نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۴، شماره ۲، نیمسال دوم ۱۳۸۹ ، ص. ۲۴۴-۲۳۴
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Journal of Horticultural Science
Vol. 24, No. 2, Fall- Winter 2010-2011, P. 234-244
ISSN: 2008 - 4730

نقش فیزیولوژیکی و تغییرات بیوشیمیائی شش رقم زیتون(*Olea europaea* L.) در برابر تنش خشکی

محمد مهدی ضرابی[1*]- علیرضا طلائی[2]- علی سلیمانی[3]- رحیم حداد[4]

تاریخ دریافت: ۸۸/۱۲/۲۰
تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۰/۷

چکیده

خشکی از جمله تنش های محیطی مهم است که بر رشد و نمو گیاهان اثر منفی می گذارد. برای شناخت فیزیولوژی مقاومت به تنش خشکی گیاه زیتون که در شرایط گلخانه با دو سطح شاهد و تیمار تنش خشکی (-1/5 MPa) بر اساس آزمایش فاکتوریل در قالب بلوک های تصادفی در سه تکرار بر روی ۶ رقم زیتون (زرد، روغنی، فیشمی، نبالی، آربکین و گوردال) طی سه مرحله متناوب (تنش و آبیاری مجدد) بر روی نهال های دو ساله اعمال گردید. در این پژوهش برخی شاخص هائی مانند پروتئین، آنزیم پراکسیدار و آسکوربیت پراکسیداز و میزان بتائین، کلروفیل و تعداد روزنه ها در واحد سطح برگ اندازه گیری شد. نتایج نشان داد که با افزایش تنش خشکی میزان پروتئین محلول کل کاهش یافت و میزان آن در ارقام مختلف زیتون متفاوت بود. همچنین تنش خشکی موجب تجمع معنی دار میزان آنزیم پراکسیداز در برگ گیاه زیتون شد. بر اساس نتایج بیوشیمیائی از این آزمایش زیتون گوردال و زرد به عنوان ارقام مقاوم به خشکی در مقایسه با سایر ارقام مشخص شد. همچنین میزان بتائین در تمام ارقام تحت تنش خشکی نسبت به گیاهان شاهد افزایش معنی دار نشان دادند. میزان کلروفیل a , b و کل نیز در کلیه ارقام زیتون تحت تنش کاهش نشان داد، بطوریکه در ارقام گوردال و نبالی میزان کلروفیل نسبت به دیگر ارقام کاهش داشته است. در بررسی تعداد روزنه ها مشخص شد که با اعمال تنش خشکی بر تراکم روزنه ها افزوده گردید و افزایش تراکم روزنه ها در ارقام گوردال و روغنی کاملا مشهود بود. می توان نتیجه گرفت که ارقام نبالی و گوردال در مقایسه با دیگر ارقام مقاومت نسبتا بالائی به خشکی دارند.

واژه های کلیدی: زیتون، تنش، آنزیم پراکسیداز، بتائین، کلروفیل

مقدمه [1]

آب یکی از عوامل محدود کننده مهم برای تولید کنندگان محصولات کشاورزی در مناطق خشک و نیمه خشک جهان است. این ماده از لحاظ اقتصادی در بسیاری از مناطق جهان به خصوص مناطق خشک و نیمه خشک به یکی از منابع بسیار مهم تبدیل شده که همواره خطرات کمبود آب گریبانگیر ملت ها است. اخیراً در همه بخش های صنعتی نیاز به آب در حال افزایش است که یکی ازفعالیت‌های مهم اقتصادی، صنعت باغبانی می‌باشد (۳۴). اولین واکنش گیاهان در برابر تنش خشکی کاهش رشد رویشی آنها است. تنش خشکی خصوصیات رویشی درختان زیتون از جمله ارتفاع، وزن تر و خشک اندام‌ها، تعداد و سطح برگ را تحت تاثیر قرارمی دهد. سطح برگ نیز با خشک شدن خاک کاهش می‌یابد، از طرف دیگر تغییرات سازگاری در توزیع ماده خشک ممکن است با افزایش در نسبت ریشه به شاخساره روی دهد (۲۲) و بنظر می رسد گونه های مختلف گیاهی دامنه وسیعی از مکانیسم های مقاومت به خشکی را نشان می دهند که منجربه ایجاد سازگاری های فیزیولوژی و بیوشیمیائی می گردد (۱۰)، در همین رابطه راجیر (۳۲) اظهار داشت، یکی از مهمترین مکانیسم های سازگاری گیاهان به شرایط کم آبی پدیده تنظیم اسمزی است که در درختان زیتون، پسته و بادام گزارش شده است و افزود که تحمل به تنش خشکی نتیجه تولید و یا تجمع محلول های اسمزی سازگار باشد. تجمع اسمولیت های سازگار مؤثر در امر تنظیم اسمزی با پایین رفتن پتانسیل اسمزی به سلول اجازه می‌دهد که آب بیشتری را از محیط جذب کند. بنابراین اثر جبران کننده سریع بر کمبود آب درگیاه را خواهد داشت (۳۲). از طرفی

۱- استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بین المللی امام خمینی
(*- نویسنده مسئول: (Email: mehdimzz@gmail.com
۲- استاد گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران
۳- استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان
۴- استادیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بین المللی امام خمینی

ویتاگ لیانو و همکارش (۳۹) گزارش کردند که، زیتون جزء گیاهان همیشه سبز است و کشت آن در حوزه مناطق مدیترانه متداول است. کشت این گیاه دستخوش بعضی تنش های نامساعد محیطی قرار می گیرد. به طور مثال کمبود آب، سرما و شوری از جمله فاکتورهای تنش‌زا هستند که رشد گیاه را محدود می کند و فرآیندهای بیوشیمیائی آنرا تحت تاثیر قرار می دهد، به علاوه مقاومت این گیاه نقش مهمی دربیان ژن و سنتز پروتئین در مقایسه یا دیگر گیاهان را نشان می دهد. درخت زیتون از جمله گیاهانی است که در هنگام خشکی با پائین نگه داشتن پتانسیل آب برگ می تواند در برابر خشکی مقاومت نماید (۴۲)، چنین پاسخی توسط چارتزولاکیس و همکاران (۱۰) گزارش شده است. دانشمندان معتقدند که با کاهش آب در سلول فرآیند تنظیمی[1] درجهت تنظیم سوخت وساز سلولی[2] متناسب با شرایط تنش صورت می گیرند. به طورهمزمان تغییر در رشد ونمو با تغییرات در بیان ژن ها[3] به وقوع می پیوندد. بسیاری از بیان ژن ها تحت تنش کم آبی پروتئین ها و آنزیم ها را کد می نماید که می توانند در حفظ و ادامه فعالیت تنظیمی نیز تحت شرایط کم آبی القاء گردند اما تعداد کمی ازآنها شناسائی شده اند (۴۳) و استفاده از گزینش متابولیکی ما را در درک بهتر مولفه های فیزیولوژیکی کنترل کننده واکنش های گیاهی به عوامل غیره زنده تنش را یاری می نماید (۱۵). بنابراین هدف از این تحقیق، تعیین توانایی گیاهان جوان زیتون به سازگاری در برابر خشکی بوسیله اعمال تیمارهای مختلف تنش کمبود آب به منظور شناخت دقیق تر مکانیزم های فیزیولوژی و بیوشیمیائی دخیل در این سازوکار بود.

