

## Effect of chitosan spray on cold tolerance physiology and budburst time of Yaghooti grapevine

### Abstract

The present study was carried out in order to investigate the effect of foliar spray of chitosan (CTS; 0, 5, 10 and 20 gr/L) in wooly bud stage (late March) on budburst time and physiological indices related to spring cold tolerance of Yaghooti grapevine during 2021 and 2022. Based on the results, budburst time in vines treated with 10 gr/L CTS was delayed up to 8 days compared to the control vines. Also, CTS at 20 g/L, increased abscisic acid and decreased gibberellic acid in the bud of grapevines. Furthermore, the 20 g/L of CTS caused a 15.16% increase in the bud water content and a 33.24% decrease in ionic leakage of plant compared to the control. The vines sprayed with CTS, especially the concentration of 10 and 20 g/L, had the highest amount of proline, protein, carbohydrates, soluble sugars, total phenol and activity of antioxidant enzymes. In addition, the lowest accumulation of MDA content and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> occurred in the leaves of grape in the treatment of 20 g/L CTS. With the increase in CTS concentration, the amount of leaf photosynthetic pigments and bud endogenous polyamines in the leaves of grapevine increased. Vines treated with 10 g/L of CTS had more potassium, phosphorus and calcium content. In general, spraying with CTS at 10 and 20 gr/L in wooly bud stage through affecting bud's hormones, polyamines and other physiological indices while inducing cold tolerance, delayed budburst time up to 8 days in Yaghooti grape.

**Keywords:** *Grape, Chilling injury, Soluble sugars, Chitosan, Hormones*

## اثر محلول پاشی کیتوزان بر فیزیولوژی تحمل به سرما و زمان شکفتن جوانه در انگور یاقوتی

### چکیده

پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر محلول پاشی کیتوزان (غلظت‌های ۰، ۵، ۱۰ و ۲۰ گرم در لیتر) در مرحله نوک‌پنبه‌ای (اواخر اسفند) بر زمان شکفتن جوانه و شاخص‌های فیزیولوژیکی مرتبط با تحمل به سرمای بهاره انگور یاقوتی در سال‌های ۱۴۰۰ و ۱۴۰۱ انجام گرفت. بر اساس نتایج شکفتن جوانه در تاک‌های تیمار شده با غلظت ۱۰ گرم در لیتر در مقایسه با تاک‌های شاهد تا ۸ روز به تاخیر افتاد. کاربرد کیتوزان به ویژه غلظت ۲۰ گرم در لیتر باعث افزایش اسید آسبازیک و کاهش اسید جیبرلیک در جوانه‌های تاک شد. به علاوه تیمار ۲۰ گرم در لیتر موجب افزایش ۱۵/۱۶ درصدی مقدار آب جوانه و کاهش ۳۳/۳۴ درصدی نشت یونی نسبت به تاک‌های شاهد شد. بیشترین مقدار پرولین، پروتئین، کربوهیدرات، قندهای محلول، فنول کل و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مربوط به تاک‌های تیمار شده با غلظت ۱۰ و ۲۰ گرم در لیتر کیتوزان بود. به علاوه کمترین مقدار مالون‌دی‌آلدهید (۳/۱۹ میکرومول در گرم وزن تر) و پراکسید هیدروژن (۵/۳۴ میکرومول در گرم وزن تر) در جوانه تاک‌های تیمار شده با غلظت ۲۰ گرم در لیتر مشاهده شد. با افزایش غلظت کیتوزان مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی برگ و پلی‌آمین‌ها جوانه افزایش یافت. همچنین تاک‌های تیمار شده با غلظت ۱۰ گرم در لیتر، مقدار پتاسیم، فسفر و کلسیم بیشتری داشتند. به طور کلی محلول پاشی با غلظت ۱۰ و ۲۰ گرم در لیتر کیتوزان در مرحله نوک‌پنبه‌ای جوانه با تاثیر بر مقادیر هورمون‌ها، پلی‌آمین‌ها و دیگر شاخص‌های فیزیولوژیکی ضمن القاء تحمل به سرما، تا ۸ روز باعث تاخیر در زمان شکفتن جوانه‌های انگور یاقوتی شد.

کلید واژه‌ها: تاک، سرمازدگی، قند محلول، کیتوزان، هورمون‌ها

### مقدمه

انگور (*Vitis vinifera* L.) یکی از محصولات میوه‌ای با ارزش در جهان است که در بیش از ۹۰ کشور کاشته می‌شود و به عنوان میوه تازه یا فرآوری شده به عنوان کشمش و آب‌میوه مصرف می‌شود. ایران با بیش از ۳۰۰۰۰۰ هکتار باغ انگور و تولید حدود ۱/۵ میلیون تن انگور یکی از مناطق مهم تولید انگور است که از نظر مساحت تاکستان در رتبه هشتم جهان و چهاردهمین تولیدکننده انگور است (FAO, 2022). تنش سرما به دلیل دوره‌های طولانی یخبندان در پاییز، زمستان و بهار، به بافت‌های دائمی، اندام‌های در حال رشد و اندام‌های زایشی انگور آسیب می‌رساند (Karimi, 2019). اغلب نقاط انگور کاری ایران در اقلیم‌های سرد واقع شده‌اند این بدان معنی است که در برخی نقاط از قبیل استان همدان گاهی دما تا ۲۳- درجه سانتی‌گراد در زمستان و تا ۴- درجه سانتی‌گراد در طول بهار کاهش می‌یابد. رقم یاقوتی از سطح زیرکشت قابل توجهی در کشور برخوردار است. این رقم نیاز سرمایی کمی داشته (حدود ۲۰۰ ساعت) و به محض شکست دما شروع به شکوفایی می‌کند. لذا سرمازدگی یکی از تهدیدات پرورش این رقم است که می‌تواند باعث آسیب برگ‌ها، شاخه‌های سبز و خوشه‌های گل این رقم در اوایل فصل رشد شود (Ershadi et al., 2016). بنابراین، به کارگیری روش‌های کاهش خسارت تنش سرما یکی از الزامات کلیدی مدیریت تاکستان و تولید پایدار انگور در مناطق مستعد با شرایط آب و هوایی سرد است.

گیاهان از طریق مکانیسم‌های مختلف از جمله تغییرات مورفولوژیکی، مولکولی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی به سرما واکنش نشان می‌دهند (Vosnjak et al., 2021). از طرفی تنش سرما بر بقای گیاه، تقسیم سلولی، فتوسنتز، انتقال آب، پتانسیل رشد و در نهایت عملکرد و کیفیت گیاهان تأثیر می‌گذارد. همچنین دمای پایین شدت فتوسنتز را تغییر می‌دهد و عمدتاً به دلیل کاهش فعالیت‌های آنزیمی (مثل فعالیت آنزیم رویسکو) منجر به کاهش جذب CO<sub>2</sub> می‌شود (Aazami et al., 2021). همچنین تنش سرما باعث علائم فنوتیپی متعددی مانند کاهش رنگدانه‌های فتوسنتزی، کلروز، پژمردگی و خشکیدگی برگ می‌شود. علاوه بر این، تغییرات متابولیکی مختلفی در نتیجه تنش سرما ایجاد می‌شود، مانند کاهش محتوای اسیدهای چرب غیراشباع و افزایش نفوذپذیری غشای سلولی که کارایی گیاه را کاهش می‌دهند (Vosnjak et al., 2021).

یکی از روش‌های اخیر برای بهبود تحمل به تنش در محصولات، استفاده از مولکول‌های طبیعی مانند کیتوزان است که با تحریک پاسخ‌های مرتبط با سیستم دفاعی گیاه، موجب خنثی کردن اثرات مضر تنش‌های زیستی و غیر زیستی و بهبود عملکرد و کیفیت محصولات می‌شود (Quitadamo et al., 2021). کیتوزان (C<sub>11</sub>H<sub>17</sub>O<sub>7</sub>N<sub>2</sub>) یک پلی‌ساکارید خطی و از مشتقات کیتین است و پس از سلولز

دومین پلیمر رایج در جهان به شمار می‌رود و به عنوان یک جزء در پوسته سخت بوستان، اسکلت بیرونی حشرات و دیواره سلولی قارچ وجود دارد. به طور خاص، کیتوزان و مشتقات آن دارای فعالیت ضد قارچی، ضد باکتریایی و ضد ویروسی هستند و گاهی به عنوان جایگزینی برای آفت‌کش‌های شیمیایی، برای دستیابی به کنترل بیماری‌های گیاهی مورد استفاده قرار گرفتند (Quitadamo et al., 2021). همچنین مشخص شد که کیتوزان و مشتقات آن باعث القاء مقاومت گیاهان در برابر تنش‌های غیرزیستی مانند خشکی، شوری، دمای بالا و فلزات سنگین می‌شوند (Li et al., 2017; Hidangmayum et al., 2019; Muley et al., 2019; Qu et al., 2019). در کشاورزی، کیتوزان از طریق محلول‌پاشی برگ گیاهان، تیمار بذر و یا به عنوان کود به طور مستقیم به خاک اضافه می‌شود و یا به عنوان یک محرک زیستی برای تقویت سیستم آنتی-اکسیدانی استفاده می‌شود (Attia et al., 2021; Quitadamo et al., 2021).

### پیشینه پژوهش

کاربرد کیتوزان می‌تواند باعث تقویت سیستم دفاعی گیاه در مواجهه با تنش‌های محیطی مختلف شود. همچنین استفاده از کیتوزان منجر به افزایش قندهای محلول، محتوای نسبی آب برگ، غلظت کلروفیل و جذب عناصر بسیاری از گیاهان شده است (Hidangmayum et al., 2019). کاربرد نانوذرات کیتوزان در برخی گیاهان از طریق تجمع پرولین و افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز اثرات تنش خشکی (Jiao et al., 2012) و شوری (Hassan et al., 2021) را به طور قابل توجهی کاهش داد. همچنین کاربرد کیتوزان منجر به کاهش تجمع پراکسید هیدروژن و مالون دی‌آلدئید گیاهان در این پژوهش‌ها شد (Jiao et al., 2012). مطالعه‌ای دیگر روی کاهو تحت تنش شوری محلول پاشی نانوکیتوزان به طور قابل توجهی اثرات منفی شوری روی گیاه را کاهش داد به عبارت دیگر تیمار کیتوزان کاهش کلروفیل را به تاخیر انداخت و باعث القاء فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و گلوکاتایون ردوکتاز در گیاهان تحت تنش شوری شد. همچنین کاربرد خارجی کیتوزان باعث افزایش تجمع پتاسیم در برگ کاهو تحت تنش شوری شد (Zhang et al., 2021). در پژوهشی بوته‌های موز، کاربرد خارجی نانوذرات کیتوزان باعث افزایش وزن تر و خشک بوته، محتوای مواد مغذی، تجمع ترکیبات فنولی کل، کربوهیدرات‌های محلول، پرولین و اسیدهای آمینه، رنگدانه‌های فتوسنتزی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از جمله سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز برگ گیاهان تحت تنش سرما شد (Wang et al., 2021). محلول‌پاشی بوته‌های گل رز با کیتوزان به طور قابل توجهی باعث افزایش وزن زیست توده، شاخص‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی از جمله فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شده است (Arshad et al., 2022). در مطالعه‌ای روی انگور کاربرد کیتوزان منجر به افزایش ترکیبات فنولی و آنتوسیانین انگور شده است (Singh et al., 2020). همچنین کاربرد توام کیتوزان و صمغ هندی در انگور تحت ابارمائی سرد باعث کاهش نشت یونی، پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء و تولید کمتر پراکسید هیدروژن شده است (Eshghi et al., 2022) که حاکی از دخالت کیتوزان در فرایندهای مرتبط با تحمل به تنش‌های محیطی در گیاهان می‌باشد.

با توجه به تغییر اقلیم و گرمایش جهانی سرمازدگی دیررس بهاره یکی از تهدیدات مهم محیطی است که اغلب باعث ایجاد خسارت به بخش‌های زایشی تاک و کاهش عملکرد می‌شود. لذا کاربرد ترکیبات شیمیایی به منظور تاخیر در شکفتن جوانه و یا افزایش تحمل به دمای پایین یکی از عملیات‌های مهم باغی است که می‌تواند آثار زیانبار اقتصادی سرمازدگی در تاکستان‌ها را کاهش دهد. تاکنون گزارشی در مورد اثر کاربرد برگ کیتوزان بر تحمل به سرمای بهاره گیاهان چوبی از جمله انگور گزارش نشده است. فرضیه ما اینست که کیتوزان مانند یک پوشش باعث تاخیر در شکوفایی جوانه می‌شود و از طرفی منجر به تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی تاک تحت تنش سرما می‌شود. بنابراین هدف از انجام این پژوهش، بررسی اثر کاربرد اول فصل کیتوزان بر زمان شکفتن جوانه و شاخص‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مرتبط با تحمل به سرما در انگور یاقوتی تحت سیستم پرورش پرگولا بود.

