

مقاله پژوهشی:

بررسی روند برخی تغییرات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی در برگ رقم‌های زیتون (*Olea europaea* L.) طی دوره سازگاری و عدم سازگاری به سرما

صفورا سعادت^۱، بهرام بانی نسب^{۲*}، مصطفی مبلی^۳ و مهدیه غلامی^۲

۱، ۲ و ۳. دانشجوی سابق دکتری، دانشیار و استاد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۲۰ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۴/۲۹)

چکیده

این پژوهش به منظور بررسی تغییرات در سطح کربوهیدرات‌های محلول برگ، ظرفیت آنتی اکسیدانی، فنول کل، چگالی برگ، محتوای نسبی آب برگ، ماده خشک برگ و اسیدهای چرب در طی دوره سازگاری و عدم سازگاری به سرما و ارتباط آن با تحمل به یخ‌زدگی زیتون انجام شد. سه رقم زیتون آمفی‌سیس، گرگان و مانزانیلا انتخاب و نمونه‌های برگ‌گی از باغ زیتون در طی پاییز تا تابستان در شش زمان (آبان، آذر، دی، بهمن، فروردین و تیر ماه) تهیه شدند. به منظور تعیین تحمل به یخ‌زدگی نمونه‌های برگ‌گی به مدت ۱۲ ساعت در معرض انجماد مصنوعی (صفر تا ۲۵- درجه سلسیوس) قرار گرفتند. نتایج نشان داد بین رقم‌های زیتون از نظر تحمل به یخ‌زدگی در هر مرحله از نمونه‌برداری تفاوت معنی‌داری مشاهده شد. تحمل به یخ‌زدگی رقم‌ها طی مرحله سازگاری به سرما افزایش و در مرحله خروج از سازگاری کاهش یافت. کربوهیدرات‌های محلول، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، محتوای فنول کل و درصد ماده خشک برگ، به ویژه از مرحله شروع سازگاری به سرما تا سازگاری کامل به سرما در دی ماه در رقم متحمل به یخ‌زدگی - آمفی‌سیس - بیشتر از رقم‌های گرگان و مانزانیلا بود. بیشترین نسبت اسیدهای چرب غیر اشباع به اشباع در هر دو ماه دی و تیر در رقم آمفی‌سیس مشاهده شد. بنابراین از ترکیباتی مانند کربوهیدرات‌های محلول، محتوای فنول کل و اسیدهای چرب، می‌توان به عنوان شاخص‌های بیوشیمیایی تعیین کننده تحمل به یخ‌زدگی در غربالگری رقم‌های زیتون استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: اسیدهای چرب، تحمل به یخ‌زدگی، محتوای فنول کل، کربوهیدرات‌های محلول.

Investigation of some biochemical and physiological changes in leaves of olive (*Olea europaea* L.) cultivars during cold acclimation and de-acclimation stage

Safoora Saadati¹, Bahram Baninasab^{2*}, Mostafa Mobli³ and Mahdijeh Gholami²

1, 2, 3. Former Ph.D. Student, Associate Professor and Professor, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

(Received: Feb. 09, 2020- Accepted: Jul. 19, 2020)

ABSTRACT

This study was conducted to investigate the changes in the levels of soluble carbohydrate, antioxidant capacity, total phenolic acid and fatty acid composition of olive during cold acclimation and deacclimation related with freezing tolerance (FT). Three olive cultivars, Amphisis, Gorgan and Manzanilla were selected and leaf samples were prepared from field-grown trees from autumn to summer at six times (November, December, December, February, April and July). The FT was measured by exposure to artificial freezing (0°C to -25°C). Result showed that there was a significant difference between the olive cultivars in terms of FT at each stage of sampling. The FT of cultivars increased during the cold acclimation stage and declined in deacclimation stage. Soluble carbohydrates, antioxidant capacity, total phenolic content, leaf dry matter, especially from the beginning of cold acclimation until full acclimation, in cold-tolerant -Amphisis- cultivar was more than the Gorgan and Manzanilla cultivars. The highest ratio of unsaturated to saturated fatty acids in both January and July was observed in Amphisis cultivar. Therefore, compounds such as soluble carbohydrates, total phenolic content, and fatty acids can be used as biochemical indicator of FT in screening of olive cultivars.

Keywords: Fatty acids, freezing tolerance, soluble carbohydrates, total phenolic content.

* Corresponding author E-mail: bbanin@iut.ac.ir

مقدمه

زیتون (*Olea europaea* L.) یکی از مهم‌ترین محصولات روغنی در جهان است که اخیراً به دلیل ارزش غذایی و مقاومت در برابر تنش‌های محیطی، از منشأ اولیه آن در حوزه دریای مدیترانه به سایر مناطق دیگر جهان گسترش یافته است. دمای پایین یکی از تنش‌های محیطی است که بر رشد و توزیع جغرافیایی گونه‌های گیاهی تأثیر می‌گذارد و ممکن است به برخی گیاهان از جمله زیتون آسیب برساند (Mancuso, 2000). اکثر گیاهان چند ساله در مواجهه با دمای پایین در اوایل پاییز، به منظور جلوگیری از آسیب در برابر دماهای یخ‌زدگی در زمستان، به دمای پایین هوا سازگار می‌شوند (Vyse et al., 2019). گیاهان در طی دوره سازگاری به سرما یکسری تغییرات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی پیدا می‌کنند که از آن جمله می‌توان به سنتز و تجمع قندهای محلول، ترکیبات فنولی و آنتی‌اکسیدان‌ها، تغییر در محتوای نسبی آب برگ، چگالی و ماده خشک برگ، تغییر در ترکیب اسیدهای چرب غشایی و بیان برخی ژن‌ها اشاره کرد (Hashempour et al., 2014; Arias et al., 2016; Ershadi et al., 2015). طی فرایند سازگاری به سرما، قندها با جلوگیری از تشکیل کریستال‌های یخ یا کند کردن روند تشکیل آن و پایداری غشا باعث افزایش تحمل یخ‌زدگی می‌شوند (Bartolozzi et al., 2001). ارتباط بین تجمع کربوهیدرات‌های محلول و تحمل سرما در برخی گیاهان از قبیل زیتون (Gulen et al., 2009) و انار (Ghasemi Soloklui et al., 2012) گزارش شده است. نقش ترکیبات فنلی در تنش‌های غیر زنده گیاهان بخصوص تنش دمای پایین، مورد توجه کمتری قرار گرفته است. ساختار شیمیایی فنول‌ها نقش احتمالی آنها را به عنوان جاروبرگرهای رادیکال آزاد (آنتی‌اکسیدان‌ها) اثبات می‌کند. آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که با مهار آغاز یا انتشار واکنش‌های زنجیره اکسیدکننده می‌توانند اکسیداسیون لیپیدها یا سایر مولکول‌ها را به تأخیر بیندازند یا مهار کنند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنلی عمدتاً به دلیل خاصیت احیا آنهاست که می‌توانند نقش مهمی در جذب و خنثی‌کردن

