Journal of Research in Horticultural Science
پژوهش در علوم باغبانی
Vol. 4, No. 1 Spring and Summer 2025 (76–95)
جلد ۴، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۴۰۴ (ص ۹۵-۷۶)
10.22092/rhsj.2025.369588.1124
مقاله علمی پژوهشی
تارنمای مجله: https://rhsj.areeo.ac.ir

گزینش ارقام امید بخش انگور (*Vitis vinifera* L.) متحمل به سرما براساس برخی صفات مرفو-فیزیولوژیک و فعالیت آنزیمی

محمد علی نجاتیان *[۱]، علی رضائی [۲]

۱- دانشیار، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان قزوین، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، قزوین، ایران.

۲- محقق، پژوهشکده میوه‌های معتدله و سردسیری، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۳/۰۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۴/۳۰

چکیده

به منظور بررسی اثرات سرما بر میزان خسارات وارده به جوانه‌های انگور و تعیین میزان تحمل ۲۱ رقم انگور منتخب، این پژوهش در اسفند ماه ۱۳۹۹- ۱۳۹۷در مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی قزوین انجام گرفت. در مرحله اول ۱۴۲ رقم موجود در کلکسیون انگور تاکستان، براساس آزمون تمایز، یکنواختی و پایداری و در مرحله بعدی سنجش تحمل به سرمای زمستان قلمه‌های یکساله ۲۱ رقم منتخب در فریزر در دماهای ۱۵-، ۱۸-، ۲۱- و ۲۴- درجه سانتی گراد به مدت ۱۲ ساعت قرار داده شدند. در ادامه تحمل به سرمای بهاره ۱۱ رقم برتر تحت تیمارهای سرمایی ۴+، ۰، ۲- و ۴- درجه سانتی‌گراد مورد ارزیابی واقع شد. نتایج نشان داد که ارقام از نظر میزان زنده بودن جوانه‌ها با یکدیگر اختلاف معنی‌دار داشتند. اثر متقابل رقم در سرما زمستانه در تمامی صفات در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بود. از نظر میزان پرولین تولیدی در سطح تنش شدید سرمای بهاره، رقم امین بیشترین و ترکمنستان ۴ کمترین میزان را دارا بودند. ارقام موسکات سیاه و آلیگونه در میزان آنزیم کاتالاز، رقم موسکات سیاه در گایاکول‌پرکسیداز و رقم خلیلی دیررس در صفت کاتالاز، ارقام کاردینال، خلیلی دیررس، شاهانی قزوین و آلیگونه در صفت گایاکول پراکسیداز و رقم ترکمنستان ۴ در آسکوربات پراکسیداز، کمترین میزان را در دمای ۴- درجه سانتی‌گراد داشتند. بر اساس روش رقوم گذاری ارقام بلی‌رامفی، یوسکی‌بیسر و آلیگونه از امتیاز بالاتری برخوردار بودند و به عنوان ارقام متحمل و رقم ترکمنستان ۴ نسبت به سایر ارقام از امتیاز کمتری برخوردار بود و به عنوان رقم حساس به تنش سرما ارزیابی شدند.

واژگان کلیدی: انگور، تنش سرما، پرولین، ارقام متحمل، آنتی اکسیدان‌ها.

Selection of promising cold-tolerant grape (*Vitis vinifera* L.) cultivars based on some morpho-physiological and enzymatic traits

Mohammad Ali Nejatian [1*], Ali Rezaei [2]

1- Associate Professor, Qazvin Province Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Horticultural Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Qazvin, Iran.

2- Researcher, Temperate Fruits Research Center, Horticultural Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran.

Received: May 2025 Accepted: July 2025

Abstract

In this study the effect of cold injury on buds of 21 grape cultivars was investigated in 2018 to 2020 by exposing of one-year-old cuttings to sub-zero temperatures. To assess winter cold tolerance, one-year-old cuttings of 21 selected cultivars were placed in a freezer at temperatures of -15, -18, -21, and -24 degrees Celsius for 12 hours. Based on the results, there was a significant difference among cultivars for (flower) bud viability. The cold resistance of 11 selected grape cultivars was examined under the temperatures of +4, 0, -2 and -4 °C in a factorial Randomized Complete Block Design. The highest level of free proline was measured in Amin while Torkamanestan 4 had the lowest amount. The highest level of catalas belonged to Black Muscat and Aligone. Black muscat and Aligone cultivars had the highest level of guaiacol peroxidase and ascorbic acid, respectively. In contrast, the cultivars of Khalili Dirras and Torkamanestan 4 had the lowest level of catalase and ascorbate peroxidase, respectively. Finally, Torkamanestan 4 had a lower score and was identified to be a cold sensitive cultivar.

Keywords: Cold stress, proline, tolerant cultivars, antioxidants.

*نویسنده مسئول: nejatianali@yahoo.com

۱- مقدمه

انگور به مدت هزاران سال با زندگی بشر عجین بوده و مطابق مدارک تاریخی موجود، کاشت آن در مصر حدود پنج تا شش هزار سال قبل انجام می‌شد. کاشت مو در آسیای صغیر در قسمت‌های جنوبی، ناحیه‌ای بین دریای سیاه و دریای خزر، ناحیه‌ای که بیشتر گیاه‌شناسان آن را محل پیدایش انگورهای دنیای قدیم می‌دانند، شروع شد (Grassi *et al*., 2020). بوته انگور به لحاظ گیاه‌شناسی از خانواده ویتاسه (Vitaceae) بوده و جنس ویتیس، مهم‌ترین جنس موجود در این خانواده می‌باشد. غالب‌ترین گونه کشت شده در دنیا یعنی گونه ویتیس وینیفرا (*Vitis vinifera*) است. گونه ویتیس وینیفرا حساس به سرما، سفیدک سطحی و داخلی و فیلوکسرا بوده و به آهک و خشکی مقاوم است و ریشه‌زایی در آن به‌راحتی صورت می‌گیرد. در واقع محدوده کشت ارقام آن توسط عوامل اقلیمی محدود می‌گردد (Bazgeer, 2020). این گونه، مهمترین گونه خوراکی دنیا است و دارای بهترین کیفیت میوه در بین سایر گونه‌ها است. انگورهای مورد کشت و کار در ایران، از گونه ویتیس وینیفرا می‌باشند. مقاومت به سرما عامل مهم در توسعه کشت اکثر ارقام انگور اروپایی می باشد. در بعضی از سال‌ها گاهی تا ۹۵-۹۰٪ محصول از پدیده سرمازدگی خسارت دیده و از بین می‌رود. به‌عنوان مثال به طور بالقوه ۹۹٪ ارقام کشت شده انگور در ایران به دلیل اینکه از ارقام اروپایی (وینیفرا) هستند، در دمای پایین‌تر از ۱۵- درجه سانتی‌گراد آسیب شدید و گاهی دچار مرگ بوته خواهند شد (Nejatian, 2013). طبق بررسی دیگر حدآستانه تحمل در برابر سرمای زمستانه در کلون‌های نرمال ارقام انگور بین ۱±۱۵- تا ۱±۱۷- سانتی‌گراد اما در کلون‌های برتر معرفی شده تحمل در برابر سرما می‌تواند تا ۱±۲۰- سانتی‌گراد باشد (EL-Hammady and Jensen, 1999).

تنش‌های غیرزنده به طور گسترده‌ای رشد و نمو و تولید مثل گیاهان را تحت تاثیر قرار می‌دهند. در پی این تنش‌ها تغییرات مورفولوژیک، فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و مولکولی در گیاه اتفاق می‌افتد که با طی این مراحل، گیاه برای مقابله با شرایط تنش سازگار خواهد شد (Zhang *et al*., 2020). در بین تنش‌های غیرزیستی، تنش‌های دمای بالا و پایین از مهم‌ترین عوامل تعیین کننده کشت گیاهان است. دماهای پایین اغلب بر روی رشد و عملکرد تاثیر می‌گذارد و میزان محصول گیاهان را به‌طور چشمگیری تحت تاثیر قرار می‌دهد (Wang *et al*., 2020). به طور کلی گیاهان به عنوان موجودات بی‌حرکت تغییرات دمایی را در محیط اطرافشان تشخیص داده و سپس به آن تغییرات پاسخ می‌دهند و تعادل دمایی مناسب را در درون سلول‌هایشان برقرار می‌کنند. دمای پایین تغییراتی را در ساختار غشا سلولی و ترکیب لیپیدهای غشا، نشت الکترولیت‌ها و آمینواسیدها، محتوی پروتئین‌ها و فعالیت‌های آنزیمی و همچنین تغییرات در یک طیف گسترده‌ای از اجزا سلولی نظیر پلاستیدها، غشاهای تیلاکوئیدی، فسفریلاسیون پروتئین‌های تیلاکوئیدی و میتوکندری‌ها ایجاد می‌کند (Theocharis *et al*., 2012).

تحمل گیاهان در میزان دماهای پایین (۱۵-۰ درجه سانتی‌گراد) و یخزدگی (زیر صفر درجه سانتی‌گراد) متفاوت می‌باشند. سازگاری به دماهای پایین با قرارگیری در معرض سرماهای کوتاه مدت حاصل می‌شود، که این پروسه تحمل سرما، سازگاری به سرما شناخته می‌شود. تحمل به سرما عبارت است از توانایی گیاه به تحمل دماهای پایین (۱۵-۰ درجه سانتی‌گراد) بطوریکه صدمه و خسارتی به بافت گیاه وارد نمی‌گردد (Yadav, 2010). این فرآیند همراه با تغییرات بیوشیمیایی و فیزیولوژیک همراه است که در نهایت تغییرات چشمگیری را در بیان ژن، وضعیت لیپیدهای غشایی و تجمع مولکول‌های کوچک به دنبال خواهد داشت (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006).

