



دانشگاه گوارش و منابع گیاهی

نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی

جلد بیست و هشتم، شماره اول، ۱۴۰۰

۶۵-۷۹

<http://jopp.gau.ac.ir>

DOI: 10.22069/jopp.2021.17095.2568

## نمایش افتراقی تحمل به تنش حرارتی ارقام زیتون زرد و دیره براساس شاخص‌های فیزیولوژیکی،

### زیست-شیمیایی و الگوی بیان ژن‌های PAL و PPO

احمد اجنی<sup>۱</sup>، \* علی سلیمانی<sup>۱</sup>، علی اصغر زینانلو<sup>۲</sup>، اسماعیل سیفی<sup>۳</sup> و مهدی طاهری<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup>گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران،

<sup>۲</sup>پژوهشکده میوه‌های معتدله، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران،

<sup>۳</sup>گروه علوم باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران،

<sup>۴</sup>مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع زنجان، زنجان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۶/۲۰؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۸/۱۹

#### چکیده

**سابقه و هدف:** زیتون یکی از مهم‌ترین گونه‌های محصولات باغی ایران بوده که به‌طور وسیعی در مناطق نیمه‌گرمسیری کشور کشت می‌شود. در بسیاری از این مناطق دمای هوا به‌ویژه در فصول تابستان تا حد ایجاد تنش حرارتی برای این گونه گیاهی بالا می‌رود. اطلاعات اندکی در خصوص تحمل ارقام و راهکارهای فیزیولوژیکی و زیست-شیمیایی مؤثر در پاسخ به تنش حرارتی در زیتون وجود دارد. بنابراین شناخت این راهکارها و نیز کشت ارقامی با دامنه تحمل بالا به چنین شرایطی از اهداف اصلاحی زیتون می‌باشد. در این مطالعه تأثیر تنش حرارتی بر تغییرات صفات فیزیولوژیکی، زیست-شیمیایی و الگوی بیان ژن‌های فنیل‌آلانیل آمونیا لیاز (PAL) و پلی‌فنول اکسیداز (PPO) اجرا شده است.

**مواد و روش‌ها:** نهال‌های یکساله حاصل از قلمه ریشه‌دار شده ارقام زیتون زرد و دیره، بعد از انتقال به اتاقک رشد مصنوعی و سازگار شدن در سه مرحله دمایی مختلف، با تیمارهای دمایی ۳۲ (مرحله قبل از تنش، به مدت سه ماه)، ۴۵ (مرحله تنش، به مدت یک ماه) و ۳۶ (مرحله بعد از تنش، به مدت پنج روز) درجه سانتی‌گراد مورد ارزیابی قرار گرفتند. صفات اندازه‌گیری شده شامل میزان رشد طولی تجمعی و وزن خشک شاخساره، رطوبت نسبی برگ‌ها، میزان نشت یونی، محتوی مالون‌دی‌آلدئید، حداکثر عملکرد فتوسنتز II ( $F_v/F_m$ )، حداکثر فلورسنس کلروفیل ( $F_o$ )، میزان فعالیت آنزیم‌های PAL و PPO و الگوی بیان ژن‌های مربوط به این دو آنزیم بودند. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1 انجام و مقایسه میانگین داده‌ها به روش LSD در سطح احتمال یک درصد انجام شد.

**یافته‌ها:** نتایج مربوط به شاخص‌های رشد تجمعی و وزن خشک شاخساره، برتری نسبی رقم زرد را در مواجهه با تنش حرارتی و در مقایسه با رقم دیره نشان داد. تنش درجه حرارت بالا میزان رطوبت نسبی برگ هر دو رقم را نسبت به دوره قبل از تنش به‌طور معنی‌داری کاهش داد، اما این کاهش در رقم دیره با اختلاف معنی‌داری نسبت به رقم زرد محسوس‌تر بود. میزان آسیب

\* مسئول مکاتبه: [asoleimani@znu.ac.ir](mailto:asoleimani@znu.ac.ir)

تنش حرارتی به ساختارهای غشای سلولی که از طریق اندازه‌گیری متغیرهای نشت یونی و شاخص پراکسیداسیون چربی‌های غشاء (مالون‌دی‌آلدئید) تعیین شده بود، نشان داد تحت تنش درجه حرارت بالا، رقم زرد هم آسیب کم‌تری دیده بود و هم بازیافت سریع‌تری را در دوره بعد از تنش داشت. تنش حرارتی شاخص Fv/Fm را به‌طور معنی‌داری در دیره نسبت به زرد کاهش داد، در حالی‌که شاخص Fo در رقم دیره به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از رقم زرد بود. میزان فعالیت آنزیم‌های PAL و PPO تحت شرایط تنش حرارتی افزایش بیش‌تری در رقم زرد نسبت به دیره نشان داد. میزان فعالیت PPO هر دو رقم در دوره بعد از تنش نسبت به دوره تنش کاهش یافت. بررسی الگوی تظاهر ژن‌های PPO و PAL نیز افزایش بیان این ژن‌ها را در پاسخ به تنش حرارتی در هر دو رقم نشان داد. میزان بیان ژن مربوط به این آنزیم PPO و PAL در مرحله تنش در رقم زرد نسبت به دیره به‌ترتیب ۳ و ۱/۵ برابر افزایش داشت.

**نتیجه‌گیری:** نتایج نشان داد که رقم زرد در مقایسه با رقم دیره تحمل نسبتاً بالایی به تنش حرارتی دارد. هم‌چنین، این رقم به‌دنبال رفع تنش، توانایی بالایی را در بازیافت خصوصیات فیزیولوژیکی و زیست-شیمیایی دارد.

**واژه‌های کلیدی:** تنش دمای بالا، تنش غیرزیستی، زیتون، فلورسانس کلروفیل، نشت یونی

#### مقدمه

به تنش حرارت‌های بالا در بین ارقام زیتون مشاهده شده است (۱۲ و ۲۴) با این‌حال، مطالعات اندکی در خصوص تغییرات زیست-شیمیایی و تفاوت در الگوی بیان ژن‌ها) تحت شرایط تنش حرارتی در بین ارقام زیتون صورت گرفته است.

از جمله تغییرات زیست-شیمیایی مرتبط با تنش حرارتی در گیاهان می‌توان به تغییر در سیالیت غشاءهای سلولی اشاره داشت. در این مورد، آزمون هدایت الکتریکی ( $EL^1$ ) غشای سلولی و پراکسیداسیون چربی‌های غشایی، از جمله شاخص‌های خوب برای تشخیص ژنوتیپ‌های متحمل و حساس در برابر تنش‌های غیر زیستی می‌باشند (۶). مطالعات نشان داده است تنش حرارتی در گیاه *Dactylis glomerata* L. باعث کاهش سیالیت غشایی سلول‌ها شده و از طریق پراکسیداسیون ترکیبات غشایی موجب تولید مالون‌دی‌آلدئید ( $MDA^2$ ) می‌شود. هم‌چنین میزان نشت یونی به‌دلیل آسیب به یکپارچگی غشاء سلولی در بافت برگ‌های این گیاه افزایش یافت (۴۳).

تنش حرارتی، اغلب به دمایی اشاره دارد که سبب آسیب غیرقابل برگشت به رشد و نمو و در نهایت عملکرد گیاه می‌شود (۱۳). پیش‌بینی می‌شود میانگین دمای کره زمین تا پایان قرن بیست و یکم ۱/۵ الی ۲ درجه سانتی‌گراد افزایش یابد (۱۷). تنش درجه حرارت بالا که ناشی از گرم شدن کره زمین می‌باشد، سبب کاهش عملکرد و تولید ماده خشک گیاهان شده و مانعی برای گسترش گونه‌های گیاهی محسوب می‌شود (۲۵).

زیتون (*Olea europaea* L.) درختی همیشه‌سبز بوده که در کشورهای حوزه مدیترانه و به‌طورکلی در عرض‌های جغرافیایی بین ۳۰ و ۴۵ درجه شمالی و جنوبی به‌صورت گسترده کشت می‌شود. تغییرات اقلیم به‌ویژه درجه حرارت‌های بالا می‌تواند کشت و توسعه زیتون را در معرض مخاطره قرار دهد (۲۴). دمای بهینه رشد برای ارقام زیتون ۲۵ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد بوده و دماهای خیلی بالا، به‌ویژه بالای ۳۸ درجه سانتی‌گراد موجب کاهش شدید فتوسنتز در زیتون می‌شود (۲۸). برخی تفاوت‌ها در توانایی تحمل

1- Electrolyte leakage

2- Malondyaldehyde

حرارت بالا گزارش شده است (۳۷). مطالعه تغییرات بیان این ژن‌ها نگرش‌های مولکولی سازش گیاهان به تنش‌های محیطی را فراهم می‌کند (۵).

