ گیاه رخ خواهد داد (Hana and Bischof, 2004). در تأیید این مطلب در بسیاری از بررسی‌های انجام شده، بین میزان نشت الکترولیت‌ها و تحمل به سرما همبستگی منفی و زیادی گزارش

یکسان از بخش میانی شاخه‌های یک‌ساله پس از برداشت و قرارگیری در جعبه‌های یخ بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شدند.

در بررسی حاضر، براساس نتایج منتشرشده طرح مصوب با شماره ۴-۰۳-۰۳-۰۳-۹۲۳۳۰ مرکز تحقیقات کشاورزی استان مرکزی (ایستگاه تحقیقات ساوه)، رقم کرونایکی، رقم حساس و رقم میشن، رقم مقاوم به تنش یخزدگی (Garrido Fernandez et al., 1997) در شرایط آب‌وهوایی منطقه ساوه انتخاب شد. علاوه بر این، براساس اطلاعات هواشناسی مبنی بر وقوع یخبندان در مناطق معتدله از جمله استان مرکزی در سال ۱۳۹۲ تا ۱۳۹۳ و کاهش دما تا ۱۸- درجه سانتی‌گراد، ارزیابی مقاومت به تنش یخزدگی ارقام بررسی شده در دو دمای ۱۸- و ۲۰- درجه سانتی‌گراد انجام شد.

و میزان پرولین در شرایط خوش‌سرمایی، در بهمن‌ماه ۱۳۹۴ با میانگین حداقل دمای ۷- درجه سانتی‌گراد، شاخه‌های یک‌ساله از درختان سه‌ساله ایستگاه تحقیقاتی زیتون واقع در ساوه در شمال استان مرکزی (بین ۳۴ درجه و ۴۵ دقیقه تا ۳۵ درجه و ۳۴ دقیقه عرض شمالی و ۴۹ درجه و ۱۵ دقیقه تا ۵۰ درجه و ۵۶ دقیقه طول شمالی) انتخاب شدند. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار (هر واحد آزمایشی، ۵ قلمه ۳ جوانه‌ای) انجام شد؛ به طوری که عامل اول، ارقام زیتون (زرد، روغنی، میشن و کرونایکی)، (جدول ۱) و عامل دوم، شدت سرما در دو دمای ۱۸- و ۲۰- درجه سانتی‌گراد و عامل سوم، مدت سرمادهی (۲۴ و ۴۸ ساعت) در نظر گرفته شد. شاخه‌های نمونه‌برداری شده با قطر تقریبی ۱۰ میلی‌متر با رشد

جدول ۱- مشخصات عمومی ارقام زیتون ارزیابی شده در پژوهش حاضر

رنگ میوه در زمان برداشت	درصد روغن در ماده خشک	میزان مقاومت به تنش غیرزیستی	نوع مصرف	مبدأ	رقم
کاملاً قرمز تیره	۵۵	متحمل به خشکی	روغنی، کنسروی	ایران	زرد
بنفش مایل به سیاه	۶۰	نسبتاً حساس به خشکی، مقاومت نسبی به سرما	روغنی	ایران	روغنی
بنفش	۵۰	مقاوم به سرما	روغنی، کنسروی	آمریکا	میشن
سیاه	۶۴	متحمل به خشکی، حساس به سرما	روغنی	یونان	کرونایکی

اعمال تنش یخزدگی و ارزیابی شاخص‌ها:

برای اعمال تنش یخزدگی براساس روش Yamori و همکاران (۲۰۰۵) ابتدا نمونه‌های جمع‌آوری شده برای حفظ رطوبت در کاغذ مرطوب و سپس ورق‌های آلومینیوم پیچیده شدند و سپس به دستگاه انکوباتور (مدل SBOD-201، شرکت FINETECH، کره) برای اعمال تنش دمایی ۱۸- و

۲۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند؛ به طوری که روند کاهش دمای انکوباتور، ۲ درجه سانتی‌گراد بر ساعت بود و باتوجه به عامل مدت سرمادهی، پس از رسیدن دمای نمونه‌ها به هریک از تیمارهای دمایی مدنظر، نمونه‌ها به مدت ۲۴ یا ۴۸ ساعت در آن دما نگه داشته شدند؛ سپس دمای انکوباتور با سرعت ۵ درجه سانتی‌گراد در ساعت تا دمای ۴

خلاصه، برای هر ترکیب تیماری ابتدا شاخه خوسرمایی شده حاوی یک جوانه برگ به قطعات کوچک تقسیم شد و سپس با نیتروژن مایع در هاون چینی پودر شد و در ادامه ۰/۲ گرم از پودر آماده شده در فالكون‌های ۱۵ میلی لیتری ریخته و ۱۰ میلی لیتر سولفوسالیسیلیک اسید ۳ درصد به آن اضافه شد؛ سپس مخلوط یادشده با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ (مدل Centric250IVD، شرکت DOMEL، آلمان) شد. در ادامه، ۲ میلی لیتر از محلول روشن‌رنگ شفاف به فالكون‌های جدید منتقل شد و ۲ میلی لیتر استیک اسید گلاسیال و ۲ میلی لیتر معرف نین هیدرین به آن اضافه و به مدت نیم ساعت در حمام آب گرم با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد؛ سپس نمونه‌ها در حمام آب یخ قرار داده شدند تا کاملاً سرد شوند و واکنش متوقف شود. پس از سرد شدن به نمونه‌ها ۴ میلی لیتر تولون اضافه شد و پس از ورتکس، دو لایه تشکیل شد؛ سپس از لایه رویی که کمپلکس رنگی داشت برای اندازه‌گیری میزان پرولین استفاده شد و میزان جذب نور آن با دستگاه اسپکتروفوتومتر (مدل UV-2600/2700، شرکت Shimadzu، ژاپن) در طول موج ۵۲۰ نانومتر خوانده شد. در نهایت، با توجه به نمودار استاندارد به دست آمده از غلظت‌های مختلف پرولین، میزان پرولین نمونه‌ها به صورت میکرومول بر گرم وزن خشک محاسبه شد.

