به‌زراعی کشاورزی
دوره ۱۶ ■ شماره ۴ ■ زمستان ۱۳۹۳
صفحه‌های ۱۰۱۳-۹۹۹

تغییرات فصلی در محتوای پروتئین‌های محلول، فنول‌کل و مالون‌دی‌آلدهید و ارتباط آنها با مقاومت به سرمای برخی از ارقام تاک

روح‌اله کریمی[۱]، احمد ارشادی[۲]* محمود اثنی‌عشری[۳] و مسعود مشهدی اکبر بوجار[۴]

۱. استادیار گروه مهندسی فضای سبز، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه ملایر، ملایر، ایران
۲. دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران
۳. استاد گروه علوم باغبانی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران
۴. دانشیار گروه بیوشیمی، دانشکدهٔ علوم، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

تاریخ وصول مقاله: ۱۳۹۲/۰۹/۲۹ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۲/۱۲/۲۶

چکیده

در این پژوهش، مقاومت به سرمای ۱۵ رقم تاک با دو روش آزمون رنگ‌آمیزی تترازولیوم و ارزیابی سبز شدن جوانه‌ها پس از انجماد، طی شش ماه از شروع سازگاری به سرما در جوانه‌ها تا زمان خروج از سازگاری بررسی شد. همچنین الگوی تغییرات فصلی غلظت پروتئین‌های محلول، فنول کل و مالون‌دی‌آلدهید طی این مدت بررسی شد. اختلاف معناداری بین مقاومت به سرمای ارقام در تمامی مراحل اندازه‌گیری در سطح ۱ درصد مشاهده شد. بیشترین مقاومت به سرمای برآوردشده در دی‌ماه مربوط به رقم‌های 'بیدانه‌قرمز' و 'خلیلی' (به‌ترتیب با LT_{50} برابر با ۲۲- و ۲۱/۶- درجهٔ سانتی‌گراد) و کمترین مقاومت مربوط به رقم‌های 'روبی' و 'پرلت' (به‌ترتیب با LT_{50} برابر با ۱۶/۱- و ۱۶/۹- درجهٔ سانتی‌گراد) بود. با افزایش سازگاری به سرما، غلظت پروتئین‌های محلول و فنول کل در ارقام مورد بررسی افزایش یافت و در دی‌ماه به حداکثر رسید. غلظت این ترکیبات در ارقام مقاوم به سرما از قبیل 'بیدانه‌قرمز' و 'خلیلی' بیش از ارقام دیگر بود که حاکی از ارتباط مثبت این ترکیبات با مقاومت به سرما است. غلظت مالون‌دی‌آلدهید حاصل از پراکسیداسیون لیپیدهای غشا در ابتدا و انتهای فصل رکود کمتر از مقدار آن در دی‌ماه بود. غلظت مالون‌دی‌آلدهید در ارقام مقاوم به سرمای 'خلیلی' و 'بیدانه‌قرمز' در مرحلهٔ رکود عمیق کمتر از ارقام حساس به سرما نظیر 'روبی'، 'پرلت' و 'یاقوتی' بود. نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که تجمع بیشتر پروتئین‌های محلول و ترکیبات فنولی در ارقام مقاوم، ضمن حفظ پایداری غشا در دمای کم، به افزایش تحمل به یخ‌زدگی در آنها منجر شده است.

کلیدواژه‌ها: پراکسیداسیون غشا، تترازولیوم، تحمل به یخ‌زدگی، سازگاری به سرما، سنجش سبز شدن جوانه.

* نویسنده مسئول Email: Ershadi@basu.ac.ir

۱. مقدمه

سرما یکی از عوامل مهم و تأثیرگذار بر مدیریت کشت و تولید تاک[1] است. اغلب ارقام تاک اروپایی نیاز سرمایی کمی (۱۰۰-۵۰۰ ساعت) دارند و زودگلدهی سبب تحمیل صدمات یخ‌زدگی به این ارقام می‌شود [۱۴]. ارقام این گونه در دمای کمتر از ۲۵- درجهٔ سانتی‌گراد از بین می‌روند، اما درجات تحمل یخ‌زدگی بین آنها بسته به مرحلهٔ فنولوژیکی، محل باغ و عملیات باغی تغییر می‌کند [۲۵].

سازگاری به سرما مستلزم تغییر جنبه‌های بیوشیمیایی از قبیل محتوای پروتئین‌های محلول، فنول کل، مالون‌دی‌آلدهید و تنظیم‌کننده‌های اسمزی از قبیل کربوهیدرات‌های محلول و پرولین است [۱۳، ۱۷، ۳۰، ۴۰]. تغییر در بیان ژن‌ها طی مرحلهٔ سازگاری به سرما به تغییرات عمده‌ای در مقدار و الگوی تولید پروتئین‌های غشا می‌انجامد که این تغییرات سبب واکنش سریع گیاه به دمای کم و حفظ ساختار سلول از دهیدراسیون ناشی از انجماد می‌شوند [۳۶]. این تغییرات شامل تولید پروتئین‌های ترمیم‌کنندهٔ غشا، پروتئین‌های مرتبط با تنش‌های اسمزی و پروتئین‌هایی با وظیفهٔ نامشخص است [۳۸]. ارتباط بین مقادیر پروتئین‌های محلول و تحمل یخ‌زدگی در گیاهان مختلف از قبیل زیتون [۱۳]، تاک [۲۰، ۴۰] و عناب [۱۹] مشاهده شده است. همچنین سازگاری به سرما موجب تجمع ترکیبات فنولی می‌شود که این ترکیبات به‌طور مثبت با ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه ارتباط دارند [۶]. پلیمرهای فنولی از قبیل لیگنین و سوبرین در جوانه‌های گل ارقام مقاوم به سرمای آزالیا، از پیشرفت بلورهای یخ موجود در شاخه و فلس‌ها به درون سرآغازه‌های[2] گل جلوگیری می‌کنند [۱۰]. رسوب ترکیبات فنولی از قبیل لیگنین با افزودن درجهٔ چوبی شدن بافت‌ها در جوانه‌های تاک [۲۲] و سیب [۲۱] و نیز رسوب سوبرین در تاک [۲۸] و صنوبر [۲۳] در مواجهه با سرما، سبب افزایش مقاومت این درختان به سرما شد.

یکی از مهم‌ترین آسیب‌های تنش سرما، وقوع پراکسیداسیون در لیپیدهای غشا است که سبب تغییر سیالیت، انسجام و نفوذپذیری غشا می‌شود [۳۶]. مالون‌دی‌آلدهید[3] به‌عنوان یک نشانگر زیستی حاصل از تخریب غشاها به‌طور وسیع برای بررسی مقاومت به سرما استفاده شده است [۱۷، ۳۷، ۴۰]. یکی از روش‌های ممکن برای اندازه‌گیری دمای کشندهٔ جوانه‌های تاک طی مرحلهٔ شروع رکود تا خاتمهٔ آن، اعمال تنش سرمای مصنوعی است که برای پیش‌بینی صدمات بالقوهٔ ناشی از یخ‌زدگی مؤثر است [۱۴]. یکی از این روش‌ها، آزمون رنگ‌آمیزی تترازولیوم[4] و ارزیابی سبز شدن جوانه‌ها بعد از انجماد[5] است [۱۹]. روش رنگ‌آمیزی تترازولیوم به‌طور موفقیت‌آمیزی به‌منظور ارزیابی مقاومت به سرمای جوانه و شاخهٔ گیاهان مختلف از قبیل تاک‌فرنگی [۳۴]، تاک [۱] و انار [۱۸] استفاده شده است. شمارش جوانه‌های سبزشده بعد از سرمادهی مصنوعی نشان‌دهندهٔ توانایی یک رقم برای تحمل دمای کم و معیاری قابل اعتماد برای مقایسهٔ مقاومت به سرمای ارقام است [۴، ۱۵، ۲۶]. در کنار این تکنیک‌ها، بررسی روند تغییرات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی مرتبط با سرما می‌تواند برای تحلیل جامع‌تر ظرفیت تحمل بافت‌های گیاهان از جمله تاک به تنش یخ‌زدگی در یک منطقهٔ معین به‌کار گرفته شود [۱۹، ۲۰، ۲۹،۴۰].