### روش‌شناسی پژوهش

این پژوهش روی ۲۴ تاک غیر پیوندی انگور رقم یاقوتی (*Vitis vinifera* L.) با شرایط رشد، تربیت و هرس یکسان در تاکستان تحقیقاتی شماره یک دانشکده کشاورزی دانشگاه ملایر در سال‌های ۱۴۰۰ و ۱۴۰۱ انجام شد. تاک‌های با فاصله ۲×۴ متر روی

ردیف‌های شرقی- غربی با سیستم تربیت پرگولا کاشته شدند. آزمایش در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۴ تیمار و سه تکرار (هر تکرار دو تاک) اجرا شد. تیمارها شامل محلول‌پاشی کیتوزان (سیگما-آلدریج، آمریکا) در غلظت‌های ۰ (آب مقطر)، ۵، ۱۰ و ۲۰ گرم در لیتر بود. محلول‌پاشی غلظت‌های مختلف کیتوزان طی دو مرحله در اواخر اسفند و اوایل فروردین درست کمی قبل از متورم شدن تا تورم کامل جوانه‌ها (مرحله نوک‌پنبه‌ای بر اساس سیستم فنولوژیکی انگور ایکهورن-لورنز؛ EL=3; Eichhorn-Lorenz, 1977) با استفاده از یک سمپاش ۱۰ لیتری تا مرحله آب چک روی تاک‌ها انجام شد. برای افزایش بازده جذب، ۵٪ مویان (تووین ۲۰) به محلول اضافه شد. تاک‌های شاهد با ترکیب آب مقطر و مویان محلول‌پاشی شدند. از لحاظ زمانی هرس تاک‌ها بر اساس عرف منطقه ملایر بعد از ظهور مرحله سه‌برگی و رفع خطر سرمای بهاره در ۵ اردیبهشت‌ماه انجام شد. از لحاظ شدت هرس، تعداد ۱۵ شاخه یکساله حاوی دو اسپور ۲ و ۴ جوانه‌ای در هر تاک حفظ شد. طی هر دو سال سایر عملیات‌های باغی از قبیل مبارزه با آفات و امراض، آبیاری و تغذیه نیز مطابق با عرف منطقه صورت گرفت. به منظور ارزیابی شاخص‌های مختلف در جوانه نمونه‌برداری از شاخه‌های یکساله دو هفته بعد از آخرین محلول‌پاشی انجام شد که طی آن تعداد ۱۰ شاخه به طول ۲۵-۲۰ سانتی‌متر از گره‌های میانی شاخه‌های یکساله انتخاب و جمع‌آوری شد. شاخه‌ها پس از علامت‌گذاری، درون حوله کاغذی مرطوب پیچیده شده و بلافاصله با یخدان یونولیتی برای ارزیابی‌های شاخص‌های نشت یونی، پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء، پراکسید هیدروژن، مقدار آب جوانه به آزمایشگاه باغبانی دانشگاه ملایر منتقل شدند. نمونه‌های مربوط به اندازه‌گیری آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، پروتئین محلول، پرولین، قندهای محلول، پلی‌آمین‌ها و برخی هورمون‌های گیاهی ابتدا در ازت مایع منجمد و به صورت مدفون در یخ بلافاصله به فریزر ۸۰- درجه‌سانتی‌گراد آزمایشگاه فیزیولوژی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه ملایر منتقل شد.

اندازه‌گیری زمان باز شدن (شکفتن) جوانه و شکوفایی گل به عنوان بخشی از شاخص‌های دخیل در اجتناب از سرمای دیررس بهاره در تاک‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف کیتوزان ثبت و مقایسه شدند. ملاک شکفتن جوانه‌ها رسیدن آنها به مرحله نوک سبز بود. مدت زمان لازم برای باز شدن ۵۰ درصد جوانه‌ها از زمان محلول‌پاشی، به عنوان تاریخ شکفتن جوانه در نظر گرفته شد. تعداد روز تا گلدهی با ثبت روزها از زمان محلول‌پاشی تا زمان شکوفایی ۱۰ درصد گل‌ها در خوشه در هر تیمار اندازه‌گیری شد (Wang and Dami, 2020).

دو هفته بعد از آخرین محلول‌پاشی، تعداد ۱۰ تا ۱۵ شاخه به طول ۲۵-۲۰ سانتی‌متر از گره‌های میانی شاخه‌های یکساله واقع در اطراف بوته‌های تیمار شده با کیتوزان انتخاب و جمع‌آوری شد. شاخه‌ها پس از اتیکت زنی، درون حوله کاغذی مرطوب پیچیده شده و بلافاصله با یخدان یونولیتی برای ارزیابی‌های بعدی به آزمایشگاه منتقل شدند. ابتدا به منظور حذف آلودگی‌های سطحی، شاخه‌ها با آب مقطر شستشو شدند. پس از حذف رطوبت اضافی با دستمال حوله‌ای، ۵ شاخه از هر رقم درون کیسه فریزرهای (یا فویل آلومینیومی با پارچه مرطوب) مجزا گذاشته و به مدت ۱۲ ساعت در معرض دمای سرمازدگی (صفر درجه سانتی‌گراد) در یک اتاقک سرماساز ترموگرادیان (رادالکترونیک، تهران) قرار داده شدند. دمای شروع اتاقک سرماساز براساس دمای محیط در روز نمونه‌برداری تعیین و روند کاهش دمای آن ۲ درجه سانتی‌گراد در هر ساعت بود (Karimi, 2019). بعد از کاهش تدریجی دما تا تیمار سرمای هدف (صفر درجه سانتی‌گراد)، دمای اتاقک سرما ساز به مدت ۱۲ ساعت در این دما ثابت باقی ماند. ارزیابی تحمل به سرما به روش نشت یونی صورت گرفت.

مقدار نشت یونی بافت جوانه با استفاده از دستگاه هدایت‌سنج الکتریکی و در دو مرحله قبل از اتوکلاو ( $EC_1$ ) و پس از آن ( $EC_2$ ) اندازه‌گیری شد. مقدار نشت یونی (EL) از طریق رابطه  $(EL = (EC_1/EC_2) \times 100)$  محاسبه گردید (Ershadi et al., 2016). اندازه‌گیری مقدار پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی به وسیله تست تیوباربیتوریک اسید (TBAT) با سنجش مقدار مالون دی‌آلدئید انجام شد (Heath and Packer, 1968). پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ ) به روش Velikova and Loreto (2001) اندازه‌گیری شد. مقدار پراکسید هیدروژن نمونه‌ها به وسیله مقایسه جذب آن‌ها در طول موج ۳۹۰ نانومتر و منحنی استاندارد آن در طیفی از ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ میکرومول بر میلی‌لیتر محاسبه شد. سنجش غلظت پروتئین محلول جوانه به روش اسپکتروفتومتری در طول موج ۵۹۵ نانومتر انجام شد (Bradford, 1976).

اندازه‌گیری مقدار آب جوانه با توزین جوانه‌ها قبل و بعد از قرار دادن در آون (مدت سه روز در دمای  $70^{\circ}\text{C}$ ) تعیین شد (Webster and Ebdon, 2005).

برای اندازه‌گیری پرولین جوانه مقدار جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۱۸ نانومتر در دستگاه اسپکتروفوتومتر (مدل Spekol 2000، ساخت آلمان) قرائت و غلظت پرولین بر حسب میکرومول بر گرم وزن تر جوانه تعیین شد (Bates et al., 1973). برای اندازه‌گیری مقدار کلروفیل‌های a، b، کل و کاروتنوئید برگ از روش استخراج با استون استفاده شد (Lichtenthaler, 1987). استخراج عناصر فسفر، پتاسیم، کلسیم، منیزیم، آهن و روی غذایی برگ به روش هضم تر و اندازه‌گیری غلظت به طور جداگانه بادستگاه جذب ا مورد ارزیابی قرار گرفت (Karla, 1998). جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، نمونه‌های جوانه (۱۰۰ میلی‌گرم) در ازت مایع کوبیده شده و هر نمونه در یک تیوب پلاستیکی کوچک ریخته شده و تا زمان اندازه‌گیری در دمای  $-80^{\circ}\text{C}$  درجه‌سانتی‌گراد نگهداری شدند. فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز (Nakano and Asada, 1981)، کاتالاز (Bergmeyer, 1970) و پراکسیداز (Herzog and Fahimi, 1973) با دستگاه اسپکتروفوتومتر مدل Spekol 2000، ساخت آلمان به ترتیب، در طول موج‌های ۲۹۰، ۲۴۰ و ۴۶۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. هر یک واحد از فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و گایاکول‌پراکسیداز به عنوان مقداری از این آنزیم‌ها به صورت جداگانه در نظر گرفته شد که موجب کاهش یک میکرومول پراکسید هیدروژن در هر دقیقه می‌شود. هر واحد فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز به عنوان مقداری از آنزیم در نظر گرفته شد که موجب اکسید شدن یک میکرومول آسکوربات در هر دقیقه می‌شود. میزان فعالیت هر سه آنزیم بر حسب واحد در میلی‌گرم پروتئین جوانه بیان شد. استخراج و اندازه‌گیری فنول کل با کمی تغییر نسبت به روش فولین‌سیوکالتیو صورت گرفت و جذب نوری نمونه‌ها با دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۷۶۵ نانومتر قرائت شد (Velioglu et al., 1998). اندازه‌گیری کربوهیدرات محلول کل با روش رنگ سنجی به کمک آنترون و قرائت در طول موج ۶۲۵ نانومتر صورت گرفت (Yemm and Willis, 1954).

برای استخراج قندهای محلول ابتدا جوانه‌ها از شاخه یکساله جدا و در ازت مایع منجمد شدند. در مرحله بعد بافت‌ها با کمک ازت مایع کاملاً پودر شد. سپس نیم‌گرم از بافت پودر شده توزین و در ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۸۰٪ محلول و به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۸۰۰۰ سانتریفوژ شد. این محلول از صافی ۰/۲ میکرومتر عبور داده شد تا برای تفکیک قندها به دستگاه HPLC تزریق شود. برای جداسازی قندها از دستگاه HPLC مدل Unicam-Crystal-200 ساخت کشور انگلیس که مجهز به آشکارساز UV-Vis SPD MLOAD از نوع Photodiode array بود استفاده شد. مقدار تزریق ۱۰ میکرولیتر و ستون به کار گرفته شده Spherisorb C8-ODS<sub>2</sub> به ابعاد طول ۱۵۰ میلی‌متر و قطر ۴/۶ میلی‌متر و قطر ذرات ۰/۳ میکرون بود. فاز متحرک شامل بافر سیترات سدیم  $\text{pH}=5/5$  و استونیتریل فوق خالص با نسبت ۹۹:۱ و با سرعت عبور ۰/۱ میلی‌لیتر بر دقیقه بود. بر اساس زمان بازداری و با استفاده از استانداردهای گلوکز، فروکتوز و ساکاروز، نوع و مقدار قندهای محلول در نمونه‌های مجهول مشخص و به صورت میکرومول بر گرم وزن تر بیان شد (Comis et al., 2001).

برای استخراج و اندازه‌گیری پلی‌آمین‌های پوترسین، اسپرمیدین و اسپرمین مقدار ۲۵۰ میلی‌گرم از بافت گیاهی (جوانه) در ۲ میلی‌لیتر محلول ۴٪  $\text{CLO}_4\text{H}$  حاوی ۱ و ۷ دی‌آمینو‌هپتان (۵ میلی‌گرم در لیتر از اسید کلریدریک ۲ نرمال) هم‌وزن گردید. بعد از یک ساعت ماندن در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  از فیلتر ۰/۴۵ میکرون عبور داده شد. سپس روی ۰/۲ میلی‌لیتر از این محلول، مقدار ۱ میلی‌لیتر بافر کربنات با  $\text{pH}=9$  و یک میلی‌لیتر دانسیل کلراید (۱۰ میلی‌گرم در ۱ میلی‌لیتر استون) اضافه و به خوبی به هم زده شد. این مخلوط به مدت یک ساعت در دمای  $60^{\circ}\text{C}$  و در تاریکی قرار داده شد. سپس تا زمان تزریق به دستگاه HPLC در یخچال نگهداری شد. پس از این مراحل پلی‌آمین‌ها به فرم دانسیله در می‌آیند که توسط ۳ میلی‌لیتر تولوئن از مواد دیگر جدا شده و سپس به دستگاه HPLC تزریق گردید. برای اندازه‌گیری غلظت پلی‌آمین‌ها ۱۰ میکرولیتر از محلول پایانی مرحله جداسازی، به ستون کوچک با طول ۱۰ سانتی‌متر و قطر داخلی ۳ میلی‌متر فاز معکوس از نوع Chorompack-Nederland متصل به دستگاه HPLC مدل Unickam-crystal 200 ساخت انگلستان، تزریق گردید. فاز متحرک شامل مخلوط استونیتریل فوق خالص و آب دیونیزه به ترتیب با نسبت ۷۲ به ۲۸ حجم به حجم می‌باشد که با سرعت ۲ میلی‌لیتر بر دقیقه حرکت آن با سیستم ایزوکرایک انجام می‌شود. آشکارساز دستگاه از نوع UV و در طول موج ۳۳۷ نانومتر تنظیم گردید (Walter and Geuns, 1987).

