مجله علوم و فنون باغبانی ایران جلد ۱۷ شماره ۳ صفحه‌های ۲۹۹ تا ۳۱۲ (۱۳۹۵)

پاسخ‌های فیزیولوژیکی و سیتوژنتیکی سه نژادگان انگور در پاسخ به تنش سرما در شرایط درون شیشه‌ای[۱]

Physiological and Cytogenetical Responces of Three Grapevine Genotypes Reactions to Cold Stress under *In Vitro* Conditions

بهمن حسینی*، علیرضا فرخزاد، جعفر امیری و لیلا آقازاده اقدام[۲]

چکیده

تنش سرما و یخبندان موجب تغییر در فرایندهای فیزیولوژیکی و زیست‌شیمیایی گیاه می‌شود. نژادگان‌های مختلف انگور واکنش‌های متفاوتی نسبت به سرما دارند و بنابراین انتخاب نژادگان‌های متحمل، مؤثرترین روش برای اجتناب از خسارت سرما به‌شمار می‌رود. استفاده از کشت درون شیشه‌ای، از روش‌های کارآمد جهت گزینش گیاهان متحمل به سرما می‌باشد. در پژوهش حاضر پس از تولید پینه از گره‌های شاخه‌های یک‌ساله جوان، سه نژادگان انگور بیدانه سفید، عسکری و دم روباهی، زیر مریستم اصلی با اندازه ۰/۸ سانتی‌متر، جهت اعمال خوسرمایی به‌مدت ۲۴ شبانه روز در شرایط تاریکی و دمای ۴ درجه سلسیوس قرار گرفت. مقدار پرولین، قندهای محلول، پروتئین، درصد ماده خشک و سطح چندگانی در پینه‌های سازگار شده و شاهد بررسی و در دماهای مختلف یخزدگی آزمون زنده‌مانی انجام شد. بیشترین انگیزش پینه (۹۲/۴٪) در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میکرومولار توفوردی و بیشترین انگیزش پینه (۹۳/۵٪) در غلظت ۵ میکرومولار نفتالن استیک اسید در ترکیب با ۱ میکرومولار بنزیل آدنین به‌دست آمد. در نژادگان عسکری در شرایط دمای پایین، کمترین مقدار پرولین (۲/۷ میکروگرم بر گرم ماده خشک) مشاهده شد. با اعمال خوسرمایی، مقدار پرولین، درصد ماده خشک و پروتئین کل افزایش یافت که این افزایش در نژادگان بیدانه سفید و دم روباهی بیشتر از عسکری بود. یافته‌های این پژوهش، پیشنهاد می‌نماید که در بین سه نژادگان مورد مطالعه، بیدانه سفید، تحمل بیشتری به دماهای یخزدگی نشان داد. همچنین در بررسی تأثیر سرما بر سطح چندگانی نژادگان‌ها، در نژادگان‌های مورد مطالعه ثبات سطح چندگانی و پایداری ژنتیکی مشاهده شد که از نظر ریزافزایی و افزایش درون شیشه‌ای می‌تواند با اهمیت باشد.

واژه های کلیدی: انگور، پرولین، پینه، خوسرمایی، سطح چندگانی، قندهای محلول.

مقدمه

آسیب ناشی از دماهای کم، یکی از عامل‌های محدود کننده پراکنش گونه‌های مختلف درخت‌های میوه در روی کره زمین می‌باشد. انگور، از مهم‌ترین میوه‌هایی است که از زمان‌های قدیم در ایران کشت می‌شود. نژادگان‌های زیر کشت در ایران از گونه وینیفرا (*Vitis vinifera* L.) با محدوده تحمل دمایی بین ۱۵- تا ۲۰- درجه سلسیوس هستند (۴۷). اغلب تاکستان‌های کشور در منطقه‌های معتدله با زمستان‌های خیلی سرد قرار گرفته‌اند؛ در نتیجه، سالیانه، بیش از ۵۰٪ محصول انگور در این منطقه‌ها در اثر یخبندان‌های زمستانه و سرماهای بهاره از بین می‌روند (۳). بنابراین سرمای دیررس بهاره، یکی از عامل‌های محدود کننده تولید انگور می‌باشد که گاهی تا ۹۰٪ به باغ‌های انگور آسیب می‌رساند (۲). خطر سرمازدگی شاخه‌های سبز و خوشه‌های گل انگور، در ابتدای فصل رشد در بیشتر نژادگان‌های تجاری انگور وجود دارد (۴۵). در منطقه‌های سردسیر ایران، در برخی سال‌ها، سرمای

۱- تاریخ دریافت: ۹۴/۹/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۶/۳/۱۳

۲- به ترتیب دانشیار، استادیارها و دانشجوی سابق کارشناسی ارشد علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه.

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: (b.hosseini@urmia.ac.ir)

دیررس بهاره، شاخه‌های تازه تشکیل شده انگور را نیز ازبین می‌برد. در این شرایط اگر دما، به ۱- درجه سلسیوس برسد به شاخه‌ها، آسیب جدی خواهد رسید (۲). در منطقه‌هایی که انگور پرورش داده می‌شود، میانگین دمای سالانه، نباید از ۹ درجه سلسیوس کمتر باشد. همچنین انگور در دوره رکود، سرمای ۱۸- تا ۲۰- درجه سلسیوس را تحمل می‌نماید (۲). گزینش، برای نژادگان‌های متحمل به سرما و یخزدگی در شرایط مزرعه در خیلی از موردها، نیازمند صرف زمان، هزینه و نیروی کار زیاد می‌باشد. ترکیبی از شیوه‌های معمول گزینش، با روش-های نوینی مانند کشت بافت گیاهی می‌تواند علاوه بر کوتاه نمودن طول دوره بهنژادی، باعث کاهش هزینه و افزایش کارایی شود (۳۳). بعضی پژوهش‌ها نشان داده است که یاخته‌های تمایز نیافته (پینه) در محیط کشت بافت، دامنه وسیعی از تحمل به تنش‌های محیطی را بروز می‌دهند (۱۳). تنوع به وجود آمده در کشت بافت (تنوع سوماکلونال)، امکان گزینش برای نژادگان‌های متحمل به تنش‌ها را فراهم ساخته و در این خصوص، گزارش‌های محدودی در مورد انتخاب لاین‌های متحمل به سرما، از راه گزینش درون شیشه‌ای، در برخی از درخت‌های میوه مانند انگور ارائه شده است (۴۹). جهت انگیزش پینه، بیشتر از هورمون‌های اکسینی و سایتوکنینی استفاده می-شود و از اکسین‌هایی مانند نفتالن استیک اسید (NAA)، توفوردی (2,4-D) و تری کلروفنوکسی‌استیک اسید (2,4,5-T) جهت انگیزش پینه در انگور استفاده شده است (۳۹). هر یک از این اکسین‌ها به تنهایی، قادر به انگیزش پینه می‌باشند، اما به‌کارگیری ترکیب اکسین- سایتوکنین، پینه‌زایی را آسان می‌نماید (۲۳)، ضمن اینکه حضور اکسین و سایتوکینین در تسهیل و سرعت باززایی نقش مهمی دارند.

در ارتباط با شرایط انگیزش و تولید پینه در انگور مطالعه‌های مختلفی انجام شده است. در بیشتر مطالعه‌ها ترکیب تنظیم کننده رشد اکسینی و سایتوکینینی مناسب بوده است. با این حال در برخی دیگر از مطالعه‌ها، نتیجه-های کاربرد اکسین در محیط کشت بهتر از زمانی بوده که از ترکیب دو تنظیم کننده رشد استفاده شده است. به عنوان مثال، انگیزش پینه در برگ انگور، در محیط MS با غلظت‌های یک صدم میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و یک میلی‌گرم در لیتر BA، مشاهده شد و افزایش غلظت 2,4-D، تأثیری بازدارنده، بر روی رشد و انگیزش پینه داشت (۳۷). در پژوهش دیگری، بیشترین و کمترین وزن تر پینه، به‌ترتیب در محیط MS دارای یک دهم میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین و محیط کشت بدون بنزیل آدنین ثبت شد (۳۶).