تحلیل آماری: تجزیه واریانس داده‌ها با رویه GLM، مقایسه میانگین‌ها با آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار LSD در سطح احتمال $P \leq 0/05$ و

درجه سانتی‌گراد افزایش داده شد. پس از اعمال تیمارهای دمایی، شاخه‌ها در موعد مقرر از انکوباتور خارج و برای اندازه‌گیری میزان نشت الکترولیت و مقدار پرولین بلافاصله پس از خروج در نیتروژن مایع قرار داده شدند و سپس به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. گفتنی است، دمای محیط در زمان نمونه‌برداری، ۷- درجه سانتی‌گراد بوده است؛ بنابراین بلافاصله پس از نمونه‌برداری براساس روش‌های گفته شده در زیر، میزان نشت الکترولیت‌ها و محتوای پرولین آزاد در دمای یادشده (تیمار شاهد) اندازه‌گیری شد.

نشت الکترولیت‌ها: برای اندازه‌گیری میزان نشت الکترولیت‌ها از روش Sekozawa و همکاران (۲۰۰۵) با کمی تغییرات استفاده شد. ابتدا شاخه‌ها به قطعات کوچک‌تر حاوی یک جوانه برگ تقسیم و درون فالكون‌هایی حاوی ۲۰ میلی لیتر آب مقطر دوبار تقطیر منتقل شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق روی شیکر با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه قرار گرفتند. پس از سپری شدن این مدت، هدایت الکتریکی اولیه (EC1) اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری میزان کل نشت الکترولیت‌ها (EC2)، نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو (مدل 10L، شرکت DOMEL، آلمان) با دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و پس از سرد شدن نمونه‌ها، هدایت الکتریکی کل اندازه‌گیری و درصد نشت الکترولیت‌ها از رابطه ۱ محاسبه شد.

$$\text{رابطه ۱ } EL (\%) = (EC1/EC2) \times 100$$

پرولین آزاد: برای اندازه‌گیری میزان پرولین از روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) استفاده شد. به‌طور

فیزیولوژیک معنی‌دار بودند (جدول ۲). با توجه به معنی‌دار بودن آثار متقابل، برش‌دهی آثار متقابل در دماها و مدت‌های متفاوت انجام شد و نتایج نشان دادند در هر دما و هر مدت، بین رقم‌ها از نظر درصد نشت الکترولیت‌ها و میزان پرولین آزاد تفاوت معنی‌داری وجود داشت (جدول ۳).

میزان نشت الکترولیت‌ها

میزان نشت الکترولیت در ۲۴ ساعت سرمادهی: با توجه به نتایج برش‌دهی (جدول ۳)، مقایسه میانگین بین ارقام در مدت ۲۴ ساعت سرمادهی نشان داد در زمان نمونه‌گیری و دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد، بیشترین و کمترین درصد نشت الکترولیت‌ها به ترتیب مربوط به رقم‌های کروناپکی و روغنی بودند و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد، بیشترین درصد نشت الکترولیت به ترتیب در ارقام کروناپکی، میشن - روغنی و زرد بود (شکل ۱).

جدول ۲- تجزیه واریانس برای نشت الکترولیت‌ها و پرولین ارقام زیتون خوسرمایی شده در تنش یخ‌زدگی

میانگین مربعات			
منابع تغییرات	درجه آزادی	پرولین	نشت الکترولیت‌ها
رقم	۳	۱/۸۱**	۱۳۱۷/۳**
دما	۲	۲/۰۵**	۱۸۵/۳**
زمان	۱	۰/۶۶**	۱۱۳۰/۷۴**
دما × رقم	۶	۰/۱۸**	۵۶/۴۱**
زمان × رقم	۳	۰/۰۸**	۵۷/۶۴**
دما × زمان	۲	۰/۴۶**	۳۲/۶۸**
دما × زمان × رقم	۶	۰/۴۱**	۱۲۴/۳۹**
خطای آزمایش	۳۶	۰/۰۱	۳/۵۵
درصد ضریب	-	۲۰/۲۵	۳/۵۹

با نرم‌افزار SAS، نسخه ۹/۱ و رسم نمودارها با نرم‌افزار Excel سال ۲۰۱۶ انجام شد.

نتایج و بحث

یکی از فرایندهای مهم در مقاومت گیاهان به تنش سرما، خوسرمایی است. در طبیعت، کاهش تدریجی دما در روزهای کوتاه فصل پاییز، شرایط مساعدی برای خوسرمایی ایجاد می‌کند، در این فرایند علاوه بر کاهش رشد، سازوکارهای درونی گیاه به افزایش مقاومت به تنش یخ‌زدگی پس از قرارگیری گیاه در دماهای نزدیک به صفر درجه سانتی‌گراد منجر می‌شود (Gusta *et al.*, 2007)؛ از سوی دیگر یکی از نقش‌های کلیدی خوسرمایی، پایدارکردن غشا در برابر خسارت ناشی از تنش یخ‌زدگی است (Filippi *et al.*, 2007). براساس اطلاعات هواشناسی استان مرکزی در شهرستان ساوه، دمای هوا در سال ۱۳۹۴ از آبان‌ماه تا آذرماه به تدریج سرد شد و بیشینه سرما در ماه دی (۴/۲- درجه سانتی‌گراد) و در ماه بهمن (۵/۸- درجه سانتی‌گراد) رخ داده است و از نیمه اسفندماه دمای هوا دوباره افزایش یافت (Markazi Province Meteorological Organization, 2018)؛ بنابراین شرایط لازم برای خوسرمایی درختان زیتون در زمان نمونه‌گیری (بهمن‌ماه) در منطقه ساوه فراهم شدند.

