Iranian Journal of Horticultural Science
Vol 52, No 1, Spring 2021 (213-224)
DOI: 10.22059/ijhs.2020.290640.1729

علوم باغبانی ایران
دورهٔ ۵۲، شمارهٔ ۱، بهار ۱۴۰۰ (ص ۲۲۴-۲۱۳)

ارزیابی برخی پاسخ های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی هفت رقم تجاری انگور به تنش سرما طی فصل رشد

صمد مرادی حیدرآباد[۱] و احمد ارشادی[۲*]
۱ و ۲. دانشجوی دکتری و دانشیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۷/۲۲ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۲)

چکیده

در این پژوهش تحمل به سرمای هفت رقم تجاری انگور شامل خلیلی، بی‌دانه قرمز، فخری، ریش‌بابا، تامسون سیدلس، یاقوتی و روبی سیدلس طی فصل رشد ارزیابی شد و رابطه بین برخی پاسخ‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی این رقم ها با تحمل به سرما بررسی شد. به همین منظور نهال‌های یک ساله گلدانی این رقم ها در معرض تیمارهای دمایی ۲۵، چهار، صفر و منفی چهار درجه سلسیوس قرار گرفتند. بالاترین تحمل به سرما در منفی چهار درجه سلسیوس مربوط به رقم خلیلی و به دنبال آن فخری و بیدانه قرمز بود و کمترین تحمل در روبی سیدلس و تامسون سیدلس مشاهده شد. بین تحمل به سرمای زمستانه قبلاً گزارش شده برای این رقم ها با تحمل به سرمای منفی چهار درجه سلسیوس طی فصل رشد رابطه قوی، ولی با تحمل به سرمای چهار درجه سلسیوس رابطه نسبتاً ضعیف‌تری وجود داشت. کاهش دما باعث افزایش غلظت کربوهیدرات‌های محلول، پرولین، پروتئین محلول و پراکسید هیدروژن و کاهش کلروفیل و محتوای نسبی آب برگ در همه رقم ها شد. رقم های متحمل به سرما شامل خلیلی، فخری و بی‌دانه قرمز بالاترین محتوای نسبی آب، کربوهیدرات‌های محلول، پروتئین محلول و کلروفیل کل و کمترین غلظت پراکسید هیدروژن و پرولین را داشتند، درحالی‌که بالاترین غلظت پرولین و پراکسید هیدروژن در رقم های حساس روبی سیدلس، تامسون سیدلس و یاقوتی دیده‌شد. بالاترین همبستگی بین پایداری غشاهای سلولی و پاسخ‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی بررسی شده در تیمارهای سرمایی منفی چهار و صفر درجه سلسیوس مشاهده شد که نشان می‌دهد گیاهان پس از کاهش دما تا یک حد بحرانی سیستم محافظتی خود را فعال می‌کنند.

واژه‌های کلیدی: **انگور، پراکسید هیدروژن، تنش سرما، تنظیم‌کننده اسمزی، نشت یونی.**

Evaluation of some physiological and biochemical responses of seven commercial grape cultivars to cold stress during the growing season

Samad Moradi Heidarabad[1] and Ahmad Ershadi[2*]
1, 2. Ph. D. Candidate and Associate Professor, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, of Hamedan, Iran
(Received: Oct. 14, 2019 - Accepted: Jan. 22, 2020)

ABSTRACT

In this research, cold tolerance of seven commercial grape cultivars including 'Khalili', 'Bidaneh Qermez', 'Fakhri', 'Rishbaba', 'Thompson seedless', 'Yaghuti' and 'Ruby seedless' was evaluated. Likewise, the relationships between biochemical and physiological responses of these cultivars with their cold tolerance were studied. For this reason, one-year potted vines were exposed to different temperatures: 25, 4, 0 and -4 ˚C. The highest cold tolerance at -4 ˚C was seen in 'Khalili' followed by 'Fakhri' and 'Bidaneh Qermez', while the lowest tolerance was observed in 'Ruby seedless' and 'Thompson Seedless'. There were strong correlations between, previously reported, freezing tolerance of these cultivars during the winter and their cold tolerance at -4 ˚C; however, weaker relationships with cold tolerance at 4 ˚C were observed. Low-temperature treatments resulted in higher concentrations of soluble carbohydrates, proline, soluble proteins and hydrogen peroxide, but lower total chlorophyll and relative water content in all cultivars. Cold tolerant cultivars: 'Khalili', 'Fakhri' and 'Bidaneh Qermez' contained the highest relative water content, soluble carbohydrates, soluble proteins and total chlorophyll, but the least proline and hydrogen peroxide content. However, the highest proline and hydrogen peroxide was seen in cold-sensitive cultivars, 'Ruby seedless', 'Thompson seedless' and 'Yaghuti'. The highest correlations between cell membrane stability of cultivars and their biochemical and physiological responses were observed at -4 and zero ˚C showing that plants activate their protective systems following temperature decrement down to a critical limit.

Keywords: Cold stress, grape, hydrogen peroxide, ion leakage, osmoregulants.

* Corresponding author E-mail: ershadi@basu.ac.ir

مقدمه

سرمای دیررس بهاره یکی از مشکلات پرورش انگور است که گاهی تا ۹۰ درصد محصول تاکستان‌ها را از بین می‌برد (Fennell, 2004). خطر سرمازدگی برگ‌ها، شاخه‌های سبز و خوشه‌های گل انگور در اوایل فصل رشد در اکثر رقم های تجاری انگور وجود دارد (Ershadi & Taheri, 2013; Winkler *et al*., 1974). انگور از لحاظ سطح کشت و میزان تولید، دومین میوه جهان است (FAO, 2018). اکثر رقم های تجاری انگور حساس به سرما هستند و سرمازدگی می‌تواند باعث کاهش بهره‌وری و کیفیت محصول و حتی بقای گیاه شود (Hamman *et al*., 1996; He & Chao, 1982). دما یکی از عوامل اصلی محیطی است که بر رشد گیاه تأثیر می‌گذارد و بنابراین توزیع منطقه‌ای هر ژنوتیپ خاص را تعیین می‌کند (Ebadi *et al*., 2020; Alberdi & Corcuera, 1991). تحمل به سرما در گیاهان معمولاً شامل ترکیبی از ویژگی‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی است که با انتخاب طبیعی در طی دوره‌های بسیار طولانی توسعه می‌یابد. این ویژگی‌ها اغلب باهم مرتبط هستند و یکی از روش‌های ارزیابی تحمل به سرما بررسی تغییر در مقادیر نسبی ترکیبات بیوشیمیایی خاص است (Keller & Lynn, 2007). قرارگرفتن گیاهان در معرض دماهای پایین منجر به کاهش محتوی آب می‌شود. یکی از رایج‌ترین واکنش‌های گیاهان تحت شرایط تنش، تولید بیش از حد انواع مختلف ترکیبات سازگارکننده آلی است (Serraj & Sinclair, 2002). حلال‌های سازگار با وزن مولکولی کم، ترکیبات بسیار محلولی هستند که اغلب در غلظت‌های نسبتاً بالا غیرسمی هستند. این اسمولیت‌های ارگانیک اغلب شامل کربوهیدرات‌ها (مانند قندها)، اسیدهای آمینه، پروتئین‌های محلول و پرولین هستند (Youssef *et al*., 2003). بنابراین، تغییر در میزان این ترکیبات منجر به سازگاری طبیعی بسیاری از گونه‌های گیاهی به دمای پایین می‌شود (Wang *et al*., 2000; Jahn *et al*., 2010). پرولین اسیدآمینه شناخته‌شده‌ای است که به‌طور گسترده‌ای در گیاهان و به‌طور معمول در مقادیر زیاد در پاسخ به تنش‌های محیطی تجمع می‌یابد (Kishore *et al*., 2005) و علاوه بر نقش آن به‌عنوان یک اسمولیت برای تنظیم پتانسیل آب سلول، باعث تثبیت ساختارهای زیر سلولی (مانند غشاها و اندامک‌ها) و پروتئین‌ها، سم زدایی از گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر و بازسازی بافت‌های سلولی در شرایط تنش می‌شود (Ashraf & Foolad, 2006). بررسی برخی تغییرات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی در گیاهان تحت تأثیر تنش دمایی می‌تواند به‌عنوان معیار مناسبی برای ارزیابی مقاومت به سرما در ارقام انگور استفاده شود (Wang *et al*., 2000; Jahn *et al*., 2010). مقاومت به سرما طی فصل رشد لزوماً ارتباط زیادی با مقاومت به سرمای گیاهان در فصل رکود ندارد. با توجه به اینکه غربال‌گری رقم های انگور بر اساس تحمل به سرما و شناخت مکانیسم‌های درگیر در آن یکی از اولویت‌های مهم برنامه به‌نژادی انگور در مناطق سردسیر است و از طرفی رقم های انگور واکنش متفاوتی به سرما طی فصل رشد دارند، انتخاب رقم های متحمل روشی مناسب برای اجتناب از سرمازدگی بهاره است. ازآنجایی‌که بررسی تحمل به سرما طی فصل رشد در رقم های تجاری انگور ایرانی تاکنون انجام نشده است. بنابراین هدف از این پژوهش بررسی برخی پاسخ های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی هفت رقم تجاری انگور ایرانی و خارجی در پاسخ به سرمای بهاره می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و محل آزمایش