در طبیعت، با کاهش دما در انتهای پاییز و یا ابتدای زمستان، خوسرمایی در گیاهان آغاز می‌شود. سرما، نور و آبسایزیک اسید به عنوان سه محرک عمده در فعال‌سازی فرایند خوسرمایی شناخته شده‌اند (۳۴). خوسرمایی باعث ایجاد تغییرهای عمده در پروتئین‌های محلول (۳۴)، آنزیم‌های ضداکسیدانی (۲۲)، تجمع محافظت کننده‌های اسمزی مانند تجمع قندهای رافینوز و سوربیتول (۱۲)، تجمع ترکیب‌های وابسته به نیتروژن مانند اسیدهای آمینه پرولین، آرژنین، گلوتامین، آسپارژین، آمونیوم‌های چهارگانه، مانند گلایسین بتائین و پلی‌آمین‌ها (۳۷) و تغییر در ساختار چربی (۴۳) می‌شود. اسمولیت‌ها در حفظ ساختار، محافظت از زیرساخت‌های یاخته‌ای، حفاظت از غشاهای یاخته‌ای و تأمین انرژی یاخته‌ای نقش دارند. این ترکیب‌ها وزن مولکولی کمی دارند و در غلظت‌های زیاد در یاخته، اثر سمی ندارند (۲۵). گیاهان با انباشت ماده‌های تنظیم کننده اسمزی مانند اسیدهای آمینه مانند پرولین، کربوهیدرات‌های محلول، برخی یون‌های معدنی و پروتئین‌ها، تحمل خودشان را به دمای کم، افزایش می‌دهند. پرولین، در برخی از گونه‌ها در دامنه وسیعی از شرایط تنش مانند سرما، شوری و خشکی تجمع یافته و باعث حفاظت از پروتئین‌ها و ثبات غشاهای یاخته‌ای به‌وسیله واکنش با فسفولیپیدها می‌شود و به عنوان تصفیه کننده گونه‌های اکسیژن فعال، ذخیره‌کننده انرژی و منبع نیتروژن عمل می‌کند (۷). کربوهیدرات‌های محلول، ضمن تنظیم فشار اسمزی، باعث کاهش هدررفت آب، حفظ آماس و پایداری غشای یاخته می‌شوند (۱۹).

از میان روش‌های زیست سنجی، آزمون تترازولیوم کلراید، به طور وسیعی در بررسی تحمل به سرما در محیط کشت درون شیشه‌ای استفاده می‌شود (۳۸). ارزیابی تحمل به یخزدگی، در کشت تعلیقی یاخته‌های هلو با

استفاده از آزمون تترازولیوم کلراید انجام و نشان داده شد که خوسرمایی در شرایط دمای پایین، انگیزش می-شود (۶).

در کشت بافت گیاهی به‌ویژه کشت پینه، به‌دلیل تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، امکان تغییر سطح‌های چندگانی وجود دارد. در این خصوص، تنوع کروموزومی گسترده‌ای در کشت بافت خیار (۲۸) و آرابیدوپسیس (۱۸) گزارش شده است. تغییرهای سطح‌های چندگانی به روش‌های مختلفی بررسی می‌شود که یکی از این روش-ها، استفاده از روش فلوسایتومتری می‌باشد (۱۶). از این روش، در بررسی تغییرهای سطح‌های چندگانی در برخی گیاهان مانند تمشک (*Rubus chamaemorus* L.) (۴۲) و گون (*Astragalus gummifer*) (۱۴) به طور موفقیت آمیزی استفاده شده است.

پژوهش‌های بسیار کمی در مورد اثرهای تنش سرما در درخت‌های میوه به‌ویژه انگور، در محیط درون شیشه انجام شده است. این پژوهش، به‌منظور تعیین بهترین ترکیب و غلظت هورمونی جهت انگیزش پینه در سه نژادگان انگور (بیدانه سفید، عسکری و دم روباهی) و بررسی تأثیر تنش سرما بر برخی ویژگی‌های فیزیولوژیکی و تغییرهای سطح چندگانی پس از اعمال خوسرمایی در پینه‌های رشد یافته در محیط درون شیشه‌ای انجام شد.

مواد و روش‌ها

به منظور بررسی تأثیر تنش سرما بر برخی ویژگی‌های فیزیولوژیکی و سیتوژنتیکی سه نژادگان انگور (بیدانه سفید، عسکری و دم روباهی)، پژوهشی در قالب دو آزمایش جداگانه انجام شد. آزمایش اول، به هدف انگیزش پینه در ریزنمونه گره به صورت فاکتوریل در قالب طرح آماری کامل تصادفی در سه تکرار انجام شد. فاکتورهای آزمایش، نژادگان در سه سطح (بیدانه سفید، عسکری و دم روباهی)، نوع و غلظت هورمون‌های اکسین در چهار سطح (هورمون‌های NAA و 2,4-D هر کدام در دو سطح ۵ و ۱۰ میکرومولار) به همراه BA در دو سطح (صفر و ۱ میکرومولار) بود. برای تهیه گره از شاخه‌های دارای ۴ جوانه، از پایین مریستم نمونه تهیه و پس از جدا نمودن برگ‌ها و دمبرگ‌ها، گندزدایی انجام شد. گندزدایی ریز نمونه‌ها، با شستشو با آب جاری، برش در زیر هود به ابعاد یک سانتیمتری، غوطه‌وری در الکل اتیلیک ۷۰٪ به مدت ۳۰ ثانیه، شستشو با آب مقطر استریل، غوطه‌وری به مدت ۱۰ دقیقه با هیپوکلریت سدیم یک درصد و در نهایت سه بار آبکشی با آب مقطر استریل، انجام شد. جهت انگیزش پینه، از محیط کشت پایه MS استفاده شد و pH محیط کشت‌ها برابر با ۵/۷ بود. محیط کشت‌ها در اتوکلاو، در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس و فشار ۱/۲ پاسکال به‌مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفتند. بعد از کشت، ریزنمونه-ها در شیشه‌های دارای محیط کشت به اتاق رشد با دمای ۱±۲۵ درجه سلسیوس، ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و شدت نور ۵۶ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه منتقل شدند. بعد از سه هفته، تعداد ریزنمونه‌هایی که پینه تولید کردند شمارش و به محیط کشت‌های جدید در شرایط کامل گندزدایی و زیر هود انتقال یافتند. هر ۳ هفته یک‌بار، نمونه‌ها به دلیل حفظ پینه‌ها و نیز به منظور افزایش مقدار توده یاخته‌ای آنها، واکشت شدند. آزمایش دوم به صورت فاکتوریل در قالب طرح آماری کامل تصادفی و با دو فاکتور انجام شد. فاکتور اول، نژادگان‌های مورد آزمایش در سه سطح (بیدانه سفید، عسکری و دم روباهی) و فاکتور دوم، نوع پینه در دو سطح (سازگار شده به سرما و سازگار نشده به سرما) بود. پس از انگیزش پینه، برخی از پینه‌ها به منظور اعمال خوسرمایی به‌مدت ۲۴ روز در یخچال در دمای ۴- درجه سلسیوس در شرایط تاریکی قرار داده شدند در حالی‌که نمونه‌های پینه شاهد، در شرایط اتاقک رشد، باقی ماندند.

مقدار پرولین نمونه‌ها بر اساس روش بیتس و همکاران (۸)، مقدار پروتئین کل با روش برادفورد (۱۱)، غلظت قندهای محلول با روش دوبیس و همکاران (۱۷) اندازه‌گیری شد. جهت تعیین وزن خشک نمونه‌ها، ابتدا نمونه‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در خشک‌کن با دمای ۷۰ درجه سلسیوس قرار گرفتند و پس از خارج نمودن نمونه‌ها از خشک-کن، وزن خشک آن‌ها به کمک ترازوی دیجیتالی (با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم) تعیین شدند. مقدار زنده‌مانی در پینه‌های

سازگار شده به سرما و شاهد با روش آزمون تترازولیوم کلراید، اندازه‌گیری و سطح‌های چندگانی نیز با استفاده از روش فلوسایتومتری بررسی شد.