غربالگری ارقام بومی براساس مقاومت به سرما و شناخت سازوکارهای درگیر در آن با هدف انتخاب ارقام مناسب یکی از اولویت‌های مهم در برنامه‌های به‌نژادی و به‌زراعی تاک در مناطق سردسیر است که تاکنون به‌طور

1. *Vitis vinifera* L.
2. Primordia
3. Malondialdehyde(MDA)
4. Tetrazolium Stain Test (TST)
5. Post Freezing Budbreak Assay (PFBA)

جدی و گسترده انجام نشده است. استفاده از ارقام مقاوم یکی از راهکارهای منطقی و کم‌هزینه برای تولید پایدار در هر منطقه است. بنابراین هدف پژوهش حاضر، ارزیابی مقاومت به سرمای ۱۵ رقم تجاری تاک با استفاده از آزمون رنگ‌آمیزی تترازولیوم و روش ارزیابی سبز شدن جوانه پس از انجماد طی چهار مرحله بود و روند تغییرات پروتئین‌های محلول (در همهٔ ارقام)، فنول کل و مالون‌دی‌آلدهید (در شش رقم با مقاومت به سرمای متفاوت) و رابطهٔ آنها با مقاومت به سرما نیز طی شش مرحله (آبان تا فروردین) بررسی شد.

۲. مواد و روش‌ها

در این پژوهش، پانزده رقم تجاری تاک شامل 'بیدانه‌سفید'، 'بیدانه‌قرمز'، 'پرلت'، 'تامسون‌سیدلس'، 'تبرزه'، 'خلیلی'، 'ریش بابا'، 'روبی'، 'شاهانی'، 'صاحبی'، 'عسگری'، 'فخری'، 'گزنه‌ای'، 'لعل' و 'یاقوتی' از یک تاکستان دوازده‌ساله واقع در ایستگاه تحقیقات انگور ملایر انتخاب و طی شش مرحلهٔ زمانی و در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با پنج تکرار (هر تکرار شامل یک بوته تاک) ارزیابی شد (جدول ۱). نتایج مربوط به مقاومت به سرمای ارقام 'تبرزه' و 'گزنه‌ای' در آبان‌ماه مخدوش بود و در این مقاله مطرح نشد. بوته‌های سالم و با رشد یکنواخت انتخاب شد و در هر مرحله به‌ازای هر تیمار دمایی از اطراف بوته‌ها پنج شاخه به‌طول ۲۰-۲۵ سانتی‌متر از گره‌های میانی شاخه‌های یکساله انتخاب و جمع‌آوری شد. شاخه‌ها پس از اتیکت‌گذاری، درون حولهٔ کاغذی مرطوب پیچیده شده و بلافاصله با یخدان یونولیتی برای ارزیابی‌های بعدی به آزمایشگاه باغبانی دانشگاه بوعلی سینا منتقل شدند.

به‌منظور حذف آلودگی‌های سطحی، شاخه‌های یکساله با آب مقطر شست‌وشو شدند. پس از حذف رطوبت اضافی با دستمال حوله‌ای، پنج شاخه از هر رقم درون کیسه فریزرهای مجزا گذاشته و در معرض تیمارهای سرمایی مختلف در یک اتاقک سرمایی ترموگرادیان قرار داده شد. تیمارهای سرمایی براساس دمای پیش‌تیمار، سه روز قبل از شروع آزمایش اصلی تعیین شد که در آبان و فروردین شامل ۴-، ۶-، ۱۰-، ۱۴- و ۱۸- درجهٔ سانتی‌گراد و در دی و اسفندماه شامل ۱۲-، ۱۶-، ۲۰-، ۲۴- و ۲۸- درجهٔ سانتی‌گراد بود. دمای شروع تیمار سرمایی براساس دمای محیط در روز نمونه‌برداری تعیین و روند کاهش دمای اتاقک سرمایی ۲ درجهٔ سانتی‌گراد در هر ساعت بود. نمونه‌های شاخه به‌مدت یک ساعت در تیمار نهایی سرما نگهداری و سپس از دستگاه خارج شدند.

جدول ۱. مقادیر حداقل، حداکثر و میانگین دمای روزانه ثبت‌شده توسط ایستگاه هواشناسی ملایر در زمان نمونه‌برداری (۱۳۹۰-۹۱)

دما	۲۰ آبان	۲۵ آذر	۲۶ دی	۲۴ بهمن	۲۲ اسفند	۲۵ فروردین
حداکثر دما (°C)	۱۳/۶	۹	۸	۸	۱۴/۸	۱۵/۴
حداقل دما (°C)	-۰/۲	-۴/۴	-۱۰	-۷	-۷	۷/۶
میانگین دما (°C)	۶/۹	۲/۴	-۰/۸	۰/۶	۳/۸	۱۱/۹

برای آزمون رنگ‌آمیزی تترازولیوم، بعد از اعمال تیمارهای سرمایی، شاخه‌ها از اتاقک سرمایی خارج شده و به‌منظور ذوب شدن تدریجی ابتدا دو ساعت در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد و سپس سه ساعت در دمای اتاق قرار داده شدند. در تاک جوانهٔ اولیه در مقایسه با جوانه‌های دوم و سوم به سرما حساس‌تر است [۱۴]. به‌همین دلیل، برای تعیین درصد مرگ جوانه‌ها، پس از جدا کردن جوانه‌ها از بافت شاخه، با تیغ اسکالپل یک برش نازک عرضی از نوک جوانه گرفته شد تا بافت جوانهٔ اولیه در معرض مستقیم رنگ تترازولیوم قرار گیرد. سپس در هر تیمار سرمایی پنج تکرار از هر رقم (هر کدام حاوی سه جوانه) در داخل لولهٔ آزمایش حاوی ۵ میلی‌لیتر محلول ۱ درصد تترازولیوم (۵، ۳، ۲ تری‌فنیل تترازولیوم کلراید) حاوی بافر فسفات (اسیدیته برابر ۷/۳) غوطه‌ور شد. پس از دو ساعت تکان دادن، لوله‌های حاوی محلول تترازولیوم و جوانه به‌مدت ۲۴ ساعت در محیط تاریک در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. معیار ارزیابی زنده بودن، تشکیل رنگ قرمز در جوانهٔ اولیه بود که درنهایت با استفاده از بینوکولر (با بزرگنمایی ۴۰) تشخیص داده شد. درصد مرگ جوانه‌ها با تقسیم جوانه‌های مرده به کل جوانه‌ها مشخص شد [۳۳، ۳۴].

به‌منظور ارزیابی مقاومت به سرمای بهارهٔ ارقام با آزمون سبز شدن جوانه‌ها پس از انجماد، در آخرین مرحله از نمونه‌برداری در اواخر فروردین، پنج قلمهٔ ۱۰-۱۵ سانتی‌متری (حاوی سه جوانه) از هر رقم به هر تیمار سرمایی مربوط به فروردین مشابه روش قبل اختصاص داده شد. بعد از اعمال تیمارهای سرمایی، قلمه‌های سرمادیدهٔ مربوط به هر تیمار به‌مدت پنج روز در دمای ۶ درجهٔ سانتی‌گراد در بستری مرطوب قرار داده شد تا از تکمیل خواب جوانه‌ها اطمینان حاصل شود. سپس قلمه‌ها در گلدان‌های پلاستیکی حاوی مخلوط سه به یک پرلایت و پیت خزه (حجم به حجم) کاشته و در گلخانهٔ تحقیقاتی گروه باغبانی با شرایط دمایی ۲۰ و ۱۵ درجهٔ سانتی‌گراد (روز/شب) قرار داده شدند. در این روش، معیار ارزیابی مقاومت به سرمای ارقام، سبز شدن جوانهٔ انتهایی پس از گذشت یک ماه از اعمال تیمارهای سرمایی بود. قلمه‌هایی که جوانهٔ انتهایی در آنها سبز نشده بود مرده فرض شدند. ازاین‌رو درصد سبز شدن جوانه‌ها با تقسیم تعداد قلمه‌های حاوی جوانهٔ انتهایی سبزشده به کل قلمه‌ها تعیین شد [۵].

برای اندازه‌گیری پروتئین‌های محلول ابتدا ۰/۵ گرم بافت منجمدشدهٔ جوانه با ۵ میلی‌لیتر بافر استخراج (تریس با غلظت ۱ میلی‌مولار و اسیدیتهٔ ۷)، در هاون چینی کاملاً له شده و این مخلوط به‌مدت ۲۰ دقیقه با دور ۶۰۰۰g سانتریفیوژ شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول روشناور با ۵ میلی‌لیتر معرف بیورد [(۱۰ درصد اسید استیک گلاسیال + ۲۵ درصد اتانول + ۶۵ درصد آب مقطر + ۰/۱ درصد (حجم/وزن) محلول کوماسی بریلیانت بلوجی[1] (۲۵۰)] مخلوط و جذب آن با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل کری ۱۰۰، استرالیا)[2] در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت شد [۷]. با استفاده از منحنی استاندارد تهیه‌شده از غلظت‌های مختلف آلبومین گاوی، غلظت پروتئین‌های محلول (میلی‌گرم در گرم وزن تر) محاسبه شد.