این پژوهش در گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا در بهار سال ۱۳۹۶ انجام گرفت. نهال‌های یک‌ساله انگور از رقم های خلیلی، بی‌دانه قرمز، فخری، ریش‌بابا، تامسون سیدلس، یاقوتی و روبی سیدلس از ایستگاه تحقیقات انگور ملایر تهیه شد و به گلخانه‌های گروه علوم باغبانی انتقال یافت. این نهال‌ها در گلدان‌هایی با حجم هفت لیتر حاوی خاک زراعی، ماسه و کود حیوانی به نسبت ۱:۱:۲ کشت و به‌طور منظم با استفاده از کود کامل فلورال (سیفو، ایتالیا) تغذیه و آبیاری شدند.

اعمال تیمار سرمایی

به‌منظور اعمال تیمارهای دمایی، گیاهان گلدانی از هفت رقم ذکرشده در اتاقک سرما ساز (کیمیا رهاورد،

ایران) در معرض دماهای ۲۵ (شاهد)، چهار، صفر و منفی چهار درجه سلسیوس قرار گرفتند (Ershadi & Taheri, 2013). دمای شروع تیمار سرمادهی بر اساس دمای محیط در روز نمونه‌برداری (در محدوده ۲۵- ۲۰ درجه سلسیوس) انتخاب شده و روند کاهش دمای دو درجه سلسیوس در هر ساعت بود. گیاهان به‌مدت یک ساعت در هر یک از تیمارهای دمایی نگه‌داری شدند و سپس از دستگاه خارج و برای اندازه‌گیری صفات مختلف به آزمایشگاه منتقل شدند. این پژوهش به‌صورت آزمایش فاکتوریل (۴×۷) و در قالب طرح کاملاً تصادفی و در چهار تکرار انجام شد.

کلروفیل کل

برای اندازه‌گیری غلظت کلروفیل از روش Porra (2002) استفاده شد. ابتدا مقدار ۰/۲۵ گرم نمونه برگ تازه در هاون چینی با استفاده از ازت مایع پودر گردید و با ۵ میلی‌لیتر استون ۸۰٪ کاملاً ساییده شد. عصاره حاصل به‌مدت پنج دقیقه با گردش ۱۵۰۰ دور، سانتریفیوژ شد، محلول رویی نگه‌داشته و رسوب آن دور ریخته شد. حجم نهایی عصاره گیاه با استون ۸۰٪ به ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس جذب نمونه‌ها در طول‌موج‌های ۶۴۵ و ۶۶۴ نانومتر به ترتیب برای کلروفیل a و b و کل با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (واریان، امریکا) اندازه‌گیری شد و با استفاده از رابطه‌های زیر غلظت کلروفیل a، b و کل بر اساس میلی‌گرم در لیتر محاسبه گردید:

کلروفیل a = (۱۲/۲۵×A۶۶۴) - (۲/۵۵×A ۶۴۵)

کلروفیل b = (۲۰/۱۳×A۶۴۵) - (۴/۹۱×A۶۶۴)

کلروفیل کل = (۱۷/۷۶×A۶۴۵) + (۷/۳۴×A۶۶۴)

در نهایت غلظت رنگیزه‌ها در نمونه‌های برگ به کمک رابطه زیر و بر حسب میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ محاسبه شد.

$$\text{رنگیزه برگ} = \frac{C_X \times V_e \times D}{W_s \times 1000}$$

(میلی‌گرم در گرم وزن تر)

که در آن، C_x بیانگر غلظت محاسبه‌شده هر رنگیزه در عصاره (میلی‌گرم در لیتر)، V_e حجم کل عصاره (میلی‌لیتر)، D فاکتور رقت، و W_s وزن تر نمونه برگ (گرم) است.

نشت یونی

درصد نشت یونی با روش Lutts *et al.* (1995) اندازه‌گیری شد. ابتدا شش عدد دیسک به قطر یک سانتی‌متر از برگ‌ها تهیه‌شده و در لوله‌های آزمایش حاوی ۴۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر به‌مدت ۲۴ ساعت روی شیکر قرار داده شدند. سپس هدایت الکتریکی اولیه محلول‌ها (EC_1) با استفاده از دستگاه هدایت‌سنج (مدل CC-501 WTW آلمان) قرائت شد. پس از آن لوله‌های آزمایش به‌مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس قرار داده شدند. بعد از خارج‌کردن لوله‌ها از اتوکلاو و هم دما شدن با محیط، هدایت الکتریکی محلول‌ها (EC_2) دوباره قرائت شد. در نهایت درصد نشت یونی برگ با استفاده از فرمول زیر تعیین شد.

$$\text{درصد نشت یونی} = (EC_1/EC_2) \times 100$$

محتوای نسبی آب

محتوای نسبی آب برگ‌ها با استفاده از روش Barr & Weatherly (1962) اندازه‌گیری شد. از هر واحد آزمایشی شش عدد دیسک یک سانتی‌متری از برگ نهال با ترازوی با دقت ۰/۰۰۱گرم توزین گردید (وزن ترFW). سپس نمونه‌ها در لوله‌های آزمایش حاوی ۴۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر قرار گرفته و به‌مدت ۲۴ ساعت در شرایط تاریکی در دمای چهار درجه سلسیوس قرار داده شدند و پس از گرفتن آب سطح برگ‌ها، دوباره توزین گردیدند (وزن اشباعTW). در نهایت برگ‌ها به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۷۲ درجه سلسیوس در آون نگهداری و سپس وزن آنها تعیین شد (وزن خشکDW). درصد رطوبت نسبی برگ با استفاده از معادله ۶ محاسبه شد:

$$\text{محتوای نسبی آب} = (FW\text{-}DW) / (TW\text{-}DW) \times 100$$

کربوهیدرات‌های محلول

استخراج و اندازه‌گیری غلظت کربوهیدرات‌های محلول برگ به روش Dubios *et al.* (1956) انجام شد. ابتدا ۰/۳ گرم از بافت برگ با پنج میلی‌لیتر اتانول ۹۵٪ در هاون چینی ساییده شد. سپس نمونه ساییده شده درون لوله آزمایش ریخته و به‌مدت دو دقیقه به شدت

تکان داده شد. بدین ترتیب، از نمونه‌ها دو فاز جامد و مایع به‌دقت جدا و دوباره به فاز جامد دو بار و هر بار ۵ میلی‌لیتر اتانول ۷۰٪ اضافه و به شدت تکان داده شد تا فاز مایع تفکیک گردید. کل فاز مایع با سرعت ۳۵۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و بخش بالایی آن جدا شد. از عصاره الکلی فوق‌الذکر، مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر جدا و با سه میلی‌لیتر معرف آنترون تازه تهیه شده مخلوط گردید (از واکنش آنترون با قندها در محیط اسیدی رنگ سبز مایل به آبی تولید می‌شود). این محلول ده دقیقه در داخل بن‌ماری ۱۰۰ درجه سلسیوس قرار داده شد تا واکنش رنگ‌گیری انجام شود. پس از خنک‌شدن نمونه‌ها، میزان جذب نور آنها با اسپکتروفتومتر (کری واریان ۱۰۰، آمریکا) در طول‌موج ۶۲۵ نانومتر و با استفاده از آب مقطر به‌عنوان بلانک قرائت شد.