استخراج و اندازه‌گیری هورمون‌های درون‌زای گیاهی شامل اسید آبسزیک و اسیدجیبرلیک به شرح ذیل انجام شد (Yurekli et al., 2001). برای استخراج، یک گرم پودر منجمد شده بافت جوانه‌ها به ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰٪، ۰/۱ گرم پلی‌وینیل-پیرولیدون

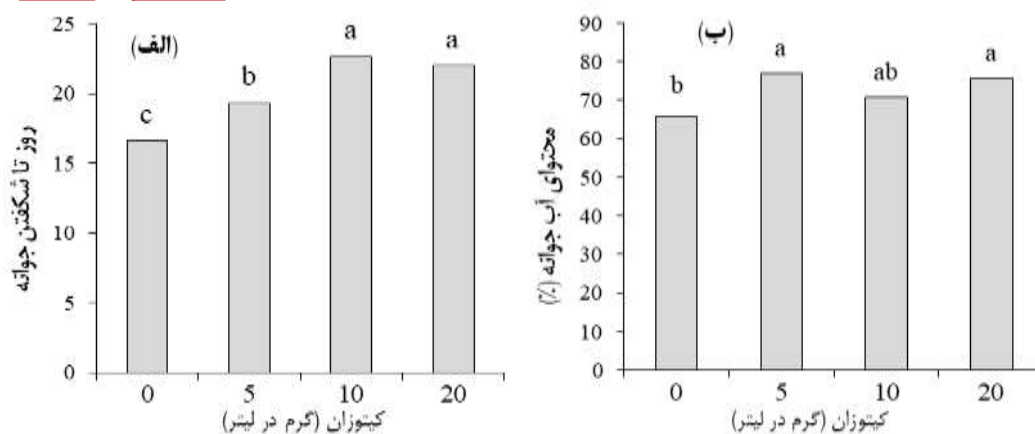
(PVP) و ۰/۰۱ گرم ویتامین ث اضافه و به مدت یک شب در دمای ۴°C روی شیکر با دور ۱۲۰ دور در دقیقه تکان داده شد تا عمل انحلال هورمون اسید آسبیزیک به خوبی صورت گیرد. سپس مخلوط هموزن شده به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۴۰۰۰ سانتریفوژ و محلول رویی آن جدا شده و pH آن به ۸ رسانده شد. عمل استخراج از رسوبات باقیمانده دو بار تکرار شد. بعد از صاف کردن عصاره با کاغذ صافی (واتمن شماره ۱)، متانول اضافی تبخیر داده شد و سپس pH بخش باقیمانده با اسید هیدروکلریک ۰/۲ نرمال در حدود ۲/۵ تنظیم شده و به آن ۱۰ میلی لیتر اتیل استات اضافه شد. آنگاه اتیل استات تبخیر شده و به رسوب باقیمانده یک میلی لیتر محلول متانول ۳٪ و اسیداستیک ۰/۱ مولار اضافه شد تا به صورت محلول درآید. مخلوط حاصل با استفاده از صافی ۰/۴۵ میکرونی پالایش و از آن ۲۰ میکرولیتر برای مرحله ارزیابی برداشت شد. سپس مقدار ۲۰ میکرولیتر محلول استخراج شده به ستون Diamonsic-C18 با قطر ذرات ۵ میکرومتر، طول ۲۵ سانتی متر، قطر داخلی ۴/۶ میلی متر با سیستم فاز معکوس در دستگاه HPLC مدل Unicam-Crystal-200 ساخت کشور انگلیس تزریق گردید. فاز متحرک از متانول ۲۰ تا ۷۵٪ در اسید استیک ۱٪ با نرخ جریان ۰/۱ میلی لیتر در دقیقه شده برای جیرلین و ۱/۲ میلی لیتر در دقیقه برای اسید آسبیزیک تشکیل شده بود. از آشکارساز UV-Vis SPD MLOAD از نوع Photodiode array در طول موج ۲۶۰ نانومتر استفاده شد. بر اساس زمان بازداری طبق نمونه استاندارد اسید آسبیزیک و اسید جیرلینک و سطح زیر منحنی، مقدار اسید آسبیزیک و جیرلین نمونه‌ها مشخص و به صورت نانوگرم در گرم وزن تر بیان شد.

برای تجزیه و تحلیل آماری اطلاعات به دست آمده، از نرم افزار (SAS 9.1) استفاده گردید. به دلیل معنی دار نشدن اثر سال، داده‌های ارائه شده به صورت میانگین دو سال متوالی می‌باشند. مقایسه میانگین تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد بررسی شد و نمودارها با نرم افزار Excel 2007 رسم گردید.

## یافته‌های پژوهش

### روز تا شکفتن جوانه و شکوفایی گل

بر اساس نتایج، محلول پاشی کیتوزان باعث تغییر در زمان شکفتن جوانه (باز شدن جوانه) در تاک‌های انگور یا قوتی شد این تغییرات وابسته به غلظت بوده و تاک‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف کیتوزان پاسخ‌های متفاوتی از نظر زمان شکفتن جوانه نشان دادند. با افزایش غلظت کیتوزان از ۵ به ۱۰ گرم در لیتر زمان باز شدن جوانه افزایش و در غلظت ۲۰ گرم در لیتر کیتوزان زمان شکفتن جوانه رو به کاهشی گذاشت اگرچه از لحاظ آماری اختلاف معنی داری با غلظت ۱۰ گرم در لیتر نداشت. در تاک‌های تیمار شده با غلظت ۱۰ گرم در لیتر کیتوزان در مقایسه با تاک‌های شاهد شکفتن جوانه تا ۸ روز دیرتر اتفاق افتاد (شکل ۱). اثر کیتوزان بر شاخص روز تا زمان شکوفایی (گلدهی) معنی دار نشد.



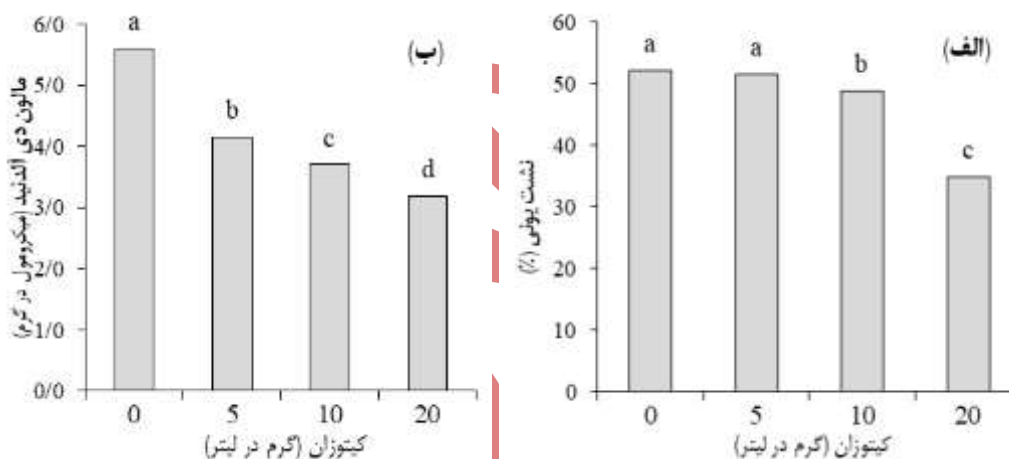
شکل ۱. اثر محلول پاشی کیتوزان بر زمان شکفتن (الف) و مقدار آب (ب) جوانه در انگور یا قوتی. میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون اختلاف معنی داری در سطح ۵٪ با هم ندارند.

## مقدار آب جوانه

مقدار آب جوانه تحت تاثیر کاربرد کیتوزان بسته به غلظت به کار رفته دستخوش تغییراتی شد. در تاک‌های تیمار شده با غلظت‌های ۵ و ۲۰ میلی‌گرم در گرم کیتوزان مقدار آب جوانه در مقایسه با مقدار این شاخص در تاک‌های شاهد به طور معنی‌داری افزایش یافت ولی در تاک‌های تیمار شده با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر مقدار آب جوانه با شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت (شکل ۱). تیمار کیتوزان منجر به حفظ آب جوانه در تاک‌های تیمار شده در مقایسه با شاهد شد (شکل ۱).

## نشت یونی جوانه

همانطور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، درصد نشت یونی جوانه اندازه‌گیری شده پس از سرمادهی مصنوعی شاخه‌های یکساله تحت تاثیر کاربرد کیتوزان قرار گرفت. با افزایش غلظت کیتوزان از صفر تا ۲۰ گرم در لیتر درصد نشت یونی جوانه روند کاهشی نشان داد. کمترین نشت یونی اندازه‌گیری شده (۳۴/۸ درصد) مربوط به جوانه تاک‌هایی بود که با غلظت ۲۰ گرم در لیتر کیتوزان محلول‌پاشی شده بودند. درصد نشت یونی در این تاک‌ها به مقدار ۳۳/۳ درصد کمتر از مقدار نشت یونی اندازه‌گیری شده در تاک‌های شاهد بود (شکل ۲).



شکل ۲. اثر محلول‌پاشی غلظت‌های مختلف کیتوزان بر نشت یونی (الف) و مقدار مالون‌دی‌آلدئید (ب) جوانه انگور یاقوتی. میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون اختلاف معنی‌داری در سطح ۵٪ با هم ندارند.

## مقدار مالون‌دی‌آلدئید جوانه

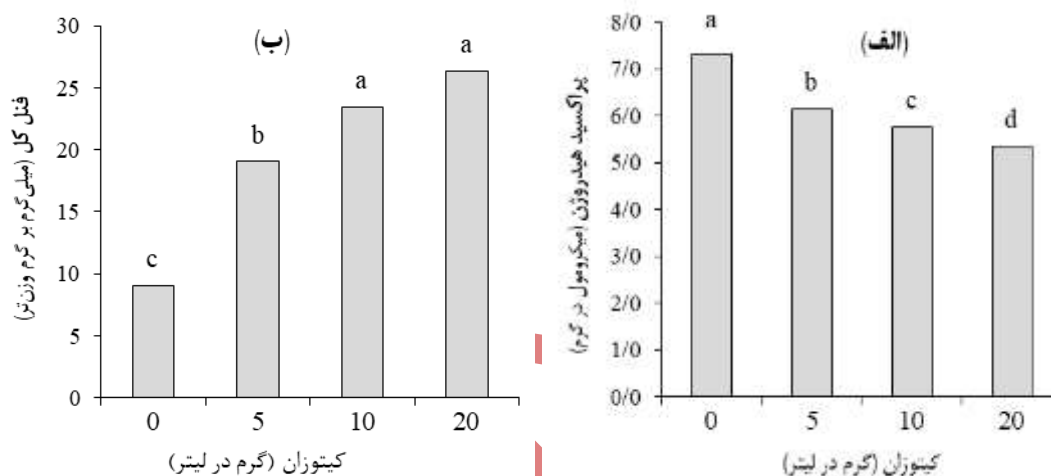
کاربرد کیتوزان، مقدار مالون‌دی‌آلدئید جوانه در انگور یاقوتی را نسبت به شاهد کاهش داد و بین همه سطوح کیتوزان با شاهد اختلاف معنی‌داری وجود داشت. کاهش در مقدار مالون‌دی‌آلدئید جوانه در اثر کاربرد کیتوزان وابسته به غلظت بود به طوری که کمترین مقدار مالون‌دی‌آلدئید جوانه مربوط به تاک‌های تیمار شده با غلظت ۲۰ گرم در لیتر و بیشترین مقدار این ترکیب سمی حاصل از پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء مربوط به تاک‌های محلول‌پاشی نشده (شاهد) بود. در واقع تیمار ۲۰ گرم در لیتر کیتوزان تا ۴۳/۲ درصد منجر به کاهش پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء در مقایسه با تاک‌های شاهد شد (شکل ۲).

## مقدار پراکسید هیدروژن جوانه

بر اساس نتایج کاربرد کیتوزان منجر به کاهش چشمگیر مقدار پراکسید هیدروژن جوانه در انگور یاقوتی شد. به طوری که کمترین مقدار این شاخص آسیب‌زای غشاء نیز (۵/۳۴ میکرومول در گرم وزن تر) مربوط به تاک‌های تیمار شده با غلظت ۲۰ گرم در لیتر کیتوزان بود که نسبت به محتوای پراکسید هیدروژن جوانه در تاک‌های شاهد ۲۷/۱ درصد کاهش نشان داد. بیشترین مقدار تجمع پراکسید هیدروژن با میانگین ۷/۳۲ میکرومول در گرم وزن تر مربوط به تاک‌های بدون کاربرد کیتوزان (شاهد) بود (شکل ۳).

### مقدار فنول کل جوانه

مقدار فنول کل جوانه تحت تاثیر محلول پاشی کیتوزان در جوانه انگور یا قوتی افزایش یافت. بیشترین مقدار فنول کل مربوط به تیمار ۲۰ گرم در لیتر با میانگین ۲۶/۳۳ میلی گرم بر گرم وزن تر بود که تفاوت معنی داری با غلظت ۱۰ گرم در لیتر (۲۳/۴۴ میلی گرم بر گرم وزن تر) نداشت. کمترین فنول کل (۹/۰۲ میلی گرم بر گرم وزن تر) مربوط به تیمار شاهد بود که نسبت به غلظت ۲۰ و ۱۰ گرم در لیتر به ترتیب ۱۹۱/۹۰ و ۱۵۹/۸۶ درصد کاهش نشان داد (شکل ۳).



شکل ۳. اثر محلول پاشی غلظت‌های مختلف کیتوزان بر مقدار پراکسید هیدروژن (الف) و فنول کل (ب) جوانه انگور یا قوتی. میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون اختلاف معنی داری در سطح ۵٪ با هم ندارند.