پراکسیداسیون لیپیدهای غشا براساس غلظت مالون‌دی‌آلدهید تولیدشده در اثر آسیب به غشا و واکنش آن با تیوباربیتوریک اسید که ترکیب رنگی تیوباربیتوریک اسید- مالون دی‌آلدهید تشکیل می‌دهد، اندازه‌گیری شد [۹]. در این روش، ۰/۵ گرم از بافت تازهٔ جوانه در هاون چینی حاوی ۵ میلی‌لیتر محلول تری‌کلرو استیک اسید ۲۰ درصد، حاوی ۰/۵ درصد تیوباربیتوریک اسید، آسیاب شده و عصارهٔ به‌دست‌آمده به‌مدت ۱۵ دقیقه با دور ۶۰۰۰g

1. Coomassie Brilliant Blue G
2. Cary 100, Australia

سانتریفیوژ شد. محلول رویی به‌مدت ۲۵ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۸۰ درجهٔ سانتی‌گراد گذاشته شد و پس از کاهش فوری دمای آن با یخ خردشده، به‌مدت ۵ دقیقه با همان سرعت قبل سانتریفیوژ شد. برای حذف اثر ترکیبات مزاحم، جذب نمونه‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر ($A_{۶۰۰}$) قرائت شده و از مقدار جذب آنها در طول موج ۵۳۲ نانومتر ($A_{۵۳۲}$) کم شد. غلظت نهایی مالون‌دی‌آلدهید با استفاده از معادلهٔ زیر محاسبه شد [۸]:

(۱)

غلظت مالون‌دی‌آلدهید (میکرو مول در گرم وزن تر) =

$[(A_{۵۳۲}- A_{۶۰۰})/۱۵۵]\times۱۰۰۰$

استخراج و اندازه‌گیری فنول کل با کمی تغییر نسبت به روش ولی‌اوغلو[1] و همکاران صورت گرفت [۳۹]. ابتدا ۰/۵ گرم از بافت منجمدشدهٔ جوانه در ۵ میلی‌لیتر متانول ۸۵ درصد حل و به‌مدت ۱۰ دقیقه با دور ۶۰۰۰g سانتریفیوژ شد. در مرحلهٔ بعد، ۳۰۰ میکرولیتر از عصارهٔ متانولی با ۱۰۰۰ میکرولیتر محلول ۱۰ درصد معرف فولین- سیوکالتیو[2] مخلوط و ۵ دقیقه بعد، مقدار ۱۰۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم ۷ درصد نیز به آن اضافه شد. بعد از ۲۰ دقیقه جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۶۵ نانومتر قرائت شد. برای رسم منحنی استاندارد از اسید گالیک در غلظت‌های ۱۰۰-۵۰۰ میکروگرم در لیتر استفاده شد. محتوای فنول کل براساس میلی‌گرم اسید گالیک در وزن تر بیان شد.

محتوای پروتئین‌های محلول طی چهار مرحله (آبان، دی، اسفند و فروردین و در تمام ارقام) و مقادیر فنول کل و مالون‌دی‌آلدهید طی شش مرحله هر ماه از آبان تا فروردین و در شش رقم 'خلیلی' و 'بیدانه‌قرمز' (به‌عنوان ارقام مقاوم)، 'عسگری' و 'لعل' (به‌عنوان ارقام نیمه‌مقاوم) و 'یاقوتی' و 'پرلت' (به‌عنوان ارقام حساس به سرما) بدون اعمال سرمای مصنوعی و پس از تجربهٔ سرمای طبیعی در هر مرحله تعیین شد. مقاومت به سرما براساس شاخص LT_{50}[3] (در مورد آزمون رنگ‌آمیزی تترازولیوم، دمایی که در آن ۵۰ درصد نمونه‌ها رنگ قرمز به خود نگرفتند و در مورد روش ارزیابی سبز شدن جوانه‌ها، دمایی که در آن ۵۰ درصد قلمه‌ها قادر به سبز کردن جوانه‌های انتهایی نبودند) با استفاده از نرم‌افزار اکسل تعیین شد [۱۵]. تجزیهٔ واریانس با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS (نسخهٔ ۹/۱) (دستورالعمل GLM) و مقایسهٔ میانگین‌ها به‌روش آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح ۰/۰۵ انجام گرفت. همچنین همبستگی بین شاخص‌های بیوشیمیایی و مقادیر LT_{50} برآوردشده با دو روش آزمون رنگ‌آمیزی تترازولیوم و ارزیابی سبز شدن جوانه بعد از انجماد با استفاده از ضریب همبستگی پیرسون (دستورالعمل CORR) انجام گرفت.

۳. نتایج و بحث

مقاومت به سرمای برآوردشدهٔ ارقام براساس روش رنگ‌آمیزی تترازولیوم در جدول ۲ نشان داده شده است. نتایج تجزیهٔ واریانس نشان داد که ارقام از نظر مقاومت به سرما در هر چهار مرحلهٔ ارزیابی آبان، دی، اسفند و فروردین اختلاف معناداری در سطح ۱ درصد دارند. براساس مقادیر LT_{50} برآوردشده در آبان، ارقام به دو دستهٔ کلی تقسیم شدند: ۱. ارقام مقاوم به سرما شامل 'خلیلی'، 'فخری'، 'بیدانه‌قرمز'، 'بیدانه‌سفید'، 'شاهانی'، 'لعل'، 'عسگری'، 'صاحبی'، 'یاقوتی'؛ ۲. ارقام حساس به سرما شامل 'ریش بابا'، 'روبی'، 'تامسون‌سیدلس' و 'پرلت'.

در مرحلهٔ سازگاری کامل به سرما در دی‌ماه مقاومت به سرمای ارقام به‌طور میانگین ۷/۴ درجهٔ سانتی‌گراد افزایش پیدا کرد. در این مرحله از نمونه‌برداری، کمترین

1. Velioglu
2. Folin-Ciocalteu
3. Lethal Temperature 50 (LT50)

مقادیر LT_{50} در ارقام 'بیدانه‌قرمز' و 'خلیلی' (به‌ترتیب با دمای LT_{50} برابر با ۲۲- و ۲۱/۶۴- درجهٔ سانتی‌گراد) مشاهده شد. ارقام 'روبی'، 'پرلت'، 'یاقوتی'، 'تامسون‌سیدلس' (به‌ترتیب با دمای LT_{50} برابر با ۱۶/۱۱- و ۱۶/۹۱-، ۱۷/۶۷- و ۱۷/۷۰- درجهٔ سانتی‌گراد) در دستهٔ ارقام حساس به سرما قرار داشتند و سایر ارقام از نظر مقاومت به سرما در میان این دو گروه قرار گرفتند. رقم 'ریش بابا' با افزایش چشمگیر سازگاری و مقاومت به سرما در دستهٔ ارقام با مقاومت متوسط قرار گرفت (جدول ۲). مقاومت به سرمای ارقام در اسفند کاهش جزئی (با میانگین ۱/۴ درجهٔ سانتی‌گراد) پیدا کرد و دسته‌بندی ارقام از نظر مقاومت به سرما تا حدود زیادی مشابه دی بود.

در فروردین همزمان با ازدست رفتن قدرت سازگاری، مقاومت به سرمای ارقام تا حد زیادی (با میانگین ۹/۵ درجهٔ سانتی‌گراد) کاهش یافت. البته ارقام از نظر سرعت ازدست دادن سازگاری، تفاوت داشتند. در این مرحله، ارقام در سه دستهٔ کلی ۱. مقاومت زیاد شامل رقم‌های 'بیدانه‌قرمز'، 'خلیلی'، 'فخری'، 'بیدانه‌سفید' و 'تبرزه'؛ ۲. مقاومت متوسط شامل رقم‌های 'گزنه‌ای'، 'شاهانی'، 'عسگری'، 'ریش‌بابا'، 'صاحبی'، 'لعل' و 'تامسون‌سیدلس'؛ و ۳. مقاومت کم شامل رقم‌های 'پرلت'، 'روبی' و 'یاقوتی' جای داده شدند.