مواد و روش ها

در این پژوهش اثرات تنش خشکی بر روی ۶ رقم زیتون شامل نبالی، فیشمی، آربکین، زرد، گوردال و روغنی بر اساس آزمایش فاکتوریل در قالب طرح بلوک های کامل تصادفی در۳ تکرار با ۲ تیمار شاهد (آبیاری کامل و تنش خشکی 1.5- MPa) با سه دوره متناوب (تنش خشکی و آبیاری مجدد[4])، طی دو سال (۱۳۸۶– ۱۳۸۴) در گلخانه های تحقیقاتی دانشگاه بین المللی امام خمینی قزوین مورد ارزیابی قرار گرفت. در این پژوهش از هر رقم تعداد ۳۶ نهال دو ساله استفاده شد. این آزمایش در شرایط گلخانه با متوسط دمای حداقل وحداکثر به ترتیب۱۷/۸۲ و۳۶/۵ درجه سانتی گراد و میزان رطوبت هوای داخل آن بین ۲۲ تا۳۱ درصد در نوسان بود وخاک مورد استفاده ترکیبی از ماسه، خاک زراعی و مواد آلی به نسبت۱:۱:۱ در نظر گرفته شد. برای ارزیابی رطوبت خاک گلدان ها و اعمال تیمارهای آبیاری از بلوک گچی[5] استفاده گردید. دستگاه تحت فشار ۱۵- بار تنظیم و سپس میزان رطوبت بلوک گچی قرائت شد و این رطوبت به عنوان مبنای تعیین زمان آبیاری در طول دوره رشد بود (۲). این پژوهش در طی فصل تابستان به منظور بررسی اثرات تنش بر روی برخی صفات بیوشیمیائی و فیزیولوژیکی که تحت تیمارهای مختلف واقع شده بودند انجام گرفته است.

به منظور اندازه گیری میزان پروتئین کل از روش بردفورد (۸) استفاده شد. برپایه این روش محلول Bradford ۲۰٪ و محلول های استاندارد با استفاده از پروتئین آلبومین سرم گاوی[6] (BSA) محلول‌هائی با غلظت۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰ و۱۰۰۰ میکروگرم در یک میلی لیتر تهیه شد بطوریکه ضریب پیوستگی تمام منحنی های استاندارد در طول آزمایش ها بالای ۹۹ بود و میزان جذب در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت گردید. سنجش آنزیم پراکسیداز(۷. ۱. ۱. ۱۱. ۱ Pox,Ec) به روش همدا و همکارش (۲۱) و تغییرات آنزیم آسکوربیت پراکسیداز (۱۱. ۱. ۱۱. ۱ APX,EC) به روش ناکونا و همکارش (۲۹) اندازه گیری گردید. منحنی تغییرات جذب و فعالیت آنزیم پراکسیداز و آسکوربیت پراکسیداز به ترتیب در طول موج ۴۷۰ و۲۹۰ نانومتر با استفاده از روش kinetic دستگاه اسپکتروفتومتر (UV-3200 model labomed) قرائت شد. ضمنا فعالیت ویژه این دو آنزیم بصورت تعداد میکرومول H2O2 تجزیه شده در دقیقه در میلی گرم پروتئین گزارش شد. میزان بتائین در برگ های نهال زیتون به روش گریو (۱۹) اندازه گیری شد. ابتدا نمونه های گیاهی در دمای ۵۵ تا ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت خشک کرده سپس ۰/۵ گرم از برگ را توزین کرده و آنرا در ارلن ریخته و ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه گردید و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد روی شیکر قرار داده شد. پس از تهیه اسید سولفوریک ۲ نرمال، یک میلی لیتر از عصاره گیاهی را با یک میلی‌لیتر اسید مخلوط و سپس (نسبت ۱: ۱) مقدار ۰/۵ میلی لیتر از ترکیب حاصله را در لوله آزمایش ریخته و در حمام آب یخ به مدت یک ساعت قرار داده و نهایتا پس از تهیه مخلوط ید و یدیدپتاسیم (۱۵/۷ گرم ید خالص بعلاوه ۲۰ گرم یدیدپتاسیم) مقدار ۰/۲ میلی‌لیتر از یدیدپتاسیم و ید را به لوله آزمایش اضافه کرده و آنرا ورتکس می نمائیم. در این مرحله نمونه ها بمدت ۱۶ ساعت در دمای صفر تا ۴ درجه سانتی گراد نگهداری گردید. بعد از آن نمونه ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای صفر درجه سانتی گراد با دور ۱۰/۰۰۰ سانتریفوژ شد. در هر لوله آزمایش فاز محلول روئی جدا و فقط کریستال موجود در کف لوله را نگهداشته شد. این مراحل حتماً بایستی در محیط حمام آب یخ انجام شود تا

1- Regulatory processes
2- Cellular metabolism
3- Gene expression
4- Recovery

5- Gypsum block (EiJkelkamp model 14.22)
6- Bovine serum albumin (BSA)

خطا کاهش یابد. سپس کریستال های موجود را در ۹ میلی‌لیتر از محلول ۱ و ۲ دی کلرواتان حل کرده و پس از عمل ورتکس و گذشت ۲ تا ۲/۵ ساعت مقدار جذب آن در ۳۶۵ نانومتر قرائت گردید. اسید سولفوریک نیز بعنوان شاهد دستگاه مورد استفاده قرار گرفت و استانداردها نسبت به آن سنجیده شدند. نهایتاً بعد از چند بار تکرار منحنی استانداردی با ضریب پیوستگی R^2 =۰/۹۹۲ بدست آمد. اندازه گیری میزان کلروفیل b,a و کل از روش آرنون (۴) استفاده شد. ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر از بافت له شده برگ با ۸۰۰ میکرولیتر استون ۱۰۰ درصد (V/V)، مخلوط شد. مخلوط حاصله به آرامی ورتکس[1] شده و به مدت یک ساعت در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد قرار داده شد. سپس نمونه ها به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ rpm دور با میکروسانتریفوژ، سانتریفوژ شدند، سپس محلول روئی برداشته شد و میزان کلروفیل با دستگاه اسپکتروفتومتر (Labomed 3200 مدل UVO-) در طول موج های ۶۵۴ و ۶۶۳ نانومتر با استفاده از فرمول‌های زیر بر حسب mg/ml محاسبه شد. به منظور برآورد تعداد روزنه‌ها در واحد سطح برگ از میکروسکوپ نوری Olympus با بزرگنمائی ۴۰۰ استفاده شد و برای هر نمونه تعداد روزنه موجود در ۳-۲ نقطه هر کدام به مساحت ۴۲/ میلی متر مربع شمارش گردید (۲۸). برای تجزیه و تحلیل داده ها از افزارهای آماری SAS استفاده شد و مقایسه میانگین ها از آزمون دانکن و برای رسم منحنی از نرم افزار Excel استفاده گردید.