تعداد زیادی از گونه‌های گیاهی زمانی که در معرض دمای پایین قرار می‌گیرند، دچار تغییرات فیزیولوژیکی و یا سلولی متعددی می‌گردند (Wang *et al*., 2020). تحت دمای پایین، گیاهان تلاش می‌کنند تا عملکرد و فعالیت سلول را حفظ نماید، بخصوص پایداری غشاء سلولی و ساختار پروتئین‌های دارای فعالیت بیولوژیکی در زنده‌مانی تحت تنش‌های محیطی اهمیت بالایی دارند. قرار گرفتن گیاهان در دماهای زیر صفر درجه منجر به تشکیل یخ در بافت‌های گیاه

می‌گردد (Ritonga and Chen, 2020). غلظت‌های بالاتر هسته‌های تشکیل‌دهنده یخ در محلول آپوپلاستی گیاهان، باعث می‌شود که این بخش گیاه نقطه انجماد بالاتری داشته و بنابراین کریستال‌های یخ ابتدا در فضاهای بین سلولی شکل می‌گیرند. این فرآیند منجر به کاهش پتانسیل آب محلول آپوپلاستی می‌گردد. بنابراین، استرس انجماد در گیاهان معمولاً با تنش خشکی همراه می‌گردد. کریستال‌های یخ منجر به تغییرات در فاز لیپیدهای غشاء و افزایش نشت یونی می‌گردد. با ادامه یافتن فرآیند یخزدگی، تنش‌های اسمزی باعث دهیدراسیون سلولی شده و باعث تسهیل تشکیل کریستال‌های یخ درون سلولی می‌گردد. در حالت شدید، این وضعیت کریستال‌های یخ می‌توانند منجر به پاره شدن سلول و نشت سیتوزول به بیرون و مرگ گیاه گردد. بنابراین جلوگیری از تشکیل یخ درون سلولی و گسترش آن می‌تواند باعث افزایش مقاومت گیاه به تنش سرمایی گردد. مهم‌ترین روشی که گیاهان برای مقابله با سرما به‌کار می‌برند، سازگاری با سرما می‌باشد که این امکان را برای گیاهان فراهم می‌کند که با تجمع پلی‌پپتیدهای محافظ سرمایی و اسمولیت‌ها از قبیل قندهای محلول و پرولین با سرما مقابله کنند (Ritonga and Chen, 2020). در سازگاری با تنش سرما، گیاهان از چندین مکانیزم سلولی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی جهت بقا استفاده می‌کنند (Hasanuzzaman *et al*., 2013). تنش سرما نتیجه مستقیم دمای پایین در ماکرومولکول های سلولی است که منجر به کندی متابولیسم و از بین رفتن عملکرد غشاء سلولی می‌شود (Chai *et al*., 2019). سطح مقاومت به سرما در بین ارقام انگور اروپایی متفاوت است و بسته به زمان نمونه برداری در زمستان متغیر است. سازگاری تاک‌های انگور در ارقام وینیفرا در دماهای پایین‌تر از ۱۵- درجه سانتی‌گراد رخ می‌دهد. بیشترین مقاومت به سرما در *V. Vinifera* تا ۲۶- درجه سانتی‌گراد گزارش شده است (Mills *et al*., 2006). برخی از گونه‌های انگور وحشی می‌توانند در دمای میانه زمستان تا ۳۵- تا ۴۰- درجه سانتی‌گراد زنده بمانند (Pierquet and Stushnoff, 1980; Andrews *et al*., 1984). کاهش دما موجب وارد آمدن فشار مکانیکی به دیواره سلولی و به دنبال آن تحریک ژن‌هایی که بیان آن‌ها، اثرات مخرب تنش را کاهش می‌دهد، می‌شود (Dalton *et al*.,1999). همچنین گزارش‌ها نشان می‌دهند که تنش سرما موجب تغییرات بیوشیمیایی و فیزیولوژیک در میزان و فعالیت آنزیم‌ها، تجمع کربوهیدرات‌ها و اسیدهای‌آمینه و پروتئین‌های محلول و همچنین موجب تغییر در ترکیبات چربی غشای سلولی می‌شود (Tomashow, 1999). پیامد دیگر تنش در دمای پایین، تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) است. در واقع گونه‌های اکسیژن فعال تولید شده در پاسخ به استرس یخبندان در خسارت به غشاء نقش دارند.

گونه‌های فعال اکسیژن مولکول‌های سمی هستند که قادر به واکنش با سلول‌های حیاتی مانند پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک، لیپیدها و کربوهیدرات‌ها هستند و به آن‌ها آسیب می‌رسانند (Sattler *et al*., 2000). یکی از اساسی‌ترین مکانیسم‌ها برای کسب تحمل در برابر تنش‌های محیطی، حذف گونه‌های فعال اکسیژن است (Rezaie *et al*., 2020). هر دو سیستم آنزیمی و غیر آنزیمی در این فرآیند برای مقابله با گونه‌های اکسیژن فعال مؤثر هستند (Ritonga and Chen., 2020; Chai *et al*., 2019; Pastori *et al*., 2002). برای از بین بردن ترکیبات سمی، مکانیزم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاه آغاز به فعالیت می‌کنند که در نهایت گونه‌های اکسیژن فعال را از بین می‌برند. تحقیقات انجام شده بسیاری بر زنجیره آنتی‌اکسیدانی در سلول، برای مقابله با تنش‌ها تأکید کرده‌اند (Dalton, 1999; Shin, 2004; Tuteja, 2007; Tuteja, 2009). آنزیم‌هایی مانند سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، گلوتایتول ردوکتاز و آنتی اکسیدان‌هایی از جمله آسکوربیک اسید، گلوتاتیول و نوکلئیدهای پریدین به همراه ترکیبات فنلی، کاروتنوئیدی و نوکروفرول ها برای از بین بردن خاصیت سمی گونه‌های اکسیژن فعال ضروری هستند (Prasad, 1996). تنش سرما سبب تغییرات مقادیر کربوهیدرات‌های محلول، پرولین و محتوای آب بافت‌های گیاه نیز می‌شود (Goldsmith, 2009). گزارش‌ها ارتباط مثبت بین تحمل گیاه به سرمای زمستانه با بالا بودن میزان ذخایر کربوهیدرات‌ها در گیاهان چوبی را تأیید می‌کند (Aslamarz *et al*., 2010) و بر این نظر است که تولید کربوهیدرات‌های

محلول برای مقاومت به سرما ضروری است. در مکانیسم تحمل به سرما، کربوهیدرات‌ها در تنظیم اسمتیک سلول نقش دارند (Cox and Stushnoff, 2001) و اثر محافظت‌کننده بر کم آب نمودن سلول و تثبیت غشای سلولی دارند. با بررسی جنبه‌های بیوشیمیایی تحمل به سرما در انگور رقم "Cabernet Sauvignon" مقادیر کربوهیدرات‌های محلول با درجه حرارت هوا و مراحل خواب بافت در جوانه‌ها ارتباط داشت و در طول فصل زمستان افزایش و دوباره از اواسط اسفند و در هنگام شکست خواب جوانه کاهش یافت (Wample and Bary, 1992).

پرولین نیز در مواجه گیاهان با تنش‌های غیرزیستی نظیر سرمازدگی تاثیر دارد (Taylor, 1996)، به‌طوریکه بعد از تنش سرمایی میزان پرولین به تدریج در سلول‌ها افزوده می‌شود (Koster and Lynch, 1992; Wanner and Junttila, 1999) و می‌تواند نقش مهمی برای مقاومت به سرما ایفا نماید در واقع به‌عنوان یک محافظ اسمزی عمل نموده (Csonka, 1989; Morita *et al*., 2002)، غشای سلول را از طریق تعاملات آبی محافظت می‌کند اما در مواجه با استرس سرما کارآمدی کمتر نسبت به کربوهیدرات‌های محلول دارد (Van Swaaij *et al*., 1985; Morin *et al*., 2007) و ارتباط قوی برای افزایش تحمل به سرما ندارد (Taylor, 1996).

در انگور در مواجهه با سرمای پاییزه تقریباً میزان مقاومت پوست و آوندهای چوبی یکسان است ولی به هنگام زمستان شانس زنده ماندن پوست کمتر خواهد بود (Levitt, 1980). دمای کم باعث کاهش فعالیت بیوسنتزی گیاهان، انجام وظایف و فرآیندهای فیزیولوژیک شده و نهایتاً باعث خسارت های دائمی و مرگ می‌شود (Gao, 2002; Levitt, 1980; Paul and Gamet, 2008). براساس مطالعات صورت گرفته، حدود یک شبانه روز سرمای شدید زمستان برای از بین بردن کامل بوته‌های انگور کافی است و پس از آن افزایش روزهای سرما، دیگر تأثیری در میزان خسارت به جوانه‌ها ندارد. استان قزوین به عنوان یکی از مراکز اصلی تولید انگور در کشور، جزو مناطقی است که تاکستان‌های آن در بیشتر سال‌ها با سرمای زمستانه مواجه شده و آسیب می‌بینند. لذا شناسایی ارقام و یا کلون‌هایی از یک رقم دارای میوه با کیفیت و عملکرد بالا که به سرما نیز مقاومت نشان دهد، می‌تواند در برنامه‌های آینده انگورکاری و گسترش سطح زیرکشت انگور در مناطق سرد ایران موثر باشد. با توجه به تنوع بسیار زیاد ارقام انگور در کشور و خصوصاً کلون‌های گزینش شده و همچنین پایه‌های امیدبخش انگور، لذا ارزیابی تحمل در برابر تنش سرما و نیز دست‌یابی به ارقام تجاری متحمل به سرمای بهاره و زمستانه به ویژه در مناطق اصلی انگورکاری در کشور ضروری به‌نظر می‌رسد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد گیاهی

در اسفند ۱۳۹۷ و فروردین ۱۳۹۸ و در مرحله اول آزمایش، با توجه به وقوع سرمازدگی، ابتدا براساس صفات مورفولوژیک مرتبط با سرمازدگی، یک غربالگری اولیه در کلکسیون ملی انگور واقع در تاکستان قزوین (متشکل از ۱۴۲ رقم داخلی و وارداتی) به جهت شناسایی ارقام مستعد متحمل به سرما انجام شد. به‌طوریکه کلیه ارقام مورد مطالعه براساس حدود ۵۰ صفت ظاهری و طبق دستورالعمل تمایز، یکنواختی و پایداری ارقام انگور (دستورالعمل DUS) مورد ارزیابی مورفولوژیک، کمی و کیفی قرار گرفتند (داده‌های این بخش آورده نشده است). مهمترین صفاتی که در این مرحله مورد ارزیابی قرار گرفت شامل برگ سرمازده، شاخه‌های سالم، شاخه آسیب دیده، جوانه سالم و جوانه آسیب دیده بود. در نهایت ۲۱ رقم انگور ایرانی و خارجی از بین ارقام مورد ارزیابی به منظور اعمال تنش سرما انتخاب شدند (لیست ارقام در جدول ۱ آورده شده است).