روند سازگاری و میزان تحمل یخ‌زدگی بین گونه‌ها و ارقام درختان میوه متفاوت است که این امر می‌تواند ناشی از تفاوت‌های ژنتیکی مرتبط با مقاومت به سرما بین آنها باشد [۲۵]. در آبان‌ماه ارقام 'تامسون‌سیدلس'، 'پرلت'، 'روبی' و 'ریش بابا' مقاومت به سرمای کمتری نسبت به دیگر ارقام نشان دادند. در برخی ارقام رابطهٔ نسبی معکوس بین تاریخ رسیدن و برداشت میوه و مقاومت به سرما در اواسط پاییز مشاهده شد. برای مثال، رقم زودرس 'یاقوتی' در آبان‌ماه در دستهٔ ارقام نیمه‌مقاوم قرار گرفت، درحالی‌که در سایر زمان‌های نمونه‌برداری مقاومت به سرمای کمی نشان داد. البته استثناهایی هم در این زمینه مشاهده شد. برای مثال، با اینکه 'پرلت' رقمی زودرس است، زمان رسیدن تأثیری در مقاومت به سرمای این رقم در پاییز نداشت. رقم دیررس 'ریش بابا' به سرمای پاییزه حساس است، ولی در بقیهٔ مراحل نمونه‌برداری در دستهٔ ارقام مقاوم یا نیمه‌مقاوم قرار گرفت. ارتباط بین دیررس بودن و حساسیت به سرمای زودرس پاییزه قبلاً در درختان میوهٔ مختلف نظیر انار و تاک گزارش شده است [۱۸،۲۰].

براساس نتایج دیگر تحقیقات، روی ارزیابی مقاومت به سرمای چهار رقم تاک 'یاقوتی'، 'بیدانه‌سفید'، 'بیدانه‌قرمز' و 'کلاهداری' با استفاده از روش نشت یونی و ارزیابی رشد مجدد نیز نتایجی مشابه مطالعهٔ حاضر به‌دست آمد و ارقام 'یاقوتی' و 'بیدانه‌قرمز' به‌ترتیب حساس‌ترین و مقاوم‌ترین ارقام به سرما گزارش شدند [۴]. در تحقیقی دیگر، مقاومت به سرمای چهار رقم دانه‌دار ('فخری'، 'مولایی'، 'چفته' و 'سیاه قزوین') و چهار رقم بیدانهٔ تاک ('بیدانه‌سفید'، 'بیدانه‌قرمز'، 'عسگری' و 'یاقوتی')با روش ارزیابی قهوه‌ای شدن جوانه بررسی شد که در بین ارقام دانه‌دار، بیشترین مقاومت مربوط به رقم 'فخری' بود [۲] و در بین ارقام بیدانه، رقم 'بیدانه‌قرمز' مقاوم، ارقام 'بیدانه‌سفید' و 'عسگری' نیمه‌مقاوم و رقم 'یاقوتی' حساس‌ترین رقم به سرما بودند [۳] که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد. برخی منابع رقم 'تامسون‌سیدلس' را همان 'بیدانه‌سفید' یا بسیار شبیه به آن می‌دانند که البته در این تحقیق بین مقاومت به سرمای این دو رقم تفاوت زیادی وجود داشت.

مقاومت به سرمای ارقام در اسفند به‌طور میانگین ۱/۴ درجهٔ سانتی‌گراد کمتر از دی ماه بود. این اختلاف کم بین مقاومت به سرمای اندازه‌گیری‌شده در این مرحله با دی‌ماه ممکن است تا حدودی به‌دلیل افت شدید دما طی ۱۰ روز

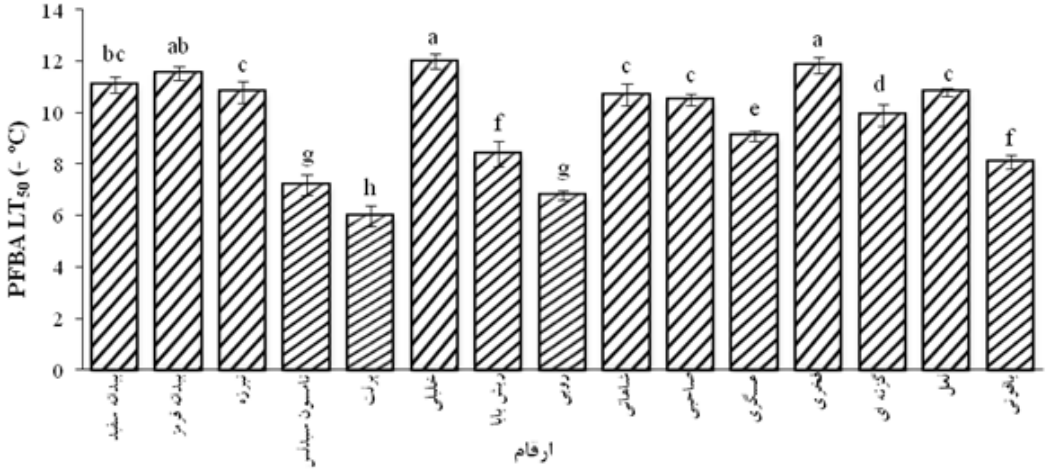
قبل از نمونه‌برداری تا ۵- درجهٔ سانتی‌گراد باشد که این موضوع سبب حفظ روند مقاومت به سرما یا افزایش کوتاه‌مدت آن در این مرحله از نمونه‌برداری شده است. ارتباط قوی بین میزان مقاومت به سرما و دمای محیط طی روزهای قبل از نمونه‌برداری در مطالعات سایر پژوهشگران نیز مشاهده شده است [۱۴، ۲۵]. در اواخر فروردین، همزمان با گرم شدن هوا و شکست خواب در جوانه‌ها، مقاومت به سرمای ارقام نیز کاهش زیادی یافت که این کاهش برحسب سرعت خروج از سازگاری در ارقام متفاوت بود. بیشترین و کمترین کاهش مقاومت به سرما در این مرحله به‌ترتیب مربوط به رقم‌های 'عسگری' (۱۱/۱ درجهٔ سانتی‌گراد) و 'فخری' (۸/۴ درجهٔ سانتی‌گراد) بود. درصورتی‌که یک مرحله ارزیابی در اردیبهشت انجام گیرد، اختلاف ارقام از نظر سرعت خروج از سازگاری بهتر مشخص خواهد شد (جدول ۲).

براساس تجزیهٔ واریانس نتایج حاصل از روش ارزیابی سبز شدن جوانه‌ها، اختلاف معناداری بین مقاومت به سرمای ارقام در سطح ۱ درصد مشاهده شد (شکل ۱). در ارقام حساس به سرما تیمارهای دمایی ۱۴- درجهٔ سانتی‌گراد و کمتر، سبب خسارت شدید جوانه‌ها شد و به اصطلاح جوانه‌ها کور ماندند و رشد جدید در آنها حاصل نشد، درحالی‌که در ارقام مقاوم، تیمار دمایی ۱۸- درجهٔ سانتی‌گراد موجب مرگ کامل همهٔ جوانه‌ها شد و در این تیمار سرمایی در هیچ کدام از ارقام مقاوم نیز باز شدن جوانه مشاهده نشد.

جدول ۲. مقایسهٔ میانگین مقاومت به سرمای برآوردشده به روش رنگ‌آمیزی تترازولیوم ($TST\ LT_{50}$) در ۱۵ رقم تاک طی ماه‌های آبان، دی، اسفند و فروردین