پرولین

تهیه عصاره و اندازه‌گیری پرولین آزاد برگ به روش Bates (1973) انجام شد. برای عصاره‌گیری، ابتدا ۰/۳ گرم از بافت برگ تازه با ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوسالیسیلیک ۳٪ (وزن به حجم) در هاون چینی ساییده شد. سپس نمونه ساییده‌شده درون لوله آزمایش ریخته و به‌مدت دو دقیقه به شدت تکان داده شد. بدین ترتیب، دو فاز جامد و مایع نمونه‌ها به‌دقت تفکیک گردید. فاز مایع با سرعت ۳۵۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و بخش بالایی آن جدا شد. برای اندازه‌گیری غلظت پرولین، مقدار دو میلی‌لیتر از عصاره فوق جدا و داخل لوله آزمایش ریخته شد. ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر به هر یک از نمونه‌ها اضافه و به هم زده شد. به هر نمونه مقدار دو میلی‌لیتر معرف نین‌هیدرین و دو میلی‌لیتر اسید استیک اضافه گردید. پس از طی مراحل فوق، نمونه‌ها به‌مدت ۴۵ دقیقه در داخل بن‌ماری با دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس قرار داده شدند. پس از خنک کردن نمونه‌ها در آب یخ، چهار میلی‌لیتر تولوئن به هر نمونه اضافه و کاملاً تکان داده شد تا پرولین وارد فاز تولوئن گردد. سپس، نمونه‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در تاریکی به حال سکون رها شدند و نهایتاً میزان جذب نور در فاز بالایی نمونه‌ها به‌کمک دستگاه اسپکتروفتومتر (کری واریان ۱۰۰، آمریکا) در طول‌موج ۵۱۵ نانومتر و با استفاده از تولوئن به‌عنوان بلانک تعیین گردید.

پر اکسید هیدروژن

غلظت پراکسیدهیدروژن بر اساس واکنش H_2O_2 با پتاسیم یدید (KI) و با روش Alexieva (2001) انجام شد. در این روش ۰/۱ گرم از بافت تازه برگ در تری کلرو استیک اسید یک درصد سائیده شد. عصاره حاصل به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس به ۵۰۰ میکرو لیتر از محلول رویی ۵۰۰ میکرو لیتر بافر پتاسیم فسفات ۱۰۰میلی مولار (pH=7) و دو میلی‌لیتر یدید پتاسیم یک مولار اضافه شد. مخلوط حاصل به‌مدت یک ساعت در تاریکی در دمای اتاق قرار داده شد و سپس جذب نمونه‌ها در ۳۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

پروتئین‌های محلول

برای اندازه‌گیری پروتئین‌های محلول از روش Bradford (1976) استفاده شد. به این منظور مقدار ۰/۵ گرم بافت تازه برگ به همراه ۶/۲۵ میلی‌لیتر بافر استخراج مخلوط گردید و به‌مدت ۲۴ ساعت در یخچال با دمای چهار درجه سانتی‌گراد قرار داده شد (برای تهیه بافر استخراج ۱۲۱/۱۴ گرم تریس در آب مقطر حل شده و سپس به حجم یک لیتر رسانده شد و توسط اسیدکلریدریک یک نرمال، اسیدیته آن روی ۶/۸ تنظیم گردید). پس از گذشت زمان ۲۴ ساعت، نمونه همراه بافر استخراج به‌مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از فاز رویی برداشته و به آن پنج میلی‌لیتر معرف بیورد اضافه شد (برای تهیه معرف بیورد ۱۰۰ میلی‌گرم کوماس بریلیانت بلوجی ۲۵۰ با ۵۰ میلی‌لیتر اتانول خالص مخلوط گردید و به آن ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید فسفریک خالص اضافه شد و به حجم یک لیتر رسانده شد و از کاغذ صافی عبور داده شد). مخلوط به‌دست آمده به‌مدت چند ثانیه تکان داده شد و جذب نوری نمونه‌ها در طول‌موج ۵۹۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (کری ۱۰۰، واریان

امریکا) قرائت شد. از آلبومین سرم گاوی به عنوان استاندارد استفاده شد. غلظت پروتئین‌های محلول مطابق با رابطه زیر و بر حسب میلی‌گرم در گرم وزن تر تعیین شد:

$$\text{پروتئین‌های محلول} = \frac{\text{حجم عصاره (۶/۲۵ میلی‌لیتر)} \times (A/۱۰۰۰)}{\text{(وزن تر نمونه (۰/۵ گرم)}}$$

A: غلظت در فرمول منحنی استاندارد.

نتایج و بحث

درصد نشت یونی به‌طور معنی‌داری ($P \leq ۰/۰۱$) تحت تأثیر دما، رقم و اثر متقابل دما و رقم بود (جدول ۱). تحت شرایط عدم تنش سرمایی درصد نشت یونی رقم ها متفاوت، اما غیر معنی‌دار بودند. تنش سرما باعث افزایش درصد نشت یونی در تمامی ارقام انگور گردید به‌طوری‌که میانگین آن از ۱۵/۶۴ درصد در شرایط شاهد (۲۵ درجه سلسیوس) به ۴۰/۵۰ درصد در شرایط دمای (منفی چهار درجه سلسیوس) افزایش یافت (جدول ۲). کاهش دما از ۲۵ به چهار درجه سلسیوس باعث افزایش جزیی، ولی غیرمعنی دار درصد نشت یونی در رقم های خلیلی و فخری گردید، در حالی‌که این کاهش دما باعث افزایش چشم‌گیر و معنی‌دار درصد نشت یونی در سایر رقم ها شد (جدول ۳). در تنش سرمای صفر درجه سلسیوس بالاترین مقاومت به سرما مربوط به رقم های خلیلی و فخری و کمترین مقاومت مربوط به روبی سیدلس بود و سایر رقم ها حدواسط این دو رقم بودند (جدول ۳). در شرایط تنش سرمایی منفی چهار درجه سلسیوس رقم خلیلی دارای تحمل بالایی به سرما بود، ولی تحمل رقم فخری تا حدوی کاهش یافت. در این دما کمترین تحمل مربوط به روبی سیدلس، تامسون سیدلس و ریش بابا بود و یاقوتی و بیدانه قرمز حدواسط این دو گروه بودند (جدول ۳).

غشاهای سلولی اولین نواحی هستند که تحت تأثیر آسیب‌های سرمایی قرار می‌گیرند. تنش دمای پایین باعث کاهش سیالیت غشا شده که در کنار پراکسیداسیون چربی‌ها موجب تخریب غشا و در نتیجه افزایش نشت یونی می‌گردد (Campos *et al.*, 2003). غشای سلول در هنگام تنش از حالت انعطاف‌پذیری (مایع-بلور) به یک ساختار (ژل-جامد) تبدیل می‌شود، زیرا چربی‌های غشا (مانند فسفولیپیدها) در یک دمای بحرانی سخت می‌شوند و این تغییر حالت موجب ایجاد شکاف و درزهایی می‌شود که افزایش نشت غشا را به دنبال دارد. این تأثیر فوری بر نفوذ غشا موجب اختلال در موازنه یون و همچنین نشت یون می‌شود. افزایش در نفوذپذیری و نشت یون نشان‌دهنده سرمازدگی و آسیب به غشای سلول است (Saltveit, 2002).

