

Investigating the effect of chitosan on gene expression, p5cs enzyme activity and proline content in rapeseed (*Brassica napus* L.) under salt stress

Zihreh Khosravian

Msc Candidate, Department of Biology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran. E-mail: khosravian@yahoo.com

Monireh Ranjbar 

*Corresponding author. Assistant Professor, Department of Biology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran. E-mail: Monireh.Ranjbar@iau.ac.ir

Ali Mohammad Ahadi 

Associate Professor, Department of Molecular Genetics, Faculty of Science, Shahrekord University, Shahrekord, Iran. E-mail: ahadi_al@sku.ac.ir

Abstract

Objective

Salinity is one of the most important stresses that reduce the yield of most plants. Plants use different mechanisms in response to environmental stresses. Chitosan and its oligomers are used in plants to resist abiotic stresses such as salinity. In this study, the effect of chitosan and salinity on gene expression and p5cs enzyme activity and proline content in rapeseed was investigated.

Materials and methods

For this purpose, rapeseed plants were treated with sodium chloride solution (0, 50, 100 and 150 mM) and chitosan (0, 5 and 10 mg/l). The experiment was performed as a factorial experiment with a completely randomized design in 3 replications. Treated plants were harvested to measure gene expression, p5cs enzyme activity and proline content.

Results

With increasing salt concentration, the expression of delta-1 proline-5 carboxylate synthetase (P5CS) gene, enzyme activity and proline content increased. In the combined salinity of 100 mM with chitosan 10 mg/l, gene expression, activity and proline content in rapeseed had the highest amount. The use of chitosan in salt-containing medium compared to salinity treatments in same concentration, caused more P5CS gene to be expressed, increased enzyme activity and subsequently more proline was synthesized. Therefore, there is a positive correlation between gene expression, enzyme activity and the amount of proline produced.

Conclusions

According to the results, chitosan with a concentration of 10 mg / l in salinity treatment, by increasing gene expression and the activity of the enzyme delta-1-proline-5-carboxylate synthetase (P5CS), produced proline, which increases the plant's resistance to salinity stress.

Keywords: chitosan, P5CS enzyme, rapeseed, proline, salinity.

Paper Type: Research Paper.

Citation: Khosravian Z, Ranjbar M, Ahadi AM (2022) Investigating the effect of chitosan on gene expression, p5cs enzyme activity and proline content in rapeseed (*Brassica napus* L.) under salt stress. *Agricultural Biotechnology Journal* 14 (4), 181-200.

Agricultural Biotechnology Journal 14 (4), 181-200.

DOI: 10.22103/jab.2022.18349.1348

Received: October 23, 2022.

Received in revised form: November 23, 2022.

Accepted: November 24, 2022.

Published online: November 30, 2022

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant
Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian
Biotechnology Society.




© the authors

بررسی تاثیر کیتوزان بر بیان ژن، فعالیت آنزیم p5cs و میزان پرولین در گیاه کلزا (*Brassica napus* L.) تحت تنش شوری

زهرة خسرویان


دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران. رایانامه:

khosravian@yahoo.com

 منیره رنجبر

*نویسنده مسئول: استادیار، گروه زیست شناسی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران. رایانامه:

Monireh.Ranjbar@iau.ac.ir

 علی محمد احدی

دانشیار، گروه ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران. رایانامه: ahadi_al@sku.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۸/۰۱ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۱/۰۹/۰۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۰۳

چکیده

هدف: شوری یکی از مهمترین تنش‌هایی است که عملکرد اکثر گیاهان را در سراسر جهان کاهش می‌دهد. گیاهان از مکانیزم‌های مختلفی در پاسخ به تنش‌های زیست محیطی استفاده می‌کنند. از کیتوزان و الیگومرهای آن در گیاهان برای ایجاد مقاومت در برابر تنش‌های غیر زیستی مانند شوری استفاده می‌شود. در این مطالعه تاثیر کیتوزان و شوری بر بیان ژن و فعالیت آنزیم p5cs و میزان پرولین در گیاه کلزا بررسی شده است.

مواد و روش‌ها: بدین منظور گیاهان کلزا تحت تیمارهای شوری (۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار)، سطوح کیتوزان (۰، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر) در آزمایشی به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شده و جهت ارزیابی بیان ژن و فعالیت آنزیم p5cs و میزان پرولین مورد استفاده قرار گرفتند.

نتایج: با افزایش شوری میزان بیان ژن دلتا - ۱ پرولین - ۵ کربوکسیلات سنتتاز (P5CS)، فعالیت آنزیم و محتوای پرولین افزایش یافته است. در تیمار توام شوری ۱۰۰ میلی‌مولار با کیتوزان ۱۰ میلی‌گرم در لیتر، بیان ژن، فعالیت و میزان پرولین در گیاه کلزا دارای بیشترین میزان بود. استفاده از کیتوزان در محیط حاوی نمک در مقایسه با تیمارهای شوری هم غلظت، باعث شده تا ژن P5CS

بیشتر بیان شده، فعالیت آنزیم مربوطه افزایش یافته و به دنبال آن پرولین بیشتری سنتز گردد. بنابراین همبستگی مثبتی بین بیان ژن، فعالیت آنزیم و میزان پرولین تولید شده وجود دارد.

نتیجه گیری: با توجه به نتایج می توان بیان کرد که کیتوزان با غلظت ۱۰ میلی گرم در لیتر در شرایط شوری با افزایش بیان ژن و فعالیت آنزیم دلتا- ۱ پرولین - ۵ کربوکسیلات سنتتاز (P5CS)، پرولین تولید کرده که باعث افزایش مقاومت گیاه به تنش می گردد. **کلیدواژه ها:** آنزیم P5CS، پرولین، شوری، کلزا، کیتوزان
نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: خسرویان زهره، رنجبر منیره، احدی علی محمد (۱۴۰۱) بررسی تاثیر کیتوزان بر بیان ژن، فعالیت آنزیم p5cs و میزان پرولین در گیاه کلزا (*Brassica napus L.*) تحت تنش شوری. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۴(۴)، ۱۸۱-۲۰۰.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant



Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian
Biotechnology Society.

© the authors

مقدمه

گیاهان در دوره حیات با انواع تنش های محیطی مواجه می شوند، این تنش ها شانس نمو و بقای گیاهان را محدود می کنند (Parihar et al., 2015). تنش شوری تمام مراحل رشد و نمو گیاه را از جوانه زنی تا تولید بیوماس و دانه و میوه را تحت تاثیر قرار می دهد. پاسخ گیاهان به شوری به نوع گیاه، مراحل نمو گیاه، شدت و مدت تنش بستگی دارد (Orcutt and Nilsen 2000). آثار ناشی از تنش شوری بر گیاهان شامل اختلالات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی و ترکیبات، سمیت یونی، تنش اسمزی، کمبود عناصر معدنی است (Saleh 2013). تنش شوری به روش های گوناگونی سبب کاهش رشد گیاهان می شود. کاهش پایداری غشای سلولی، فعالیت آنزیم های فتوسنتزی، میزان فتوسنتز، آماس سلول ها و در نتیجه کاهش توسعه برگ ها، اختلال در جذب یون ها به ویژه تجمع یون های سدیم و کلر در برگ و در نهایت کاهش رشد رویشی و عملکرد اقتصادی از اثرات تنش شوری بر گیاهان زراعی می باشد (Munns 2002). برای کاهش آسیب ناشی از تنش شوری می توان سازوکارهایی پیش بینی کرد. یکی از این موارد استفاده از ایستورهایی مانند کیتوزان است. کیتوزان یک پلی ساکارید گلوکوزامین مشتق شده از کیتین است. معمولاً کیتوزان به کیتینی که بیش از ۵۰ درصد گروه های استیل آن حذف شده باشد اطلاق می گردد (Mahdavi et al. 2013). کیتوزان یک ایستور با منشأ زیستی و غیر زیستی، غیرسمی، بیوپلیمر آلی، پلی ساکارید نیتروژن دار و قابل تجزیه زیستی است که می تواند اثرات تنش های محیطی حاصل از شوری و خشکی خاک را کاهش دهد و موجب بهبود روند رشد در گیاهان می شود (Jimenez-Gomez and Cecilia JA 2020). پرولین از جمله اسیدهای آمینه هایی است که در بسیاری از گیاهان در پاسخ به تنش های محیطی به خصوص