براساس نتایج تجزیه واریانس، بین ارقام از نظر درصد نشت الکترولیت‌ها و میزان پرولین آزاد تفاوت معنی‌داری ($P < 0/01$) مشاهده شد. از سوی دیگر آثار متقابل دوگانه و سه‌گانه بین رقم، دما و مدت سرمادهی (دما × رقم، مدت سرمادهی × رقم و دما × رقم × مدت سرمادهی) نیز برای این دو صفت

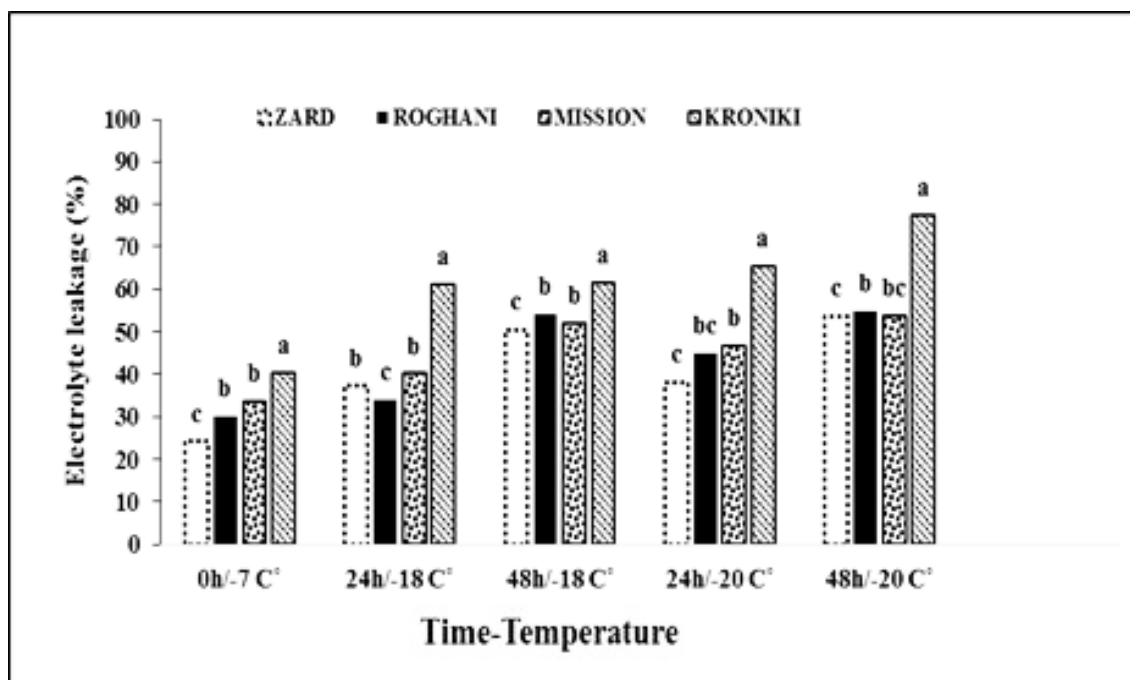
**، معنی‌داری را در سطح احتمال ۱ درصد نشان می‌دهد.

تغییرات

جدول ۳- برش‌دهی آثار متقابل دوگانه برای درصد نشت الکترولیت‌ها و پرولین ارقام زیتون بررسی شده

آثار متقابل	منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	پروکلین
دما × رقم	۱۸- درجه سانتی‌گراد	۳	نشت الکترولیت‌ها ۴۲۹/۳۷**	۱/۵۳**
	۲۰- درجه سانتی‌گراد	۳	۹۴۳/۴۲**	۰/۴۳**
زمان × رقم	۲۴ ساعت	۳	۸۳۰/۲۸**	۱/۱۷**
	۴۸ ساعت	۳	۵۴۳/۷۷**	۰/۷۰**

**، معنی‌داری را در سطح احتمال ۱ درصد نشان می‌دهد.



شکل ۱- درصد نشت الکترولیت‌ها در ارقام بررسی‌شده در دماها و مدت‌های سرمادهی متفاوت- مقادیر، میانگین سه تکرار ± انحراف معیار هستند. حروف متفاوت، بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ براساس آزمون LSD هستند.

سانتی‌گراد) و دمای ۱۸- و ۲۰- درجه سانتی‌گراد به رقم کروناکیکی مربوط بود و سه رقم زرد، روغنی و میشن در هر دو تیمار دمایی، واکنش یکسانی نشان دادند (شکل ۱).

میزان نشت الکترولیت در ۴۸ ساعت

سرمادهی: براساس نتایج به‌دست‌آمده از برش‌دهی اثر متقابل زمان سرمادهی × رقم و دما × رقم (جدول ۳)، مقایسه میانگین بین ارقام در مدت ۴۸ ساعت سرمادهی نشان داد بیشترین میزان نشت الکترولیت در زمان نمونه‌گیری (دمای ۷- درجه

