



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

Hossein Safamanesh<sup>1</sup>, Rouhollah Karimi<sup>2\*</sup>

1. Department of Horticulture and Landscape Engineering, Faculty of Agriculture, Malayer University, Iran., E-mail: [housseinsafamanesh@gmail.com](mailto:housseinsafamanesh@gmail.com)
2. Corresponding Author, Department of Horticulture and Landscape Engineering, Faculty of Agriculture, Malayer University, Iran. E-mail: [r.karimi@malayeru.ac.ir](mailto:r.karimi@malayeru.ac.ir)

Article Info	ABSTRACT
<b>Article type:</b> Research Article	The present study aimed to investigate the effect of foliar spray of chitosan (CS; 0, 5, 10 and 20 gr/L) at woolly 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 CS was delayed up to 6 days compared to the control vines. Also, CS at 20 g/L, increased abscisic acid and decreased gibberellic acid in the bud. Furthermore, the 20 g/L of CS 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 CS, 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 CS. With the increase in CS concentration, the amount of leaf photosynthetic pigments and bud endogenous polyamines in the leaves of grapevine increased. Vines treated with 10 g/L of CS had more potassium, phosphorus and calcium content. In general, spraying with CS at 10 and 20 gr/L in woolly bud stage through affecting bud's hormones, polyamines and other physiological indices, while inducing cold tolerance, delayed budburst time up to 6 days in 'Yaghooti' grape.
<b>Article history:</b> Received: 18 March 2024 Received in revised form: 30 June 2024 Accepted: 13 August 2024 Published online: Winter 2024	
<b>Keywords:</b> <i>Abscisic acid,</i> <i>Chilling injury,</i> <i>Grape,</i> <i>Hormones,</i> <i>Soluble sugar.</i>	

**Cite this article:** Safamanesh, H. & Karimi, R. (2024). Effect of chitosan spray on cold tolerance physiology and budburst time of 'Yaghooti' grapevine. *Iranian Journal of Horticultural Science*, 55 (4), 555-576. DOI: <https://doi.org/10.22059/ijhs.2024.374052.2164>



© The Author(s).

DOI: <https://doi.org/10.22059/ijhs.2024.374052.2164>

**Publisher:** The University of Tehran Press.

### 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 (CS), 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 CS on budburst time and physiological and biochemical indices related to cold tolerance in 'Yaghooti' grapes under pergola cultivation system.

### Materials and methods

The present experiment was conducted in 2021 and 2022, on the own-rooted 15-year-old grapevines (*V. vinifera* 'Yaghooti') from a commercial vineyard with the pergola training system at Malayer in Hamadan province/Iran. The treatments included foliar application of CS at 0, 5, 10 and 20 g/L at two stages in late March and early April. Two weeks after CS 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 the results, CS (10 g/L) caused a delay in the time of budburst up to 6 days later and avoided the spring cold injury of the vines. It seems that by increasing the concentration of abscisic acid, CS has made the grape buds to remain dormant and delayed their blooming in the spring season. This has protected the grape buds against the late spring cold. As the concentration of CS increased from 0 to 20 g/L, a decreasing trend was observed in the percentage of bud electrolyte leakage (EL), malondialdehyde (MDA) and hydrogen peroxidase ( $H_2O_2$ ). The lowest value of these membrane damage indices was related to the buds of vines sprayed with a concentration of 20 g/L of CS. Chitosan can induce the enzyme antioxidant system and inhibit hydrogen peroxide, thereby enhancing the integrity of the membrane and improving the plant's tolerance to stress. Also, CS at 20 g/L increased abscisic acid and decreased gibberellic acid in the buds of grapevines. Furthermore, 20 g/L of CS caused a 15.16% increase in the bud water content and a 33.24% decrease in EL of the plant compared to the control. The vines sprayed with CS, particularly at concentration of 10 and 20 g/L, exhibited the highest amounts of proline, protein, carbohydrates, soluble sugars, total phenol and activity of antioxidant enzymes. In addition, the lowest accumulation of MDA content and  $H_2O_2$  occurred in the leaves of grape in the treatment of 20 g/L CS. With the increase in CS concentration, the amount of leaf photosynthetic pigments and bud endogenous polyamines in the leaves of grapevine increased. Vines treated with 10 g/L of CS had more potassium, phosphorus and calcium content.

### Conclusion

In the present study, CS spraying, especially at the concentration of 10 and 20 g/l, with an increase in the abscisic acid and a decrease in gibberellic acid contents, caused a delay in the budburst time of grapevine buds for up to 6 days. In addition, the CS foliar application increased 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 MDA,  $H_2O_2$  accumulation, and a decrease in EL percentage in vine buds, increased the cold tolerance in the grape plant through the reduction of oxygen free radicals and damage to the membrane. Therefore, CS foliar spraying, especially at a concentration of 20 g/L, 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 CS.



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

حسین صفامنش<sup>۱</sup> | روح الله کریمی<sup>۲</sup>

۱. گروه علوم باغبانی و فضای سبز، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ملایر، ملایر، ایران. رایانامه: [husseinsafamanesh@gmail.com](mailto:husseinsafamanesh@gmail.com)  
۲. نویسنده مسئول، گروه علوم باغبانی و فضای سبز، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ملایر، ملایر، ایران. رایانامه: [r.karimi@malayeru.ac.ir](mailto:r.karimi@malayeru.ac.ir)

اطلاعات مقاله	چکیده
<p><b>نوع مقاله:</b></p> <p>مقاله پژوهشی</p> <p><b>تاریخ دریافت:</b> ۱۴۰۲/۱۲/۲۸</p> <p><b>تاریخ بازنگری:</b> ۱۴۰۳/۰۴/۱۰</p> <p><b>تاریخ پذیرش:</b> ۱۴۰۳/۰۵/۲۳</p> <p><b>تاریخ انتشار:</b> زمستان ۱۴۰۳</p> <p><b>کلیدواژه‌ها:</b></p> <p>اسید آسبیزیک، تاک، سرمازدگی، قند محلول، کیتوزان، هورمون‌ها.</p>	<p>پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر محلول پاشی کیتوزان (غلظت‌های صفر، 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 ۶ روز به تأخیر افتاد. کاربرد کیتوزان به ویژه غلظت ۲۰ گرم در لیتر باعث افزایش اسید آسبیزیک 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 ۳۳/۲۴ 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. همچنین، 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 در 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 تأثیر بر مقادیر هورمون‌ها، پلی‌آمین‌ها و دیگر شاخص‌های فیزیولوژیکی ضمن القاء تحمل به سرما، تا ۶ روز باعث تأخیر در زمان شکفتن جوانه‌های انگور یاقوتی شد.</p>

**استناد:** صفامنش، حسین و کریمی، روح الله (۱۴۰۳). اثر محلول پاشی کیتوزان بر فیزیولوژی تحمل به سرما و زمان شکفتن جوانه در انگور یاقوتی. نشریه علوم باغبانی ایران، ۵۵ (۴)، ۵۵۵-۵۷۶  
DOI: <https://doi.org/10.22059/ijhs.2024.374052.2164>



© نویسندگان.