نتایج

نتایج تجزیه واریانس در تیمارهای مختلف آبیاری بر میزان پروتئین کل در طی سه دوره آزمایش نشان می دهد که بین تیمار شاهد و تنش خشکی و همچنین فاکتور رقم اختلاف معنی دار در سطح ۱درصد وجود دارد (جدول۲). فاکتور زمان تحت تاثیر تیمارهای مختلف در طی ۳ دوره آزمایش متناوب نشان می دهد که در مرحله اول آزمایش میزان پروتئین کاهش بیشتری نسبت به آزمایش مرحله دوم وسوم دارد واز نظر آماری اختلاف معنی داری در سطح ۱ درصد را نشان می دهد (جدول ۲و۱). میزان پروتئین کل در ارقام زیتون تحت تیمارهای مختلف در شرایط تنش به ترتیب گوردال، نبالی، آربکین، روغنی، فیشمی و زرد بیشترین میزان پروتئین کل را دارند، ولی در شرایط شاهد بیشترین میزان پروتئین کل به ترتیب در ارقام گوردال، آربکین، زرد، نبالی، فیشمی و روغنی مشاهده گردید (نمودار۱). بررسی نتایج نشان می دهد اثر متقابل رقم در تیمار و زمان در و زمان در تیمار به ترتیب در سطح ۱ و ۵ درصد اختلاف معنی دار داشتند (جدول۲). تغییرات ویژه آنزیم پراکسیداز گیاه زیتون در تیمارهای تنش خشکی و شاهد در طی سه دوره آزمایش متناوب اختلاف معنی داری در سطح ۱ درصد را نشان می دهد. همچنین اثر متقابل فاکتورهای رقم در تیمار، زمان در رقم و زمان درتیمار به ترتیب در سطح ۱ و۵ درصد اختلاف معنی دار وجود دارد (جدول ۲) و فاکتور زمان تحت تاثیر تیمارهای مختلف در طی سه دوره آزمایش متناوب بیانگر آنست که در مرحله سوم آزمایش میزان پراکسیداز فعالیت کمتری نسبت به مرحله اول و دوم آزمایش دارد (نمودار۳) و از نظر آماری اختلاف معنی داری را در سطح ۵ درصد نشان می دهد. براساس نتایج، میزان بتائین برگ زیتون در طی سه دوره آزمایش متناوب تفاوت معنی دار را نشان می دهد. بطوریکه بین تیمار تنش و شاهد و همچنین فاکتور رقم اختلاف معنی دار در سطح ۱ درصد وجود دارد (جدول۲و۱) و ارقام مختلف زیتون تحت تنش به ترتیب گوردال، زرد، نبالی، بیشترین میزان بتائین را دارند (نمودار۴). تغییرات میزان کلروفیل نشان می‌دهد، تاثیر تیمارهای تنش خشکی و شاهد بر میزان کلروفیل (a , b و کل) در طی سه دوره آزمایش متناوب در برخی سطوح معنی دار می باشد. میزان کلروفیل a نشان می دهد بین تیمار تنش و شاهد اختلاف معنی دار نیست لیکن بین ارقام مختلف، اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد را نشان می دهد، بطوریکه در شرایط تنش ارقام گوردال، نبالی و آربکین بیشترین میزان کلروفیل a را دارند در صورتیکه میزان کلروفیل کل برگ b در شرایط تنش خشکی به ترتیب در ارقام گوردال، نبالی و زرد بود که تقریبا مشابه همین تغییرات در کلروفیل کل مشاهده گردید (نمودار۵). همچنین تغییرات میزان کلروفیل کل برگ طی سه مرحله آزمایش متناوب نشان می دهد، بین تیمار تنش و شاهد اختلاف معنی دار نیست، لیکن فاکتور زمان و رقم در طی سه دوره آزمایش در سطح ۱و۵ درصد اختلاف معنی دار را نشان می دهد (جدول۲). میزان کلروفیل کل در مرحله دوم تنش نسبت به مرحله اول و سوم آزمایش بیشتر شده بود و در شرایط تنش ارقام مختلف زیتون به ترتیب گوردال، نبالی و زرد از بیشترین میزان کلروفیل کل برخوردار بودند. تاثیر تنش خشکی بر تعداد روزنه ها نشان می دهد بین تیمار تنش خشکی و شاهد اختلاف معنی دار در سطح ۱ درصد وجود دارد، بطوریکه ارقام زیتون گوردال، روغنی و زرد به ترتیب بیشترین تراکم روزنه در واحد سطح برگ را داشتند. در شاخص تعداد روزنه ها طی سه مرحله تنش متناوب اختلاف معنی دار مشاهده می شود بطوریکه در مرحله دوم تنش تراکم روزنه ها افزایش یافته است و در مرحله سوم تراکم تعداد روزنه‌ها تعدیل می شود (جدول۲ ونمودار۶).

