زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال ششم، شماره نوزدهم، بهار ۱۳۹۳، صفحه ۱-۱۶
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۰۲/۰۷
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۲/۰۷/۰۶
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۲/۰۹/۲۵
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۲/۱۰/۲۱

بررسی تغییرات برخی ترکیبات مؤثره دارویی و فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز در دو رقم زیتون تحت تنش سرما

شیوا رضایی [۱]، منصور افشارمحمدیان [۱]* و داوود بخشی [۲]
[۱] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران
[۲] گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

چکیده

زیتون (*Olea europaea* L.) از گیاهان همیشه سبز و بومی نواحی مدیترانه‌ای است. توسعه زیتون در مناطق سرد با محدودیت روبرو است ، زیرا به ندرت دمای ۱۲- درجه سانتیگراد را تحمل می کند. در سال‌های اخیر به علت افزایش تقاضا برای روغن و میوه زیتون، کاشت این درخت در ایران گسترش یافته است. برای ارزیابی تأثیر تنش سرما بر میزان فنل کل، فعالیت آنتی اکسیدانی و سه ترکیب فنلی الئوروپین، هیدروکسی تیروزول و تیروزول و همچنین فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز در برگ دو رقم زیتون (سویلانا و فرانتوئیو)، نهال‌های یک ساله، در معرض هفت دمای: ۲۰ (دمای شاهد)، ۱۰، ۵، ۰، ۵-، ۱۰-، ۱۵-، ۲۰- درجه سانتیگراد به تدریج به مدت ۱۲ ساعت قرار گرفتند. نتایج این پژوهش نشان داد که اعمال تنش سرمایی سبب افزایش میزان فنل کل، فعالیت آنتی اکسیدانی و میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز شد. البته فعالیت این آنزیم در رقم سویلانا از دمای ۵- و در رقم فرانتوئیو از دمای ۱۰- درجه سانتیگراد رو به کاهش نهاد. غلظت الئوروپین در هر دو رقم طی تنش سرمایی به طور معنی داری افزایش یافت، ولی غلظت هیدروکسی تیروزول و تیروزول در مقایسه با گیاهان شاهد کاهش نشان داد. بر اساس نتایج حاصل از پژوهش حاضر، ارقام فرانتوئیو و سویلانا در برابر تنش سرمایی مقاومت متفاوتی از خود نشان دادند، به طوری که رقم فرانتوئیو مقاوم‌تر از رقم سویلانا بود.

واژه‌های کلیدی: زیتون، آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز، تنش سرمایی، الئوروپین، هیدروکسی تیروزول، تیروزول

مقدمه

زیتون (*Olea europaea* L.) گیاهی سازگار با اقلیم‌های مدیترانه‌ای و شبه مدیترانه‌ای است. همچنین، یکی از محصولات مهم و استراتژیک مهم کشور بوده، از اقلام صادراتی کشاورزی ایران است. هر گونه گیاهی در یک دامنه دمایی ویژه، حداکثر رشد و عملکرد مطلوب را دارد و هر گونه انحراف از آن، به ویژه کاهش دما از حد بحرانی، موجب بروز تنش و کاهش رشد

*نویسنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: afshar@guilan.ac.ir، شماره تماس: ۰۱۳۱۳۲۳۲۸۰۶

رویشی و زایشی می‌شود. بسیاری از گیاهان از جمله زیتون، که بومی آب و هوای گرم هستند، علایم آسیب را زمانی نشان می‌دهند که با دماهای پایین مواجه می‌شوند. رشد و توسعه زیتون در نواحی سرد محدود می‌شود، زیرا به ندرت دمای ۱۲- درجه سانتیگراد را تحمل می کند. به طور معمول، هر ساله در فصل زمستان و اوایل بهار، دما به زیر صفر می‌رسد که به یخ‌زدگی منجر می‌شود. با وجود این، برخی اوقات، دمای هوا به زیر ۷- درجه سانتیگراد می‌رسد که به شدت به گیاه آسیب می رسد، بخش‌های هوایی گیاه می‌میرد، برگ ها می ریزند و شاخه‌ها خشک می‌شود. این رخداد به کاهش محصول زیتون منجر شده، می‌تواند حیات درخت را زمانی که تنش یخ‌زدگی شدید است، به شدت تهدید کند. بنابراین، مطالعه آثار تنش سرما در زندگی گیاه به ویژه در ارتباط با محصولات کشاورزی مهم، حائز اهمیت است.

پژوهش ها نشان داده است که این ترکیبات از طریق گروه‌های هیدروکسیل موجود در ساختار خود، به طور مستقیم، باعث خنثی‌سازی رادیکال های آزاد می‌شوند (Japon-Lujan and Luque de Castro, 2006). فراوان‌ترین ترکیب فنلی در برگ و میوه زیتون، الئوروپین است که مسؤول طعم تلخ میوه زیتون و قهوه‌ای شدن میوه سبز آن است (Malik and Bradford, 2006؛ Soler-Rivas *et al*., 2000). هیدروکسی تیروزول از دیگر ترکیبات فنلی مهم موجود در زیتون است، اما برخلاف الئوروپین مختص تیره زیتون (Oleaceae) نیست (Solar-Rivas *et al*., 2000). هیدروکسی تیروزول نیز از ترکیبات مهم حاصل از هیدرولیز الئوروپین است که ظرفیت جذب رادیکال اکسیژن توسط آن، ده برابر چای سبز است. این ترکیب به ندرت در طبیعت به صورت آزاد یافت می‌شود (Guinda, 2006). گزارش شده است که الئوروپین و دیگر ترکیبات فنلی نظیر: هیدروکسی تیروزول و تیروزول از آنتی اکسیدان هایی هستند که در کاهش خطر بیماری‌های قلبی و چندین نوع سرطان نقش دارند (Wiseman *et al*., 1996؛ Visioli and Galli, 1994؛ Owen *et al*., 2000؛ Tripoli *et al*., 2005). علاوه بر این، این ترکیبات دارای فعالیت ضد ویروسی و ضد میکروبی نیز هستند (Bisingnano *et al*., 1999؛ Uccella, 2001). اگرچه تغییر در سطوح هیدروکسی تیروزول و الئوروپین طی رسیدن میوه زیتون گزارش شده است (Amiot *et al*., 1989)؛ دخالت این ترکیبات در تنش های محیطی کمتر بررسی شده است. علاوه بر روغن و میوه زیتون به عنوان محصولات اصلی، برگ زیتون نیز از محصولات جانبی است که در طب سنتی حایز اهمیت است. پژوهش های اخیر نشان داده است که برگ زیتون می تواند منبعی غنی از ترکیبات فنلی باشد که گستره وسیعی از فعالیت‌های زیستی نظیر: ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی، ضد قارچی، ضد باکتریایی، ضد سرطانی به این ترکیبات نسبت داده می‌شود (Visioli and Galli, 1994). برگ زیتون درمان کننده فشار خون و زخم‌های عفونی است. برگ های زیتون بالاترین میزان فعالیت آنتی اکسیدانی و قدرت گیرندگی رادیکال های آزاد را در بین بخش‌های مختلف درخت زیتون دارند (Visioli and Galli, 1994؛ Gilani *et al*., 2005). فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL, EC 4.3.1.5)، آنزیم اصلی در مسیر فنیل پروپانوئیدی است که در بیوسنتز