ارقام و ژنوتیپ‌های متعددی از زیتون در ایستگاه تحقیقات زیتون طارم استان زنجان وجود دارد که با هدف حفظ، ارزیابی و پیش‌برد برنامه‌های اصلاحی زیتون در این ایستگاه کشت شده‌اند و مسلماً تفاوت‌هایی از نظر پاسخ به تنش حرارتی در بین آن‌ها وجود دارد. در این بین ارقام زرد و دیره تفاوت‌های رشدی قابل‌توجهی، بر اساس مشاهدات تجربی و بررسی‌های اولیه، در شرایط اقلیمی طارم و در مواجهه با دمای بالای فصل رشد منطقه به‌ویژه در ماه‌های تیر و مرداد نشان داده‌اند. رقم زرد، از ارقام دو منظوره و رقم غالب کشت شده در منطقه طارم بوده که ۸۰ درصد سطح زیر کشت منطقه را به خود اختصاص داده است. رقم کنسروی دیره، بومی دشت دیره در شهرستان سرپل ذهاب استان کرمانشاه بوده و تحت آزمایش مزرعه‌ای جهت معرفی به منطقه انتخاب و معرفی شده است (۴۲). بررسی‌های میدانی-باغی در خصوص تفاوت در میزان تحمل به تنش حرارتی بین این دو رقم صورت گرفته است. پژوهش تکمیلی حاضر به‌منظور انجام مطالعات در شرایط دمایی کنترل شده و در سطح ارزیابی پاسخ‌های فیزیولوژیکی و مولکولی روی نهال‌های یک ساله این دو رقم طراحی و اجرا شد. علاوه براین، با توجه به بررسی منابع علمی صورت گرفته، نتایج حاصل از این پژوهش اولین گزارش در ارتباط با تغییر الگوی بیان ژن و فعالیت دو آنزیم PAL و PPO در ارتباط با تنش حرارتی گیاه زیتون می‌باشد.

### مواد و روش‌ها

تهیه نهال و نحوه اعمال تیمارها: برای انجام این پژوهش نهال‌های یکساله حاصل از قلمه ارقام زرد و

شاخص حداکثر عملکرد کوانتومی فتوسینتم II ( $F_v/F_m$ ) و حداقل فلورسانس کلروفیل<sup>۱</sup> ( $F_0$ ) به صورت گسترده‌ای به‌عنوان شاخص تغییرات فتوسنتزی گیاه تحت تنش حرارتی به‌کار می‌رود (۴۰). میزان فلورسانس کلروفیل، سالم بودن غشای تیلاکوئید و کارایی نسبی انتقال الکترون از فتوسینتم II به فتوسینتم I را نشان می‌دهد. این روش سریع، حساس و غیرتخریبی بوده و به‌طور گسترده‌ای در مطالعات اکوفیزیولوژی گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرد. از آنجایی‌که در شرایط تنش حرارتی از تثبیت موثر دی‌اکسیدکربن جلوگیری می‌شود، هم‌چنین به‌دلیل بروز اختلال در انجام واکنش‌های اکسایش-احیاء و انتقال مؤثر بار الکترونیکی در زنجیره انتقال الکترون، اندازه‌گیری مولفه‌های  $F_0$  و  $F_v/F_m$  توانایی لازم برای شناسایی رقم متحمل به دمای بالا را دارد (۳).

تغییرات مولکولی در سطح الگوی بیان ژن (ها) و فعالیت آنزیم‌های مرتبط با متابولیسم ترکیبات فنولی در گیاهان مختلف و در ارتباط با تنش‌های غیرزیستی متعدد گزارش شده است. ترکیبات فنولی و متابولیسم آن‌ها که عمده‌تاً تحت کنترل دو آنزیم مهم پلی‌فنول‌اکسیداز و فنیل‌آلانین‌آمونیا لیاز می‌باشند، نقش مهمی در مواجهه گیاهان به انواع تنش‌های غیر زیستی ایفا می‌نمایند. افزایش بیان ژن‌های مسئول سنتز آنزیم‌های PPO و PAL تحت شرایط تنش خشکی در برخی ارقام زیتون گزارش شده است (۲۷ و ۹). هم‌چنین در گیاهان دیگر نیز گزارش‌هایی در خصوص تغییر در الگوی بیان این ژن‌ها در مواجهه با تنش‌های غیرزیستی وجود دارد. تغییر در الگوی بیان ژن آنزیم PAL در گیاه کلم تحت شرایط تنش حرارتی (۳۰) و بیان ژن PPO در ارقام متحمل گوجه‌فرنگی در مواجهه با تنش خشکی و درجه

1- Maximum quantum yield of PSII  
2- Minimum chlorophyll fluorescence

گردید. حداکثر شدت روشنایی به‌میزان ۴۰۰ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه بود که بوسیله لوکس‌متر (Testo, 545, Germany) در محدوده تاج‌پوشش نهال‌ها اندازه‌گیری گردید (۱۲). در پایان هر مرحله، نمونه‌های برگ‌ی برای اندازه‌گیری متغیرهای مورد ارزیابی از برگ‌های کاملاً توسعه یافته واقع روی گره‌های چهار الی شش از انتهای توک شاخساره جمع‌آوری و سطح برگ نهال‌ها با اتانول ۷۰ درصد تمیز گردید و بلافاصله در مجاورت نیتروژن مایع به یخچال با دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل گردیدند. برای اندازه‌گیری میزان رشد شاخساره‌های تازه رشد کرده، شاخساره‌های هر کدام از نهال‌های زرد و دیره در ابتدای مرحله سازگاری علامت‌گذاری شدند و در پایان مراحل قبل از تنش، تنش و بعد از تنش، میزان رشد تجمعی شاخساره به‌وسیله خط‌کش اندازه‌گیری گردید (۱۷). در پایان هر مرحله، برای به‌دست آوردن وزن خشک شاخساره‌ها، آن‌ها از محل علامت‌گذاری شده قطع و پس از انتقال به آزمایشگاه در آن، با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۷۲ ساعت، خشک و سپس در ترازوی دیجیتال توزین شدند.

به‌منظور محاسبه محتوی رطوبت نسبی برگ‌ها ( $RWC^1$ ) برگ‌های جوان و توسعه یافته از هر دو رقم جدا و بعد از تمیز کردن سطحی وزن تازه ( $FW^2$ ) آن‌ها تعیین شد. سپس نمونه‌های برگ‌ی به‌مدت ۲۴ ساعت در ظروف حاوی آب مقطر در تاریکی و دمای چهار درجه سانتی‌گراد شناور شدند. بعد از آب‌گیری، برگ‌ها مجدداً توزین شده و وزن آماس ( $TW^3$ ) آن‌ها تعیین شد. سپس وزن خشک برگ‌ها ( $DW^4$ ) با قرارگیری در دمای ۷۰ درجه