1- Vortex

1) chl a = ۱۲/۷ × B -۲/۹۶ × A

2) chl b = ۲۲/۹ × -۴/۶۸ × B

3) chl (a+b) = ۲۰/۲ × A +۸/۰۲ × B

بحث

بررسی مولکولی تحمل بر خشکی در گیاهان باعث شناخت کامل تر متابولیسم گیاهی در شرایط تنش خشکی گردیده است. تاکنون تعداد زیادی ژن القاء شونده در خشکی توسط پژوهشگران شناسائی شده است (۲۴). بیان برخی از این ژن ها موجب سنتز نگهدارنده اسمزی مانند اسیدهای آمینه، پروتئین ها، قندها و بتائین ها می گردد (۲۳) در این پژوهش برخی از خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیائی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج این پژوهش نشان داد که میزان پروتئین برگ زیتون تحت تاثیر تنش خشکی کاهش می یابد که نظیر همین نتایج در گیاهان گندم (۲۵) پنبه (۱۳) ،تنباکو (۳۰) و برنج (۳۴) گزارش شده است. برخی پژوهشگران نتایج مشابهی ارائه نموده اند که در گیاهان مناطق خشک سنتز پروتئین در واکنش به کم آب کاهش یافته و بیان ژن ها تحت تنش خشکی دگرگون می شود، بطوریکه سازش به تنش خشکی در واقع نتیجه ای از تغییر بیان ژن می باشد. بنابراین ممکن است پروتئین های جدیدی سنتز شده و یا از فرم غیر فعال به فعال در آیند (۳۷). در این بررسی مشاهده گردید میزان پروتئین محلول ارقام تحت تنش خشکی در مقایسه با گیاهان شاهد کاهش یافته است. این مقدار کاهش طوری بود که میزان پروتئین در گیاهان تحت تنش ارقام زیتون گوردال، نبالی، آربکین، روغنی ، فیشمی و زرد (نمودار۳) به ترتیب ۲/۲۳، ۱/۶۰، ۱/۵۷، ۱/۵۲، ۱/۴۹ و ۱/۳۳ میلی گرم در گرم وزن تر برگ رسیده نتایج را این پژوهش با نتایج بدست آمده توسط وانگ و همکاران (۴۱) که میزان پروتئین محلول زیتون در برگ جوان را ۱/۰۳ و در برگ پیر ۲/۲۵ و در میوه زیتون ۱/۷۴ میلی گرم در گرم وزن تر گزارش کرده بود مطابقت می دهد. در این بررسی ارقام زیتون مورد آزمایش نشان می دهد، ارتباطی بین تغییرات پرولین و پروتئین برگ زیتون موجود دارد و به نظر می رسد که کاهش محتوی پروتئین تحت تنش خشکی، کاهش سنتز آن، افزایش فعالیت آنزیم های تجزیه کننده پروتئین و نیز تجمع اسیدهای آمینه آزاد از جمله پرولین مرتبط باشد (۹) که این موضوع با یافته های ما مطابقت دارد. گیاهان جهت مقابله با تنش خشکی مکانیزم های آنزیمی مانند پراکسیداز (POX)، آسکوربیت پراکسیداز (APX)، کاتالاز (CAT) و سوپراکسید دسموتاز (SOD) را بوجود آورده اند. این آنزیم ها شاخص های ارزیابی مقاومت به خشکی در گیاهان محسوب می شوند (۱۴). در این پژوهش دو آنزیم پراکسیداز (POX) و آسکوربیت پراکسیداز (APX) در گیاه زیتون مورد آزمایش قرار گرفت. براساس نتایج بدست آمده تاثیر تیمارهای آبیاری بر میزان آنزیم POX در طی سه دوره آزمایش معنی دار بود، بطوریکه میزان آنزیم POX در شرایط تنش خشکی در مقایسه با گیاهان شاهد افزایش نشان داد. در همین راستا شارما و همکارش (۳۵) گزارش کردند با اعمال تنش ملایم خشکی بر گیاه برنج فعالیت آنزیم های SOD,APX,POX افزایش یافت. همچنین پژوهشگران دیگر نیز گزارش مشابهی منتشر کرده اند که اثر تنش خشکی بر فعالیت آنزیم های ضداکسید اتیو مانند POX,SOD,CAT در گیاه گندم منجربه افزایش آنزیم های مذکور شده است (۴۵). اگرت و همکارش (۱۶) در گزارش دیگر مشاهده کردند که در پیاز کوهی (*Allium schomo* prasum) ۹ روز پس از قطع آبیاری فعالیت آنزیم پراکسیداز افزایش یافت. در پژوهش حاضر افزایش آنزیم پراکسیداز در شرایط تنش خشکی به ترتیب در ارقام زیتون زرد، گوردال، نبالی بیشتر از سایر ارقام بود و با طولانی تر شدن دوره تنش خشکی (مرحله سوم تنش) فعالیت این آنزیم کاهش یافت. این نتایج با بررسی شارما و همکارش (۳۵) گزارش کرده اند، با بالا رفتن شدت تنش خشکی (2MPa-) فعالیت آنزیم POX کاهش پیدا کرده است و با نتایج ژانگ و همکاران (۴۵) بر روی گیاه گندم مطابقت دارند. دانشمندان معتقدند که پراکسیداز در فرآیندهای متابولیکی مانند کاتابولیسم هورمون، دفاع در برابر عوامل بیماریزا اکسیدآسیون فنل ایجاد پیوند با پروتیئن های ساختاری سلول وپلی ساکاریدهای دیواره سلولی نقش دارند (۱۱) مشابه همین بررسی درباره مقادیر بالائی از اسیدهای فنولی فعال کننده ایندول استیک اکسیداز زیتون رقم مانزانیلا گزارش شده است (۱۸) نتایج این بررسی نشان داد که افزایش میزان آنزیم پراکسیداز در ارقام زیتون زرد و گوردال بیشتر بود که معلوم شد در ارقام مقاوم به خشکی کاهش خسارت اکسیداتیوی به افزایش بیان سیستم های آنتی اکسیدان مرتبط است (۳۸) و سلول‌های گیاهی که دارای مکانیسم های انتی اکسیدان هستند می تواند در مقابل خسارت های اکسیداتیو محافظت شوند (۲۶). در این پژوهش میزان آنزیم آسکوربیت پراکسیداز (APX) بدقت در گیاه زیتون تحت تنش خشکی و شاهد اندازه گیری شد، لیکن تغییری در میزان آنزیم APX در هیچ کدام از شرایط اعمال شده مشاهده نگردید. برای توجیه این مطلب دو احتمال را می توان مد نظر قرار داد، اول اینکه پایداری مولکولی پروتئین این انزیم در شرایط اکسیداتیو پائین باشد. دوم اینکه شاید این آنزیم (APX) در گیاه زیتون مورد بررسی غیرفعال باشد ولی در همین شرایط این آنزیم (APX) در گیاه گندم و گوجه فرنگی فعال بود. پیش از این هیچ بررسی در مورد فعالیت های آنزیمی گیاه زیتون گزارش نشده است. از طرفی تجمع محلول های سازگار ممکن است گیاهان را در برابر تنش محیطی حفاظت نماید که این ترکیبات بر اساس گونه های گیاهی متفاوت می باشد. از این مواد می توان به بتائین یا تری متیل گلایسین اشاره کرد که ترکیبات آمونیم چهارتایی اولین بار در عصاره چغندرقند شناسائی گردید (۵). نتایج این پژوهش نشان می دهد که میزان بتائین تحت تاثیر تنش آبی افزایش می یابد. پژوهشگران نیز گزارش های مشابهی منتشر کرده اند که بیشتر گیاهان و همچنین درختان چند ساله در شرایط تنش خشکی با تجمع مواد محلول سازگار

در داخل سلول از جمله بتائین که فشار اسمزی را تعدیل می کند، پاسخ می دهد (۴۰). بطوریکه وجود تنظیم اسمزی در درختان زیتون، سیب، هلو، گیلاس و انگور در برابر تنش خشکی مشخص شده است. در زیتون تنظیم اسمزی ۳/۲۴ مگاپاسکال در برابرافزایش تنش خشکی گزارش شده که ۱/۰۴ مگاپاسکال آن در اثر تنظیم اسمزی فعال بوده است (۴۲). در این آزمایش تجمع بتائین در شرایط تنش خشکی در کلیه ارقام گیاه زیتون مشاهده گردید. این افزایش در ارقام گوردال، زرد و نبالی بیشتر از سایر ارقام بود. شاید بتوان اظهار داشت که تجمع میزان بتائین در ارقام گوردال و زرد می تواند به عنوان یک ماده محلول سیتوپلاسمی سازگار برای تنظیم اسمزی باشد. از طرفی دانشمندان معتقدند، بتائین به عنوان محلول سازگار در تثبیت ساختمان برخی آنزیم ها و ترکیبات پروتئینی و حفاظت از غشاء سلولی (۱۲) و حفاظت از فرآیندهای فیزیولوژیکی مانند فتوسنتز (۳) و خاصیت ضد اکسیداتیو (۲۰) در شرایط تنش خشکی، شوری و دمای زیاد نقش مهمی ایفا نمایند که بیان این نتایج با پژوهش ما و دیگر پژوهشگران (۲۶،۲۳ و ۳۸) مطابقت دارد. بررسی تغییرات کلروفیل نشان می دهد، میزان کلروفیل b ,a و کل در کلیه ارقام زیتون مورد آزمایش کاهش یافته است و از نظر آماری بین تیمار تنش خشکی و شاهد اختلاف معنی دار نبود لیکن تفاوت بین آنها کاملا آشکار بود. بطوریکه در شرایط تنش، ارقام مختلف زیتون به ترتیب گوردال، نبالی، زرد، آربکین، روغنی و فیشمی بیشترین میزان کلروفیل کل را دارا بودند. کاهش میزان کلروفیل کل در ارقام مختلف زیتون تحت تنش خشکی نیز مشابه کاهش کلروفیل در ارقام زیتون میشن، روغنی، زرد، بلیدی و ماری (۱) و دو رقم نهال سیب (۳۶) و بعضی درختچه های نیمه خزان کننده و درختان پهن برگ و کاج ها (۶) گزارش شده است. براساس مشاهدات ظاهری در زمان تنش خشکی، در برخی ارقام زیتون شدت رنگ سبزینه‌ای کاهش داشته است. نتایج این بررسی نشان می دهد که، کاهش در میزان سبزینه برگ تحت تنش باعث کاهش کارآیی فتوسنتزی در گیاهان می گردد و گیاهانی که بتوانند سبزینه خود را حفظ نمایند می توانند فتوسنتز بالاتری داشته باشند. کمبود آب نیز سبب پیری زودرس گیاهان، شکسته شدن کلروپلاست ها و کاهش میزان کلروفیل می گردد. همچنین تشکیل پرتوکلروفیل در شرایط تنش متوقف می شود (۳۳). یافته های ما حاکی است که احتمالاً در شرایط تنش خشکی ارقام گوردال و نبالی تجزیه کلروفیل کمتری نسبت به دیگر ارقام داشته اند و شرایط تنش خشکی را بهتر تحمل می کنند. از طرفی دانشمندان معتقدند، یکی از عوامل مهم در کاهش فتوسنتز بسته شدن روزنه ها در شرایط کمبود آب می باشد که کاهش هدایت روزنه و در نهایت کاهش میزان فتوسنتز را به همراه دارد که محدودیت روزنه ای سبب کاهش میزان فتوسنتز و غلظت CO_2 در فضای بین سلولی برگ می شود که به نوبه خود سبب جلوگیری از متابولیسم می گردد (۲۷). در رابطه با همین موضوع تنش خشکی برتراکم روزنه ها مورد بررسی قرار گرفت، بطوریکه تحت شرایط تنش خشکی تعداد روزنه ها در کلیه ارقام افزایش نشان داد و از نظر آماری بین تیمار تنش خشکی و شاهد و ارقام مختلف زیتون اختلاف معنی دار مشاهده شده است که گیاهان تحت تنش به ترتیب ارقام گوردال، روغنی، زرد، آربکین، نبالی و فیشمی به ترتیب دارای تعداد زیادتری روزنه در واحد سطح برگ بودند. احتمالا یکی از علل افزایش تراکم روزنه ها در هنگام تنش خشکی کوچکتر شدن اندازه سلول ها است که باعث می شود تعداد بیشتری روزنه در واحد سطح قرار گیرند. نتایج بدست آمده در پژوهش حاضر با نتایج بدست آمده در زیتون ارقام ماستودیس و کرونایکی مشابه است. بطوریکه در این ارقام نیز تنش خشکی به ترتیب موجب ۴۴/۹ و ۵۵/۲ درصد افزایش در تراکم روزنه ها شده بود (۷). همچنین گزارش ایناژه و همکاران (۱۷) درباره مکانیسم دفاعی دو رقم زیتون مسکی و شملالی در برابر کمبود آب نشان می دهد که در رقم شملالی کرک برگ زیاد بوده و روزنه ها فشرده هستند که این موضوع تایید کننده مطلب فوق می باشد.