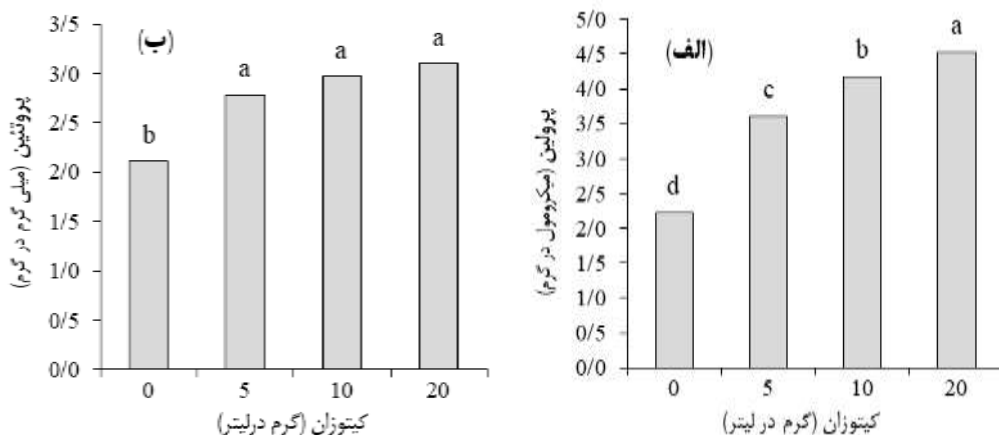
### مقدار پرولین جوانه

محلول پاشی کیتوزان سبب افزایش مقدار پرولین جوانه شد و بین غلظت‌های کیتوزان با شاهد از لحاظ مقدار پرولین تفاوت معنی داری مشاهده شد. بر اساس نتایج بیشترین مقدار پرولین مربوط به تیمار ۲۰ گرم در لیتر کیتوزان با مقدار ۴/۵۲ میکرومول در گرم وزن تر بود و تیمار شاهد با مقدار ۲/۲۲ میکرومول در گرم وزن تر حاوی کمترین مقدار پرولین در جوانه بود. در حالی که تیمار مذکور (۲۰ گرم در لیتر کیتوزان) باعث افزایش ۱۰۳/۶۰ درصدی مقدار پرولین جوانه انگور یا قوتی نسبت به شاهد شد (شکل ۴).

### مقدار پروتئین جوانه

کاربرد کیتوزان، مقدار پروتئین جوانه را در مقایسه با تاک‌های شاهد افزایش داد. بیشترین مقدار پروتئین جوانه (۳/۱۰ میلی گرم بر گرم وزن تر) در تیمار ۲۰ گرم در لیتر کیتوزان به دست آمد که البته اختلاف معنی داری را با غلظت ۵ و ۱۰ گرم در لیتر نداشت. همچنین کمترین مقدار پروتئین مربوط به تیمار شاهد با ۲/۱۱ میلی گرم بر گرم وزن تر بود که در مقایسه با غلظت ۲۰ گرم در لیتر ۴۶/۹۱ درصد کاهش نشان داد (شکل ۴).





شکل ۴. اثر محلول پاشی غلظت‌های مختلف کیتوزان بر مقدار پرولین (الف) و پروتئین (ب) جوانه انگور یاقوتی. میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون اختلاف معنی‌داری در سطح ۵٪ با هم ندارند

### مقدار گلوکز، فروکتوز و ساکارز جوانه

مقدار قندهای محلول گلوکز، فروکتوز و ساکارز در جوانه تاک‌های تیمار شده با غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان از لحاظ آماری با تاک‌های شاهد تفاوت معنی‌دار نداشت. ولی بین مقدار گلوکز، فروکتوز و ساکارز تاک‌های تیمار شده با غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ گرم در لیتر کیتوزان با مقدار این قندهای محلول در تاک‌های شاهد تفاوت معنی‌داری مشاهده شد (جدول ۱). مقدار گلوکز، فروکتوز و ساکارز جوانه در تاک‌های تیمار شده با غلظت ۲۰ گرم در لیتر کیتوزان در مقایسه با مقدار قندهای محلول جوانه در تاک‌های شاهد به ترتیب ۱۱/۱، ۱۶/۳ و ۲۱/۱ درصد بیشتر بود (جدول ۲).

جدول ۱. اثر محلول پاشی غلظت‌های مختلف کیتوزان بر مقدار قندهای محلول و کربوهیدرات محلول کل جوانه انگور یاقوتی

تیمار کیتوزان (گرم در لیتر)	گلوکز (میکرو مول در گرم)	فروکتوز (میکرو مول در گرم)	ساکاروز (میکرو مول در گرم)	کربوهیدرات محلول کل (میلی‌گرم بر گرم)
شاهد (صفر)	۳۸/۳۳ <sup>b</sup>	۳۱/۴۱ <sup>b</sup>	۶۱/۱۷ <sup>c</sup>	۳۰/۹۱ <sup>d</sup>
۵	۴۰/۵۸ <sup>ab</sup>	۳۶/۴۶ <sup>a</sup>	۶۸/۳۶ <sup>b</sup>	۳۹/۱۳ <sup>c</sup>
۱۰	۴۲/۲۸ <sup>a</sup>	۳۶/۲۳ <sup>a</sup>	۷۲/۹۳ <sup>ab</sup>	۴۳/۶۴ <sup>b</sup>
۲۰	۴۳/۱۲ <sup>a</sup>	۳۷/۵۱ <sup>a</sup>	۷۷/۵۱ <sup>a</sup>	۴۷/۰۷ <sup>a</sup>

میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون اختلاف معنی‌داری در سطح ۵٪ با هم ندارند.

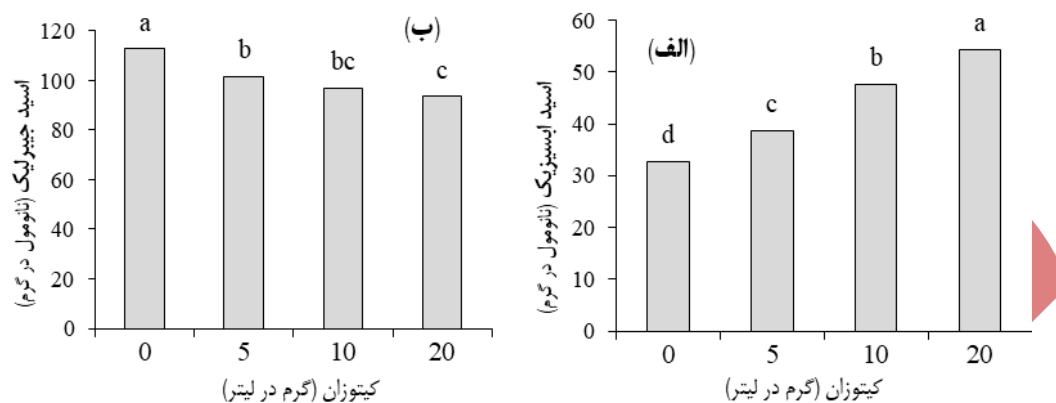
### مقدار کربوهیدرات محلول کل جوانه

محلول پاشی کیتوزان تاثیر مثبتی بر مقدار کربوهیدرات محلول کل جوانه داشت. در واقع کیتوزان باعث افزایش مقدار کربوهیدرات محلول جوانه انگور یاقوتی شد به طوری که مقدار این اسمولیت سازگاری در غلظت ۲۰ گرم در لیتر کیتوزان به مقدار ۴۷/۰۷ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک رسید که در مقایسه با تاک‌های شاهد ۳۵/۲٪ افزایش داشت (جدول ۱).

### مقدار اسید جیبرلیک و اسید آبسزیک جوانه

محلول پاشی کیتوزان مقدار هورمون‌های اسید جیبرلیک و اسید آبسزیک جوانه تاک‌ها را دستخوش تغییرات کرد. محلول پاشی کیتوزان باعث کاهش چشمگیر مقدار اسید جیبرلیک جوانه تاک شد. با افزایش غلظت کیتوزان از مقدار اسید جیبرلیک جوانه به طور معنی‌داری کاسته شد و تحت سطوح مختلف کیتوزان، کمترین مقدار اسید جیبرلیک در تیمار ۲۰ گرم در لیتر (۹۳/۵۱ نانوگرم در گرم وزن‌تر) به دست آمد. همچنین بیشترین مقدار اسید جیبرلیک جوانه به مقدار ۱۱۲/۷ نانوگرم در گرم وزن‌تر در تاک‌های بدون تیمار مشاهده شد.

(شکل ۵). در مقابل با افزایش غلظت کیتوزان مقدار اسید آبسزیک به عنوان بازدارنده رشد جوانه در بوته‌های تیمار شده رو به افزایش گذاشت و در تاک‌های محلول‌پاشی شده با غلظت ۲۰ گرم در لیتر کیتوزان این هورمون غلظت بیشتری داشت. به علاوه کمترین مقدار اسید آبسزیک (۳۲/۶۳ نانوگرم در گرم وزن تر) مربوط به تاک‌های شاهد بود (شکل ۵).



شکل ۵. اثر محلول‌پاشی غلظت‌های مختلف کیتوزان بر مقدار اسید آبسزیک (الف) و اسید جیبرلیک (ب) جوانه انگور یاقوتی. میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون اختلاف معنی‌داری در سطح ۵٪ با هم ندارند.

### مقدار پلی‌آمین‌های جوانه

کاربرد کیتوزان مقدار پلی‌آمین‌ها شامل پوتریسین، اسپرمین و اسپرمیدین جوانه در تاک‌های تیمار شده را در مقایسه با تاک‌های شاهد افزایش داد. تاک‌های تیمار شده با غلظت ۲۰ گرم در لیتر کیتوزان بیشترین مقدار پلی‌آمین‌ها را نشان داد. البته در مورد اسپرمین و اسپرمیدین بین تیمار ۱۰ و ۲۰ گرم در لیتر کیتوزان اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (جدول ۲). مقدار پوتریسین، اسپرمین و اسپرمیدین جوانه در تاک‌های تیمار شده با غلظت ۲۰ گرم در لیتر کیتوزان در مقایسه با مقدار پلی‌آمین‌های جوانه در تاک‌های شاهد به ترتیب ۲۶/۸، ۱۲/۸ و ۱۸/۹ درصد بیشتر بود (جدول ۲).

جدول ۲. اثر محلول‌پاشی غلظت‌های مختلف کیتوزان بر مقدار پلی‌آمین‌های جوانه انگور یاقوتی

کیتوزان (گرم در لیتر)	پوتریسین (نانو مول بر گرم)	اسپرمیدین (نانو مول بر گرم)	اسپرمین (نانو مول بر گرم)
شاهد (صفر)	۶۷/۵۷ <sup>c</sup>	۵۰/۸۳ <sup>b</sup>	۸۰/۳۷ <sup>d</sup>
۵	۷۱/۵۶ <sup>c</sup>	۵۴/۱۶ <sup>ab</sup>	۸۴/۰۶ <sup>c</sup>
۱۰	۸۰/۸۷ <sup>b</sup>	۵۶/۵ <sup>a</sup>	۹۴/۷۷ <sup>b</sup>
۲۰	۹۲/۴۱ <sup>a</sup>	۵۸/۳۱ <sup>a</sup>	۹۹/۰۱ <sup>a</sup>

میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون اختلاف معنی‌داری در سطح ۵٪ با هم ندارند.

### فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی جوانه

کاربرد غلظت‌های مختلف کیتوزان باعث بهبود سیستم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی جوانه در تاک‌های تیمار شده شد. در مورد فعالیت آنزیم کاتالاز جوانه، تاک‌های تیمار شده با کیتوزان مقدار فعالیت آنزیم بیشتری در مقایسه با تاک‌های شاهد داشتند. بیشترین فعالیت این آنزیم مربوط به تاک‌های تیمار شده با غلظت ۱۰ گرم در لیتر کیتوزان بود که تا ۵۷/۲۴٪ بیشتر از تاک‌های شاهد بود (جدول ۳). محلول‌پاشی کیتوزان منجر به افزایش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز جوانه تاک‌ها شد. بیشترین فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز مربوط به تاک‌هایی بود که با غلظت‌های ۲۰ گرم در لیتر کیتوزان تیمار شده بودند که البته با فعالیت این آنزیم در جوانه تاک‌های تیمار شده با غلظت ۱۰

گرم در لیتر از لحاظ آماری اختلاف معنی داری نداشتند (جدول ۳). فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز جوانه در تاک‌های تیمار شده با غلظت نهایی کیتوزان ۵۹/۱۹٪ بیشتر از فعالیت این آنزیم در تاک‌های شاهد بود (جدول ۳).

جدول ۳. اثر محلول پاشی غلظت‌های مختلف کیتوزان بر مقدار فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی جوانه انگور یا قوتی

کیتوزان (گرم در لیتر)	کانالاز (واحد در میلی‌گرم پروتئین)	گایاکول پراکسیداز (واحد در میلی‌گرم پروتئین)	آسکوربات پراکسیداز (واحد در میلی‌گرم پروتئین)
شاهد (صفر)	۱/۷۱ <sup>c</sup>	۶/۵۷ <sup>c</sup>	۳/۲۱ <sup>b</sup>
۵	۳/۰۴ <sup>b</sup>	۱۱/۷۲ <sup>b</sup>	۸/۸۳ <sup>a</sup>
۱۰	۳/۹۹ <sup>a</sup>	۱۴/۵۴ <sup>a</sup>	۱۱/۱۴ <sup>a</sup>
۲۰	۳/۲۵ <sup>b</sup>	۱۶/۱۰ <sup>a</sup>	۹/۲۹ <sup>a</sup>

میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون اختلاف معنی داری در سطح ۵٪ با هم ندارند.