تنش شوری تجمع پیدا کرده و به عنوان اسمولیت و یک چارپون مولکولی برای حفظ ساختار پروتئین‌ها و سلول از خسارات ایجاد شده توسط تنش عمل می‌کند (Amirjani 2011). اگر گیاه در شرایط تنش‌زا نباشد پرولین از مسیر اورنتین و در شرایط تنش شوری و خشکی از L-گلوتامیک اسید توسط آنزیم دلتا-۱ پرولین-۱ -۵ کربوکسیلات سنتتاز (P5CS) سنتز می‌شود. آنزیم مسیر گلوتامات، پیرولین-۵-کربوکسیلات سنتتاز (P5CS)، آنزیمی با دو عملکرد در گیاهان هستند. یکی از فعالیت‌های آن، به عنوان γ -گلوتامیل کیناز است که فسفوریلاسیون L-گلوتامات توسط ATP را کاتالیز می‌کند و γ -گلوتامیل فسفات تولید می‌کند. فعالیت دیگر آن به عنوان GSA ردوکتاز وابسته به NADPH است که γ -گلوتامیل فسفات را به گلوتامیک- γ سمی آلدئید (P5CS) احیا می‌کند. این حد واسطه، به شکل $\Delta 1$ - پیرولین - ۵- کربوکسیلات حلقه ای تبدیل می‌گردد. سپس P5C توسط آنزیم P5C ردوکتاز وابسته به NADPH به پرولین تبدیل می‌شود (Pérez Arellano et al. 2010).

کلزا با نام علمی *Brassica napus* L گیاهی از تیره شب بو است که گونه‌های آمفی دیپلوئید حاصل از تلاقی فرم‌هایی از کلم (*Brassica olearacea*) با شلغم (*Brassica campestris*) می‌باشد. دانه کلزا دارای ۲۵ تا ۵۵ درصد روغن، ۱۸ تا ۲۴ درصد پروتئین می‌باشد. همچنین دارای اسید اولئیک (۶۰ درصد) و آلفالیونائیک (۹ درصد)، کمتر از ۴ درصد اسید پالمیتیک (اسید چرب اشباع شده) بوده و از نظر کیفیت تغذیه‌ای در مقایسه با سایر دانه‌های روغنی دیگر اهمیت خاصی دارد (Gunstone 2004). با بررسی بیان ژن *P5CS* در گیاه سویا تحت تنش خشکی، افزایش بیان ژن *P5CS* در هر دو اندام برگ و ریشه را مشاهده شد (Solleimani et al. 2015). تولید پرولین در گیاهان شاهد و گیاهان تراریخته، تحت آبیاری معمولی و کم آبی، تفاوت دارد. بیان ژن *P5CS* در گیاهان تراریخت باعث افزایش تحمل به تنش خشکی در این گیاهان می‌شود (Yamchi et al., 2005). بیان ژن *P5CSA* در دانه‌های کلزا هنگام جوانه زنی افزایش یافته است (Kubala et al. 201). شوری بر فعالیت آنزیم *P5CS* در گیاه *Eurya emarginata* تاثیر معنی‌داری داشته و سبب افزایش بیان و فعالیت این آنزیم شده است (Zheng et al., 2016). همچنین در پژوهش Silva-Ortega و همکاران (۲۰۰۸) فعالیت آنزیم و میزان بیان ژن *P5CS* در گلایی تحت تنش شوری با افزایش غلظت شوری افزایش یافته است. شوری باعث کاهش شاخص‌های درصد جوانه‌زنی و همچنین رشد گیاهچه لوبیا شد. بازدارندگی رشد در غلظت ۱۵۰ میلی مولار بالاتر بود. تیمار گیاه لوبیا با غلظت‌های نمک همراه با غلظت‌های مختلف نانو کیتوزان (۰.۱٪، ۰.۲٪ و ۰.۳٪) نشان داد که نانو کیتوزان در تمام غلظت‌ها به طور قابل توجهی جوانه زنی بذر و متغیرهای رشد (ارتفاع بوته، سطح برگ، وزن تر و خشک شاخه و ریشه) و پرولین را به طور معنی‌داری افزایش داد (Zayed et al. 2017). کیتوزان در گیاه فلفل شیرین تحت تنش شوری منجر به افزایش تجمع پرولین و فعالیت آنزیم سنتزی پرولین، کلروفیل، عملکرد میوه و کاهش فلورسانس کلروفیل، نسبت (Fv/Fm)، پراکسیداسیون لیپید، نشت الکترولیت، و H_2O_2 شد (ALKahtani et al. 2020). به‌علاوه، در اواخر دهه ۸۰ میلادی مطالعات و بررسی‌های به عمل آمده روشن نمود که مکانیسم‌های مولکولی در زمره مهم‌ترین فرایندهای ژنتیکی (مشمول بر همانندسازی DNA، رونویسی، ترجمه و حتی نحوه تنظیم ژن‌ها) هستند (Mohammadabadi et al. 2021). ماده ژنتیکی یک سلول دارای تعداد زیادی ژن می‌باشد که هیچ‌گاه به طور همزمان بیان

نمی‌شوند و در یک زمان خاص فقط تعداد کمی از آنها بیان شده و پروتئین یا آنزیم مورد نیاز سلول را تولید می‌نمایند (Arabpou et al. 2021). نیاز به بیان ژن توسط محیطی که در آن رشد می‌کند کنترل می‌شود و در صورت عدم نیاز به فرآورده ژن، آن ژن به صورت خاموش و غیرفعال باقی خواهد ماند (Mohammadabadi 2020). ساز و کار بیان ژن اولین بار در باکتری *E.coli* کشف شد (Mohammadabadi et al. 2021). بیان ژن‌های یوکاریوتی تحت کنترل موقت و چندبعدی می‌باشد (Masoudzadeh et al. 2020). تنها یک مجموعه نسبتاً کوچک از تمام ژنوم در هر یک از انواع بافت‌ها بیان می‌شود و نیز بیان ژن‌ها به مرحله نمو بستگی دارد (Mohammadabadi et al. 2018). بنابراین، بیان ژن در یوکاریوت‌ها برای هر بافت اختصاصی است (Shahsavari et al. 2021). همچنین مقدار محصولات ژن که در همان بافت و نیز در سایر بافت‌هایی که آن محصول را می‌سازند، ساخته شده سبب تنظیم بیان آن ژن می‌شود (Mohammadabadi 2020). یکی از اقدامات اساسی مطالعه ژن‌ها و پروتئین‌های مرتبط با صفات اقتصادی و مطالعه آنها در سطح سلولی یا کروموزومی است (Mohammadabadi and Soflari 2020). با توجه به غلظت بالای املاح در بسیاری از خاکها و اثرات مثبت کیتوزان در تعدیل آسپه‌های شوری، آزمایشی بصورت فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی و سه تکرار بر روی گیاهچه‌های کلزا در شرایط کنترل شده انجام گرفت. از طرفی پرولین بعنوان یک اسمولیت مهم سلول‌های گیاهی جهت کنترل اثرات سوئ تنش شوری است که در این تحقیق به بررسی تغییرات میزان آن و نحوه تاثیرپذیری فعالیت آنزیم موثر در بیوسنتز و بیان ژن این آنزیم تحت تاثیر شوری و کیتوزان پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

کشت بذر و تیماردهی: بذر یک رقم هیبرید آلمانی کلزا (*Brassica napus* L.) بنام روهان از شرکت آرمان سبز آدینه اصفهان تهیه شد. بذرها در گلدان‌های حاوی کوکوپیت و پرلیت به نسبت مساوی، کشت و در شرایط کنترل شده نگهداری شدند. با رشد گیاه و رسیدن به مرحله سه برگچه‌ای تیمار دهی به صورت یک روز در میان با محلول کلرید سدیم با غلظت‌های (صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی مولار) و به همراه کیتوزان با غلظت‌های (صفر، ۵ و ۱۰ میلی گرم در لیتر) با سه تکرار آغاز شد. بعد از گذشت ۴ هفته اندام‌های هوایی به منظور ارزیابی بیان ژن، فعالیت آنزیم p5CS و میزان پرولین، جدا شده و مورد بررسی قرار گرفتند. جهت بررسی بیان ژن، گیاهان ۴۸ ساعت پس از آخرین تیمار گیاهان برداشت شدند.