DOI: <https://doi.org/10.22059/ijhs.2024.374052.2164>

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

## مقدمه

انگور یکی از محصولات میوه‌ای با ارزش در جهان است که در بیش از ۹۰ کشور کاشته می‌شود و به‌عنوان 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 سلسیوس در زمستان و تا ۴- درجه سلسیوس 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 پوستان، اسکلت بیرونی حشرات و دیواره سلولی قارچ‌ها 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 گرفته‌اند (Quitadamo et al., 2021). همچنین مشخص شده است 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. علاوه بر این، 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 فندهای محلول، محتوای نسبی آب برگ، غلظت کلروفیل و جذب عناصر در بسیاری از گیاهان شده است (Hidangmayum et al., 2019). کاربرد نانوذرات کیتوزان در برخی گیاهان از طریق تجمع پرولین و افزایش فعالیت

آنزیم های 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 دی آلدئید گیاهان در این پژوهش ها شد (Jiao et al., 2012). در مطالعه ای 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 آنزیم های 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 روی بوته های موز، کاربرد خارجی نانوذرات کیتوزان باعث افزایش وزن تر و خشک بوته ها، محتوای مواد مغذی، تجمع ترکیبات فنولی کل، کربوهیدرات های محلول، پرولین و اسیدهای آمینه، رنگدانه های فتوسنتزی و فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی از جمله سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز برگ گیاهان تحت تنش سرما شد (Wang et al., 2021). محلول پاشی بوته های گل رز با کیتوزان به طور قابل توجهی باعث افزایش وزن زیست توده، شاخص های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی از جمله فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی شده است (Arshad et al., 2022). در مطالعه ای 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 انبارمانی 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 تنش های محیطی در گیاهان می باشد.

با توجه به تغییر اقلیم و گرمایش جهانی، سرمازدگی دیررس بهار یکی از تهدیدات مهم محیطی است که اغلب باعث ایجاد خسارت به بخش های زایشی تاک و کاهش عملکرد می شود. لذا، کاربرد ترکیبات شیمیایی به منظور تاخیر در شکفتن جوانه و یا افزایش تحمل به دمای پایین یکی از عملیات های مهم باغی است که می تواند آثار زیان بار اقتصادی سرمازدگی در تاکستان ها را کاهش دهد. تاکنون گزارشی در مورد اثر کاربرد برگی کیتوزان بر تحمل به سرمای بهار گیاهان چوبی از جمله انگور گزارش نشده است. فرضیه ما این است که کیتوزان مانند یک پوشش باعث تاخیر در شکوفایی جوانه می شود و از طرفی منجر به تقویت سیستم آنتی اکسیدانی تاک تحت تنش سرما می شود. بنابراین هدف از انجام این پژوهش، بررسی اثر کاربرد اول فصل کیتوزان بر زمان شکفتن جوانه و شاخص های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مرتبط با تحمل به سرما در انگور یاقوتی تحت سیستم پرورش پرگولا بود.

## روش شناسی پژوهش

این پژوهش روی ۲۴ تاک غیر پیوندی انگور رقم 'یاقوتی' با شرایط رشد، تربیت و هرس یکسان در تاکستان تحقیقاتی شماره یک دانشکده کشاورزی دانشگاه ملایر در سال های ۱۴۰۰ و ۱۴۰۱ انجام شد. تاک ها با فاصله ۲×۴ متر روی ردیف های شرقی - غربی با سیستم تربیت پرگولا کاشته شدند. آزمایش در قالب طرح بلوک های کامل تصادفی با چهار تیمار و سه تکرار (هر تکرار دو تاک) اجرا شد. تیمارها شامل محلول پاشی کیتوزان (سیگما-آلدریج، آمریکا) در غلظت های صفر (آب مقطر)، ۵، ۱۰ و ۲۰ گرم در لیتر بود. محلول پاشی غلظت های مختلف کیتوزان طی دو مرحله در اواخر اسفند و اوایل فروردین درست کمی قبل از متورم شدن تا تورم کامل جوانه ها (مرحله نوک پنهانی بر اساس سیستم فنولوژیکی انگور ایکهون-لورنز؛ EL=3; Eichhorn-Lorenz, 1977) با استفاده از یک سمپاش ۱۰ لیتری تا مرحله آب چک روی تاک ها انجام شد. برای افزایش بازده جذب، ۵/۰ درصد مویان (تووین ۲۰) به محلول اضافه شد. تاک های شاهد با ترکیب آب مقطر و مویان محلول پاشی شدند. از لحاظ زمانی هرس تاک ها بر اساس عرف منطقه ملایر بعد از ظهور مرحله سه برگی و رفع خطر سرمای بهار در پنجم اردیبهشت ماه انجام شد. از لحاظ شدت هرس، تعداد ۱۵ شاخه یک ساله حاوی دو اسپور دو و چهار جوانه ای در هر تاک حفظ شد. طی هر دو سال سایر عملیات های باغی از قبیل مبارزه با آفات و امراض، آبیاری و تغذیه نیز مطابق با عرف منطقه صورت گرفت. به منظور ارزیابی شاخص های مختلف در جوانه، نمونه برداری از شاخه های یک ساله دو هفته بعد از آخرین محلول پاشی انجام شد، به این ترتیب که تعداد ۱۰ شاخه به طول ۲۵-۲۰ سانتی متر از گره های میانی شاخه های یک ساله انتخاب و

