Autumn (2023) 13(43): 43-53.
DOI: 10.30473/cb.2023.69814.1934
Received: 27, Aug. 2023 Accepted: 12, Dec. 2023

Crop Biotechnology *Open Access*

ORIGINAL ARTICLE

Investigating some antioxidant enzymes activity and changing the expression of some defense chitinase genes of potato (*Solanum tuberosum* L.) after inoculation with chitin

Maryam Faramarzi Jafarbeiglou[1], Farhad Nazarian-Firouzabadi[1*], Seyed Sajad Sohrabi[1], Ali Moghadam[2]

[1]Department of Production Engineering and Plant Genetics, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran.
[2]Institute of biotechnology, Shiraz University, Iran

Correspondence
Farhad Nazarian-Firouzabadi
Email: nazarian.f@lu.ac.ir

How to cite
Faramarzi Jafarbeiglou, M., Nazarian-Firouzabadi, F., Sohrabi, S. S., & Moghadam, A. (2023). Investigating some antioxidant enzymes activity and changing the expression of some defense chitinase genes of potato (*Solanum tuberosum* L.) after inoculation with chitin. *Crop Biotechnology*, *13*(43), 43-53.

ABSTRACT
Plant diseases, particularly diseases caused by fungi and oomycetes pose significant challenges in modern agriculture worldwide. Pathogen associated molecular pattern (PAMP) like chitin found in the cell walls of fungi and oomycetes, trigger defence signalling, leading to expression of R-genes and the production of reactive oxygen species (ROS), and accumulation of a wide range of metabolites. Chitin elicitors prompt the expression of defence-related genes such as chitinases, ultimately the resulting in the breakdown of chitin in the pathogen's cell wall. To assess the expression level of certain chitinases in potatoes and the activity of antioxidant enzymes, leaves of a tolerant potato genotype (jelly) was challenged with chitin oligomers in vitro. Result of this study revealed that 48 hours post chitin induction, the expression of different classes of chitinase genes were significantly increased. Class I chitinase (Soltu.DM.10G017450) and class III chitinase (Soltu.DM.11G026160) genes, had respectively the highest (5.5-fold relative to control) and the lowest (1.1-fold relative to control) expression level after 48 hours post chitin inoculation. However, the activities of antioxidant enzymes catalase and ascorbate peroxidase did not change significantly compared to the control. These findings suggest that the application of chitin does not activate the signaling pathways involved in the biosynthesis of antioxidant enzymes 48 hours after chitin treatment. In addition, results of this study may imply that chitinase genes can be cloned by genetic engineering approaches to generate transgenic plants resistant to pathogens.

KEYWORDS
Antioxidant enzymes, , Gene expression, potato, Chitinase gene..

© 2023, by the author(s). Published by Payame Noor University, Tehran, Iran.
This is an open access article under the CC BY 4.0 license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

سال سیزدهم، شماره یکم، پیاپی چهل و سوم، پاییز ۱۴۰۲ (۵۳-۴۳)

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۶/۰۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۹/۲۱

DOI: 10.30473/cb.2023.69814.1934

نشریه علمی

زیست‌فناوری گیاهان زراعی

«مقاله پژوهشی»

بررسی فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و تغییر بیان برخی ژن‌های کیتیناز دفاعی گیاه سیب‌زمینی پس از تلقیح با کیتین

مریم فرامرزی جعفربیگلو[۱]، فرهاد نظریان فیروزآبادی[۱*]، سید سجاد سهرابی[۱]، علی مقدم[۲]

[۱]گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران.

[۲]پژوهشکده بیوتکنولوژی دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.

نویسنده مسئول:

فرهاد نظریان فیروزآبادی

رایانامه: nazarian.f@lu.ac.ir

چکیده

بیماری‌های گیاهی، به ویژه بیماری‌های حاصل از قارچ‌ها و اُوومیست‌ها، از چالش‌های عمده‌ی کشاورزی مدرن جهانی هستند. الگوهای مولکولی مرتبط با پاتوژن (PAMP) مانند کیتین دیواره‌ی سلولی قارچ‌ها و اُوومیست‌ها، باعث تحریک و سیگنال‌هایی در گیاه میزبان، بیان ژن‌های R و تولید گونه‌های اکسیژن فعال و طیف وسیعی از متابولیت‌ها می‌شوند. تحریک کیتین منجر به بیان ژن‌های مرتبط با دفاع مانند کیتینازها و درنهایت تخریب کیتین دیواره‌ی سلولی پاتوژن‌ها می‌شود. به‌منظور ارزیابی سطح بیان تعدادی از ژن‌های کیتیناز و اندازه‌گیری فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، برگ‌های یک ژنوتیپ سیب‌زمینی متحمل به بیماری به نام جلی، در شرایط آزمایشگاهی با الیگومرهای کیتین تلقیح شد. نتایج پژوهش نشان داد که ۴۸ ساعت پس از تلقیح با کیتین، بیان کلاس‌های مختلف ژن کیتیناز در برگ‌های تیمار شده نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری پیدا کرد. ژن‌های کیتیناز کلاس I (با ۵/۵ برابر افزایش بیان نسبت به شاهد) و ژن‌های کیتیناز کلاس III (با ۱/۱۱ برابر افزایش بیان نسبت به شاهد)، به ترتیب بیشترین و کمترین بیان را ۴۸ ساعت پس از تلقیح با کیتین داشتند. با این حال، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز و آسکوربات‌پراکسیداز تغییر معنی‌داری نسبت به شاهد نداشتند. این نتیجه نشان می‌دهد که استفاده از تیمار کیتین، مسیرهای سیگنال‌دهی درگیر در بیوسنتز آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان را در ۴۸ ساعت پس از تیمار کیتین، القا نمی‌کند و نیز ژن‌های کدکننده کیتینازها را می‌توان با روش‌های مهندسی ژنتیک همسانه‌سازی نمود و در نهایت گیاهان تراریخته‌ی مقاوم به پاتوژن‌ها را تولید کرد.

واژه‌های کلیدی

آنتی‌اکسیدان، بیان ژن، سیب‌زمینی، ژن کیتیناز.

استناد به این مقاله:

فرامرزی جعفربیگلو، مریم، نظریان فیروزآبادی، فرهاد، سهرابی، سید سجاد و مقدم، علی (۱۴۰۲). بررسی فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و تغییر بیان برخی ژن‌های کیتیناز دفاعی گیاه سیب‌زمینی پس از تلقیح با کیتین. فصلنامه علمی زیست فناوری گیاهان زراعی، ۱۳(۴۳)، ۵۳-۴۳.

مقدمه

بیماری‌های گیاهی یکی از چالش‌های عمده کشاورزی در جهان هستند (Gurr & Rushton, 2005). عوامل بیماری‌زا باعث ایجاد پاسخ‌های مختلفی در گیاه، مانند القا مقاومت سیستمیک اکتسابی[1] (SAR) در برابر بیمارگر می‌شوند. پاسخ به بیمارگر می‌تواند توسط عوامل غیرزنده فیزیکی و شیمیایی موسوم به القاگر[2] اتفاق بیافتد که به طور کلی به آنها الگوهای مولکولی مرتبط با پاتوژن[3] (PAMPs) اطلاق می‌گردد (Durrant & Dong, 2004). در بیشتر موارد، القاگرها اجزاء سلولی، مولکول‌ها یا پروتئین و آنزیم‌هایی هستند که توسط بیمارگرها سنتز شده و به بیرون از سلولهایشان ترشح می‌کنند. کیتین یکی از الگوهای مولکولی مرتبط با پاتوژن یا یک القاگر است که در دیواره سلولی برخی از پاتوژن‌ها بویژه برخی اوومیست‌ها و قارچ‌ها دیده می‌شود. مولکول کیتین یک پلیمر زیست تخریب‌پذیر و غیرسمی است که از واحدهای N– استیل‌گلوکزآمین[4] ساخته شده است و توسط پیوندهای گلیکوزیدی (1-4) β به هم مرتبط شده‌اند (Esteban *et al*., 2000, Cuesta *et al*., 2003, Elie *et al*., 2018).

علاوه بر کیتین، الگوهای مولکولی متعدد دیگری مانند پپتیدوگلیکان‌ها، کیتوزان، فلاژلین و ... نیز وجود دارند که توسط گیرنده‌های تشخیص الگو[5] (PRRs) در سطح سلول گیاهی شناسایی می‌شوند (Couto & Zipfel, 2016). با شناسایی الگوهای مرتبط با پاتوژن، واکنش‌های دفاعی خاصی در درون سلول‌های گیاه میزبان فعال می‌شوند. تولید گونه‌های فعال اکسیژن[6](ROS)، تحریک نسخه‌برداری ژن‌های کدکننده پروتئین‌های ضد میکروبی، بیوسنتز اتیلن و تحریک آبشار پروتئین کینازها توسط میتوژن[7]، از مهم‌ترین واکنش‌های دفاعی سلول‌های گیاهی محسوب می‌شوند (Asai *et al*., 2002, Nürnberger *et al*., 2004).