مواد فنلی نقش مهمی ایفا می کند. فنل ها با عمل آنتی‌اکسیدانی غیر آنزیمی خود در تنظیم حالت کشسانی دیواره سلولی نقش دارند (Sofo *et al.*, 2005). مشاهده شده است که رویارویی با دماهای پایین باعث تغییر در فعالیت PAL و غلظت فنیل پروپانوئیدها شود (Parra *et al.*, 1990؛ Leyva *et al.*, 1995). این تغییرات عاملی مهم در مقاومت گیاه به دماهای پایین در نظر گرفته شده‌اند (Leyva *et al.*, 1995؛ Solecka and Kacperska, 1995؛ Janas *et al.*, 2000). بررسی‌های اندکی در مورد فعالیت آنزیم PAL در برگ گیاه زیتون تحت تنش سرما وجود دارد. پژوهشی نشان داد که در گیاه زیتون، در تنش‌های سرمایی متوسط و شدید، غلظت الئوروپین افزایش و غلظت هیدروکسی تیروزول کاهش می‌یابد (Ortega-García and Peragón, 2009). همچنین، فعالیت آنزیم های فنیل آلانین آمونیالیاز و محتوای فنل کل برگ زیتون در تنش دمایی زیر ۷- درجه سانتیگراد، در زیتون رقم Picual بررسی و مشاهده شد که میزان فعالیت این آنزیم طی تنش سرما افزایش می‌یابد. Cansev و همکاران (۲۰۰۹) برخی ارقام زیتون را به مدت ۱۲ ساعت در معرض دمای ۴، ۵-، ۱۰- و ۲۰- قرار داده، نشان دادند که فعالیت آنزیمی در گیاهان تنش یافته نسبت به گیاهان شاهد افزایش می‌یابد. در بررسی دیگر توسط Remorini و همکاران (۲۰۰۹) مشخص شود که فنل کل در گیاهان زیتون تحت تنش شوری افزایش می‌یابد. همچنین غلظت دو ترکیب فنلی الئوروپین و هیدروکسی تیروزول در پاسخ به تنش شوری بررسی شد. ترکیبات فنلی در ژنوتیپ‌های مقاوم به سرما نیز بررسی شده است (Eris *et al.*, 2007؛ Bartolozzi *et al.*, 1999).

پژوهش حاضر به منظور بررسی برخی ترکیبات فنلی از قبیل الئوروپین، هیدروکسی تیروزول، تیروزول، فعالیت آنزیم PAL و نیز برخی از شاخص‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی زیتون (*O. europaea*)، ارقام سویلانا و فرانتوئیو در مقابل تنش سرما انجام شد. فرض بر این بود که ممکن است تنش سرمایی شدید سبب تغییر متابولیسم فنیل پروپانوئیدها و در نتیجه تولید برخی ترکیبات دفاعی در برگ شود و گیاه را قادر به محافظت از خود کند. دانش ما درباره فعالیت PAL و ترکیبات فنلی در پاسخ به تنش سرمایی در ارقام مختلف می تواند به انتخاب و کاشت ارقام مقاوم‌تر و در نتیجه در جلوگیری از آسیب‌های وارده به گیاه در شرایط تنش‌زا کمک کند.

مواد و روش‌ها

روش نمونه‌برداری و اعمال تنش: در پژوهش حاضر، تأثیر تنش سرما روی برگ‌های دو رقم زیتون (سویلانا و فرانتوئیو) از طریق فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی در سه تکرار با هفت تیمار دمایی: ۲۰ (شاهد)، ۱۰، ۵، ۰، ۵-، ۱۰-، ۱۵- و ۲۰- درجه سانتیگراد در آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه گیلان بررسی شد. این نحوه اعمال تنش، بر اساس روش Cansev و همکاران (۲۰۰۹) با اندکی تغییرات بود. در این پژوهش، تعداد ۶ نهال یک ساله از هر رقم از ایستگاه تحقیقات زیتون شمال کشور واقع در منطقه رودبار تهیه شد. ابتدا نهال‌ها به مدت دو ماه در شرایط گلخانه با متوسط دمای شب و روز به ترتیب: ۱۴ و ۲۲ درجه سانتیگراد قرار گرفتند. پس از این مدت جهت

اعمال تیمار سرما به اتاقک رشد (test chamber) منتقل شدند و تیمار دمایی به این ترتیب اعمال شد: پس از انتقال نهال ها به اتاقک رشد، ابتدا دما در عرض ۶ ساعت از ۲۰ به ۱۰ درجه سانتیگراد رسید، سپس به مدت ۱۲ ساعت در ۱۰ درجه سانتیگراد باقی ماند؛ پس از آن، دما طی دو ساعت به تدریج به ۵ درجه سانتیگراد کاهش یافت و ۱۲ ساعت نیز در این دما باقی ماند. روند کاهش دما تا رسیدن به دمای ۲۰- درجه سانتیگراد تکرار شد. پس از پایان هر دوره ۱۲ ساعته، از برگ گیاهان نمونه‌برداری شد و نمونه‌ها با نیتروژن مایع شوک فریز شده، بلافاصله به فریزر ۷۰- منتقل و تا زمان انجام آزمایش‌ها در آنجا نگهداری شدند. برگ‌های نمونه‌برداری شده در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد به عنوان شاهد در نظر گرفته شد.

روش عصاره‌گیری و سنجیدن فعالیت آنزیم PAL: برای استخراج و سنجیدن فعالیت آنزیمی از روش Rivero و همکاران (۲۰۰۱) با اندکی تغییرات استفاده شد. ۰/۱ گرم از بافت برگ با نیتروژن مایع خوب ساییده، حجم آن با بافر استخراج پتاسیم فسفات به ۱ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس نمونه‌ها ابتدا به مدت ۱ دقیقه ورتکس و پس از آن به مدت ۳۰ دقیقه (در ۴ درجه سانتیگراد) در دور ۱۴۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. در ادامه، روشناور جدا شد و بار دیگر به مدت ۵ دقیقه در ۱۴۰۰۰ دور سانتریفیوژ انجام شد. سپس، عصاره‌ها به فریزر ۷۰- درجه سانتیگراد برای نگهداری و انجام آزمایش‌های بعدی منتقل شدند. برای سنجش فعالیت آنزیم، در یک میکروتیوب، ۲۰۰ میکرولیتر محلول فنیل آلانین ۰/۱ مولار در بافر پتاسیم فسفات (اسیدیته=۸)، ۱۵۰ میکرولیتر از عصاره پروتئین استخراج شده، ۶۵۰ میکرولیتر پتاسیم فسفات بافر ۰/۱ مولار (اسیدیته=۸) اضافه شد، در حالی که نمونه شاهد شامل تمام ترکیبات به جز پروتئین استخراج شده بود. نمونه‌ها به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد که اوج فعالیت آنزیم PAL است، قرار گرفتند. سپس، ۵۰ میکرولیتر از هیدروکلرید اسید (۶ مولار) برای غیر فعال کردن آنزیم به نمونه‌ها اضافه شد. شستشو در سه مرحله و هر بار با ۱ میلی‌لیتر اتیل استات انجام شد. سپس، نمونه‌ها تا زمان خشک شدن، در دمای آزمایشگاه زیر هود قرار گرفتند و پس از آن به رسوب ۱ میلی لیتر سدیم هیدروکسید ۰/۰۵ مولار اضافه شد و جذب آن در طول موج ۲۹۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر خوانده شد. برای به دست آوردن فعالیت آنزیمی بر حسب واحد آنزیمی، جذب غلظت‌های مختلف سینامیک اسید در طول موج ۲۹۰ نانومتر به دست آمد و منحنی استاندارد سینامیک اسید رسم شد. در نمونه‌های مجهول نیز بر اساس مقادیر جذب حاصل از نمونه‌ها و منحنی استاندارد، مقدار سینامیک اسید تولید شده در مدت یک دقیقه محاسبه شد. از آنجا که یک واحد آنزیم PAL مقداری از آنزیم است که طی یک دقیقه، یک میکرومول محصول را تولید می کند، بنابراین فعالیت آنزیم بر حسب واحد آنزیمی به صورت میکرومول سینامیک اسید بر دقیقه بیان شد.