در سال دوم و در مرحله دوم آزمایش به منظور بررسی میزان تحمل ۲۱ رقم منتخب انگور به دماهای زیر صفر (تنش سرمای زمستان)، تنش سرمای مصنوعی بر روی قلمه‌ها اعمال گردید. برای این کار از شاخه‌های یک‌ساله تاک‌های مورد بررسی در بهمن ماه سال ۱۳۹۸ قلمه‌های ۸ جوانه‌ای تهیه و در آزمایشگاه مرکز تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی و منابع طبیعی قزوین در داخل یخچال در معرض دماهای ۴ درجه (به عنوان شاهد) و در فریزر در دماهای ۱۵-، ۱۸-، ۲۱- و ۲۴- درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ساعت قرار داده

شدند. سرمادهی در فریزر تایمر دار اعمال شد که در آن کاهش دما به تدریج انجام شد تا اینکه ابتدا قلمه‌ها در دمای ۵- درجه به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند و سپس دما در هر تیمار با روند ۳ درجه کاهش در هر ساعت به دمای مورد نظر رسید و قلمه‌ها در هر دما به مدت سه ساعت نگهداری شده و سپس به دمای بعدی کاهش یافت، تا از تنش ناگهانی به قلمه‌ها خودداری شود و کاهش دمای شبیه شرایط طبیعی فراهم گردد. پس از ۱۲ ساعت باقی ماندن در سرمای مورد نظر به طور تدریجی دمای قلمه‌ها تا دمای اتاق افزایش یافت. لازم به توضیح است که از ۲۱ رقم تیمار شده، تعداد ۱۰ رقم در اثر تیمارهای سرمای مصنوعی از بین رفتند.

پس از اعمال تیمار، قلمه‌ها به آزمایشگاه منتقل شد و پس از قرارگیری در دمای اتاق به مدت ۱۲ ساعت جوانه‌ها به تفکیک موقعیت از یک تا هشت در هر ترکیب تیماری جدا شده و از طریق مشاهده زیر بینوکولر درصد زنده بودن و خشک شدن جوانه‌های اولیه، ثانویه و ثالثیه محاسبه گردید. به منظور بررسی میزان خسارت سرما به بافت آوندی و لایه زاینده، میزان نکروز شدن کامبیوم قلمه‌ها نیز اندازه‌گیری شد. از وسط میانگره قلمه‌ها برش‌های عرضی نازک تهیه کرده و از طریق مشاهده و اندازه‌گیری مساحت منطقه قهوه‌ای شده زیر بینوکولار ثبت شد.

در مرحله سوم آزمایش، ۱۱ رقم برتر مقاوم به سرمای زمستان که جوانه‌های فعال شده داشتند و در حال رشد بودند از محل کلکسیون از آن‌ها قلمه تهیه شد و در معرض سرمای بهاره مصنوعی قرار گرفت. تیمارهای دمایی شامل ۴+، ۰، ۲- و ۴- درجه سانتی‌گراد بود. در این مرحله قلمه‌ها (چهار قلمه چهار جوانه‌ای با جوانه‌های شماره ۴-۱) به صورت مصنوعی در معرض تیمارهای دمایی قرار گرفتند و سپس قلمه‌ها در داخل محیط ماسه بادی و پرلیت به نسبت ۱ به ۱ کشت شده و در گلخانه قرار داده شد و پس از جوانه‌زنی تعداد جوانه‌های جوانه زده و جوانه نزده به تفکیک جایگاه جوانه شمارش شد، سپس میزان پرولین، آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و گایکول پراکسیداز در جوانه‌های قلمه‌ها اندازه‌گیری شد. تهیه نمونه‌های برگ جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در پایان هر تیمار تنش صورت گرفت. برای این منظور، بافت برگ تازه با استفاده از ازت مایع در یک هاون چینی کوبیده شد و در یک تیوب پلاستیکی کوچک ریخته شد و تا زمان اندازه‌گیری در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد.

جدول ۱- ارقام منتخب برای ارزیابی تحمل به تنش سرمایی به همراه منشاء و خصوصیت ویژه آن‌ها.

رقم	منشاء	خصوصیت ویژه
یوسکی‌بیسر	روسیه (کراسنودار)	تازه خوری، متحمل به خشکی
آلیگونه	روسیه (کراسنودار)	تازه خوری، متحمل به خشکی
بلی‌رامفی	روسیه (کراسنودار)	تازه خوری، متحمل به خشکی
پیکامی کاشمر	ایران	تازه خوری، کشمش
سرخ فخری	ایران	تازه خوری
خوشنام	ایران	متحمل به خشکی، مناسب دیمکاری، مناسب صنایع تبدلی
کاردینال	آمریکا (کالیفورنیا)	تازه خوری و کشمش، حساس به سفیدک
ریش‌بابا	ایران	تازه خوری، دیررس
عسگری	ایران	تازه خوری، کشمش، حساس به سفیدک
خلیلی دانه‌دار	ایران	تازه خوری، زودرس
ترکمنستان ۴	ترکمنستان	تازه خوری، کشمشی
شاهانی قزوین	ایران	تازه خوری، زودرس

ادامه جدول ۱- ارقام منتخب برای ارزیابی تحمل به تنش سرمایی به همراه منشاء و خصوصیت ویژه آن‌ها.

رقم	منشاء	خصوصیت ویژه
ملائی قزوین	ایران	تازه خوری، متحمل به خشکی
چفته قزوین	ایران	متحمل به خشکی
دیوانه کاشمر	ایران	تازه خوری، کشمش
خلیلی دیررس	ایران	تازه خوری، دیررس
امین	ایران	تازه خوری، مویز
موسکات سیاه	ایران و مصر	تازه خوری، کشمش
شاهرودی	ایران	تازه خوری، دیررس
ایتالیایی	ایتالیا	تازه خوری
سرخاب	ایران	تازه خوری، صنایع تبدیلی

۲-۲- خصوصیات بیوشیمیایی و آنزیمی

۲-۲-۱- پرولین برگ

جهت استخراج پرولین ابتدا ۰/۵ گرم از بافت برگ را در مجاورت ازت مایع داخل هاون چینی، کاملاً پودر کرده، سپس ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفو سالیسیلیک سه درصد (سه گرم اسید سولفو سالسیلیک در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) به آن اضافه شده و مجدداً به خوبی ساییده شد. سپس عصاره حاصل به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه، در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. در مرحله بعد دو میلی‌لیتر از عصاره رویی برداشته شده و در لوله آزمایش ریخته شد و به آن دو میلی‌لیتر اسید استیک‌گلایسیال و دو میلی‌لیتر معرف ناین‌هیدرین تازه تهیه شده (۱/۲۵ گرم ناین هیدرین + ۳۰ میلی‌لیتر اسیداستیک‌گلایسیال + ۲۰ میلی‌لیتر اسیدفسفریک شش مولار) اضافه شد. پس از انجام مراحل فوق، نمونه‌ها به مدت یک ساعت داخل حمام آب گرم، با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از خروج از حمام آب گرم، نمونه‌ها به مدت پنج دقیقه در یخ قرار گرفت. سپس چهار میلی‌لیتر تولوئن به هرکدام از نمونه‌ها اضافه شد و به مدت ۳۰ ثانیه به شدت تکان داده شد تا پرولین وارد فاز تولوئن گردد. در نهایت از فاز آجری رنگ رویی دو میلی‌لیتر برداشته و مقدار جذب آن در طول‌موج ۵۲۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید (Bates *et al*., 1973). سپس مقادیر جذب را در فرمول خط منحنی استاندارد قرار داده تا غلظت پرولین محاسبه شود. برای رسم منحنی استاندارد پرولین از غلظت‌های ۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر پرولین خالص براساس وزن تر استفاده گردید.

۲-۲- ۲- آنزیم کاتالاز

فعالیت این آنزیم به روش ابی (Aebi, 1984)، اندازه‌گیری شد. به این منظور به ۳۵۰ میلی‌گرم بافت برگی پودر شده، ۱۵۰۰ ماکرولیتر از بافر فسفات سدیم۱۰۰میلی‌مولار حاوی ۲ درصد PVPP و ۱/۳ مولار EDTA افزوده شد و پس از ورتکس، نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند و برای سنجش آنزیم بکار گرفته شد. مخلوط واکنش دارای ۳۰ میلی‌مولار پراکسید هیدروژن در بافر فسفات۵۰ میلی‌مولار (pH=7) و ۱۰۰ ماکرولیتر عصاره آنزیم در حجم نهایی ۱۰۰۰ ماکرولیتر بود. فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس مصرف پراکسید هیدروژن در واکنش و کاهش جذب نوری در طول موج ۲۴۰ نانومتر سنجیده و بر اساس کاتال در میلی‌لیتر گزارش شد (Aebi, 1984).

۲-۲- ۳- آنزیم گایاکول پراکسیداز

فعالیت آنزیم پراکسیداز بر اساس تبدیل گوئیکول به تتراگوئیکول در حضور پراکسید هیدروژن و تغییر رنگ مخلوط واکنش و افزایش در جذب نوری در طول موج ۴۷۰ نانومتر، به روش چانس و مهلی (Chance and Maehly, 1955) انجام گرفت. به‌منظور تهیه عصاره آنزیمی برای سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز، از بافر فسفات‌سدیم ۱۰۰ میلی‌مولار (pH=7) استفاده شد. بدین‌منظور پس از

پودرکردن ۳۵۰ میلی‌گرم از برگ در حضور ازت مایع و انتقال آن به تیوب ۲ میلی‌لیتری، ۱۵۰۰ ماکرولیتر از بافر فسفات‌سدیم ۱۰۰ میلی‌مولار حاوی ۲ درصد PVPP و ۱/۳ میلی‌مولار EDTA به آن افزوده شد و پس از ورتکس، نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۲۰۰۰۰g سانتریفیوژ شدند. به‌منظور سنجش فعالیت آنزیمی ۶۰۰ ماکرولیتر بافر فسفات‌سدیم ۱۰۰ میلی‌مولار به همراه ۲۷۰ ماکرولیتر گوئیکول ۲ درصد، و ۱۷۰ ماکرولیتر پراکسیدهیدروژن ۱ درصد به مدت ۹ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و سپس ۱۵۰ ماکرولیتر از عصاره آنزیمی به مخلوط واکنش افزوده و به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر، افزایش جذب نوری در طول موج ۴۷۰ نانومتر در مدت ۳ دقیقه ثبت شد. میزان فعالیت این آنزیم بر اساس کاتال در میلی‌لیتر گزارش شد.

۲-۲- ۴- آنزیم آسکوربات پراکسیداز

کمپلکس واکنشی (یک میلی‌لیتر) شامل ۲۵۰ میکرولیتر از محلول بافر فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار pH=۷، ۲۵۰میکرولیتر از آسکوربات یک میلی‌مولار، ۲۵۰ میکرولیتر از EDTA ۰/۴ میلی‌مولار، ۱۹۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر، ۱۰ میکرولیتر از پراکسیدهیدروژن ۱۰ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر از محلول آنزیمی استخراج شده بود. جذب واکنش آنزیمی در طول موج ۲۹۰ نانومتر در زمان شروع و پس از یک دقیقه از شروع واکنش قرائت شد (Nakano and Asada, 1981).