برای بررسی زنده‌مانی در پینه‌ها، از پینه‌هایی که به‌مدت ۲۴ روز، در معرض تیمار خوسرمایی قرار داشتند و نیز پینه‌های شاهد، به درون میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری، منتقل و به منظور حذف ماده‌های محافظت کننده بین یاخته‌ای این پینه‌ها، به مدت دو ساعت در آب مقطر قرار داده شدند. آب اضافی نیز، توسط کاغذ صافی از نمونه-ها، حذف شد. به منظور اعمال تیمار یخ‌زدگی در نمونه‌ها، از فریزر ترموگرادیان قابل برنامه‌ریزی استفاده شد. نمونه‌ها در طول شب در دمای ۴- درجه سلسیوس انتقال و پس از آن به منظور جلوگیری از پدیده فراسرد شدن و تشکیل بلورهای یخ، دما در عرض دو ساعت، به ۲- درجه سلسیوس، کاهش یافت و در این دما، نمونه‌ها به‌مدت دو ساعت نگهداری شدند. پس از طی این مدت، اولین نمونه‌ها به صورت تصادفی از هر یک از تیمارها در سه تکرار از فریزر، خارج شدند. پس از آن، با کاهش دو درجه‌ای دما در هر ساعت، دما تا ۱۶- درجه سلسیوس کاهش یافت (نمونه‌ها در دماهای ۴-، ۶-، ۸-، ۱۰-، ۱۲-، ۱۴- و ۱۶- درجه سلسیوس، در فریزر ترموگرادیان قرار گرفتند). تمامی نمونه‌ها پس از خروج از فریزر، برای بازیابی، به مدت سه ساعت در آب خنک و پس از آن، برای ارزیابی زنده‌مانی نمونه‌ها، از آزمون تترازولیوم کلراید استفاده شد. برای این منظور، محلول ۰/۶٪ تریفنیل تترازولیوم کلراید در بافر ۰/۰۵ مولار $Na_2 HPO_4$-KH_2PO_4 (pH ۷/۴) تهیه شد. به هر یک از نمونه‌های درون میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری، یک میلی‌لیتر از این محلول اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۲۰ ساعت در دمای ۲±۲۵ درجه سلسیوس در تاریکی قرار داده شدند. رنگ قرمز به‌دست آمده از احیای تترازولیوم کلراید، پس از تخلیه محلول آن با استفاده از یک میلی‌لیتر اتانول ۹۵٪، در آب جوش به مدت چهار دقیقه عصاره‌گیری شد. برای ارزیابی مقدار احیای تترازولیوم، از روش اسپکتروفتومتری استفاده شد. به این ترتیب که ابتدا برای تعیین بیشترین جذب تترازولیوم احیا شده در هر یک از نمونه‌ها، دستگاه در حالت طیف‌نگار توسط محلول استخراج شده از یک نمونه که در دمای ۱۶- درجه سلسیوس به طور کامل از بین رفته بود، کالیبره شد. پس از آن، درصد جذب تترازولیوم احیا شده در پینه‌های مورد تیمار و شاهد، با اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۸۳ نانومتر اندازه گیری شد (۳۵).

برای بررسی محتوای ژنومی نمونه‌های مورد نظر، ابتدا با استفاده از روشPartec Cystain UV precise P، هسته‌ها از یاخته، استخراج و رنگ‌آمیزی شدند. برای این منظور، حدود ۱۰۰ میلی‌گرم از هر نمونه در پتری دیش-ها قرار داده و سپس ۲۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج به آن‌ها اضافه شد. با استفاده از یک تیغ تیز، نمونه‌ها به مدت ۳۰ تا ۶۰ ثانیه، خرد شدند. سپس بافر استخراج که دارای هسته یاخته‌ها بود، توسط فیلتر ۵۰ میکرومتری، صاف و به لوله‌های آزمایش ویژه‌ای منتقل شدند. پس از آن، برای رنگ‌آمیزی DNA موجود در هسته‌ها، ۸۰۰ میکرولیتر محلول رنگ‌آمیزی دارای رنگ فلورسانس ۴ و ۶ دیامیدینو-۲-فنیل ایندول-۲-HCL (DAPI) به بافر استخراج تصفیه شده موجود در لوله‌های آزمایش، اضافه شد. سپس، نمونه‌ها در دمای محیط به مدت ۳۰ ثانیه تیمار شدند و در نهایت هسته‌های رنگ‌آمیزی شده، توسط دستگاه Analyser Ploidy از نظر محتوای ژنومی ارزیابی شدند. برای تجزیه واریانس و مقایسه میانگین داده‌ها از نرم‌افزار SAS و برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel استفاده شد. اطلاع‌های خروجی دستگاه فلوسایتومتری در قالب فایل‌های اطلاعاتی توسط نرم‌افزار Modfit LT3.1 تجزیه و تحلیل آماری و نتیجه‌ها با استفاده از نرم افزار Excel در قالب نمودار رسم شد.

نتایج و بحث

مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد، نژادگان‌های عسکری و بیدانه سفید به ترتیب با ۹۲/۴ و ۷۶/۸٪، بیشترین و کمترین مقدار انگیزش پینه را نشان دادند (شکل ۱). غلظت‌های ۵ و ۱۰ میکرومولار 2,4-D در ترکیب با یک میکرومولار BA و غلظت ۵ میکرومولار NAA در ترکیب با یک میکرومولار BA، بیشترین تأثیر را در انگیزش پینه داشتند (شکل ۲).

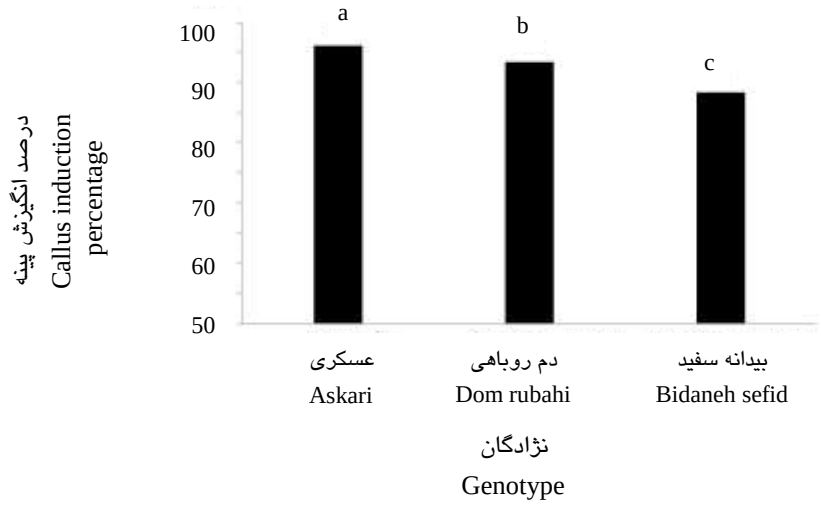

Fig. 1. Effect of different grape cultivars on callus induction. Columns with the same letters are not significantly different at $P \leq 0.01$ by DMRT.

شکل ۱- اثر نژادگان‌های مختلف انگور بر درصد انگیزش پینه. حرف‌های غیر مشابه نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال آماری ۱٪ در بین میانگین‌ها در آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشند.

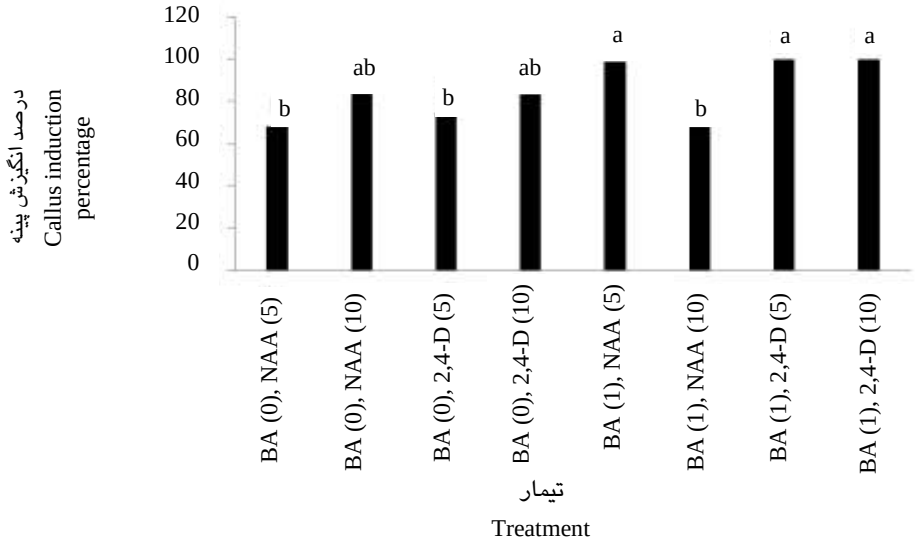

Fig. 2. The interaction effect of NAA and 2,4-D in combination with BA on the callus induction of different grape cultivars. Columns with the same letters are not significantly different at $P \leq 0.01$ by DMRT.