روش استخراج عصاره‌های فنلی: ابتدا نمونه‌های برگ با آب مقطر شسته و تمیز شدند، سپس برای خشک شدن، به مدت سه روز در آون در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد قرار گرفته، استخراج عصاره برگ طبق روش Bakhshi و Arakawa (۲۰۰۶) انجام شد. بدین منظور، برگ ها کاملاً پودر شد، به ۰/۱ گرم از پودر خشک، ۳

میلی‌لیتر محلول متانول- استیک اسید (با نسبت ۸۵ به ۱۵) اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در یخچال با دمای ۴ درجه سانتیگراد قرار گرفت. پس از سپری شدن این زمان، محلول رویی جدا و معادل حجم آن n- هگزان اضافه شد. پس از ۲ دقیقه ورتکس، فاز رویی که شامل ترکیبات غیر قطبی بود برداشته شد و محلول پایینی که حاوی ترکیبات قطبی بود به مدت ۱۰دقیقه در دور ۵۰۰۰ در دقیقه مجدداً سانتریفوژ شد. سپس محلول رویی از آن جدا و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. از این عصاره برای اندازه‌گیری ترکیبات فنلی (الئوروپین، هیدروکسی تیروزول و تیروزول)، فنل کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها استفاده شد.

سنجش فنل تام: سنجش مقدار فنل کل با روش Singleton و Rossi (۱۹۶۵) انجام شد که نیازمند استفاده از معرف فولین سیوکالتئو (folin-ciocalteu) و استاندارد گالیک اسید است. برای این منظور ۵ میلی‌لیتر محلول واکنش، شامل ۱۲۵ میکرولیتر عصاره مرحله قبل، ۳۷۵ میکرولیتر آب مقطر، ۲/۵ میلی‌لیتر معرف فولین سیوکالتئو ۱۰ درصد و ۲ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۷/۵ درصد تهیه شد. پس از ۳ تا ۵ دقیقه، کربنات سدیم در غیاب نور اضافه شد. در پایان، نمونه‌ها به مدت یک ساعت در تاریکی و در دمای اتاق قرار گرفتند. بلانک نیز به همین ترتیب با ۱۲۵ میکرولیتر حلال متانول- استیک اسید (با نسبت ۸۵ به ۱۵) به جای عصاره آماده شد. سنجش غلظت فنل در نمونه‌ها با روش رنگ‌سنجی و با دستگاه اسپکتروفتومتر انجام شد. جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۶۵ نانومتر خوانده شد.

تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی با استفاده از سنجش پاک‌سازی رادیکال آزاد DPPH: فعالیت آنتی‌اکسیدانی با سنجش پاک‌سازی رادیکال آزاد DPPH (۲ و ۲- دی فنیل-۱- پیکریل هیدرازیل) ارزیابی شد (Kontogiorgis and Hadjipavlou-Litina, 2005). برای این منظور ۵۰ میکرولیتر عصاره به همراه ۹۵۰ میکرولیتر محلول ۰/۱ نرمال در متانول درون میکروتیوپ ریخته شد. شاهد و بلانک نیز به ترتیب با ۱ میلی لیتر محلول ۰/۱ نرمال در متانول و ۱ میلی لیتر حلال استخراج آماده شد. سپس، میکروتیوپ‌ها به خوبی تکان داده شد و به مدت ۳۰ دقیقه در محفظه ای تاریک در دمای اتاق قرار داده شدند. پس از آن، جذب شاهد و نمونه در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. با قرار دادن جذب مربوط به شاهد و نمونه در رابطه ۱ درصد جمع‌آوری ردیکال آزاد به دست آمد.

رابطه ۱: $DPPH_{sc}\%=(A_{cont}-A_{samp})/A_{cont}\times 100$

$DPPH_{sc}\%$= درصد بازدارندگی، A_{cont}= میزان جذب DPPH، A_{samp}= میزان جذب (نمونه + DPPH)

سنجش الئوروپین، هیدروکسی تیروزول و تیروزول با دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (HPLC): برای استخراج ترکیبات فنلی، عصاره‌های تهیه شده به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. پس از آن، حدود ۲۰۰ میکرولیتر از بخش روشناور نمونه ها برداشته شد و از فیلتر سر سرنگی یک بار مصرف با قطر منافذ ۰/۴۵ میکرومتر عبور داده شد.

تعیین غلظت ترکیبات فنلی ذکر شده با HPLC: تعیین اجزای تشکیل‌دهنده مواد فنلی با استفاده از سیستم HPLC (Waters ،Ma و Breeze system USA) مجهز به یک پمپ دوتایی (binary) نوع Waters 1525 و شناساگر (Waters UV-visible Dual λ Absorbance 2487) انجام شد. جداسازی

ترکیبات فنلی در یک ستون symmetry C18 (۴/۶ × ۱۵۰ میلی‌متر با قطر منافذ ۵ میکرومتر، Waters) (Dublin, Ireland با استفاده از دو حلال A (۹۵ درصد آب: ۵ درصد متانول (HPLC grade) و B (۵ درصد آب: ۹۵ درصد متانول) با اسیدیته حدود ۳ انجام شد. برای تنظیم اسیدیته حلال‌ها از استیک اسید استفاده شد. حلال‌ها پیش از استفاده با فیلتر استات سلولز (sartorios) فیلتر می‌شدند. ستون در دمای اتاق نگهداری می‌شد. سرعت جریان فاز متحرک داخل ستون یک میلی لیتر در دقیقه بود. برای اندازه‌گیری مقدار ترکیبات فنلی مورد نظر در عصاره برگی، مقدار ۵۰ میکرولیتر از نمونه‌ها، به دستگاه تزریق شده، شناساگر در طول موج ۲۸۰ نانومتر تنظیم شد. سپس، با توجه به کروماتوگرام‌های استاندارد الئوروپین، هیدروکسی تیروزول و تیروزول، غلظت این ترکیبات بر حسب میکروگرم در یک گرم بافت خشک محاسبه شد. تمامی اندازه‌گیری‌ها در سه تکرار انجام شد.

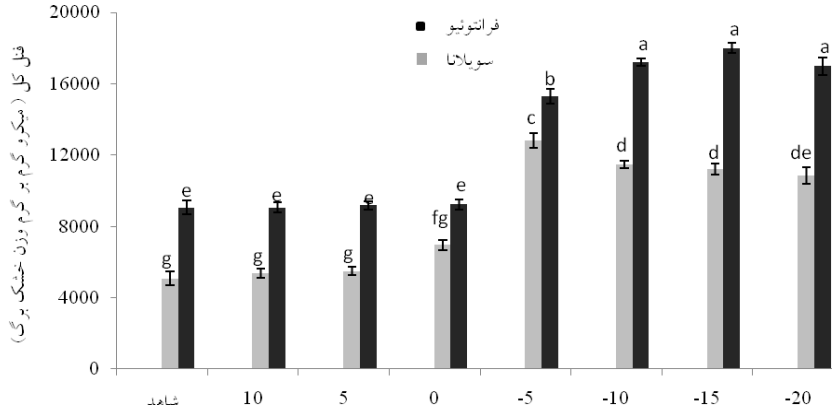
تحلیل آماری: داده‌های با استفاده از آزمون‌های فاکتوریل با چهار رقم و هشت سطح تیمار دمایی، در قالب طرح کاملاً تصادفی و در سه تکرار بررسی شد. در آنالیز واریانس و مقایسه میانگین‌ها، آثار متقابل عوامل از طریق آزمون دانکن در نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ بررسی شد. نمودارها در نرم‌افزار Excel رسم شدند.