۲-۳- تجزیه و تحلیل داده‌ها

داده‌های حاصل از مرحله اول این پژوهش به صورت توصیفی ارائه گردید و نتایج حاصل از مراحل بعدی پژوهش به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. داده‌های بدست آمده با استفاده از نرم افزار آماری MSTATC و SPSS (Ver. 9) تجزیه واریانس شد و در نهایت مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن صورت گرفت. همچنین به کمک تجزیه خوشه‌ای، گروه بندی و تفکیک ارقام با استفاده از کلیه صفات بیوشیمیایی به روش Ward و با استفاده از نرم‌افزار SPSS (Ver. 9) صورت پذیرفت.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- مرحله اول: ارزیابی ارقام موجود در کلکسیون نسبت به سرمای طبیعی بهاره

براساس نتایج تجزیه واریانس صفات مورد بررسی در سرمازدگی طبیعی بهاره (جدول ۲)، بین ارقام از نظر صفات درصد برگ سرمازده، درصد شاخه‌های آسیب‌دیده، درصد شاخه‌های سالم و درصد جوانه سالم و درصد جوانه آسیب دیده تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد وجود داشت (جدول ۲).

جدول ۲- تجزیه واریانس مرکب تاثیر تنش سرمای طبیعی بهاره بر صفات مورفولوژیک مرتبط.

منابع تغییرات	درجه آزادی	درصد برگ سرمازده	درصد شاخه‌های سالم	درصد شاخه آسیب‌دیده	درصد جوانه سالم	درصد جوانه آسیب‌دیده
رقم	۱۴۱	۱۱۸۵/۸۷ **	۳۷۳/۲۶ **	۳۷۳/۳۱ **	۴۱۰۲/۱۷ **	۴۱۳۵/۴۳ **
خطا	۵۶۴	۱۰/۱۸	۱۵/۶۷	۱۵/۶۱	۲۱۵/۴۸	۲۰۲/۷۹
CV (%)	-	۲۴/۷۳	۴/۳	۵۰/۲۰	۲۱/۷۳	۴۴/۰۱

**و * به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد

۳-۲- مرحله دوم: ارزیابی تأثیر تنش سرمای مصنوعی (سرمای زمستان) بر صفات مورفولوژیک

براساس نتایج جدول تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۳)، تاثیر تیمار تنش سرمای مصنوعی بر صفات زمان باز شدن اولین جوانه و درصد جوانه‌های باز شده معنی‌دار ($p<0.01$) بود. از سوی دیگر اثر متقابل دوگانه بین رقم و تیمار نیز برای دو صفت زمان باز شدن اولین جوانه و درصد جوانه‌های باز شده در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۳).

جدول ۳- تجزیه واریانس مرکب اعمال تنش سرمای مصنوعی بر صفات زمان باز شدن اولین جوانه و درصد جوانه‌های باز شده در بین ارقام انگور مورد مطالعه.

منابع تغییرات	درجه آزادی	زمان باز شدن اولین جوانه	درصد جوانه‌های باز شده
تکرار	۴	۱/۷۸ **	۱۵۳/۰۱ **
تیمار (T)	۴	۲۴۴۹/۸۳ **	۸۹۵۵۴/۱۹ **
رقم (C)	۲۰	۵۲۳/۷۳ **	۸۷۰/۷۳ **
T×C	۸۰	۲۰۵/۴۱ **	۲۶۷/۰ **
خطا	۴۱۶	۰/۴۴	۲۱/۴۵
CV (%)	-	۵/۴۴	۱۲/۳۱

**و * به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد

نتایج جدول مقایسه میانگین داده‌ها برای صفت درصد جوانه‌های باز شده نشان داد که رقم یوسکی‌بیسر با داشتن میانگین ۲۱/۵۷ درصد، بیشترین میزان را نسبت به سایر ارقام داشت (جدول ۴)، در حالی‌که کمترین میزان این صفت مربوط به رقم سرخ فخری با ۶/۹۳ درصد بود. ارقام یوسکی‌بیسر، عسگری، کاردینال و خلیلی دانه‌دار در صفت درصد جوانه‌های باز شده بیشترین میانگین و رقم ترکمنستان ۴ کمترین مقدار را در بین ارقام مورد مطالعه به خود اختصاص داد (جدول ۴). براساس جدول مقایسه میانگین درخصوص صفت زمان باز شدن اولین جوانه بین ارقام یوسکی بیسر، کاردینال، عسگری و خلیلی دانه‌دار از نظر آماری اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. زودترین بازشدن جوانه در رقم سرخآب و دیرترین زمان باز شدن جوانه در رقم خارجی یوسکی بیسر مشاهده شد. شمارش جوانه‌های سبز شده بعد از سرمادهی مصنوعی نشان دهنده توانایی یک رقم برای تحمل به دمای کم و معیاری قابل اعتماد برای مقایسه تحمل به سرمای ارقام است.

جدول ۴- مقایسات میانگین صفات زمان باز شدن اولین جوانه و درصد جوانه‌های باز شده در بین ارقام انگورمورد مطالعه.

رقم	درصد جوانه‌های باز شده	زمان باز شدن اولین جوانه
یوسکی‌بیسر	۲۱/۵۷ a	۴۷/۵۰ a
آلیگونه	۲۰/۴۳ b	۴۰/۵۶ b
بلی‌رامفی	۱۸/۰ c	۴۰/۸۴ b
پیکامی کاشمر	۸/۹۷ k	۳۳/۶۱ defg
سرخ فخری	۶/۹۳ m	۳۶/۳۹ bcde
خوشنام	۱۲/۳۰ h	۳۳/۶۱ defg
کاردینال	۱۱/۰۷ i	۴۵/۵۶ a
ریش‌بابا	۱۲/۹۰ gh	۳۶/۳۹ bcde
عسگری	۷/۵۰ m	۴۷/۵۰ a
خلیلی دانه‌دار	۱۵/۱۷ d	۴۵/۲۸ a
ترکمنستان ۴	۹/۵۰ jk	۳۰/۵۶ g
شاهانی قزوین	۹/۰۳ k	۳۵/۸۳ cdef
ملائی قزوین	۱۴/۳۳ def	۳۶/۹۵ bcd

ادامه جدول ۴- مقایسات میانگین صفات زمان باز شدن اولین جوانه و درصد جوانه‌های باز شده در بین ارقام انگورمورد مطالعه.

رقم	درصد جوانه‌های باز شده	زمان باز شدن اولین جوانه
چفته قزوین	۱۲/۷۷ gh	۳۲/۲۲ efg
دیوانه کاشمر	۸/۵۰ kl	۳۳/۶۱ defg
خلیلی دیررس	۱۳/۷۰ fg	۴۰/۵۶ b
امین	۸/۵۳ kl	۴۰/۲۸ bc
موسکات سیاه	۱۴/۰۰ ef	۳۲/۵۰ defg
شاهرودی	۷/۳۷ m	۳۲/۲۲ efg
ایتالیایی	۱۰/۱۳ ij	۳۶/۶۷ bcde
سرخاب	۱۴/۸۰ de	۳۱/۳۹ fg

در هر ستون میانگین‌های دارای حروف مشترک در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

براساس نتایج مقایسه میانگین برهمکنش اثر ارقام در سطوح تیمارهای سرمایی (جدول ۵)، مشخص شد که با افزایش سرما جوانه‌ها دیرتر باز شده و همچنین مرگ جوانه‌ها نیز در دماهای پایین‌تر بیشتر اتفاق افتاد که این موضوع با مشاهدات میدانی و باغی نویسنده اول مقاله حاضر کاملاً منطبق است. کریمی علویجه و همکاران (۱۳۹۳) نیز نشان دادند که در ارقام انگور حساس به سرما، تیمارهای دمایی ۱۴- درجه سانتی‌گراد و پایین‌تر، سبب خسارت شدید به جوانه‌ها شد و به اصطلاح جوانه‌ها کور ماندند و رشد جدید در آن‌ها حاصل نشد، درحالی‌که در ارقام مقاوم، تیمار دمایی ۱۸- درجه سانتی‌گراد موجب مرگ کامل همه جوانه‌ها شد و باز شدن جوانه‌ها مشاهده نشد.

جدول ۵- نتایج مقایسه میانگین تاثیر تیمارهای سرمایی حاصل از سرمای مصنوعی بر صفات زمان باز شدن اولین جوانه و درصد جوانه‌های باز شده در بین برخی ارقام انگور.

تیمارهای سرمایی (درجه سانتی گراد)	باز شدن اولین جوانه (روز)	درصد جوانه‌های باز شده
شاهد	۷/۵۶ d	۷۳/۷۴ a
-۱۵	۱۲/۱۰ c	۵۲/۴۵ b
-۱۸	۱۴/۹۲ b	۳۵/۷۱ c
-۲۱	۱۸/۱۷ a	۲۰/۵۷ d
-۲۴	۱۸/۵۶ b	۵/۶۲ e

در هر ستون میانگین‌های دارای حروف مشترک در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

۳-۳- مرحله سوم: ارزیابی تاثیر تنش سرمای مصنوعی (بهاره) بر صفات بیوشیمیایی و آنزیمی

نتایج تجزیه داده‌های حاصل از اندازه‌گیری میزان اسیدآمینه پرولین و آنزیم‌های کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و آسکوربات‌پراکسیداز بر روی ۱۱ رقم نشان داد که بین ارقام مورد بررسی به غیر از صفت گایاکول پراکسیداز تفاوت معنی‌داری ($p<0.01$) وجود داشت (جدول ۶). معنی‌دار بودن اثر متقابل تیمار سرمایی و رقم نیز نشان داد که با تغییر سطوح تنش سرمایی، واکنش ارقام یکسان نیست که مبین طیف گسترده تحمل تا حساسیت به تنش در بین ارقام است (جدول ۶).

جدول ۶- نتایج تجزیه واریانس مربوط به تاثیر تنش سرمای مصنوعی بر صفات بیوشیمیایی و آنزیمی ارقام انگورمورد مطالعه.

منابع تغییر	درجه آزادی	پرولین	کاتالاز	گایاکول پراکسیداز	آسکوربات پراکسیداز
تکرار	۲	۰/۰۰۰۰۲	۰/۰۲	۰/۰۰۸	۰/۰۰۰۶
رقم (C)	۱۰	۲/۷۴ **	۰/۷۴ **	۰/۰۰۶ ns	۰/۲۵ **
تیمار (T)	۳	۰/۰۸ **	۷/۱۸ **	۰/۰۵ **	۳/۳۲ **
T×C	۳۰	۰/۱۶ **	۱/۵۵ **	۰/۰۲ **	۰/۱۸ **
خطا	۸۶	۰/۰۰۰۰۴	۰/۰۰۸	۰/۰۰۶	۰/۰۰۰۰۴
CV (%)	-	۱/۴۲	۵/۶۷	۳۱/۴۷	۰/۷۸

**و * به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد

طبق بررسی‌های انجام شده، در بسیاری از گونه‌های گیاهی در تنش سرما-یخزدگی تجمع مواد تنظیم‌کننده اسمزی از جمله پرولین افزایش می‌یابد؛ به طوری که تجمع این مواد محلول و سازگار، اسمولاریته سلول را باعث می‌شود که جریان آبی و میزان خروج آب را کاهش می‌دهد که در نهایت این پدیده در گسترش و توسعه سلولی است و بدین دلیل افزایش میزان پرولین یکی از سازوکارهای تحمل به دماهای انجماد شناخته می‌شود (Ashraf and Foolad, 2007). براساس جدول مقایسه میانگین (جدول ۷)، بیشترین و کمترین میزان پرولین به ترتیب به ارقام آلیگونه با میزان ۱/۷۵ میکروگرم بر لیتر وزن تر و امین با میزان ۰/۰۷ میکروگرم بر لیتر وزن تر اختصاص یافت.