در مورد آنزیم آسکوربات پراکسیداز بیشترین فعالیت مربوط به جوانه تاک‌هایی بود که با غلظت ۱۰ گرم در لیتر کیتوزان تیمار شده بودند که البته از لحاظ آماری با فعالیت این آنزیم در جوانه تاک‌های تیمار شده با غلظت ۲۰ گرم در لیتر اختلاف معنی داری نداشتند (جدول ۳). در واقع کاربرد غلظت ۱۰ گرم در لیتر کیتوزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز جوانه را تا ۷۱/۱۸٪ بیشتر از فعالیت این آنزیم در تاک‌های شاهد افزایش داد (جدول ۳).

#### مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی برگ

بین مقدار کلروفیل a و کاروتنوئید برگ در تاک‌های شاهد و تاک‌های تیمار شده با غلظت ۵ و ۱۰ گرم در لیتر کیتوزان تفاوت معنی داری مشاهده نشد. ولی بین مقدار کلروفیل a برگ در تاک‌های تیمار شده با غلظت ۲۰ گرم در لیتر کیتوزان و تاک‌های شاهد تفاوت معنی داری مشاهده شد (جدول ۴). در مورد کلروفیل کل بین تیمار ۵ گرم در لیتر و تاک‌های شاهد تفاوت معنی داری مشاهده نشد ولی بین دو غلظت ۱۰ و ۲۰ گرم در لیتر کیتوزان و شاهد از لحاظ مقدار کلروفیل کل تفاوت مشاهده شد. در مورد کلروفیل b بین تاک‌های تیمار شده با کیتوزان و شاهد اختلاف معنی داری مشاهده شد. بیشترین مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی مربوط به تاک‌های تیمار شده با غلظت ۲۰ گرم در لیتر کیتوزان بود که به ترتیب در مورد کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل به ترتیب ۱۳/۰، ۳۳/۲ و ۱۹/۹ درصد بیشتر از تاک‌های شاهد بود (جدول ۴). اثر غلظت‌های مختلف کیتوزان بر مقدار کاروتنوئید کل معنی دار نشد (جدول ۴).

جدول ۴. اثر محلول پاشی غلظت‌های مختلف کیتوزان بر مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی برگ (میلی‌گرم بر گرم وزن تر) انگور یا قوتی

کیتوزان (گرم در لیتر)	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	کاروتنوئید
شاهد (صفر)	۳/۲۱ <sup>b</sup>	۱/۲۳ <sup>c</sup>	۴/۴۴ <sup>c</sup>	۷/۳۱ <sup>b</sup>
۵	۳/۲۱ <sup>b</sup>	۱/۵۲ <sup>b</sup>	۴/۷۳ <sup>c</sup>	۷/۴۵ <sup>b</sup>
۱۰	۳/۳۹ <sup>b</sup>	۱/۷۱ <sup>ab</sup>	۵/۰۹ <sup>b</sup>	۷/۴۶ <sup>ab</sup>
۲۰	۳/۷ <sup>a</sup>	۱/۸۴ <sup>a</sup>	۵/۵۴ <sup>a</sup>	۷/۹۱ <sup>a</sup>

میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون اختلاف معنی داری در سطح ۵٪ با هم ندارند.

#### مقدار عناصر غذایی برگ

محلول پاشی کیتوزان در سطح احتمال پنج درصد بر مقدار عناصر فسفر، پتاسیم، کلسیم، آهن و روی معنی داری شد ولی تاثیر معنی داری بر مقدار عنصر منیزیم نداشت (جدول ۵). بر اساس نتایج جدول ۵، محلول پاشی کیتوزان تاثیر مثبتی بر مقدار عنصر فسفر برگ بوته انگور داشت. به طوری که بین غلظت‌های ۵ و ۲۰ گرم در لیتر کیتوزان با تاک‌های تیمار نشده اختلاف معنی داری مشاهده نشد و کاربرد کیتوزان ۱۰ گرم در لیتر باعث کاهش مقدار عنصر فسفر برگ بوته در مقایسه با تاک‌های شاهد شد (جدول ۵). تاک‌های تیمار شده با غلظت ۱۰ گرم در لیتر کیتوزان مقدار پتاسیم و کلسیم بیشتری داشتند هر چند از لحاظ آماری با مقدار این عناصر در برگ تاک‌های تیمار

شده با کیتوزان ۲۰ گرم در لیتر از لحاظ آماری تفاوتی وجود نداشت. (جدول ۵). مقدار آهن و روی برگ در تاک‌های تیمار شده با غلظت ۵ گرم در لیتر کیتوزان بیشتر از بقیه تیمارها بود البته از لحاظ آماری تفاوتی بین مقدار این عناصر برگ و تاک‌های تیمار شده با غلظت ۱۰ گرم در لیتر کیتوزان تفاوتی وجود نداشت (جدول ۵).

جدول ۵. اثر محلول‌پاشی غلظت‌های مختلف کیتوزان بر مقدار برخی عناصر پرمصرف و کم مصرف برگ انگور یاقوتی

کیتوزان (گرم در لیتر)	فسفر (%)	پتاسیم (%)	کلسیم (%)	منیزیم (%)	آهن (پی‌پی‌ام)	روی (پی‌پی‌ام)
شاهد (صفر)	۰/۴۲ <sup>a</sup>	۱/۷۸ <sup>b</sup>	۲/۲۰ <sup>c</sup>	۱/۳۸ <sup>a</sup>	۱۱۸/۳ <sup>b</sup>	۵۳/۶ <sup>b</sup>
۵	۰/۳۸ <sup>a</sup>	۱/۸۰ <sup>b</sup>	۲/۳۷ <sup>b</sup>	۱/۳۷ <sup>a</sup>	۱۴۴/۰ <sup>a</sup>	۶۴/۰ <sup>a</sup>
۱۰	۰/۲۷ <sup>b</sup>	۲/۱۵ <sup>a</sup>	۲/۸۷ <sup>a</sup>	۱/۲۵ <sup>a</sup>	۱۲۶/۵ <sup>ab</sup>	۵۹/۵ <sup>ab</sup>
۲۰	۰/۴۴ <sup>a</sup>	۱/۸۹ <sup>ab</sup>	۲/۵۰ <sup>ab</sup>	۱/۵۳ <sup>a</sup>	۱۱۷/۶ <sup>b</sup>	۵۳/۳ <sup>a</sup>

میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون اختلاف معنی‌داری در سطح ۵٪ با هم ندارند.

## بحث

کاربرد غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان تا ۸ روز در مقایسه با تاک‌های شاهد منجر به تاخیر در شکفتن جوانه در انگور یاقوتی شد. بخشی از تاخیر در شکوفایی جوانه مشاهده شده در مطالعه می‌تواند با ماهیت پلی‌ساکاریدی کیتوزان و ایجاد یک پوشش روی جوانه در ارتباط باشد که با تنظیم تبادلات گازی منجر به کاهش تنفس و فعل و انفعالات درونی جوانه شده است. از طرفی به نظر می‌رسد کیتوزان از طرق افزایش مقدار اسید آبسازیک سبب تداوم خواب جوانه‌ها و تاخیر در شکفتن آن‌ها در فصل بهار شده و در نتیجه از جوانه‌های انگور در مقابل سرماهای دیررس بهاره محافظت کرده است (Karimi, 2019) که بر اساس نتایج مطالعه حاضر کاربرد کیتوزان منجر به افزایش اسید آبسازیک و کاهش اسید جیبرلیک جوانه تاک‌های انگور یاقوتی شد. رابطه نزدیکی بین مقدار اسید آبسازیک و خواب جوانه در گلابی مشاهده شده است. در واقع، تیمار اسید آبسازیک از شکستن خواب جوانه‌های گلابی جلوگیری کرد، که نشان می‌دهد اسید آبسازیک ممکن است نقش مهمی در القاء خواب داشته باشد. به علاوه مقدار اسید آبسازیک قبل از شکوفایی جوانه‌ها اوج خود رسیده است. این ممکن است یک استراتژی محافظتی برای زنده ماندن گلابی تحت سرما باشد (Li et al., 2018). علاوه بر این کیتوزان بیوسنتز اکسین را از طریق بیان ژن‌های مرتبط با اکسین، تسریع بیوسنتز و انتقال اسید ایندول استیک و کاهش فعالیت اسید ایندول - استیک اکسیداز افزایش می‌دهد (Bakhroum et al., 2020). از طرفی غلظت زیاد اکسین اثر بازدارندگی بر رشد و نمو گیاهان دارد، بنابراین به نظر می‌رسد که با بر هم زدن مقدار اکسین درونی جوانه‌ها، می‌تواند سبب تأخیر در نمو و شکوفایی طبیعی جوانه‌ها شود. همچنین، غلظت زیاد اکسین سبب القای تولید هورمون اتیلن می‌شود و این هورمون موجب تأخیر در مراحل نمو گیاه و از جمله باز شدن جوانه‌ها می‌شود. در واقع، اتیلن سنتز اسید آبسازیک را تقویت می‌کند و مسیر سیگنالینگ اسید آبسازیک را فعال می‌کند (Karimi, 2019). به طور کلی، جیبرلین و آبسازیک نقش متضاد در تنظیم رشد گیاه دارند. جیبرلین برای تقویت رشد گیاه و شکستن خواب جوانه در نظر گرفته می‌شود و آبسازیک اسید مانع رشد گیاه می‌شود (Wang and Gao, 2016). مقدار اسید آبسازیک با ورود تاک‌ها به مرحله رکود افزایش و بعد از رکود مقدار آن کاهش می‌یابد که حاکی از نقش اسید آبسازیک به عنوان بازدارنده شکوفایی جوانه‌های در حال خواب تاک می‌باشد (Karimi, 2019). مشخص شده که افزایش کیتوزان منجر به تجمع هورمون‌های مربوط به رشد گیاه (اسید آبسازیک و اسید ایندول استیک) می‌شود (Suarez-Fernandez et al., 2020). از آنجایی که اسید آبسازیک به عنوان یک سیگنال درون‌زا عمل می‌کند گیاهان را قادر می‌سازد که بر شرایط نامناسب محیطی غلبه کنند و همچنین گزارش شده است که می‌تواند تنظیم رونویسی از ژن‌های ضروری کدکننده پروتئین‌های درگیر در فرآیندهای فیزیولوژیکی متنوع را کنترل کند (Ahmad et al. 2019). به نظر می‌رسد کیتوزان از طریق افزایش سطح اسید آبسازیک و کاهش تجمع اسید جیبرلیک در جوانه‌های انگور یاقوتی موجب القاء خواب و تحمل به سرمای تاک شده است.

بر اساس نتایج مقدار آب جوانه در تاک‌های تیمار شده با کیتوزان در مقایسه با شاهد بیشتر بود. در مطالعه‌ای روی انگور کاربرد کیتوزان در ترکیب با دیگر پلی ساکاریدها از قبیل صمغ هندی منجر به افزایش مقدار آب انگور تحت تنش سرما شد (Eshghi *et al.*, 2022) که تاییدی بر یافته‌های مطالعه حاضر است. در مرحله خواب عمیق زمستانه، کاهش مقدار آب جوانه در گیاهان چوبی نقش مهمی در کاهش خسارت دمای پایین دارد با این حال با شکست خواب در مرحله خروج از سازگاری به سرما مقدار آب جوانه نقش تعیین کننده ای در تحمل به سرما ندارد و در صورت سلامت غشاهای زیستی وجود آب برای تداوم متابولیسم سلولی در جهت شکفتن جوانه لازم است (Ershadi *et al.*, 2016). لذا حفظ آب موجود در جوانه در اثر کاربرد کیتوزان به ویژه در غلظت ۲۰ میلی گرم در لیتر ممکن است با ویژگی کیتوزان و ایجاد پوشش روی جوانه و کاهش تلفات آب در ارتباط باشد.

کاربرد کیتوزان به ویژه در غلظت ۲۰ میلی گرم در لیتر به مقدار قابل توجهی درصد نشت یونی در تاک‌ها را تحت تنش سرما کاهش داد. در این راستا گزارش شده است که در میوه انار در طول انبارمانی سرد، کاربرد کیتوزان سبب تجمع کمتر الکترولیت‌ها و مالون‌دی-آلدئید در نتیجه حفظ یکپارچگی غشای سلولی را در مقایسه با تیمارهای شاهد می شود (Molaei *et al.*, 2021). مقدار نشت یونی غشای سیتوپلاسمی سلول‌های گیاهان تحت تنش در مقایسه با گیاهان در شرایط معمولی از هدایت الکتریکی بالاتری برخوردار هستند، بالاتر بودن هدایت الکتریکی نشان دهنده پایین بودن پایداری غشاء سیتوپلاسمی می‌باشد. در نتیجه در شرایط تنش غشاء از پایداری کمتری برخوردار است و مقدار نشت مواد درون سلولی در آن‌ها افزایش می‌یابد (Ershadi *et al.*, 2016). به نظر می‌رسد کیتوزان با داشتن خاصیت آنتی اکسیدانی، منجر به حفظ تمامیت غشاء، جذب انتخابی یون‌ها و نقل و انتقال یون شده است. لذا کاهش مقدار نشت یونی مشاهده شده در مطالعه حاضر در گیاهان تیمار شده با کیتوزان می‌تواند با نقش مثبت کیتوزان بر پایداری غشاء و بهبود نفوذپذیری انتخابی غشای پلاسمایی سلولی مرتبط باشد (Wang *et al.*, 2021). البته مقدار بیشتر اسید آسبیزیک و پلی آمین‌ها مشاهده شده در جوانه تاک‌های تیمار شده با کیتوزان نیز نقش مهمی در بهبود تحمل به سرما و کاهش نشت یونی دارد (Karimi, 2019) که در مطالعه حاضر نیز به اثبات رسید.