یکی از پاسخ‌های گیاه میزبان در مواجهه با حمله پاتوژن‌ها، بیان ژن‌های مرتبط با دفاع است (Navarro *et al*., 2004, Zipfel *et al*., 2006). گیاهان گروه کوچکی از پروتئین‌های ناهمگن به نام پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (PRs)[8] را سنتز کرده و با استفاده از آنها با تنش ناشی از حمله پاتوژن‌ها مقابله می‌کنند (Van loon & Van Strien, 1999). این پروتئین‌ها به‌طور خاص در شرایط بیماری تولید شده و نقش مهمی در مقاومت به بیماری ایفا می‌کنند (Saboki & Singh, 2011). بر اساس خصوصیات بیوشیمیایی و ساختمانی، پروتئین‌های PR به ۱۷ خانواده پروتئینی با عملکرد متنوع دسته‌بندی می‌شوند. در این طبقه‌بندی، بعضی این پروتئین‌ها ناشناخته، برخی نقش β- ۱ و ۳ گلوکانازی، برخی عملکرد کیتینازی، تعدادی پروتئین‌های شبیه توماتین‌ها، عده‌ای فعالیت پراکسیدازی و برخی دیگر نیز در گروه تیونین‌ها هستند (van Loon *et al*., 2006).

کیتینازها (E.C 3.2.1.14)، آنزیم‌های هیدرولیزکننده‌ای هستند که سبب هضم کیتین‌ها از جمله کیتین تشکیل‌دهنده دیواره سلولی برخی از قارچ‌ها می‌شوند و به‌طور گسترده‌ای در موجودات مختلف مثل باکتری‌ها، قارچ‌ها، جانوران، ویروس‌ها و گیاهان عالی دیده می‌شوند (Rawat *et al*., 2017). این آنزیم‌ها در شرایط طبیعی سطح بیان پایه را نشان می‌دهند، اما در شرایط بیماری و بروز برخی تنش‌های غیرزنده، بیان آنها به‌طور چشمگیری افزایش می‌یابد که در نتیجه بیان این پروتئین‌ها، مقاومت اکتسابی سیستمیک القاء می‌شود (Návarová *et al*., 2012). این پروتئین‌ها به‌طور گسترده‌ای در اندام‌های مختلف گیاهان عالی وجود دارند و پس از آلودگی توسط عوامل بیماری‌زا، به سرعت تولید و انباشته می‌شوند (Bravo *et al*., 2003).

بسته به نوع مکانیسم مقاومت گیاه، پس از حملات پاتوژن، تجمع ROS[9] به‌ویژه رادیکال‌های آزاد سوپراکسید (O^{2-}) و پراکسیدهیدروژن (H_2O_2)، به‌سرعت افزایش می‌یابد تا از رشد بیشتر پاتوژن‌ها جلوگیری به عمل آید. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، اولین راه دفاعی در برابر صدمات ROSها هستند. گیاهان عالی از چندین آنزیم آنتی‌اکسیدان از قبیل کاتالاز (CAT)، آسکوربات پراکسیداز (APX) برای جمع‌آوری رادیکال‌های آزاد اکسیژن استفاده می‌کنند (Schutzendubel & Polle, 2002). آنزیم کاتالاز در جذب و بی‌اثرسازی پراکسیدهیدروژن نقش دارد و آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز با استفاده از آسکوربات به‌عنوان دهنده الکترون پراکسیدهیدروژن را به آب احیا می‌کند (Asada, 1992).

تحقیقات نشان می‌دهند که کیتینازها به‌عنوان ژن‌های مرتبط با دفاع در برابر پاتوژن‌های حاوی کیتین عمل می‌کنند (Abeles *et al*., 1971). برای مثال، سطح بیان کیتینازها در پاسخ به

1. Systemic acquired resistance
2. Stimuli
3. Pathogene- associated molecular pattern
4. N-Acetylglucosamine (GlcNAc)
5. Ptteren recognition receptors
6. Reactive oxigen species (ROS)
7. Mitogen-activated protein kinase (MAPK)
8.Pathogenesis-related
9. Reactive oxigen species

حمله‌های پاتوژن‌ها افزایش می‌یابد (Que *et al*., 2014; Roby *et al*., 1988). مطالعات نشان دادند که در میوه گوجه‌فرنگی، بیان ژن‌های کدکننده‌ی کیتینازهای مختلف در جریان آلودگی به *Alternaria alternata* تغییر پیدا کرد (Cota *et al*., 2007) در تحقیقی دیگر، نقش خانواده ژنی کیتینازها در شرایط بیماری قارچی گیاه کلزا مورد بررسی قرار گرفت و در مجموع ۳۳ ژن کدکننده‌ی کیتینازها شناسایی شدند که بر اساس وجود دومین حفاظت شده در آنها، این پروتئین‌ها در ۵ گروه دسته‌بندی شدند. (Chen *et al*., 2018).