تولید گونه‌های اکسیژن فعال در گیاهان یک عکس‌العمل عمومی در پاسخ به تنش‌های محیطی از جمله سرما، خشکی، شوری و تنش ازن می‌باشد (Mittler, 2002). سیستم دفاعی در مقابل تنش‌های اکسیداتیو در گیاهان شامل چندین آنزیم است که یکی از آن‌ها کاتالاز می‌باشد. با توجه به جدول مقایسه میانگین (جدول ۷)، ارقام چفته قزوین و خلیلی دیررس به ترتیب بیشترین و کمترین میزان کاتالاز را داشتند. کاتالاز با همکاری پراکسیداز و دیگر آنزیم‌ها، پرکسید هیدروژن تولیدی در مواجهه سلول با تنش را از بین می‌برد (Foyer *et al*., 1994). با وجود جایگاه مشخص این آنزیم که در پراکسیزوم و گلی‌اکسیزوم‌ها می‌باشد، کاتالاز نقش کلیدی در مواجه با تنش‌های اکسیداتیو دارد. بنابراین مقایسه فعالیت کاتالاز بین ارقام نشان داد که میانگین فعالیت آنزیم کاتالاز رقم چفته قزوین بالاتر از سایر ارقام بوده، که نشان‌دهنده سیستم محافظتی قوی‌تری در این رقم برای به دام انداختن پراکسید هیدروژن است. نتایج مقایسات میانگین درخصوص صفت گایاکول‌پراکسیداز نیز نشان داد که رقم موسکات‌سیاه بیشترین (۰/۲۸ میکروگرم بر لیتر وزن تر) و رقم دیوانه‌کاشمر کمترین (۰/۲۰ میکروگرم بر لیتر وزن تر) میزان را به خود اختصاص دادند (جدول ۷). همچنین ارقام امین (۰/۹۸ میکروگرم بر لیتر وزن تر) و چفته قزوین به ترتیب بیشترین و کمترین (۰/۵۵ میکروگرم بر لیتر وزن تر) میزان آسکوربات پراکسیداز را نسبت به سایر ارقام مورد بررسی داشتند (جدول ۷).

جدول ۷- مقایسه میانگین اثر ساده رقم تحت تاثیر تنش سرمای مصنوعی بر صفات بیوشیمیایی و آنزیمی.

رقم	پرولین (µg/ml FW)	کاتالاز (Kat/ml)	گایاکول پراکسیداز (Kat/ml)	آسکوربات پراکسیداز (µmol H_2O_2 min−1.mg−1 protein)
کاردینال	۰/۲۴ g	۱/۳۱ f	۰/۲۴ ab	۰/۶۹ h
ترکمنستان ۴	۰/۲۱ g	۱/۳۲ f	۰/۲۷ ab	۰/۷۵ g
دیوانه‌کاشمر	۰/۳۴ d	۱/۷۳ c	۰/۲۰ b	۰/۹۰ d
موسکات سیاه	۰/۲۲ h	۱/۶۸ c	۰/۲۸ a	۰/۸۳ e
خلیلی دیررس	۰/۳۹ c	۱/۲۱ g	۰/۲۶ ab	۰/۹۶ b
چفته قزوین	۰/۳۰ e	۱/۹۷ a	۰/۲۶ ab	۰/۵۵ k
امین	۰/۰۷ j	۱/۵۶ d	۰/۲۴ ab	۰/۹۸ a
شاهانی قزوین	۰/۳۱ e	۱/۵۵ d	۰/۲۴ ab	۰/۹۱ c
یوسکی‌بیسر	۰/۲۹ f	۱/۳۹ e	۰/۲۴ ab	۰/۷۷ f
آلیگونه	۱/۷۵ a	۱/۳۰ f	۰/۲۶ ab	۰/۶۱ j
بلی‌رامفی	۰/۹۲ b	۱/۸۲ b	۰/۲۲ ab	۰/۶۷ i

در هر ستون میانگین‌های دارای حروف مشترک در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

۳-۳-۱- پرولین

افزایش پرولین از مکانیسم‌های دفاعی گیاه در مواجه با تنش‌های اسمزی از قبیل خشکی، شوری و سرما است. در بیان علل تغییرات میزان پرولین با اعمال تنش سرما می‌توان بیان داشت که پرولین علاوه بر نقش اسمزی، به‌عنوان یک محافظت‌کننده در برابر تنش عمل می‌کند. بررسی جدول برش‌دهی اثر متقابل (جدول ۸)، یافته‌های ارزشمندی را از سیر تغییرات میزان پرولین در ۴ سطح دمایی نشان می‌دهد، به‌طوری‌که، تغییرات مقادیر پرولین ارقام از سطح ۴+ به طرف صفر درجه سانتی‌گراد از روند ثابتی برخوردار نبوده و نوسان داشته است.

توجه به رونـد تغییرات مقادیـر پرولیـن در بین ۱۱ رقم از سطح صفر تا ۲- °C نشان می‌دهد که تنها یک رقم (دیوانه‌کاشمر) افزایش پرولین را داشته است. نکته قابل توجه در این ویژگی فیزیولوژیک در حرکت از ۲- °C به ۴- °C بروز نموده است و آن این که عکس‌العمل قریب‌به‌اتفاق ارقام افزایش میزان این فرآورده فیزیولوژیک می‌باشد. در این قسمت تمامی ارقام افزایش را نسبت به مرحله قبل نشان دادند. این سیر تغییرات نشان می‌دهد که اکثریت ارقام چگونه توانایی خود را در سنتز پرولین از دست داده و شرایط بقا، آن‌ها را ملزم به تجزیه این اسیدآمینه برای تأمین انرژی مورد نیاز و نجات گیاه نموده است. نتیجه این بررسی نشان می‌دهد که ترکیب پرولین در مرحله سوم به شدت تحت‌تأثیر آنزیم‌هایی قرار می‌گیرد که قادرند این ماده مؤثر در تحمل به سرما را تجزیه کنند. بدیهی است در چنین شرایطی حرکت گیاه به سوی توقف علائم حیاتی تسریع می‌گردد. این نتیجه نه تنها تأییدی بر مطلوبیت شاخص‌بودن ویژگی فیزیولوژیک پرولین جهت ارزیابی تحمل به سرما در ارقام انگور است بلکه به لحاظ ماهیت ویژگی نیز از تجزیه و تحلیل کارآمدتری برخوردار است. به عبارت بهتر، ارقامی در این نوع از تنش مطلوب‌ترند که در سطوح پایین دمایی، پرولین بیشتری را حفظ می‌کنند که با توجه به جدول ۷، رقم امین توانسته است در تنش شدید (۴-) میزان بالایی از پرولین را نسبت به سایر ارقام حفظ نماید که می‌توان از این رقم در جهت تولید ارقام یا پایه‌های تجاری با صفت تحمل بسیار بالا در برابر سرما استفاده کرد. در ارزیابی برخی پاسخ‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی ۷ رقم تجاری انگور به تنش سرما نیز بالاترین تحمل به سرما در دمای ۴- درجه سانتی‌گراد مربوط به رقم

خلیلی و به دنبال آن فخری و بیدانه قرمز بود و کمترین تحمل در روبی‌سیدلس و تامسون سیدلس مشاهده شد.

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 and Foolad, 2007). در تعدادی از گیاهان تحت شرایط تنش سرما تا چندین برابر شرایط عادی، میزان پرولین افزایش می‌یابد (Matysik *et al*., 2002). در مطالعه‌ای بر روی تحمل به سرمای هفت رقم انار، 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 (Soloklui *et al*., 2012)، لذا می‌توان این گونه استنباط داشت که احتمالا افزایش پرولین در گیاه در هنگام تنش، نوعی مکانیسم دفاعی است. پرولین از طریق تنظیم اسمزی، جلوگیری از تخریب آنزیم‌ها، جاروکردن رادیکال‌های هیدروکسیل بردباری و تحمل گیاهان را در برابر تنش‌ها افزایش می‌دهد (Dar *et al*., 2016; Baghbanha *et al*., 2007). در بررسی انجام شده روی هفت رقم انگور، بالاترین غلظت پرولین در رقم‌های روبیسیدلس، تامسون سیدلس و یاقوتی و کمترین میزان در رقم‌های خلیلی، بی‌دانه قرمز و فخری مشاهده شد (Moradi Heidarabad and Ershadi, 2021).

جدول ۸- نتایج مقایسه میانگین برهمکنش ارقام × سطوح تیمارهای سرمایی بر میزان پرولین.