نتیجه گیری کلی

براساس نتایج این پژوهش می توان نتیجه گیری نمود که، ارقام زیتون نبالی و گوردال در مقایسه با ارقام آربکین، روغنی و فیشمی از نظر فیزیولوژی و مولکولی دارای مقاومت بیشتری در برابر تنش خشکی بودنده اند. بدین ترتیب ملاحظه می شود که با توجه به گسترش روز افزون کم آبی و نیاز شدید کشور به فرآورده های روغنی، استفاده از این ارقام توصیه می گردد. برای دستیابی به اطلاعات بیشتر به انجام پژوهش های مشابهی با سایر ارقام داخلی و خارجی پیشنهاد می گردد.

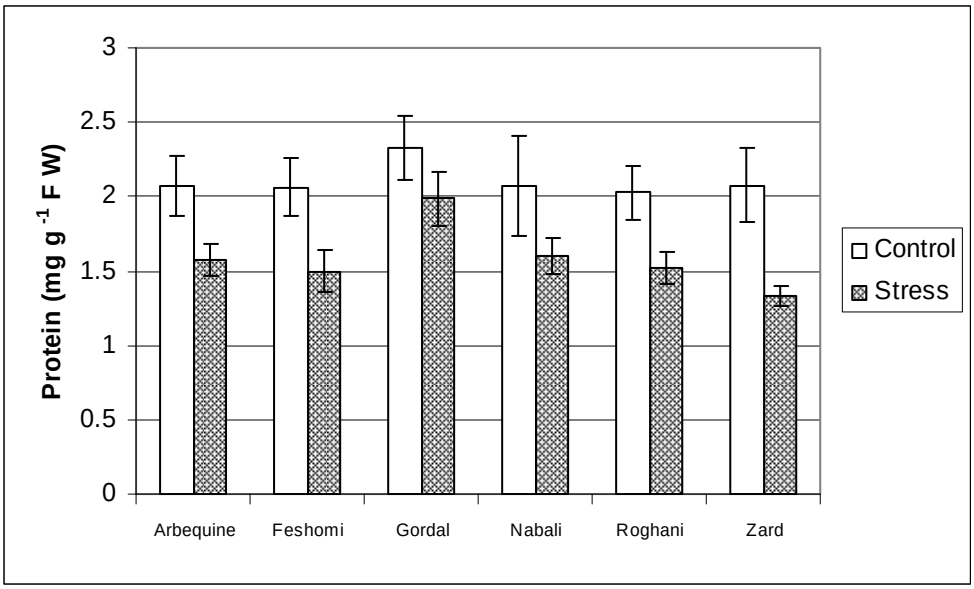
جدول۱- مقایسه میانگین های فاکتورهای پروتئین و آنزیم پراکسیداز شاخص های دیگر با استفاده از آزمون دانکن بر اساس ارقام مختلف زیتون، تیمارهای شاهد و تنش خشکی طی سه مرحله آزمایش متناوب. میانگین های دارای حداقل یک حرف مشترک فاقد تفاوت معنی دار در سطح ۱٪ می باشد.

رقـــم	پروتئین ($mg\ g^{-1}$ F W)	آنزیم پراکسیداز uM H2o2 dec./ min/mg Pro	بتائین (Micro mol g^{-1}DW)	کلروفیل a ($mg\ g^{-1}$ F W)	کلروفیل b ($mg\ g^{-1}$ F W)	کلروفیل کل ($mg\ g^{-1}$ F W)	تعداد روزنه ها mm^2
آربکین	1/96814 b	750/83d	77/079b	0/030333 a	0/0425 ab	0/2672 a	56/24 d
فیشمی	1/69430 b	909/72d	64/124c	0/026166 b	0/0409 ab	0/2326 a	51/85 e
گوردال	1/98435 a	1341/39b	99/259a	0/040778 ab	0/0538 a	0/3572 a	73/48 a
نبالی	1/97125 b	1181/28c	82/966b	0/038944 ab	0/0468 ab	0/2948 a	49/25 e
روغنی	1/64513 b	860/00d	62/336c	0/029278 ab	0/0398 b	0/2557 a	64/47 b
زرد	1/64018 b	1432/22a	85/056b	0/028221 ab	0/0429 ab	0/2872 a	59/18c
زمـــان							
مرحله اول	1/6451 b	1074/61b	77/575b	0/040514 a	0/0428 b	0/3083 b	56/07 ab
مرحله دوم	1/96814 a	1096/61a	80/985a	0/037889 b	0/0723 a	0/3588 a	56/95 a
مرحله سوم	1/98435 a	1068/80b	76/85b	0/026903 c	0/0475 b	0/2616 b	54/74 b
تیمـار							
شاهد	2/09052 a	598/45b	55/598b	0/044157 a	0/0496 a	0/3132 a	53/48 b
تنش	1/64122 b	1561/39a	101/342a	0/03738 a	0/0587 a	0/3339 a	58/36a