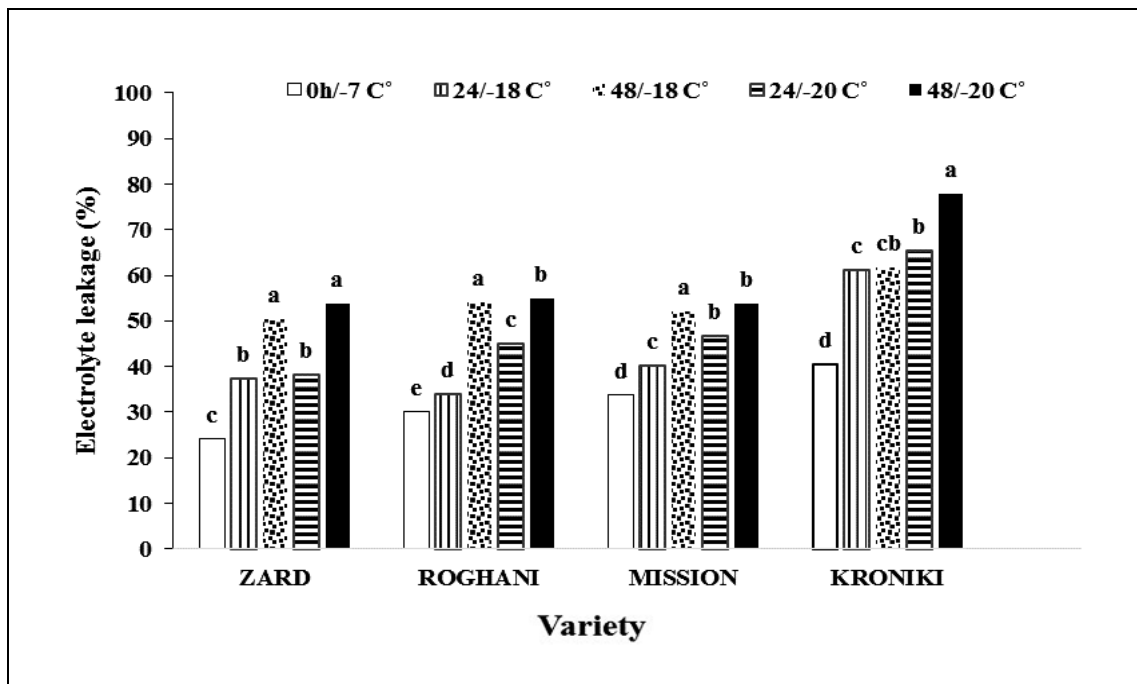
که در ارقام متحمل به سرما این افزایش ناچیز بود. همچنین Guo و همکاران (۲۰۰۶) با اعمال تنش سرمایی بر چهار رقم برنج دریافتند تنش سرما به افزایش نشت الکترولیت‌ها در ارقام حساس منجر می‌شود؛ با وجود این، در رقم‌های مقاوم، این افزایش در میزان نشت یونی ناچیز است.

علاوه بر این، با توجه به معنی‌داری اثر متقابل دما×زمان سرمادهی (جدول ۱)، مقایسه میانگین تیمارهای دمایی و زمانی در هر رقم (شکل ۲) نشان داد در هر رقم و در سطح دمایی ویژه با افزایش مدت ماندگاری، میزان نشت الکترولیت‌ها افزایش داشته است. از سوی دیگر در همه ارقام با کاهش دما از دمای نمونه‌گیری (۷- درجه سانتی‌گراد) تا ۱۸- درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت سرمادهی، میزان نشت الکترولیت‌ها روند افزایشی نشان داد؛ با این حال، در نقطه دمایی ۲۰- درجه سانتی‌گراد و مدت ۲۴ ساعت سرمادهی، شیب خط نشت الکترولیت‌ها منفی شد و دوباره در ترکیب تیماری ۲۰- درجه سانتی‌گراد و ۴۸ ساعت سرمادهی، شیب خط نشت الکترولیت‌ها مثبت و روند تغییرات، افزایشی شد. از آنجا که در همه ارقام، نمونه‌گیری در یک ماه ویژه (بهمن‌ماه) انجام شده است و دما برای خوشرمایی همه ارقام یکسان و کافی بوده است و همچنین با توجه به روند مشاهده‌شده به نظر می‌رسد دمای بحرانی برای تحمل تنش یخ‌زدگی در ارقام بررسی‌شده دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت سرمادهی است و با افزایش مدت ماندگاری در دمای یادشده احتمالاً آسیب به غشای

مشابه با نتایج حاضر، Lesheim و McKersie (۲۰۱۳) گزارش کردند میزان کاهش درجه حرارت و مدتی که گیاهان در معرض سرما قرار می‌گیرند در افزایش میزان نشت الکترولیت‌ها تأثیرگذار هستند. همچنین از نظر بسیاری از پژوهشگران، درصد نشت الکترولیت‌ها با سلامت و پایداری غشا رابطه معکوس دارد و هرچه درصد نشت الکترولیت در گیاهی بیشتر باشد، نشان‌دهنده غشای ناپایدار و حساسیت بیشتر به تنش است (Hana and Bischof, 2004؛ بنابراین، بیشتر بودن درصد نشت الکترولیت‌ها در رقم کرونایکی، نشان‌دهنده حساسیت بیشتر این رقم به تنش یخ‌زدگی است و رقم زرد، رقمی بومی در مقایسه با ارقام تجاری خارجی بررسی‌شده، مقاومت در خور توجهی در شرایط اعمال‌شده نشان داد. مشابه با نتایج حاضر، Barranco و همکاران (۲۰۰۵) با بررسی تحمل به یخ‌زدگی ۸ رقم زیتون گزارش کردند بر اثر کاهش هرچه بیشتر دما تا ۲۲- درجه سانتی‌گراد، میزان نشت الکترولیت‌ها افزایش یافت. همچنین Fontanazza و Bartolozzi (۱۹۹۹) بر اساس میزان نشت الکترولیت‌ها در محدوده دمایی ۱۲- تا ۲۰- درجه سانتی‌گراد، آستانه تحمل ۱۲ رقم زیتون را در شرایط آب‌وهوایی ایتالیا ۱۱/۳۹- تا ۱۸/۳۶- درجه سانتی‌گراد تعیین کردند.

Takac (۲۰۰۴) نیز با بررسی میزان مقاومت ارقام ذرت به تنش یخ‌زدگی نشان داد در ارقام حساس پس از دو روز اعمال تنش سرمایی، میزان نشت الکترولیت تا دو برابر افزایش یافت؛ در حالی

سیتوپلاسمی ارقام افزایش یافت که به افزایش نشت الکترولیت‌ها منجر شد.