رقم	تغییرات پرولین (µg/ml FW) در تیمارهای دمایی (درجه سانتی‌گراد)			
	+۴	۰	-۲	-۴
کاردینال	۰/۴۴ i	۱/۰۰ c	۰/۴۵ cd	۰/۸۷ e
ترکمنستان ۴	۱/۱۷ b	۰/۸۶ d	۰/۳۳ de	۰/۶۳ f
دیوانه‌کاشمر	۰/۸۴ d	۰/۵۰ d	۰/۸۵ a	۱/۰۷ d
موسکات سیاه	۰/۷۳ e	۰/۸۹ d	۰/۳۱ de	۱/۴۱ b
خلیلی دیررس	۰/۹۰ c	۱/۰۰ c	۰/۶۷ b	۱/۲۶ c
چفته قزوین	۰/۴۲ i	۰/۷۳ e	۰/۳۰ de	۰/۷۶ e
امین	۰/۵۸ g	۱/۳۶ a	۰/۲۲ e	۱/۷۷ a
شاهانی قزوین	۰/۶۴ f	۱/۱۸ b	۰/۵۶ bc	۱/۲۸ c
یوسکی‌بیسر	۱/۲۳ a	۰/۶۱ f	۰/۱۷ e	۱/۰۷ d
آلیگونه	۰/۵۲ h	۰/۸۸ d	۰/۱۸ e	۰/۸۴ e
بلی‌رامفی	۰/۶۴ f	۰/۸۷ d	۰/۱۶ e	۱/۰۱ d

در هر ستون میانگین‌های دارای حروف مشترک در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

۳-۳-۲- کاتالاز

براساس نتایج مقایسه میانگین جداگانه برای فعالیت آنزیم کاتالاز (جدول ۹)، روند تغییرات مقادیر کاتالاز در بین ۱۱ رقم از سطح ۴+ تا صفر نشان داد که ۴ رقم نسبت به دمای صفر افزایش در میزان کاتالاز داشتند و تنها رقم موسکات‌سیاه تغییری در روند خود نداشت و از صفر درجه سانتی‌گراد تا ۲ °C- که تقریبا عکس‌العمل عموم ارقام کاهش میزان این آنزیم می‌باشد. لیکن در حرکت از ۲ °C- به °C

۴- این نسبت به ۶:۵ افزایش یافت. نتایج این آزمایش نشان داد که نمی‌توان یک روند تغییرات منظمی را برای میزان کاتالاز برای هر ۱۱ رقم انتخاب شده معرفی کرد و هر رقم واکنش و روند نموداری مختص خود را دارا می‌باشد که با توجه به نوع رقم می‌توان بیان داشت که این رقم در چه دمایی می‌تواند میزان کاتالاز بیشتری را تولید و یا حفظ کند تا توان مقابله به سرمای بیشتری را از خود نشان دهد. در واقع نتایج این تحقیق نشان دهنده تنوع کافی و همچنین تفاوت رفتاری با تنش، بین ارقام مورد مطالعه می‌باشد. سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز آنزیم‌های مقاومت به تنش سرما هستند و در نتیجه سطوح آن‌ها در ارقام مقاوم بالاتر است، لذا با توجه به نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌ها مشخص شد که ارقام آلیگونه و موسکات سیاه در تنش شدید به دلیل داشتن بیشترین میزان کاتالاز می‌توانند به‌عنوان ارقام متحمل در برنامه‌های به‌نژادی آینده استفاده شوند. افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز تحت تنش سرما در گیاهان در مطالعات متعددی گزارش شده است، به‌طوریکه در ارقام متحمل به سرما در مقایسه با ارقام حساس، میزان فعالیت این آنزیم بیشتر بوده است (Cakmak and Atici, 2009; Javadian *et al*., 2010). در بررسی انجام شده توسط کریمی علویجه و همکاران (Karimi Alavijeh *et al*., 2015) بیشترین فعالیت آنزیم کاتالاز و پراکسیداز مربوط به انگور خلیلی دانه‌دار و گونه ریپاریا و کمترین فعالیت مربوط به ارقام رجبی سیاه، بی‌دانه سفید و شاهرودی بود.

جدول ۹- نتایج مقایسه میانگین برهمکنش ارقام × سطوح تیمارهای سرمایی بر میزان کاتالاز.

رقم	تغییرات کاتالاز (Kat/ml) در تیمارهای دمایی (درجه سانتی‌گراد)			
	+۴	۰	-۲	-۴
کاردینال	۰/۳۰ c	۰/۲۴ c	۰/۱۸ a	۰/۲۴ ab
ترکمنستان ۴	۰/۳۲ d	۰/۲۸ b	۰/۲۸ a	۰/۲۰ bc
دیوانه کاشمر	۰/۲۷ c	۰/۲۳ c	۰/۱۴ a	۰/۱۷ cd
موسکات سیاه	۰/۲۲ e	۰/۲۲ c	۰/۳۹ a	۰/۲۸ a
خلیلی دیررس	۰/۴۲ a	۰/۲۹ b	۰/۲۴ a	۰/۰۷ e
چفته قزوین	۰/۲۶ cd	۰/۲۹ b	۰/۲۳ a	۰/۲۴ ab
امین	۰/۳۱ b	۰/۱۶ d	۰/۲۳ a	۰/۲۵ ab
شاهانی قزوین	۰/۲۴ d	۰/۲۹ b	۰/۱۷ a	۰/۲۵ ab
یوسکی بیسر	۰/۳۱ b	۰/۳۰ b	۰/۲۱ a	۰/۱۴ d
آلیگونه	۰/۱۹ f	۰/۳۰ b	۰/۲۶ a	۰/۲۸ a
بلی‌رامفی	۰/۲۱ e	۰/۳۴ a	۰/۲۳ a	۰/۰۸ e

در هر ستون میانگین‌های دارای حروف مشترک در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

۳-۳-۳- گایاکول‌پراکسیداز

با توجه به نتایج برش‌دهی مقایسه میانگین بین ارقام در صفت گایاکول‌پراکسیداز (جدول ۱۰)، در ۴ سطح دمایی مشاهده شد که در دمای ۴+ به صفر درجه‌سانتی‌گراد، در اکثر ارقام مورد بررسی افزایش میزان گایاکول‌پراکسیداز را داشتیم. نکته جالب توجه این که روند تغییرات ارقام در سطح صفر تا ۲- افزایش میزان آنزیم را داشت. واکنش ارقام در بررسی فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در سطوح ۲- به ۴- نیز نشان داد که از بین ۱۱ رقم، ۴ رقم شامل ترکمنستان ۴،

موسکات‌سیاه، امین و بلی‌رامفی روند افزایشی را نشان دادند و رقم موسکات‌سیاه بیشترین فعالیت آنزیم را در سطح دمایی ۴- داشت. در حالی‌که بین ارقام کاردینال، شاهانی‌قزوین، خلیلی‌دیررس و آلیگونه تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد و با دارا بودن کمترین میزان فعالیت آنزیمی شناخته شدند. نتایج آزمایش‌های دیگر هم نشان می‌دهد که با کاهش دما فعالیت آنزیم پراکسیداز به منظور جلوگیری از آسیب‌های وارده به گیاه ناشی از تنش سرما و تولید پراکسیدهیدروژن افزایش می‌یابد (Yong Kim *et al*., 2005). تحقیقات نشان داده است که تغییرات فعالیت پراکسیداز در گیاهان مقاوم نسبت به گیاهان حساس شدیدتر و سریع‌تر است (Moerschbacher, 1992).

جدول ۱۰- نتایج مقایسه میانگین برهمکنش ارقام × سطوح تیمارهای سرمایی بر میزان گایاکول پراکسیداز.

رقم	تغییرات گایاکول پراکسیداز (Kat/ml) در تیمارهای دمایی (درجه سانتی‌گراد)			
	+۴	۰	-۲	-۴
کاردینال	۰/۶۹ f	۱/۲۳ bc	۲/۵۶ a	۰/۷۶ e
ترکمنستان۴	۰/۷۷ d	۰/۸۵ c	۰/۵۳ a	۱/۱۴ d
دیوانه‌کاشمر	۱/۰۵ d	۱/۳۱ bc	۲/۵۷ a	۲/۰۰ c
موسکات سیاه	۱/۰۰ d	۰/۸۰ c	۲/۲۷ bc	۲/۶۶ a
خلیلی دیررس	۰/۵۶ f	۱/۲۷ bc	۲/۴۲ ab	۰/۵۹ e
چفته قزوین	۱/۴۳ c	۱/۶۶ b	۲/۵۶ a	۲/۲۶ bc
امین	۱/۹۹ b	۱/۳۳ bc	۲/۱۹ c	۲/۲۶ bc
شاهانی قزوین	۱/۵۳ c	۰/۹۵ bc	۰/۹۷ e	۰/۷۴ e
یوسکی‌بیسر	۰/۷۱ f	۰/۹۰ bc	۲/۵۲ a	۱/۴۳ d
آلیگونه	۲/۴۸ a	۰/۶۷ c	۱/۴۷ d	۰/۵۷ e
بلی‌رامفی	۰/۸۰ ef	۲/۴۳ a	۱/۵۰ d	۲/۵۵ ab

در هر ستون میانگین‌های دارای حروف مشترک در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

۳-۳-۴- آسکوربات‌پراکسیداز

با توجه به نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل بین ارقام در فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز (جدول ۱۱)، که در تمامی سطوح دمایی اکثر ارقام (۷:۴) افزایش آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز را نشان دادند. افزایش آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز از این جهت است که به عنوان اسمویت سازگاری و آنزیم ضدرادیکال‌های آزاد اکسیژن، ضمن محافظت از ماکرومولکول‌ها و غشاهای سلول، آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد اکسیژن که در تنش دمایی شدید به وجود آمده است را خنثی کند. نکته جالب توجه این که رقم آلیگونه در تمامی سطوح دمایی بالاترین میزان آنزیم را نسبت به سایر ارقام دارا بود که می‌توان به عنوان یک رقم مقاوم و رقم ترکمنستان ۴ به عنوان رقم حساس به سرما در نظر گرفت. افزایش بیان آسکوربات‌پراکسیداز سیتوزولی در گوجه‌فرنگی و در گیاه ذرت تحت تنش سرما گزارش شده است (Wang *et al*., 2005). در گیاه کاهو در تیمارهای دمایی شبانه‌روزی بیشینه فعالیت آنزیم در ۲۰/۱۳ (شب/روز) گزارش شده است (Chon *et al*., 2012). چنین ارزیابی شده است که، دماهای پایین موجب افزایش فعالیت این آنزیم شده و توان آنتی اکسیداتیو افزایش می‌یابد (Boo *et al*., 2011). در رابطه با آنزیم پراکسیداز نتایج آزمایش‌های دیگر نیز نشان داده که با

کاهش دما، فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز به منظور جلوگیری از آسیب‌های وارده به گیاه ناشی از تنش سرما و تولید پراکسید هیدروژن افزایش می‌یابد (Kim *et al*., 2005). همچنین در درختان سیب رشد کرده روی پایه *Malus sieversii* نسبت به پایه *M. hupehensis* فعالیت بیشتر آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز ثبت گردید (Liu *et al*., 2012). نتایج محققین دیگر بر روی سیب (Liu *et al*., 2012)، توتون (Xu *et al*., 2010) و بادام (Li *et al*., 2012) با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. در واقع، آنزیم آسکوربات پراکسیداز از آسکوربات به عنوان دهنده الکترون در ابتدای سیکل گلوتاتیون– آسکوربات استفاده می‌کند و نقش مهمی در سمیت‌زدایی H2O2 در سلول دارد (Moore and Roberts, 1998). از آنجایی‌که تجمع پراکسید هیدروژن ناشی از واکنش سوپراکسید دیسموتاز نیاز به فعالیت ترکیبی دو آنزیم پراکسیداز و کاتالاز به‌منظور حفاظت سلول‌های گیاهی خواهد داشت، لذا این آنزیم‌ها نقش مهمی را در حذف پراکسید هیدروژن ایفاء می‌نماید. چرخه گلوتاتیون-آسکوربات نقش مهمی در ایجاد سیستم دفاعی در برابر تنش اکسیداتیو دارد و افزایش فعالیت آنزیم‌های آن باعث کاهش اثرات تنش اکسیداتیو می‌شود. همان‌طوریکه امروزه بسیاری از محققین بر این باورند که این چرخه اصلی‌ترین نقش را در جمع‌آوری H2O2 ایفا می‌کند. لذا فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز به‌عنوان آنزیم نهایی این چرخه، از اهمیت بالایی برخوردار بوده و کاهش فعالیت آن می‌تواند سبب تجمع اکسیدان‌ها گردد (Foyer and Harbinson, 1994). پژوهش‌ها نشان داده‌اند که بین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و تحمل گیاه به تنش‌های غیرزنده مانند تنش سرما همبستگی وجود دارد و گیاهانی که دارای سطوح بالاتری از آنتی‌اکسیدانت‌ها هستند، مقاومت بالاتری را به آسیب‌های اکسیداتیو نشان می‌دهند.