در پژوهشی که روی ۲۵ رقم انگور انجام شد، نتایج نشان داد که تنش سرما موجب تسریع در تخریب غشا و در نتیجه، افزایش نشت یونی می‌شود (Zhang *et al.*, 2012). در مقایسه تحمل به سرمای زمستانه ۱۲ رقم انگور، خلیلی به عنوان متحمل‌ترین رقم گزارش شده که پس از آن رقم فخری قرار داشت. از طرفی رقم روبی سیدلس بالاترین حساسیت را به سرما داشته و رقم های ریش بابا، تامسون سیدلس، بیدانه قرمز و یاقوتی حد واسط بودند (Ershadi *et al.*, 2016). بین رتبه‌بندی این رقم ها از نظر تحمل به سرمای زمستانه (Ershadi *et al.*, 2016) با تحمل آنها به سرمای منفی چهار درجه سلسیوس طی فصل رشد تشابه بالایی وجود داشت، ولی با رتبه‌بندی آنها از نظر تحمل به سرمای چهار درجه سلسیوس شباهت نسبتاً ضعیف‌تری دیده‌شد. به نظر می‌رسد در رقم های متحمل به سرمای انگور حفظ ساختار غشا به دلیل پایداری بیشتر خصوصیات فیزیکی و شیمیایی غشای پلاسمایی و جلوگیری از افزایش پراکسیداسیون لیپیدهای غشا تحت تنش سرما باشد.

درصد محتوای نسبی آب برگ به‌طور معنی‌داری ($P \leq ۰/۰۱$) تحت تأثیر رقم و دما و همچنین اثر متقابل رقم و دما بود (جدول ۱). با کاهش دما، در همه رقم های مورد آزمایش، محتوای نسبی آب برگ کاهش یافت، به‌طوری‌که میانگین آن در شرایط شاهد (۲۵ درجه سلسیوس) از ۹۱/۴۸ درصد به کمترین مقدار خود در شرایط دمای (منفی چهار درجه سلسیوس) ۶۳/۲۰ درصد رسید (جدول ۲). سرعت کاهش محتوای نسبی آب برگ در رقم ها متفاوت بود، به‌طوری که در رقم های

روبی سیدلس و یاقوتی تحت تیمار تنش سرما بیشتر از رقم های خلیلی، بی‌دانه قرمز و فخری بود (جدول ۳). در هنگام تنش سرما گیاه دچار تنش آبی نیز می‌شود که به‌وسیله کاهش هدایت هیدرولیکی ریشه آغاز و با کاهش شدید در پتانسیل آب و آماس برگ ادامه می‌یابد، روزنه‌ها بسته‌شده و کاهش تعرق سبب کاهش هدایت هیدرولیکی ریشه گردیده و در نتیجه تنش آبی ناشی از خسارت سرمازدگی تشدید می‌شود (Joshi *et al*., 2007).

کاهش محتوای نسبی آب سریعترین اثر تنش سرما بر روی گیاهان تلقی می شود. ورود آب از طریق ریشه به دلیل افزایش ویسکوزیته در آب و کاهش سیالیت غشاها تحت تنش سرما کاهش می یابد بنابراین حالت تورژسانس در سلول به تدریج کم شده و سلول ها شروع به کوچک شدن می کنند و با افزایش نشت یونی و مالون دی آلدییید در برگ خسارات سلولی آشکار می شوند (Erdal, 2012). آنچه مسلم است بین پتانسیل آب گیاه و محتوای نسبی آب برگ همبستگی مثبت و بالایی وجود دارد و گیاهانی که در پایان دوره تنش بتوانند محتوای نسبی آب برگ بالاتری را حفظ کنند به لحاظ مقاومت به تنش نیز برتر خواهند بود. کاهش محتوای آب برگ باعث می‌شود که هدایت روزنه‌ای، فتوسنتز و اسیمیلاسیون دی‌اکسیدکربن کاهش پیدا کند (Joshi *et al*., 2007). به نظر می‌رسد بالا بودن محتوای نسبی آب برگ در دماهای پایین در رقم های متحمل انگور می‌تواند ناشی از شکستن مولکول‌های درشت مانند پلی ساکاریدها و تولید قندهای ساده‌تر باشد که منجر به کاهش پتانسیل اسمزی و افزایش محتوای نسبی آب گردد (Erdal, 2012). در پژوهشی که روی نهال‌های هفت رقم انگور تحت تنش سرما انجام شد، نتایج نشان داد که با کاهش تدریجی دما از ۲۰ به صفر درجه سلسیوس محتوای نسبی آب برگ در رقم ها ی حساس بیش از رقم های متحمل به سرما کاهش پیدا کرد (Coa *et al*., 2010).

غلظت کلروفیل کل به‌طور معنی‌داری ($P \leq$۰/۰۱) تحت تأثیر دما بود (جدول ۱). با کاهش دما غلظت کلروفیل برگ در تمامی رقم های انگور مورد آزمایش کاهش یافت. در دمای ۲۵ درجه سلسیوس بیشترین غلظت کلروفیل کل مربوط به رقم خلیلی با ۲/۶۳ میلی‌گرم بر گرم وزن تر و کمترین میزان مربوط به رقم یاقوتی با ۲/۴۱ میلی‌گرم بر گرم وزن تر بود (جدول ۳). واکنش رقم های مختلف به کاهش دما تقریباً روند یکسانی را دنبال می‌کرد با این تفاوت که رقم خلیلی در دمای صفر و منفی چهار درجه سلسیوس با تفاوت معنی‌داری نسبت به رقم های یاقوتی، روبی سیدلس و تامسون سیدلس بالاترین غلظت کلروفیل برگ را داشت (جدول ۳). کاهش میزان کلروفیل در گیاهان تحت تنش دمایی ممکن است با کاهش سنتز، افزایش تخریب و یا هر دو عامل در ارتباط باشد. کاهش سنتز کلروفیل در اثر دما ممکن است در اثر اختلال در آنزیم‌های درگیر در بیوسنتز کلروفیل باشد (Reda & Mandoura, 2011). در دماهای پایین، میزان پراکسیداسیون در غشای کلروپلاست‌ها و تیلاکوئیدها به‌وسیله گونه‌های فعال اکسیژن افزایش یافته و باعث کاهش میزان کلروفیل می‌گردد (Oliveira *et al*., 2009; Navari-Izzo *et al*., 1998). تأثیر سرما بر کاهش میزان کلروفیل در برگ گیاهانی مانند انار (Moradi *et al*., 2016) و انگور (Zhang *et al*., 2012) گزارش شده است.

نتایج یک پژوهش نشان داد که توقف بیوسنتز کلروفیل در ارتباط با اختلال در بیوسنتز ۵-آمینولوولونیک اسید در هر دو شرایط تنش گرما و تنش سرما بود. به‌علاوه بیوسنتز پروتوکلروفیلید در این شرایط نیز کاهش یافت. این نتایج نشان می‌دهد که تنش دمای پایین اثر مضری بر آنزیم‌های درگیر در بیوسنتز کلروفیل دارند. تخریب کلروفیل بسته به گونه گیاهی و مقاومت آن به سرما و دوره و شدت تنش می‌تواند متفاوت باشد (Tewari & Tripathy, 1998). یک همبستگی منفی و معنی دار بین درصد نشت یونی برگ و غلظت کلروفیل کل برگ در تنش‌های سرمایی صفر و منفی چهار درجه سلسیوس مشاهده شد و با افزایش درصد نشت یونی غلظت کلزوفیل کل برگ کاهش یافت (جدول ۴). به نظر می‌رسد رقم های مقاوم انگور نسبت به رقم های حساس با استفاده از مکانیسم دفاعی بهتری، از تولید و اثرات منفی اکسیژن فعال تا حدی جلوگیری کرده و میزان کلروفیل خود را بیشتر حفظ نموده‌اند.

جدول ۱. نتایج تجزیه واریانس اثر تنش سرما و رقم بر نشت یونی، محتوای نسبی آب، کلروفیل کل، پراکسید هیدروژن، پرولین، کربوهیدرات محلول و پروتئین کل انگور طی فصل رشد.

Table 1. Results of variance analysis effect of cold stress and cultivar on ion leakage (EC), relative water content (RWC), total chlorophyll (Total Chl), hydrogen peroxide (H_2O_2), proline (Pro), soluble carbohydrates (SC) and soluble proteins (SP) of grape during growing season.