رادیکال‌های آزاد، جاروب گونه‌های فعال اکسیژن یا تجزیه پراکسیدها داشته باشند (Rice-Evans et al., 1997). رسوب ترکیبات فنولی از قبیل لیگنین با بالا بردن درجه چوبی شدن بافت‌ها در جوانه‌های انگور (Hubackova, 1982) و نیز رسوب سوبرین در درخت نوتل (Johnson-Flanagan & Owens, 1985) در مواجهه با سرما، باعث افزایش مقاومت این درختان به سرما شده است. به منظور اجتناب از یخ‌زدگی، محتوای آب آزاد درون سلولی و یا نقطه انجماد مواد محلول سیتوپلاسمی کاهش می‌یابد. در پژوهشی در انگور، محتوای آب شاخه‌ها و جوانه‌ها از پاییز تا اواسط زمستان کاهش یافت و این تغییر با افزایش تحمل یخ‌زدگی همبستگی مثبتی داشت (Jiang & Howell, 2002). در پژوهش‌هایی روی زیتون (Rosa et al., 2015; Arias et al., 2000) گزارش شد که در طی دوره رکود، کاهش محتوای آب سلولی باعث افزایش تحمل به تنش سرما در درختان شد. در این پژوهش تغییرات برخی صفات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی طی دوره سازگاری و عدم سازگاری به سرما و ارتباط آنها با میزان تحمل به یخ‌زدگی در رقم‌های آمفی‌سیس، گرگان و مانزانیلا بررسی شد. نتایج این پژوهش می‌تواند، درکی عمیق‌تر از مکانیسم‌های تحمل در برابر تنش یخ‌زدگی ارائه دهد و به پژوهشگران در طراحی برنامه‌های به‌نژادی به منظور اصلاح رقم‌های زیتون کمک کند.

مواد و روش‌ها

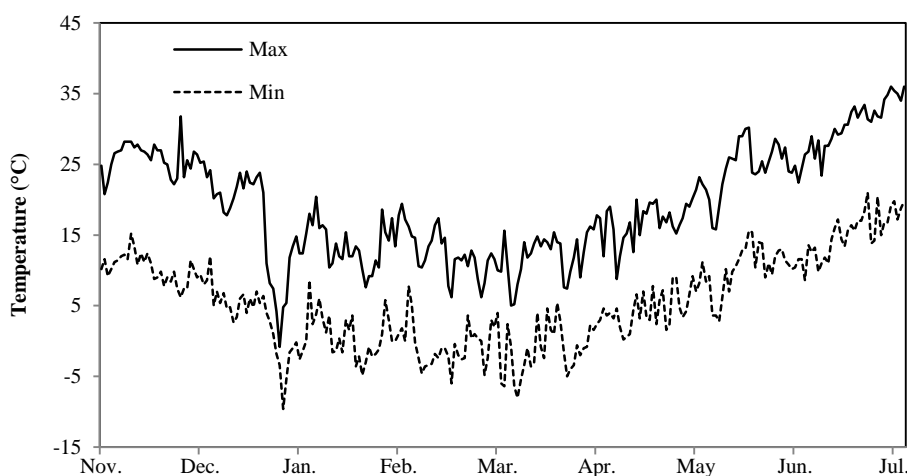
در این پژوهش روند تغییرات تحمل به یخ‌زدگی، کربوهیدرات‌های محلول برگ، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، فنول کل، چگالی برگ، محتوای نسبی آب برگ، ماده خشک برگ و اسیدهای چرب در سه رقم ۱۵ ساله زیتون شامل آمفی‌سیس، گرگان و مانزانیلا طی مرحله سازگاری به سرما (ماه‌های آبان، آذر، دی، بهمن)، خروج از سازگاری (فروردین ماه) و عدم سازگاری به سرما (تیر ماه) در باغ سازگاری زیتون دانشگاه صنعتی اصفهان بررسی شد. این پژوهش در قالب طرح کرت‌های خردشده در زمان بر پایه بلوک‌های کامل تصادفی روی سه رقم زیتون، در شش زمان

به یخچال با دمای ۴ درجه سلسیوس منتقل شدند تا بازگشت از تنش به آرامی در سلول‌ها انجام شود. پس از خروج نمونه‌ها از انجماد، تحمل به یخزدگی (LT_{50}) آنها اندازه‌گیری شد. LT_{50} (دمایی که در آن ۵۰ درصد نشت یونی کامل اتفاق می‌افتد) بر اساس روش نشت یونی با ترسیم نمودار دما-نشت یونی در نرم‌افزار Excel تعیین شد (Hashempour *et al.*, 2014).

کربوهیدرات‌های محلول برگ با استفاده از محلول اتانول ۹۵ درصد استخراج و به روش آنترون (Irigoyen *et al.*, 1992)، محتوای فنول کل به روش فولین (Gao *et al.*, 2000)، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به روش درصد مهار رادیکال‌های DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) (Ebrahimzadeh *et al.*, 2008)، چگالی برگ با روش غوطه‌ورسازی در آب (Scholz *et al.*, 2007)، محتوای نسبی آب با توزین بافت تر، خشک و اشباع (Weatherley, 1950) و درصد ماده خشک برگ با روش توزین انجام گرفت. روغن نمونه‌های برگ با استفاده از محلول کلروفرم: متانول استخراج (Bligh & Dyer, 1959) و برای تعیین پروفیل اسیدهای چرب موجود در روغن برگ زیتون از دستگاه کروماتوگرافی گازی (مدل Agilent 6890N ساخت آمریکا) استفاده شد (Goli *et al.*, 2008). تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماري SAS 9.2 و مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد انجام گرفت.