ارقام	آبان†	دی	اسفند	فروردین
	$TST\ LT_{50}$ (°C)			
بیدانه سفید	-۱۳/۸۳±۰/۸۵^{abc}	-۲۰/۸۲±۰/۷۶^{b}	-۱۹/۷۳±۰/۲۳^{bc}	-۱۰/۲۴±۰/۴۰^{cd}
بیدانه قرمز	-۱۳/۰۰±۰/۶۹^{bc}	-۲۲/۰۰±۰/۶۶^{a}	-۲۰/۷۶±۰/۴۰^{a}	-۱۱/۲۰±۰/۷۰^{a}
پرلت	-۹/۰۷±۰/۲۰^{g}	-۱۶/۹۱±۰/۲۶^{f}	-۱۵/۶۱±۰/۳۵^{g}	-۵/۵۰±۰/۴۰^{h}
تامسون سیدلس	-۸/۳۷±۰/۳۰^{g}	-۱۷/۶۷±۰/۲۵^{e}	-۱۶/۳۷±۰/۴۵^{f}	-۶/۷۰±۰/۱۰^{f}
تبرزه	-	-۲۰/۴۹±۰/۳۶^{bc}	-۱۹/۱۰±۰/۲۰^{bcd}	-۱۰/۱۰±۰/۱۷^{d}
خلیلی	-۱۴/۵۷±۰/۶۸^{a}	-۲۱/۶۴±۰/۲۰^{a}	-۱۹/۸۷±۰/۳۷^{b}	-۱۱/۱۰±۰/۲۰^{ab}
ریش بابا	-۱۰/۸۰±۰/۳۴^{f}	-۲۰/۵۰±۰/۲۰^{c}	-۱۹/۱۸±۰/۲۰^{bcd}	-۸/۵۰±۰/۴۱^{f}
روبی	-۱۰/۵۷±۰/۱۵^{f}	-۱۶/۱۱±۰/۱۰^{g}	-۱۴/۸۱±۰/۵۰^{h}	-۶/۲۰±۰/۲۳^{g}
شاهانی	-۱۳/۶۷±۰/۷۰^{abc}	-۱۹/۷۸±۰/۲۵^{cd}	-۱۹/۰۵±۰/۳۲^{cd}	-۸/۷۰±۰/۳۵^{f}
صاحبی	-۱۲/۶۷±۰/۷۰^{cd}	-۲۰/۱±۰/۳۶^{c}	-۱۷/۸±۰/۳۶^{e}	-۸/۴۰±۰/۴۰^{f}
عسگری	-۱۲/۷۷±۰/۸۵^{cd}	-۲۰/۷±۰/۴۶^{b}	-۱۹/۶۷±۰/۴۵^{bc}	-۸/۶۰±۰/۲۵^{f}
فخری	-۱۴/۱۰±۰/۵۲^{ab}	-۲۰/۰۷±۰/۴۹^{bc}	-۱۹/۰۷±۰/۰۵^{cd}	-۱۰/۶۶±۰/۳۱^{bc}
گزنه‌ای	-	-۲۰/۲۳±۰/۴۳^{bc}	-۱۸/۹±۰/۲۶^{d}	-۹/۵۰±۰/۲۳^{e}
لعل	-۱۲/۹۱±۰/۷۲^{cd}	-۱۹/۲۳±۰/۴۰^{d}	-۱۸/۱۳±۰/۶۱^{e}	-۸/۳۰±۰/۵۷^{f}
یاقوتی	-۱۱/۷۶±۰/۸۰^{de}	-۱۷/۷±۰/۲۶^{e}	-۱۶/۲۳±۰/۵۶^{fg}	-۶/۳۰±۰/۳۵^{g}
میانگین	-۱۲/۲±۰/۵۴	-۱۹/۶±۰/۴۲	-۱۸/۲±۰/۳۷	-۸/۷±۰/۳۱

† – داده‌ها میانگین پنج تکرار ±SE هستند. میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون فاقد اختلاف آماری در سطح ۵ درصدند.



شکل ۱. مقایسهٔ میانگین LT_{50} برآوردشده با روش ارزیابی سبز شدن جوانه‌ها بعد از انجماد (PFBA) در پانزده رقم تاک در فروردین. داده‌ها میانگین پنج تکرار ±SE است. حروف مشابه در هر ستون نشان‌دهندهٔ نبود تفاوت معنادار بین ارقام در سطح ۵ درصد است.

جدول ۳. همبستگی بین مقاومت به سرمای برآوردشده به‌روش تترازولیوم ($TST\ LT_{50}$) و روش ارزیابی سبز شدن جوانه‌ها بعد از انجماد ($PFBA\ LT_{50}$) با پروتئین‌های محلول، فنول کل و مالون‌دی‌آلدهید در جوانهٔ ارقام تاک طی چهار مرحلهٔ نمونه‌برداری

متغیرها	آبان	دی	اسفند	فروردین
		پروتئین‌های محلول†		
$TST\ LT_{50}$	−۰/۷۶**	−۰/۸۲**	−۰/۸۴**	−۰/۸۲**
$PFBA\ LT_{50}$	–	–	–	−۰/۷۳**
		فنول کل		
$TST\ LT_{50}$	−۰/۷۹**	−۰/۹۲**	−۰/۸۷**	−۰/۸۵**
$PFBA\ LT_{50}$	–	–	–	−۰/۷۹**
		مالون‌دی‌آلدهید		
$TST\ LT_{50}$	**۰/۸۷	**۰/۹۲	۰/۸۵**	۰/۸۳**
$PFBA\ LT_{50}$	–	–	–	۰/۸۴**
		$PFBA\ LT_{50}$		
$TST\ LT_{50}$	–	–	–	**۰/۹۱

† : تعداد مشاهدات در هر مرحله برای پروتئین‌های محلول، TST و PFBA، ۷۵ عدد و برای فنول کل و مالون‌دی‌آلدهید ۳۰ عدد بود.
**: معنادار در سطح ۰/۰۱.

به‌منظور سهولت مقایسهٔ ارقام، مقاومت به سرما به‌صورت LT_{50} بیان شد. براساس این شاخص که به‌نوعی بیانگر مقاومت به سرمای بهاره است، ارقام به سه دسته تقسیم شدند: ۱. ارقام مقاوم شامل 'خلیلی'، 'فخری'، 'بیدانه‌قرمز'، 'بیدانه‌سفید'، 'شاهانی'، 'تبرزه'، 'لعل' و 'صاحبی'؛ ۲. ارقام نیمه‌مقاوم شامل 'گزنه‌ای'، 'عسگری'، 'ریش بابا' و 'یاقوتی'؛ و ۳. ارقام حساس شامل 'تامسون‌سیدلس'، 'روبی' و 'پرلت'. همبستگی قوی (r=۰/۹۱) بین نتایج حاصل از این روش با نتایج به‌دست‌آمده از روش رنگ‌آمیزی تترازولیوم در آخرین

مرحله از نمونه‌برداری وجود داشت که در سطح ۱ درصد معنادار بود (جدول ۳).

بین غلظت پروتئین‌های محلول ارقام در تمامی مراحل نمونه‌برداری اختلاف معناداری مشاهده شد (P≤۰/۰۱). به‌طور کلی، غلظت پروتئین‌های محلول از آبان تا دی با توسعهٔ دورهٔ رکود افزایش یافت و در اسفند با شکست خواب در جوانه‌ها، غلظت پروتئین‌های محلول کاهش یافت و روند کاهشی تا فروردین ادامه داشت (جدول ۴). در مرحلهٔ سازگاری به سرما، ارقام 'خلیلی'، 'بیدانه‌قرمز'، 'فخری' و 'بیدانه‌سفید' بیشترین غلظت پروتئین‌های محلول را داشتند، ولی این مقدار در ارقام 'پرلت'، 'روبی' و 'ریش بابا' کم بود (جدول ۴) که با میزان مقاومت به سرمای این ارقام همبستگی داشت (جدول ۳)، اما در دی‌ماه با افزایش سازگاری درختان به سرما در همهٔ ارقام غلظت پروتئین‌های محلول به‌مقدار زیادی افزایش یافت و اکثر ارقام با مقاومت زیاد و متوسط، تفاوتی از این نظر نشان ندادند. البته در این مرحله نیز کمترین مقدار پروتئین‌های محلول در ارقام 'پرلت' و 'روبی' مشاهده شد (جدول ۴).

جدول ۴. تغییرات در غلظت پروتئین‌های محلول در جوانهٔ ۱۵ رقم تاک طی یک دورهٔ شش‌ماههٔ رکود