جدول ۱۱- نتایج مقایسه میانگین برهمکنش ارقام × سطوح تیمارهای سرمایی بر میزان آسکوربات پراکسیداز.

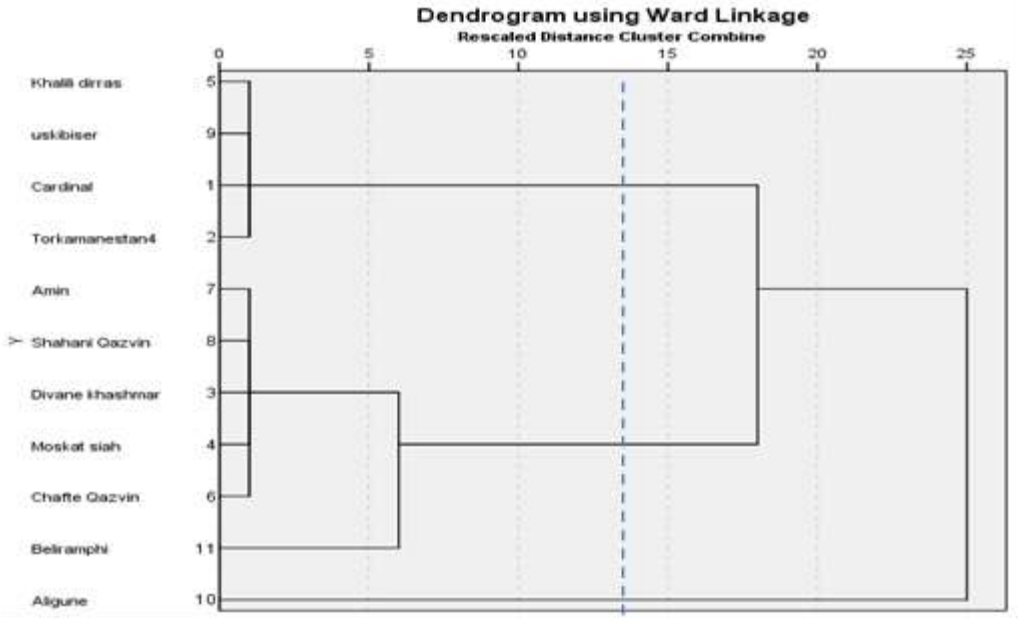
رقم	تغییرات آسکوربات پراکسیداز (µmol H_2O_2 min−1.mg−1 protein) در تیمارهای دمایی (درجه سانتی‌گراد)			
	+۴	۰	-۲	-۴
کاردینال	۰/۱۱ g	۰/۲۰ cde	۰/۳۶ f	۰/۲۹ f
ترکمنستان ۴	۰/۲۴ cd	۰/۰۶ fg	۰/۵۴ c	۰/۰۲ g
دیوانه‌کاشمر	۰/۲۱ de	۰/۲۳ cde	۰/۴۹ d	۰/۴۵ de
موسکات سیاه	۰/۱۴ fg	۰/۱۵ def	۰/۲۳ h	۰/۳۸ e
خلیلی دیررس	۰/۰۹ g	۰/۲۸ cd	۰/۴۲ e	۰/۷۹ b
چفته قزوین	۰/۱۸ ef	۰/۳۰ c	۰/۲۳ h	۰/۵۱ cd
امین	۰/۰۱ h	۰/۰۰۱ g	۰/۰۲ j	۰/۲۴ f
شاهانی قزوین	۰/۲۳ cd	۰/۲۸ cd	۰/۱۴ i	۰/۵۹ c
یوسکی‌بیسر	۰/۲۷ c	۰/۱۳ ef	۰/۳۱ g	۰/۴۲ e
آلیگونه	۲/۲۳ a	۲/۰۳ a	۱/۵۸ a	۱/۱۵ a
بلی‌رامفی	۰/۸۲ b	۱/۲۱ b	۰/۸۲ b	۰/۸۵ b

در هر ستون میانگین‌های دارای حروف مشترک در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

۳-۴- تجزیه خوشه‌ای

در بررسی تنوع ژنتیکی، تجزیه خوشه‌ای بهترین روش برای برآورد شباهت بین افراد در یک مجموعه ذخایر توارثی می‌باشد. هدف از تجزیه خوشه‌ای، انتساب ژنوتیپ‌ها به گروه‌هاست به‌طوری که ژنوتیپ‌های دارای شباهت و خویشاوندی بیشتر در یک گروه قرار می‌گیرند. جهت تعیین

الگوی تنوع ژنتیکی بین ارقام مورد بررسی از تجزیه خوشه‌ای به روش وارد استفاده شد که ارقام انگور به ۴ گروه تقسیم شدند (شکل ۱). ارقام خلیلی‌دیررس، یوسکی‌بیسر، کاردینال و ترکمنستان ۴ در گروه اول، ارقام امین، شاهانی‌قزوین، دیوانه‌کاشمر، موسکات‌سیاه، چفته قزوین در گروه دوم و ارقام بلی‌رامفی و آلیگونه به ترتیب در گروه های سوم وچهارم قرار گرفتند. گروه چهارم که فقط رقم آلیگونه را دارا بود در دو صفت پرولین و گایاکول‌پرکسیداز نسبت به سایر ارقام برتری داشت. در حالیکه گروه دوم و سوم به ترتیب در صفات آسکوربات‌پراکسیداز و کاتالاز بیشترین میانگین را دارا بودند. اصولاً در تجزیه کلاستر، ژنوتیپ‌های که داخل یک گروه یا زیرگروه قرار می‌گیرند، قرابت ژنتیکی بیشتری با یکدیگر دارند. به نظر برخی محققین گزینش یک ژنوتیپ برتر از هر کلاستر (یا زیرکلاستر) برای تشکیل یک زیرمجموعه متنوع از والدین، هتروزیس بیشتری در مقایسه با والدینی که همه از درون یک کلاستر انتخاب شده باشند، دارد (Kolliker *et al.*, 2005).



شکل ۱- دندروگرام حاصل از تجزیه کلاستر ارقام انگور بر اساس کلیه صفات مورد مطالعه.

۴- نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج فعالیت آنزیم‌ها و نیز میزان پرولین (بر اساس روش رقوم گذاری) مشاهده شد که رقم بلی‌رامفی با ارقام یوسکی‌بیسر و آلیگونه تفات معنی‌داری نداشت و در مقایسه با سایر ارقام از امتیاز بالاتری برخوردار بوده و می‌توان از آن به عنوان رقم متحمل به تنش سرمایی در برنامه‌های به‌نژادی استفاده کرد. در حالی‌که رقم ترکمنستان ۴ نسبت به سایر ارقام از میزان امتیاز کمتری برخوردار بود و می‌توان به عنوان رقم حساس به تنش سرما در نظر گرفت. با توجه به اینکه درصد خسارت سرمازدگی در ارقام مهم‌تر استان قابل توجه بوده است، لذا پیشنهاد می‌گردد جهت پرهیز از عواقب ناشی از سرمازدگی در مناطق سرماخیز تدابیر لازم از طرف باغداران در نظر گرفته شود. این تدابیر می‌تواند اقداماتی از قبیل اعمال برنامه تغذیه بهتر در طول فصل رشد، پرهیز از تأخیر در برداشت محصول، خودداری از هر نوع عملیات حذف برگ‌ها به خصوص پس از برداشت محصول، انجام آبیاری صحیح و متوازن، انجام هرس مناسب فرم و باردهی که موجب نفوذ و دریافت نور بیشتر به داخل تاج بوته انگور شود،

خودداری از هرس بسیار شدید بویژه در اواخر فصل رشد، خودداری از مصرف کود ازته در آخر فصل رشد، بهره‌گیری از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی (پاکلوبوترازول و مواد مشابه) که القاکننده مقاومت به سرما می‌باشند، استفاده از مالچ‌های پوششی جاذب نور در فصل زمستان، بهره‌گیری از پیوندک‌های مقاوم‌تر در عملیات پیوند.

تعارض منافع- نگارندگان اعلام می‌کنند که هیچگونه تعارض منافعی ندارند.

تشکر و قدردانی - بدینوسیله از حمایت‌های انجام شده توسط مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان قزوین، پژوهشکده میوه‌های معتدله و سردسیری و موسسه تحقیقات علوم باغبانی کشور سپاسگزاری می‌شود.

منابع

Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, *105*, 121-126.

Andrews, P. K., Sandidge, C. R., & Toyama, T. K. (1984). Deep supercooling of dormant and deacclimating *Vitis* buds. *American Journal of Enology and Viticulture*, *35,* 175–177.

Ashraf, M., & Foolad, M. R. (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany*, *59*, 206-216.

Aslamarz, A. A., & Vahdati, K. (2010). Stomatal density and ion leakage as indicators of cold hardiness in walnut. *Acta Horticulturae*, *861*, 321-324.

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 3*,185-198. (In Persian).

Bates, L. S., Walderen, R. D., & Taere, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. *Journal of Plant Soil*, *39*, 205-207.

Bazgeer, S., Behrouzi, M., Nouri, H., Nejatian, M. A., & Akhzari, D. (2022). Effect of Dust on Growth and Reproductive Characteristics of Grapevine (*Vitis vinifera*). *International Journal of Horticultural Science and Technology*, *9*(3), 301-313.

Boo, H. O., Heo, B. G., Gorinstein, S., & Chon, S. U. (2011). Positive effects of temperature and growth conditions on enzymatic and antioxidant status in lettuce plants. *Plant Science*, *181*, 479-484.

Cakmak, T. & Atici, Ö. (2009). Effects of putrescine and low temperature on the apoplastic antioxidant enzymes in the leaves of two wheat cultivars. *Plant Soil Environment, 55*, 320-326.