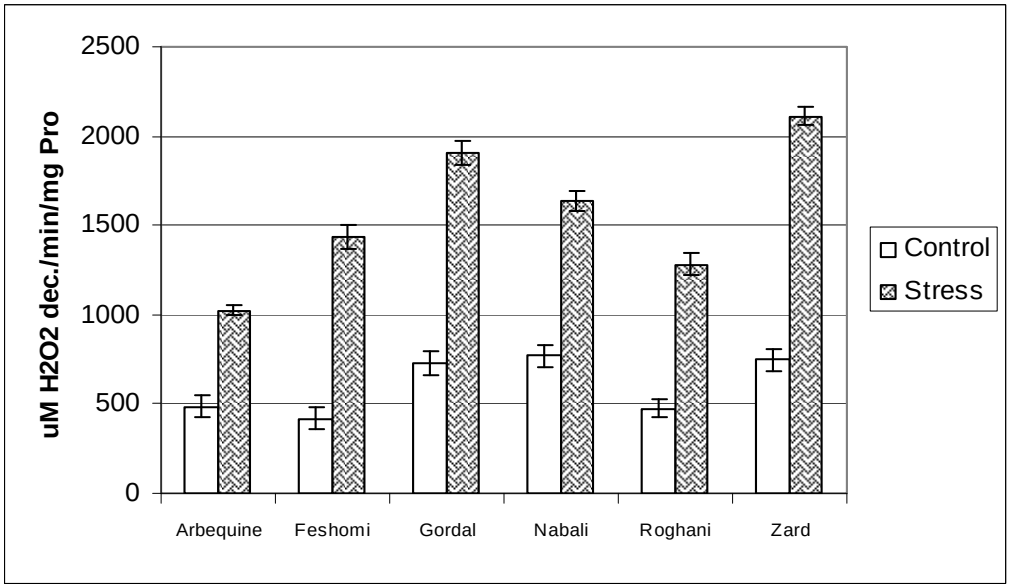
جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس پروتئین و آنزیم پر اکسیداز،.ارقام مختلف زیتون در شرایط تنش خشکی و شاهد طی سه دوره آزمایش متناوب

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات						
		پروتئین	آنزیم پر اکسیداز	بتائین	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	تعداد روزنه
تکرار	2	0/0254 ns	24001/81 ns	80/47076 ns	0003 ns/0	0/0010 ns	0/0319 ns	109/1698 ns
تیمار	1	10/90**	25019706/70**	56496/17**	0025 ns/0	0/0044 ns	0/0231 ns	1931/11**
رقم	5	1/57**	1387063/25**	3469/68**	0011* /0	0/0019*	0/0480 ns	3103/36**
رقم × تیمار	5	0/70**	343604/34**	513/0908 ns	002 **/0	0/0022 ns	0/0743 ns	291/92**
خطا	22	0/0600	9697/56	290/91	0005/0	0/0010	0/0390	35/23373
زمان	2	2/63**	7707/78*	175/5609 ns	01**/0	0/018**	0/36**	134/07*
زمان× رقم	10	0/80**	8852/85**	74/21824 ns	0/0015 ns	0/005*	0/14*	230/44**
زمان × تیمار	2	1/29*	11349/46*	123/3841 ns	0/0015 ns	0/01*	0/1941 ns	106/39*
زمان×رقم× تیمار	10	0/1985 **	81023/09**	27/51681 ns	0/004**	0/011**	0/34**	169/58**
خطا	48	0/1652	578486/63	128/0225	0/0008	0/0022	0/0673	31/86265
CV		6/3156	44/3	14/41914	20/2200	17/0103	17/7406	10/49001

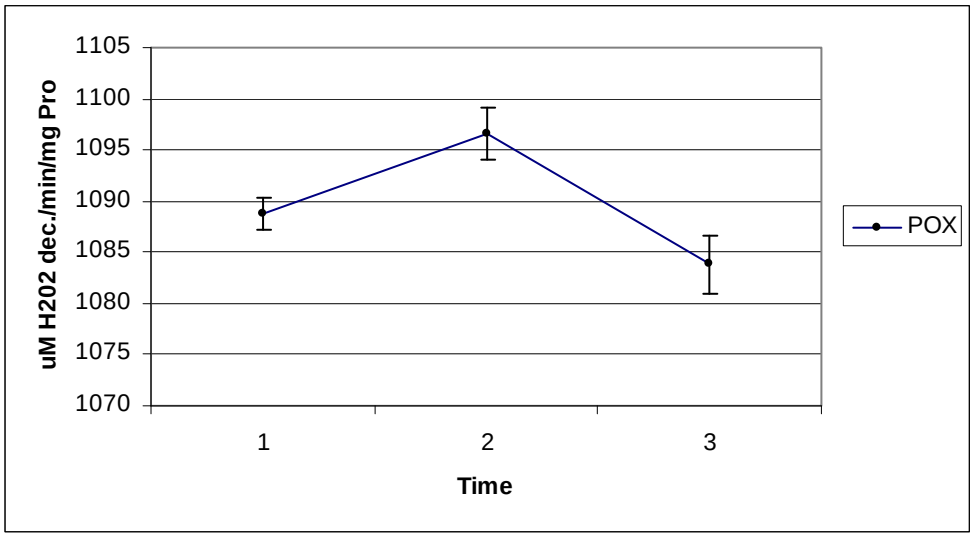
ns و * و ** به ترتیب غیر معنی دار و معنی دار در سطح ۵٪ و ۱٪ می باشند.



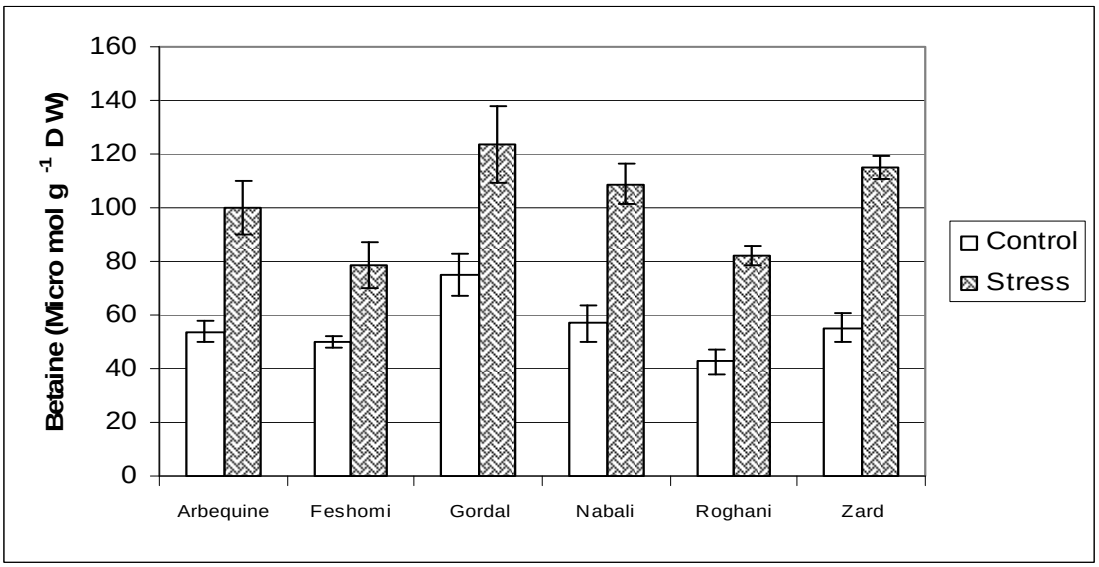
نمودار۱- تغییرات میزان پروتئین محلول کل (میلی گرم در گرم وزن تر برگ) ارقام مختلف زیتون در شرایط تنش خشکی(۱/۵- مگاپاسکال) و شاهد طی سه دوره آزمایش متناوب