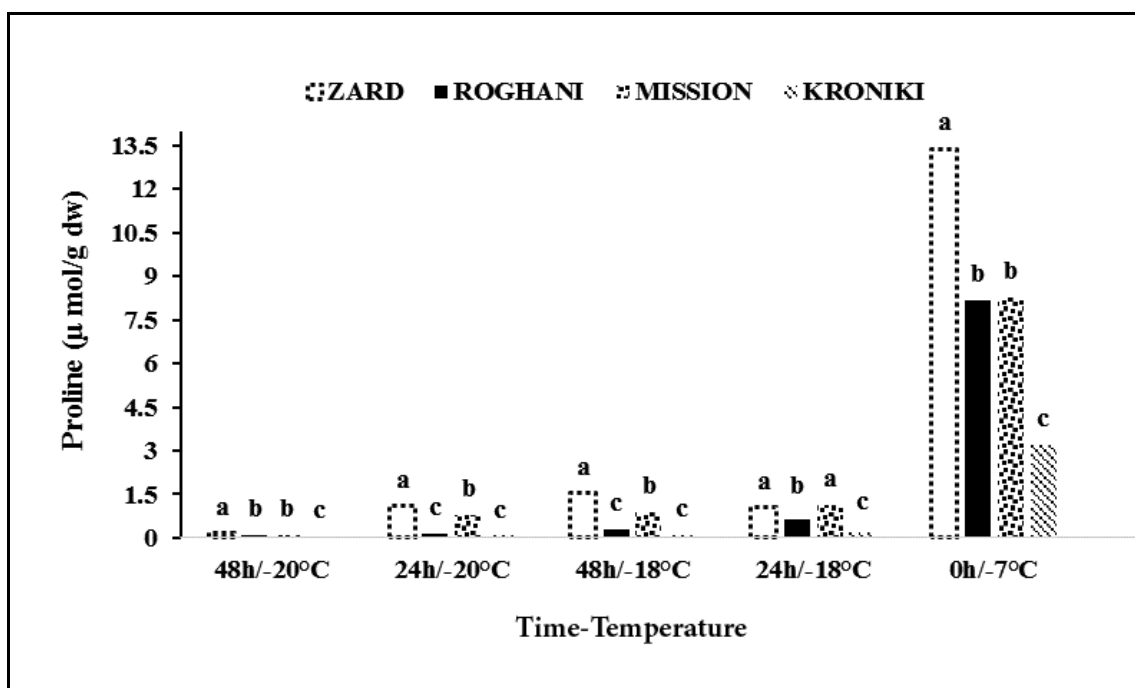
شکل ۲- درصد نشت الکترولیت‌ها در هر رقم در دماها و مدت‌های سرمادهی متفاوت- مقادیر، میانگین سه تکرار ± انحراف معیار هستند. حروف متفاوت، بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ براساس آزمون LSD هستند.

در پژوهش حاضر، بین ارقام بررسی شده، رقم بومی زرد در مقایسه با سایر ارقام، واکنش ویژه‌ای در شرایط یخ‌زدگی نشان داد؛ به طوری که اولاً در دمای بحرانی یادشده (۲۰- درجه سانتی‌گراد و ۲۴ ساعت سرمادهی) در مقایسه با سایر ارقام، کمترین میزان نشت الکترولیت‌ها را داشت (شکل ۲) و دوماً در زمان ماندگاری ثابت با کاهش دما تفاوت معنی‌داری در میزان نشت الکترولیت‌ها برای این رقم مشاهده نشد (شکل ۲) که این مسئله احتمالاً از توانایی ویژه این رقم بومی در مقابله با شرایط تنش یخ‌زدگی ناشی می‌شود.

میزان پرولین آزاد: میزان پرولین آزاد در ۲۴ و ۴۸ ساعت سرمادهی، با کاهش دما از زمان نمونه‌گیری (۷- درجه سانتی‌گراد) تا ۱۸- درجه سانتی‌گراد روند کاهشی نشان داد. وضعیت مشابهی

به طور کلی، تفاوت در شیب نمودار نشت الکترولیت‌ها یکی از نشانه‌های مهم شدت خسارت ناشی از تنش سرما است (Nezami and Naghedi, 2011). در بررسی حاضر، افزایش نشت الکترولیت‌ها با کاهش دما به‌ویژه از محدوده دمایی ۲۰- درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت سرمادهی نشان می‌دهد احتمالاً علاوه بر تغییر وضعیت غشا از حالت کریستال - مایع به حالت جامد - ژل، یکپارچگی غشاهای سلولی نیز بر اثر دماهای یخ‌زدگی مختل شده و نشت مواد به خارج از سلول افزایش یافته است (Baek and Skinner, 2003). Antognozzi و همکاران (۱۹۹۳) با بررسی تأثیر تنش یخ‌زدگی در شرایط طبیعی، دمای بحرانی را برای خسارت به شاخه‌های زیتون، ۱۸- درجه سانتی‌گراد گزارش کردند.

نیز در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد با دو مدت ماندگاری ۲۴ و ۴۸ ساعت در میزان پرولین آزاد در همه ارقام مشاهده شد (شکل ۳).



شکل ۳- محتوای پرولین در ارقام زیتون بررسی شده در دماها و مدت‌های سرمادهی متفاوت- مقادیر، میانگین سه تکرار ± انحراف معیار هستند. حروف متفاوت، بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ براساس آزمون LSD هستند.