جمع‌آوری شد. شاخه‌ها پس از علامت‌گذاری، درون حوله کاغذی مرطوب پیچیده شده و بلافاصله با یخدان یونولیتی برای ارزیابی‌های شاخص‌های نشت‌یونی، 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- درجه- سلسیوس 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، به‌عنوان 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 & 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 برچسب 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 سرمادگی (صفر درجه سلسیوس) 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 سلسیوس در هر ساعت بود (Karimi, 2019). بعد از کاهش تدریجی دما تا تیمار سرمایی هدف (صفر درجه سلسیوس)، دمای اتاقک سرما ساز به مدت ۱۲ ساعت در این دما ثابت باقی ماند. ارزیابی تحمل به سرما به روش نشت‌یونی 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 به‌وسیله تست تیوباربیتوریک اسید<sup>۱</sup> (TBAT) با سنجش مقدار مالون دی-آلدئید انجام شد (Heath & Packer, 1968). پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ ) به روش Velikova & 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 اسپکتروفوتومتری 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  $70^\circ C$ ) تعیین شد (Webster & Ebdon, 2005).

برای اندازه‌گیری پرولین جوانه مقدار جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۱۸ نانومتر در دستگاه اسپکتروفوتومتر (مدل اسپکول ۲۰۰۰)، 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 اتمی 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 ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز (Nakano & Asada, 1981)، کاتالاز

1. Thiobarbituric acid  
2. Spekol 2000

(Bergmeyer, 1970) و پراکسیداز (Herzog & Fahimi, 1973) با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل اسپکول ۲۰۰۰، ساخت آلمان) به ترتیب، در طول موج‌های ۲۹۰، ۲۴۰ و ۴۶۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. هر یک واحد از فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و گایاکول پراکسیداز 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 آسکوربات پراکسیداز 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 میلی گرم پروتئین جوانه بیان شد. استخراج و اندازه‌گیری فنول کل با کمی تغییر نسبت به روش فولین سیوکالتیو صورت گرفت و جذب نوری نمونه‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۶۵ نانومتر قرائت شد (Velioglu et al., 1998). اندازه‌گیری کربوهیدرات محلول کل با روش رنگ سنجی به کمک آنترن و قرائت در طول موج ۶۲۵ نانومتر صورت گرفت (Yemm & 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 نیم گرم از بافت پودر شده توزین و در ۱۰ میلی لیتر اتانول ۸۰ درصد مخلوط 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 یونی کم- کریستال- ۲۰۰، ساخت کشور انگلیس) که مجهز به آشکارساز UV-Vis SPD MLOAD از نوع آرایه دیودی نوری بود استفاده شد. مقدار تزریق ۱۶ میکرولیتر، ستون به کار گرفته شده از نوع Spherisorb C8-ODS<sub>2</sub> به طول ۱۵۰ میلی متر و قطر ۴/۶ میلی متر و قطر ذرات ۰/۳ میکرون بود. فاز متحرک شامل بافر سیترات سدیم pH=۵/۵ و استونیتریل فوق خالص با نسبت ۱:۹۹ و با سرعت عبور ۰/۱ میلی لیتر بر دقیقه بود. بر اساس زمان بازداری و با استفاده از استانداردهای گلوکز، فروکتوز و ساکارز، 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 میلی گرم از بافت گیاهی (جوانه) در دو میلی لیتر محلول پرکلریک اسید چهار درصد (ClO<sub>4</sub>H) حاوی ۱ و ۷ دی‌آمینوپیپتان (پنج میلی گرم در لیتر از اسید کلریدریک دو نرمال) هموژن گردید. بعد از یک ساعت ماندن در دمای چهار درجه سلسیوس از فیلتر ۰/۴۵ میکرون عبور داده شد. سپس به ۰/۲ میلی لیتر از این محلول، مقدار ۱ میلی لیتر بافر کربنات با pH=۹ و یک میلی لیتر دانسیل کلراید (۱۰ میلی گرم در یک میلی لیتر استون) اضافه و به خوبی به هم زده شد. این مخلوط به مدت یک ساعت در دمای ۶۰ درجه سلسیوس 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 سه میلی لیتر تولونن از مواد دیگر جدا شد و سپس به دستگاه HPLC تزریق گردید. برای اندازه‌گیری غلظت پلی‌آمین‌ها ۱۰ میکرولیتر از محلول پایانی مرحله جداسازی، به ستون کوچک با طول ۱۰ سانتی متر و قطر داخلی ۳ میلی متر فاز معکوس از نوع کرومپک- ندرلند متصل به دستگاه HPLC مدل یونی کم- کریستال- ۲۰۰، ساخت انگلستان، تزریق گردید. فاز متحرک شامل مخلوط استونیتریل فوق خالص و آب دیونیزه به ترتیب با نسبت ۷۲ به ۲۸ (حجم به حجم) بود که با سرعت ۲ میلی لیتر بر دقیقه حرکت آن با سیستم ایزوکرایک انجام می‌شد. 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 میلی لیتر متانول ۸۰ درصد، ۰/۰۱ گرم پلی وینیل-پیرولیدون (PVP) و ۰/۰۱ گرم ویتامین ث اضافه و به مدت یک شب در دمای چهار درجه سلسیوس روی شیکر با ۱۲۰ دور در دقیقه تکان داده شد تا عمل انحلال هورمون اسید آبسزیک به خوبی صورت گیرد. سپس مخلوط هموژن شده

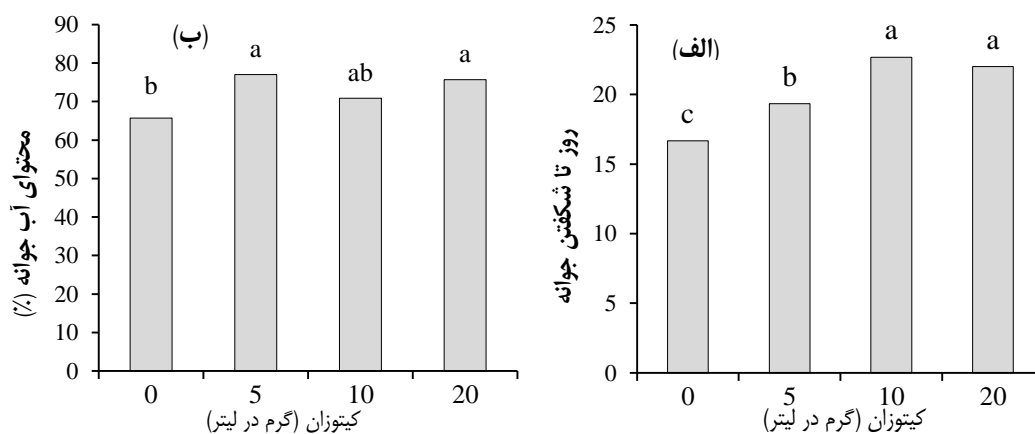
1. Uficam-Crystal-200
2. Photodiod array
3. dansylated
4. Crompack-Nederland