نمونه‌گیری با ۳ تکرار و در مجموع ۵۴ واحد آزمایشی انجام شد. در هر واحد آزمایشی از سه درخت استفاده شد. درختان زیتون موجود در این باغ تحقیقاتی با فاصله ۵×۶ متر استقرار داشتند. سیستم آبیاری درختان به صورت قطره‌ای و کوددهی طی دو نوبت انجام گرفت. دمای حداقل و حداکثر روزانه در طی دوره نمونه برداری از آبان ماه ۱۳۹۵ تا تیر ماه ۱۳۹۶ در شکل ۱ نشان داده شده است.

برای این منظور شاخه‌هایی دو ساله از جهات مختلف هر درخت برداشت و بلافاصله در جعبه‌های یخ به آزمایشگاه علوم باغبانی منتقل شد. سپس برگ‌ها از شاخه‌ها جدا و نمونه‌های برگ به دو گروه تقسیم شدند. گروه اول برای تعیین میزان تحمل به یخزدگی به روش نشت یونی، به فریزر با دمای قابل کنترل منتقل شدند. گروه دوم برای اندازه‌گیری برخی صفات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی استفاده شدند. به منظور حذف آلودگی‌های سطحی، برگ‌ها با آب مقطر شستشو شدند. پس از حذف رطوبت اضافی با دستمال حوله‌ای، ۵ عدد برگ کاملاً بالغ و یکنواخت در هر تکرار در ورق آلومینیومی پیچیده شدند و در معرض تیمارهای دمایی شامل صفر، -۵، -۱۰، -۱۵ و -۲۵ درجه سلسیوس قرار گرفتند (Eris *et al.*, 2007). نمونه‌ها به مدت ۱۲ ساعت در هر تیمار دمایی نگهداری و پس از هر تیمار دمایی به مدت ۲۴ ساعت



شکل ۱. نمودار حداقل و حداکثر دمای هوای روزانه در طی دوره نمونه برداری از آبان ماه ۱۳۹۵ تا تیر ماه ۱۳۹۶.
Figure 1. Diagram of minimum and maximum daily air temperature during the sampling period from November 2016 to July 2017.

نتایج و بحث

تحمل به یخزدگی

تحمل به یخزدگی (با کاهش LT_{50}) برآورد شده در جدول ۱ نشان داده شده است. نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد اثر رقم، زمان نمونه‌برداری و اثر متقابل آنها در سطح احتمال ۱ درصد بر تحمل به یخ زدگی برگ معنی‌دار بود (جدول ۱). مقایسه میانگین‌ها نشان داد، در بین رقم‌ها بیشترین و کمترین تحمل به یخ‌زدگی به ترتیب مربوط به رقم‌های آمفی‌سیس و مانزانیلا بود. به طور کلی تحمل به یخ‌زدگی رقم‌ها طی دوره سازگاری به سرما از آبان تا دی ماه افزایش و پس از آن تا فروردین کاهش یافت و در تیر ماه به حداقل رسید. نتایج نشان داد اگرچه در طی دوره سازگاری به سرما، میزان تحمل رقم‌ها به یخ‌زدگی افزایش یافت، اما این افزایش در رقم‌های مختلف با روندی مشابه صورت نگرفت. برای مثال رقم آمفی‌سیس سریع‌تر از سایر رقم‌ها به یخ‌زدگی متحمل شد. همچنین بیشترین افزایش تحمل به یخ‌زدگی در این رقم از آبان تا آذر ماه مشاهده شد که در مقایسه با دو رقم دیگر، تحمل به یخ‌زدگی در این رقم ۶/۱۶ درجه سلسیوس افزایش یافت (جدول ۲).

به‌طور کلی این الگوی تغییر در میزان تحمل به یخ‌زدگی یکی از ساز و کارهای فیزیولوژیکی در گیاهان است که در پاسخ به تغییرات دما در گیاهان رخ می‌دهد و موجب افزایش مقاومت غشاهای سلولی هم‌زمان با افزایش سازگاری به سرما می‌شود. در پژوهش‌های پیشین در زیتون (Cansev *et al.*, 2009; Hashempour *et al.*, 2014)، انار (Ghasemi *et al.*, 2012) و انگور (Soloklui *et al.*, 2012) و انار (Ghasemi *et al.*, 2014) مشاهده شد که در مقایسه با دو رقم دیگر، تحمل به یخ‌زدگی در این رقم ۶/۱۶ درجه سلسیوس افزایش یافت (جدول ۲).

(2016) تحمل به یخ‌زدگی در طی سازگاری به سرما در زمستان افزایش و سپس با گرم شدن هوا و خروج از دوره رکود، کاهش یافت.

کربوهیدرات‌های محلول برگ

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد اثر رقم در سطح احتمال ۵ درصد و زمان نمونه‌برداری در سطح احتمال ۱ درصد بر غلظت کربوهیدرات‌های محلول برگ معنی‌دار بود (جدول ۱). مقایسه میانگین رقم‌ها نشان داد، بیشترین غلظت کربوهیدرات‌های محلول برگ در رقم آمفی‌سیس و کمترین آن در رقم‌های گرگان و مانزانیلا مشاهده شد. علاوه بر این، غلظت کربوهیدرات‌های محلول برگ در طی فصل سازگاری به سرما از آبان تا دی، به میزان ۷۰ درصد افزایش یافت. پس از آن در فروردین ماه کاهشی ۲۶ درصدی نسبت به دی ماه نشان داد که ممکن است به دلیل انتقال کربوهیدرات‌ها از برگ به سمت جوانه‌ها به منظور تأمین بخشی از انرژی مورد نیاز برای رشد و تکامل آن‌ها باشد. مجدداً در طی دوره عدم سازگاری به سرما در تیر ماه ۱۸ درصد نسبت به فروردین ماه افزایش یافت (جدول ۲). در سایر پژوهش‌ها روی زیتون (Proietti & Famiani, 2002; Eris *et al.*, 2007) و هلو (Shojaee *et al.*, 2012) افزایش غلظت کربوهیدرات‌های محلول در دوره سازگاری به سرما مشاهده شد. افزایش غلظت کربوهیدرات‌های محلول، یکی از مکانیسم‌های سازگاری گیاهان با سرما است که با افزایش غلظت شیره سلولی، موجب بهبود اثرات پساییدگی مرتبط با یخ‌زدگی می‌شود (Eris *et al.*, 2007; Moradi Heidarabad & Ershadi, 2021).