Source of variation	df	Mean of squares						
		EC	RWC	Total Chl	H_2O_2	Pro	SC	SP
Cultivar	6	392**	385**	0.366**	631197**	9.282**	55.29**	0.0296**
Temperature	3	2196**	2135**	7.163**	7703117**	52.028**	611.50**	0.1617**
Cultivar × temperature	18	44**	157**	0.058*	98151*	1.183*	7.54^{ns}	0.0006^{ns}
Error	56	17	54	0.029	43570	0.654	7.63	0.0018
C.V. (%)		14.51	9.53	7.93	9.32	10.82	9.68	13.61

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

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

جدول ۲. مقایسه میانگین اثر تنش سرما و رقم بر نشت یونی، محتوای آب نسبی، کلروفیل کل، پراکسید هیدروژن، پرولین، کربوهیدرات محلول و پروتئین کل انگور طی فصل رشد.

Table 2. Mean comparison effect of cold stress and cultivar on ion leakage (EC), relative water content (RWC), total chlorophyll (Total Chl), hydrogen peroxide (H_2O_2), proline (Pro), soluble carbohydrates (SC) and soluble proteins (SP) of grape during growing season.

Treatment		EC (%)	RWC (%)	Total Chl (mg/g)	H_2O_2 (µmol/g)	Pro (µmol/g)	SC (mg/g)	SP (mg/g)
Cultivar	Rish Baba	28.81 c[1]	77.07 b	2.17 bc	2246 bc	7.64 bc	27.85 bc	0.300 c
	Khalili	19.26 e	80.15 ab	2.41 a	1902 e	6.17 e	31.45 a	0.399 a
	Red Bidaneh	28.24 c	82.87 ab	2.24 b	2174 cd	7.01 cd	29.59 ab	0.351 b
	Fakhri	24.03d	84.62a	2.28 ab	2006 de	6.74 de	29.72 ab	0.349 b
	Rubi	37.11 a	69.91 c	1.98 d	2542 a	8.72 a	25.81 c	0.274 c
	Thompson seedless	32.62 b	77.17 b	2.04 cd	2376 ab	7.80 b	26.29 c	0.275 c
	Yaghuti	28.40 c	70.48 c	1.93 d	2420 ab	8.19 ab	26.37 c	0.273 c
Temperature (^{0}C)	25	16.47 d	86.49 a	2.84 a	1434 d	5.75 d	22.01 d	0.205 d
	4	24.69 c	82.65 a	2.35 b	2160 c	6.77 c	25.54 c	0.294 c
	0	31.76 b	77.22b	1.93 c	2504b	7.94 b	31.04 b	0.365 b
	-4	40.50 a	63.44 c	1.47 d	2853 a	9.41 a	34.02 a	0.404 a

در هر ستون میانگین هایی با حداقل یک حرف مشترک، تفاوت معنی داری در سطح احتمال ۵ درصد ندارند.

In each column means followed by at least a common letter, are not significantly difference at 5% probability level.

غلظت پراکسیدهیدروژن برگ به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر دما، رقم و همچنین اثر متقابل رقم و دما بود (جدول ۱). تنش سرما باعث افزایش غلظت پراکسیدهیدروژن برگ در تمامی رقم های انگور گردید، به‌طوری‌که میانگین آن در شرایط شاهد (۲۵ درجه سلسیوس) از (۱۴۳۵) میکرو مول بر گرم وزن تر برگ به (۲۸۵۳) میکرو مول بر گرم وزن تر برگ در شرایط دمای منفی چهار درجه سلسیوس افزایش یافت (جدول ۲). به‌طور کلی بالاترین غلظت پراکسید هیدروژن برگ مربوط به رقم روبی سیدلس با ۲۵۴۲ و یاقوتی با ۲۴۲۰ میکرو مول بر گرم وزن تر برگ و کمترین غلظت پراکسید هیدروژن برگ مربوط به رقم خلیلی با ۱۹۰۲ و فخری با ۲۰۰۶ میکرو مول بر گرم وزن تر برگ بوده و رقم های بی‌دانه قرمز، تامسون سیدلس و ریش بابا حد واسط بوده‌اند (جدول ۲). در دمای ۲۵ درجه سلسیوس (شاهد) تفاوت معنی‌داری در غلظت پراکسید هیدروژن در بین رقم ها وجود نداشت، اما رقم روبی سیدلس در دمای منفی چهار درجه سلسیوس بالاترین غلظت پراکسید هیدروژن را دارا بود که البته تفاوت معنی‌داری با رقم های تامسون سیدلس، یاقوتی و ریش بابا نداشت (جدول ۳).

پراکسیدهیدروژن در گیاهان می‌تواند نقش دوگانه‌ای داشته باشد. این مولکول در غلظت بالا سبب خسارت سلولی شده و به بافت‌های گیاهی آسیب می‌رساند، ولی در غلظت پایین به‌عنوان سیگنال می‌تواند مسیرهای دفاعی گیاه را فعال کند (Zhang *et al.*, 2013). تنش سرما باعث افزایش پراکسید هیدروژن در گیاه می‌شود که می‌تواند مکانیسم

آنتی‌اکسیدانی گیاه برای مقابله با سرما را فعال کند. در تحقیق حاضر، تنش سرما سبب افزایش پراکسید هیدروژن در رقم های انگور شد که می‌تواند نقش مهمی در سازگاری گیاه به شرایط تنش داشته باشد. یک رابطه مثبت بین غلظت پراکسید هیدروژن و درصد نشت یونی بافت برگ در دمای صفر، چهار و منفی چهار درجه سلسیوس مشاهده شد و با افزایش غلظت پراکسید هیدروژن در تیمارهای سرمایی درصد نشت یونی و خسارت به غشاهای سلولی افزایش یافت (جدول ۴). غلظتی از پراکسید هیدروژن که نقش سیگنالی و یا تخریبی آن را تعیین می‌کند مشخص نشده است، بنابراین لزوماً افزایش در غلظت پراکسید هیدروژن یک تغییر مثبت برای گیاه در مقابله با تنش محیطی قلمداد نمی شود.

غلظت کربوهیدرات محلول برگ به‌طور معنی‌داری ($P \leq ۰/۰۱$) تحت تأثیر دما و رقم بود، ولی اثر متقابل رقم و دما معنی دار نبود (جدول ۱). در دمای ۲۵ درجه سلسیوس (شرایط عدم تنش) بیشترین غلظت کربوهیدرات محلول برگ مربوط به رقم خلیلی بود که تفاوت معنی‌داری با سایر رقم ها نداشت (جدول ۲). با کاهش دما غلظت کربوهیدرات محلول برگ در تمامی رقم های انگور افزایش پیدا کرد، ولی پاسخ رقم ها به تنش سرما متفاوت بود. فقط در رقم های خلیلی و فخری با کاهش دما از ۲۵ به چهار درجه سلسیوس افزایش معنی‌داری در غلظت کربوهیدرات محلول رخ داد که یکی از مکانیسم‌های مقاومت به سرما در رقم های متحمل به سرما است (جدول ۳). در دمای صفر و منفی چهار درجه سلسیوس رقم خلیلی بالاترین غلظت کربوهیدرات محلول برگ را دارا بود که تفاوت معنی‌داری با رقم های یاقوتی، روبی سیدلس و تامسون سیدلس داشت (جدول ۳). یک همبستگی منفی و معنی‌داری بین غلظت کربوهیدرات محلول برگ و درصد نشت یونی برگ در تیمارهای دمایی چهار، صفر و منفی چهار درجه سلسیوس دیده‌شد و با افزایش غلظت کربوهیدرات محلول درصد نشت یونی برگ‌ها کاهش یافت (جدول ۴).