به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۴۰۰۰، سانتریفوژ و محلول رویی آن جدا شده و pH آن به هشت رسانده شد. عمل استخراج از رسوبات باقیمانده دو بار تکرار شد. بعد از صاف کردن عصاره با کاغذ صافی (واتمن شماره یک)، 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 سه درصد و اسیداستیک ۰/۱ مولار اضافه شد تا به صورت محلول درآید. مخلوط حاصل با استفاده از صافی ۰/۴۵ میکرونی پالایش و مقدار ۲۰ میکرولیتر آن 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 تزریق گردید. فاز متحرک از متانول ۲۰ تا ۷۵ درصد در اسید استیک یک درصد با نرخ جریان ۰/۱ میلی لیتر در دقیقه برای جیرلین و ۱/۲ میلی لیتر در دقیقه برای اسید آبسزیک تشکیل شده بود. از آشکارساز UV-Vis SPD MLOAD از نوع آرایه دیودی نوری در طول موج ۲۶۰ نانومتر استفاده شد. بر اساس زمان بازداری طبق نمونه استاندارد اسید آبسزیک و اسید جیرلین و سطح زیر منحنی، مقدار اسید آبسزیک 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 پنج درصد بررسی شد و نمودارها با نرم افزار Excel 2007 رسم گردید.

## یافته‌های پژوهش

### تعداد روز تا شکفتن جوانه و شکوفایی گل

بر اساس نتایج، محلول پاشی کیتوزان باعث تغییر در زمان شکفتن جوانه (باز شدن جوانه) در تاک‌ها شد. این تغییرات وابسته به غلظت بوده و تاک‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف کیتوزان پاسخ‌های متفاوتی از نظر زمان شکفتن جوانه نشان دادند (شکل ۱).



شکل ۱. اثر محلول پاشی کیتوزان بر زمان شکفتن (الف) و مقدار آب (ب) جوانه در انگور یاقوتی

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 کاهش گذاشت، اگرچه از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری 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 ۶ روز دیرتر اتفاق افتاد (شکل ۱). اثر کیتوزان بر شاخص روز تا زمان شکوفایی (گلدهی) معنی‌دار نشد.

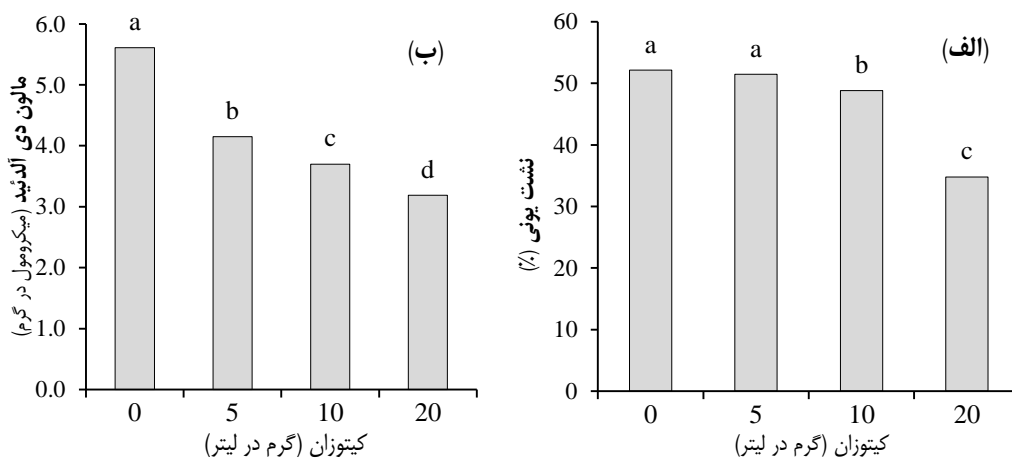


### مقدار آب جوانه

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

### نشت یونی جوانه

درصد نشت یونی جوانه اندازه گیری شده پس از سرمادهی مصنوعی شاخه های یک ساله 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 اندازه گیری شده (۳۴/۸ درصد) مربوط به جوانه تاک هایی بود که با غلظت ۲۰ گرم در لیتر کیتوزان محلول پاشی شده بودند. درصد نشت یونی در این تاک ها به مقدار ۳۳/۳ درصد کمتر از مقدار نشت یونی اندازه گیری شده در تاک های شاهد بود (شکل ۲).



شکل ۲. اثر محلول پاشی غلظت های مختلف کیتوزان بر نشت یونی (الف) و مقدار مالون دی آلدئید (ب) جوانه انگور یاقوتی.