جدول ۱. تجزیه واریانس اثر رقم و زمان نمونه برداری بر برخی صفات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی برگ زیتون.

Table 1. Results of variance analysis effect of cultivar (C) and sampling date (S) on some biochemical and physiological traits of cultivar olive leaf.

Source of variance	df	Mean of squares						
		Freezing tolerance	Leaf soluble carbohydrate	Antioxidant capacity	Total phenolic content	Leaf density	Relative water content	Leaf dry matter
Cultivars (C)	2	67.367**	77.901*	89.221*	321.099**	0.075**	206.569*	48.141**
Sampling dates (S)	5	118.453**	739.932**	549.625**	3407.081**	0.225**	853.724*	428.109**
C × S	10	6.075**	5.429 ^{ns}	3.934 ^{ns}	49.135 ^{ns}	0.005**	8.175 ^{ns}	3.908 ^{ns}
Error	30	0.950	15.192	12.329	38.574	0.002	22.868	4.338
CV (%)		12.13	7.83	4.93	7.42	8.98	7.10	3.59

ns و **: به ترتیب نبود تفاوت معنی‌دار و تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

ns, *, **: Non-significantly difference and significantly difference at 5 and 1% of probability levels, respectively.

جدول ۲. مقایسه میانگین اثر متقابل رقم و زمان نمونه برداری بر برخی صفات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی برگ زیتون.

Table 2. Mean compression interaction effect of cultivar and sampling date on some biochemical and physiological traits of olive leaf.

Cultivars	Sampling dates						Mean
	Nov.	Dec.	Jan.	Feb.	Apr.	Jul.	
Freezing tolerance (°C)							
Amphisis	-8.95 d	-15.11 c	-14.47 a	-11.37 ab	-5.27 ef	-4.00 fg	-9.86 a
Gorgan	-7.86 de	-9.48 de	-13.55 d	-10.78 bc	-4.86 ef	-2.90 g	-8.24 b
Manzanilla	-5.61 ef	-7.55 a	-8.51 ab	-8.33 d	-4.00 fg	-2.04 h	-6.01 c
Mean	-7.47 c	-10.71 b	-12.18 a	-10.16 b	-4.71 d	-2.98 e	
Leaf soluble carbohydrate (mg.g ⁻¹ FW)							
Amphisis	36.22 hi	53.02 c-f	63.39 a	57.54 a-d	47.17 fg	55.93 b-e	52.21 a
Gorgan	34.73 i	51.83 d-f	59.50 a-c	51.61 d-f	42.37 gh	51.41 d-f	48.58 b
Manzanilla	34.35 i	51.93 d-f	61.21 ab	49.82 ef	42.45 gh	52.09 d-f	48.64 b
Mean	35.10 d	52.26 b	61.37 a	52.99 b	44.00 c	53.14 b	
Antioxidant capacity (%)							
Amphisis	71.70 d-f	79.96 ab	81.44 a	80.06 ab	69.19 e-g	59.09 h	73.57 a
Gorgan	70.03 e-g	76.33 a-d	77.57 a-c	76.33 a-d	68.50 fg	57.54 h	71.05 b
Manzanilla	69.09 e-g	74.79 b-e	76.55 a-d	72.38 c-f	65.08 g	56.91 h	69.14 b
Mean	70.27 b	77.03 a	78.52 a	76.26 a	67.59 b	57.85 c	
Total phenolic content (mg.g ⁻¹ FW)							
Amphisis	82.52 e-g	90.52 c-e	112.71 a	111.65 a	75.13 fg	55.44 h	88.00 a
Gorgan	74.00 fg	84.27 d-f	108.45 a	106.31 ab	74.21 fg	54.40 h	83.61 ab
Manzanilla	73.70 g	85.67 de	97.19 bc	93.53 cd	72.47 g	54.75 h	79.55 b
Mean	76.74 c	86.82 b	106.12 a	103.82 a	73.94 c	54.86 d	
Leaf density (g.cm ⁻³)							
Amphisis	0.63 ab	0.55 c-e	0.61 a-c	0.66 a	0.23 h	0.40 g	0.51 a
Gorgan	0.47 ef	0.52 de	0.58 b-d	0.50 e	0.15 i	0.29 h	0.42 b
Manzanilla	0.48 ef	0.51 de	0.53 de	0.43 fg	0.14 i	0.25 h	0.39 b
Mean	0.53 b	0.53 b	0.57 a	0.53 b	0.17 d	0.31 c	
Relative water content (%)							
Amphisis	74.11 a-c	71.00 c-e	47.26 i	63.41 e-g	65.03 d-g	61.89 gh	63.78 b
Gorgan	79.10 ab	74.35 a-c	51.40 i	70.17 c-f	70.18 c-f	60.58 gh	67.63 ab
Manzanilla	81.56 a	78.00 a-c	54.33 hi	72.73 b-d	73.56 bc	63.02 fg	70.54 a
Mean	78.26 a	74.45 a	51.00 d	68.77 b	69.59 b	61.83 c	
Leaf dry matter (%)							
Amphisis	55.36 c-e	57.38 cd	71.96 a	65.33 b	50.67 fg	58.39 cd	59.85 a
Gorgan	53.44 ef	55.57 c-e	66.67 b	64.03 b	49.22 g	56.77 c-e	57.62 b
Manzanilla	53.76 ef	54.19 de	64.73 b	63.85 c	47.20 g	56.23 c-e	56.66 b
Mean	54.19 d	55.71 cd	67.79 a	64.40 b	49.03 e	57.13 c	

در هر ستون میانگین‌هایی با حداقل یک حرف مشترک، در سطح احتمال پنج درصد بر اساس آزمون LSD تفاوت معنی‌داری ندارند.