جداسازی RNA و ساخت cDNA: استخراج RNA کل با استفاده از روش لیتیوم کلراید انجام گرفت (Manickavelu et al. 2007).

برای ساخت cDNA از کیت شرکت GeneALL استفاده شد. به داخل هر ویال که حاوی ۱۰ میکرولیتر ماده master mix (مواد تشکیل دهنده کیت) بود هشت میکرولیتر از RNA استخراجی و یک میکرولیتر Olig dT اضافه شد و با آب DEPC به حجم ۲۰ میکرولیتر رسید. ابتدا ۲/۵ μ l RNA، ۰/۵ μ l mix dNTP، ۰/۵ μ l oligo dT، ۰/۵ μ l random hexamer در یک ویال ۰/۲ مخلوط و در دستگاه PCR در دمای ۷۰°C به مدت ۵ دقیقه قرار داده شدند. سپس ویال از دستگاه

خارج شده و به مدت ۲ دقیقه در یخ قرار گرفت. در نهایت به هر ویال $0.5 \mu\text{l}$ آنزیم ریورس ترانسکریپتاز، $5 \mu\text{l}$ بافر $2X$ و $1 \mu\text{l}$ Rnasin 0.5 اضافه شد و ویال در دستگاه قرار داده شد و در دماهای 25°C به مدت ۱۰ دقیقه، 42°C به مدت ۵۰ دقیقه، 80°C به مدت ۱ دقیقه انکوبه انجام شد. تمام cDNA ها در دمای 20°C نگهداری شدند.

Real Time PCR: در این مطالعه از کیت شرکت BioFACTM با دستگاه Real-Time PCR مدل ABI

(Applied Biosystems Real Time Polymerase Chain Reaction) مدل StepOne استفاده شد. مراحل بر اساس دستورالعمل موجود در کیت انجام گرفت. مقادیر (Cycle Threshold Ct) حاصل از نمودارهای تکثیر از نرم افزار gene Rotor به محیط Excel انتقال داده شد و پس از مرتب سازی در محیط Gen Ex، داده ها بر اساس تغییرات بیان ژن Ribosomal 16s RNA و مطابق فرمول زیر (رابطه ۱) محاسبه شد و سپس با استفاده از نرم افزار آماری SPSS مورد مقایسات آماری و رسم نمودار قرار گرفت (Channuntapipat et al. 2003).

$$\Delta\text{Ct} = \text{mCt p5cs} - \text{mCtrRNA} \quad \text{رابطه ۱}$$

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct(a target gene)} - \text{Ct(a reference gene)}$$

ΔCt تفاوت در مقادیر Ct برای ژن مورد نظر و ژن خانه دای برای یک نمونه معین است.

Ct آستانه سیکل در PCR

تهیه عصاره آنزیمی برای سنجش فعالیت آنزیم p5cs و سنجش فعالیت آنزیم p5cs: بافت ها در نیتروژن

مایع کوبیده شدند تا به صورت پودری نرم درآیند. جهت استخراج، 0.25 گرم بافت گیاهی با $1/5$ میلی لیتر بافر تریس - 50HCl میلی مولار با $7/4$ pH که حاوی ترکیبات 0.6 KCl مولار، 7 MgCl₂ میلی مولار، 3 EDTA میلی مولار، 1 DTT میلی مولار و 5 PVP (W/V) درصد می باشد، کوبیده شد. عصاره هموژنیزه شده با کاغذ صافی صاف شد و به مدت 35 دقیقه در دمای چهار درجه سانتی گراد در 30000 سانتریفوژ شد. سپس مایع رویی جمع آوری شد و جهت سنجش آنزیم p5cs استفاده شد (Ruiz et al., 2002). مخلوط واکنش شامل بافر تریس - 50HCl میلی مولار با 7 pH، 20 MgCl₂ میلی مولار، L - گلوتامات 50 میلی مولار، هیدروکسیل آمین هیدروکلراید 100 میلی مولار، ATP ده میلی مولار بود. حجم نهایی محلول واکنش فوق 0.5 میلی لیتر بوده و 0.2 میلی لیتر عصاره آنزیمی به آن اضافه شد. بعد از انکوباسیون به مدت 15 دقیقه در دمای 37 درجه سانتی گراد، واکنش با اضافه کردن یک میلی لیتر بافر شامل $2/5$ گرم FeCl₃ و 6 گرم تری کلرواستیک اسید در حجم نهایی 100 میلی لیتر 5HCl $2/5$ مولار، متوقف شد. رسوب در دمای چهار درجه سانتی گراد به مدت 15 دقیقه با 10000 دور، سانتریفیوژ شده و جذب نوری در 535 نانومتر تعیین شد. مقدار کمپلکس هیدروکسامات ایجاد شده برای کمپلکس Fe^{+3} هیدروکسامات با استفاده از ضریب خاموشی $M^{-1}\text{cm}^{-1}$ 250 محاسبه و برحسب واحد آنزیم در میلی گرم پروتئین گزارش شد (Špoljarevi et al. 2011).

سنجش پرولین: ابتدا 0.1 گرم نمونه گیاهی را با 10 میلی لیتر اسید سولفوسالسیلیک 3% کوبیده سپس صاف کرده و

دو میلی لیتر از عصاره به دست آمده را با دو میلی لیتر معرف نین هیدرین و دو میلی لیتر اسیداستیک گلاسیال مخلوط کرده و به

مدت یک ساعت در حرارت ۱۰۰ درجه در حمام آب گرم (بن ماری) قرار گرفت. پس از سرد شدن حدود چهار میلی لیتر تولوئن اضافه و پس از سانتریفیوژ دو فاز جدا و از فاز آلی صورتی رنگ، جهت تعیین میزان جذب در طول موج ۵۲۰ نانومتر استفاد شد. مقدار پرولین در هر نمونه با استفاده از منحنی استاندارد پرولین بر حسب میکرومول بر گرم محاسبه گردید (Bates et al. 1973).

تجزیه و تحلیل آماری: این طرح بصورت فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی در سه تکرار انجام گردید. آنالیز واریانس

داده ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS22 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. مقایسه میانگین ها با آزمون دانکن انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج مربوط به آنالیز واریانس بیان ژن، فعالیت آنزیم دلتا-۱ پرولین - ۵ کربوکسیلات سنتتاز (P5CS) و میزان پرولین گیاه

کلزا (*Brassica napus L.*) تحت تیمار متقابل تنش شوری و کیتوزان در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱. نتایج تجزیه واریانس صفات مورد ارزیابی در گیاه کلزا تحت تاثیر تیمار توام شوری و کیتوزان

Table 1. Results of analysis of variance of evaluated factors in rapeseed under the influence of combined salinity and chitosan treatment

میانگین مربعات (MS) mean squares				
پرولین Proline	فعالیت آنزیم P5CS Enzyme activity P5CS	بیان ژن P5cs Gene expression P5cs	درجه آزادی Degree of freedom	منابع تغییرات Sources of Variation
۱۲۰/۸۶۹ **	۰/۰۴۹**	5.926 **	۳	تنش شوری Salt stress
۱۳۳/۷۷۳**	۰/۰۵۷**	16.427 **	۲	کیتوزان Chitosan
۱۰۰/۵۹۰**	۰/۰۱۱*	2.333 **	۱۱	تنش شوری x کیتوزان Salt stress x Chitosan
0.36	0.018	0.098	30	خطا Error
13.46	5.63	8.08		ضریب تغییرات (C.V%)

** و * به ترتیب تفاوت معنی دار در سطح ۰/۰۱ و ۰/۰۵ و ns عدم وجود تفاوت معنی دار را نشان می دهد. ***, *, ns, Significant at $P \leq 0.01$, significant at $P \leq 0.05$, non-significant respectively.

تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۱) نشان داد که اثر شوری، کیتوزان و اثر متقابل شوری و کیتوزان بر میزان بیان ژن P5CS

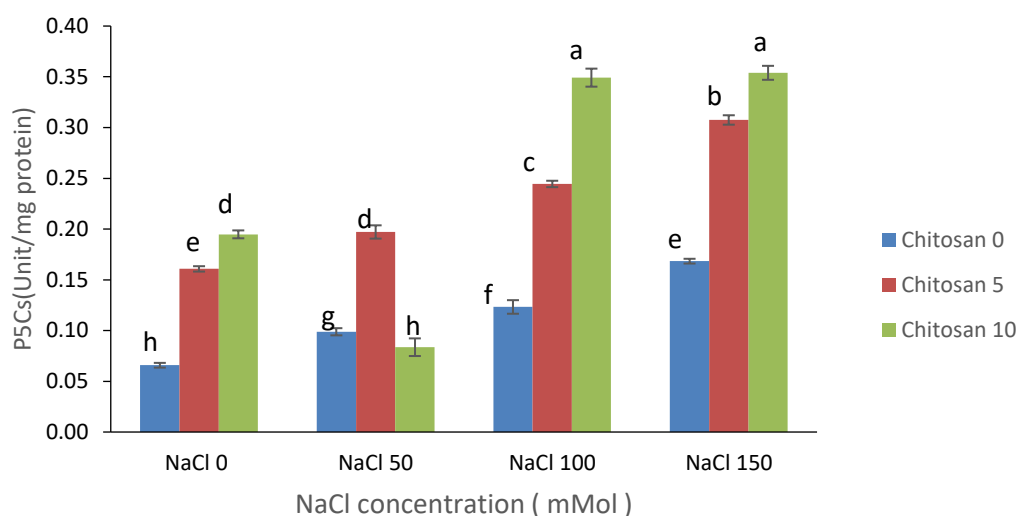
و میزان پرولین از نظر آماری در سطح یک درصد معنی دار بوده است. همچنین تاثیر تیمار شوری و کیتوزان در سطح یک درصد و

اثر متقابل آنها در سطح پنج درصد بر فعالیت آنزیم معنی دار بود. در این پژوهش شوری و کیتوزان میزان بیان ژن و فعالیت آنزیم

دلتا-۱ پرولین - ۵ کربوکسیلات سنتتاز (P5CS) و محتوای پرولین را افزایش داده است. بر اساس جدول آنالیز واریانس داده‌ها

(۱) میزان فعالیت آنزیم دلتا-۱ پرولین - ۵ کربوکسیلات سنتتاز (P5CS) تحت تنش شوری و کیتوزان در سطح ۱ درصد (۰/۰۱)

($p < 0.05$) و در تیمار توام شوری و کیتوزان در سطح ۵ درصد معنی دار بوده است (شکل ۱) مقایسه میزان فعالیت آنزیم دلتا-۱ پرولین-۵ کربوکسیلات سنتتاز (P5CS) در گیاه کلزا تحت تنش شوری و کیتوزان را نشان داده است. در تنش شوری با افزایش غلظت شوری فعالیت آنزیم در مقایسه با شاهد افزایش داشته است. استفاده از کیتوزان در هر دو غلظت ۱۰ و ۵ میلی گرم در لیتر باعث افزایش میزان فعالیت آنزیم دلتا-۱ پرولین - ۵ کربوکسیلات سنتتاز (P5CS) شده است. تیمار توام شوری و کیتوزان باعث افزایش فعالیت این آنزیم شده است. بیشترین فعالیت مربوط به غلظت ۱۰ میلی گرم در لیتر کیتوزان همراه با شوری ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی مولار است. در شوری ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی مولار همراه با کیتوزان، نسبت به شوری هم غلظت روند صعودی فعالیت آنزیم دیده شد.



شکل ۱. مقایسه برهمکنش غلظت‌های صفر ۵، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی مولار شوری همراه با غلظت‌های صفر ۵ و ۱۰ میلی گرم در لیتر کیتوزان بر روی فعالیت آنزیم دلتا-۱ پرولین - ۵ کربوکسیلات سنتتاز (P5CS) گیاه کلزا در مقایسه با شاهد. داده میانگین سه تکرار \pm خطای استاندارد می باشد. میانگین‌های دارای حروف مشابه از نظر آماری اختلاف معنی دار ندارند

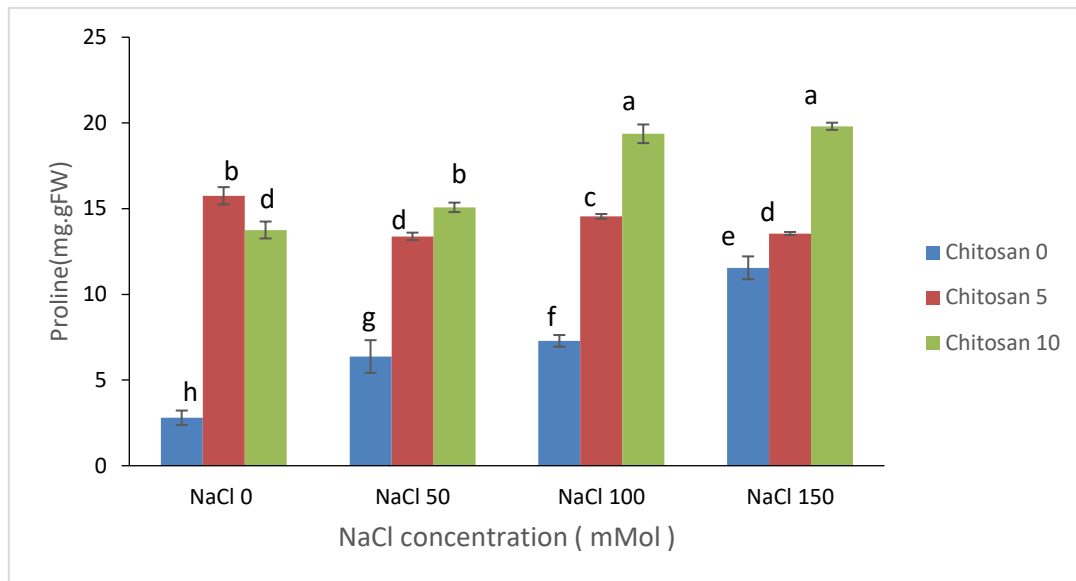
Figure 1. Comparison of the interaction of 50, 100 and 150 mM salinity concentrations with concentrations of 5 and 10 mg/L chitosan on the activity of delta-1 proline-5 carboxylate synthetase (P5CS) in rapeseed compared to control. The data are the mean of three replications \pm standard deviation. Averages with similar letters are not statistically significant

بررسی‌ها نشان داد که شوری باعث افزایش میزان پرولین در لوبیا چشم بلبلی (Pated and Krishnamurthy 2013)

و کلزا (Baghi zade et al. 2014) شده که علت آن به افزایش فعالیت آنزیم دلتا-۱ پرولین - ۵ کربوکسیلات سنتتاز (P5CS) نسبت داده شده است. نتایج بررسی که Wang et al. (2015) بر روی تجمع پرولین و بیان ژن‌های مهم در سنتز پرولین (از جمله *KvProT*، *KvPDH*، *KvOAT*، *KvP5CS1*) بر روی گیاهچه *Kosteletzkya virginica* تحت تنش شوری انجام دادند، حاکی از آن بود که میزان پرولین با افزایش غلظت شوری در گیاهچه افزایش یافته و بررسی بیان ژن‌ها نشان داد که بیشترین

ژن‌هایی که در تنش شوری بیان می‌شوند ژن‌های *KvP5CS1* و *KvProT* هستند. ژن *KvOAT* با افزایش غلظت شوری و افزایش مدت قرار گرفتن در تنش شوری افزایش یافته، بنابراین به این نتیجه رسیدند که مهم‌ترین ژن دخیل در سازگاری شوری *KvP5CS1* است. فعالیت آنزیم *KvP5CS1* دارای یک مسیر تنظیم کننده وابسته به ABA بوده و به سیگنال‌های حاصل از H_2O_2 حساس است (Alqurashi et al. 2017). افزایش محتوای پرولین در طی تنش شوری تحت تاثیر مسیر پیام رسانی ABA و H_2O_2 تنظیم می‌گردد (Rejeb et al. 2014). نتایج Yang et al. (2009) نشان داد که در جوانه‌های ذرت تحت تیمار با پراکسید هیدروژن خارجی، تجمع پرولین، بیان ژن *P5CS* و فعالیت بالای آنزیم ۱-پیرولین-۵-کربوکسیل سینتاز مشاهده شده است. این تجمع ممکن است نتیجه ترکیبی از افزایش فعالیت آنزیم *P5CS* و کاهش فعالیت آنزیم ProDH باشد. در پژوهشی فعالیت آنزیم *P5CS* در گیاه *Arabidopsis thaliana* تحت شرایط تنش شوری افزایش یافته است (Her et al. 2001). بررسی خصوصیات فیزیولوژیکی و مولکولی گل داوودی (*Chrysanthemum*) در استرس آبی تحت تیمار روبینین و کیتوزان نشان داد که میزان پرولین و سطوح بیان ژن پیرولین-۵-کربوکسیلات، ۵-پیرولین-کربوکسیلات ردوکتاز و پرولین دهیدروژناز در گیاهان تیمار شده با روبینین و کیتوزان افزایش یافته است (Elansary et al. 2020).