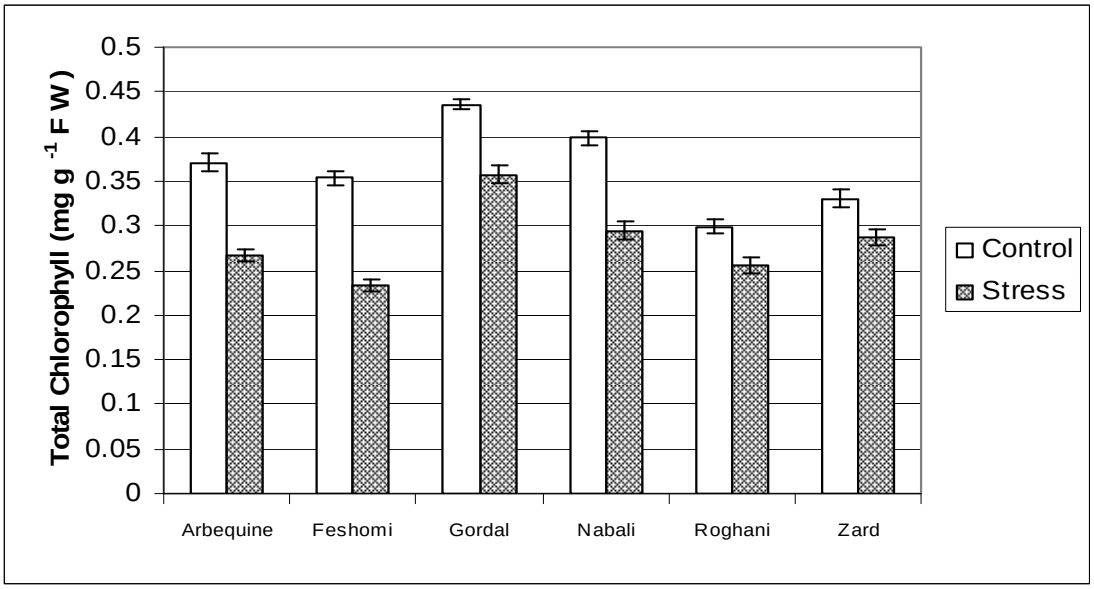
نمودار۲- تغییرات میزان آنزیم پراکسیداز ارقام مختلف زیتون در شرایط تنش خشکی(۱/۵- مگاپاسکال) و شاهد طی سه دوره آزمایش متناوب



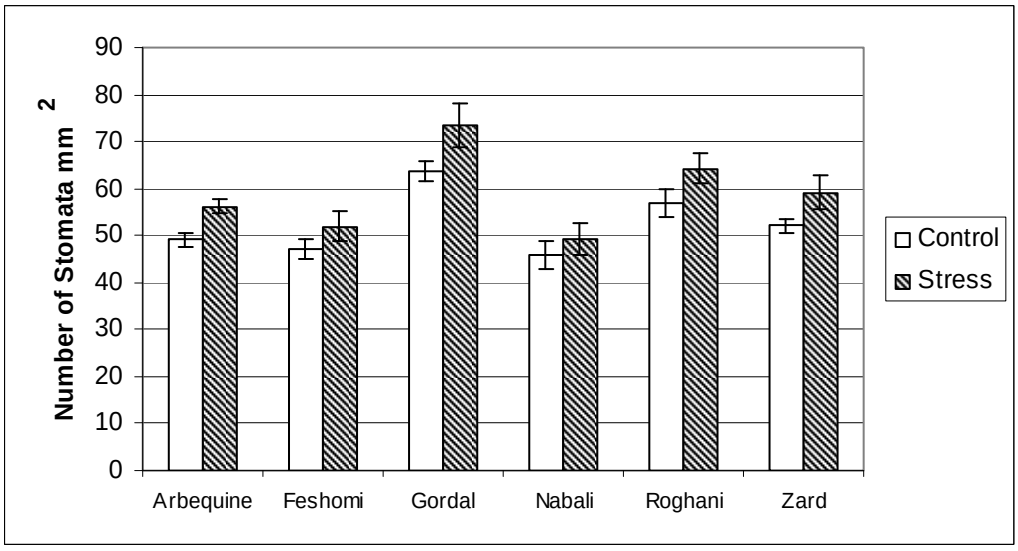
نمودار۳- مقایسه سطوح مختلف زمان بر تغییرات میزان آنزیم پراکسیداز



نمودار٤- تغییرات میزان بتائین (میکرومول در گرم وزن خشک برگ) ارقام مختلف زیتون در شرایط تنش خشکی(۱/۵- مگاپاسکال) و شاهد طی سه دوره آزمایش متناوب



نمودار۵- تغییرات مقدار کلروفیل کل (میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ) ارقام مختلف زیتون در شرایط تنش خشکی(۱/۵- مگاپاسکال) و شاهد طی سه دوره آزمایش متناوب



نمودار٦- مقایسه تعداد روزنه‌ها (بر حسب میلی‌متر مربع) در ارقام مختلف زیتون تحت تاثیر تنش خشکی(۱/۵- مگاپاسکال) و شاهد طی سه دوره آزمایش متناوب

منابع

۱- ارجی ع. ۱۳۸۲. اثر تنش خشکی برخصوصیات فیزیولوژیک، ریخت شناسی و بیوشیمیائی برخی از ارقام زیتون. رساله دکتری دانشکده کشاورزی- دانشگاه تربیت مدرس، ۲۱۳ ص.

۲- علیزاده ا. ۱۳۸۱. رابطه آب و خاک و گیاه، چاپ دوم. انتشارات آستان قدس، دانشگاه امام رضا، مشهد، ۳۵۳ ص.

3- Agboma M., Jones M.G.K., Peltone–Sainio P., Rita H., and Pehu E. 1997. Exogenous glycine betaine enhances grain yield of maize, sorghum and wheat grown under two supplementary watering regimes. J. Agron. Crop Sic.