شکل ۲- اثر برهمکنش تنظیم کننده‌های رشد NAA و 2,4-D در ترکیب با BA بر درصد پینه در نژادگان‌های انگور. BA (0)، NAA (1)، NAA (5)، NAA (10)، 2,4-D (5) و 2,4-D (10) به ترتیب بنزیل آدنین صفر میکرومولار، بنزیل آدنین ۱ میکرومولار، نفتالن استیک اسید ۵ میکرومولار، نفتالن استیک اسید ۱۰ میکرومولار، توفوردی ۵ میکرومولار و توفوردی ۱۰ میکرومولار. حرف‌های غیر مشابه نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ در بین میانگین‌ها در آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشد.

نتیجه‌های پژوهش حاضر، نشان داد که انگیزش پینه در ریزنمونه‌های گره در هر سه نژادگان انگور، از هورمون‌های 2,4-D، NAA و BA اثر می‌پذیرد و با افزایش غلظت BA (۱۰ میکرومولار)، درصد انگیزش پینه، کاهش یافت. درصد انگیزش پینه، از عامل‌های مختلفی از جمله نژادگان، نوع ریزنمونه، منبع‌های کربوهیدراتی و تنظیم کننده‌های رشد گیاهی اثر می‌گیرد (۳۲). اکسین‌ها، به ویژه 2,4-D، به عنوان هورمون‌های رشد فعال، جهت انگیزش پینه در گیاهان گزارش شده‌اند. نتیجه‌ها نشان داد که افزایش غلظت 2,4-D، اثری بازدارنده روی رشد پینه دارد. پس به‌کارگیری یک اکسین به همراه سایتوکنین، دستیابی به پینه‌زایی بهینه را آسان می‌نماید (۲۳). در پژوهشی بر روی ریزنمونه‌های دیسک برگی گیلاس، نشان داد که بیشترین انگیزش پینه در محیط کشت MS دارای ۱ میکرومولار هورمون BA، بوده است (۳۱). در ریزنمونه‌های دیسک برگی هلو مشاهده شد که با افزایش مقدار BA (بیش از ۱ میکرومولار)، مقدار تولید پینه کاهش یافت در حالی که در محیط کشت بدون BA و در حضور 2,4-D و NAA، توانایی تولید پینه کاهش یافت (۳۱). در این پژوهش، نتیجه‌ها نشان داد که غلظت‌های ۵ و ۱۰ میکرومولار 2,4-D، در ترکیب با ۱ میکرومولار BA و غلظت ۵ میکرومولار NAA، در ترکیب با ۱ میکرومولار BA، بیشترین تأثیر را در انگیزش پینه داشتند. بنابراین مقدار انگیزش پینه به نژادگان و نوع تنظیم کننده رشد بستگی دارد.

برای جلوگیری از آسیب‌های تنش یخزدگی، گیاهان مجهز به سازوکارهای سازگاری به تنش‌ها شده‌اند. اسمولیت‌ها از ماده‌هایی هستند که در گیاهان در شرایط تنش به مقدارهای مختلف تولید می‌شوند. از جمله این ماده‌ها می‌توان به پرولین، گلایسین بتایین، سیترولین، گلوتامات، سوربیتول، فروکتان‌ها، ساکاروز و پلی ال‌ها اشاره کرد (۳۷).

در پژوهش حاضر، بیشترین مقدار پرولین در نژادگان دم روباهی و کمترین آن در نژادگان عسگری مشاهده شد و بین دو نژادگان بیدانه سفید و عسگری اختلاف معنی‌داری ثبت نشد (شکل ۳). همچنین با اعمال تیمار خوسرمایی، مقدار پرولین در پینه‌ها به طور معنی‌داری افزایش یافت (شکل ۴). نتیجه‌ها نشان داد که پرولین به‌عنوان یکی از ترکیب‌های مهم محافظت‌کننده یاخته در برابر یخزدگی، اسیدآمینه‌ای غالب در گیاهان متحمل به سرما به شمار می‌رود (۱۵). رابطه مثبتی بین مقدار پرولین و افزایش تحمل به سرما در بیشتر درخت‌های میوه از جمله انگور(*Vitis vinifera* L.) (۴)، سیب (*Malus domestica*) (۲۶) و پرتقال (*Citrus sinensis*) (۴۱) گزارش شده است. در پژوهشی نشان داده شد که در جوانه‌های پسته هرچه دما پایین‌تر رود مقدار پرولین جوانه‌ها افزایش می‌یابد (۱). همچنین برخی پژوهش‌ها، تغییرپذیری در سوخت و ساز پرولین و تجمع آن را در طول پاسخ به شوک سرمایی و در سازگاری به تنش‌ها در گیاهان مختلف نشان داده‌اند (۲۷). پرولین به‌عنوان یک حفاظت کننده اسمزی علاوه بر تنظیم اسمزی، ساختار سه بعدی پروتئین‌ها را در مقابل تنش محافظت می‌نماید و منبع کربن و نیتروژن برای رشد گیاهان و نیز به عنوان جاروب کننده رادیکال‌های آزاد اکسیژن عمل می‌نماید، که این امر موجب پایداری غشاها و حفاظت آنزیم‌ها از اثرهای مخرب تنش می‌شود (۷).

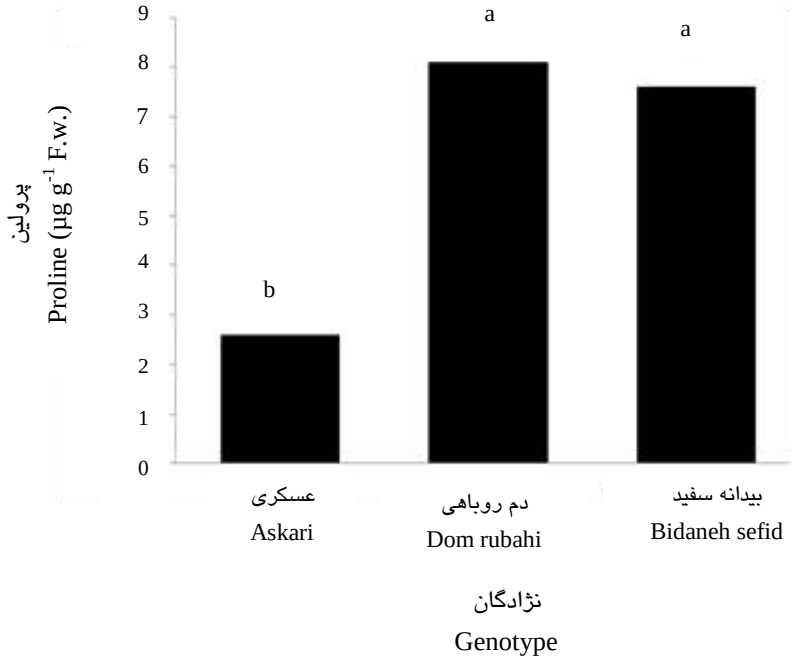

Fig. 3. Effect of cold treatment on callus prolin content in different grape cultivars. Columns with the same letters are not significantly different at $P \leq 0.01$ by DMRT.

شکل ۳- اثر سرما بر مقدار پرولین پینه در نژادگان‌های مورد مطالعه انگور. حرف‌های غیر مشابه نشان دهنده تفاوت معنی-دار در سطح احتمال ۱٪ در بین میانگین‌ها در آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشند.