بر اساس نتایج آنالیز واریانس (جدول ۱) اختلاف داده‌ها نشان می‌دهد که اثر شوری و کیتوزان و تیمار توام بر روی میزان محتوای پرولین در سطح ۱ درصد معنی دار است ($p < 0/01$). با توجه به شکل (۲) با افزایش غلظت شوری میزان پرولین روند افزایشی داشته و در غلظت ۱۵۰ میلی‌مولار بیشترین میزان مشاهده شد. استفاده از کیتوزان بر روی گیاه کلزا باعث افزایش میزان پرولین شده که بیشترین افزایش مربوط به غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر بود. در تیمار توام در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر همراه با شوری ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار بیشترین میزان پرولین مشاهده شده است. اسیدآمینو پرولین توسط ارگانیک‌های مختلف برای جبران عدم تعادل سلولی ناشی از استرس محیط سنتز می‌شود. پرولین در گیاهان تحت تنش شوری، بعنوان یک اسمولیت عمل کرده و باعث عدم جذب یون‌های سمی، تنظیم فشار اسمزی و ایجاد مقاومت در برابر تنش می‌شود (Chun et al. 2018). محتوای پرولین در واقع به عنوان یک شاخص تحمل به تنش شوری به حساب می‌آید. پرولین جهت مقاومت در برابر تنش شوری در گیاهان تحت تنش شوری بر اثر افزایش بیان $\Delta 1$ -پیرولین-۵-کربوکسیلات سنتز می‌شود (Goharrizi et al. 2020) که منجر به کاهش پتانسیل اسمزی سلول‌های گیاهی، تسهیل جذب آب شده و از طرفی مولکول‌های اکسیژن فعال (ROS) را از بین می‌برد (Qureshi et al. 2014; Pottosin et al. 2013). پرولین علاوه بر نقش خود به عنوان اسمولیت، می‌تواند از آنزیم‌ها محافظت کرده و در شرایط مختلف ثبات غشا را افزایش دهد. همچنین ممکن است در سم‌زدایی غیرآنزیمی رادیکال‌های آزاد کمک کند (Sharma et al. 2019).

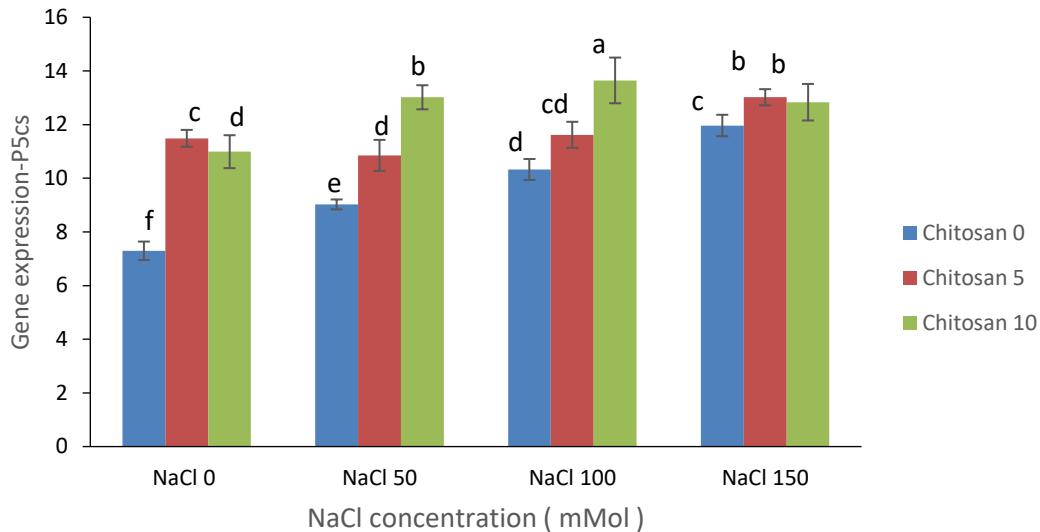


شکل ۲. مقایسه برهمکنش‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی مولار شوری همراه با غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی گرم در لیتر کیتوزان بر روی میزان پرولین گیاه کلزا در مقایسه با شاهد. داده میانگین سه تکرار \pm انحراف معیار می باشد. میانگین‌های دارای حروف مشابه از نظر آماری اختلافی ندارند

Figure 2. Comparison of the interaction of 50, 100 and 150 mM salinity concentrations with 5 and 10 mg/L chitosan concentrations on rapeseed proline content compared to control. The data are the mean of three replications \pm standard deviation. Averages with similar letters are not statistically different.

بررسی‌های Filippou et al. (2014) نشان داد که در گیاه *Ailanthus altissima* هنگام قرار گرفتن در تنش خشکی و شوری فعالیت آنزیم P5CS و تجمع پرولین آزاد افزایش یافته است. در پژوهش حاضر، نتایج حاصل از بررسی تأثیر شوری و کیتوزان بر بیان ژن P5CS و افزایش پرولین در گیاه کلزا نشان می‌دهد که عملکرد این ژن مشابه ژنهای سنتز کننده بتائین گلايسين، قندهای تری هالوزها، ژنهای دخیل در هموسازی یونها، ژن های سنتز کننده پلی اولها در گیاهان تراریخته آرابیدو پسیس، کلزا، توتون و سیب زمینی است که مقاومت به تنش را افزایش می‌دهند (Yamchi et al. 2005). بررسی تأثیر کیتوزان بر روی نهال‌های خیار تحت تنش سرمایی نشان داد که کیتوزان باعث افزایش پرولین و مقاومت گیاه به تنش شده است (Xue et al. 2004). همچنین نتایج Guan et al. (2009) نشان داد کیتوزان بر روی گیاه ذرت تحت تنش سرمایی میزان پرولین را افزایش داده و باعث مقاومت گیاه ذرت شده است. افزایش میزان پرولین در استفاده از کیتوزان بر گیاه سویا (*max Glycine L*) تحت تنش شوری گزارش شده است (Mansouri gandomany et al. 2017). افزایش میزان پرولین در تیمار توام شوری همراه با کیتوزان بر روی گیاه نخود نیز گزارش شده است (Mahdavi and safari 2015). تأثیر کیتوزان بر گیاه آویشن دناپی (*Thymus daenensis Celak*) تحت تنش خشکی توسط Bistgani et al. (2017) بررسی شد. تیمار متقابل شوری و کیتوزان میزان پرولین در این گیاه را افزایش داد که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد. با توجه به شکل (۳) با افزایش غلظت شوری، میزان بیان ژن آنزیم دلتا-۱ پرولین - ۵ کربوکسیلات سنتتاز (P5CS) افزایش یافته است. شوری همراه با کیتوزان

بر روی بیان ژن آنزیم دلتا-۱ پرولین - ۵ کربوکسیلات سنتتاز (*P5CS*) در سطح ۱ درصد تاثیر معنی‌دار داشت ($p < 0.01$). در غلظت های ۱۰ میلی گرم در لیتر کیتوزان همراه با شوری ۱۰۰ میلی مولار بیشترین افزایش مشاهده شده است. در مقایسه تیمارهای توام با تیمارهای شوری هم غلظت، مشاهده شد که استفاده از کیتوزان همراه شوری باعث افزایش بیان ژن شده است.