بر اساس نتایج کمترین مقدار پراکسید هیدروژن مربوط به تاک‌های تیمار شده با غلظت ۲۰ گرم در لیتر کیتوزان بود. پراکسید هیدروژن در مقادیر کم به عنوان یک مولکول سیگنالی برای واکنش‌های متابولیک مختلف و همچنین جزء فعال دفاعی گیاه عمل می‌کند بنابراین در غلظت‌های بهینه ممکن است نقش مهمی در انتقال سیگنال‌ها به سلول‌های گیاهی اطراف برای شروع مقاومت سیستمیک اکتسابی داشته باشد. با این حال در غلظت‌های بحرانی باعث پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء شده و باعث از هم گسیختگی غشاء سلولی می‌شود (Attia *et al.*, 2021). کیتوزان می‌تواند سیستم آنتی اکسیدانی آنزیمی را القا و پراکسید هیدروژن را مهار کند که در نتیجه موجب افزایش یکپارچگی غشاء و بهبود تحمل گیاه به تنش می‌شود (Hassan *et al.*, 2021). از طرفی کیتوزان خود توانایی حذف رادیکال‌های آزاد اکسیژن را دارد زیرا مولکول‌های کیتوزان حاوی تعداد زیادی گروه آمینو و هیدروکسیل فعال هستند، آمینو می‌تواند با اتم هیدروژن پیوند تشکیل دهد و سپس با رادیکال‌های آزاد اکسیژن ترکیب می‌شوند و یک ماکرومولکول پایدار و کمپلکس فلزی تولید می‌کند این مجموعه فعالیت آنتی اکسیدانی موثری را نشان می‌دهد و بنابراین می‌تواند رادیکال‌های آزاد اکسیژن را حذف کند (Qu *et al.*, 2019). به طور مشابه، کاربرد کیتوزان سبب کاهش مقدار پراکسید هیدروژن در بوته‌های گوجه‌فرنگی شد که ممکن است با توانایی کیتوزان در القاء واکنش‌های دفاعی گیاه از طریق فعال کردن آنزیم‌ها آنتی اکسیدان و دیگر ترکیبات حذف کننده رادیکال‌های آزاد از قبیل ترکیبات فنولی در ارتباط باشد (Attia *et al.*, 2021).

در مطالعه حاضر مقدار مالون‌دی‌آلدئید در جوانه تاک‌های محلول پاشی شده با غلظت ۲۰ میلی گرم در لیتر کیتوزان در مقایسه با شاهد کاهش چشمگیری نشان داد. کاربرد کیتوزان در خیار ژاپنی مقدار مالون‌دی‌آلدئید را از طریق محافظت و حفظ یکپارچگی ساختاری غشاء در طول انبارمانی سرد کاهش داده است (Hashim *et al.*, 2018) که تاییدی بر نقش این پلی ساکارید در جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء تحت دمای پایین می‌باشد. مالون‌دی‌آلدئید محصولی حاصل از پراکسیداسیون اسیدهای چرب اشباع نشده غشایی سلول بوده و به عنوان شاخص تنش اکسیداتیو، نشت یونی بالا و تخریب غشاء شناخته می‌شود (Hassan *et al.*, 2021). مطالعات متعدد نشان داده است که کیتوزان به عنوان یک محرک زیستی ممکن است دارای پتانسیلی برای از بین بردن رادیکال‌های آزاد اکسیژن باشد

(Hidangmayum *et al.*, 2019). استفاده از کیتوزان تولید مالون‌دی‌آلدئید و پراکسید هیدروژن را از طریق افزایش ترکیبات آنتی‌اکسیدانی که رادیکال‌های آزاد اکسیژن را از بین می‌برند کاهش می‌دهد (Attia *et al.*, 2021). کاهش مقدار مالون‌دی‌آلدئید در پاسخ به تیمار کیتوزان به ساختار خاص کیتوزان مربوط است که از شمار زیادی گروه آمین و هیدروکسیل قابل دسترس تشکیل شده که با رادیکال‌های آزاد اکسیژن واکنش نشان می‌دهند (Hassan *et al.*, 2021). همچنین کیتوزان می‌تواند از طریق کاهش آسیب‌آکسیداتیو و تنظیم ثبات غشای سلولی باعث کاهش پراکسیداسیون لیپیدی شود (Zhang *et al.*, 2021).

مقدار تجمع پرولین در پاسخ به کاربرد کیتوزان در جوانه تاک‌های تیمار شده افزایش یافت. در مطالعه‌ای کاربرد نانوذرات کیتوزان منجر به افزایش مقدار پرولین برگ‌دانه‌های موز تحت تنش سرما را افزایش داد (Wang *et al.*, 2021). همچنین در گیاهچه‌های خیار کاربرد کیتوزان سبب افزایش پرولین برگ‌ها شده است (Balal *et al.*, 2017). افزایش مقدار پرولین در گیاهان تیمار شده با کیتوزان می‌تواند به این دلیل باشد که پرولین سهم قابل توجهی در کاهش تنش اسمزی و حفاظت از ساختارهای غشایی تحت شرایط تنش دارند. علاوه بر این، پرولین یک ترکیب غنی شده با نیتروژن است و گیاهان از این منبع درون‌زا نیتروژن در شرایط تنش غیرزیستی استفاده می‌کنند. در مطالعه‌ای روی انگور کاربرد دیگر پلی‌ساکاریدها از قبیل صمغ هندی منجر به افزایش مقدار پرولین انگور تحت تنش سرما شد (Eshghi *et al.*, 2022) که حاکی از نقش این پلی‌ساکاریدها در تجمع اسید آمینه پرولین در راستای تنظیم اسمزی بافت‌های گیاهی تحت تنش سرما می‌باشد.

بر اساس نتایج کاربرد کیتوزان به طور موثری مقدار پرولین جوانه را در تاک‌های انگور یا قوتی افزایش داد. مطابق با نتایج این پژوهش کیتوزان مقدار پروتئین محلول را در نهال *Prunus davidiana* افزایش داد که این نشان می‌دهد تیمار کیتوزان می‌تواند تعادل اسمزی را بین پروتوپلاست‌های سلولی و محیط حفظ کند و سیستم غشایی را تثبیت کند و مقاومت به تنش گیاه را افزایش دهد (Xu *et al.*, 2020). افزایش مقدار پروتئین‌های محلول در حضور محرک‌ها، به افزایش سنتز پروتئین‌هایی مانند دهیدرین‌ها، پروتئین‌های شوک حرارتی و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نسبت داده شده است. پروتئین‌های محلول می‌توانند به عنوان عوامل تنظیم‌کننده اسمزی عمل کنند. غلظت‌های بالای پروتئین‌های محلول موجب می‌شود سلول‌ها پتانسیل اسمزی نسبتاً پایینی داشته باشند و در برابر تنش مقاومت کنند (Jiao *et al.*, 2012). یافته‌ها نشان می‌دهد که کیتوزان می‌تواند هموستاز سلولی گیاهی را تنظیم کند و اثرات تنش را کاهش دهد. همچنین کیتوزان نقش کلیدی در بهبود تحمل گیاهان به تنش ایفا می‌کند و از این طریق باعث سنتز قند محلول و پروتئین‌های محلول می‌شود (Liu *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2021). تأثیر کیتوزان بر مقدار پروتئین ممکن است مربوط به مقدار نیتروژن کیتوزان باشد که نقش اساسی در سنتز پروتئین ایفا می‌کند. علاوه بر این، کیتوزان می‌تواند با افزایش بیان پروتئین‌ها و ژن‌های بازدارنده پروتئاز، باعث کاهش تخریب پروتئین محلول شود (Liu *et al.*, 2021).

در مطالعه حاضر مقدار ترکیبات فنولی در جوانه تاک‌های تیمار شده با کیتوزان در مقایسه با تاک‌های شاهد افزایش یافت. همسو با یافته‌های پژوهش حاضر کاربرد کیتوزان موجب افزایش مقدار فنول کل برگ در دانه‌های موز تحت تنش سرما شد (Wang *et al.*, 2021). همچنین در نهال‌های نارنج محلول‌پاشی کیتوزان سبب افزایش مقدار فنول کل جوانه تحت تنش خشکی شده است (Mohamed, 2018). آن‌ها بیان کردند که کیتوزان با گیرنده‌های غشای گیاهی برهم‌کنش داشته و ترکیبات سیگنالی ایجاد می‌کنند که بیان ژن‌های کدکننده آنزیم‌های بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه را القا می‌کنند و همچنین می‌توانند تأثیر غیرمستقیمی بر تجمع ترکیبات فنولی در گیاهان داشته باشند که نقش مهمی در جذب و خنثی‌سازی و حذف رادیکال‌های آزاد اکسیژن و یا پراکسیدازهای تجزیه‌کننده دارند. کیتوزان به عنوان یک محرک زیستی ممکن است دارای پتانسیل برای از بین بردن رادیکال‌های آزاد اکسیژن باشد که باعث افزایش میزان ترکیبات فنولی می‌شود. بنابراین افزایش مقدار این ترکیبات احتمالاً به دلیل نقش آنتی‌اکسیدانی آنها در برابر رادیکال‌های آزاد اکسیژن است (Hidangmayum *et al.*, 2019). به علاوه کیتوزان ممکن است ژن‌های جدیدی را فعال کند که می‌توانند منجر به سنتز مسیرهای بیوسنتزی مختلف و راه‌اندازی آنزیم‌ها گردد و در نهایت باعث تولید فنول شود.

بر اساس نتایج کاربرد کیتوزان باعث افزایش مقدار کربوهیدرات محلول جوانه انگور یاقوتی شد. در این راستا نیز محلول پاشی بوت-ه های توت فرنگی با کیتوزان موجب افزایش کربوهیدرات محلول کل شده است (El-Miniawy *et al.*, 2013). همچنین تیمار میوه های انگور با پلی ساکارید صمغ هندی موجب افزایش مقدار کربوهیدرات محلول شد و میوه های با محتوای کربوهیدرات محلول تحمل به یخ- زدگی بیشتری داشتند (Eshghi *et al.*, 2022). افزایش مقدار کربوهیدرات در اثر کاربرد کیتوزان ممکن است به این دلیل باشد که کیتوزان عملکرد تنظیم کننده اسمزی یا محافظ اسمزی دارد که با متابولیسم کربوهیدرات و افزایش تجمع کربوهیدرات ها تا حد زیادی به بهبود مقاومت به تنش کمک می کند (Hidangmayum *et al.*, 2019). از طرفی به نظر می رسد که توقف مرحله نموی جوانه در اثر کاربرد کیتوزان (تاخیر در شکوفایی) مانع از استفاده قندهای محلول در فرایندهای بعدی نمو شده و باعث تجمع درشت مولکول ها در جوانه شده است. مشخص شده که کیتوزان بسیاری از ژن های دخیل در انتقال کربوهیدرات و متابولیسم را در جوانه های شیدر سفید تحت تنش- خشکی را تنظیم می کند (Li *et al.*, 2017) که تاییدی بر یافته های مطالعه حاضر است.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که مقدار گلوکز، فروکتوز و ساکارز جوانه در تاک های تیمار شده با غلظت ۲۰ گرم در لیتر کیتوزان در مقایسه با مقدار قندهای محلول جوانه در تاک های شاهد به طور چشمگیری بیشتر است. کیتوزان سبب افزایش مقدار قندهای محلول برگ در دانهال های موز تحت تنش سرما نیز شده است که احتمالاً تجمع قند محلول به دلیل تغییر آنزیمی نشاسته به قند باشد (Wang *et al.*, 2021). افزایش قندهای محلول مشاهده شده در تاک های تیمار شده با کیتوزان حاکی از تاثیر این پلی ساکارید بر تنظیم مقدار قندهای محلول جوانه انگور در مواجهه با دمای پایین است. کیتوزان سبب ایجاد تغییرات فرا ساختاری در اندامک های سلولی از قبیل تونوپلاست و آنزیم های مسیر متابولیسم قندها می شود. این سازش اسمزی می تواند از طریق سنتز ترکیبات محلول درون سلولی تامین گردد (Hidangmayum *et al.*, 2019). هنگامی که گیاهان در معرض تنش غیرزیستی قرار می گیرند، قندهای محلول مانند فروکتوز، گلوکز و ساکارز به عنوان مولکول های سیگنال دهنده مهم برای انتقال سیگنال تنش در سلول ها تجمع می یابند (Geng *et al.*, 2020). در واقع افزایش محتوای قندهای محلول تحت تیمار کیتوزان احتمالاً به دلیل هیدرولیز نشاسته به قندهای محلول نظیر گلوکز، فروکتوز و ساکارز می باشد که یک نوع مکانیسم تطابقی و سازگار یافته برای حفظ و نگهداری پتانسیل اسمزی می باشد. همچنین، واحد ساختاری کیتوزان گلوکز آمین است که با برداشتن گروه آمین به گلوکز تبدیل خواهد شد. این مونوساکارید نیز به راحتی قادر است به فروکتوز تبدیل شود (Chien *et al.*, 2007). قندها به دلیل نقش های متعدد خود به عنوان محافظ سرما در گیاهان تحت شرایط تنش سرما عمل می کنند و مقدار تجمع آن ها در سلول های گیاه و جوانه تعیین کننده سطح تحمل به سرما در ارقام انگور است (Karimi, 2019).