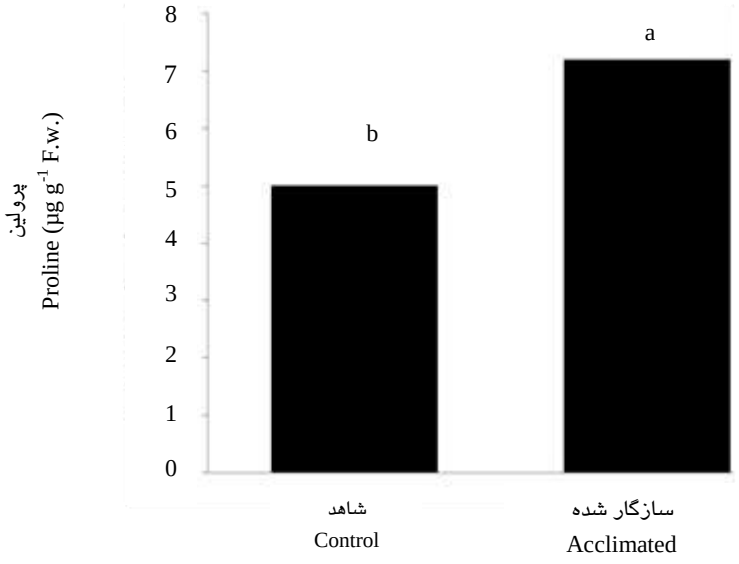

Fig. 4. Effect of cold treatment on callus proline content in control and cold-acclimated conditions in different grape cultivars. Columns with the same letters are not significantly different at $P \leq 0.01$ by DMRT.

شکل ۴- اثر سرما در دو تیمار شاهد و سازگار شده بر مقدار پرولین پینه رقم‌های مورد مطالعه انگور. حرف‌های غیر مشابه نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪، در بین میانگین‌ها در آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشند.

همبستگی بین مقدار کربوهیدرات محلول و تحمل به سرما در بسیاری از گونه‌های چوبی گزارش شده است (۴۶). قندهای محلول در بسیاری از گونه‌های گیاهی، نقش مهمی را در مقابل تنش سرما بر عهده دارند و ناپدید شدن نشاسته، یکی از رخدادهایی است که در طول فرایند خوسرمایی رخ می‌دهد که این فرایند، ممکن است در راستای شکسته شدن این ترکیب به قندهای ساده‌تر باشد (۶). در تیمار دمای‌های پایین، نشاسته موجود در بافت-های گیاه به قندهای احیا کننده تبدیل می‌شود. نشاسته پلی‌ساکاریدی است که بر اثر فعالیت آنزیم‌های آمیلاز و مالتاز که به‌وسیله سرما تحریک شده‌اند و به قند ساده تبدیل می‌شود (۲۱). این تبدیل، تحمل گیاه به سرما را افزایش می‌دهد. زیرا با افزایش قندهای احیاکننده شیره یاخته‌ای غلیظ می‌شود و مقدار آب آزاد موجود در یاخته کم می‌شود و در نتیجه عمل یخزدگی بافت‌ها در دمای پایین‌تر اتفاق می‌افتد (۵). تجمع عامل‌های مرتبط با قندها مانند ساکاریدها، رافینوزها، سوربیتول و فروکتان‌ها در طول دوره خوسرمایی در برخی گیاهان نشان داده شده است (۱۲). در درخت‌های زردآلو، هلو، شلیل و آلو مقدار قندهای گلوکز، فروکتوز و سوربیتول با تیمار ۵۰۰ ساعت سرما به‌طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد (۱۰). بر اساس نتیجه‌های به‌دست آمده از پژوهش حاضر، خو-سرمایی بر مقدار قندهای محلول در هر سه نژادگان انگور، تأثیر معنی‌داری نداشت. این نتیجه‌ها نشان می‌دهد که به احتمال فراوان، فاکتورهای دیگری غیر از قندهای محلول در تحمل به یخزدگی در نژادگان‌های انگور در این پژوهش، تأثیر داشته‌اند.

در پینه‌های سازگار شده به سرما، مقدار پروتئین کل، به طور معنی‌داری افزایش یافت (شکل ۵). افزایش مقدار پروتئین بافت‌های ذخیره‌ای و تحمل به سرما در گیاهان، توسط پژوهشگرهای زیادی گزارش شده که با نتیجه-های این پژوهش مطابقت دارد (۲۴). بنابراین به احتمال فراوان، افزایش مقدار پروتئین کل در نژادگان‌های متحمل می‌تواند یکی از دلیل‌های افزایش تحمل به تیمارهای یخزدگی در آزمون تترازولیوم باشد.

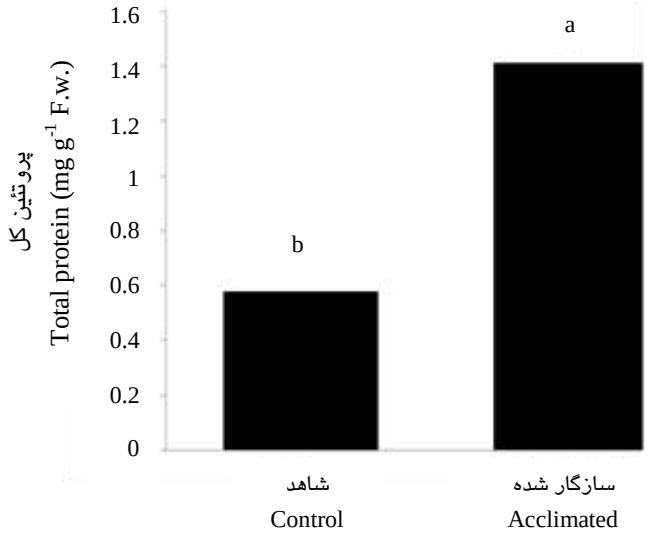

Fig. 5. Effect of cold treatment on callus protein content in control and cold-acclimated conditions in different grape cultivars. Columns with the same letters are not significantly different at $P \leq 0.01$ by DMRT.

شکل ۵- اثر سرما در دو حالت شاهد و سازگار شده بر مقدار پروتئین پینه نژادگان‌های مختلف انگور. حرف‌های غیر مشابه، نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪، در بین میانگین‌ها در آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشند.

بالاترین درصد وزن خشک پینه در نژادگان بیدانه سفید، در شرایط سازگار شده مشاهده شد. با اعمال خوسرمایی، مقدار وزن خشک پینه در تمامی نژادگان‌ها افزایش یافت، ولی این افزایش، فقط در نژادگان بیدانه سفید معنی‌دار بود (شکل ۶).

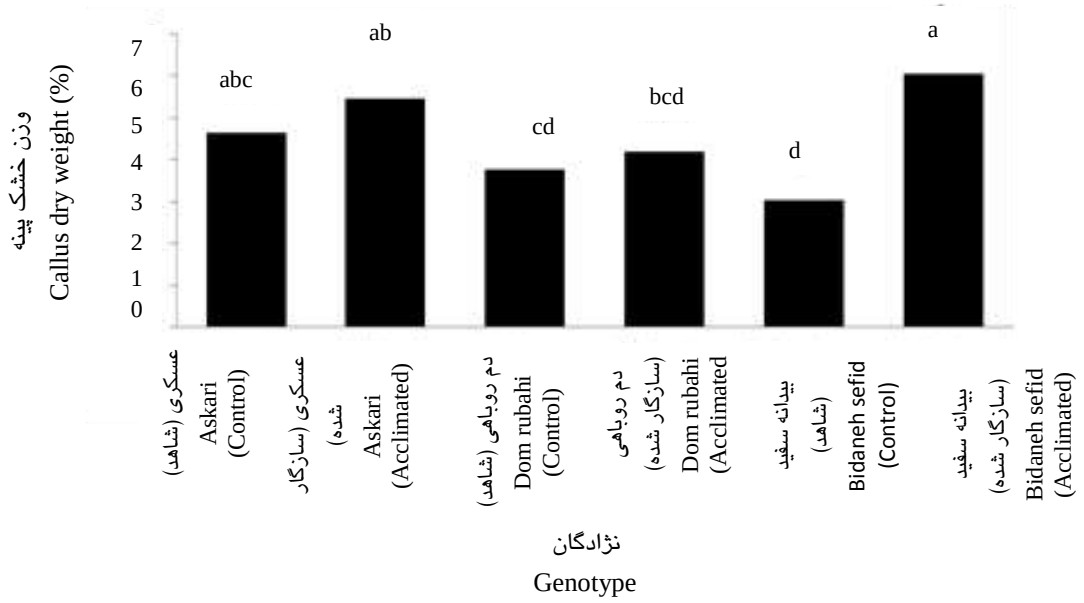

Fig. 6. The reciprocal effect of cold accilimation/cultivar on callus dry weight. Columns with the same letters are not significantly different at $P \leq 0.01$ by DMRT.