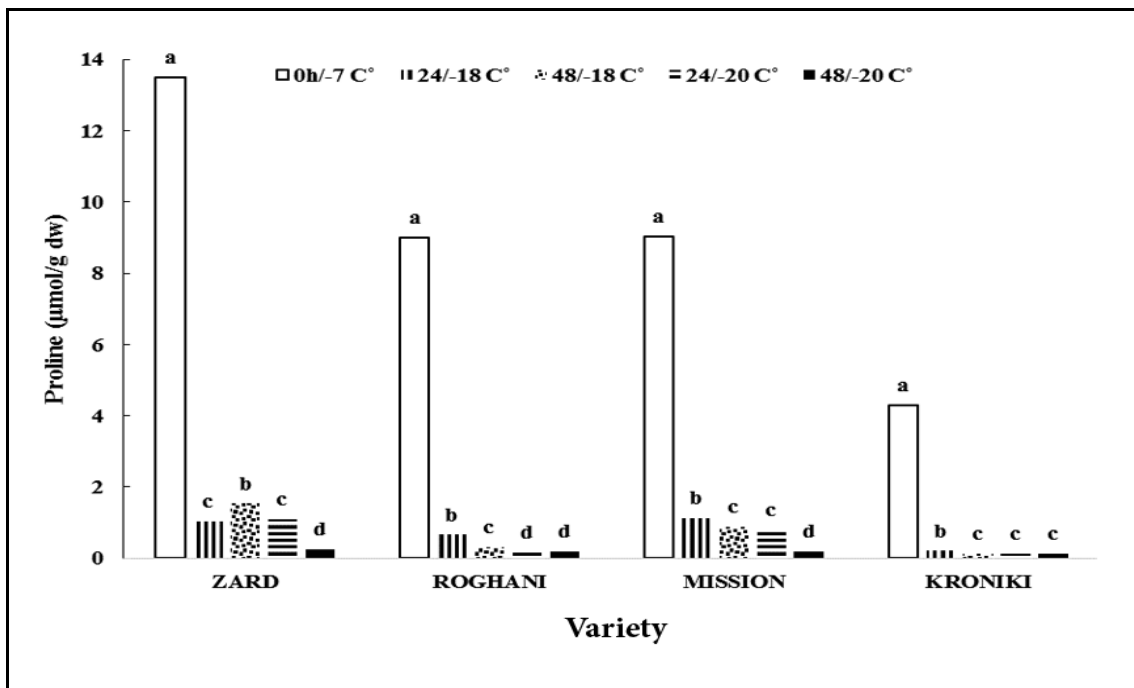
شناخته می‌شود (Ashraf and Foolad, 2007)؛ بنابراین در پژوهش حاضر براساس میزان پرولین آزاد در تیمارهای دمایی اعمال‌شده، رقم کرونایکی، حساس‌ترین و رقم زرد، مقاوم‌ترین رقم شناخته شد.

همچنین مقایسه میانگین تیمارهای دمایی و زمانی در هر رقم (شکل ۴) با توجه به معنی‌دار بودن اثر متقابل دما×مدت زمان سرمادهی، روند کاهش منظم میزان پرولین را در همه رقم‌ها بجز رقم بومی زرد با اعمال ترکیبات تیماری (کاهش دما با افزایش مدت سرمادهی) نشان داد. درباره رقم بومی زرد در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد و مدت ۴۸

از سوی دیگر در همه ترکیبات تیماری اعمال‌شده و همچنین زمان نمونه‌گیری، بیشترین و کمترین میزان پرولین آزاد به ترتیب به رقم زرد و کرونایکی مربوط بود (شکل ۳).

براساس بررسی‌های انجام‌شده، در بسیاری از گونه‌های گیاهی در تنش سرما - یخ زدگی تجمع مواد تنظیم‌کننده فشار اسمزی از جمله پرولین افزایش می‌یابد؛ به طوری که تجمع این مواد محلول و سازگار، اسمولاریته سلول را باعث می‌شود که جریان آبی و میزان خروج آب را کاهش می‌دهد که در نهایت، این پدیده در گسترش و توسعه سلولی ضروری است و بدین دلیل افزایش میزان پرولین، یکی از سازوکارهای مقاومت به دماهای انجماد

ساعت تیمار سرمایی، میزان پرولین افزایش یافت
 توانایی ویژه این رقم بومی در مقایسه با سه رقم
 که این مسئله ممکن است از مقاومت بیشتر و
 دیگر ناشی شود.



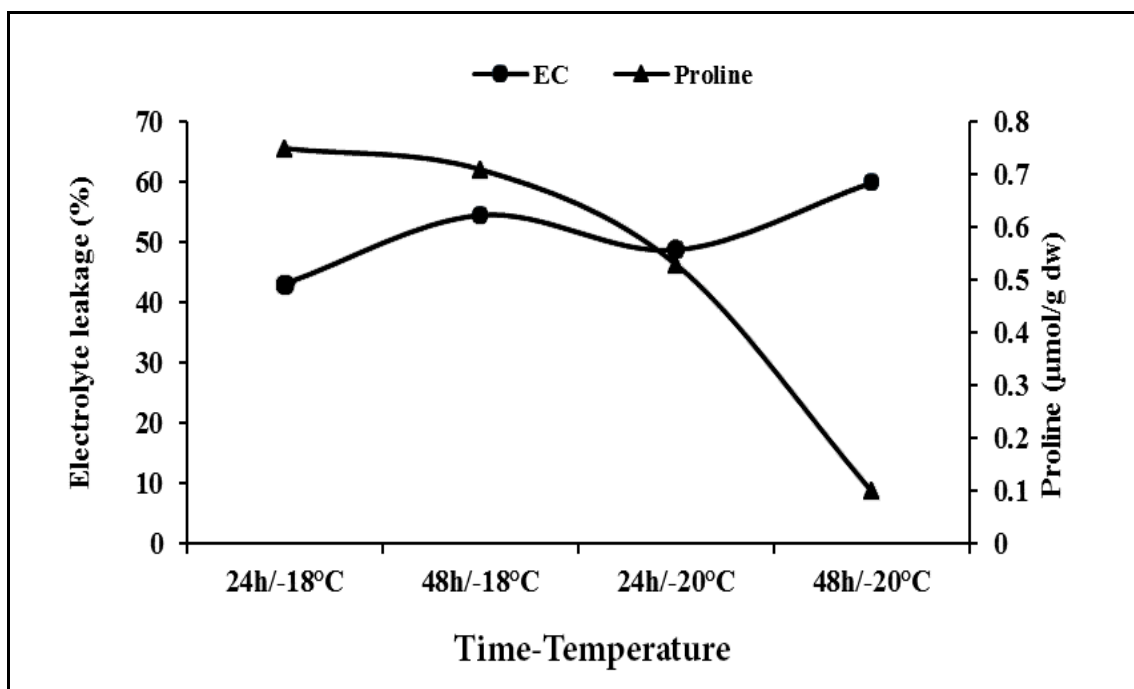
شکل ۴- میزان پرولین در هر رقم در در دماها و مدت‌های سرمادهی متفاوت- مقادیر، میانگین سه تکرار ± انحراف معیار هستند. حروف متفاوت، بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ براساس آزمون LSD هستند.