نتایج

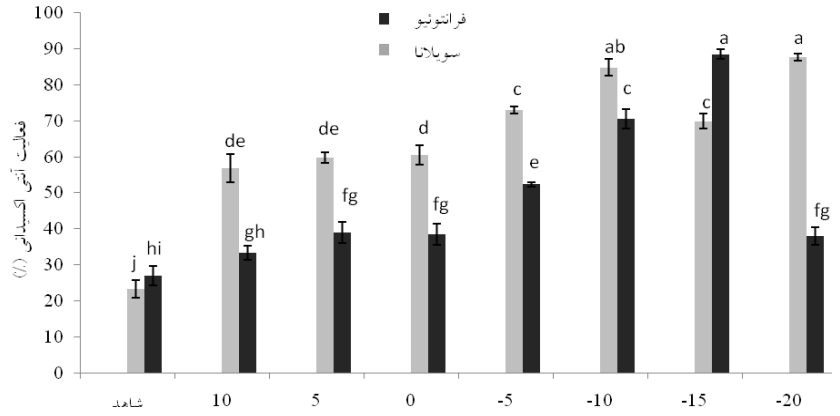
اثر تنش سرمایی بر میزان فنل کل: اعمال تیمار سرما سبب افزایش میزان فنل کل برگ های زیتون شد. بیشترین افزایش در میزان فنل کل در عصاره برگ رقم فرانتوئیو مشاهده شد (شکل ۱). در رقم سویلانا تیمار سرما سبب افزایش محتوای فنل کل شد، ولی این افزایش در مقایسه با رقم فرانتوئیو کمتر بود. بیشترین میزان فنل کل در رقم فرانتوئیو و سویلانا به ترتیب: در دماهای ۱۰- و ۵- دیده شد و کاهش بیشتر دما اثر معنی داری نداشت. کمترین میزان فنل کل در دماهای بالاتر از صفر در رقم سویلانا دیده شد.

اثر تنش سرمایی بر فعالیت پاک‌سازی رادیکال آزاد DPPH: درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی در عصاره برگ ارقام سویلانا و فرانتوئیو بررسی شد. سنجش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در دو رقم مورد مطالعه نتایج متفاوتی را به همراه داشت. تنش سرمایی سبب افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره برگ‌های زیتون شد (شکل ۲). در دمای ۲۰- سانتیگراد فعالیت آنتی‌اکسیدانی رقم فرانتوئیو به طور ناگهانی کاهش یافت.

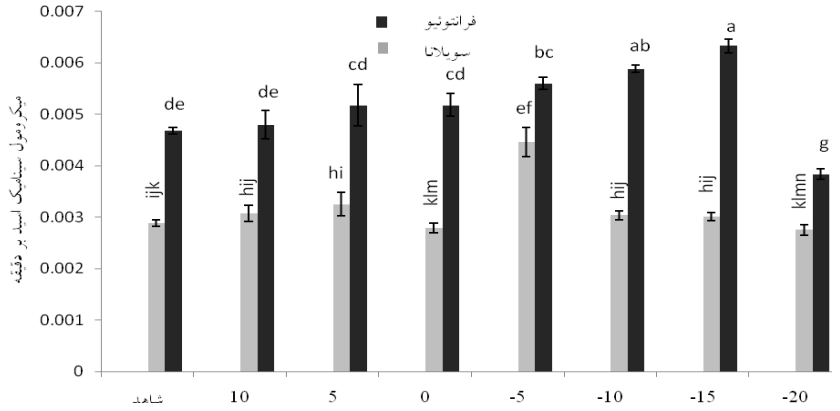
اثر تنش سرمایی بر میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL): نتایج حاصل از تحلیل داده‌ها نشان داد که فعالیت آنزیم PAL در تمامی تیمارهای اعمال شده، در رقم فرانتوئیو نسبت به سویلانا بیشتر بود. در رقم سویلانا، کاهش دما سبب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم تا دمای ۵- درجه سانتیگراد شد و پس از آن میزان فعالیت کاهش یافت ولی در رقم فرانتوئیو تا دمای ۱۵- درجه سانتیگراد میزان فعالیت این آنزیم افزایش یافت (شکل ۳). فرانتوئیو بیشترین فعالیت آنزیم PAL را در حالت شاهد (شرایط بدون تنش) از خود نشان داد که این فعالیت با اعمال تیمار سرما تقریباً حفظ شد. با اعمال تیمارهای دمایی مختلف، حداکثر فعالیت آنزیم PAL در رقم سویلانا در دمای ۵- و در رقم فرانتوئیو در دماهای ۱۰- و ۱۵- درجه سانتیگراد مشاهده شد.



شکل ۱- اثر متقابل تیمارهای دمایی مختلف بر میزان فنل کل برگ دو رقم زیتون. مقادیر، میانگین ۳ تکرار ±SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح P<0.01 است.



شکل ۲- اثر متقابل تیمارهای دمایی مختلف بر میزان فعالیت آنتی اکسیدانی برگ دو رقم زیتون. مقادیر، میانگین ۳ تکرار ±SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح P<0.01 است.



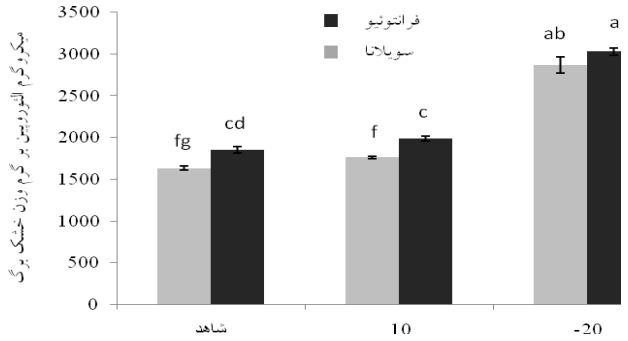
شکل ۳- اثر متقابل تیمارهای دمایی مختلف بر میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) مربوط به برگ دو رقم زیتون. مقادیر، میانگین ۳ تکرار ±SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح P<0.01 است.

اثر تنش سرما بر میزان الئوروپین، هیدروکسی تیروزول و تیروزول: برای سنجش تغییرات، مقادیر سه ترکیب فنلی مهم موجود در برگ زیتون شامل الئوروپین، هیدروکسی تیروزول و تیروزول، تحت تنش سرما از نمونه‌های برگ به دست آمده از دماهای: ۱۰، ۲۰- و ۲۰ درجه سانتیگراد (شاهد) استفاده شد.