شکل۶- برهمکنش نژادگان و خوسرمایی بر درصد ماده خشک پینه. حرف‌های غیر مشابه نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد در بین میانگین‌ها در آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشند.

مقایسه روند تغییرهای احیای تری فینیل تترازولیوم کلراید به فورمازون، در نمونه‌های تیمار سرمازدگی با نمونه‌های شاهد نشان داد که در نژادگان‌های عسکری و دم روباهی، در دمای ۴- درجه سلسیوس، کاهش و در نژادگان بیدانه سفید در دماهای ۴- و ۸- درجه سلسیوس افزایش در احیای تترازولیوم در مقایسه با تیمار شاهد مشاهده شد. در پژوهش حاضر، در بین سه نژادگان انگور، تحمل به سرما در نژادگان بیدانه سفید، بیشتر از دو نژادگان دیگر بود. به طور کلی، در هر سه نژادگان، از دمای ۱۰- درجه سلسیوس به بعد، کاهش در احیای تترازولیوم نسبت به شاهد، مشاهده شد و در دمای ۱۶- درجه سلسیوس، تمامی نمونه‌ها، توانایی خود را در احیای تترازولیوم از دست دادند (شکل ۷). به نظر می‌رسد که این افزایش در احیای تری فینیل تترازولیوم کلراید در اثر افزایش ظرفیت احیاکنندگی یاخته در نتیجه افزایش فعالیت آنزیمی دهیدروژناز باشد. در این روش، براورد زنده‌مانی بیش از ۱۰۰٪ بیانگر این واقعیت است که به طور یقین نسبت تترازولیوم احیا شده در نمونه‌های تیمار یافته به شاهد منطبق با درصد زنده‌مانی یاخته‌ها در نمونه‌های تیمار یافته نیست. نتیجه‌های پژوهشگرهای دیگر نیز مؤید این مطلب است که این پدیده می‌تواند به بروز خطا در نتیجه‌ها منجر شود و خسارت‌های کم ناشی از یخزدگی را پنهان نماید (۴۹).

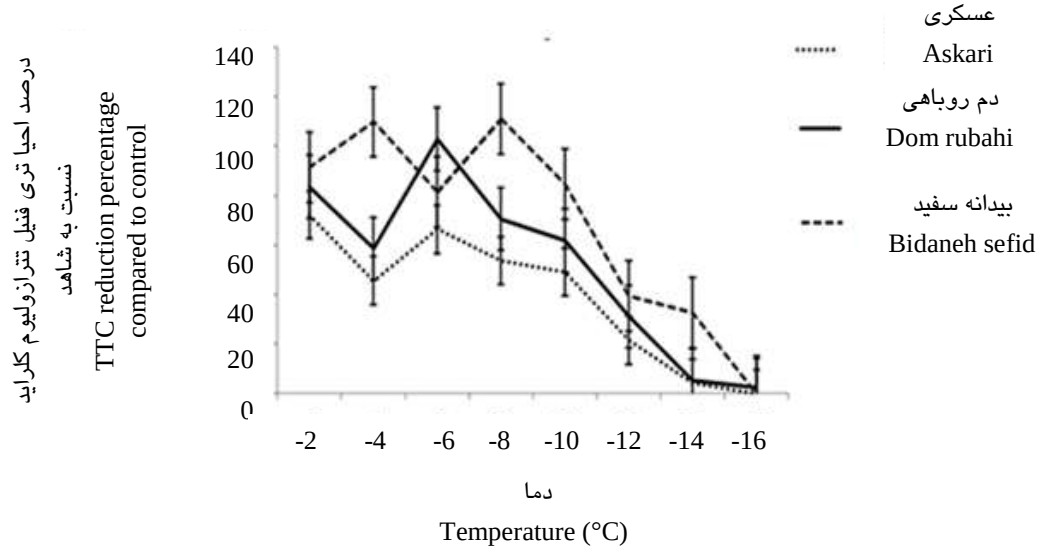

Fig. 7. Tetrazolium test of survival callus estimate changes in response to low temperatures cultivars.
شکل ۷- روند تغییرهای براورد آزمون تترازولیوم از زنده‌مانی پینه‌ها در پاسخ به دماهای کم.

نتیجه‌های تجزیه تحلیل فلوسایتومتری نشان داد که انگیزش سرما، تأثیری در سطح چندگانی پینه، در هر سه نژادگان نداشت و هیچ‌گونه تنوعی از نظر مقدار DNA در سطح چندگانی پینه‌های نژادگان‌های سازگار شده به سرما در مقایسه با شاهد مشاهده نشد (شکل‌های ۸ و ۹). در پژوهش حاضر، نژادگان‌های مورد بررسی سازگار شده به سرما و شاهد، دوگان بودند؛ بنابراین تفاوتی بین جایگاه این پیک‌ها (پیک یک یا Dip G_1 و پیک دو یا Dip G_2 به ترتیب نشان دهنده یاخته‌های دوگان موجود در فازهای G1 و G2 می‌باشند) در نمونه‌های شاهد و تیمار دیده نشد که این نشان دهنده ثبات ژنتیکی نژادگان‌های مختلف انگور در شرایط تنش‌های انجام شده بود. به طور معمول معیار، پیک یک می‌باشد که همان‌طور که در شکل‌های به‌دست آمده دیده شد (فقط شکل مربوط به نژادگان بیدانه سفید در این جا آورده شده است) جایگاه آن در حدود ۲۰ بوده که نشان دهنده شدت فلورسانس نسبی DNA در همین حدود است. باید گفت تفاوت نسبی دیده شده در پروفیل فلوسایتومتری نمونه‌های مختلف به سایر عامل‌ها، غیر از سطح چندگانی، مانند مرحله رشدی و بافت پینه و خطای جزئی آماده‌سازی نمونه‌ها، همچنین ناهمگونی بافت پینه و ماده‌های زاید موجود در یاخته ها بوده که قابل چشم پوشی است.

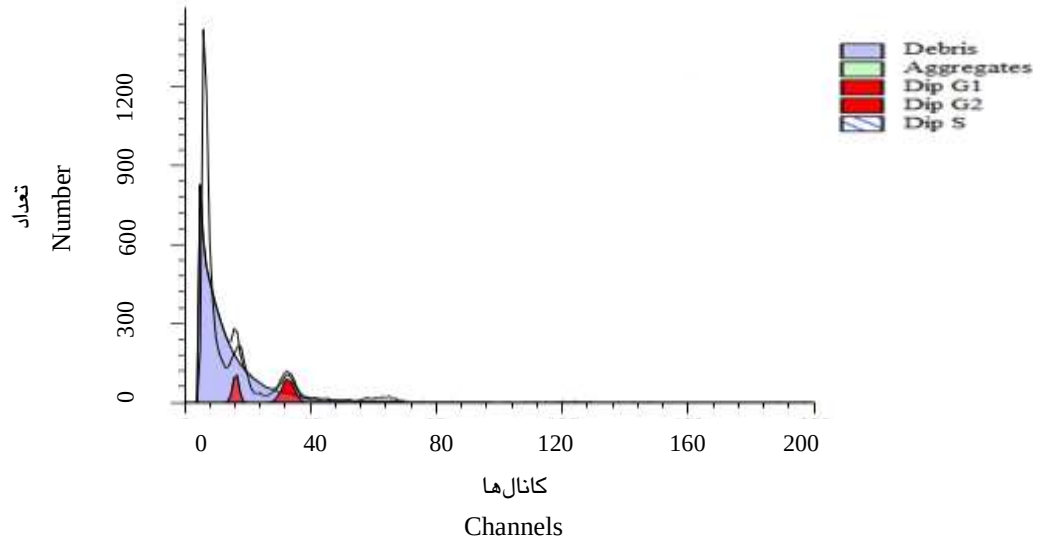

Fig. 8. Flow cytometric analysis of Bidaneh sefid cell nuclei control. Debris, Aggregates, Diploid Cells in G_1 Phase, Diploid Cells in G_2 Phase, Diploid Cells in S Phase.