شاهد در آزمایش بود از سایر ارقام تفکیک و آن را رقم حساس شناسایی کنند؛ با وجود این، به نظر می‌رسد با توجه به روند کاهش منظم در میزان پرولین، احتمالاً استفاده از این شاخص، کارآمدتر باشد.

از سوی دیگر، با توجه به نتایج بخش مربوط به نشت الکترولیت‌ها و همچنین شکل ۵، به نظر می‌رسد استفاده از شاخص نشت الکترولیت‌ها در تعیین دمای بحرانی، مؤثرتر و کارآمدتر بوده است؛ به طوری که در پژوهش حاضر با توجه به شکل ۵ در

گفتنی است بررسی هم‌زمان روند تغییرات میزان پرولین و درصد نشت الکترولیت‌ها در ارقام بررسی‌شده نشان داد بین این دو شاخص نوعی ارتباط منفی وجود دارد (شکل ۵)؛ به طوری که ارقام حساس در محدوده دمایی و زمانی ویژه، میزان نشت زیاد الکترولیت و کاهش میزان پرولین بیشتری خواهند داشت. همچنین هر دو شاخص، کارایی مقبولی در تفکیک ارقام حساس و مقاوم به تنش یخ‌زدگی، نشان دادند؛ به طوری که هر دو شاخص به خوبی توانستند رقم کرونایکی را که رقم حساس

ارقام بررسی شده، برخلاف روند کلی افزایشی میزان نشت الکترولیت‌ها با کاهش دما و مدت سرمادهی، با اعمال دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت میزان نشت الکترولیت‌ها کاهش یافت.



شکل ۵- تغییرات محتوای پرولین و درصد نشت الکترولیت‌ها در تیمارهای اعمال شده

جمع‌بندی

است و نشت الکترولیت‌ها که شاخصی از میزان خسارت به غشای سیتوپلاسمی به شمار می‌رود، در تنش یخ‌زدگی در تفکیک ارقام مقاوم و حساس، کارایی خوبی دارند؛ با وجود این، براساس روند کاهشی منظم مشاهده شده در میزان پرولین با کاهش دما و افزایش مدت سرمادهی، به نظر می‌رسد این شاخص در مقایسه با شاخص فیزیولوژیک نشت الکترولیت‌ها در تفکیک ارقام مقاوم و حساس کارآمدتر بوده است. از سوی دیگر، نتایج تغییرات نشت الکترولیت‌ها با توجه به آثار متقابل دما و مدت سرمادهی نشان دادند با کاهش دما از ۲۰- درجه سانتی‌گراد و مدت ۲۴ ساعت سرمادهی درصد نشت الکترولیت‌ها در همه ارقام بررسی شده کاهش یافت که احتمالاً این مسئله بیان می‌کند دما

با توجه به کاربرد زیتون، گیاهی چندمنظوره، در صنایع غذایی، دارویی و همچنین فضای سبز و افزایش سطح زیر کشت این گیاه در ایران به ویژه در مناطق معتدله از جمله استان مرکزی با زمستان‌های سرد (کاهش دما تا ۱۸- درجه سانتی‌گراد)، استفاده از ارقام مقاوم به تنش یخ‌زدگی راهکاری مهم و کارآمد در افزایش سطح زیر کشت شناخته شده است. از سوی دیگر، کارایی شاخص‌های فیزیولوژیک از جمله میزان پرولین و نشت الکترولیت‌ها در شناسایی و تفکیک ارقام حساس و مقاوم در تنش یخ‌زدگی در بسیاری از پژوهش‌ها به اثبات رسیده است؛ از این رو، نتایج بررسی حاضر نشان دادند پرولین که اسمولیت آلی

- of *Opuntia ficus-indica* flowers maceration on quality and on heat stability of olive oil. *Journal of Food Science and Technology* 54: 1502-1510.
- Antognozzi, E., Famiani, F., Proietti, P., Pannelli, G. and Alfei, B. (1993) Frost resistance of some olive cultivars during the winter. *Acta Horticulturae* 356: 152-155.
- Arvin, M. J. and Donnelly, D. J. (2008) Screening potato cultivars and wild species to abiotic stresses using an electrolyte leakage bioassay. *Journal of Agricultural Science and Technology* 10: 33-42.
- Ashraf, M. and Foolad, M. R. (2007) Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany* 59: 206-216.
- Ayerza, R. and Sibbett, G. S. (2001) Thermal adaptability of olive (*Olea europaea* L.) to the arid chaco of Argentina. *Agriculture, Ecosystem and Environment* 84: 277-285.
- Baek, K. H. and Skinner, D. Z. (2003) Alteration of antioxidant enzyme gene expression during cold acclimation of near-isogenic wheat lines. *Plant Science* 165: 1221-1227.
- Barranco, D., Ruiz, N. and Gómez-del Campo, M. (2005) Frost tolerance of eight olive cultivars. *Horticultural Science* 40: 558-560.
- Bartolozzi, F. and Fontanazza, G. (1999) Assessment of frost tolerance in olive (*Olea europaea* L.). *Horticultural Science* 81: 309-319.
- Bates, L. S., Waldron, R. P. and Teare, I. D. (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil* 39: 205-207.
- Dibax, R., Deschamps, C., Bessalho Filho, J., Vieira, L. G. E., Molinari, H. B.C., De-Campos, M. K. F. and Quoirin, M. (2010) Organogenesis and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Eucalyptus saligna* و مدت بحرانی تحمل به یخزدگی در ارقام بررسی شده، ۲۰- درجه سانتی‌گراد و ۲۴ ساعت سرمادهی است.
- همچنین براساس نتایج به دست آمده، رقم زرد (رقم بومی) و کرونا یکی (رقم خارجی) به ترتیب مقاوم‌ترین و حساس‌ترین ارقام به تنش یخزدگی براساس صفات بررسی شده معرفی می‌شوند. بین ارقام بررسی شده، رقم بومی زرد در مقایسه با سایر ارقام، واکنش ویژه‌ای در شرایط یخزدگی نشان داد؛ به طوری که اولاً در دمای بحرانی یادشده (دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد و مدت سرمادهی ۲۴ ساعت) در مقایسه با سایر ارقام، کمترین میزان نشت الکترولیت‌ها و بیشترین میزان پرولین آزاد را داشت و دوماً در زمان ماندگاری ثابت با کاهش دما تفاوت معنی‌داری در میزان نشت الکترولیت‌ها برای این رقم مشاهده نشد که این مسئله احتمالاً از توانایی ویژه این رقم بومی در مقابله با تنش یخزدگی ناشی می‌شود. در مجموع، احتمالاً رقم زرد، رقمی با توانایی ویژه برای کشت در مناطق در معرض تنش یخزدگی است و برای بررسی‌های تکمیلی از جمله ارزیابی درصد بقای نهال در شرایط طبیعی یا مصنوعی پیشنهاد می‌شود.
- ### سپاسگزاری
- در اینجا نگارندگان از مسئولان و کارکنان دانشگاه پیام نور مرکز اراک بابت بررسی و تصویب مفاد طرح سپاسگزاری می‌کنند.
- ### منابع
- Ammar, I., BenAmira, A., Khemakem, I., Attia, H. and Ennouri, M. (2017) Effect