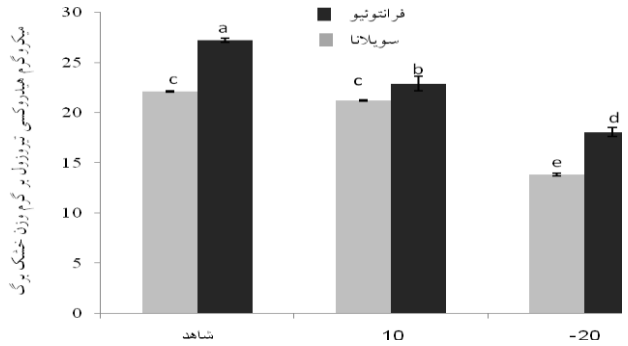
مقدار الئوروپین: میزان الئوروپین در اثر کاهش دما تا دمای ۱۰ درجه سانتیگراد افزایش یافت ولی این افزایش معنی‌دار نبود. ولی تنش سرمایی ۲۰-، سبب افزایش معنی‌دار میزان الئوروپین در هر دو رقم شد. رقم فرانتوئیو در دمای ۲۰- دارای بیشترین مقدار الئوروپین بود (شکل ۴).

مقدار هیدروکسی تیروزول: بررسی تغییرات مقدار هیدروکسی تیروزول نشان داد که تنش سرمایی در رقم فرانتوئیو سبب کاهش معنی‌دار مقدار این ترکیب در برگ، نسبت به برگ گیاهان شاهد شد (شکل ۵). در رقم سویلانا کاهش دما تا ۱۰ درجه سانتیگراد، تغییر معنی‌داری در مقدار هیدروکسی تیروزول حاصل نکرد، ولی تنش سرمایی ۲۰- باعث کاهش معنی‌دار این ترکیب در رقم سویلانا شد.

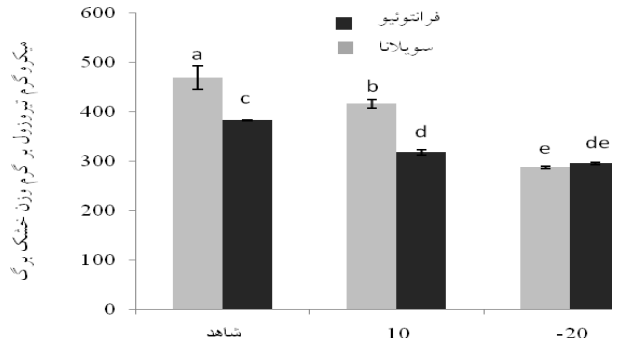
مقدار تیروزول: بررسی تغییرات مقدار تیروزول نیز نشان داد که تنش سرما سبب کاهش معنی‌دار مقدار این ترکیب در برگ هر دو رقم تحت آزمایش نسبت به گیاهان شاهد شد (شکل ۶)، اما در رقم فرانتوئیو این روند کاهشی از دمای ۱۰ تا ۲۰- معنی‌دار نبود.



شکل ۴- اثر متقابل تیمارهای دمایی مختلف بر میزان الئوروپین برگ دو رقم زیتون. مقادیر، میانگین ۳ تکرار ±SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح P<0.01 است.



شکل ۵- اثر متقابل تیمارهای دمایی مختلف بر میزان هیدروکسی تیروزول برگ دو رقم زیتون. مقادیر، میانگین ۳ تکرار ±SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح P<0.01 است.



شکل ۶- اثر متقابل تیمارهای دمایی مختلف بر میزان تیروزول برگ دو رقم زیتون. مقادیر، میانگین ۳ تکرار ±SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح P<0.01 است.

بحث

اثر تنش سرمایی بر میزان فنل کل: کاهش دما به عنوان یک تنش سبب ایجاد رادیکال‌های آزاد و آسیب به غشای سلولی شده، موجب افزایش ترکیبات فنلی به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های اساسی در گیاه زیتون شد. بیشترین میزان فنل کل در رقم فرانتوئیو و سویلانا به ترتیب در دماهای ۱۰- و ۵- درجه سانتیگراد دیده شد و کاهش بیشتر دما اثر معنی‌داری نداشت. کمترین میزان فنل کل در دماهای بالای صفر در رقم سویلانا دیده شد. در نتایج پژوهش حاضر، رقم فرانتوئیو، با مقدار ۰/۱۵ ± ۱۸ (میلی‌گرم بر گرم وزن خشک برگ)، بیشترین میزان فنل کل را به خود اختصاص داد. Ortega-García و Peragón (۲۰۰۹) با بررسی میزان فنل کل در برگ‌های زیتون رقم Picual تحت تنش سرما، مقدار ۱/۷۷ ± ۵۸/۹۱ (میلی‌گرم بر گرم وزن تر) را ثبت کردند. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که ترکیبات فنلی در ارقام مختلف زیتون، درصد قابل توجهی از وزن برگ را به خود اختصاص می‌دهد. ترکیبات فنلی رایج‌ترین و وسیع‌ترین گروه از ترکیبات دفاعی بررسی شده در گیاهان هستند. این ترکیبات طی مسیری که به مسیر فنیل پروپانوئید معروف است سنتز می‌شوند. برخی از این متابولیت‌های ثانویه مانند پلی فنل‌ها، دارای ساختمان شیمیایی مناسب برای پاک کردن رادیکال‌های آزاد فعال و عمل به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های گیاهی هستند (Joyce *et al*., 2005). در پژوهش حاضر، در همه تیمارهای دمایی، بیشترین میزان فنل کل مربوط به عصارهبرگ رقم فرانتوئیو بود. همچنین، با اعمال تیمار سرمایی، میزان فنل کل در هر دو رقم، ابتدا بدون تغییر و سپس با افزایش همراه بود که این افزایش در رقم فرانتوئیو نسبت به رقم سویلانا بیشتر بود. در پاسخ به تنش سرمایی، برگ‌ها سطوح بالاتر فنل کل را نشان دادند. تنش‌های محیطی نظیر تنش سرما ممکن است رشد گیاه را محدود کند. در چنین شرایطی، ترکیبات فنلی بیشتری تولید می‌شود (Briante *et al*., 2003). از سوی دیگر، می‌توان چنین در نظر گرفت که گیاهان تحت تنش، مکانیسم‌های دفاعی خاصی از قبیل افزایش غلظت فنل کل و پروتئین محلول در برابر تنش اکسیداتیو به کار می‌گیرند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنلی عمدتاً ناشی از ویژگی اکسیداسیون-احیای آنهاست که می‌تواند نقش مهمی

در جذب و خنثی کردن رادیکال‌های آزاد داشته باشند (Joyce *et al*., 2005). بنابراین، افزایش محتوای فنل کل برگ گیاهان زیتون تحت تنش سرما، نشان دهنده این است که ترکیبات فنلی ممکن است به عنوان بخشی از سیستم آنتی‌اکسیدانی برای جمع‌آوری ROS عمل کنند. با وجود القای سنتز ترکیبات فنلی در تیمار سرمایی، تنش‌های شدید سرما و یخ زدگی می‌تواند اثر منفی روی ویژگی های آنتی‌اکسیدانی گیاهان داشته، باعث کاهش ترکیبات فنلی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی شود (Sidsel *et al*., 2009).