شکل ۸- بررسی سطح چندگانی نژادگان بیدانه سفید شاهد به روش فلوسایتومتری. هسته‌های خرد شده، هسته‌های بهم چسبیده، یاخته‌های دوگان در فاز G_1، یاخته‌های دوگان در فاز G_2، یاخته‌های دوگان در فاز S.

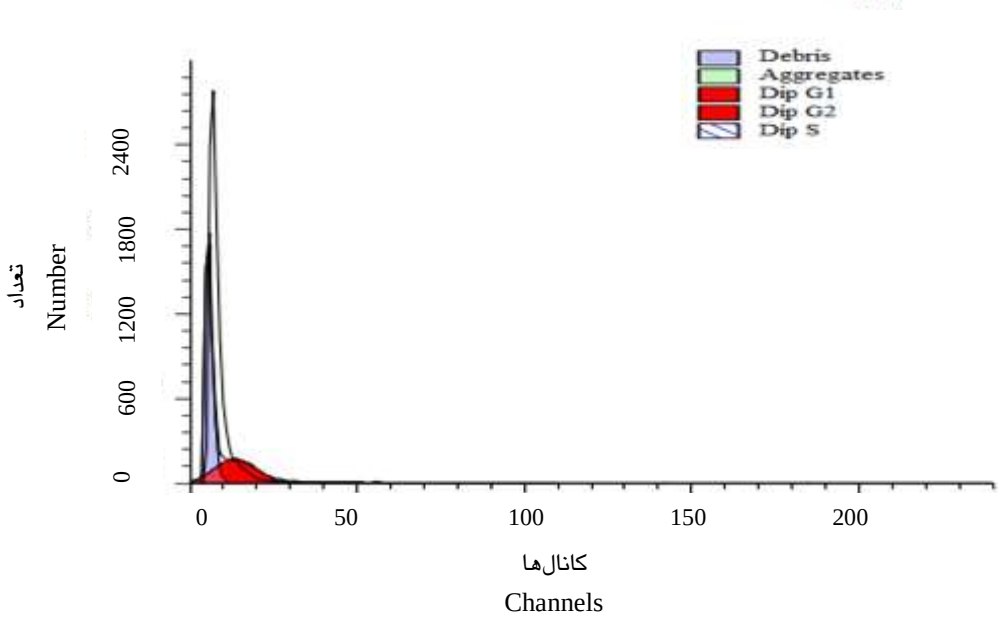

Fig. 9. Flow cytometric analysis of Bidaneh Sefid cell nuclei cold-acclimated. Debris, Aggregates, Diploid Cells in G_1 Phase, Diploid Cells in G_2 Phase, Diploid Cells in S Phase.

شکل ۹- بررسی سطح چندگانی نژادگان بیدانه سفید سازگار شده به سرما به‌روش فلوسایتومتری. هسته‌های خرد شده، هسته‌های بهم چسبیده، یاخته‌های دوگان در فاز G_1، یاخته‌های دوگان در فاز G_2، یاخته‌های دوگان در فاز S.

نتیجه گیری

بر اساس نتیجه‌های به‌دست آمده از پژوهش حاضر، مشخص شد که استفاده از NAA در غلظت ۵ میکرومولار و 2,4-D در غلظت ۵ و ۱۰ میکرومولار در ترکیب با غلظت ۱ میکرومولار BA، باعث افزایش انگیزش پینه در مقایسه با سایر غلظت‌ها، در هر سه نژادگان انگور شد. در نژادگان‌های سازگار شده به سرما در مقایسه با شاهد، مقدار پرولین و وزن خشک پینه در هر سه نژادگان افزایش یافت که نشان دهنده نقش پرولین به‌عنوان یک ترکیب محافظت کننده اسمزی در برابر یخزدگی در نژادگان‌های مورد بررسی بود. در آزمون زنده‌مانی، در بین سه نژادگان انگور، نژادگان بیدانه سفید، تحمل بیشتری نسبت به دماهای یخزدگی نشان داد. همچنین در هر سه نژادگان، ثبات سطح چندگانی در تنش‌های سرما مشاهده شد که این ثبات سطح چندگانی و پایداری ژنتیکی می‌تواند از نظر ریزافزایی و افزایش درون شیشه‌ای نژادگان‌های مورد پژوهش، اهمیت داشته باشد.

منابع References

۱. پاک کیش، ز. ۱۳۸۸. بررسی مقاومت به سرما تغییرات فیزیکی و بیوشیمیایی در هنگام رکود درونی و تعیین نیاز گرمایی ارقام پسته. پایان نامه دکتری. دانشگاه شیراز. ۲۷۳ ص.

۲. جلیلی مرندی، ر. ۱۳۸۴. میوه‌های ریز. انتشارات جهاد دانشگاهی ارومیه. ۲۹۷ ص.

۳. کرمی، م.ج. ۱۳۸۴. معرفی و تشریح خصوصیات مهم ارقام انگور مقاوم به سرما موجود در کلکسیون استان فارس. همایش علمی کاربردی راه های مقابله با سرمازدگی. یزد، سازمان جهاد کشاورزی استان یزد. ۴۰ ص.

4. Ait Barka, E. and J.C. Audran. 1997. Response of champenoise grapevine to low temperatures: changes of shoot and bud proline concentrations in response to low temperatures and correlations with freezing tolerance. J. Hort. Sci. Biotech. 72:577-582.
5. Arora, R. and K. Tanino. 2003. Induction and release of bud dormancy in woody perennials: a science comes of age. J. Hort. Sci. 38:911-921.
6. Arora, R. and M.E. Wisniewsski. 1995. Ultrastructural and protein changes in cell suspension culture of peach associated with low temperature-induced cold acclimation and abscisic acid treatment. Plant Cell Tissue Org. Cult. 40:17-24.
7. Ashraf, M. and M. Foolad. 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. Environ. Exp. Bot. 59:206-216.
8. Bates, L.S., R.P. Waldern and I.K. Teare. 1973. Rapid determination of free prolin for water stress studies. Plant Soil 39:205-208.
9. Bertin, P., J. Bouharmont and J.M. Kniet. 1997. Somaclonal variation and improvement in chiling tolerance in rice: change in chilling-induced chlorophyl fluorescence. Crop Sci. 37:1727-1735.
10. Bonhomme, M., R. Regeau, A. Laconite and M. Gendraud. 2005. Influences of cold deprivation during dormancy on carbohydrate contents of vegetative and floral primordia and nearby structures of peach buds (*Prunus persica* L. Batch). J. Hort. Sci. 105:223-240.
11. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation and microgram quantitites of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Annu. Biochem. 72:248-254.
12. Breton, G., J. Danyluk, F. Ouellet and F. Sarhan. 2000. Biotechnological applications of plant freezing associated proteins. Biotechnol. Annu. Rev. 6:57-99.
13. Chawala, H.S. 2002. Introduction to plant biotechnology. Science Publishers. Inc. Plymouth. U.K. 528 p.