ارقام	غلظت پروتئین‌های محلول (mg/g FW)			
	آبان†	دی	اسفند	فروردین
بیدانه سفید	۱۱/۴۷±۰/۱۳^{bc}	۱۹/۷۳±۰/۱۴^{ab}	۱۱/۱۱±۰/۱۷^{b}	۶/۷۷±۰/۲۳^{cd}
بیدانه قرمز	۱۲/۱۴±۰/۱۷^{ab}	۲۰/۱۵±۰/۳۴^{a}	۱۳/۰۱±۰/۳۳^{a}	۷/۴۱±۰/۱۲^{ab}
پرلت	۸/۸۵±۰/۱۰^{fg}	۱۵/۶۸±۰/۲۴^{ef}	۸/۳۵±۰/۵۰^{f}	۴/۰۱±۰/۱۴^{g}
تامسون سیدلس	۱۰/۰۰±۰/۲۴^{def}	۱۸/۷۲±۰/۱۳^{cd}	۸/۷۳±۰/۲۲^{ef}	۵/۱۶±۰/۱۷^{f}
تبرزه	–	۱۸/۹۲±۰/۲۵^{bc}	۱۱/۲۳±۰/۳۶^{b}	۶/۸±۰/۱۶^{cd}
خلیلی	۱۶/۹۷±۰/۳۰^{a}	۱۹/۹۲±۰/۱۹^{a}	۱۳/۴۹±۰/۱۷^{a}	۷/۳۱±۰/۳۲^{abc}
ریش بابا	۹/۱۳±۰/۲۱^{fg}	۱۶/۹۳±۰/۱۸^{ed}	۹/۵۳±۰/۱۰^{def}	۶/۴±۰/۴۳^{d}
روبی	۸/۲۵±۰/۱۴^{g}	۱۴/۸۷±۰/۴۰^{f}	۸/۹۶±۰/۱۵^{def}	۵/۶۷±۰/۱۶^{e}
شاهانی	۱۱/۶۹±۰/۲۲^{bc}	۱۸/۷۴±۰/۱۲^{abc}	۱۰/۷۴±۰/۲۳^{bc}	۷/۱۳±۰/۱۰^{abc}
صاحبی	۱۱/۱۷±۰/۱۳^{cde}	۱۸/۸۸±۰/۲۱^{abc}	۹/۹۶±۰/۱۶^{bcd}	۵/۷۴±۰/۲۰^{e}
عسگری	۹/۸۲±۰/۲۱^{ef}	۱۸/۲۱±۰/۲۰^{bcd}	۱۱/۱۶±۰/۱۰^{b}	۶/۲۹±۰/۱۲^{d}
فخری	۱۲/۷۹±۰/۲۷^{b}	۱۹/۸۷±۰/۱۴^{a}	۱۳/۲۰±۰/۳۴^{a}	۶/۹۶±۰/۱۲^{bc}
گزنه ای	--	۱۹/۲۳±۰/۳۱^{bc}	۱۰/۹۹±۰/۴۱^{b}	۷/۵۰±۰/۰۹^{a}
لعل	۱۱/۲۸±۰/۲۸^{cd}	۱۹/۲۲±۰/۳۵^{abc}	۱۰/۲۰±۰/۱۴^{bcd}	۶/۸۲±۰/۰۸^{cd}
یاقوتی	۱۰/۸۶±۰/۳۳^{cde}	۱۷/۶۶±۰/۲۳^{cd}	۸/۸۲±۰/۳۵^{def}	۴/۴۵±۰/۳۲^{g}
میانگین	۱۰/۲۵±۰/۲۱	۱۸/۳۵±۰/۲۴	۱۰/۵۶ ±/۲۷	۶/۳۰ ±۰/۲۲

† – داده‌ها میانگین پنج تکرار ±SE است. میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون فاقد اختلاف آماری در سطح ۵ درصدند.

غلظت پروتئین‌های محلول در اسفند، تا حد زیادی در اکثر ارقام کاهش یافت که این روند کاهشی در ارقام 'تامسون‌سیدلس' و 'یاقوتی' بیشتر از دیگر ارقام بود. در اسفند و فروردین رتبهٔ ارقام از نظر غلظت پروتئین‌های محلول تفاوت چندانی نداشت و ارقام حساس 'پرلت'، 'روبی'، 'تامسون‌سیدلس' و 'یاقوتی' کمترین مقادیر را نشان دادند (جدول ۴). بین مقدار تجمع پروتئین‌های محلول و حساسیت به سرمای ارقام در تمامی مراحل همبستگی منفی و معناداری مشاهده شد، اما این همبستگی در آبان‌ماه کمتر از سایر مراحل بود (جدول ۳) و حداکثر مقاومت به سرما زمانی مشاهده شد که جوانه‌های ارقام دارای بیشترین مقدار پروتئین‌های محلول بودند.

رابطهٔ بین تغییرات فصلی در محتوای پروتئین‌های محلول در اندام‌های گیاهان دیگر از قبیل جوانه‌های تاک [۱، ۴۰]، زیتون [۱۳]، گلابی [۳۵] و عناب [۱۹] با مقاومت به سرما در این گیاهان مشاهده شده است. افزایش محتوای پروتئین‌ها به‌خصوص پروتئین‌های مرتبط با مقاومت به سرما نظیر دی‌هیدرین‌ها، سبب کاهش آثار ناشی از دهیدراسیون طی فرایند یخ‌زدگی برون‌سلولی می‌شود [۱۱]. تجمع پروتئین‌های محلول (مشابه تجمع قندهای محلول) یک عامل سازگاری برای کاهش آسیب‌های ناشی از دمای کم و درنتیجه افزایش تحمل یخ‌زدگی در ارقام تاک است، زیرا الگوی تغییر آن تابعی از الگوی تغییر دما است و در ارقام مقاوم بیشتر از ارقام حساس تاک تجمع می‌یابد [۲۰]. به‌نظر می‌رسد تجمع پروتئین‌های محلول سبب کاهش آب آزاد درون‌سلولی و به همان نسبت افزایش آب پیوندی می‌شود که این موضوع ضمن تغلیظ بیشتر سایر اسمولیت‌ها از یخ‌زدگی ناگهانی آب درون‌سلولی جلوگیری می‌کند. بنابراین ارقام با تجمع بیشتر پروتئین‌های محلول قادر به تحمل دماهای کمترند. کاهش پروتئین‌های محلول در فروردین ممکن است به‌دلیل حل شدن کالوز داخل آوندهای چوبی و برقراری ارتباط آوندی مجدد جوانه‌ها با سایر بافت‌ها و درنتیجه رقیق‌شدن محتوای پروتئین‌های محلول به‌علت شروع فعالیت ریشه‌ها و جذب آب در این مرحلهٔ فنولوژیکی باشد [۳۲]. همچنین کاهش محتوای پروتئین در این مرحله با افزایش فعالیت آنزیم پروتئین کیناز برای تأمین ترکیبات لازم برای تکمیل نمو جوانه‌ها در ارتباط است [۱۱، ۳۲]. نکتهٔ شایان توجه این است که در ارقام حساس، روند کاهش غلظت این ترکیبات بیشتر از ارقام مقاوم بود که ممکن است تا حدودی به سرعت پیشرفت در مراحل فنولوژیکی و خروج از مرحلهٔ سازگاری در این ارقام مرتبط باشد.

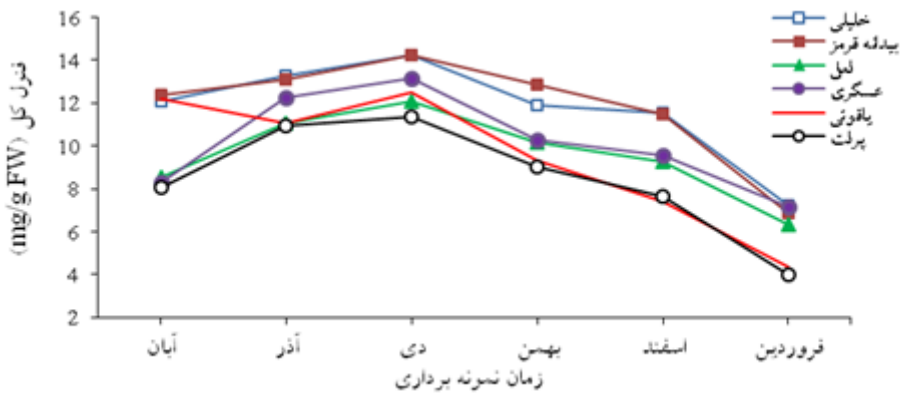
بین غلظت فنول کل اندازه‌گیری‌شده در شش رقم مورد بررسی در تمامی مراحل نمونه‌برداری اختلاف معناداری مشاهده شد ($P\leq ۰/۰۱$) (شکل ۲). مقدار فنول کل در همهٔ ارقام در راستای فرایند سازگاری به سرما روند افزایشی داشت و در آذر و دی همزمان با رکود عمیق به حداکثر خود رسید و همزمان با خروج از مرحلهٔ سازگاری شروع به کاهش کرد (شکل ۲). میانگین کلی غلظت فنول کل از آبان، آذر، دی، بهمن، اسفند و فروردین به‌ترتیب ۱۰/۳، ۱۲، ۱۲/۹، ۱۰/۶، ۹/۵ و ۶ میلی‌گرم در گرم وزن تر بود. بین غلظت فنول کل ارقام و مقاومت به سرما همبستگی قوی و معناداری مشاهده شد که بیشترین و کمترین همبستگی به‌ترتیب در دی و آبان دیده شد، به‌طوری‌که ارقام مقاوم به سرمای 'خلیلی' و 'بیدانه‌قرمز' دارای مقدار فنول کل بیشتری نسبت به ارقام حساس به سرمای 'پرلت' و 'یاقوتی' بودند و ارقام 'لعل' و 'عسگری' حد واسط آنها قرار گرفتند (شکل ۲).

ارقام مقاوم به سرمای زمستانهٔ تاک حاوی مقادیر بیشتری ترکیبات فنولی از قبیل تانن نسبت به ارقام حساس به سرما هستند [۲۴]. درختان سیب بومی مناطق سرد حاوی سطوح بالایی از اسید کلروژنیک بودند [۲۱].