یکی از ویژگی‌های شناخته‌شده سازگاری به سرما، تجمع متابولیت‌های مختلف در گیاهان است (Lukoseviciute *et al*., 2014). تحت تنش سرما پلی ساکاریدها به قندهای محلول هیدرولیز شده که باعث افزایش پتانسیل اسمزی سیتوپلاسم و کاهش پیوسته نقطه انجماد سیتوپلاسمی می‌شود (Ouellet & Charron, 2013). Olien (1967) گزارش کرد که کربوهیدرات‌های محلول در فضای بین سلولی در تشکیل کریستال‌های یخ دخالت دارند و آسیب مکانیکی مرتبط با یخزدگی را کاهش می‌دهند. وقتی دما کاهش می‌یابد، ابتدا آب فضای بین سلولی یخ میزند و آب درون‌سلولی از سلول‌ها به سمت توده‌های یخ بین سلولی کشیده می‌شود. برای جلوگیری از کاهش آب درون‌سلولی، سلول‌های اندام‌های متحمل به سرمازدگی اقدام به تجمع مواد جامد محلول با وزن مولکولی کم مانند پرولین و کربوهیدرات‌های محلول می‌کنند (Burg & Ferraris, 2008). در واقع سرما موجب تحریک بیان ژن‌هایی می‌شود که رمزنگاری آنزیم‌های مورد نیاز در بیوسنتز این ترکیبات را به عهده دارند (Ouellet & Charron, 2013). گیاهان زمانی که در معرض تنش سرما قرار می‌گیرند سطوح بالاتری از کربوهیدرات های محلول مانند ساکارز، گلوکز، فروکتوز، استاکیوز، رافینوز و مانیتول را در سلول جمع می‌کنند (Kaplan *et al*., 2007). تغییرات غلظت پرولین برگ به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر دما، رقم ($P \leq ۰/۰۱$) و اثر متقابل رقم و دما ($P \leq ۰/۰۵$) بود (جدول ۱). تنش سرما باعث افزایش غلظت پرولین برگ در تمامی رقم های انگور گردید. به‌طور کلی رقم های حساس مانند روبی سیدلس و یاقوتی دارای غلظت‌های بالاتری از پرولین در مقایسه با رقم های متحمل‌تر مانند فخری و خلیلی بودند (جدول ۲). از طرفی رقم های حساس سریع‌تر به کاهش دما حساسیت نشان دادند، به‌طوری‌که کاهش دما از ۲۵ درجه سلسیوس به چهار درجه سلسیوس باعث افزایش معنی‌دار غلظت پرولین در برگ رقم روبی سیدلس شد، ولی در رقم های فخری، خلیلی و بیدانه قرمز فقط وقتی کاهش دما به منفی چهار درجه سلسیوس رسیده غلظت پرولین در برگ‌ها افزایش معنی دار داشت (جدول ۳).

افزایش پرولین در گیاه در هنگام تنش، نوعی

مکانیسم دفاعی است. پرولین از طریق تنظیم اسمزی، جلوگیری از تخریب آنزیم‌ها و جارو کردن رادیکال‌های هیدروکسیل بردباری و تحمل گیاهان را در برابر تنش‌ها افزایش می‌دهد (Dar *et al*., 2016; Baghbanha *et al*., 2007). بین درصد نشت یونی و غلظت پرولین برگ در تیمارهای دمایی چهار، صفر و منفی چهار درجه سلسیوس رابطه مثبت و معنی‌داری مشاهده شد، در حالی‌که این رابطه در شرایط عدم تنش غیر معنی‌دار بود (جدول ۴).

با وجود بررسی‌هایی که دلالت بر رابطه مثبت بین تجمع پرولین با تحمل تنش در بعضی گیاهان دارد، برخی عقیده دارند که افزایش میزان پرولین، حاصل شرایط تنش است نه واکنش سازگاری به تنش (Ashraf & Foolad, 2007). در تعدادی از گیاهان تحت شرایط تنش سرما تا چندین برابر شرایط نرمال، میزان پرولین افزایش می‌یابد (Matysik *et al*., 2002). Soloklui *et al*. (2012) در پژوهشی که روی تحمل به سرمای هفت رقم انار انجام دادند، گزارش کردند رابطه مشخصی بین غلظت پرولین بافت با تحمل به سرما دیده نشد و برخی رقم‌هایی که مقاومت به سرمای زیادی در آنها مشاهده نشد، دارای پرولین نسبتاً بالایی بودند.

جدول ۳. مقایسه میانگین اثر متقابل تنش سرما و رقم بر نشت یونی، محتوای آب نسبی، کلروفیل کل، پراکسید هیدروژن، پرولین، کربوهیدرات محلول و پروتئین کل انگور طی فصل رشد.

Table 3. Mean comparison interaction effect of cold stress and cultivar ion leakage (EC), relative water content (RWC), total chlorophyll (Total Chl), hydrogen peroxide (H_2O_2), proline (Pro), soluble carbohydrates (SC) and soluble proteins (SP) of grape during growing season.

Cultivar	Temperature (^{0}C)	EC (%)	RWC (%)	Total Chl (mg/g)	H_2O_2 (µmol/g)	Pro (µmol/g)	SC (mg/g)	SP (mg/g)
Rish Baba	25	14.94 mn	92.52 ab	2.79 ab	1505 k-m	5.69 k	21.36 l	0.186 mn
	4	23.49 h-l	89.88 a-c	2.43 c-e	2069 h-j	6.76 g-k	24.42 h-l	0.288 i-h
	0	30.72 e-h	64.33 h-j	2.00 g-i	2501 d-g	8.26 d-g	31.40 c-f	0.352 d-g
	-4	46.10 a-c	61.65 ij	1.45 k	2909 bc	9.86 bc	34.23 a-d	0.374 c-e
Khalili	25	10.91 n	90.00 a-c	2.93 a	1474 lm	5.26 k	22.92 J-l	0.270 i-h
	4	18.30 j-n	83.22 a-g	2.56 b-d	1868 jk	5.63 k	29.03 e-h	0.368 c-f
	0	22.53 i-m	77.62 c-f	2.35 d-f	1974 ij	6.39 h-k	34.86 a-d	0.446 a-c
	-4	25.32 g-k	69.72 f-i	1.82 h-j	2289 e-i	7.42 e-i	39.00 a	0.514 a
Red Bidaneh	25	16.52 l-n	95.44 a	2.93 a	1443 lm	6.05 i-k	22.23 kl	0.235 j-n
	4	27.01 f-i	87.54 a-d	2.33 d-f	2127 g-j	6.55 h-k	26.05 g-l	0.324 d-i
	0	33.95 ef	84.33 a-e	2.07 f-h	2429 d-h	7.30 f-j	33.46 b-e	0.404 b-d
	-4	35.47 de	63.77 h-j	1.62 jk	2699 cd	8.15 d-g	36.62 ab	0.440 a-c
Fakhri	25	18.03 k-n	95.74 a	2.83 ab	1364 m	5.66 k	21.34 l	0.230 k-n
	4	20.55i-m	94.08 ab	2.39 d-f	1811 j-l	6.11 i-k	28.02 f-j	0.319 e-i
	0	23.42 h-l	84.33 a-e	2.18 e-g	2281 e-i	6.53 h-k	33.24 b-e	0.385 b-e
	-4	34.15 ef	64.33 h-j	1.73 i-k	2568 c-f	8.66 c-f	36.30 a-c	0.460 ab
Rubi	25	22.51 i-m	83.22 a-f	2.91 a	1543 k-m	5.78 jk	21.65 l	0.156 n
	4	33.67 ef	75.28 d-i	2.29 d-g	2416 d-h	7.69 e-h	23.30 J-l	0.260 i-h
	0	43.10 bc	67.94 g-i	1.62 jk	2909 bc	9.79 bc	27.16 f-k	0.331 d-i
	-4	49.15 ab	53.22 j	1.11 l	3299 a	11.63 a	31.12 d-g	0.346 d-g
Thompson Seedless	25	17.10 l-n	84.33 a-e	2.78 ab	1378 m	5.86 i-k	22.53 kl	0.179 mn
	4	25.98 g-j	84.33 a-e	2.24 d-g	2250 f-i	7.26 f-j	24.15 h-l	0.252 i-m
	0	35.88 de	70.52 e-i	1.71 i-k	2279 b-d	8.64 c-f	28.64 e-i	0.315 e-j
	-4	51.54 a	69.51 f-i	1.43 k	3098 ab	9.63 b-d	29.84 d-g	0.353 d-g
Yaghuti	25	15.28 mn	80.04 b-g	2.71 a-c	1336 m	5.93 i-k	22.08 kl	0.176 mn
	4	23.83 h-l	72.10 e-i	2.25 d-g	2580 c-f	7.42 e-i	23.79 i-l	0.249 i-m
	0	32.71 e-g	68.77 g-i	1.61 jk	2652 c-e	8.90 c-e	28.56 e-i	0.324 d-i
	-4	41.78 cd	61.00 ij	1.14 l	3113 ab	10.50 ab	31.06 d-g	0.342 d-h

در هر ستون میانگین هایی با حداقل یک حرف مشترک، تفاوت معنی داری در سطح احتمال ۵ درصد ندارند.