دیره از ایستگاه تحقیقات زیتون طارم تهیه و به پژوهشکده میوه‌های معتدله و سردسیری در کرج منتقل شدند. در آن‌جا نهال‌ها به گلدان‌های پلاستیکی سه لیتری با ترکیب خاک شن، کوکوپیت و پرلیت به نسبت حجمی ۱:۱:۱ منتقل و به‌مدت سه ماه با کود استاندارد (Grow more, USA) تغذیه و نگهداری شدند. سپس نهال‌ها به اتاقک رشد منتقل شده و در آن‌جا به‌دنبال اعمال آبیاری‌های منظم در طول دوره تحقیق، سطح گلدان‌ها به‌منظور جلوگیری از تبخیر سطحی و ایجاد تنش خشکی با ورقه آلومینیومی پوشانده شدند. درجه حرارت اتاقک رشد در ابتدا ۲۶ و ۱۸ درجه سانتی‌گراد (روز/شب) بود و به‌صورت تدریجی (۰/۵ درجه سانتی‌گراد در هر هفته) طی سه ماه افزایش داده شد (مرحله سازگاری). در پایان مرحله سازگاری و در درجه حرارت ۲۴/۳۲ درجه سانتی‌گراد (روز/شب) نمونه‌برداری از نهال‌ها برای مطالعه متغیرهای مورد نظر صورت گرفت (به‌عنوان مرحله قبل از تنش). سپس با بررسی فلورسانس کلروفیل ( $F_v/F_m$ ) مجدداً دمای محیط اتاقک در طی یک ماه به تدریج افزایش داده شد و به ۳۷/۴۵ درجه سانتی‌گراد (روز/شب) افزایش یافت. در این شرایط دمایی میزان حداکثر فلورسانس کلروفیل ( $F_v/F_m$ ) در هر دو رقم کاهش و فلورسانس اولیه کلروفیل ( $F_0$ ) افزایش یافته و علائم پژمردگی روی برگ‌های نهال‌ها مشاهده گردید. نمونه‌برداری از نهال‌ها در پایان این دوره به‌عنوان مرحله تنش لحاظ شد. در ادامه دمای اتاقک رشد نهال‌ها در طی پنج روز به ۲۸/۳۶ سانتی‌گراد (روز/شب) کاهش داده شد و نمونه‌برداری در این زمان به‌عنوان مرحله بعد از تنش در محاسبات آماری مورد استفاده قرار گرفت. در طی تمام مراحل، دمای اطراف تاج‌پوشش نهال‌ها با دماسنج کنترل گردید. طول دوره فتوپریود ۱۲/۱۲ ساعت (شب/روز) و رطوبت نسبی اتاقک در حدود ۶۰ درصد تنظیم

- 1- Relative water content
- 2- Fresh weight
- 3- Turgur weight
- 4- Dry weight

برگی در یک هاون چینی سرد حاوی سه میلی لیتر بافر فسفات ۲۵ میلی مولار با  $\text{pH}=6/8$  حاوی اتیلن دی آمین تتراسیتیک اسید (EDTA) و پلی وینیل پیرولیدون (PVP) یک درصد ساییده شد. سپس عصاره با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه در دمای چهار درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ و محلول رویی برای اندازه گیری میزان آنزیم PPO استفاده شد (۱۹). تعدادی لوله آزمایش در حمام آب در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد و بعد به هر لوله آزمایش ۲/۵ میلی لیتر محلول بافر فسفات ۰/۲ مولار با  $\text{pH}=6/8$  و ۰/۲ میلی لیتر پیروگالول<sup>۲</sup> ۰/۰۲ مولار اضافه کرده تا به دمای ۴۰ درجه سانتی گراد برسند. در لحظه خواندن جذب آنزیم، به هر لوله دو میلی لیتر عصاره آنزیمی اضافه کرده و تغییرات جذب در طول موج ۴۳۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر ثبت شد. میزان فعالیت آنزیم بر اساس میلی گرم پروتئین دقیقه بیان شد (۳۲).

جهت تعیین فعالیت آنزیم PAL، ۱۰۰ میلی گرم بافت تازه برگ با دو میلی لیتر بافر استخراج (۵۰ میلی مولار تریس-کلریدریک اسید با  $\text{pH}=8/5$  حاوی ۱۵ میلی مولار بتا-مراکاپتواتانول<sup>۳</sup>) در مجاورت نیتروژن مایع ساییده شد. سپس نمونه‌ها به مدت پنج دقیقه با نیروی ۴۰۰۰ دور در دقیقه در دمای چهار درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شدند. در نهایت برای اندازه گیری فعالیت آنزیم PAL از محلول رویی به عنوان عصاره آنزیمی استفاده شد. برای تخمین فعالیت آنزیم، یک میلی لیتر محلول واکنش (۵۰۰ میکرومولار تریس-کلریدریک اسید با  $\text{pH}=8$ ) حاوی شش میکرومول فنیل آلانین و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی در حجم نهایی یک میلی لیتر تهیه شد. سپس به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد قرار

سانتی گراد به مدت ۷۲ ساعت تعیین و برای محاسبه محتوی آب نسبی برگ از رابطه ۱ استفاده شد (۴۱).

$$WRC\% = (Fw - Dw / Tw - Dw) \times 100 \quad (1)$$

برای اندازه گیری نشت یونی، قطعات مساوی از برگ‌ها تهیه و در لوله‌های آزمایش حاوی ۲۰ میلی لیتر آب مقطر با دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند. سپس هدایت الکتریکی اولیه ( $EC_1$ ) آب مقطر حاوی نمونه‌ها با استفاده از دستگاه هدایت سنج الکتریکی قرائت شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۰ درجه سانتی گراد اتوکلاو شده و بعد از خنک شدن، هدایت الکتریکی ثانویه ( $EC_2$ ) اندازه گیری شد (۲۲). درصد نشت یونی از رابطه ۲ محاسبه شد.

$$[EL(\%) = (EC_1 / EC_2) \times 100] \quad (2)$$

محتوی مالون دی آلدئید به عنوان محصول پراکسیداسیون اسیدهای چرب غشاءها به روش هلث و پکر<sup>۱</sup> (۱۹۶۸) اندازه گیری شد (۱۵). فلورسانس کلروفیل در برگ‌های کاملاً توسعه یافته بالغ پنجم و ششم از نوک شاخساره‌ها با استفاده از فلورسنس متر پورتابل (Opti-Sciences Inc, USA) اندازه گیری شد. برای این منظور، برگ‌ها قبل از شروع آزمایش با فویل آلومینیومی به مدت ۱۵ دقیقه در شرایط تاریکی قرار داده شدند تا به شرایط تاریکی سازگار شوند. سپس با استفاده از دستگاه فلورسنس متر میزان فلورسنس هر برگ ثبت شد. سپس متغیرهای حداقل فلورسنس ( $F_0$ ) و حداکثر عملکرد کوانتومی فتوسیستم II ( $F_v/F_m$ ) قرائت و یادداشت برداری شدند (۳۴).

برای اندازه گیری فعالیت آنزیم PPO ابتدا عصاره آنزیمی تهیه شد. برای این کار ۰/۱ گرم بافت تازه

2- Pyrogallol  
3- B-mercaptoethanol

1- Health and Packer

گرفت. در نهایت به این محلول میزان ۵۰ میکرولیتر کلریدریک‌اسید با غلظت پنج نرمال اضافه شد تا تولید سینامیک‌اسید از فنیل‌آلانین متوقف شود. در پایان، فعالیت آنزیم در طول موج ۲۹۰ نانومتر براساس میزان تولید سینامیک‌اسید بر حسب میلی‌گرم در گرم پروتئین در دقیقه به دست آمد (۴).

به منظور جداسازی، کمی‌سنجی، تهیه cDNA و qRT-PCR در ابتدا حدود ۱۰۰ میلی‌گرم بافت برگگی تازه برای جداسازی RNA کل با استفاده از RNeasy Mini Kit (Qiagen) طبق دستورالعمل کارخانه استفاده شد. سپس میزان پنج میکروگرم از RNase-free DNase (Promega Biotech )

برای حذف آلودگی DNA استفاده گردید. کمی‌سنجی و کیفی‌سنجی RNA به ترتیب بوسیله اسپکتروفتومتر و الکتروفورز ژل افقی انجام شد ( Nanodrop, Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). نسخه‌برداری معکوس با استفاده از آنزیم رونوشت‌بردار معکوس و با استفاده از آغازگرهای الیگو (dt) (Takara, Inc, Japan) انجام شد. آغازگر ژن‌های مربوط به آنزیم‌های PAL و PPO به وسیله نرم‌افزار Allel ID 7 و با استفاده توالی‌های ارتولوگ ژنوم زیتون طراحی شدند (جدول ۱).

جدول ۱- توالی و خصوصیات آغازگرهای ژن‌های پلی‌فنول‌اکسیداز (PPO)، فنیل‌آلانین آمونیولایز (PAL) و ژن خانگی اکتین.