افزایش ترکیبات فنولی طی مرحلهٔ سازگاری به سرما در پسته [۲۷]، تاک [۲۲] و سیب [۲۱] مشاهده شده است. فقدان مقاومت به سرما در ارقام دیررس تاک نیز به چوب‌پنبه‌ای شدن ناکافی بافت‌های جوانه و شاخه آن در این زمان نسبت داده شده است [۲۸].

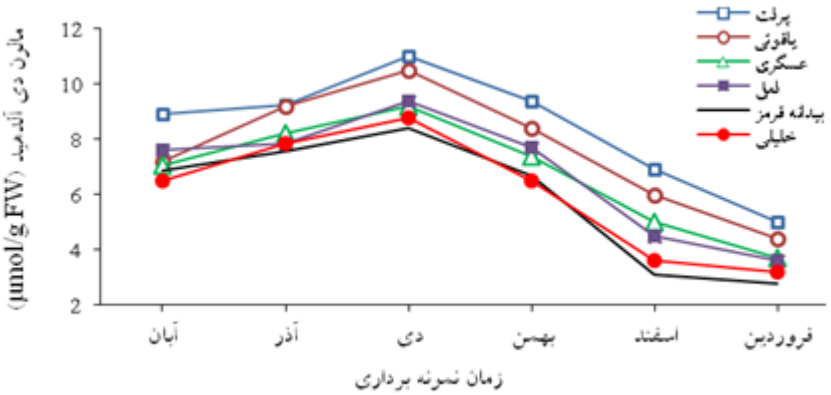
تحت تنش دمای کم، فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالاز افزایش پیدا می‌کند، ولی فعالیت آنزیم‌های اکسیدکنندهٔ ترکیبات فنولی محلول از قبیل پراکسیداز و پلی‌فنول اکسیداز کاهش می‌یابد [۲۷،۳۰]. این موضوع سبب افزایش تجمع ترکیبات فنولی محلول می‌شود و ممکن است به‌عنوان نوعی سازوکار سازگاری برای غلبه بر تنش اکسیداتیو ناشی از دمای کم در تاک عمل کند [۶]. حداکثر مقدار ترکیبات فنولی در مطالعهٔ حاضر در دی‌ماه همزمان با رکود عمیق زمستانه مشاهده شد که حاکی از ارتباط این ترکیبات با مقاومت به سرما و نقش حفاظتی آنها در جوانه‌های در حال خواب تاک است. طی مرحلهٔ خواب، چند بازدارندهٔ رشد شامل ترکیبات فنولی (کافئیک اسید، نارینجین، فلوریدزین و کوئرسیترین)[1] در جوانه‌های اغلب درختان تجمع می‌یابد و پس از دریافت سرمای کافی در زمستان، غلظت این ترکیبات در مرحلهٔ شکوفایی جوانه‌ها به حداقل می‌رسد [۱۲]. به‌نظر می‌رسد رسوب بیشتر ترکیبات فنولی در اپیدرم شاخه و فلس‌های جوانه در ارقام از پیشرفت بلورهای یخ موجود به درون بخش‌های داخلی جوانه جلوگیری می‌کند [۱۰].

غلظت مالون‌دی‌آلدهید به‌عنوان شاخص تنش اکسیداتیو وارد به لیپیدهای غشا طی سرما اندازه‌گیری شد. اختلاف معناداری ($P\leq ۰/۰۱$) بین غلظت مالون‌دی‌آلدهید تولیدشده در شش رقم مورد بررسی تحت تأثیر دمای محیط در تمامی مراحل نمونه‌برداری مشاهده شد. نتایج نشان داد که پراکسیداسیون غشا در همهٔ ارقام همراه با کاهش دما از آبان تا دی روند افزایشی داشت و در دی‌ماه همزمان با کاهش شدید دمای محیط به حداکثر خود رسید. در اسفند با افزایش دما، تولید مالون‌دی‌آلدهید روند کاهشی داشت و در اواخر فروردین به کمترین حد ممکن رسید. میانگین کلی غلظت مالون‌دی‌آلدهید در آبان، آذر، دی، بهمن، اسفند و فروردین به‌ترتیب ۷/۴، ۸/۳، ۹/۶، ۷/۷، ۴/۹ و ۳/۸ میکرومول در گرم وزن تر بود. بیشترین غلظت مالون‌دی‌آلدهید در ارقام 'پرلت' و 'یاقوتی' و کمترین آن در ارقام 'خلیلی' و 'بیدانه‌قرمز' مشاهده شد (شکل ۳).



شکل ۲. الگوی تغییر در غلظت فنول کل در شش رقم تاک طی شش مرحلهٔ نمونه‌برداری

1. Caffeic acid, Naringin, Phloridzin, Quercitrin



شکل ۳. الگوی تغییر در غلظت مالون‌دی‌آلدهید در شش رقم تاک طی شش مرحلهٔ نمونه‌برداری

بین غلظت مالون‌دی‌آلدهید و مقاومت به سرمای ارقام، همبستگی منفی قوی مشاهده شد که بیشترین و کمترین همبستگی به‌ترتیب در ماه‌های دی و فروردین به‌چشم خورد (جدول ۳). روند تغییرات فصلی تولید مالون‌دی‌آلدهید تاکنون در گیاهان چوبی خزان‌دار بررسی نشده است، ولی مشابه نتایج این تحقیق در مرکبات نیز گزارش شده است [۳۱]. ارقام مقاوم به سرمای 'خلیلی' و 'بیدانه‌قرمز' تحت دمای محیط باغ، مقادیر خیلی کمتری مالون‌دی‌آلدهید نسبت به ارقام حساس 'پرلت' و 'یاقوتی' تولید کردند و دو رقم 'عسگری' و 'لعل' در میان این دو دسته قرار گرفتند که نشان‌دهندهٔ تحمل به سرمای بیشتر ارقام 'خلیلی' و 'بیدانه‌قرمز' در برابر آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از تنش سرما است. تولید مالون‌دی‌آلدهید، حاصل تجزیهٔ زنجیرهٔ لیپیدهای غیراشباع در اثر فعالیت آنزیم لیپوکسی‌ژناز طی دمای کم است. توانایی یک رقم برای ایجاد تعادل بین آنزیم‌های تبدیل‌کنندهٔ اسیدهای چرب اشباع به نوع غیراشباع آن و آنزیم‌های اکسیدکنندهٔ اسیدهای چرب غیراشباع، عامل مهمی در کاهش پراکسیداسیون لیپیدهای غشا و درنتیجه افزایش مقاومت به سرمای آن رقم است. فعالیت آنزیم لیپوکسی‌ژناز و پراکسیداسیون لیپیدها در برگ‌های ذرت تحت دمای کم، افزایش یافت که حاکی از وقوع پراکسیداسیون لیپیدهای غشا توسط فعالیت آنزیم لیپوکسی‌ژناز در برگ‌های ذرت سرمازده است [۱۶]. ارتباط بین مقاومت به سرما و تولید مقادیر کمتر مالون‌دی‌آلدهید طی مواجهه با سرما در ارقام وحشی تاک [۴۰] عناب [۱۷] و قهوه [۱۱] نیز گزارش شده است که با نتایج مطالعهٔ حاضر مطابقت دارد. به‌نظر می‌رسد که تجمع پروتئین‌های محلول و فنول بیشتر، سبب افزایش انسجام غشاها، تولید مالون‌دی‌آلدهید کمتر و درنتیجه سازگاری بیشتر به دمای کم می‌شود که می‌توان آن را به‌عنوان یک شاخص تکمیل‌کننده در کنار دیگر شاخص‌های ارزیابی مقاومت به سرما در تاک به‌کار گرفت.

۴. نتیجه‌گیری

براساس مقادیر LT_{50} محاسبه‌شده با روش آزمون رنگ‌آمیزی تترازولیوم و سبز شدن جوانه‌ها، ارقام به سه دستهٔ مقاوم، نیمه‌مقاوم و حساس تقسیم شدند. بین میزان مقاومت به سرمای ارقام با تجمع پروتئین‌های محلول و فنول کل در تمام مراحل نمونه‌برداری ارتباط معناداری مشاهده شد، به‌طوری‌که ارقام با غلظت بیشتر پروتئین‌های محلول و فنول کل، مقاومت به سرمای بیشتری داشتند. با کاهش دما پراکسیداسیون غشا افزایش یافت و تولید مالون‌دی‌آلدهید رابطهٔ بسیار خوبی با مقاومت به سرما در ارقام داشت. به‌طور کلی، ارقام 'خلیلی' و 'بیدانه‌قرمز'

مقاومت به سرمای بیشتری نسبت به دیگر ارقام نشان دادند و می‌توان از پتانسیل این ارقام برای احداث تاکستان در مناطق سردسیر، به‌عنوان پایه یا در برنامه‌های اصلاحی برای افزایش مقاومت به سرما استفاده کرد. ارقام خارجی 'روبی'، 'پرلت'، 'تامسون‌سیدلس' و رقم زودرس ایرانی 'یاقوتی' مقاومت به سرمای کمتری نسبت به سایر ارقام نشان دادند. با توجه به اینکه ایران دارای منابع غنی از ژرم‌پلاسم تاک است، پیشنهاد می‌شود که پتانسیل مقاومت به سرمای دیگر ارقام نیز در طی مراحل مختلف فنولوژیک و در مکان‌های مختلف بررسی شود.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از آقای علی‌رضا براتی مسئول محترم ایستگاه تحقیقات انگور ملایر قدردانی می‌شود.