### مقدار مالون دی آلدئید جوانه

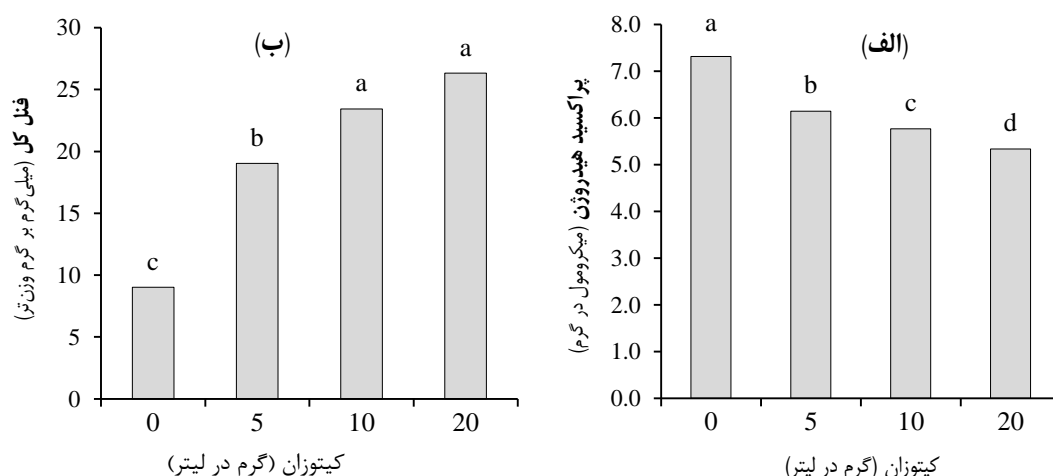
کاربرد کیتوزان، مقدار مالون دی آلدئید جوانه در انگور یاقوتی را نسبت به شاهد کاهش داد و بین همه سطوح کیتوزان با شاهد اختلاف معنی داری وجود داشت. کاهش در مقدار مالون دی آلدئید جوانه در اثر کاربرد کیتوزان وابسته به غلظت بود به طوری که کمترین مقدار مالون دی آلدئید جوانه مربوط به تاک های تیمار شده با غلظت ۲۰ گرم در لیتر و بیشترین مقدار این ترکیب سمی حاصل از پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء مربوط به تاک های محلول پاشی نشده (شاهد) بود. در واقع تیمار ۲۰ گرم در لیتر کیتوزان تا ۴۳/۲ درصد منجر به کاهش پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء در مقایسه با تاک های 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 آسیب زای غشاء نیز (۵/۳۴ میکرومول در گرم وزن تر) مربوط به تاک های تیمار شده با غلظت ۲۰ گرم در لیتر کیتوزان بود که نسبت به محتوای پراکسید هیدروژن جوانه در تاک های شاهد ۲۷/۱ درصد کاهش نشان داد. بیشترین مقدار تجمع پراکسید هیدروژن با میانگین ۷/۳۲ میکرومول در گرم وزن تر مربوط به تاک های بدون کاربرد کیتوزان (شاهد) بود (شکل ۳).

### مقدار فنول کل جوانه

مقدار فنول کل جوانه تحت تاثیر محلول پاشی کیتوزان در جوانه انگور یاقوتی 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).



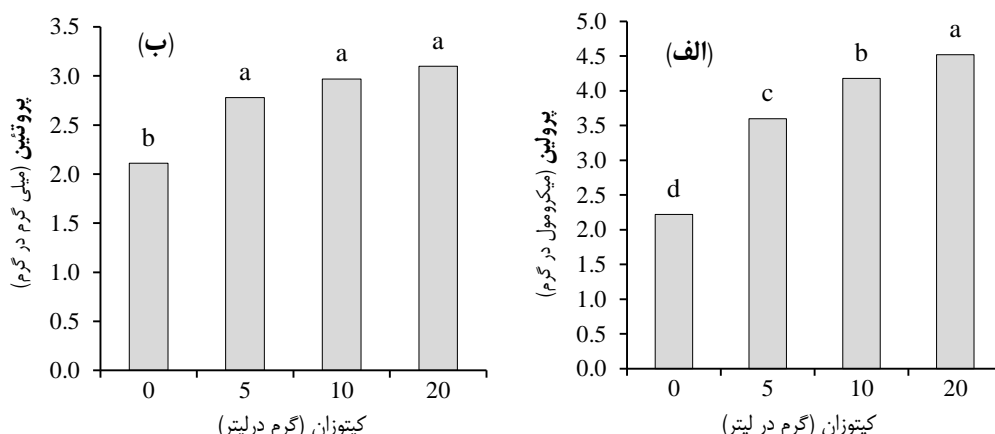
شکل ۳. اثر محلول پاشی غلظت‌های مختلف کیتوزان بر مقدار پراکسید هیدروژن (الف) و فنول کل (ب) جوانه انگور یاقوتی.

### 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 یاقوتی 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 یا قوتی.

### مقدار گلوکز، فروکتوز و ساکارز جوانه

مقدار قندهای محلول گلوکز، فروکتوز و ساکارز در جوانه تاک‌های تیمار شده با غلظت پنج 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 یا قوتی

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>

مقادیر میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون فاقد تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشند.

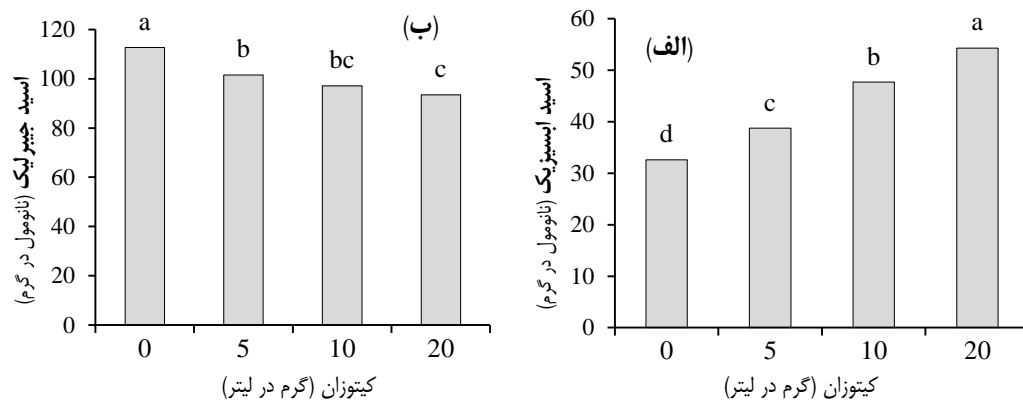
### مقدار کربوهیدرات محلول کل جوانه

محلول پاشی کیتوزان تاثیر مثبتی بر مقدار کربوهیدرات محلول کل جوانه داشت. در واقع کیتوزان باعث افزایش مقدار کربوهیدرات محلول جوانه انگور یا قوتی 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 درصد افزایش داشت (جدول ۱).