شکل ۳. مقایسه برهمکنش غلظت‌های صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار شوری همراه با غلظت های صفر، ۵ و ۱۰ میلی گرم در لیتر کیتوزان بر روی بیان ژن آنزیم دلتا-۱ پرولین - ۵ کربوکسیلات سنتتاز (*P5CS*) گیاه کلزا در مقایسه با شاهد. داده میانگین سه تکرار \pm خطای استاندارد می باشد. میانگین های دارای حروف مشابه از نظر آماری اختلاف معنی دار ندارند

Figure 3. Comparison of the interaction of 50, 100 and 150 mM salinity concentrations with concentrations of 5 and 10 mg/L chitosan on the expression of delta-1 proline-5 carboxylate synthetase (*P5CS*) gene in rapeseed compared to control. The data are the mean of three replications \pm standard deviation. Averages with similar letters are not statistically significant

گیاهان برای مقابله با اثرات منفی تنش، تجمع پرولین را افزایش می‌دهند. در سنتز پرولین یک ژن مهم و کلیدی به نام دلتا-۱ پرولین - ۵ کربوکسیلات سنتتاز (*P5CS*) وجود دارد که آنزیمی به همین نام را سنتز می‌کند. بیان این ژن تحت شرایط تنش‌زا مانند تنش شوری تغییر می‌کند (Lehmann et al. 2010). بیوسنتز پرولین از طریق مسیر گلوتامات، توسط فعالیت آنزیم *P5CS* رمزگذاری شده توسط دو ژن مجزای *P5CS1* و *P5CS2* کنترل می‌شود (Kubala et al. 2015). با توجه به اینکه *P5CS* نقش مهمی در سنتز پرولین دارد، در گونه‌های مختلف تلاش‌های زیادی برای دستکاری این ژن انجام شده تا گیاهانی بدست آورند که بتوانند در مناطق شور رشد کنند. به این ترتیب، مطالعه ژن‌های درگیر در بیوسنتز پرولین گونه‌هایی که به طور طبیعی در محیط‌های تحت تنش زندگی می‌کنند، می‌تواند اطلاعات ارزشمندی درباره مکانیسم‌های سازگاری گیاه فراهم کند (Verbruggen and Hermans 2008). سطح بیان ژن آنزیم *P5CS* در گیاه *Arabidopsis thaliana* تحت شرایط تنش

شوری افزایش یافته است (Hare et al. 2003). افزایش سطح بیان ژن باعث افزایش فعالیت آنزیم شده و به دنبال آن میزان پرولین تولید شده بیشتر از گیاه شاهد است که باعث تحمل بیشتر به تنش شوری می‌گردد. همچنین در پژوهش Razavizadeh و Ehsanpour (۲۰۰۹) افزایش بیان ژن دلتا-۱ پرولین - ۵ کربوکسیلات سنتتاز (P5CS) در گیاه توتون تراریخته تحت تنش شوری مشاهده شد. در تنش شوری میزان بیان ژن دلتا-۱ پرولین - ۵ کربوکسیلات سنتتاز در گیاه بونجه تحت تنش شوری افزایش یافته است (Arab and Ehsanpour 2013). احتمالاً افزایش بیان این ژن باعث مقاومت گیاه کلزا در شرایط شوری شده است. جدول ۲ نشان دهنده همبستگی بیان ژن، فعالیت آنزیم و میزان پرولین سنتز شده است. بر اساس این جدول، همبستگی مثبتی بین آنها دیده می‌شود. افزایش بیان ژن باعث تولید و فعالیت آنزیم شده که در نهایت منجر به افزایش تجمع پرولین خواهد شد.

جدول ۲. همبستگی بین بیان ژن و فعالیت دلتا-۱ پرولین - ۵ کربوکسیلات سنتتاز (P5CS) توام شوری و کیتوزان

Table 2. Correlation between gene expression and activity of delta-1 proline-5-carboxylate synthetase (P5CS) combined with salinity and chitosan

پرولین Proline	فعالیت آنزیم P5CS Enzyme activity P5CS	بیان ژن آنزیم P5CS Gene expression P5CS	
0.503 **	0.626 **	1	بیان ژن آنزیم P5CS Gene expression P5CS
0.632 **	1	0.626 **	فعالیت آنزیم P5CS Enzyme activity P5CS
1	0.632 **	0.503 **	پرولین Proline

بر اساس جدول ۲، همبستگی مستقیم بین فعالیت آنزیم، میزان پرولین و بیان ژن وجود دارد. افزایش تجمع پرولین در حین تنش شوری می‌تواند به دلیل تحریک سنتز آن از اسیدگلوتامیک، کاهش صادرات آن از طریق آوند آبکش و جلوگیری از اکسیداسیون آن در طول تنش باشد. در شرایط تنش کیتوزان با افزایش میزان پرولین با تنظیم اسمزی سلول باعث کاهش اثرات زیانبار شوری شود از طرفی تجمع پرولین امکان دارد نتیجه افزایش متابولیسم نیتروژن در اثر شوری نیز باشد (Zhang et al. 2021). کیتوزان می‌تواند مستقیماً به قندها و پیرووات تبدیل شود که پیش ساز چرخه اسیدتری کربوکسیلیک و بیوسنتز گلوتامات و سایر اسیدهای آمینه از جمله پرولین است (Geng et al. 2020). از دلایل دیگر افزایش پرولین به دلیل کاربرد کیتوزان ممکن است مربوط به کاهش اکسیداسیون پرولین به گلوتامات، القای بیوسنتز پرولین، کاهش بیوسنتز پروتئین و یا افزایش بازچرخش پروتئین باشد (Hidangmayum et al. 2019). از نظر ژنتیکی، تحریک تجمع پرولین ناشی از کاربرد کیتوزان، می‌تواند نتیجه تنظیم بالادست ژنهای بیوسنتز پرولین مانند گلوتامیل کیناز و گلوتامات-۵-سمی آلدئید دهیدروژناز باشد که منجر به سنتز پرولین از گلوتامات می‌شود (Ali et al. 2021). کیتوزان می‌تواند تعدادی از گیرنده های سلولی (receptor-like kinase gene, MAP kinase)

(pathway, lysine motif receptor-like kinase, chitin elicitor receptor kinase 1 (CERK1) را القا کرده تا بتوانند به کتین و کیتوزان متصل شوند. پس از علامت دهی القا شده با کیتوزان که توسط گیرنده های خاص سلولی دریافت می شوند، پیامبرهای ثانویه مانند گونه های اکسیژن فعال، یون کلسیم، آب اکسیژنه، اکسید نیتریک و هورمونهای گیاهی، پیام را در سلول منتقل کرده و پاسخهای فیزیولوژیکی القا می شود. اثر مهاری رادیکالهای آزاد مانند آنیون سوپراکسید و رادیکالهای آزاد لیپیدی نیز گزارش شده است. کیتوزان القا کننده تجمع جاسمونیک اسید در برنج و باقلا نیز است. کیتوزان باعث فعال شدن جاسمونیک اسید و اتیلین شده که نقش علامت دهی برای ایجاد مقاومت در گیاه دارد. فعال سازی رونویسی ژن کد کننده فیل آلانین آمونیاکاز و مهار کننده های پروتئاز توسط کیتوزان القا می شود. همچنین کیتوزان بر روی سنتز اید آبسزیک و جاسمونیک اسید تاثیر می گذارد (Hidangmayum et al. 2019). به نظر می رسد کیتوزان با افزایش میزان پرولین اثرات منفی تنش شوری بر روی این گیاه را کاهش داده و منجر به ایجاد مقاومت به شوری شده است. با توجه به نتایج می توان بیان کرد که کیتوزان با افزایش بیان ژن و فعالیت آنزیم دلتا-۱ پرولین - ۵ کربوکسیلات سنتتاز (P5CS)، پرولین و اسید آمینه آزاد باعث افزایش مقاومت گیاه به تنش می گردد.

نتیجه گیری: تجمع پرولین در گیاه کلزا جهت ایجاد مقاومت به شوری محیط، تحت تاثیر فعالیت آنزیم دلتا-۱ پرولین - ۵ کربوکسیلات سنتتاز است. شوری باعث افزایش بیان ژن مربوط به سنتز این آنزیم شده که در نتیجه با تولید آنزیم، پرولین تولید و انباشته می گردد. استفاده از کیتوزان در محیط شور با تاثیر بر بیان این ژن باعث تولید آنزیم دلتا-۱ پرولین - ۵ کربوکسیلات سنتتاز شده و با افزایش میزان پرولین در گیاه، باعث مقاومت آن شده است.