**Table 1. The primers characteristics and sequences of Polyphenol oxidase (PPO), Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and Actin (housekeeping) genes.**

نام ژن Gene Name	شماره دسترسی در بانک ژن GenBank Accession No.	آغازگر رفت Forward primer (5'-3')	آغازگر برگشت Reverse primer (5'-3')	اندازه قطعه تکثیر Amplicon (bp)
PPO	KP968843	CAACTCCCACACAAAATAA	ACAGTGTCATCATCAGCAA	101
PAL	KJ511867.1	TGATTGGGTTATGGAGAGT	TGCTCTTGTTGCTGAATG	193
Actin	AF545569.1	GAATTGCCAGATGGACAGGT	GAACCACCACTGAGGACGAT	188

آغاز الکتروفورز و آنالیز منحنی ذوب ارزیابی شد. منحنی ذوب برای همه نمونه‌ها به صورت تک پیک و نقطه پیک منحنی در محدوده دمای ذوب Melt Temperature (TM) پیش‌بینی شده برای هر یک از فراگمنت‌ها قرار داشت. برای محاسبه TM هر فراگمنت از سایت آنلاین <https://www.dna.utah.edu/umelt/umelt.html> کمک گرفته شد. TM محاسبه شده برای قطعات تکثیری ژن‌های کدکننده آنزیم‌های PAL و PPO به ترتیب ۸۷/۵ و ۸۳ درجه سانتی‌گراد بود و پیک منحنی ذوب همه واکنش‌های RT-qPCR در محدوده

آنالیز PCR معکوس توسط سیستم Step One Real-Time PCR (Applied Bio systems, CA, USA) انجام شد. محلول واکنش حاوی یک میکرولیتر از cDNA، پنج میکرولیتر SYBR Green و یک میکرومول جفت آغازگر ویژه بود که با آب دوبار تقطیر به حجم نهایی ده میکرولیتر رسانده شد. محدوده دمایی برای تکثیر به شرح ذیل بود: ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه همراه با ۴۰ دور در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج ثانیه و ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه. تکثیر اختصاصی به وسیله ژل

اختلاف معنی‌داری نشان نداد. اگرچه بخشی از اختلاف رشد مشاهده شده بین دو رقم، با رشد بیش‌تر در رقم زرد، می‌تواند بخاطر تفاوت در عادت رشدی و قدرت سازگاری نهال‌های دو رقم در مرحله انتقال به اتافک رشد مصنوعی باشد، اما به نظر و با توجه به دیگر شاخص‌های مورد ارزیابی که در ادامه نتایج و بحث اشاره شده است، می‌توان چنین استنباط کرد که بخشی از رشد نسبتاً بیش‌تر رقم زرد در مقایسه با رقم دیره می‌تواند به‌خاطر تحمل بیش‌تر این رقم به تنش حرارتی باشد. به‌طورکلی اثرات تنش درجه حرارت‌های بالا در گیاهان موجب بروز صدمات فیزیولوژیکی شامل نکروزه شدن برگ، پیری و خزان برگ شده و از طریق محدودسازی رشد ریشه و ساقه منجر به کاهش زیست توده گیاهی می‌شود (۳۹). در این مطالعه مقدار رشد هر دو رقم، بدون لحاظ مقدار رشد تجمعی، در مرحله قبل از تنش بیشتر از مرحله تنش بود. در تأیید این نتایج، کاهش در میزان رشد شاخساره زیتون تحت تنش درجه حرارت‌های بالا گزارش گردیده است (۱۲).

میزان رطوبت نسبی برگ در شرایط تنش حرارتی در هر دو رقم کاهش معنی‌داری نسبت به مرحله سازگاری نشان دادند. در همه مراحل مورد بررسی میزان این صفت در رقم زرد بیش‌تر از رقم دیره بود (شکل ۱-C). در تناقض با نتیجه آزمایش حاضر در خصوص صفت میزان رطوبت نسبی، نتایج آزمایش بررسی تنش درجه حرارتی روی نهال‌های دو ساله زیتون رقم لچینو<sup>۳</sup> نشان داد که دمای بالا (۵/۵°C) اثر معنی‌داری بر میزان رطوبت نسبی برگ‌ها نداشته و سازگاری ویژه روزنه‌های این گیاه به شرایط دمای بالا علت این موضوع بیان شده است (۱۵). تفاوت در سن نهال‌های مورد آزمایش، وجود قدرت سازگاری متفاوت در بین ارقام مختلف زیتون و مهم‌تر از همه اعمال تیمار حرارتی با دمای بالاتر در مطالعه حاضر

پیش‌بینی شده قرار داشت. بیان همه ژن‌ها در مقابل بیان ژن خانگی اکتین<sup>۱</sup> نرمال‌سازی شدند. سطوح بیان نسبی ژن‌ها و مقادیر تغییرات ژن‌های اختصاصی و اکتین در مرحله تنش تعیین شدند (۴۱).

این پژوهش به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و سه تکرار (سه اصله نهال در هر تکرار) مشتمل بر ۵۴ اصله نهال یک‌ساله زیتون از ارقام زرد و دیره اجرا شد. عامل اول شامل رقم در دو سطح و عامل دوم شامل مراحل تنش در سه سطح قبل از تنش، حین تنش و مرحله بعد از تنش بودند. تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS (نسخه ۹/۱) انجام و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار میانگین‌های فیشر (LSD<sup>۲</sup>) صورت گرفت.

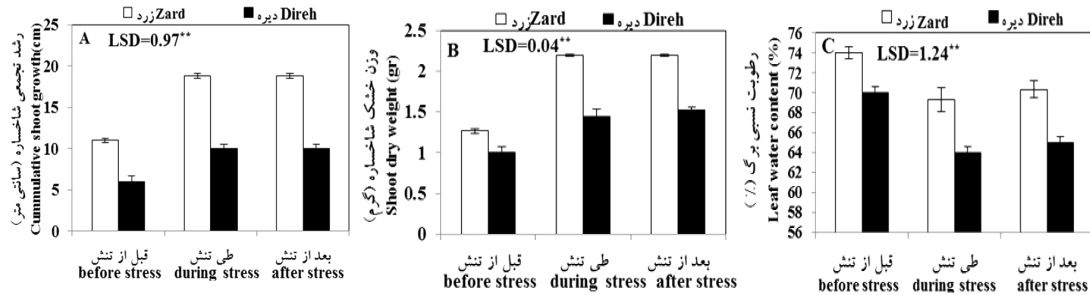
### نتایج و بحث

مقایسه میانگین اثر متقابل صفات مربوط به میزان رشد تجمعی شاخساره، وزن خشک شاخساره و رطوبت نسبی برگ‌ها تحت تیمارهای مختلف درجه حرارت و نوع رقم نشان داده شده است (شکل ۱). تغییر میزان رشد از مشخص‌ترین علائم ظاهری و واکنش‌های نهال‌های زیتون به تنش درجه حرارت بالا بود. نتایج این پژوهش نشان داد میزان رشد شاخساره‌ها و هم‌چنین وزن خشک شاخساره‌های هر دو رقم مورد بررسی در میانگین دمایی ۲۴/۳۲°C (روز/شب) مرحله قبل از تنش و نیز در مواجهه با شرایط دمای تنش‌زا ۳۷/۴۵°C (روز/شب) از نظر آماری با یکدیگر تفاوت معنی‌داری داشتند، به طوری که رقم زرد نسبت به دیره با اختلاف معنی‌داری مقدار رشد تجمعی بیشتری نشان داد (شکل ۱-A) و شکل ۱-B) با رفع شدن دوره تنش، میزان تغییرات رشد و وزن خشک شاخساره‌ها نسبت به مرحله تنش

1- Actin  
2- Least significance differences

و افزایش مقاومت روزنه‌ای در ورود دی‌اکسید کربن به درون برگ‌ها شده و در نهایت باعث کاهش رشد گیاه می‌گردد (۳۱) که با نتایج این پژوهش هم‌خوانی دارد.

( $45^{\circ}\text{C}$ ) می‌تواند از دلایل علمی چنین نتیجه متضادی باشد. وجود رطوبت نسبی برگ در حفظ تورژسانس سلولی و تقسیم سلولی مؤثر می‌باشد. عدم وجود رطوبت نسبی کافی در برگ باعث بسته شدن روزنه‌ها



شکل ۱- مقایسه میانگین میزان رشد تجمعی شاخساره (A)، وزن خشک شاخساره (B) و محتوی رطوبت نسبی برگ (C) دو رقم زیتون (زرد و دیره) در مراحل قبل، حین و بعد از تنش حرارتی. علامت نوار روی ستون‌ها نشان‌دهنده خطای استاندارد توزیع میانگین‌ها هستند. \* تفاوت معنی‌دار میانگین‌ها در سطح احتمال (0.05) می‌باشد.

Fig. 1. Mean comparison of cumulative shoot growth (A), shoot dry weight (B) and relative water content (C) of two olive cultivars (Zard and Direh) before, during and after heat stress stages. Error bars indicate standard error. \*\* means significance difference ( $P \leq 0.01$ ).