### مقدار اسید جبرلیک و اسید آبسزیک جوانه

محلول پاشی کیتوزان مقدار هورمون‌های اسید جبرلیک و اسید آبسزیک جوانه تاک‌ها را دستخوش تغییرات کرد. محلول پاشی کیتوزان باعث کاهش چشمگیر مقدار اسید جبرلیک جوانه تاک شد. با افزایش غلظت کیتوزان از مقدار اسید جبرلیک جوانه به طور معنی‌داری کاسته شد و تحت سطوح مختلف کیتوزان، کمترین مقدار اسید جبرلیک در تیمار ۲۰ گرم در لیتر (۹۳/۵۱ نانوگرم در گرم وزن تر) به دست آمد. همچنین، بیشترین مقدار اسید جبرلیک جوانه به مقدار ۱۱۲/۷ نانوگرم در گرم وزن تر 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. علاوه بر این کمترین مقدار اسید آسبیزیک (۳۲/۶۳ نانوگرم در گرم وزن تر) مربوط به تاک‌های شاهد بود (شکل ۵).



شکل ۵. اثر محلول‌پاشی غلظت‌های مختلف کیتوزان بر مقدار اسید آسبیزیک (الف) و اسید جیبرلیک (ب) جوانه انگور یاقوتی.

### 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>	۸۰/۲۷ <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>

مقادیر میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون فاقد تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشند.

### فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی جوانه

کاربرد غلظت‌های مختلف کیتوزان باعث بهبود سیستم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی جوانه در تاک‌های تیمار شده شد. تاک‌های تیمار شده با کیتوزان مقدار فعالیت آنزیم کاتالاز 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 درصد 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 معنی‌داری نداشتند (جدول ۳). فعالیت آنزیم

گایاکول پراکسیداز جوانه در تاک‌های تیمار شده با غلظت نهایی کیتوزان ۵۹/۱۹ درصد 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 یاقوتی

کیتوزان (گرم در لیتر)	کاتالاز (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>	۱۱/۷۳ <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>

مقادیر میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون فاقد تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشند.

بیشترین فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز 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 معنی‌داری نداشتند (جدول ۳). در واقع کاربرد غلظت ۱۰ گرم در لیتر کیتوزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز جوانه را تا ۷۱/۱۸ درصد 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 معنی‌داری مشاهده نشد. ولی بین مقدار کلروفیل a برگ در تاک‌های تیمار شده با غلظت ۲۰ گرم در لیتر کیتوزان و تاک‌های شاهد تفاوت معنی‌داری مشاهده شد (جدول ۴). در مورد کلروفیل کل بین تیمار ۵ گرم در لیتر و تاک‌های شاهد تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ولی بین دو غلظت ۱۰ و ۲۰ گرم در لیتر کیتوزان و شاهد از لحاظ مقدار کلروفیل کل تفاوت معنی‌دار بود. در مورد کلروفیل b بین تاک‌های تیمار شده با کیتوزان و شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. بیشترین مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی مربوط به تاک‌های تیمار شده با غلظت ۲۰ گرم در لیتر کیتوزان بود که مقدار 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 معنی‌دار نشد (جدول ۴).

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

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>

مقادیر میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون فاقد تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشند.

#### مقدار عناصر غذایی برگ

اثر محلول پاشی کیتوزان در سطح احتمال پنج درصد بر مقدار عناصر فسفر، پتاسیم، کلسیم، آهن و روی معنی‌داری شد ولی تاثیر معنی‌داری 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 در لیتر کیتوزان با تاک‌های تیمار نشده اختلاف معنی‌داری 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، هرچند 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، اگرچه 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 (درصد)	پتاسیم (درصد)	کلسیم (درصد)	منیزیم (درصد)	آهن (بی‌بی/م)	روی (بی‌بی/م)
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>

مقادیر میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون فاقد تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشند.

## بحث

کاربرد غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان تا شش روز در مقایسه با تاک‌های شاهد منجر به تأخیر در شکفتن جوانه در انگور یاقوتی شد. بخشی از تأخیر در شکوفایی جوانه مشاهده شده در این 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 آسبیزیک سبب تداوم خواب جوانه‌ها و تأخیر در شکفتن آن‌ها در فصل بهار شده و در نتیجه از جوانه‌های انگور در مقابل سرماهای دیررس بهاره محافظت کرده است (Karimi, 2019). بر اساس نتایج مطالعه حاضر کاربرد کیتوزان منجر به افزایش اسید آسبیزیک و کاهش اسید جیبرلیک جوانه تاک‌های انگور یاقوتی شد. رابطه نزدیکی بین مقدار اسید آسبیزیک و خواب جوانه در گلایی مشاهده شده است. در واقع، تیمار اسید آسبیزیک از شکستن خواب جوانه‌های گلایی جلوگیری کرده که نشان دهنده نقش مهم آن در القاء خواب می‌باشد. به علاوه مقدار اسید آسبیزیک قبل از شکوفایی جوانه‌ها به اوج رسیده و این ممکن است یک استراتژی محافظتی برای زنده ماندن گلایی تحت سرما باشد (Li et al., 2018). علاوه بر این، کیتوزان بیوستنز اکسین را از طریق بیان ژن‌های مرتبط با اکسین، تسریع بیوستنز و انتقال اسید ایندول استیک و کاهش فعالیت اسید ایندول استیک اکسیداز افزایش می‌دهد (Bakhom et al., 2020). از طرفی غلظت زیاد اکسین اثر بازدارندگی بر رشد و نمو گیاهان دارد، بنابراین به نظر می‌رسد که با برهم زدن مقدار اکسین درونی جوانه‌ها، کیتوزان 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 آسبیزیک را تقویت می‌کند و مسیر سیگنالینگ اسید آسبیزیک را فعال می‌کند (Karimi, 2019). به طور کلی، جیبرلین و آسبیزیک اسید نقش متضاد در تنظیم رشد گیاه دارند. جیبرلین برای تقویت رشد گیاه و شکستن خواب جوانه در نظر گرفته می‌شود و آسبیزیک اسید مانع رشد گیاه می‌شود (Wang & Gao, 2016). مقدار اسید آسبیزیک با ورود تاک‌ها به مرحله رکود افزایش و بعد از رکود مقدار آن کاهش می‌یابد که حاکی از نقش اسید آسبیزیک به عنوان بازدارنده شکوفایی جوانه‌های در حال خواب تاک می‌باشد (Karimi, 2019). مشخص شده است که افزایش کیتوزان منجر به تجمع هورمون‌های مربوط به رشد گیاه (اسید آسبیزیک و اسید ایندول استیک) می‌شود (Suarez-Fernandez et al., 2020). از آنجا که اسید آسبیزیک به عنوان یک