In each column means followed by at least a common letter, are not significantly different at 5% probability level as compared by LSD test.

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی برگ

نتایج جدول تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد اثر رقم در سطح احتمال ۵ درصد و مراحل نمونه برداری در سطح احتمال ۱ درصد بر میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی برگ معنی‌دار بود (جدول ۱). مقایسه میانگین رقم‌ها نشان داد، بیشترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی برگ در رقم آمفی‌سیس و کمترین آن در رقم‌ها گرگان و مانزانیلا مشاهده شد. علاوه بر این، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی برگ در طی فصل سازگاری به سرما از آبان تا دی افزایش یافت. اگرچه تفاوت معنی‌داری بین ماه‌های آذر، دی و بهمن مشاهده نشد، سپس در شروع فصل رشد در

فروردین ماه کاهش یافت و به کمترین میزان خود در تیرماه رسید (جدول ۲). همبستگی مثبت و معنی‌داری بین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی برگ رقم‌های زیتون و تحمل به یخ‌زدگی برگ مشاهده شد (جدول ۳). بنابراین افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی برگ به طور مؤثری موجب کاهش رادیکال‌های آزاد و در نتیجه حفاظت از غشا و سایر ماکرومولکول‌ها در برابر گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود و از این طریق تحمل به یخ‌زدگی در گیاه افزایش می‌یابد. نتایج مشابه با پژوهش حاضر در سایر گیاهان گزارش شده است (Joyce *et al.*, 2005; Pennycooke *et al.*, 2005).

جدول ۳. ضریب همبستگی پیرسون بین تحمل به یخ‌زدگی سه رقم زیتون با صفات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی در کل مرحله نمونه‌برداری.

Table 3. Pearson correlation coefficients between freezing tolerance and some biochemical and physiological traits in three olive cultivars at all sampling stages.

Traits	Correlation coefficient (r)		
	Amphisis	Gorgan	Manzanilla
Leaf soluble carbohydrate	0.32 ^{ns}	0.37 ^{ns}	0.33 ^{ns}
Antioxidant capacity	0.86 ^{**}	0.80 ^{**}	0.86 ^{**}
Total phenolic content	0.80 ^{**}	0.87 ^{**}	0.85 ^{**}
Leaf density	0.67 [*]	0.83 ^{**}	0.75 ^{**}
Relative water content	-0.18 ^{ns}	-0.16 ^{ns}	-0.02 ^{ns}
Leaf dry matter	0.55 [*]	0.69 ^{**}	0.58 [*]

ns, *, **: به ترتیب نبود تفاوت معنی‌دار و تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد.
ns, *, **: Non-significantly difference and significantly difference at 5 and 1% of probability levels, respectively.

محتوای فنول کل برگ

در برگ‌های سیب (Huang & Wang, 1982) و کاج نوئل (Johnson-Flanagan & Owens, 1985) در مواجهه با سرما، سبب افزایش مقاومت این درختان به سرما شد. در پژوهشی تحت تنش دمای پایین فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلاز افزایش، ولی فعالیت آنزیم‌های اکسیدکننده ترکیبات فنولی محلول از قبیل پراکسیداز و پلی‌فنول اکسیداز کاهش یافت. این امر باعث افزایش تجمع ترکیبات فنولی محلول شد که ممکن است به عنوان یک مکانیسم سازگاری برای غلبه بر تنش اکسیداتیو ناشی از دمای پایین عمل کند (Balasundram *et al.*, 2006).

چگالی برگ

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد اثر رقم، زمان نمونه برداری و اثر متقابل آنها در سطح احتمال ۱ درصد بر چگالی برگ معنی‌دار بود (جدول ۱). مقایسه میانگین رقم‌ها نشان داد، بیشترین و کمترین چگالی برگ به ترتیب مربوط به رقم‌های آمفی‌سیس و مانزانیا بود. چگالی برگ در طی فصل سازگاری به سرما از آبان تا دی ۷ درصد افزایش یافت، اما در طی ماه‌های دی تا فروردین ۷۰ درصد کاهش و مجدداً در تیر ماه ۱۳۸۲ درصد نسبت به فروردین افزایش یافت. افزایش در چگالی برگ رقم‌های زیتون، در طی دوره سازگاری به سرما، روندی متفاوت داشت. بیشترین چگالی برگ در رقم آمفی‌سیس در بهمن ماه و در رقم‌های گرگان و مانزانیا در دی ماه مشاهده شد (جدول ۲). همبستگی مثبت و معنی‌داری بین چگالی برگ و تحمل به یخ‌زدگی برگ رقم‌های زیتون

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد اثر رقم و زمان نمونه برداری در سطح احتمال ۱ درصد بر محتوای فنول کل برگ معنی‌دار بود (جدول ۱). مقایسه میانگین رقم‌ها نشان داد، بیشترین مقدار فنول کل مربوط به رقم آمفی‌سیس و کمترین آن در رقم مانزانیا مشاهده شد. اگرچه بین رقم‌های گرگان و مانزانیا تفاوت معنی‌داری از نظر این صفت وجود نداشت. علاوه بر این، محتوای فنول کل برگ در طی فصل سازگاری به سرما از آبان تا دی، ۳۸ درصد افزایش یافت و بین ماه‌های دی و بهمن تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. سپس در هنگام خروج از سازگاری به سرما در فروردین ماه به میزان ۳۰ درصد نسبت به دی ماه کاهش یافت. این کاهش در طی دوره عدم سازگاری به سرما در تیر ماه، نیز ادامه یافت و ۲۶ درصد کاهش نسبت به فروردین ماه مشاهده شد (جدول ۲). همبستگی مثبت و معنی‌داری بین محتوای فنول کل برگ و تحمل به یخ‌زدگی برگ رقم‌ها مشاهده شد (جدول ۳). ترکیبات فنولی خواص آنتی‌اکسیدانی و نقش مهمی در جذب و خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد بر عهده دارند و با حفاظت از غشا و ماکرومولکول‌ها موجب افزایش تحمل به یخ‌زدگی رقم‌های زیتون می‌شود. فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنولی عمدتاً به دلیل خواص احیاکنندگی آنهاست که می‌تواند نقش مهمی در جذب و خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد و نیز فرونشاندن اکسیژن یگانه و سه گانه و یا تجزیه پراکسیدها داشته باشد (Rice-Evans *et al.*, 1997). افزایش ترکیبات فنولی