اثر تنش سرمایی بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی: بر اساس سایر پژوهش‌ها، برگ زیتون منبعی غنی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی است. آنتی‌اکسیدان‌ها، ترکیباتی هستند که می‌توانند آغاز یا پیشروی واکنش‌های زنجیره‌ای اکسیداسیون لیپیدها و مولکول‌های دیگر موجود در سایر سلول‌ها را ممانعت کنند (Joyce *et al*., 2005). آنتی‌اکسیدان‌های گیاهی طبیعی شامل ترکیبات فنلی، بتا-کاروتن، ویتامین‌های C و E هستند که در بخش‌های مختلف گیاه، آثار سودمندی در جمع‌آوری ROS دارند. تیمار سرمایی باعث تجمع ترکیبات فنلی و در نتیجه افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌شود. با وجود این، به دلیل تفاوت در ساختار شیمیایی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنلی، ممکن است علیرغم بالا بودن میزان فنل (فنل‌هایی با ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کم)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی اندک باشد (Klimczak *et al*., 2007). تحمل پدیده یخ‌زدگی، با سیستم مؤثر جمع‌آوری ROS (برای مقابله با تنش اکسیداتیو) مرتبط است (Inze and Van Montagu, 1995). در گیاهچه‌های ناسازگار به سرما، آسیب سرمایی تا حدودی ناشی از تشکیل ROS است. در حالی که تحمل سرمایی در گیاهچه‌های سازگار تا اندازه‌ای ناشی از افزایش فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانی است که سلول‌ها را در برابر تجمع ROS حفاظت می‌کند (Pennycooke *et al*., 2005). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که با کاهش دما، درصد احیای رادیکال DPPH افزایش می‌یابد که این خود نشانگر وجود رادیکال‌های آزاد بیشتر و قدرت احیایی آنتی‌اکسیدان‌ها در دماهای پایین‌تر است (شکل ۲). نتایج پژوهش حاضر به وضوح مشخص می‌کند که عصاره‌های برگ زیتون حاوی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی هستند که می‌توانند به طور مؤثر رادیکال‌های آزاد گوناگون را پاک‌سازی کنند. بر اساس آزمون DPPH، در عصاره برگ رقم فرانتوئیو پتانسیل آنتی‌اکسیدانی بالاتر بود که منعکس کننده حساسیت کمتر آن به اکسیداسیون است. نتایج مشابه با این نتیجه توسط Marren و همکاران در سال ۲۰۰۲ گزارش شده است. آنتی‌اکسیدان‌ها نقش مهمی در به تأخیر انداختن یا جلوگیری از اکسیداسیون سوبستراهای سلولی قابل اکسید ایفا می‌کنند (Pennycooke *et al*., 2005). در پژوهشی دیگر، Bartolozzi و همکاران (۱۹۹۹) افت شدید فعالیت‌های بیوشیمیایی حتی در ارقام سازگار زیتون را در دماهای ۱۵- و ۲۰- گزارش کردند. در پژوهش حاضر، در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد فعالیت آنتی‌اکسیدانی رقم فرانتوئیو به طور ناگهانی کاهش یافت. در پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد ایجاد شده طی تنش، هم آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و هم غیر آنزیمی نقش ایفا می‌کنند. ممکن است در رقم فرانتوئیو در دمای ۲۰- به علت کاهش شدید دما، بیشتر آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی

که فعالیت گسترده‌تری دارند، دخالت کرده باشند و نقش غیر آنزیمی‌ها که در پژوهش حاضر مورد نظر است، در این دما کمتر شده باشد. به دلیل تفاوت در ساختار شیمیایی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنلی، ممکن است با وجود بالا بودن میزان فنل (فنل‌های با ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کم)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی اندک باشد. عدم کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در رقم سویلانا در دمای ۲۰- می‌تواند ناشی از تفاوت در نوع و میزان ترکیب فنلی و یا آنزیم آنتی‌اکسیدانی درگیر در تنش (نسبت به رقم فرانتوئیو) باشد.

اثر تنش سرمایی بر فعالیت فنیل آلانین آمونیالیاز: تنش دمایی ناشی از قرارگیری گیاه در معرض دماهای پایین به بیوسنتز فنیل پروپانوئیدهای اختصاصی از قبیل فنلیک اسیدهای متصل به استر منجر می‌شود (Janas *et al*., 2000). همچنین مشاهده شده است که تیمار دماهای پایین می‌تواند سبب تغییر در فعالیت PAL و غلظت فنیل پروپانوئیدها شود (Parra *et al*., 1990؛ Leyva *et al*., 1995). این تغییرات از عوامل مهم در مقاومت گیاه به دماهای پایین در نظر گرفته شده‌اند (Leyva *et al*., 1995؛ Solecka and Kacperska, 1995؛ Janas *et al*., 2000). اغلب مواقع، زمانی که گیاه در معرض تنش‌های غیرزیستی و زیستی نظیر: دمای پایین، دمای بالا، خشکی، نور زیاد و حمله عوامل بیماری‌زا قرار می‌گیرد، فعالیت این مسیر متابولیسمی تشدید می‌شود (Nozzolillo *et al*., 1990؛ Okuda *et al*., 1991). سرما، سبب القای بیان آنزیم‌های PAL در گیاهان مختلف می‌شود (Leyva *et al*., 1995؛ Solecka and Kacperska, 1995).

Cansev و همکاران (۲۰۰۹) برخی ارقام زیتون را به مدت ۱۲ ساعت در معرض دماهای ۴، ۵-، ۱۰- و ۲۰- قرار داده، نشان دادند که فعالیت آنزیمی در گیاهان تنش یافته نسبت به گیاهان شاهد افزایش می‌یابد. در میوه *Fortune maderine* تنش سرما سبب افزایش فعالیت آنزیم PAL شد (Sanchez-Ballesta *et al*., 2000) افزایش فعالیت آنزیم PAL در پاسخ به تنش دمای پایین در گیاه آرابیدوپسیس نیز گزارش شده است (Leyva *et al*., 1995). در مطالعه‌ای دیگر روی برگ‌های زیتون تحت تنش سرمایی مشاهده شد که فعالیت ویژه آنزیم PAL در گیاهان تحت تنش نسبت به گیاهان شاهد به طور معنی‌داری افزایش یافت (Ortega-García and Peragón, 2009). پژوهش حاضر نیز نتایج مشابهی را تأیید کرد. PAL، آنزیم کلیدی در مسیر سنتز ترکیبات فنلی است و افزایش فعالیت آن، سبب افزایش تولید ترکیبات فنلی می‌شود. در نتایج اشاره شد که در رقم فرانتوئیو در دمای ۲۰- ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کاهش یافت و موازی با آن، فعالیت آنزیمی نیز کاهش یافت. این تغییر می‌تواند به دلیل کاهش تولید آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی با خاصیت شدید پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد باشد. همان طور که قبلاً اشاره شد در چنین تنش شدیدی احتمالاً آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نقش خود را بیشتر ایفا کرده‌اند و فعالیت آنزیم PAL و تولید آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی کاهش نشان داده است. از سوی دیگر، دمای ۲۰- تنش سرمایی شدیدی است که می‌تواند سبب تخریب ساختار بیوشیمیایی و ساختمان سوم آنزیم PAL شده باشد. افت فعالیت آنزیم در رقم سویلانا در دمای ۵- انجام گرفت که می‌تواند حساسیت بیشتر این رقم را نشان دهد.

سیستم‌های متعادل کننده ارقام مختلف، در شرایط تنش با یکدیگر متفاوت است. از سوی دیگر، ممکن است ویژگی‌های ذاتی آنزیم‌ها در ارقام مختلف، متفاوت باشد که باعث تفاوت در مقاومت آنها نسبت به تنش‌های دمایی شود.