14. Chen, L.L. and S.L. Gao. 2007. *In vitro* tetraploid induction and generation of tetraploids from mixoploids in *Astragalus membranaceus*. Sci. Hortic. 112:339-344.
15. Chinnusamy, V., J. Zhu and J.K. Zhu. 2007. Cold stress regulation of gene expression in plants. Trends Plant Sci. 12:444-51.
16. Dolezel, J. 1997. Flow cytometry, Its application and potential for plant breeding, in Current Topics in Plant Cytogenetics Related to Plant Improvement. Edited by Tamas Lelley, Austria, MUVU niversitatsverlag. 80 p.
17. Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers and F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. Annal. Chem. 28:350-356.
18. Galbraith, D.W., K.R. Harkins and S. Knapp. 1991. Systemic endopolyploidy in *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol. 96:985-989.
19. Gusta, L.V., R. Trischuk and C. Weiser. 2005. Plant cold acclimation: the role of abscisic acid. J. Plant Growth Regul. 24:308-318.
20. Guy, C.L. and D. Haskell. 1987. Induction of freezing tolerance in spinach is associated with the synthesis of cold acclimation induced proteins. Plant Physiol. 84:872-878.
21. Hallowell, E.R. 1980. Cold and Freezer Storage Manual. AVL. Westport. C.T. 195 p.
22. Hernandez-Nistal, J., B. Dopico and E. Labrador. 2002. Cold and salt sress regulates the expression and activity of a chickpea cytosolic Cu/Zn superoxide dismutase. Plant Sci. 163:507-514.
23. Huda, S., R. Isama and M.A. Bari. 2000. Shoot regeneration from internode drived callus of chickpea (*Cicer arietinum* L.). J. Int. Chickpea Pigeonpea Newslett. 7:28-29.
24. Kang, S.M. and J.S. Titus. 1987. Specific proteins may determine maximum cold resistance in apple shoots. J. Hort. Sci. 62:281-285.
25. Kao, C.H. 1997. Physiological significance of stress induced changes in polyamines in plants. Bot. Bull. Acad. Sin. 38:41-44.
26. Khanizadeh, S.D. and C.G. Zarakadas. 1992. Effect of crop load on hardiness, protein and amino acids content of apple flower buds at the wintering stage and the beginning of the growth. J. Plant Nutr. 15:2441-2455.
27. Koster, K.L. and D.V. Lynch. 1992. Solute accumulation and compartmentation during the cold acclimation of puma rye. Plant Physiol. 98:108-113.
28. Kubalakova, M., J. Dolezel and A. Lebeda. 1996. Ploidy instability of embryogenic cucumber (*Cucumis sativus* L.) callus culture. Biol. Plantarum 38:475-480.
29. Mahajan, S. and N. Tuteja. 2005. Cold, salinity and drought stresses: An overview. Arch. Biochem. Biophys. 444:139-158.
30. Marian, C.O., S.L. Krebs and R. Arora. 2003. Dehydrin variability among Rhododendron species: 25-KDa dehydrin is conserved and associated with cold acclimation across diverse species. New Phytol. 161:773-780.
31. Matsuta, N. and S. Yamaki. 1998. Callus induction from leaf disks of stone fruits (*Prunus* spp.). Bull. Fruit Tree Res. Stn. 15:19-30.
32. Naqavi, S.M.S., T. Yasmin, H. Rashid, Z. Chaudary and A. Qureshi. 2002. Callus induction from seeds of Zea *mays* Var. EV-2097. Pak. J. Biol. Sci. 5:956-958.
33. Natesh, S., V.L. Chopra and S. Ram Achanderan. 1992. Biotechnology in Agriculture. Oxford and IBH Pub. Co. New. Dehli. 321 p.
34. Ndong, C., J. Danyluk, K.E. Wilson, T. Pocock, N.P.A. Huner and F. Sarhan. 2002. Cold-regulated cereal chloroplast late emberyogenesis abundant-like proteins. Plant Physiol. 129:1368-1381.
35. Nesbitt, M., R. Ebel, D. Findley, B. Wilkins, F. Woods, and D. Himelrick. 2002. Assay to assess freeze injury of Satsuma Mandarin. HortScience 37:871-877.

36. Ozden, M. and M. Karaaslan. 2011. Effects of cytokinin on callus proliferation associated with physiological and biochemical changes in *Vitis vinifera* L. Acta Physiol. Plant. 33:1451-1459.
37. Park, E.J., Z. jeknic and H.H. Chen. 2006. Exogenous application of glycinebetaine increases chilling tolerance in tomato plants. Plant Cell Physiol. 47:706-714.
38. Pelah, D., R.A. Kaushik, A. Nerd and Y. Mizrahi. 2003. Validity of *in vitro* viability tests for predicting response of different vine cacti in the field to high and low temperatres. J. Prof. Assoc. Cactus 65-73.
39. Sgarey, A.P., K. Subasini and K. Ktishmamurthy. 1993. Plant regeneration via somatic embryogenesis in chickpea (*Cicer arietinum* L.). Plant Cell Report 12:652-655.
40. Smulders, M.J. M., W. Rus-Kortekaas and L. J.W. Glissen. 1994. Development of polysomaty during differentiation in diploid and tetraploid tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plants. Plant Sci. 97:53-60.
41. Sung, D.Y., F. Kaplan, K.J. Lee and C.L. Guy. 2003. Acquired tolerance to temperature extrems. Trends Plant Sci. 8:179-189.
42. Thiem, B. and E. Sliwinska. 2003. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in cloudberry (*Rubus chamaemorus* L.) in vitro cultures. Plant Sci. 164:129-134.
43. Thomashow, M.F. 1998. Role of cold- responsive genes in plant freezing tolerance. Plant Physiol. 118:1-7.
44. Wei, H., A.L. Dhanaraj, R. Arora, L.J. Rowland, Y. Fu and L. Sun. 2006. Identification of cold acclimation-responsive Rhododendron genes for lipid metabolism, membrane transport and lignin biosynthesis: importance of moderately abundant ESTs in genomic studies. Plant Cell Environ. 29:58-570.
45. Winkler A., J. Cook, N. Klievers and L. Lideer. 1974. General Viticulture. University of California press, Berkeley and Los Angles. 710 p.
46. Wisniewski, M. and C. Basett. 2003. An overview of cold hardiness in woody plants. HortScience 38:953-959.
47. Wolf, T.K. and M.K. Cook. 1994. Cold hardiness of dormant buds of grape cultivars: Comparison of thermal analysis and field survival. HortScience 29:1453-1455.
48. Wu, J.H. and P. Mooney. 2002. Autotetraploid tangor plant regeneration from *in vitro* citrus somatic embryogenic callus treated with colchicines. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 70:99-104.
49. Zhang, M. and C.B. Rajushkar. 1994. Selection of cold tolerant cells of graps in suspension culture. Plant Sci. 97:62-74.

Iranian Journal of Horticultural Science and Technology 17 (3): 299-312 (2016)

Physiological and Cytogenetical Responces of Three Grapevine Genotypes Reactions to Cold Stress under *In Vitro* Conditions

B. Hosseini, A.Farokhzad, J. Amiri and L. Aghazadeh Aghdam[*1]

Low temperature stress, cause many physiological and biochemical process in plants. Different genotypes of grapes show diverse reaction to cold stress and therefore so, the selection of cold tolerant genotypes is the most effective method to avoid frost damages. *In vitro* culture is efficient methods for selecting cold tolerant plants. Callus was formed in three grapevine genotypes; including Bidaneh Sefid, Dom-rubahi and Askari, and then callus were incubated for cold accilimation, a period of 24 days in darkness at 4°C. The contents of soluble sugar, proline, dry weight precentage and the ploid level in acclimated and control callus have been measured. Also, survival test at different freezing temperatures were conducted. Maximum callus induction was obtained in the medium containing 5 and 10 µM of 2, 4-D and 5 µM NAA in combination with 1 µM BA. In the Askari genotype, in terms of low temperature, low proline content was observed. By making cold acclimation, proline, dry matter and total protein increased that, the increase in Bidaneh Sefid and Dom-rubahi was more than Askari. The results of this study suggested that the three genotype understudy, Bidaneh Sefid, showed greater resistance to freezing temperatures, as well as the effect of cold on ploidy level genotypes, stable ploidy level and genetic stability was observed, and that is the most important based on the *in vitro* micropropagation and proliferation of studied genotypes.

Key Words: Grapevine, Callus, Proline, Cold-acclimation, Ploid level, Slouble sugar.

1. Associate Professor, Assistant Professors and Former M. Sc. Horticulture, College of Agriculture, Urmia University, Urmia, I.R.Iran, respectively.

* Corresponding author, Email: (b.hosseini@urmia.ac.ir)