تنش خشکی در مقایسه با رقم شیشه‌گپ نشان دهد (۱۱). کاهش EL در پژوهش حاضر در هر دو رقم زیتون و در دوره بعد از تنش مشاهده گردید، اما تغییرات آن از نظر آماری نسبت به مرحله تنش غیرمعنی‌دار بود (شکل ۲-۲A). فاصله زمانی کم بین مرحله تنش و بعد از تنش و ماهیت بافت‌های گیاهی زیتون به‌عنوان یک گونه درختی در مقایسه با گونه‌های گیاهی علفی با بافت‌های نرم و لطیف‌تر، می‌تواند یکی از دلایل عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین برخی از متغیرهای اندازه‌گیری شده از جمله EL در مرحله تنش و بعد از تنش باشد. بدین مفهوم که واکنش‌های فیزیولوژیکی و زیست-شیمیایی بازیافتی و ظهور اثرات آن‌ها در گیاهی مثل زیتون در یک فرایند زمانی طولانی‌تری بعد از رفع تنش صورت می‌گیرد.

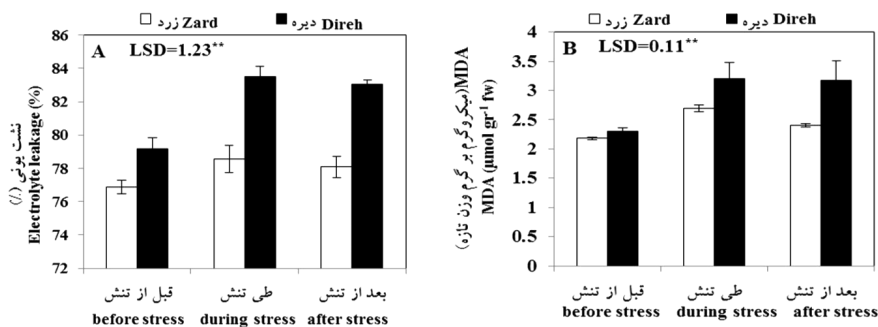
میانگین داده‌های مربوط به MDA، اختلاف معنی‌داری بین ارقام زرد و دیره در طی مرحله تنش

برش‌دهی اثر متقابل صفت مربوط به میزان EL و MDA تحت تیمارهای مختلف درجه حرارت و نوع رقم نشان داد در طی دوره تنش حرارتی، میزان خسارت به غشای سلولی به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر دما قرار گرفت (شکل ۲). افزایش دما در مرحله تنش میزان EL را در هر دو رقم، به‌ویژه در رقم دیره به‌صورت معنی‌داری افزایش داد (شکل ۲-۲A). مقادیر بالای EL نشان‌دهنده عدم توانایی غشاء در حفظ ترکیبات درون سلولی، اختلال در فعالیت و انسجام غشاءهای سلولی و خروج بیش‌تر الکترولیت‌ها از سلول می‌باشد (۱۴). مطابق با نتایج پژوهش حاضر، تیمار تنش خشکی روی نهال‌های یک‌ساله ارقام انار شیشه‌گپ و رباب باعث افزایش میزان نشت یون هر دو رقم گردید. رقم رباب (۵۵/۹ درصد) با اختلاف معنی‌داری نسبت به شیشه‌گپ (۶۲/۴ درصد) میزان نشت یونی کم‌تری داشته و به همین خاطر توانست با حفظ بیش‌تر رطوبت نسبی برگ، تحمل بالاتری به



MDA نشان‌دهنده آسیب تنش اکسیداتیو ناشی از دمای بالا روی غشای سلول بوده که منتج از پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع فسفولیپیدی می‌باشد (۲۱). مطابق با نتایج حاضر، افزایش معنی‌دار شاخص MDA در نهال‌های دو ساله سیب تحت تنش حرارتی دمای بالای ۴۰ درجه سانتی‌گراد در مقایسه با گیاهان شاهد (در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد) گزارش شده است (۲۳). مطالعات نشان می‌دهد زمانی که نهال‌های دو ساله زیتون کوراتینا<sup>۱</sup> بعد از رفع تنش خشکی در دمای خنک‌تر قرار می‌گیرند، کاهش شاخص MDA بافت برگ آن‌ها بیشتر و سریع‌تر از نهال‌هایی است که در دماهای بالاتر قرار می‌گیرند (۳۶).

نسبت به مرحله قبل از تنش و مرحله بعد از تنش را نشان دادند. میزان این شاخص در مرحله سازگاری، در رقم دیره تغییر قابل‌توجهی نسبت به رقم زرد نداشت. نتایج نشان داد میزان شاخص MDA رقم زرد طی دوره تنش حرارتی کم‌تر از رقم دیره بود. با کاهش دما در مرحله بعد از تنش نیز میزان این شاخص در رقم زرد کاهش یافت، اما تغییری در رقم دیره مشاهده نشد. کاهش میزان MDA بافت‌های سلولی در رقم زرد در مقایسه با رقم دیره می‌تواند بیانگر آسیب کم‌تر غشاءهای سلولی بافت برگ رقم زرد بوده و هم‌چنین توانایی بیش‌تر این رقم در بازیافت فرایندهای درون سلولی و نمو به‌دنبال رفع اثرات تنش حرارتی می‌باشد (شکل ۲-B).



شکل ۲- مقایسه میانگین نشت یونی (A) و محتوی MDA (B) در دو رقم زیتون (زرد و دیره) تحت مراحل قبل از تنش، تنش و بعد از تنش. علامت نوار روی ستون‌ها نشان‌دهنده خطای استاندارد توزیع میانگین‌ها هستند. \*\* تفاوت معنی‌دار میانگین‌ها در سطح احتمال (P≤۰/۰۱) می‌باشد.

Fig. 2. Mean comparison of electrolyte leakage (A) and MDA content (B) in two olive cultivars (Zard and Direh) under before, during and after stress stages. Error bars indicate standard error. \*\* means significance difference (P≤0.01).

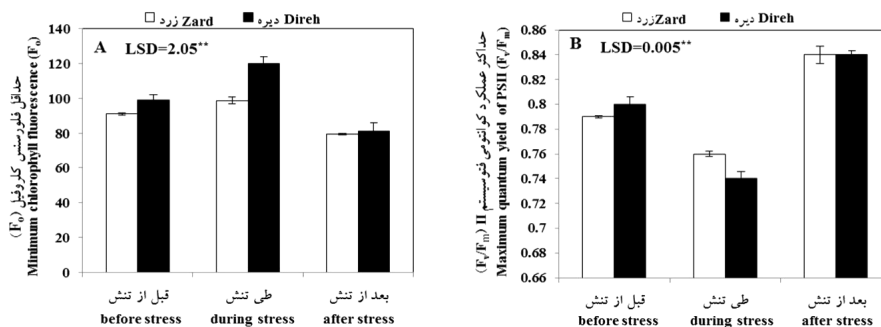
زرد بود. در مرحله بعد از تنش، میزان این شاخص در هر دو رقم روند کاهشی داشته و حتی به پایین‌تر از میزان آن در مرحله قبل از تنش رسید (شکل ۳-A). تغییرات میزان F<sub>o</sub> بستگی به اندازه گیرنده‌های نوری کلروفیل و یکپارچگی عملکرد مراکز واکنش فتوسیستم II داشته و افزایش آن تحت شرایط تنش نشان‌دهنده اکسیده شدن تمام مراکز واکنش فتوسیستم

مقایسه میانگین‌های اثر متقابل صفت مربوط به میزان F<sub>o</sub> و F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> تحت تیمارهای مختلف درجه حرارت و نوع رقم نشان داد در طی دوره تنش حرارتی، میزان F<sub>o</sub> و F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> در دو رقم زرد و دیره به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر دما قرار گرفت (شکل ۳). تنش حرارتی موجب افزایش F<sub>o</sub> در رقم زرد و دیره در مقایسه با مرحله قبل از تنش گردید. با این حال، میزان این افزایش در رقم دیره ۱/۳ برابر آن در رقم

1- Carotina

داد که نشان‌دهنده شروع ترمیم سیستم فتوسنتزی گیاه به‌دنبال کاهش دما می‌باشد. ترمیم ساختارهای مولکولی دخیل در فتوسیستم نوری II دستگاه فتوسنتزی زیتون در مواجهه با شرایط بعد از تنش خشکی (۱) و تنش تابش نور شدید و خشکی (۳۵) از جمله صفات مناسب و مطلوب در گزینش ارقام متحمل‌تر گزارش شده است. نکته قابل‌توجه در این آزمایش، کاهش و افزایش معنی‌دار  $F_0$  و  $F_v/F_m$ ، به‌عنوان بخشی از فرایند ترمیم سیستم فتوسنتزی گیاه، در مرحله بعد از تنش نسبت به مرحله قبل از تنش بود. از دلایل احتمالی موضوع می‌توان به این اشاره داشت که علی‌رغم رفع تنش حرارتی در مرحله بازیافت رشدی، دمای اتاق رشد ( $28/36^{\circ}C$  روز/شب) هنوز برای انجام فرایندهای فیزیولوژیکی و زیست-شیمیایی به اندازه‌ای بالاتر از میزان آن در مرحله قبل از تنش ( $24/32^{\circ}C$  روز/شب) بود. همین امر می‌تواند سرعت و میزان انجام برخی از فعالیت‌های ترمیمی دستگاه فتوسنتزی را افزایش دهد.