سلولی می‌تواند موجب تأخیر در رشد هسته‌های یخ در برگ‌ها و افزایش ظرفیت فراخنکی آنها شود. در پژوهشی گزارش شد که برگ‌های سازگار نشده به سرمای کلزا محتوای نسبی آب بالاتر و ظرفیت فراخنکی کمتری نسبت به برگ‌های سازگار شده به سرما داشتند (Gusta *et al.*, 2004).

ماده خشک برگ

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد اثر رقم و زمان نمونه برداری در سطح احتمال ۱ درصد بر ماده خشک برگ معنی‌دار بود (جدول ۱). مقایسه میانگین رقم‌ها نشان داد، بیشترین ماده خشک برگ در رقم آمفی-سیس و کمترین آن در رقم‌های گرگان و مانزانیلا مشاهده شد. ماده خشک برگ در طی فصل سازگاری به سرما از آبان تا دی، ۲۵ درصد افزایش، پس از آن در فروردین ماه نسبت به دی ماه ۲۷ درصد کاهش و مجدداً در تیر ماه ۱۶ درصد نسبت به فروردین ماه افزایش یافت (جدول ۲). همبستگی مثبت و معنی‌داری بین درصد ماده خشک برگ رقم‌های زیتون و تحمل به یخ‌زدگی برگ مشاهده شد (جدول ۳). افزایش در درصد ماده خشک برگ در طی سازگاری به سرما در گندم زمستانه (Sugiyama & Stefanowska *et al.*, 2007) و کلزا (Shimazaki, 2007) (1999) مشاهده شد. در این پژوهش‌ها گزارش شده است که افزایش درصد ماده خشک برگ به دلیل افزایش تعداد و اندازه سلول‌های برگ است که در نتیجه افزایش ضخامت دیواره سلولی و یکپارچگی آن موجب اجتناب از یخ‌زدگی سلول و پسابیدگی آن می‌شود (Rajashekar & Burke, 1996).

ترکیب اسیدهای چرب برگ

در بین اسیدهای چرب اشباع موجود در روغن برگ زیتون هر سه رقم، پالمیتیک اسید بیشترین درصد و بعد از آن به ترتیب استتاریک اسید و آراشیدیک اسید در هر دو ماه دی و تیر، به خود اختصاص دادند. بیشترین و کمترین درصد اسید چرب پالمیتیک در هر دو ماه دی و تیر به ترتیب مربوط به رقم مانزانیلا و آمفی‌سیس بود (جدول ۴).

مشاهده شد (جدول ۳). به طور کلی در طی دوره سازگاری به سرما در پاییز و زمستان، چگالی برگ رقم‌های زیتون افزایش یافت، که این امر می‌تواند به این دلیل باشد که با کاهش محتوای نسبی آب سلول‌ها، اندازه و حجم سلول‌های برگ نیز کاهش و به دنبال آن غلظت مواد اسمولیت درون سلول افزایش می‌یابد که در نتیجه منجر به افزایش چگالی بافت برگ می‌شود (Arias *et al.*, 2015). علاوه بر این، در این بافت‌ها، سلول‌ها به‌طور محکم به یکدیگر چسبیده‌اند و فضای اندکی بین سلول‌ها به وجود می‌آورند و در نتیجه آب کمتری به این فضا وارد شده و منجر به تغییر فرایند یخ‌زدگی و افزایش فراخنکی می‌شود (Ashworth & Abeles, 1984). کاهش چگالی برگ در اوایل بهار ممکن است به دلیل افزایش میزان جذب آب از خاک، و در نتیجه افزایش حجم سلول‌ها باشد که این امر موجب افزایش حساسیت بافت‌ها به سرما می‌شود. در تیر ماه مجدداً با کاهش میزان آب سلول‌ها و افزایش تبخیر و تعرق و افزایش ماده خشک گیاه، میزان چگالی بافت برگ افزایش یافت.

محتوای نسبی آب برگ

تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد در محتوای نسبی آب برگ سه رقم زیتون مورد بررسی در طی مراحل نمونه‌برداری مشاهده شد (جدول ۱). مقایسه میانگین رقم‌ها نشان داد، بیشترین محتوای نسبی آب برگ در رقم‌های مانزانیلا و گرگان و کمترین آن در رقم آمفی‌سیس مشاهده شد. به طور کلی، محتوای نسبی آب برگ در طی فصل سازگاری به سرما از آبان تا دی، ۲۲ درصد کاهش و پس از آن در فروردین ماه نسبت به دی، ۱۷ درصد افزایش و مجدداً در تیر ماه، ۱۰ درصد نسبت به فروردین ماه کاهش یافت (جدول ۲). کاهش محتوای نسبی آب برگ در طی سازگاری به سرما به دلیل افزایش غلظت شیره سلولی، کاهش اندازه سلول‌ها و همچنین کاهش انتقال آب به فضای بین سلولی است که از این طریق موجب افزایش تحمل به یخ‌زدگی می‌شود (Arias *et al.*, 2015). بنابراین پیشنهاد می‌شود که کاهش مقدار آب در فضای بین

جدول ۴. ترکیب اسیدهای چرب در سه رقم زیتون در دی و تیر ماه.

Table 4. Composition of fatty acids in the three olive cultivars in January and July months.