In each column means followed by at least a common letter, are not significantly difference at 5% probability level.

جدول ۴. همبستگی بین نشت یونی و برخی ویژگی های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی رقم های انگور تحت تاثیر تیمارهای مختلف دمایی طی فصل رشد.

Table 4. Correlatiosn between ion leakage (EC) and some biochemical and physiological characteristics in grapevine cultivars under different temperature treatments during growing season.

Temperature (°C)	SP (mg/g)	SC (mg/g)	Total Chl (mg/g)	Pro (µmol/g)	RWC (%)	H_2O_2 (µmol/g)
25	0.42^{*}	0.07^{ns}	0.10^{ns}	0.03^{ns}	0.15^{ns}	0.05^{ns}
4	-0.58^{**}	-0.41^{*}	-0.37^{ns}	0.70^{**}	-0.39^{ns}	0.44^{*}
0	-0.32^{ns}	-0.62^{**}	-0.72^{**}	0.67^{**}	0.17^{ns}	0.73^{**}
-4	-0.76^{**}	$^{**}-0.67$	-0.68^{**}	0.59^{**}	-0.57^{**}	0.76^{**}

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

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

نتایج نشان داد که دما و رقم اثر معنی‌داری بر غلظت پروتئین کل برگ ($P \leq$ ۰/۰۱) داشت، ولی اثر متقابل آنها غیر معنی‌دار بود (جدول ۱). در گیاهان شاهد بیشترین غلظت پروتئین کل برگ مربوط به رقم خلیلی بود که تفاوت معنی‌داری با رقم های ریش بابا، روبی سیدلس، تامسون سیدلس و یاقوتی داشت (جدول ۲). با کاهش دما غلظت پروتئین کل برگ در تمامی رقم‌های انگور افزایش یافت، به‌طوری‌که میانگین آن در شرایط شاهد (۲۵ درجه سلسیوس) از ۰/۲۰۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ به ۰/۴۰۴ میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ در شرایط دمای (منفی چهار درجه سلسیوس) افزایش یافت (جدول ۲). به‌طور کلی بیشترین غلظت پروتئین کل برگ مربوط به رقم خلیلی با (۰/۳۹۹) میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ مربوط و کمترین غلظت پروتئین کل برگ مربوط به رقم یاقوتی با (۰/۲۷۳) میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ بود (جدول ۲). بالاترین غلظت پروتئین کل برگ مربوط به رقم خلیلی در دمای منفی چهار درجه سلسیوس بود که در این دما تفاوت معنی داری با رقم های فخری و بیدانه قرمز نداشت و کمترین مربوط به رقم روبی سیدلس، تامسون سیدلس، ریش بابا و یاقوتی بود (جدول ۳).

افزایش غلظت پروتئین محلول نیز همانند محتوای کربوهیدرات محلول یکی از صفات سازگاری به تنش سرما محسوب می‌گردد و در کاهش خسارت سرما گیاهی نقش دارد، به‌نحوی‌که با کاهش دما، میزان پروتئین برگ غالباً افزایش می‌یابد که این افزایش مرتبط با افزایش سنتز و یا تجزیه ترکیبات با وزن مولکولی بالا می‌باشد (Kerepesi *et al*., 2004; Vítamvas & perasil, 2008). یک همبستگی منفی و معنی دار بین درصد نشت یونی برگ و غلظت پروتئین محلول برگ در دمای ۲۵، چهار و منفی چهار درجه سلسیوس مشاهده شد که این همبستگی در دمای ۲۵ درجه سلسیوس در سطح ۵ درصد و در دمای چهار و منفی چهار درجه سلسیوس در سطح ۱درصد معنی دار بود (جدول ۴). زمانی که سطح پروتئین‌های محلول افزایش می‌یابد ظرفیت آب باقی‌مانده در پروتوپلاست افزایش و آب آزاد در دسترس کاهش می‌یابد که باعث مقاومت به سرما می‌شود (Stepokus, 1982). Uemura *et al*. (2006) گزارش کردند که پروتئین‌های مرتبط با تحمل سرما مانند دهیدرین‌ها و لیپوکالین‌ها طی قرار گرفتن گیاه در معرض دمای پایین، در غشای پلاسمایی تجمع می‌یابند و به نگه‌داشتن پتانسیل اسمزی بین سیم پلاست و آپوپلاست کمک می‌کنند و با حفظ یکپارچگی غشای سلولی باعث کاهش توسعه تنش اکسیداتیو ناشی از تنش سرما می‌شوند (Ouellet & Charron, 2013). همچنین ژن‌های دخیل در واکنش به سرما، روی پروتئین‌هایی نظیر آنزیم‌های چرخه تنفس، آنزیم‌های دخیل در متابولیسم کربوهیدرات‌ها، چربی‌ها، فنیل پروپانوئیدها و آنتی‌اکسیدان‌ها، چاپرون های مولکولی و پروتئین‌های ضد یخزدگی نقش دارند و از این طریق در مقاومت به سرما نقش دارند (Thomashow, 1999).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این آزمایش نشان داد که دمای بحرانی خسارت سرمازدگی بهاره برای رقم های انگور متفاوت است. رقم های خلیلی، فخری و بی‌دانه قرمز تحمل به سرمای بالاتری نسبت به رقم های ریش بابا، تامسون سیدلس، یاقوتی و روبی سیدلس داشتند. ارتباط نسبتاً قوی بین مقاومت به سرمای زمستانه با تحمل به سرما در این رقم ها طی فصل رشد (سرمای بهاره) به ویژه در منفی چهار درجه سلسیوس مشاهده شد. کاهش دما باعث افزایش غلظت کربوهیدرات‌های محلول، پرولین، پروتئین محلول و پراکسید هیدروژن و کاهش کلروفیل کل و محتوای نسبی آب برگ در همه رقم ها شد. بیشترین پاسخ‌های فیزیولوژیکی مرتبط با تحمل به سرما در تیمارهای سرمایی صفر و منفی چهار درجه سلسیوس مشاهده شد.

REFERENCES

1. Alberdi, M. & Corcuera, L. J. (1991). Cold acclimation in plants. *Phytochemistry 30*, 3177-3184.
2. Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S. & Karanov, E. (2001). The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell & Environment, 24*(12), 1337-1344.
3. Ashraf, M. & Foolad, M. R. (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany, 59*(2), 206-216.