سیگنال درون‌زا عمل می‌کند گیاهان را قادر می‌سازد که بر شرایط نامناسب محیطی غلبه کنند، همچنین گزارش شده است که می‌تواند تنظیم رونویسی از ژن‌های ضروری کد کننده پروتئین‌های درگیر در فرآیندهای فیزیولوژیکی متنوع را کنترل کند (Ahmad et al., 2019). به نظر می‌رسد کیتوزان از طریق افزایش سطح اسید آسبیزیک 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 کننده‌ای 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 میلی‌گرم 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 میلی‌گرم 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 مالون‌دی‌آلدهید در نتیجه حفظ یکپارچگی غشای سلولی در مقایسه با تیمارهای شاهد می‌شود (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 نشان‌دهنده 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 آنتی‌اکسیدانی، 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 سلول مرتبط باشد (Wang et al., 2021). البته مقدار بیشتر اسید آسبیزیک و پلی‌آمین‌های 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 آنتی‌اکسیدانی 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 شود و یک ماکرومولکول پایدار و کمپلکس فلزی تولید می‌کند. این مجموعه فعالیت آنتی‌اکسیدانی 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 آنتی‌اکسیدان و دیگر ترکیبات حذف کننده رادیکال‌های آزاد از قبیل ترکیبات فنولی در ارتباط باشد (Attia et al., 2021).

در مطالعه حاضر مقدار مالون دی‌آلدئید در جوانه تاک‌های محلول‌پاشی شده با غلظت ۲۰ میلی‌گرم در لیتر کیتوزان در مقایسه با شاهد کاهش چشمگیری نشان داد. کاربرد کیتوزان در خیار ژاپنی مقدار مالون دی‌آلدئید را از طریق محافظت و حفظ یک پارچگی ساختاری غشاء در طول انبارمانی سرد کاهش داده است (Hashim *et al.*, 2018) که تاییدی بر نقش این پلی‌ساکارید در جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء تحت دمای پایین می‌باشد. مالون دی‌آلدئید محصولی حاصل از پراکسیداسیون اسیدهای چرب اشباع نشده غشایی سلول بوده و به عنوان شاخص تنش اکسیداتیو، نشأت 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 مالون-دی‌آلدئید 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 مالون دی‌آلدئید 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 آسیب اکسیداتیو 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 برگ دانهال‌های 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 یاقوتی 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، 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 دانهال‌های 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). کیتوزان با گیرنده‌های غشای گیاهی برهم‌کنش داشته و ترکیبات سیگنالی ایجاد



می کنند که بیان ژن های کدکننده آنزیم های بیوستنز متابولیت های ثانویه را القا می کنند و همچنین می توانند تأثیر غیرمستقیمی بر تجمع ترکیبات فنولی در گیاهان داشته باشند که نقش مهمی در جذب و خنثی سازی و حذف رادیکال های آزاد اکسیژن و یا پراکسیدازهای تجزیه کننده دارند. کیتوزان به عنوان یک محرک زیستی ممکن است دارای پتانسیل برای از بین بردن رادیکال های آزاد اکسیژن باشد که باعث افزایش میزان ترکیبات فنولی می شود. بنابراین افزایش مقدار این ترکیبات احتمالاً به دلیل نقش آنتی اکسیدانی آنها در برابر رادیکال های آزاد اکسیژن است (Hidangmayum et al., 2019). به علاوه کیتوزان ممکن است ژن های جدیدی را فعال کند که می تواند منجر به سنتز مسیرهای بیوستنزی مختلف و راه اندازی آنزیم ها گردد و در نهایت باعث تولید فنول شود.

بر اساس نتایج، کاربرد کیتوزان باعث افزایش مقدار کربوهیدرات محلول جوانه انگور یا قوتی شد. در این راستا نیز محلول پاشی بوته 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 طرف دیگر، به نظر می رسد که توقف مرحله نمو 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 است که کیتوزان بسیاری از ژن های دخیل در انتقال کربوهیدرات در جوانه های شبدر 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 تأثیر 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 پوتریسین، اسپرمیدین و اسپرمین در اثر کاربرد کیتوزان به این دلیل است که کیتوزان می تواند به پیرووات درگیر در چرخه اسید تری کربوکسیلیک برای تولید اسید گلوتامیک 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 دفاع آنتی اکسیدانی و متابولیسم پرولین باشد (Li

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 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 می کند. این به ساختار کیتوزان با گروه های هیدروکسیل و آمینه فراوان که برای سم زدایی رادیکال های پراکسید هیدروژن و سوپراکسید و حفظ پایداری رادیکال های غیرسمی دخیل هستند، مربوط می شود (Shehzad et al., 2020). پراکسید هیدروژن، یک ماده سمی است که عمدتاً تحت شرایط استرس با تنفس نوری، اکسیداسیون بتا اسیدهای چرب و غیره، در پراکسی زوم ها تولید می شود (Muley et al., 2019). در واقع فعالیت آنتی اکسیدانی بالاتر پس از کاربرد کیتوزان از گیاهان در برابر پراکسیداسیون لیپیدی و آسیب اکسیداتیو با سم زدایی رادیکال های پراکسید هیدروژن و سوپراکسید محافظت می کند (Arshad et al., 2022). از سوی دیگر کیتوزان می تواند با کمک آنزیم های آنتی اکسیدانی گونه های فعال اکسیژن را حذف کند و باعث تعادل همواستاتیک بین تولید و حذف آنها گردد و مقدار گونه های فعال اکسیژن را کاهش دهد.

مقدار کلروفیل a و b و کل برگ حاصل از جوانه های شکوفا شده در تاک های محلول پاشی شده با کیتوزان بیشتر از تاک های شاهد بود. هم راستا با نتایج مطالعه حاضر، محلول پاشی کیتوزان سبب افزایش مقدار رنگدانه های فتوسنتزی برگ نهال نارنج شد (Mohamed, 2018). کیتوزان از طریق تأثیر بر رنگدانه های فتوسنتزی و افزایش مقدار کلروفیل با افزایش سطح درون زای سیتوکینین ها که سنتز کلروفیل را تحریک می کند، تنش را کاهش می دهد، 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 رنگدانه های 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 می دهد. همچنین کیتوزان باعث افزایش غلظت درونی دی اکسید کربن شده که خود باعث کاهش سنتز اتیلن و در نتیجه کاهش تخریب کلروفیل می شود (Chien et al., 2007).