Stage	Cultivar	Fatty acid composition (%)							Unsat.	Sat.	Unsat./Sat.
		C _{16:0}	C _{18:0}	C _{20:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}				
Jan.	Amphisis	14.80	2.70	3.83	26.10	9.19	43.38	78.67	21.33	3.69	
	Gorgan	18.53	5.63	2.85	20.49	11.37	41.13	72.99	27.01	2.70	
	Manzanilla	20.52	5.30	2.76	16.96	10.51	43.95	71.42	28.58	2.50	
Jul.	Amphisis	18.09	3.94	3.38	24.55	13.84	36.20	74.59	25.41	2.94	
	Gorgan	22.25	4.35	2.21	14.44	11.53	45.22	71.19	28.81	2.47	
	Manzanilla	22.57	5.38	3.33	14.42	15.38	38.92	68.70	31.28	2.23	

C_{16:0}: پالمیتیک اسید، C_{18:0}: استئاریک اسید، C_{20:0}: آرشدیک اسید، C_{18:1}: اولئیک اسید، C_{18:2}: لینولئیک اسید، C_{18:3}: لینولنیک اسید، Unsat.: اسیدهای چرب

غیر اشباع، Sat.: اسیدهای چرب اشباع.

C_{16:0}: Palmitic acid; C_{18:0}: Stearic acid; C_{20:0}: Archidic acid; C_{18:1}: Oleic acid; C_{18:2}: Linoleic acid; C_{18:3}: Linolenic acid; Unsat.: Unsaturated fatty acid; Sat.: Saturated fatty acid.

اسیدهای چرب غیراشباع به اشباع افزایش یافت
(Palta et al., 1993).

نتیجه‌گیری کلی

در مطالعه حاضر تفاوت معنی‌داری بین رقم‌های زیتون از نظر تحمل به یخ‌زدگی در هر مرحله از نمونه‌برداری مشاهده شد. تحمل به یخ‌زدگی رقم‌ها طی مرحله سازگاری به سرما، افزایش و در مرحله خروج از سازگاری کاهش یافت. نتایج این پژوهش نشان داد غلظت کربوهیدرات‌های محلول، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، محتوای فنول کل و درصد ماده خشک برگ به ویژه از مرحله شروع سازگاری به سرما تا سازگاری کامل به سرما در دی ماه و همچنین در رقم متحمل به یخ‌زدگی آمفی‌سیس بیشتر از رقم نیمه متحمل گرگان و رقم حساس به یخ‌زدگی مانزانایلا بود. بیشترین نسبت اسیدهای چرب غیر اشباع به اشباع در هر دو ماه دی و تیر مربوط به رقم متحمل به یخ‌زدگی آمفی‌سیس و کمترین آن مربوط به رقم مانزانایلا بود. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که این ترکیبات نقش مهمی در افزایش تحمل به یخ‌زدگی دارند و به عنوان شاخص‌های بیوشیمیایی تعیین‌کننده در تحمل به یخ‌زدگی می‌تواند در غربالگری رقم‌های زیتون استفاده شوند.

بیشترین درصد اسیدهای چرب غیراشباع در تمام نمونه‌ها به ترتیب لینولنیک اسید، اولئیک اسید و لینولئیک بودند. همچنین در هر سه رقم میزان اسیدهای چرب غیر اشباع در دی ماه بیشتر از تیر ماه بود. در دی ماه بیشترین و کمترین درصد اسید چرب غیر اشباع لینولینک به ترتیب مربوط به رقم‌های مانزانایلا و گرگان بود. بیشترین نسبت اسیدهای چرب غیر اشباع به اشباع در هر دو ماه دی و تیر مربوط به رقم آمفی‌سیس و کمترین آن مربوط به رقم مانزانایلا بود. به طور کلی افزایش میزان اسیدهای چرب غیراشباع غشای سلولی می‌تواند باعث پایین آمدن دمای تغییر حالت غشا شود و مقاومت گیاه به تنش سرما را افزایش دهد. کاهش اسیدهای چرب غیر اشباع موجب از دست رفتن حالت سیالیت و نفوذ پذیری غشا نسبت به آب و در نتیجه کاهش مقاومت به سرما می‌شود. در پژوهشی همبستگی مثبتی بین افزایش اسیدهای چرب غیر اشباع غشای سلولی و کاهش نشت یونی در غشای سلولی مشاهده شد (Wilson, 1972). مطابق با این نتایج، در پژوهشی، گزارش شد که در طی سازگاری به سرما در سیب‌زمینی و گوجه‌فرنگی، درصد پالمیتیک اسید کاهش و نسبت

REFERENCES

1. Arias, N. S., Bucci, S. J., Scholz F. G. & Goldstein, G. (2015). Freezing avoidance by supercooling in *Olea europaea* cultivars: the role of apoplastic water, solute content and cell wall rigidity. *Plant, Cell and Environment*, 38, 2061–2070.
2. Ashworth, E. N. & Abeles, F. B. (1984). Freezing behavior of water in small pores and the possible role in the freezing of plant tissues. *Plant Physiology*, 76, 201–204.
3. Balasundram, N., Sundram, K. & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99, 191–203.