اثر تنش سرمایی بر غلظت الئوروپین، هیدروکسی تیروزول و تیروزول: برگ‌های زیتون از نظر ترکیبات فنلی بسیار غنی هستند که می‌توان به الئوروپین، ورباسکوزید، لیگستروزید، تیروزول و هیدروکسی تیروزول اشاره کرد که این ترکیبات دارای ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی هستند (Caturla *et al*., 2005). ارزیابی سه ترکیب فنلی مهم الئوروپین، هیدروکسی تیروزول و تیروزول در دماهای ۱۰، ۲۰- و دمای شاهد (۲۰ درجه سانتیگراد) نشان داد که در ارقام تحت آزمایش، اعمال تنش سرمایی سبب افزایش معنی‌دار میزان الئوروپین و کاهش معنی‌دار مقادیر هیدروکسی تیروزول و تیروزول شد (شکل‌های ۴ تا ۶). رقم فرانتوئیو در دمای ۲۰-، بیشترین غلظت الئوروپین را نشان داد. بنابراین، احتمالاً رقم فرانتوئیو مقاومت بیشتری در مقابل تنش سرمایی دارد. در پژوهش حاضر مشاهده شد که غلظت الئوروپین به عنوان یکی دیگر از عوامل بیوشیمیایی پاسخ به تنش سرمایی، در برگ‌های زیتون افزایش یافت. این افزایش گویای آن است که اعمال تنش سرما به گیاه، می‌تواند سبب تشدید سنتز یا کاهش تجزیه الئوروپین در مسیر متابولیکی آن شود. غلظت بالای الئوروپین ممکن است با ویژگی آنتی‌اکسیدانی این ترکیب مرتبط باشد و بنابراین می‌تواند محافظی در برابر آسیب اکسیداتیو ایجاد شده در اثر سرمازدگی باشد. نخستین گزارش از افزایش غلظت الئوروپین طی تنش سرمایی، توسط Ortega-García و Peragón (۲۰۰۹) مطرح شد. آنها گیاه زیتون رقم Picual را تحت تنش سرما قرار دادند و غلظت الئوروپین، هیدروکسی تیروزول و تیروزول را بررسی نمودند. نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر، گزارش مذکور را تأیید می‌کند. در پژوهش حاضر، تغییرات غلظت الئوروپین، هیدروکسی تیروزول و تیروزول طی تنش سرمایی در زیتون، برای نخستین بار در ایران بررسی و گزارش شده است.

جمع‌بندی نهایی

سیستم آنتی‌اکسیدانی غیرآنزیمی سلول‌های گیاهی، حاوی متابولیت‌هایی همچون ترکیبات فنلی مختلف است که ROS را در سطح پایدار ثابت نگه می‌دارد (Pennycooke *et al*., 2005). این تغییر سیستم آنتی‌اکسیدانی نوعی پاسخ دفاعی برای آسیب سلولی ایجاد شده توسط تنش است و نقش مهمی در محدود کردن تولید رادیکال‌های آزاد برای حفاظت از تمامیت غشا ایفا می‌کند (Chen *et al*., 2006). اگرچه این افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی برای حذف همه آثار تخریبی ایجاد شده در سطوح بالای تنش کافی نیست، اما به حفظ رشد گیاه در سطوح پایین‌تر تنش کمک می‌کند (Khan *et al*., 2009). مکانیسم‌های تحمل تنش سرمایی پیچیده است و هماهنگ با ساز و کارهای فیزیولوژیک و بیوشیمیایی دیگر برای حفظ اعمال فیزیولوژیکی طبیعی تحت شرایط سرمایی عمل می‌کنند (Pennycooke *et al*., 2005). اعمال تنش سرمایی در پژوهش حاضر سبب افزایش میزان فنل کل، قدرت خنثی‌کنندگی رادیکال آزاد (DPPH) و میزان فعالیت

آنزیم PAL در مقایسه با گیاهان شاهد شد، البته فعالیت آنزیم PAL در رقم سویلانا از دمای ۵- و در رقم فرانتوئیو از دمای ۱۰- کاهش نشان داد. غلظت الئوروپین در هر دو رقم طی تنش سرمایی، در قیاس با گیاهان شاهد افزایش یافت، از سوی دیگر، غلظت هیدروکسی تیروزول و تیروزول کاهش نشان داد. نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که ارقام فرانتوئیو و سویلانا در برابر تنش سرمایی، مقاومت متفاوتی از خود نشان دادند. در این میان، رقم فرانتوئیو مقاومت بیشتری داشت. همان طور که قبلاً اشاره شد، برگ‌های زیتون به علت داشتن ترکیبات فنلی ارزشمندی مانند الئوروپین، در درمان بسیاری بیماری‌ها حایز اهمیت است و از آنجا که طی تنش سرمایی میزان ترکیب الئوروپین افزایش می‌یابد، می‌توان از برگ‌های گیاهان زیتون آسیب دیده از تنش سرما برای مصارف دارویی استفاده کرد.

سپاسگزاری

نگارندگان از ریاست و کارکنان محترم ایستگاه تحقیقات زیتون شمال کشور واقع در رودبار به خاطر همکاری صمیمانه در تهیه نمونه‌های گیاهی و از دانشگاه گیلان به خاطر حمایت مالی صمیمانه قدردانی می‌نمایند.

منابع

Amiot, M. J., Fleuriet, A. and Macheix, J. J. (1989) Accumulation of oleuropein derivatives during olive maturation. Phytochemistry 28: 67-69.

Bakhshi, D. and Arakawa, O. (2006) Induction of phenolic compounds biosynthesis with light irradiation in the flesh of red and yellow apples. Journal of Applied Horticulture 8(2): 101-104.

Bartolozzi, F., Rocchi, P., Camerini, F. and Fontanazza, G. (1999) Changes of biochemical parameters in olive (*Olea europaea* L.) leaves during an entire vegetative season and their correlation with frost resistance. Acta Horticulturae 474: 435-440.

Bisingnano, G., Tomaino, A., Lo Cascio, R., Crisafi, G., Uccella, N. and Saija, A. (1999) On the *in vitro* antimicrobial activity of oleuropein and hydroxtyrosol. Journal of Pharmacy and Pharmacology 51: 971-974.

Briante, R., Febbraio, F. and Nucci, R. (2003) Antioxidant properties of low molecular weight phenols present in the Mediterranean diet. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51: 6975-6981.

Cansev, A., Gulen, H. and Eris, A. (2009) Cold-hardiness ofolive (*Olea europaea* L.) cultivars in cold-acclimated and non-acclimated stages: seasonal alteration of antioxidative enzymes and dehydrin-like proteins. Journal of Agricultural Science 147: 51-61.

Caturla, N., Pérez-Fons, L., Estepa, A. and Micol, V. (2005) Differential effects of oleuropein, a biophenol from Olea europaea, on anionic and zwiterionic phospholipid model membranes. Chemistry and Physics of Lipids 137: 2-17.

Chen, Y., Zhang, M., Chen, T., Zhang, Y. and An, L. (2006) The relationship between seasonal changes in anti-oxidative system and freezing tolerance in the leaves of evergreen woody plants of Sabina. Botany 72(2): 272-279.

Eris, A., Gulen, H., Barut, E. and Cansev, A. (2007) Annual patterns of total soluble sugarsandproteins related to cold-hardiness in olive (*Olea europaea* L. Gemlik). Journal of Horticultural Science and Biotechnology 82: 597-604.

Gilani, A. H., Khan, A. U., Shah, A. J., Connor, J. and Jabeen, Q. (2005) Blood pressure lowering effect of olive is mediated through calcium channel blockade. International Journal of Food Sciences and Nutrition 56: 613-620.