سپاسگزاری: از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان به خاطر حمایت معنوی / همکاری در اجرای پژوهش حاضر سپاسگزاری می شود. از داوران محترم به خاطر ارائه نظرهای ساختاری و علمی سپاسگزاری می شود.

منابع

- عرب پور رق آبادی زهرا، محمدآبادی محمدرضا، خضری امین (۱۴۰۰) الگوی بیانی ژن p32 در بافت های ران، دست، راسته و چربی پشت بره کرمانی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، ۱۳(۴)، ۱۸۳-۲۰۰.
- محمدآبادی محمدرضا (۱۳۹۹) بیان ژن ESR1 در بز کرکی رابینی با استفاده از real time PCR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۱۲(۱)، ۱۹۲-۱۷۷.
- محمدآبادی محمدرضا (۱۳۹۹) پروفایل بیانی mRNA مختص بافت ژن ESR2 در بز. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۱۲(۴)، ۱۸۴-۱۶۹.

- محمدآبادی محمدرضا، سفلی محمد (۱۳۹۹). پروفایل بیانی mRNA مختص بافت ژن BMP15 در بز. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۲(۳)، ۲۰۸-۱۹۱.
- محمدآبادی محمدرضا، شبان جرجندی دیانا، عرب پور رق آبادی زهرا، ابارقی فاطمه، ساسان حسینعلی، بردبار فرهاد (۱۴۰۱) نقش رازیانه بر بیان ژن DLK1 در بافت قلب گوسفند. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، ۱۴(۲)، ۱۵۵-۱۳۳.
- محمدآبادی محمدرضا، کرد محبوبه، نظری محمود (۱۳۹۷) مطالعه بیان ژن لپتین در بافت‌های مختلف گوسفند کرمانی با استفاده از real time PCR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۰(۳)، ۱۲۲-۱۱۱.
- منصوری گندمانی، امید ح، رضایی چرمهینی مر (۱۳۹۵) بررسی کاربرد کیتوزان بر جوانه زنی سویا (*Glycine max L.*) در شرایط تنش شوری. مجله پژوهش‌های بذر ایران. ۳(۲): ۱۷۸-۱۷۱.
- مهدوی ب، صفری ح. (۱۳۹۴) اثر کیتوزان بر رشد و برخی ویژگی‌های فیزیولوژیک نخود در شرایط تنش شوری. فرآیند و کارکرد گیاهی. ۴(۱۲): ۱۲۷-۱۱۷.
- مهدوی ب، مدرس ثانوی س ع م، آقا علیخانی م، شریفی م (۱۳۹۲) اثر غلظت‌های مختلف کیتوزان بر جوانه زنی بذر و آنزیم‌های آنتی اکسیدانت گلرنگ (*Carthamus tinctorius L.*) در شرایط تنش کم آبی. مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست شناسی ایران). ۲۶(۲): ۳۶۵-۳۵۲.
- یامچی ا، رستگار جزی ف، قبادی س، موسوی ا، کارخانه ای ع ا (۱۳۸۳) بیان فراوان ژن Δ -پرولین -۵-کربوکسیلات سنتتاز (p5CS)، با هدف افزایش مقاومت به تنش‌های اسموتیک در گیاه تراریخت توتون (*Nicotiana tabacum cv. Xanthi*). علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی ۸(۴): ۳۹-۳۱.

References

- Ali FF, EL-Shehawi AM, Ibrahim OHM, Abdul-Hafeez EY, Moussa MM, Hassan FAS (2021) A vital role of chitosan nanoparticles in improvisation the drought stress tolerance in *Catharanthus roseus* (L.) through biochemical and gene expression modulation. *Plant Physiol Biochem* 161: 166- 175.
- Alkahtani MDF, Attia KA, Hafez YM, Khan N (2020) Chlorophyll fluorescence parameters and antioxidant defense system can display salt tolerance of salt acclimated sweet pepper plants treated with chitosan and plant growth promoting rhizobacteria. *Agronomy* 10(8), 1180.
- Alqurashi M, Thomas L, Gehring C, Marondedze C (2017) A microsomal proteomics view of H₂O₂- and ABA-dependent responses. *Proteomics* 5(3), 22.
- Arab L, Ehsanpour AA (2013) Improvement of some physiological responses of alfalfa (*Medicago sativa L.*) under in vitro salt stress using triadimefon. *Prog Biophys Mol (PBS)* 3(1), 31-40.

- Arabpour Z, Mohammadabadi M, Khezri A (2021) The expression pattern of p32 gene in femur, humeral muscle, back muscle and back fat tissues of Kermani lambs. *Agric Biotechnol J* 13 (4), 183-200 (In Persian). Amirjani MR (2011) Effect of salinity stress on growth, sugar content, pigments and enzyme activity of *rice*. *Int J Biol Sci (IJBS)* 7(1), 73–81.
- Baghi zadeh A, Salarizadeh MR, Abaasi F (2014) Effects of salicylic acid on some physiological and biochemical parameters of *Brassica napus* L.(Canola) under salt stress. *Int J Agric Sci (IARAS)* 4(2):, 147-52.
- Bates LS, Waldren RP, Teare ID (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and soil* 39(1), 205-7.
- Bistgani ZE, Siadat SA, Bakhshandeh A et al. (2017) Interactive effects of drought stress and chitosan application on physiological characteristics and essential oil yield of *Thymus daenensis* Celak. *Crop J* 5(5), 407-15.
- Channuntapipat C, Wirthensohn M, Ramesh SA et al. (2003) Identification of incompatibility genotypes in almond (*Prunus dulcis* Mill.) using specific primers based on the introns of the S-alleles. *Plant Breed* 122(2), 164-8.
- Chun SC, Paramasivan M, Chandrasekaran M (2018) Proline accumulation influenced by osmotic stress in arbuscular mycorrhizal symbiotic plants. *Front Microbiol* 56,1221.
- Durgaprasad KM., Muthukumarsamy M, Panneerselvam R (1996) Changes in protein metabolism induced by NaCl salinity in soybean seedlings. *Indian J Plant Physiol* 1, 98-101.
- Elansary HO, Abdel-Hamid AM, Yessoufou K et al. (2020) Physiological and molecular characterization of water-stressed *Chrysanthemum* under robinin and chitosan treatment. *Acta Physiol Plant* 42(3), 1-4.
- Filippou P, Bouchagier P, Skotti E, Fotopoulos V (2014) Proline and reactive oxygen/nitrogen species metabolism is involved in the tolerant response of the invasive plant species *Ailanthus altissima* to drought and salinity. *Environ Exp Bot* 97, 1-0.
- Geng W, Li Z, Hassan MJ, Peng Y (2020) Chitosan regulates metabolic balance, polyamine accumulation, and Na⁺ transport contributing to salt tolerance in *creeping bentgrass*. *BMC Plant Biol.* 20, 506. doi.org/10.1186/s12870-020-02720-w.
- Guan YJ, Hu J, Wang XJ, Shao CX (2009) Seed priming with chitosan improves maize germination and seedling growth in relation to physiological changes under low temperature stress. *J Zhejiang Univ Sci* 10(6), 427-33.
- Gunstone FD (2004) Rapeseed and canola oil: production, processing, properties and uses. Blackwell Publishing Ltd. 222 pp.