178: 29-37.
4- Arnon D.I. 1975. Physiological principles of dry land crop production. In: Gupta .U.S. (Ed). Physiological aspects of dry land farming. Pp. 3-14. Oxford press.
5- Barak J.A., and Tuma D.J. 1993. Betaine metabolic by product or vital methylating agent. Life Sic. 32: 771-774.
6- Balagure L., Pugnaire F.I., Martinez-Ferri E., Armas C., Valladares F., and Manrique E. 2002. Ecophysiological significance of chlorophyll loss and reduced photochemical efficiency under extreme aridity *Stipa tenacissima* L. Plant and Soil, 240: 343-352.
7- Bosabalidis A.M., and Kofidis G. 2002. Comparative effects of drought stress on leaf anatomy of two olive cultivars. Plant Science. 163: 375-379.
8- Bradford M.M. 1979. Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein dye binding. Annul Biochem, 72: 248–254.
9- Castrillo M., and Turujillo I. 1994. Ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase activity and chlorophyll and protein contents in two cultivars of fresh bean plants under water stress and dewatering. Photosynthtica, 30: 175-181.
10- Chartzoulakis K., Bosabalidis A.M., Patakas A., and Vemmos S. 2000. Effect of water stress on water relation gas exchange and leaf structure of olive tree. Acta Horticulturae. 537: 241-247.
11- Christensen J.H., Bauw G., Welinder K.G., Montagu M.V., and Boerjan W. 1998. Purification and characterization of peroxides correlated with signification in poplar xylem. Plant Physiology. 118: 125-135.
12- Chen T.H.H., and Murata N. 2002. Enhancement of tolerance of a biotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. Current Opinion in Plant Biology, 5: 250-257.
13- Close T.J., Fenton R.D., Yang A., Asghar R., Demanson D.A., Crone D.A., Meyer R., and Moonan F. 1993. Dehydrin: the protein. In: Close T. J. and Bray, F. A. Eds., Responses of plants to cellular dehydration during environmental stress. American Society of Plant Physiology, Rikville, M. D,
14- Dellongo O.T., Gonzales G.A., Pastori G.M., and Trippi V.S. 1993. Antioxidant defenses under hyperoxygen and hyperosmotic conditions in leaves of 2 lines maize with differential sensitivity to drought. Plant and Cell Physiology. 34 (7):1023-1028.
15- Dichio B., Nuzzo V., Xiloyannis C., Celano G., and Angelopoulos K. 2000. Drought stress–induced variation of pressure-volume relationships in *Olea europaea L.* cv. 'Coratina'. *ISHS* Acta Horticulturae 449: II International Symposium on Irrigation Horticultural Crops.
16- Egert M., and Tevini M. 2002. Influence of drought on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress in leaves of chives (*Allium schoeenoprasum*). Environmental and Experimental Botany. 48: 43-49.
17- Ennajeh A., Vadel A.M., Khemira H., and Hellali A. 2006. Water deficit in two olive (*Olea europaea L.*) cultivars Meski and Chemlali. Horticultural Science and Biotechnology, Volume 81, Number 1, Pp. 99-104 (6).
18- Gonzalez G.F., and Catalina L. 1983. Importance of nutritional factors for olive flowering and fruiting. Acta Hort., 53: 459.
19- Grieve C.M., and Grattan S.R. 1983. Rapid assay for determination of water soluble quaternary ammonium compounds. Plant Soil, 70: 303-307.
20- Hare P.D., Gress W.A., and Staden V. 1998. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. Plant Cell Environment. 21 (6): 535-550.
21- Hemeda H.M., and Kelin B.P. 1990. Effects of naturally occurring antioxidants on peroxidase activity of vegetables extracts. Journal of food Science. 55: 184-185.
22- Higgs K.H., and Jones H.G. 1990. Response of apple rootstocks to irrigation in south–east England. Journal of Horticultural Science, 65: 129-141.
23- Iturriaga G., Gaff D.F., and Zentella R. 2000. New desiccation tolerant plants, including grass, in the central high–lands of Mexico, accumulate trehalose. Australian Journal of Botany. 48: 153–158.
24- Iuchi S., KobaYashi S., Yamaguchi–Shinozaki K., and Shinozaki K. 2000. A stress-inducible gene for 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase involved in abscisic acid biosynthesis under water stress in drought–tolerant cowpea. *Plant Physiology*. 123: 553–562.
25- Kulshreshtha S., Mishra D.P., and Gupta R.K. 1987. Changes in contents of chlorophyll, proteins and lipids in whole chloroplasts and chloroplast membrane fractions at different leaf water potentials in drought resistant and sensitive genotype of wheat. Photosynthetic 21: 65-70.
26- Lima A.L.S., Damatta F.M., Pinheiro H.A., Totola M.R., and Loureio M.E. 2002. Photochemical responses and oxidative, stress in two clones of coffcanephora under water deficit conditions. Environmental and Experimental Botany. 47: 239-247.
27- Lawlor D.W., and Cornic G. 2002. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plant. *Plant,* Cell and Environment. 25: 275-294.
28- Meidner H. 1984. Class experimental in plant physiology. British Library Cataloguing in Publication Pata, London.
29- Nakano Y., and Asada K. 1987. Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplast: in inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. Plant Cell Physiology. 28: 131-140.

30- Parry M.A.J., Androjc J., Khan S., Lea P.J., and Keys A.J. 2002. Rubisco activity: Effects of drought stress. *Annals of Botany*. 89: 833-839.
31- Paschal P.J., and Zengerke K.H. 1997. Irrigation scheduling of vegetables to increase the affectivity of the use of water in respect to ecological aspects using lettuce in open field conditions as an example. Acta Horticulturae. 446: 289-295.
32- Rieger M. 1995. Offsetting effects of reduced root hydraulic conductivity and osmotic adjustment following drought. Tree Physiology. 15: 379-385.
33- Salisbury F.B., and Ross G.W. 1992. Plant Physiology.4th ed. Wadsworth Pub.Co, Belmont, California.
34- Selote D.S., and Khanna-Chopra R. 2004. Drought-induced spiked sterility is associated with and inefficient antioxidant defense in rice panicles. Physiologia Plantarum.121 (3): 462-471.
35- Sharma P., and Dubey R.S. 2005. Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedling. Plant Growth Regulation. 46: 209-221.
36- Sircelj H., Stamper F., Vilhar B., and Grill D. 1999. Effects of drought stress on pigment, ascorbic acids content in leaves of two apple tree cultivars. Phyton-Horn, 93, 3: 97-100.
37- Singh M., Srivastave H., and Kramar A. 1992. Cell membrane stability in relation to drought tolerance in wheat genotypes. J. Agron. and Crop Sci.168: 186-190.
38- Smirnoff N. 1995. Antioxidant systems and plant response to the environment. In: Smirnoff. N. (Ed), Environment and plant metabolism flexibility and acclimation. BIOS Scientific Publishers. Oxford. Pp. 217-243.
39- Vitagliano C., and Sebastiani L. 2002. Physiological and biochemical remarks on environmental stress in olive (*Olea europaea L.*). IV International Symposium on Olive Growing. ISHS Acta Horticulturae 586.
40- Wang Z., and Stutte G.W. 1992. The role of carbohydrate in active osmotic adjustment in apple under water stress. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 117 (5): 816-823.
41- Wang W., Vignani R., Scali M., and Cresti M. 2006. A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis. Electrophoresis, 27: 2782-2786.
42- Xiloyannis C., Dichio B., Nuzzo V., and Celano G. 1999. Defense strategies of olive against water stress. Acta Horticulturae. 474: 423-426.
43- XU D., Duan B., Wang B., Hong B., Ho T.D., and WU R. 1996. Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, HVA1, from barley conferred tolerance to water deficit and salt transgenic rice. Plant Physiology. 110: 249 – 257.
44- Yamaguchi-Shinozaki K., Kasuga M., and Liu Q. 2002.Biological mechanisms of drought stress response. JIRCAS Japan Inter. Res. Center for Agric. Sci., Working Reports Pp: 1-8.
45- Zhang G., Tanakamaru K., Abe J., and Morita S. 2006. Influence of water logging on some anti-oxidative enzymatic activities of two barley genotypes differing in anoxia tolerance. Acta Physiologia Plantarum.29 (2): 171-176.