منابع

۱. حقی ح (۱۳۹۰) اثر تغذیهٔ برگی سولفات روی و پتاسیم در مقاومت به سرمای زمستانه انگور رقم 'بیدانه‌سفید'. دانشگاه بوعلی سینا. همدان. پایان‌نامهٔ کارشناسی ارشد.

۲. نجاتیان م ع (۱۳۹۰) ارزیابی صفت تحمل به سرمای زمستانه در کلون‌های برخی ارقام دانه‌دار انگور ایران. علوم باغبانی ایران. ۴۲(۲): ۱۱۳-۱۲۶.

۳. نجاتیان م ع (۱۳۹۱) گزینش کلون‌های متحمل به سرما در ارقام انگور بی‌دانهٔ ایران. نهال و بذر. ۲۸(۳): ۵۱۹-۵۲۴.

۴. عراقی ح، تهرانی‌فر ع، شور م و عابدی ب (۱۳۹۰) تأثیر تنش یخ‌زدگی بر نشت الکترولیتی، پرولین و رابطهٔ آن با رشد مجدد در برخی ارقام انگور. میوه‌های ریز. ۱(۱): ۱۵-۲۲.

5. Abd El-All AH (1996) Bud behaviorand productivity of Flame Seedless grapevines (*Vitis vinifera* L.) as affected by Dormex. Minia University, Egypt, Ph.D. Dissertation.

6. Balasundram N, Sundram K and Samman S (2007) Phenolic compounds in plants and agri-industrial by products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. Food Chemistry. 99: 191-203.

7. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytic Biochemistry. 72: 248-254.

8. Buege JA and Aust SD (1978) Microsomal lipid peroxidation. Methods of Enzymology. 52: 302-310.

9. Campos P, Quartin, V, Ramalho JC and Nunes MA (2003) Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity inleaves of *Coffea* sp. Plants Journal of Plant Physiology. 160: 283-292.

10. Chalker-Scott L (1988) Relationships between endogenous phenolic compoundsof rhododendron tissues and organs and coldhardiness development. Oregon State University, USA, Ph.D. Dissertation.

11. Close TJ (1997) Dehydrins: a commonalty in the response of plantsto dehydration and low temperature. Physiology of Plant. 100: 291-296.

12. Codignola A, Maffel M and Fieschi M (1988) Phenols and bud dormancy,qualitative variationin endogenous phenols in dormant buds of *Fagus sylvatica* L., New Phytology. 108: 473-477.

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

14. Fennell A (2004) Freezing tolerance and injury in grapevines. Journal of Crop Improvement. 10: 201-235.

15. Fry JD, Lang NS, Clifton RP and Maier FP (1993) Freezing tolerance and carbohydrate content of low temperature acclimated and non-acclimated centipedegrass. Crop Science. 33: 1051-1055.

16. Fryer MJ, Andrews JR, Oxborough KD, Blowers A and Baker NR (1998) Relationship between CO_2 assimilation, photosynthetic electron transport and active O_2 metabolism in leaves of maize in the field during periods of low temperature. Plant Physiology. 116(2): 571-580.

17. Gao JC, Wang HX and Li XX (2010) Relationship between soluble protein, MDA, andjujube (*Ziziphus mauritiana*) tree cold hardiness. Beifang Yuanyi (Northern Horticulture). 23: 18-20.

18. Ghasemi AA, Ershadi A and Fallahi E (2012) evaluation of cold hardiness in seven Iranian commercial pomegranate (*Punica granatum* L.) Cultivars. HortScience. 47: 1821-1825.

19. Goffinet MC (2004) Anatomy of grapevine winter injury and recovery. New York StateAgricultural Experiment Station, Geneva, New York, 21 pp.

20. Goldsmith LT (2009) Freezing tolerance and dehydrin protein expression in 'Frontenac' and 'Seyval blanc' grapevine bark and xylem cane tissues during acclimation, midwinter, and deacclimation. Iowa State University, USA, M.Sc. Dissertation.

21. Huang Y and Wang Z (1982) Cytological determination of cold resistance in fruit trees (*Malus*). Acta Horticulture. 9: 23-30.

22. Hubackova M (1982) Effect of the lignification of grapevine shoots on the resistance of buds in winter. Vitis. 9: 271-274.

23. Johnson-Flanagan AM and Owens JN (1985) Peroxidase activity in relation to suberization andrespiration in white spruce (*Picea glauca* Voss) seedling roots. Plant Physiology. 79:103-107.

24. Kezeli TA and Beridze AG (1986) Structural andhistochemical changes in one-year grapevine shoots inrelation to frost resistance. Fiziol. Morozoustoich.Vinograd. Lozy. Pp. 84-97.

25. Mills LJ, Ferguson JC and Keller M (2006) Cold hardiness evaluation of grapevine buds and cane tissues. American Journal of Enology and Viticulture. 57(2): 194-200.

26. Nzokou P and Nikiema P (2008) The influence of three plant growthregulators on susceptibility to coldinjury following warm winter spellsin fraser fir *(Abies fraseri*) and colorado blue spruce *(Picea pungens*). Horticultural Science. 43(3): 742-746.

27. Pakkish Z, Rahemi M and Baghizadeh A (2009) Seasonal changes of peroxidase, polyphenol oxidase enzyme activity and phenol content during and after rest in pistachio (*Pistacia vera* L.) Flower Buds. World Applied Sciences. 6(9): 1193-1199.

28. Paroschy JW, Meiering AG, Peterson RL, Hostetter G and Neff A (1980) Mechanical winter injury in grapevine trunks. American Journal of Enology and Viticulture. 31: 227-232.

29. Renaut J, Lutts S, Hoffman L and Hausman JF (2004) Responses of poplar to chilling temperatures: proteomic and physiological aspects. Plant Biology. 6: 81-90.

30. Rivero RM, Ruiz JM, Garcıa PC, Lopez-Lefebre LR, Sanchez E and Romero L (2001) Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. Plant Science. 160: 315-321.

31. Santini J, Giannettini J, Pailly O, Herbette S, Ollitrault P, Berti L and Luro F (2013) Comparison of photosynthesis and antioxidant performance of several Citrus and Fortunella species (Rutaceae) under natural chilling stress. Trees Structure and Function. 13: 1-8.

32. Shinozaki K and Yamaguchi-Shinozaki K (2000) Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk betweentwo stress signaling pathways. Current Opinion in Plant Biology. 3: 217-223.

33. Steponkus PL and Lanphear FO (1967) Refinement of the triphenyl tetrazolium chloride method of determining cold injury. Plant Physiology. 42: 1423-1426.

34. Takeda F, Arora R, Wisniewski ME, Davis GA and Warmund MR (1993) Assessment of freeze injury in 'BoskoopGiant' black currant buds. HortScience. 28(6): 652-654.

35. Tamura F, Tanabe K, Itai A and Tanaka H (1998) Protein changes in the flower buds of Japanese Pear during breaking of dormancy by chilling or high-temperature treatment. American Society for Horticultural Sciences. 123(4): 532-536.

36. Thomashow MF (1999) Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 50: 571-599.

37. Uemura M and Steponkus PL (1994) A contrast of the plasma membrane lipid composition of oat and ryeleaves in relation to freezing tolerance. Plant Physiology. 104: 479-496.

38. Uemura M, Tominaga Y, Nakagawara C, Shigematsu S, Minami A and Kawamura Y (2006) Responses of the plasma membrane to low temperatures. Physiologia Plantarum. 126: 81-89.

39. Velioglu YS, Mazza G, Gao L and Oomah BD (1998) Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 46: 4113-4117.

40. Zhang J, Wu X, Niu R, Liu Y, Liu N, Xu W and Wang Y (2012) Cold resistance evaluation in 25 wild grape species.Vitis. 51(4): 153-160.