II است (۱۹). روند تغییرات شاخص  $F_v/F_m$  در مقایسه با  $F_0$  الگوی متضادی داشت. بدین معنی که این شاخص در هر دو رقم مورد ارزیابی ابتدا در مواجهه با تنش حرارتی نسبت به مرحله قبل از تنش، کاهش و سپس در مرحله بعد از تنش حتی به سطح بالاتری از مرحله قبل از تنش افزایش معنی‌داری یافت (شکل ۳-B). شاخص  $F_v/F_m$  بیان‌کننده آسیب به قسمت فتوسیستم II دستگاه فتوسنتزی به ویژه تجزیه شدن پروتئین  $D_1$  می‌باشد (۱۰). کاهش  $F_v/F_m$  و افزایش میزان  $F_0$  در بافت برگ‌های بالغ و جوان گیاه *Coffea arabica* در معرض تنش دمایی ۴۹ درجه سانتی‌گراد گزارش شده است (۲۶). هم‌چنین، کاهش ۸۰ درصدی  $F_v/F_m$  دانهال‌های زیتون در شرایط آزمایشگاهی و زمانی که در معرض دمای بالای ۳۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند، گزارش شده است (۷). نتایج حاضر نشان داد که با برطرف شدن تنش حرارتی، میزان  $F_0$  و  $F_v/F_m$  در هر دو رقم نسبت به مرحله تنش به‌ترتیب روند کاهشی و افزایشی نشان



شکل ۳- مقایسه میانگین حداقل فلورسانس کلروفیل ( $F_0$ ) (A) و حداکثر عملکرد کوانتومی فتوسیستم نوری II ( $F_v/F_m$ ) (B) در دو رقم زیتون (زرد و دیره) تحت مراحل قبل از تنش، تنش و بعد از تنش. علامت نوار روی ستون‌ها نشان‌دهنده خطای استاندارد توزیع میانگین‌ها هستند. \*\* تفاوت معنی‌دار میانگین‌ها در سطح احتمال ( $P \leq 0.01$ ) می‌باشد.

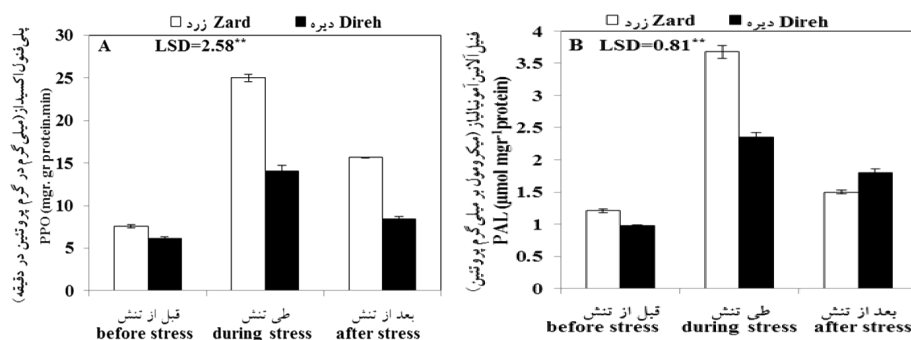
**Fig. 3.** Mean comparison of minimum chlorophyll fluorescence ( $F_0$ ) and maximum quantum yield of PSII ( $F_v/F_m$ ) in two olive cultivars (Zard and Direh) under before, during and after stress stages. Error bars indicate standard error. \*\* means significance difference ( $P \leq 0.01$ ).

آنزیم PPO هر دو رقم را نسبت به مرحله قبل از تنش افزایش داد، اما میزان این افزایش در رقم زرد بیش‌تر از رقم دیره بود. در مرحله بعد از تنش، میزان

نتایج نشان داد که میزان فعالیت آنزیم‌های PPO و PAL در هر دو رقم به‌طور معنی‌داری تحت‌تأثیر دما قرار گرفت (شکل ۴). تنش درجه حرارت بالا فعالیت

شدت بیشتر در رقم زرد، نسبت به مرحله قبل از تنش افزایش نشان داد (B-4). در همه مراحل، به غیر از مرحله بعد از تنش، میزان فعالیت این آنزیم در رقم زرد با اختلاف معنی‌داری بیشتر از رقم دیره بود. آنزیم PAL امکان تبدیل فنیل-آلانین به ترانس-سینامیک‌اسید را فراهم ساخته و سبب ادامه چرخه و تولید مواد فنولی می‌شود. ترانس-سینامیک‌اسید پیش‌ماده اصلی تولید فلاونوئیدها و لیگنین‌ها است. بنابراین افزایش فعالیت PAL سبب افزایش سطح تولید مواد فنول پروپانویدی تحت شرایط تنش‌های محیطی مانند تنش خشکی، درجه حرارت، اشعه ماورای بنفش و تنش‌های زنده شده و گیاه را در مقابل این تنش‌ها حفظ می‌کند (2) بررسی فعالیت آنزیم PAL در ارقام مختلف زیتون نشان داده میزان فعالیت این آنزیم در مرحله سخت شدن هسته، که موقع مواجهه این گیاه با درجه حرارت بالا می‌باشد، افزایش یافته و نقش مؤثری در تولید لیگنین و سخت شدن هسته میوه دارد (29).

فعالیت این آنزیم در هر دو رقم نسبت به مرحله تنش کاهش یافت. در همه مراحل میزان فعالیت این آنزیم در رقم زرد با اختلاف معنی‌داری بیشتر از رقم دیره بود (A-4). گیاهان برای مقابله با تنش‌های حرارتی ترکیبات فنولی مانند فنیل پروپانوید و فلاونوئید سنتز می‌کنند. آنزیم PPO فنول‌های تولید شده در شرایط تنش را با تبدیل 0-دی فنول<sup>1</sup> به 0-دی کینون<sup>2</sup> اکسید کرده و باعث کاهش سطح تولید ترکیبات فنولی تحت چنین شرایطی می‌شود (38). کاهش بیشتر فعالیت این آنزیم، تحت شرایط تنش خشکی، در زیتون ارقام شمالی<sup>3</sup> و زالماتی<sup>4</sup> در مقایسه با رقم چیتویی<sup>5</sup> گزارش شده است (8). بررسی اثر درجه حرارت 35 درجه سانتی‌گراد بر فعالیت آنزیم PPO در گیاه *Citrus lanatus* Thomb. cv. Dulc marvilla نشان داده است که فعالیت این آنزیم نسبت به دماهای 25 درجه سانتی‌گراد افزایش معنی‌داری داشته است (33). روند تغییرات فعالیت آنزیم PAL مشابه با آنزیم PPO بود. بدین معنی که فعالیت آن در هر دو رقم، با



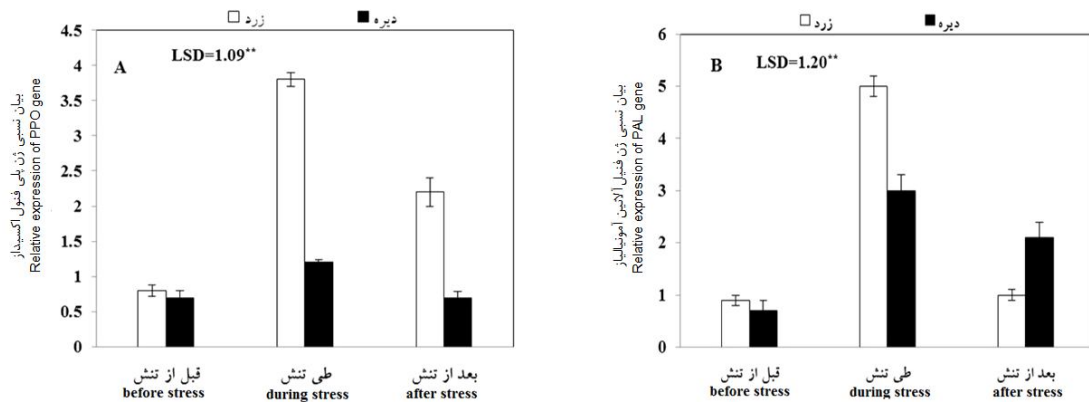
شکل 4- میانگین فعالیت آنزیم‌های PPO (A) و PAL (B) (زرد و دیره) تحت دوره‌های قبل از تنش، تنش و بعد از تنش. علامت نوار روی ستون‌ها نشان‌دهنده خطای استاندارد توزیع میانگین‌ها هستند. \* تفاوت معنی‌دار میانگین‌ها در سطح احتمال (P<0.01) می‌باشد.