در پژوهش حاضر تیمار کیتوزان مقدار پلی آمین ها را در جوانه تاک ها افزایش داد. محلول پاشی کیتوزان باعث افزایش غلظت پلی آمین های برگ خیار شد (Balal *et al.*, 2017). تجمع بیشتر پوتری سین، اسپرمیدین و اسپرمین در اثر کاربرد کیتوزان به این دلیل است که کیتوزان می تواند به پیروات درگیر در چرخه اسید تری کربوکسیلیک برای تولید اسید گلو تامیک تبدیل شود که در نهایت برای سنتز پلی آمین به آرژنین متابولیزه می شود (Geng *et al.*, 2020). علاوه بر این، تجمع پلی آمین ها ممکن است به دلیل نقش کیتوزان به عنوان سیگنال دفاعی، منبع نیتروژن و تنظیم کننده ی دفاع آنتی اکسیدانی و متابولیسم پرولین باشد (Li *et al.*, 2017). پلی آمین ها ممکن است به عنوان مولکول سیگنالی عمل کنند که با تحریک فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی باعث کاهش غلظت پراکسید هیدروژن از طریق حذف رادیکال های آزاد اکسیژن می شود. از سوی دیگر کیتوزان با افزایش غلظت پلی آمین جوانه، سبب افزایش اسمولیت های درون زا شده و از سیستم فتوسنتزی در برابر آسیب غشایی ناشی از رادیکال های آزاد اکسیژن محافظت کند. دلیل احتمالی دیگر این است که کیتوزان غلظت پلی آمین جوانه را افزایش داده است که فعالیت فتوشیمیایی را تسریع می کند (Balal *et al.*, 2017).

کاربرد غلظت های مختلف کیتوزان باعث بهبود سیستم آنتی اکسیدانی آنزیمی جوانه در تاک های تیمار شده شد. مطابق با نتایج این پژوهش کیتوزان با افزایش محتویات ترکیبات فنولی و آنزیم های آنتی اکسیدانی کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز موجب حذف رادیکال های آزاد اکسیژن در میوه موز در طول طول ذخیره سازی شد (Hosseini *et al.*, 2018). همچنین کاربرد کیتوزان در ترکیب با صمغ هندی منجر به افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز میوه انگور تحت دوره انبارمانی سرد شده است (Eshghi *et al.*, 2022). محلول پاشی کیتوزان با تحریک فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی از گیاهان در برابر

پراکسیداسیون لیپیدی و آسیب اکسیداتیو تحت شرایط تنش محافظت می‌کند. این به ساختار کیتوزان با گروه‌های هیدروکسیل و آمینه فراوان که برای سم‌زدایی رادیکال‌های پراکسید هیدروژن و سوپراکسید برای حفظ پایداری رادیکال‌های غیرسمی دخیل هستند، مربوط می‌شود (Shehzad *et al.*, 2020). پراکسید هیدروژن، یک ماده سمی عمدتاً تحت شرایط استرس با تنفس نوری، اکسیداسیون بتا اسیدهای چرب و غیره در پراکسی زوم‌ها تولید می‌شود (Muley *et al.*, 2019). در واقع فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتر پس از کاربرد کیتوزان از گیاهان در برابر پراکسیداسیون لیپیدی و آسیب اکسیداتیو با سم‌زدایی رادیکال‌های پراکسید هیدروژن و سوپراکسید محافظت می‌کند (Arshad *et al.*, 2022). از سوی دیگر کیتوزان می‌تواند با کمک آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی گونه‌های فعال اکسیژن را حذف کند و باعث بالانس هموستاتیک بین تولید و حذف آنها گردد و مقدار گونه‌های فعال اکسیژن را کاهش دهد.

مقدار کلروفیل a و b و کل برگ حاصل از جوانه‌های شکوفا شده در تاک‌های محلول‌پاشی شده با کیتوزان بیشتر از تاک‌های شاهد بود. هم‌راستا با نتایج مطالعه حاضر، محلول‌پاشی کیتوزان سبب افزایش مقدار رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی برگ نهال نارنج شد (Mohamed, 2018). کیتوزان از طریق تأثیر بر رنگدانه‌های فتوسنتزی و افزایش مقدار کلروفیل با افزایش سطح درون‌زای سیتوکینین‌ها که سنتز کلروفیل را تحریک می‌کند، تنش را کاهش می‌دهد، این اثرات مثبت به دسترسی بیشتر به آزاد شدن ترکیب آمینو از کیتوزان ارجاع داده شد (Mohamed, 2018). در مطالعات پیشین نیز اثر مثبت کیتوزان بر مقدار رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی برگ انگور گزارش شده است (Singh *et al.*, 2020). اعتقاد بر این است که کیتوزان سرعت تنفس را آهسته و تولید اتیلن را کاهش می‌دهد. همچنین کیتوزان باعث افزایش غلظت درونی دی‌اکسیدکربن شده است و به عنوان یک نتیجه، افزایش سطح دی‌اکسیدکربن باعث کاهش سنتز اتیلن و در نتیجه کاهش تخریب کلروفیل می‌شود (Chien *et al.*, 2007).

محلول‌پاشی کیتوزان مقدار عناصر فسفر، پتاسیم، کلسیم، آهن و روی جوانه انگور یاقوتی را در مطالعه حاضر تحت تأثیر قرار داد. عناصر غذایی موجود در گیاهان یکی از مهم‌ترین عواملی هستند که به گیاهان کمک می‌کنند تا بر شرایط سختی که در طول تنش سرما رخ می‌دهد مقابله کنند (Wang *et al.*, 2021). کیتوزان نقش خود را در فعال کردن درشت مغذی‌ها از طریق تغییر فشار اسمزی در سلول و کاهش تجمع گونه‌های فعال اکسیژن را از طریق بیان ژن‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاهان تحریک می‌کند (Hidangmayum *et al.*, 2019). به علاوه کیتوزان منجر به افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و محافظت از غشاهای پلاسمایی در برابر آسیب اکسایشی و افزایش نفوذپذیری سلول‌های گیاهی می‌شود که در نهایت جذب مواد مغذی را تحریک می‌کند. از طرفی گیاهان ممکن است قادر به تجزیه کیتوزان و آزادسازی قطعات کوچک کیتین باشند که ممکن است به عنوان منبع مواد مغذی مورد استفاده قرار گیرد (Kahromi and Khara, 2021).

در این پژوهش مشاهده شد که مقدار فسفر در تاک‌های تیمار شده با کیتوزان با تاک‌هایی که محلول‌پاشی نشده بودند تفاوتی نداشت و حتی کیتوزان سبب کاهش مقدار فسفر برگ نسبت به گیاهان شاهد شد. عنصر فسفر یکی از درشت مغذی‌ها است که کاهش عرضه و جذب آن یکی از عوامل محدودکننده رشد گیاه است (Chatelain *et al.*, 2014).

روند تغییرات عنصر روی در برگ تاک‌های انگور با کاربرد کیتوزان رو به افزایش گذاشت با این تفاوت که در تاک‌های تیمار شده با کیتوزان ۵ گرم در لیتر این روند شیب بیشتری داشت ولی با افزایش غلظت کیتوزان مجدداً کاهش پیدا کرد. به طور کلی این نتایج نقش مثبت غلظت‌های پایین کیتوزان بر افزایش مقدار عنصر روی برگ تاک انگور را نشان می‌دهد. همچنین مشخص شده است که کاربرد کیتوزان تجمع ریزمغذی‌هایی مانند مولیبدن، بور، منگنز، آهن، مس، سدیم، روی، سرب و کادمیوم را به طور قابل توجهی در ریشه، ساقه و برگ تغییر می‌دهد. بنابراین، می‌توان فرض کرد که کیتوزان ممکن است بر جذب و تجمع عناصر توسط بافت‌های گیاهی تأثیر بگذارد (Salachna and Zawadzińska, 2015). محلول‌پاشی کیتوزان سبب افزایش مقدار عنصر روی در برگ بوته‌های انگور شد. احتمالاً عنصر روی از طریق سم‌زدایی رادیکال‌های سوپراکسید و یکپارچگی غشاء سبب شده است که بوته انگور بتواند در برابر شرایط سخت سرما مقاومت کند (Chatelain *et al.*, 2014). هم‌راستا با نتایج پژوهش حاضر، کاربرد نانوکیتوزان موجب افزایش مقدار نیتروژن، فسفر، پتاسیم، کلسیم و آهن برگ در گیاهان موز تحت تنش سرما شد (Wang *et al.*, 2021).



## نتیجه گیری کلی

در مطالعه حاضر محلول پاشی کیتوزان به ویژه غلظت ۱۰ و ۲۰ گرم در لیتر در مرحله فنولوژیکی نوک پنبه‌ای جوانه در اواخر اسفند و اوایل فروردین ضمن افزایش اسید آسبیزیک و کاهش اسید جیبرلیک تا ۸ روز باعث تأخیر در شکفتن جوانه‌های تاک شد. به علاوه محلول پاشی کیتوزان ضمن افزایش تنظیم‌کننده‌های اسمزی پرولین، پروتئین، کربوهیدرات و قندهای محلول و همچنین افزایش فعالیت آنزیم‌های اکسیدانی و فنول کل منجر به کاهش پراکسیداسیون لیپیدی، تجمع پراکسید هیدروژن و کاهش نشت یونی در جوانه تاک‌های انگور شد که از طریق کاهش رادیکال‌های آزاد اکسیژن و صدمات وارده به غشاء توان تحمل به سرما را در بوته انگور افزایش داد. بنابراین محلول پاشی کیتوزان به ویژه در غلظت ۲۰ گرم در لیتر در مرحله نوک پنبه‌ای جوانه می‌تواند به عنوان راهکاری جهت اجتناب از سرمای دیررس بهاره (تا ۸ روز) و کاهش صدمات ناشی از سرما در تاک‌های انگور استفاده شود. پیشنهاد می‌شود با توجه به ماهیت پلی-ساکاریدی و امولسیون شوندگی کیتوزان، اثر ترکیب آن با سولوپتاس بر تحمل به سرمای بهاره انگور یا قوتی بررسی شود.

## REFERENCES

- Aazami, M. A., Asghari-Aruq, M., Hassanpouraghdam, M. B., Ercisli, S., Baron, M., & Sochor, J. (2021). Low temperature stress mediates the antioxidants pool and chlorophyll fluorescence in *Vitis vinifera* L. cultivars. *Plants*, 10(9), 1877.
- Ahmad, B., Zaid, A., Sadiq, Y., Bashir, S., & Wani, S. H. (2019). Role of selective exogenous elicitors in plant responses to abiotic stress tolerance. *Plant Abiotic Stress Tolerance: Agronomic, Molecular and Biotechnological Approaches*, 273-290.
- Arshad, M. A., Akhtar, G., Rajwana, I. A., Ullah, S., Hussain, M. B., Amin, M., & Ahmed, I. (2022). Foliar application of chitosan improves plant biomass, physiological and biochemical attributes of rose (Gruss-an-Teplitz). *Kuwait Journal of Science*, 49(2).
- Attia, M. S., Osman, M. S., Mohamed, A. S., Mahgoub, H. A., Garada, M. O., Abdelmouty, E. S., & Abdel Latef, A. A. H. (2021). Impact of foliar application of chitosan dissolved in different organic acids on isozymes, protein patterns and physio-biochemical characteristics of tomato grown under salinity stress. *Plants*, 10(2), 388.
- Bakhom, G. S., Sadak, M. S., & Badr, E. A. E. M. (2020). Mitigation of adverse effects of salinity stress on sunflower plant (*Helianthus annuus* L.) by exogenous application of chitosan. *Bulletin of the National Research Centre*, 44, 1-11.
- Balal, R. M., Shahid, M. A., Javaid, M. M., Iqbal, Z., Liu, G. D., Zotarelli, L., & Khan, N. (2017). Chitosan alleviates phytotoxicity caused by boron through augmented polyamine metabolism and antioxidant activities and reduced boron concentration in *Cucumis sativus* L. *Acta physiologiae plantarum*, 39, 1-15.
- Bates, L. S., Waldren, R. P. A., & Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39, 205-207.
- Bergmeyer, N. (1970). *Methoden der Enzymatischen Analyse*, vol 1. AkademieVerlag, Berlin, pp. 636–647.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Chatelain, P. G., Pintado, M. E., & Vasconcelos, M. W. (2014). Evaluation of chitoooligosaccharide application on mineral accumulation and plant growth in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Science*, 215, 134-140.
- Chien, P. J., Sheu, F., & Yang, F. H. (2007). Effects of edible chitosan coating on quality and shelf life of sliced mango fruit. *Journal of food engineering*, 78(1), 225-229.
- Comis, D. B., Tamayo, D. M., & Alonso, J. M. (2001). Determination of monosaccharides in cider by reversed-phase liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 436(1), 173-180.
- Eichhorn, K.W., & Lorenz, D.H. (1977) Phenological development stages of the grapevine. *Nachrichtenblatt Dtsch Pflanzenschutzd.* 29,119–20.
- El-Miniawy, S. M., Ragab, M. E., Youssef, S. M., & Metwally, A. A. (2013). Response of strawberry plants to foliar spraying of chitosan. *Research journal of agriculture and biological sciences*, 9(6), 366-372.