- Goharrizi, KJ, Baghizadeh A, Afroushteh M et al. (2020) Effects of salinity stress on proline content and expression of Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthase and vacuolar-type H⁺ subunit E genes in wheat. *Plant Genet Resour* 18(5), 334-342.
- Hare PD, Cress WA, Van Staden J (2003) A regulatory role for proline metabolism in stimulating *Arabidopsis thaliana* seed germination. *Plant Growth Regul* 39(1), 41-50.
- Hare PD, Cress WA, Van Staden J (2001) The effects of exogenous proline and proline analogues on in vitro shoot organogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Growth Regul* 34, 203–207.
- Hidangmayum A, Dwivedi P, Katiyar D, Hemantaranjan A (2019) Application of chitosan on plant responses with special reference to abiotic stress. *Physiol Mol Biol Plants* 25, 313-326.
- Jimenez-Gomez CP, Cecilia JA (2020) Chitosan: A natural biopolymer with a wide and varied range of applications. *Molecules* 25(17), 3981.
- Khan NA, Ansari HR, Khan M, Mir R (2002) Effect of phytohormones on growth and yield of Indian mustard. *Indian J Plant Physiol* 7(1), 75-78.
- Kenawy ER, Worley SD, Broughton R (2007) The chemistry and applications of antimicrobial polymers: a state-of-the-art review. *Biomacromolecules* 8(5), 1359-1384.
- Kubala S, Garneczarska M, Wojtyła Ł et al. (2015) Deciphering priming-induced improvement of rapeseed (*Brassica napus* L.) germination through an integrated transcriptomic and proteomic approach. *Plant Sci* 231, 94-113.
- Lehmann S, Funck D, Szabados L, Rentsch D (2010) Proline metabolism and transport in plant development. *Amino Acids* 39(4), 949-962.
- Mahdavi B, Modares Sanavi SAM, Agha Alikhani M, Sharifi M (2013) Effect of chitosan on safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seed germination and antioxidant enzymes activity under water stress *Iranian J Plant Biol IJPB* 26(3), 352- 365 (In Persian).
- Mahdavi B, safari H (2015) Effect of chitosan on growth and some physiological characteristics of Chickpea under salinity stress condition. *J Plant proc Func* 4 (12), 117-127 (In Persian).
- Mansouri gandomany V, Omidi H, Rezaei Charmahin M (2017) Application of chitosan on soybean (*Glycine max*) seed germination under salt stress. *Iranian J Seed Res* 3(2), 171-178 (In Persian).
- Misra N, Saxena P (2009) Effect of salicylic acid on proline metabolism in lentil grown under salinity stress. *Plant Sci* 177(3),181-9.
- Mohammadabadi MR, Shaban Jorjandy D, Arabpoor Raghavadi Z, Abareghi F, Sasan HA, Bordbar F (2022) The role of fennel on DLK1 gene expression in sheep heart tissue. *Agric Biotechnol J* 14 (2), 155-170.

- Masoudzadeh SH, Mohammadabadi M, Khezri A, et al. (2020) Effects of diets with different levels of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed powder on DLK1 gene expression in brain, adipose tissue, femur muscle and rumen of Kermani lambs. *Small Rumin Res* 193, e106276.
- Mohammadabadi M (2021) Tissue-specific mRNA expression profile of ESR2 gene in goat. *Agric Biotechnol J* 12 (4), 167-181 (In Persian).
- Mohammadabadi M, Masoudzadeh SH, Khezri A, et al. (2021) Fennel (*Foeniculum vulgare*) seed powder increases Delta-Like Non-Canonical Notch Ligand 1 gene expression in testis, liver, and humeral muscle tissues of growing lambs. *Heliyon* 7 (12), e08542.
- Mohammadabadi M, Soflaei M (2020) Tissue-specific mRNA expression profile of BMP15 gene in goat. *Agric Biotechnol J* 12, 191-208 (In Persian).
- Mohammadabadi MR (2020) Expression of ESR1 gene in Raini Cashmere goat using Real Time PCR. *Agric Biotechnol J* 12 (1), 177-192 (In Persian).
- Mohammadabadi MR, Kord M, Nazari M (2018) Studying expression of leptin gene in different tissues of Kermani Sheep using Real Time PCR. *Agric Biotechnol J* 10, 111-122 (In Persian).
- Munns R (2002) Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ.* 25(2), 239-50.
- Orcutt DM, Nilsen ET (2000) The physiology of plants under stress, soil and biotic factors. John Wiley and Sons, New York. 177-235.
- Parihar P, Singh S, Singh R, Singh VP, Prasad SM (2015) Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: a review. *Environ Sci Pollut Res* 22(6), 4056-4075.
- Patel H, Krishnamurthy R (2013) Elicitors in plant tissue culture. *J pharmacogn phytochem* 2(2), 60-5.
- Pérez-Arellano I, Carmona-Álvarez F, Martínez AI, et al. (2010) Pyrroline-5-carboxylate synthase and proline biosynthesis: From osmo tolerance to rare metabolic disease. *Protein Sci* 19(3), 372-382.
- Pottosin I, Velarde-Buendía A.M, Bos, J, et al. (2014) Cross-talk between reactive oxygen species and polyamines in regulation of ion transport across the plasma membrane: implications for plant adaptive responses. *J Exp Bot* 65(5), 1271-1283.
- Rejeb KB, Abdelly C, Savouré A (2014). How reactive oxygen species and proline face stress together. *Plant Physiol Biochem* 80, 278-284.

- Qureshi MI, Abdin MZ, Ahmad J, Iqbal M (2013) Effect of long-term salinity on cellular antioxidants, compatible solute and fatty acid profile of sweet annie (*Artemisia annua* L.). *Phytochemistry* 95, 215-223.
- Razavizadeh R, Ehsanpour A (2009) Effects of salt stress on proline content, expression of delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase, and activities of catalase and ascorbate peroxidase in transgenic tobacco plants. *Biol Lett* 46(2), 63-75.
- Silva-Ortega CO, Ochoa-Alfaro AE, Reyes-Agüero JA, et al. (2008) Salt stress increases the expression of p5cs gene and induces proline accumulation in cactus pear. *Plant Physiol Biochem* 46(1)m 82-92.
- Saleh L, Plieth C (2013) A9C sensitive Cl⁻-accumulation in *A. Thaliana* root cells during salt stress is controlled by internal and external calcium. *Plant Signal Behav* 28(6), e24259.
- Sharma A, Shahzad B, Kumar V, Kaur Kohli S (2019) Phytohormones Regulate Accumulation of Osmolytes Under Abiotic Stress *Biomolecules* 9(7), 285.
- Shahsavari M, Mohammadabadi M, Khezri A, et al. (2021) Correlation between insulin-like growth factor 1 gene expression and fennel (*Foeniculum vulgare*) seed powder consumption in muscle of sheep. *Anim Biotechnol* 33, 1-11
- Soleimani V, Ahmadi J, Golkari S, Sadeghzadeh B (2015) Expression profiling of PAP3, BZIP, and P5CS genes in soybean under drought stress conditions. *Turk J Botany*. 39(6), 952-961.
- Špoljarević M, Agić D, Lisjak M, Gumze A et al. (2011) The relationship of proline content and metabolism on the productivity of maize plants. *Plant Signal Behav*.6(2), 251-257.
- Tajik H, Moradi M, Rohani SM, Erfani AM et al. (2008) Preparation of chitosan from brine shrimp (*Artemia urmiana*) cyst shells and effects of different chemical processing sequences on the physicochemical and functional properties of the product. *Molecules* 13(6):1263-74.
- Verbruggen N, Hermans C (2008) Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids* 35(4), 753-759.
- Wang H, Tang X, Wang H, Shao HB (2015) Proline accumulation and metabolism-related genes expression profiles in *Kosteletzkya virginica* seedlings under salt stress. *Front Plant Sci* 6(792): 1-9.
- Xue GX, Gao HY, Li PM, Zou Q (2004) Effects of chitosan treatment on physiological and biochemical characteristics in cucumber seedlings under low temperature. *Physiol Mol Biol Plants* 30(4), 441-448.
- Yamchi A, Rastgar Jazii F, Ghobadi C, Mousavi A, et al. (2005) Increasing of tolerance to osmotic stresses in tobacco *Nicotiana tabacum* cv. xanthi through overexpression of *p5cs* Gene. *J Crop Pro Fun* 2005 8 (4): 31-40 (In Persian).

- Zayed MA, Elkafafi SH, Zedan MG, SherifaFM (2017) Effect of nano chitosan on growth, physiological and biochemical parameters of *Phaseolus vulgaris* under salt stress. J plant Prod 8 (5): 577 – 585.
- 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, 342. doi.org/10.3390/horticulturae7100342
- Zheng JL, Zhao LY, Shen B, Jiang LH et al. (2016) Effects of salinity on activity and expression of enzymes involved in ionic, osmotic, and antioxidant responses in *Eurya emarginata*. Acta Physiol Plant 38(3), 70.