Guinda, A. (2006) Use of solid residue from the olive industry. Grasas Y Aceites 57(1): 107-115.

Inze, D. and Van Montagu, M. (1995) Oxidative stress in plants. Current Opinion in Biotechnology 6: 153-158.

Janas, K. M., Cvikrova, M., Palagiewicz, A. and Eder, J. (2000) Alterations in phenylpropanoid content in soybean roots during lowtemperature acclimation. Plant Physiology and Biochemistry 38: 587-593.

Japon-Lujan, R. and Luque de Castro, M. D. (2006) Superheated 5. liquid extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. Journal of Chromatography A (1136): 185-191.

Joyce, C., Sam, C. and Cecil, S. (2005) Relationship of cold acclimation, total phenolic content and antioxidant capacity with chilling tolerance in petunia (*Petunia* × *hybrida*). Environmental and Experimental Botany 53(2): 225-232.

Khan, I., Ahmad, A. and Iqbal, M. (2009) Modulation of antioxidant defense system for arsenic detoxification in Indian mustard. Ecotoxicology and Environmental Safety 72: 626-634.

Klimczak, I., Malecka, M., Szlachta, M. and Gliszczynska-Świglo, A. (2007) Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. Journal of Food Composition and Analysis 20: 313-322.

Kontogiorgis, C. and Hadjipavlou-Litina, D. (2005) Synthesis and anti-inflammatory activity of coumarin derivatives. Journal of Medicinal Chemistry 48: 6400-6408.

Leyva, A., Jarillo, A., Salinas, J. and Martinez-Zapater, J. M. (1995) Low temperature induces the accumulation of phenylalanine ammonia lyase and chalcone synthase mRNAs of *Arabidopsis thaliana* in a light-dependent manner. Plant Physiology 108: 39-46.

Malik, N. S. A. and Bradford, J. M. (2006) Changes in oleuropein levels during differentiation and development of floral buds in Arbequina olives. Scientia Horticulturae 110: 274–278.

Nozzolillo, C., Isabelle, P. and Das, G. (1990) Seasonal changes in the phenolic constituents of jack pine seedlings (*Pinus banksiana*) in relation to the purplin phenomenon. Canadian Journal of Botany 68: 2010-2017.

Okuda, T., Masuda, Y., Yamanaka, A. and Sagiska, S. (1991) Abrupt increase in the level of hydrogen peroxide in leaves of winter wheat is caused by cold treatment. Plant Physiology 97: 1265-1267.

Ortega-García, F. and Peragón, J. (2009) The response of phenylalanine ammonia-lyase, polyphenol oxidase and phenols to cold stress in the olive tree (*Olea europaea* L. cv. Picual). Journal of the Science of Food and Agriculture 89: 1565-1573.

Owen, R. W., Giacosa, A., Hull, W. E., Haubner, R., Spiegelhalder, B. and Bartsch, H. (2000) The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. European Journal of Cancer 36: 1235-1247.

Parra, C., Saez, J., Perez, H., Alberdi, M., Delseny, M., Hubert, E. and Meza-Basso, L. (1990) Cold resistance in rapeseed (*Brassica napus*) seedlings. searching biochemical markers of cold-tolerance. Archivos de Biologia Y Medicina Experimentales 23: 187-194.

Pennycooke, J. C., Cox, S. and Stushnoff, C. (2005) Relationship of cold acclimation, total phenolic content and antioxidant capacity with chilling tolerance in petunia (*Petunia* × *hybrida*). Botany 53(2): 225-232.

Rivero, R. M., Ruiz, J. M., García, P. C., Lopez-lefebre, L. R., Sanchez, E. and Romero, L. (2001) Resistance to cold and heat stress. Acculimation of phenolic compoundand watermelon plants. Plant Science 160: 315-321.

Sanchez-Ballesta, M. T., Lafuente, M. T., Zacarias, L. and Granell, A. (2000) Involvement of phenylalanine ammonia-lyase in the response of Fortune mandarin fruits to cold temperature. Physiologia Plantarum 108: 382-389.

Sidsel, F. H., Grethe, I. A., Knut, A. S. and Gunnar, B. B. (2009) Effect of cold storage and harvest date on bioactive compounds in curly kale (*Brassica oleracea* L. var. acephala). Postharvest Biology and Technology 51: 36-42.

Singleton, V. L. and Rossi, J. A. (1965) Colorimetric of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture16: 144-158.

Sofo, A., Dichio, B., Xiloyannis, C. and Masia, A. (2005) Antioxidant defense in olive trees during drought stress: change in activity of some antioxidant enzymes. Functional Plant Biology 32:45-53.

Solecka, D. and Kacperska, A. (1995) Phenylalanine ammonia lyase activity in leaves of winter oilseed rape plants as affected by acclimation of plants to low temperature. Plant Physiology and Biochemistry 33: 585-591.

Soler-Rivas, C., Espin, J. C. and Wichers, H. J. (2000) Oleuropein and related compounds. Journal of the Science of Food and Agriculture 80: 1013-1023.

Tripoli, E., Giammanco, M., Tabacchi, G., Di Majo, D., Giammanco, S. and La Guardia, M. (2005) The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. Nutrition Research Reviews 18: 98-112.

Uccella, N. (2001) Olive biophenols: biomolecular characterization, distribution and phytolexin histochemical localization in the drupes. Trends in Food Science and Technology 11: 315-327.

Visioli, F. and Galli, C. (1994) Oleuropein protects low-density lipoprotein from oxidation. Life Sciences 55: 1965-1971.

Wiseman, S. A., Mathot, J. N. N. J., de Fouw, N. J. and Tijburg, L. B. M. (1996) Dietary non-tocopherol antioxidants present in extra virgin olive oil increase the resistance of low density lipoproteins to oxidation in rabbits. Atherosclerosis 120: 15-23.

An investigation on some medicinal compounds and PAL activity in two olive cultivars under cold stress

Shiva Rezaei [1], Mansour Afshar Mohammadian [1]* and Davood Bakhshi [2]

[1] Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
[2] Department of Horticulture, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

Abstract

Olive (*Olea europaea* L.) is an evergreen tree, traditionally cultivated in the Mediterranean area. Olive tree cultivation is curtailed in cold areas because they can rarely tolerate temperatures at and below -12°C. In recent years, because of high demands for olive oil and its fruit, the cultivation of olive trees has been increased in Iran. To investigate the impact of cold stress on the content of total phenol, antioxidant activity and three major phenolic compounds including oleuropein, hydroxyl tyrosol and tyrosol and also phenylalanine ammonialyase (PAL) activity, one-year old olive cultivars of Sevillana and Frantoio were exposed to low temperatures of 10, 5, 0, -5, -10, -15, -20 and control 20°C for 12 h, gradually. The results indicated that total phenol content, antioxidant activity and PAL activity were increased under cold stress in both investigated cultivars. However, PAL activity in Sevillana showed significant decrease at and below -5°C while in Frantoio cultivar there was significant dwindling blew -10°C. Oleuropein content significantly increased during cold stress but, tyrosol and hydroxy tyrosol content decreased in both cultivars compared with the controls. According to the current results, Frantoio and Sevillana showed different resistance under cold stress, so that Frantoio was more resistant than Sevillana.

Key words: Olive, Phenylalanine ammonialyase enzyme, Cold stress, Oleuropein, Hydroxy tyrosol, Tyrosol

* Corresponding Author: afshar@guilan.ac.ir