Fig. 4. Mean comparison of poly phenyloxidase (A) phenylalanin amonialyase (B) in two olive cultivars (Zard and Direh) at before, during and after stress stages. Error bars indicate standard error. \*\* means significance difference (P<0.01).

- 1- O-diphenols
- 2- O-diquinones
- 3- Chemlali
- 4- Zalmati
- 5- Chetoui

نشان داد، اما نکته قابل تامل بالا بودن بیان این ژن در این مرحله در رقم دیره نسبت به رقم زرد بود. در توضیح این موضوع، به نظر می‌رسد رقم دیره به رغم کاهش دما در مرحله بعد از تنش هنوز تحت تأثیر اثرات فیزیولوژیکی و زیست-شیمیایی متأثر از دمای بالا در مرحله تنش بوده و فعالیت آنزیم PAL و بیان ژن (ها) مربوطه در قالب سیستم دفاع آنزیمی در این رقم هنوز ادامه دارد. به عبارتی در بازه زمانی مورد مطالعه، سرعت و میزان بازیافت فرایندهای درون سلولی این رقم در مقایسه با رقم زرد کندتر و کم‌تر بوده است (شکل ۵-B). PPO و PAL با حذف مولکول‌ها و رادیکال‌های فعال اکسیژنی نقش مهمی در حفاظت گیاهان و مکانیزم‌های سازگاری آن‌ها در برابر تنش‌های محیطی دارند. گزارش شده است که میزان بیان ژن PAL زیتون رقم لچینو در حالت عدم آبیاری نسبت به آبیاری منظم در طی ماه‌های گرم تابستان افزایش می‌یابد (۲۷).

نتایج الگوی بیان ژن PPO در بافت برگ نشان داد که در هر دو رقم میزان بیان این ژن در درجه حرارت ۴۵ درجه سانتی‌گراد (دمای تنش) در رقم زرد نسبت به رقم دیره و در مقایسه با نمونه‌های قبل از تنش افزایش نشان داد (شکل ۵-A). در هر دو مرحله تنش و بعد از تنش میزان بیان این ژن در رقم زرد بیش‌تر از رقم دیره بود. هم‌چنین، شیب کاهش بیان این ژن در مرحله بعد از تنش، در مقایسه با مرحله تنش، در رقم زرد بیش‌تر از رقم دیره بود (شکل ۵-B). یافته‌ها نشان داده‌اند که بیان ژن PPO تحت تأثیر مرحله نمو گیاه و وضعیت آب گیاه متأثر می‌گردد، به طوری که بیش‌ترین میزان بیان ژن PPO در درختان زیتون تحت تیمار تنش خشکی رقم فرانتویو<sup>۱</sup> در مقایسه با درختان شاهد و در طی دمای بالای هوا در تیرماه مشاهده شده است (۹). تحت تنش حرارتی میزان بیان ژن PAL در رقم زرد بیش‌تر از رقم دیره بود. اگرچه در مرحله بعد از تنش بیان ژن PAL، مشابه با ژن PPO، در مقایسه با مرحله تنش کاهش



شکل ۵- سطوح نسبی بیان ژن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شامل PPO و PAL در زیتون رقم زرد و دیره تحت تنش حرارت (A) و دوره بعد از تنش (B). علامت نوار روی ستون‌ها نشان‌دهنده خطای استاندارد توزیع میانگین‌ها هستند. \*\* تفاوت معنی‌دار میانگین‌ها در سطح احتمال (P≤۰/۰۱) می‌باشد.

Fig. 5. Quantitative levels of gene expression for studied enzymes PPO and PAL between olive cultivars 'Direh' and 'Zard' during heat stress (A) and after heat stress (B) stages. Error bars indicate standard error. \*\* means significance difference (P≤0.01).

آسیب وارده بر عملکرد دستگاه فتوسیستم II گیاهی، که با اندازه‌گیری شاخص‌های  $F_v/F_m$  و  $F_o$  مشخص شدند، بیانگر آسیب وارده کم‌تر به زنجیره انتقال الکترون دستگاه فتوستتزی رقم زرد در مقایسه با رقم دیره بود. تحت شرایط تنش حرارتی فعالیت و بیان ژن‌های مربوط به آنزیم‌های PAL و PPO در رقم زرد بیش‌تر از رقم دیره بود. در کل، با توجه به ارزیابی شاخص‌های متعدد فیزیولوژیکی و زیست-شیمیایی و هم‌چنین مطالعه الگوی بیان دو ژن PAL و PPO، چنین استنباط می‌شود که رقم زرد در مقایسه با رقم دیره تحمل نسبتاً بالایی به تنش حرارتی ناشی از دمای بالا دارد و هم‌چنین، توانایی بازیافت رشد بهتر و سریع‌تری را به‌دنبال رفع شرایط تنش‌زای دمایی نشان می‌دهد.

### نتیجه‌گیری کلی

تفاوت‌های بین دو رقم زیتون زرد و دیره در پاسخ به تنش حرارتی  $37/45$  درجه سانتی‌گراد (روز/شب) از نظر متغیرهای فیزیولوژیکی، زیست-شیمیایی و الگوی بیان دو ژن PAL و PPO مطالعه شد. نتایج مربوط به شاخص‌های رشد شامل رشد تجمعی شاخساره و وزن خشک آن، برتری نسبی رقم زرد را در مواجهه با تنش حرارتی و در مقایسه با رقم دیره نشان داد. میزان آسیب تنش حرارتی به ساختارهای غشای سلولی که از طریق اندازه‌گیری متغیر نشت یونی و شاخص پراکسیداسیون چربی‌های غشاء تعیین شده بود، نشان داد که رقم زرد هم آسیب کم‌تری متحمل شده و هم‌چنین سرعت بازیافت بیش‌تری (بهبود سریع‌تر این شاخص‌ها در مقایسه با رقم دیره) در دوره بعد از تنش دارد. اندازه‌گیری میزان

### منابع

1. Angelopoulos, A., Dichio, B. and Xiloyannis. 1996. Inhibition of photosynthesis in olive trees (*Olea europaea* L.) during water stress and rewatering. J. Exp. Bot. 47: 301. 1093-1100.
2. Bagal, R.U., Leeben-Mack, H.J., Lorenz, W.W. and Dean, F.D.J. 2012. The phenylalanine ammonia lyase (PAL) gene family shows a gymnosperm-specific lineage. BMC genomic. 13: 2-9.
3. Baker, N.L. and Rosenqvist, E. 2004. Application of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. J. Exp. Bot. 55: 403. 1607-1621.
4. Beaudoin-Eagan, L.D. and Throp, T.A. 1985. Tyrosine and phenylalanine ammonia lyase activities during shoot initiation in tobacco callus cultures. Plant Physiol. 78: 3. 438-441.
5. Bian, S. and Jiang, Y. 2009. Reactive oxygen species, anti oxidant enzyme activities and gene expression patterns in leaves and roots of Kentucky bluegrass in response to drought stress and recovery. Sci. Hortic. 120: 2. 264-270.
6. Blum, A. and Ebercon, A. 1981. Cell membrane stability as a measure of drought and heat tolerance in wheat. Crop Sci. 21: 43-7.
7. Bongi, G., Mencuccini, M. and Fontanazza, G. 1987. Photosynthesis of olive leaves: effects of light flux density, leaf age, temperature, and peltates and  $H_2O$  vapor pressure deficit on gas exchange. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 112: 1. 143-148.
8. Boughaleb, F. and Mhamdi, M. 2011. 2011. Possible involvement of proline and the antioxidant defense system in the drought of three olive cultivars grown under increasing water deficit regimes. Agric. J. 6: 6. 378-391.
9. Cirilli, M., Caruso, G., Gennai, C., Urban, S., Frioni, E., Ruzzi, M., Servili, M., Gucci, R., Poerio, E. and Muleo, R. 2017. The role of polyphenoloxidase, peroxidase and  $\beta$ -Glucosidase in phenolics accumulation in *Olea europaea* L. fruits under different water regimes. Front. Plant Sci. 8: 717. 1-13.