- Ershadi, A., Karimi, R., & Mahdei, K. N. (2016). Freezing tolerance and its relationship with soluble carbohydrates, proline and water content in 12 grapevine cultivars. *Acta physiologiae plantarum*, 38, 1-10.
- Eshghi, S., Karimi, R., Shiri, A., Karami, M., & Moradi, M. (2022). Effects of polysaccharide-based coatings on postharvest storage life of grape: Measuring the changes in nutritional, antioxidant and phenolic compounds. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 16(2), 1159-1170.
- Food and Agriculture Organization (2011) Statistical Yearbook. FAOSTAT, New York.
- Geng, W., Li, Z., Hassan, M. J., & Peng, Y. (2020). Chitosan regulates metabolic balance, polyamine accumulation, and Na<sup>+</sup> transport contributing to salt tolerance in creeping bentgrass. *BMC Plant Biology*, 20, 1-15.
- Hashim, N. F. A., Ahmad, A., & Bordoh, P. K. (2018). Effect of chitosan coating on chilling injury, antioxidant status and postharvest quality of Japanese cucumber during cold storage. *Sains Malays*, 47(2), 287-294.
- Hassan, F. A. S., Ali, E., Gaber, A., Fetouh, M. I., & Mazrou, R. (2021). Chitosan nanoparticles effectively combat salinity stress by enhancing antioxidant activity and alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Plant Physiology and Biochemistry*, 162, 291-300.
- Heath, R. L., & Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of biochemistry and biophysics*, 125(1), 189-198.
- Herzog, V., Fahimi, HD. (1973). Determination of the activity of peroxidase. *Analytica Chimica Acta*, 55, 554-562.
- Hidangmayum, A., Dwivedi, P., Katiyar, D., & Hemantaranjan, A. (2019). Application of chitosan on plant responses with special reference to abiotic stress. *Physiology and molecular biology of plants*, 25, 313-326.
- Hosseini, M. S., Zahedi, S. M., Abadía, J., & Karimi, M. (2018). Effects of postharvest treatments with chitosan and putrescine to maintain quality and extend shelf-life of two banana cultivars. *Food science & nutrition*, 6(5), 1328-1337.
- Jiao, Z., Li, Y., Li, J., Xu, X., Li, H., Lu, D., & Wang, J. (2012). Effects of exogenous chitosan on physiological characteristics of potato seedlings under drought stress and rehydration. *Potato Research*, 55, 293-301.
- Kahromi, S., & Khara, J. (2021). Chitosan stimulates secondary metabolite production and nutrient uptake in medicinal plant *Dracocephalum kotschyi*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(9), 3898-3907.
- Karla, Y.P. (1998). Handbook of reference methods for plant analysis. CRC Press Inc Boca Raton, FL 165 170.
- Karimi, R. (2019). Spring frost tolerance increase in Sultana grapevine by early season application of calcium sulfate and zinc sulfate. *Journal of Plant Nutrition*, 42(19), 2666-2681.
- Li, Z., Zhang, Y., Zhang, X., Merewitz, E., Peng, Y., Ma, X., & Yan, Y. (2017). Metabolic pathways regulated by chitosan contributing to drought resistance in white clover. *Journal of proteome research*, 16(8), 3039-3052.
- Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In *Methods in enzymology* (Vol. 148, pp. 350-382). Academic Press.
- Liu, J., Gai, L., & Zong, H. (2021). Foliage application of chitosan alleviates the adverse effects of cadmium stress in wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 164, 115-121.
- Mohamed, S. (2018). Effect of chitosan, putrescine and irrigation levels on the drought tolerance of sour orange seedlings. *Egyptian Journal of Horticulture*, 45(2), 257-273.
- Molaei, S., Soleimani, A., Rabiei, V., & Razavi, F. (2021). Impact of chitosan in combination with potassium sorbate treatment on chilling injury and quality attributes of pomegranate fruit during cold storage. *Journal of Food Biochemistry*, 45(4), e13633.
- Muley, A. B., Shingote, P. R., Patil, A. P., Dalvi, S. G., & Suprasanna, P. (2019). Gamma radiation degradation of chitosan for application in growth promotion and induction of stress tolerance in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Carbohydrate polymers*, 210, 289-301.

- Nakano, Y., & Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and cell physiology*, 22(5), 867-880.
- Qu, D. Y., Gu, W. R., Zhang, L. G., Li, C. F., Chen, X. C., Li, J., & Wei, S. (2019). Role of chitosan in the regulation of the growth, antioxidant system and photosynthetic characteristics of maize seedlings under cadmium stress. *Russian journal of plant physiology*, 66, 140-151.
- Quitadamo, F., De Simone, V., Beleggia, R., & Trono, D. (2021). Chitosan-induced activation of the antioxidant defense system counteracts the adverse effects of salinity in durum wheat. *Plants*, 10(7), 1365.
- Salachna, P., & Zawadzińska, A. (2015). Comparison of morphological traits and mineral content in *Eucomis autumnalis* (Mill.) Chitt. plants obtained from bulbs treated with fungicides and coated with natural polysaccharides. *Journal of Ecological Engineering*, 16(2).
- Shehzad, M. A., Nawaz, F., Ahmad, F., Ahmad, N., & Masood, S. (2020). Protective effect of potassium and chitosan supply on growth, physiological processes and antioxidative machinery in sunflower (*Helianthus annuus* L.) under drought stress. *Ecotoxicology and environmental safety*, 187, 109841.
- Singh, R. K., Martins, V., Soares, B., Castro, I., & Falco, V. (2020). Chitosan application in vineyards induces accumulation of anthocyanins and other phenolics in berries, mediated by modifications in the transcription of secondary metabolism genes. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(1), 306.
- Suarez-Fernandez, M., Marhuenda-Egea, F. C., Lopez-Moya, F., Arnao, M. B., Cabrera-Escribano, F., Nueda, M. J., & Lopez-Llorca, L. V. (2020). Chitosan induces plant hormones and defenses in tomato root exudates. *Frontiers in Plant Science*, 11, 572087.
- Velikova, V., & Loreto, F. (2005). On the relationship between isoprene emission and thermotolerance in *Phragmites australis* leaves exposed to high temperatures and during the recovery from a heat stress. *Plant, Cell & Environment*, 28(3), 318-327.
- Velioglu, Y., Mazza, G., Gao, L., & Oomah, B. D. (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of agricultural and food chemistry*, 46(10), 4113-4117.
- Vosnjak, M., Sircelj, H., Hudina, M., & Usenik, V. (2021). Response of chloroplast pigments, sugars and phenolics of sweet cherry leaves to chilling. *Scientific reports*, 11(1), 7210.
- Walter, H. J. P., & Geuns, J. M. (1987). High speed HPLC analysis of polyamines in plant tissues. *Plant Physiology*, 83(2), 232-234.
- Wang, A., Li, J., Al-Huqail, A. A., Al-Harbi, M. S., Ali, E. F., Wang, J., & Eissa, M. A. (2021). Mechanisms of chitosan nanoparticles in the regulation of cold stress resistance in banana plants. *Nanomaterials*, 11(10), 2670.
- Wang, D., & Gao, Z. (2016). Expression of ABA metabolism-related genes suggests similarities and differences between seed dormancy and bud dormancy of peach (*Prunus persica*). *Frontiers in plant science*, 6, 170443.
- Wang, H., & Dami, I. E. (2020). Evaluation of budbreak-delaying products to avoid spring frost injury in grapevines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 71(3), 181-190.
- Webster, D. E., & Ebdon, J. S. (2005) Effects of nitrogen and potassium fertilization on perennial raygrass cold tolerance during deacclimation in late winter and early spring. *Hort Science*, 40, 842-849.
- Xu, D., Li, H., Lin, L., Liao, M. A., Deng, Q., Wang, J., & Xia, H. (2020). Effects of carboxymethyl chitosan on the growth and nutrient uptake in *Prunus davidiana* seedlings. *Physiology and molecular biology of plants*, 26, 661-668.
- Yemm, E. W., & Willis, A. (1954). The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochemical journal*, 57(3), 508.
- Zhang, G., Wang, Y., Wu, K., Zhang, Q., Feng, Y., Miao, Y., & Yan, Z. (2021). Exogenous application of chitosan alleviate salinity stress in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Horticulturae*, 7(10), 342.

# Effect of chitosan spray on cold tolerance physiology and budburst time of Yaghooti grapevine

## Extended Abstract

### Introduction

Late spring cold is one of the problems of growing grapes in temperate and cold climates, which sometimes destroys up to 90% of the vineyard's yield. One of the recent methods to improve tolerance to stress in products is the use of natural molecules such as Chitosan (CTS), which, by stimulating the responses related to the plant's defense system, neutralizes the harmful effects of biotic and abiotic stresses and improves the yield and quality of products. Chitosan and its derivatives induce resistance of plants against abiotic stresses such as drought, salinity, high temperature and heavy metals. The aim of this research was to investigate the effect of the first season application of CTS on bud blooming time and physiological and biochemical indicators related to cold tolerance in ruby grapes under pergola cultivation system.

### Materials and methods

The present experiment was accompanied in 2021 and 2022, on the own root of 22-year-old grapevines (*V. vinifera* cv. 'Yaghooti') from a commercial vineyard with the pergola training system at Malayer in Hamadan province/Iran. The treatments included foliar application of CTS at 0, 5, 10 and 20 g/l in two stages in late March and early April. Two week after CTS spraying, the following indices such as electrolyte leakage, malondialdehyde, hydrogen peroxide, water content, proline, total phenol, total soluble carbohydrate, soluble sugars (glucose, fructose and sucrose), activity of antioxidant enzymes (catalase, ascorbate peroxidase and peroxidase), phytohormones (abscisic acid, gibberellic acid), polyamines (putrescine, spermidine and spermine) of the buds and leaf photosynthetic pigments and also some leaf nutrients were measured in treated and control vines. Also budburst time and bloom time were recorded and compared in different treatments.

### Results and Discussion

Based on results, CTS (10 g/L) caused a delay in the time of budburst up to 8 days later and avoiding the spring cold injury of the vines. It seems that by increasing the concentration of abscisic acid, CTS has caused the buds to remain dormant and delayed their blooming in the spring season, and as a result, it has protected the grape buds against the late spring cold. With the increase of CTS concentration from 0 to 20 g/L, the percentage of bud ionic leakage, malondialdehyde and hydrogen peroxidation showed a decreasing trend. The lowest value of these membrane damage indices was related to the buds of vines that were sprayed with a concentration of 20 g/L of CTS. Chitosan can induce the enzyme antioxidant system and inhibit hydrogen peroxide, which results in increasing the integrity of the membrane and improving the plant's tolerance to stress. Also CTS at 20 g/L, increased abscisic acid and decreased gibberellic acid in the bud of grapevines. Furthermore, the 20 g/L of CTS caused a 15.16% increase in the bud water content and a 33.24% decrease in ionic leakage of plant compared to the control. The vines sprayed with CTS, especially the concentration of 10 and 20 g/L, had the highest amount of proline, protein, carbohydrates, soluble sugars, total phenol and activity of antioxidant enzymes. In addition, the lowest accumulation of MDA content and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> occurred in the leaves of grape in the treatment of 20 g/L CTS. With the increase in CTS concentration, the amount of leaf photosynthetic pigments and bud endogenous polyamines in the leaves of grapevine increased. Vines treated with 10 g/L of CTS had more potassium, phosphorus and calcium content.

### Conclusion

In the present study, CTS spraying, especially the concentration of 10 and 20 g/l, while increasing abscisic acid and decreasing gibberellic acid, caused a delay in the budburst time of grapevine buds for up to 8 days. In addition, CTS foliar application increases the osmotic regulators of proline, protein, carbohydrates and soluble sugars, as well as increasing the activity of oxidizing enzymes and total phenol, leading to a decrease in lipid peroxidation, hydrogen peroxide accumulation, and a decrease in ion leakage in vine buds, increased the cold tolerance in the grape plant through the reduction of oxygen free radicals and damage to the membrane. Therefore, CTS foliar spraying, especially at a concentration of 20 grams per liter, can be used as a solution for cold injuries and increasing tolerance to late spring cold in grape vines. It is suggested to investigate the effect of its combination with SoluPotass on the spring cold tolerance of Yaghooti grapes, considering the polysaccharide nature and emulsifiability of CTS.

**Keywords:** Grape, Chilling injury, Soluble sugars, Chitosan, Hormones