- winter wheat leaves in relation to variety-specific differences in freezing resistance. *Journal of Agronomy and Crop Science* 165: 230-239.
- Fernandez, A. G., Diez M. J. and Adams, M. R. (1997) *Table olives: production and processing*. Chapman and Hall, London.
- Filippi, D. L., Fournier, M., Cameroni, E., Linder, P., Virgilio, C. D., Foti, M. and Deloche, O. (2007) Membrane stress is coupled to a rapid translational control of gene expression in chlorpromazine-treated cells. *Current Genetics* 52: 171-185.
- Guo, Z., Ou, W., Lu, S. and Zhong, Q. (2006) Differential responses of antioxidative system to chilling and drought in four rice cultivars differing in sensitivity. *Journal of Plant Physiology and Biochemistry* 44: 828-836.
- Gusta, L. V., Trischuk, R. and Weiser, C. J. (2007) Plant cold acclimation: the role of abscisic acid. *Journal of Plant Growth Regulation* 24: 308-318.
- Hana, B. and Bischof, J. C. (2004) Direct cell injury associated with eutectic crystallization during freezing. *Cryobiology* 48: 8-21.
- Harding, M. M., Ward, L. G., Haymet, A. D. J. and Type, I. (1999) 'Antifreeze' proteins: Structure activity studies and mechanisms of ice growth inhibition. *European Journal of Biochemistry* 264: 653-665.
- Konstantinova, T., Parvanova, D., Atanassov, A. and Djilianov, D. (2002) Freezing tolerant tobacco, transformed to accumulate osmoprotectants. *Plant Science* 163: 157-164.
- Mancuso, S. (2000) Electrical resistance changes during exposure to low temperature measure chilling and freezing tolerance in olive tree (*Olea europaea* L.) plants. *Plant, Cell and Environment* 23: 291-299.
- Markazi Province Meteorological Organization, 2018, Meteorological journals, Seasonal bulleti. Retrieved with *P5CS* gene. *Biologia Plantarum* 54: 6-12.
- Dörffling, K., Schulenburg, S., Lesselich, G. and Dörffling, H. (2008) Abscisic acid and proline levels in cold hardened from <http://www.markazimet.ir>. On: 1 September 2018 (in Persian).
- McKersie, B. D. and Lesheim, Y. (2013) *Stress and stress cropping in cultivated plants*. Springer Science and Business Media, Netherlands.
- Mousavi, M. j., Nezami, S., Izadi, E., Nezami, A., Yousef Sani, M. and Keykha Akhar, F. (2011) Evaluation of freezing tolerance of English daisy (*Bellis perennis*) under controlled conditions. *Journal of Water and Soil* 25: 380-388.
- Nezami, A. and Naghedi Nia, N. (2011) Effect of freezing stress on electrolyte leakage in six varieties of safflower. *Iranian Journal of Field Crop Research* 8: 891-896 (in Persian).
- Nikzad, N., Sahari, M. A., Ghavami, M., Piravi Vanak, Z., Hoseini, S. E., Safafar, H. and Nazar, S. A. (2013) Physico-chemical properties and nutritional indexes of cultivars during table olive processing. *Journal of Food Science and Technology* 10: 31-41.
- Rayapati, P. J. and Stewart, C. R. (1991) Solubilization of a proline dehydrogenase from maize (*Zea mays* L.) mitochondria. *Plant Physiology* 95: 787-791.
- Sekozawa, Y., Sugaya, S., Gemma, H. and Iwahori, S. (2003) Cold tolerance in 'Kousui' Japanese pear and possibility for avoiding frost injury by treatment with n-propyl dihydrojasmonate. *Horticultural Science* 38: 288-292.
- Simkeshzadeh, N., Mobli, M., Etemadi, N. and Baninasab, B. (2011) Evaluation of cold resistance in some olive cultivars by measuring chlorophyll fluorescence and apparent damages. *Horticultural Science* 24: 163-169.
- Takac, T. (2004) The relationship of antioxidant enzymes and some physiological parameters in maize

- during chilling. *Plant, Cell and Environment* 50: 27-32.
- Yamori, W., Kogami, H. and Masuzawa, T. (2005) Freezing tolerance in alpine plants as assessed by the FDA-staining method. *Polar Bioscience* 18: 73-81.
- Zribi, A. (2017) Beneficial effects of extra-virgin olive oil consumption on human health. *EC Nutrition* 11: 131-133.