10. Cui, L., Li, J., Fan, Y., Xu, S. and Zhang, Zh. 2006. High temperature effects on photosynthesis, PSII functionally and antioxidant activity of two *Festuca arundinacea* cultivars with different heat susceptibility. *Bot. Stud.* 47: 61-69.
11. Ebtadaie, M. and Shekafandeh, A. 2016. Morpho-physiological changes of two cultivars of pomgrate 'Rabab' and 'Shisheh Gap' under water stress conditions. *Iran. J. Hortic. Sci. Technol.* 17: 2. 209-220.
12. Grisafi, F., Bonafede, E., Vecchia, F.F. and Rascio, N. 2004. Some morphological, anatomical, physiological responses of different olive cultivars to high temperatures and drought stress. *Acta. Bot. Gallica.* 151: 3. 241-253.
13. Hall, K. 2002. Acclimative response to temperature stress in higher plants: Approaches of gene engineering for temperature tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53: 225-245.
14. Han, B. and Bischofa, J.C. 2004. Direct cell injury associated with eutectic crystallization during freezing. *Cryobiolo.* 48: 1. 8-21.
15. Haworth, M., Marino, G., Brunetti, C., Killi, D., Del Carlo, A. and Centritto, M. 2018. The impact of heat stress and water deficit on the photosynthetic and stomatal physiology of Olive (*Olea europaea* L.)- A case study of the 2017 heat wave. *Plants.* 7: 76. 1-13.
16. Health, L.R. and Packer, R. 1968. Photo peroxidation in isolated chloroplasts: Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 125: 1. 189-198.
17. Hu, L.X., Hu, T., Zhang, X., Pang, H. and Fu, J.M. 2012. Exogenous glycine betaine ameliorates the adverse effect of salt stress on perennial ryegrass. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 137: 1. 38-46.
18. IPCC. 2014. Climate change 2014. Synthesis report. Contribution of working groups I, II and III to the fifth assessment reports of the intergovernmental panel on climate change (Core Writing Team, R.K. Pachauri and L.A. Meyer (eds.)). IPCC, Geneva, Switzerland, 12p.
19. Khanpour Ardestani, N., Sharifi, M. and Behmanesh, M. 2015. Effect of methyl jasmonate on antioxidant enzyme activities, phenolic and flavonoid compounds in *Scrophularia striata* cell culture. *J. Plant Res.* 27: 5. 840-853. (In Persian)
20. Krause, G.H. and Weis, E. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 313-349.
21. Lin, J.N. and Kao, C.H. 1998. Effects of oxidative stress caused by hydrogen peroxide on senescence of rice leaves. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 39: 161-165.
22. Lutts, S., Kinet, J.M. and Bouharmont, J. 1995. Changes in plant response of rice varieties differing in salinity resistance. *J. Exp. Bot.* 46: 293. 1843-1852.
23. Ma, Y.H., Ma, F.W., Zhang, J.K., Li, M.J., Wang, Y.H. and Liang, D. 2008. Effects of high temperature and gene expression of enzymes involved in ascorbate-glutathion cycle in apple leaves. *Plant Sci.* 175: 761-766.
24. Mancuso, S. 2000. Electrical resistance changes during exposure to low temperature measure chilling and freezing tolerance in olive trees (*Olea europaea* L.) plants. *Plant Cell Environ.* 23: 291-299.
25. Mancuso, S. and Azarello, E. 2002. Heat tolerance in olive. *Adv. Hort. Sci.* 16: 3-4. 125-130.
26. Marias, E.D., Meinzer, C.F. and Still, C. 2016. Impact of leaf age and heat stress duration on photosynthetic gas exchange and foliar nonstructural carbohydrates in *Coffea Arabica*. *Ecol. Evol.* 2017: 7. 1297-1310.
27. Martinelli, F., Basile, B., Morelli, G., d'Andria, R. and Tonutti, P. 2012. Effects of irrigation on fruit ripening behavior and metabolic changing in olive. *Sci. Hort.* 144: 201-207.
28. Mohammadi, H., Zeinanloo, A.A. and Rovshan, A.A. 2008. Thermo adaptation modeling of olive (*Olea europaea* L.) in Iran. *Phys. Geo. Res.* 64: 37-51. (In Persian)

29. Morello, J.R., Romero, M.P., Ramo, T. and Motilva, M.J. 2005. Evaluation of L-phenylalanine ammonia-lyase activity and phenolic profile in olive drupe (*Olea europaea* L.) from fruit setting period to harvesting time. *Plant Sci.* 168: 65-72.
30. Neugart, S., Krumbein, A. and Zrenner, R. 2016. Influence of light and temperature on gene expression leading to accumulation of specific flavinol glycoside and hydroxycinnamic acid derivatives in Kale (*Brassica oleraceae* var *Sabellica*). *Front. Plant Sci.* 7: 326. 1-16.
31. Rahnama, A. 2009. *Plant Physiology*. Pooran Pazhouhesh, 380p. (In Persian)
32. Raymond, J., Rakariyatham, N. and Azanza, J.L. 1993. Purification and some properties of polyphenoloxidase from sunflower seeds. *Phytochem.* 34: 927-931.
33. Rivero, M.R., Ruiz, M.J., Garcia, C.P., Lopez-Lefebvre, R.L., Sanchez, E. and Romero, L. 2001. Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. *Plant Sci.* 160: 2. 315-321.
34. Snel, J.F.H., Van Kooten, O. and Van Hove, L.W.A. 1991. Assessment of stress in plants by analysis of photosynthetic performance. *Trac-element Anal. Chem.* 10: 26-30.
35. Sofu, A. 2010. Drought stress tolerance and photoprotection in two varieties of olive tree. *Acta. Agr. Scand. B S P.* 61: 711-720.
36. Sofu, A., Dichio, B., Xiolyannis, C. and Masia, A. 2004. Effect of different irradiance levels on some antioxidant enzymes on malondialdehyde content during rewatering in olive tree. *Pant Sci.* 166: 293-302.
37. Tantaswat, P., Melkonian, J., Wolf, W.D. and Steffens, J.C. 2004. Suppression of polyphenol oxidase increases stress tolerance in tomato. *Plant Science.* 167: 4. 693-703.
38. Vaughn, K.C. and Duke, S.O. 1981. Tentoxin-induced loss of plastidic polyphenol oxidase. *Physiol. Plant.* 53: 421-428.
39. Vollenweider, P. and Gunthard-Goerg, M.S. 2005. Diagnosis of abiotic and biotic stress factors using the visible symptoms in foliage. *Environ. Pollut.* 137: 3. 455-465.
40. Yamada, M., Hidaka, T. and Fukamachi, H. 1996. Heat tolerance in leaves of tropical fruit crops as measured by chlorophyll fluorescence. *Sci. Hort.* 67: 1-2. 39-48.
41. Zandalinas, S.I., Rivero, M.R., Martin, V., Gomez-Cadenas, A. and Arbona, V. 2016. Tolerance of citrus plants to the combination of high temperatures and drought is associated to the increase in transpiration modulated by a reduction in abscisic acid levels. *BMC Plant Biol.* 16: 1. 105-120.
42. Zeinanloo, A.A. 2018. Evaluation and selection of superior olive genotypes with high oil and yield. *Iran. J. Hort. Sci. Technol.* 19: 2. 171-184. (In Persian)
43. Zhao, X X., Huang, L.K., Zhang, X.Q., Li, Z. and Peng, Y. 2014. Effects of heat acclimation on photosynthesis, antioxidant enzyme activities and gene expression in Orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.). *Mol.* 19: 9. 13564-13576.

*Arcl*