4. Ashraf, M. & Orooj, A. (2006). Salt stress effects on growth, ion accumulation and seed oil concentration in an arid zone traditional medicinal plant ajwain (*Trachyspermum ammi* [L.] Sprague). *Journal of Arid Environments*, *64*(2), 209-220.
5. Baghbanha, M., Fotouhi Qazvini, R., Hatamzadeh, A., & Heidari, M. (2007). Effect of salicylic acid on tolerance to freezing stress in lemon seedlings of Shiraz. *Iranian Journal of Horticulture science*, *3*, 185-198. (in Farsi).
6. Barrs, H. D. & Weatherley, P. E. (1962). A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. *Australian Journal of Biological Sciences*, *15*(3), 413-428.
7. Bates, L. S., Waldren, R. P. & Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, *39*(1), 205-207.
8. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
9. Burg, M. B. & Ferraris, J. D. (2008). Intracellular organic osmolytes: function and regulation. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(12), 7309-7313.
10. Campos, P. S., nia Quartin, V., Chicho Ramalho, J. & Nunes, M. A. (2003). Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of *Coffea* sp. plants. *Journal of Plant Physiology*, *160*(3), 283-292.
11. Cao, J., Chen, B., Wang, L., Mao, J. & Zhao, X. (2010). Cold resistance indexes identification and comprehensive evaluation of grape varieties. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, *30*(11), 2232-2239.
12. Dar, M. I., Naikoo, M. I., Rehman, F., Naushin, F. & Khan, F. A. (2016). Proline accumulation in plants: roles in stress tolerance and plant development. In *Osmolytes and Plants Acclimation to Changing Environment: Emerging Omics Technologies* (pp. 155-166). Springer, New Delhi.
13. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T. & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, *28*(3), 350-356.
14. Ebadi, A., Abbasi Kashani, A., Fattahi Moghadam, M. R., & Shokrpour, M. (2020). Effects of salicylic acid on winter freezing tolerance in grapevine (Vitis vinifera cv. Shahani). *Iranian Journal of Horticultural Science*, *50*(4), 911-933. (in Farsi).
15. Erdal, S. (2012). Androsterone-induced molecular and physiological changes in maize seedlings in response to chilling stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, *57*, 1-7.
16. Ershadi, A., Karimi, R. & Mahdei, K. N. (2016). Freezing tolerance and its relationship with soluble carbohydrates, proline and water content in 12 grapevine cultivars. *Acta Physiologiae Plantarum*, *38*(2), 1-10.
17. Ershadi, A. & Taheri, S. (2013). The effect of salicylic acid on spring frost tolerance in *Vitis vinifera*. *Journal of Crop Improvement*, *15*(2), 135-146 (in Farsi).
18. FAO. (2018) http://www.faostat.fao.org/.
19. Fennell, A. (2004). Freezing tolerance and injury in grapevines. *Journal of Crop Improvement*, 10: 201-235.
20. Hamman, R. A., Dami, I. E., Walsh, T. M. & Stushnoff, C. (1996). Seasonal carbohydrate changes and cold hardiness of Chardonnay and Riesling grapevines. *American Journal of Enology and Viticulture*, *47*(1), 31-36.
21. He, P. C. & Chao, W. J. (1982). The analysis on the cold-resistance of Chinese wild grape resources. *Acta Horticulure. (China)*, *9*, 17-21.
22. John, C., Ferguson, J. M., Tarara, L. J., Mills, G. G., Grove, M. K. (2010). Dynamic thermal time model of cold hardiness for dormant grapevine buds. *Annual Botany*. 49, 4-12.
23. Joshi, S. C., Chandra, S. & Palni, L. M. S. (2007). Differences in photosynthetic characteristics and accumulation of osmoprotectants in saplings of evergreen plants grown inside and outside a glasshouse during the winter season. *Photosynthetica*, *45*(4), 594-600.
24. Kaplan, F., Kopka, J., Sung, D. Y., Zhao, W., Popp, M., Porat, R. & Guy, C. L. (2007). Transcript and metabolite profiling during cold acclimation of *Arabidopsis* reveals an intricate relationship of cold-regulated gene expression with modifications in metabolite content. *Journal of Plant Physiology*, *50*(6), 967-981.
25. Keller, M. & Mills, L. J. (2007). Effect of pruning on recovery and productivity of cold-injured Merlot grapevines. *American Journal of Enology and Viticulture*, *58*(3), 351-357.
26. Kerepesi, I., Bányai-Stefanovits, É. & Galiba, G. (2004). Cold acclimation and abscisic acid induced alterations in carbohydrate content in calli of wheat genotypes differing in frost tolerance. *Journal of Plant Physiology*, *161*(1), 131-133.
27. Kishor, P. K., Sangam, S., Amrutha, R. N., Laxmi, P. S., Naidu, K. R., Rao, K. R. S. S., & Sreenivasulu, N. (2005). Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Current Science*, *88*(3), 424-438.

28. Lukoseviciute, V., Rugienius, R., Baniulis, D., Savickiene, N., Brazaityte, A., Ruzgas, V., Jariene, E., Kupcinskienė, E., Liobikas, J. and Slepetiene, A. (2014). Characterization of cold acclimation and cold hardiness of strawberry in vitro and *in vivo*. (Doctora), Aleksandro Stulginskio Universitetas.
29. Lutts, S., Kinet, J.M. & Bouharmont, J. (1995). Changes in plant response to NaCl during development of rice (*Oryza sativa* L.) varieties differing in salinity resistance. *Journal of Experimental Botany*, *46*(12), 1843-1852.
30. Matysik, J., Alia, Bhalu, B. & Mohanty, P. (2002). Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. *Current Science*, 525-532.
31. Moradi, S., Baninasab, B., Gholami, M. & Ghobadi, C. (2017). Paclobutrazol application enhances antioxidant enzyme activities in pomegranate plants affected by cold stress. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, *92*(1), 65-71.
32. Navari-Izzo, F., Quartacci, M. F., Pinzino, C., Vecchia, F. D. & Sgherri, C. L. (1998). Thylakoid-bound and stromal antioxidative enzymes in wheat treated with excess copper. *Physiologia Plantarum*, *104*(4), 630-638.
33. Olien, C. R. (1967). Preliminary classification of polysaccharide freezing inhibitors 1. *Crop Science*, *7*(2), 156-157.
34. Oliveira, H., Fadini, M. A. M., Venzon, M., Rezende, D., Rezende, F. & Pallini, A. (2009). Evaluation of the predatory mite *Phytoseiulus macropilis* (Acari: Phytoseiidae) as a biological control agent of the two-spotted spider mite on strawberry plants under greenhouse conditions. *Experimental and Applied Acarology*, *47*(4), 275-283.
35. Ouellet, F. & Charron, J. B. (2013). Cold acclimation and freezing tolerance in plants. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, *127*(4), 489-494.
36. Porra, R. J. (2002). The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. *Photosynthesis Research*, 73(1-3), 149-156.
37. Reda, F., & Mandoura, H. M. (2011). Response of enzymes activities, photosynthetic pigments, proline to low or high temperature stressed wheat plant (Triticum aestivum l.) in the presence or absence of exogenous proline or cysteine. *International Journal of Academic Research*, *3*(4), 108-115.
38. Saltveit, M. E. (2002). The rate of ion leakage from chilling-sensitive tissue does not immediately increase upon exposure to chilling temperatures. *Postharvest Biology and Technology*, *26*(3), 295-304.
39. Serraj, R. & Sinclair, T. R. (2002). Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions? *Plant, Cell & Environment*, *25*(2), 333-341.
40. Soloklui, A. A. G., Ershadi, A. & Fallahi, E. (2012). Evaluation of cold hardiness in seven Iranian commercial pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars. *HortScience*, *47*(12), 1821-1825.
41. Stepokus, P. L. (1982). Plant cold hardiness and freezing stress: mechanisms and crop implications. *Academic Press*. 02, 459-474.
42. Tewari, A.K. & Tripathy, B.C. (1998). Temperature-stress-induced impairment of chlorophyll biosynthetic reactions in cucumber and wheat. *Plant Physiology*, *117*(3), 851-858.
43. Thomashow, M.F. (1999). Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*, *50*(1), 571-599.
44. Uemura, M., Tominaga, Y., Nakagawara, C., Shigematsu, S., Minami, A. & Kawamura, Y. (2006). Responses of the plasma membrane to low temperatures. *Physiologia Plantarum*, *126*(1), 81-89.
45. Vítámvás, P. & Prášil, I.T. (2008). WCS120 protein family and frost tolerance during cold acclimation, deacclimation and reacclimation of winter wheat. *Plant Physiology and Biochemistry*, *46*(11), 970-976.
46. Wang, L., Zhang, F., Li, R., Liang, Y. & Liu, Y. (2000). The morphologic characteristics of starch grain in grape shoots and its relationship to cold resistance. *Acta Horticulturae Sinica*, *27*(2), 85-89.
47. Winkler, A. J. (1974). *General viticulture*. (2nd ed.). University of California Press.
48. Youssef, A. M., Hassanein, R. A., Hassanein, A. A. & Morsy, A. A. (2003). Changes in quaternary ammonium compounds, proline and protein profiles of certain halophytic plants under different habitat conditions. *Pakistan Journal Biological Sciences*, *6*(10), 867-882.
49. Zhang, J., Wu, X., Niu, R., Liu, Y., Liu, N., Xu, W. & Wang, Y. (2012). Cold-resistance evaluation in 25 wild grape species. *Vitis*, *51*(4), 153-160.
50. Zhang, X., Shen, L., Li, F., Meng, D. & Sheng, J. (2013). Arginase induction by heat treatment contributes to amelioration of chilling injury and activation of antioxidant enzymes in tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*, *79*, 1-8.