4. Bartolozzi, F., Mencuccini, M. & Fontanazza, G. (2001). Enhancement of frost tolerance in olive shoots *in vitro* by cold acclimation and sucrose increase in the culture medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 67, 299–302.
5. Bligh, E.G. & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37, 911–917.
6. Cansev, A., Gulen, H. & Eris, A. (2009). Cold-hardiness of olive (*Olea europaea* L.) cultivars in cold-acclimated and non-acclimated stages: seasonal alteration of anti-oxidative enzymes and dehydrin-like proteins. *The Journal of Agricultural Science*, 147, 51–61.
7. Ebrahimzadeh, M. A., Hosseinimehr, S. J. & Hamidinia, A. (2008). Antioxidant and free radical scavenging activity of *Feijoa sallowiana* fruits peel and leaves. *Pharmacologyonline*, 1, 7–14.
8. Eris, A., Gulen, H., Barut, E. & Cansev, A. (2007). Annual patterns of total soluble sugars and proteins related to cold hardiness in olive (*Olea europaea* L. Gemlik). *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 82, 597–604.
9. Ershadi, A., Karimi, R. & Mahdei, K. N. (2016). Freezing tolerance and its relationship with soluble carbohydrates, proline and water content in 12 grapevine cultivars. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38, 2.
10. Gao, X., Ohlander, M., Jepsson, N., Bjork, L. & Trajkovski, V. (2000). Changes in antioxidant effects and their relationship to phytonutrients in fruits of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) during maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1485–1490.
11. Ghasemi Soloklui, A. A., Ershadi, A. & Fallahi, E. (2012). Evaluation of cold hardiness in seven Iranian commercial pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars. *HortScience*, 47, 1821–1825.
12. Goli, S. A. H., Sahri, M. M. & Kadivar, M. (2008). Enzymatic interesterification of structured lipids containing conjugated linoleic acid with palm stearin for possible margarine production. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110, 1102–1108.
13. Gulen, H., Cansev, A. & Eris, A. (2009). Cold hardiness of olive (*Olea europaea* L.) cultivars in cold-acclimated and non-acclimated stages: seasonal alteration of soluble sugars and phospholipids. *The Journal of Agricultural Science*, 147, 459–467.
14. Gusta, L. V., Wisniewski, M., Nesbitt, N. T. & Gusta, M. L. (2004). The effect of water, sugars, and proteins on the pattern of ice nucleation and propagation in acclimated and non-acclimated canola leaves. *Plant Physiology*, 135, 1642–1653.
15. Hashempour, A., Ghasemnezhad, M., Fotouhi Ghazvini, R. & Sohani, M. M. (2014). Olive (*Olea europaea* L.) freezing tolerance related to antioxidant enzymes activity during cold acclimation and non acclimation. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36, 3231–3241.
16. Huang, Y. & Wang, Z. (1982). Cytological determination of cold resistance in fruit trees (*Malus*). *Acta Horticulturae Sinica*, 9, 23–30.
17. Hubackova, M. (1982). Effect of the lignification of grapevine shoots on the resistance of buds in winter. *Vitis*, 9, 271–274.
18. Irigoyen, J. J., Emerich, D. W. & Sanchez-Diaz, M. (1992). Water stress induced changes in concentration of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Physiologia Plantarum*, 84, 55–60.
19. Jiang, H. & Howell, G. (2002). Correlation and regression analyses of cold hardiness, air temperatures, and water content of Concord grapevines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 53, 227–230.
20. Johnson-Flanagan, A. M. & Owens, J. N. (1985). Peroxidase activity in relation to suberization and respiration in white spruce (*Picea glauca* [Moench] Voss) seedling roots. *Plant Physiology*, 79, 103–107.
21. Joyce, C., Sam, C. & Cecil, S. (2005). Relationship of cold acclimation, total phenolic content and antioxidant capacity with chilling tolerance in petunia (*Petunia* × *hybrid*). *Environmental and Experimental Botany*, 53, 225–232.
22. 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.
23. Moradi Heidarabad, S. & Ershadi, A. (2021). Evaluation of some physiological and biochemical responses of seven commercial grape cultivars to cold stress during the growing season. *Iranian Journal of Horticultural Science*, 52, 213–224. (in Farsi).
24. Palta, J. P., Whitaker, B. D. & Weiss, L. S. (1993). Plasma membrane lipids associated with genetic variability in freezing tolerance and cold acclimation of *Solanum* species. *Plant Physiology*, 103, 793–803.
25. Pennycooke, J. C., Cox, S. & Stushnoff, C. (2005). Relationship of cold acclimation, total phenolic content and antioxidant capacity with chilling tolerance in petunia (*Petunia* × *hybrida*). *Environmental and Experimental Botany*, 53, 225–232.

26. Proietti, P. & Famiani, F. (2002). Diurnal and seasonal changes in photosynthetic characteristics in different olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *Photosynthetica*, 40, 171–176.
27. Rajashekar, C. B. & Burke, M. J. (1996). Freezing characteristics of rigid plant tissues. Development of cell tension during extracellular freezing. *Plant Physiology*, 111, 597–603.
28. Rice–Evans, C.A., Miller, N.J. & Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2, 152–159.
29. Rosa, R. D., Rallo, L. & Rapoport, H.F. (2000). Olive floral bud growth and starch content during winter rest and spring budbreak. *HortScience*, 35, 1223–1227.
30. Scholz, F. G., Bucci, S. J., Goldstein, G., Meinzer, F., Franco, A. C. & Miralles–Wilhelm, F. (2007). Biophysical properties and functional significance of stem water storage tissues in *Neotropical savanna* trees. *Plant, Cell and Environment*, 30, 236–248.
31. Shojaee, K., Davarynejad, G. & Nezami, A. (2012). An investigation on freezing tolerance of peach and nectarine reproductive buds in controlled conditions. *Iranian Journal of Horticultural Science*, 43, 13–22. (in Farsi).
32. Stefanowska, M., Kuraś, M., Kubacka–Zebalska, M. & Kacperska, A. (1999). Low temperature affects pattern of leaf growth and structure of cell walls in winter oilseed rape (*Brassica napus* L., var. *oleifera* L.). *Annals of Botany*, 84, 313–319.
33. Sugiyama, S. & Shimazaki, T. (2007). Increased cell–wall mass and resistance to freezing and snow mold during cold acclimation of winter wheat under field conditions. *Plant Production Science*, 10, 383–390.
34. Vyse, K., Pagter, M., Zuther, E. & Hinch, D. K. (2019). Deacclimation after cold acclimation—a crucial, but widely neglected part of plant winter survival. *Journal of Experimental Botany*, 70, 4595–4604.
35. Weatherley, P. (1950). Studies in the water relations of the cotton plant. The field measurement of water deficit in leaves. *New Phytologist*, 49, 81–97.
36. Wilson, J. M. (1972). The mechanism of chill–and drought–hardening of *Phaseolus vulgaris* leaves. *New Phytologist*, 76, 257–269.