Chai, F., Liu, W., Xiang, Y., Meng, X., Sun, X., Cheng, C., Liu, G., Duan, L., Xin, H., & Li, S. (2019). Comparative metabolic profiling of Vitis amurensis and Vitis vinifera during cold acclimation. *Horticulture Research*, *6*.

Chance, B., & Maehly, A. C. (1955). Assay of catalases and peroxidases. Assay of Catalase and Peroxidase. *Methods in Enzymology*, *2*, 764-775.

Chon, S. U., Boo, H. O., Heo, B. G., & Gorinstein, S. (2012). Anthocyanin content and the activities of polyphenol oxidase, peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase in lettuce cultivars. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, *63*(1), 45-48.

Cox, S., & Stushnoff, E. C. (2001). Temperature related shifts in soluble carbohydrate content during dormancy and cold acclimation in populustremuloides. *Canadian Journal of Forest Research*, *31*(4),730-737.

Csonka, L.N. (1989). Physical and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiological reviews, 53*, 121-147.

Dalton, T. H., Shertzer, A., & Puga, A. (1999). Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *39*, 67-101.

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*. Springer, New Delhi: 155-166.

EL-Hammady, M., & Jensen, F. (1999). The effects of optimal nutrition on cold resistance in vineyards. *American Journal of Enology and Viticulture*, *49*(2), 96-102.

Foyer, C. H., Lelandais, M., & Kunert, K. J. (1994). Oxidative stress in plants, *Physiology Plant*, 92,696–717.

Gao, X. P., Yan, J. Y., Liu, E., & Zhang, D. P. (2002). Changes in betaine level in pear, jujube and grapevine leaves under stress. *Acta Horiculturae*, *29*, 268–270.

Goldsmith, L. T. (2009). Freezing tolerance and dehydrin protein expression in ‘Frontenac’ and ‘Seyval blance’ grapevine bark and xylem cane tissues during acclimation, midwinter, and deacclimation.M. Sc. Disserations, Iowa State University. 94.

Grassi, F., & Arroyo-Garcia, R. (2020). Origins and Domestication of the Grape. *Frontiers in Plant Science*, *11*, 1176.

Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Alam, M.M. & Roychowdhary, R. (2013). Physiological, biochemical, and molecular mechanisms of heatstress tolerance in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*: pp.9643–9684.

Javadian, N., Karimzadeh, G., Mahfoozi, S., & Ghanati, F. (2010). Cold-induced changes of enzymes, proline, carbohydrates, and chlorophyll in wheat. *Russian Journal of Plant Physiology*, *57*, 540-547.

Karimi Alavijeh, M., Ebadi, A., Mousavi, A., & Salami, A. (2015). Investigation of Catalase, Proxidase and Total Protein Level in Some Cold Treated Grapevine Cultivars Cold Stress Response. *Journal of Horticultural Science*, *29*(1), 103-110.

Kim, S. Y., Lim, J. H., Park, M. R., Kim, Y. J., Park, T. I., Seo, Y. W., & Yun, S. J. (2005). Enhanced antioxidant enzymes are associated with reduced hydrogen peroxide in barley roots under saline stress. *BMB Reports*, *38*(2), 218-224.

Kolliker, R., Boller, B., & Widmer, F. (2005). Antifungal activity of fluid extract and essential oil from anise fruit (*pimpinellaanisum* L., Apiaceae). *Acta Pharmaceutica*. *55*(4), 377-385.

Koster, K. L., & Lynch, D.V. (1992). Solute accumulation and compartmentalization during the cold acclimation of Puma rye. *Plant Physiology*, *98*, 108-113.

Levitt, J. (1980). Responses of plants to environmental stresses. Vol. 1. Chilling, freezing and high temperature stresses. (2nd ed.). New York, AcademicPress 497 p.

Li, B., Liu, L.Q., Luo, S. P., Li, N., Li, J., Cheng, M. L., & Li, L. (2012). Effects of low temperature stress on flower bud cold resistance of almonds. *Journal of Xinjiang Agricultural University*, *1*, 2-33.

Liu, B., Li, M., Cheng, L., Liang, D., Zou, Y., & Ma, F. (2012). Influence of rootstock on antioxidant system in leaves and roots of young apple trees in response to drought stress. *Plant Growth Regulation*, *67*(3), 247.

Matysik, J., Alia, Bhalu, B., & Mohanty, P. (2002). Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. *Current Science*, pp.525-532.

Mills, L. J., Ferguson, J. C., & Keller, M. (2006). Cold-hardiness evaluation of grapevine buds and cane tissues. *American Journal of Enology and Viticulture*, *57*, 194–200.

Mittler R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance, *Trends in Plant Science*, *7*,405-410.

Moerschbacher, B. M. (1992). Plant peroxidases involvement in response to pathogens. In: S. S. Gnanamanickam, R. Balasubramanian, N. Anand, eds., Emerging Trends in Plant-Microbe Interactions. University of Madras, Chennai, pp. 186-190.

Moore, K., & Roberts, L. J. (1998). Measurement of lipid peroxidation. Free Radical Research, *28*, 659–71.

Moradi Heidarabad, S., & Ershadi, A. (2021). Evaluation of some physiological and biochemical responses of seven commercial grape cultivars to cold stress during the growing season. *Iranian Journal of Horticultural Science*, *52*(1), 213-224. (In Persian).

Morin, X., Ameglio, T., Ahas, R., KurzBesson, C., Lanta, V., Lebourgeois, F., Miglietta, F. & Chuine, I. (2007). Variation in cold hardiness and carbohydrate concentration from dormancy induction to bud burst among provenances of three European oak species. *Tree Physiology*, *27*, 817-825.

Morita, Y., Nakamori, S., & Takagi, H. (2002). Effect of proline and arginine metabolism on freezing stress of Saccharomyces cerevisiae. *Journal of bioscience and bioengineering*, *94*(5), 390-394.

Nejatian M. A. (2013). Comparison of Cold-Resistance in Some Iranian and European Grape Cultivars. *Journal of Crop Production and Processing*, *3*(7), 157-171. (In Persian).

Pastori, G. M., & Foyer, C. H. (2002). Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of "redox" and abscisic acid-mediated controls. *Plant physiology*, *129*(2), 460-468.

Paul, E. R., & Gamet, S. (2008). Anatomy of the Freeze of 2007: Assessing Damage, Repair and Vineyard Restoration. University of Nebraska Viticulture Program, 35 p.

Pierquet, P., & Stushnoff, C. (1980). Relationship of low temperature exotherms to cold injury in *Vitis riparia* Michx. *American Journal of Enology and Viticulture*, *31*, 1–6.

Prasad, T. G. (1996). Mechanisms of chilling-induced oxidative stress injury and tolerance in developing maize seedling: changes in antioxidant system, oxidation of proteins and lipids, and protease activities. *Plant Journal*, 10, 1017–1026.

Rezaie, R., Abdollahi Mandoulakani, B., & Fattahi, M. (2020). Cold stress changes antioxidant defense system, phenylpropanoid contentsand expression of genes involved in their biosynthesis in *Ocimum basilicum* L. *Scientific Reports,* 10, 5290.

Ritonga, F. N., & Chen, S. (2020). Physiological and molecular mechanism involved in cold stress tolerance in plants. *Plants*, 9, 560.

Sattler, U., Calson, P., Boiteux, S., & Salles, B. (2000). Detection of oxidative base DNA damage by a newbiochemical assay. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 376, 26-33.

Shin, R., & Schachtman, D. (2004). Hydrogen peroxide mediates plant root response to nutrient deprivation. *Proceeding of the National Academy of Sciences of United States of America*, *101*, 8827-8832.

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.

Taylor, C. B. (1996). Proline and water deficit: Ups, Ins, and Outs. Plant Cell, *8*, 1221-1224.

Theocharis, A., Clément, C., & Barka, E. A. (2012). Physiological and molecular changes in plants grown at low temperatures. *Planta*, *235*, 1091 -1105.

Tomashow, M. F. (1999). Plant cold acclimation: freezing tolerance gene and regulatory mechanisms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, *50*, 571-599.

Tuteja, N. (2007). Mechanisms of high salinity tolerance in plants, Methods of Enzymology, *428*, 419-438.

Tuteja, N. (2009). Cold, Salinity, and Drought Stress, Plant Stress Biology, Hirt, H. WILEYVCH Verlag GmbH and Co. KGaA, Weinheim, pp.137-159.

Van Swaaij, A. C., Jacobsen, E., & Feenstra, W. J. (1985). Effect of cold hardening, wilting and exogenously applied proline on leaf proline content and frost tolerance of several genotypes of Solanum. *Physiologia Plantarum*, *64*(2), 230-236.

Wample, R. L., & Bary, A. (1992). Harvest date as a factor in carbohydrate storage and cold hardiness of 'Cabernet Sauvignon' grapevines. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, *117*, 32–36.

Wang, H., Blakeslee, J. J., Jones, M. L., Chapin, L. J., & Dami, I. E. (2020). Exogenous abscisic acid enhances physiological, metabolic, and transcriptional cold acclimation responses in greenhouse-grown grapevines. *Plant Science*. 110437.

Wang, Y., Wisniewski, M., Meilan, R., Cui, M., Webb, R., & Fuchigami, L. (2005). Overexpression of cytosolic ascorbate peroxidase in tomato confers tolerance to chilling and salt stress. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, *130*(2), 167-173.

Wanner, L.A., & Junttila, O. (1999). Cold-induced freezing tolerance in Arabidopsis. *Plant Physiology*, *120*, 391– 399.

Xu ShengChun, X. S., Li YongPing, L. Y., Hu Jin, H. J., Guan YaJing, G. Y., Ma WenGuang, M. W., Zheng YunYe, Z. Y., & Zhu ShuiJin, Z. S. (2010). Responses of antioxidant enzymes to chilling stress in tobacco seedlings. *Agricultural Sciences in China*, *9*(11), 1594-1601.

Yadav, S. K. (2010). Cold stress tolerance mechanisms in plants. A review. *Agronomy for sustainable development*. *30*(3), 515-527.

Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2006). Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. *57*, 781-803.

Yong Kim, S. H., Lim, M. R., Park, Y., Kim, Y. Won. S. O., Choi, K. G. & Yun, S. J. (2005). Enhanced antioxidant enzymes are associated with reduced hydrogen peroxide in barely roots under saline stress. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, *38*, 218-224.

Yong, Z., Hao-Ru, T., & Ya, L. (2008). Variation in antioxidant enzyme activities of two strawberry cultivars with short-term low temperature stress. *Journal of Agricultural Sciences*, *4*, 456-462.

Zhang, H., Zhao, Y., & Zhu, J. K. (2020). Thriving under stress: how plants balance growth and the stress response. *Developmental Cell*, *55*(5), 529-54