محلول پاشی 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 مهم ترین عواملی هستند که به گیاهان کمک می کنند تا با شرایط سختی که در طول تنش سرما رخ می دهد مقابله کنند (Wang et al., 2021). کیتوزان نقش خود را در فعال کردن درشت مغذی ها از طریق تغییر فشار اسمزی در سلول و کاهش تجمع گونه های فعال اکسیژن را از طریق بیان ژن های آنزیم های آنتی اکسیدانی در گیاهان ایفا می کند (Hidangmayum et al., 2019). به علاوه کیتوزان منجر به افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی و محافظت از غشاهای پلاسمایی در برابر آسیب اکسایشی و افزایش نفوذپذیری سلول های گیاهی می شود که در نهایت جذب مواد مغذی را تحریک می کند. 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 & Khara, 2021).

در این پژوهش مشاهده شد که مقدار فسفر در تاک‌های تیمار شده با کیتوزان با تاک‌هایی که محلول پاشی 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 پنج 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 در 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 & Zawadzińska, 2015). محلول پاشی کیتوزان سبب افزایش مقدار عنصر روی در برگ بوته‌های انگور شد. احتمالاً عنصر روی از طریق سم‌زدایی رادیکال‌های سوپراکسید و یک پارچگی 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 نانو کیتوزان موجب افزایش مقدار نیتروژن، فسفر، پتاسیم، کلسیم و آهن برگ در گیاهان موز تحت تنش سرما شد (Wang *et al.*, 2021).

### نتیجه‌گیری کلی

در مطالعه حاضر محلول پاشی کیتوزان به ویژه غلظت ۱۰ و ۲۰ گرم در لیتر در مرحله فنولوژیکی نوک‌پنبه‌ای جوانه در اواخر اسفند و اوایل فروردین ضمن افزایش اسید آسبزیک و کاهش اسید جیبرلیک تا شش روز باعث تأخیر در شکفتن جوانه‌های تاک شد. به‌علاوه 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 نوک‌پنبه‌ای جوانه می‌تواند به عنوان راهکاری جهت اجتناب از سرمای دیررس بهاره (تا شش روز) و کاهش صدمات ناشی از سرما در تاک‌های انگور استفاده شود. پیشنهاد می‌شود با توجه به ماهیت پلی‌ساکاریدی و امولسیون شونده 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. <https://doi.org/10.3390/plants10091877>
- Ahmad, B., Zaid, A., Sadiq, Y., Bashir, S., Wani, S.H. (2019). Role of Selective Exogenous Elicitors in Plant Responses to Abiotic Stress Tolerance. In M. Hasanuzzaman, K. Hakeem, K. Nahar and H. Alharby (Eds.) *Plant Abiotic Stress Tolerance* (pp. 273-290). Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-06118-0\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-030-06118-0_12)
- 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), 1-14. <http://dx.doi.org/10.48129/kjs.11655>
- 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. <http://dx.doi.org/10.3390/plants10020388>
- Bakhoun, 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. <https://doi.org/10.1186/s42269-020-00343-7>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2335-z>
- 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. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>
- Bergmeyer, N. (1970). *Methoden der Enzymatischen Analyse*, vol 1. AkademieVerlag, Berlin, pp. 636-647. Google Scholar
- 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. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- 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. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.09.022>
- 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. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)00889-3](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)00889-3)
- Eichhorn, K.W., & Lorenz, D.H. (1977) Phenological development stages of the grapevine. *Nachrichtenblatt Dtsch Pflanzenschutzd.* 29,119-20. Google Scholar
- 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. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20143098846>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s11738-015-2021-6>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s11694-021-01275-0>
- Food and Agriculture Organization (2011) *Statistical Yearbook*. FAOSTAT, New York. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/metadata>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s11694-021-01275-0>
- 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. <http://dx.doi.org/10.17576/jsm-2018-4702-10>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.03.004>
- 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. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1)
- Herzog, V., Fahimi, HD. (1973). Determination of the activity of peroxidase. *Analytica Chimica Acta*, 55, 554-562. DOI: [https://10.1016/0003-2697\(73\)90144-9](https://10.1016/0003-2697(73)90144-9)
- 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. <https://doi.org/10.1007/s12298-018-0633-1>
- 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. <https://doi.org/10.1002/fsn3.662>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s11540-012-9223-8>
- 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. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11030>
- Karla, Y. P. (1998). *Handbook of reference methods for plant analysis*. CRC Press Inc Boca Raton, FL165170. [Google Scholar](https://scholar.google.com/)
- 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. <https://doi.org/10.1080/01904167.2019.1659343>
- 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. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00334>
- Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophyll and carotenoids: –pigments of photosynthetic biomembrances. In H. Sies, R. Douce, N. Clowick & N. Kaplan (Eds.), *Methods in Enzymology Plant Cell Membranes*, 148 (pp. 350-381). Academic Press, San Diego (CA). [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1)
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.04.038>
- 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 <https://doi.org/10.21608/ejoh.2018.3063.1050>
- 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. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13633>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.01.056>
- Nakano, Y., & Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and cell physiology*, 22(5), 867-880. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232>
- 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. <https://doi.org/10.1134/S102144371901014X>
- 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. <https://doi.org/10.3390/plants10071365>
- Salachna, P., & Zawadzńska, 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), 136-142. <https://doi.org/10.12911/22998993/1868>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109841>
- 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. <https://doi.org/10.3390/ijms21010306>
- 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. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.572087>
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2004.01314.x>
- 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. <https://doi.org/10.1021/jf9801973>
- 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. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86732-y>
- Walter, H. J. P., & Geuns, J. M. (1987). High speed HPLC analysis of polyamines in plant tissues. *Plant Physiology*, 83(2), 232-234. <https://doi.org/10.1104/pp.83.2.232>
- 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. <https://doi.org/10.3390/nano11102670>
- 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. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01248>
- 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. <https://doi.org/10.5344/ajev.2020.19074>
- 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. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.40.3.842>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s12298-020-00791-5>
- Yemm, E. W., & Willis, A. (1954). The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochemical Journal*, 57(3), 508. <https://doi.org/10.1042/bj0570508>
- 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. <https://doi.org/10.3390/horticulturae7100342>