بررسی خانواده پروتئین های متصل شونده به کیتین در خانواده کلم با استفاده از یک روش جستجوی ژنوم، در مجموع تعداد ۲۰ ژن کیتیناز شناسایی شدند. همچنین نتایج مطالعه اخیر نشان داد که خانواده ژن‌های کیتینازی در کلم در بافت‌ها و اندام‌های مختلف بیان می‌شوند و تحت چهار تنش مختلف، بیان متفاوت از خود نشان دادند (Zhu *et al*., 2020). هم‌چنین تجزیه و تحلیل داده‌های توالی‌یابی ترانسکریپتوم در گیاه نیشکر نشان داد که بیان ژن‌های کیتیناز متعلق به کلاس‌های I-VI در ژنوتیپ‌های سازگار و ناسازگار در جریان آلودگی به بیماری سیاهک توسط *Sporisorium scitamineum* تغییر پیدا کردند (Su *et al*., 2015). محققان در ژنوم گوجه فرنگی تعداد ۴۳ ژن کدکننده کیتینازهای متعلق به خانواده‌های گلیکولیزهیدرولازهای خانواده‌های ۱۸ و ۱۹ (GH18, GH19) را شناسایی کردند که میزان بیان آنها در شرایط تنش‌های مختلف و در بافت‌های مختلف به‌طور معنی‌داری متغیر بود (Cao & Tan, 2019).

گیاه سیب زمینی (*Solanum tuberosum* L.) از اهمیت اقتصادی ویژه‌ای در سرتا سر جهان برخوردار است و از نظر اهمیت در تولید و تغذیه بشر پس از برنج، گندم و ذرت در رتبه چهارم قرار دارد (Muleta & Aga, 2019). به دلیل گستردگی سطح کشت، طیف وسیعی از بیماری‌های قارچی، باکتریایی و ویروسی به این گیاه حمله کرده و سبب افت شدید عملکرد آن می‌گردند (Abd Elhamid *et al*., 2010). با توجه به نقش کیتین به عنوان یک الیسیتور، این پژوهش با هدف بررسی میزان بیان ۴ کلاس از ژن‌های کدکننده کیتینازها و هم‌چنین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در شرایط القای کیتین، در رقم جلی[1] سیب زمینی، به‌عنوان یک رقم متحمل به بیماری، انجام شد.

روش‌شناسی پژوهش

شناسایی خانواده ژنی و آنالیز بیوانفورماتیکی کیتیناز سیب زمینی

برای شناسایی خانواده ژنی کیتیناز، پس از دریافت توالی‌های پروتئینی کیتینازهای مربوط به گیاه‌های گوجه فرنگی، آرابیدوپسیس و تنباکو از پایگاه داده NCBI، توالی مورد توافق حاصل از همردیفی، توسط نرم افزار DNAstar، انجام شد. توالی مورد توافق در پایگاه داده Phytozome به‌عنوان ورودی علیه ژنوم گیاه سیب زمینی، توسط ابزار tBLASTn همردیف شد و در نهایت نتایج همردیفی به عنوان ژن‌های کاندید کدکننده کیتیناز شناخته و نامگذاری شدند. برای تایید حضور دومین‌های کاتالیتیکی و هم‌چنین دومین اتصال به کیتین در توالی‌های موردنظر، از پایگاه‌های pfam و SMART و CDD استفاده شد. بررسی تغییرات بیان ژن‌های انتخابی در شرایط تنش‌های زیستی با استفاده از مجموعه داده‌های ترنسکریپتومی موجود برای سیب‌زمینی در پایگاه داده SRA (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra) انجام شد. پس از آنالیز داده‌های ترنسکریپتوم توسط نرم‌افزار CLC Genomicswb20، از هر کلاس ژن کیتیناز، ژن‌هایی که در شرایط تلقیح با قارچ، بیان بالایی داشتند، برای بررسی میزان بیان ژن در شرایط تلقیح کیتین انتخاب شدند. به منظور شناسایی عناصر تنظیمی در نواحی پروموتری ژن‌های کیتیناز انتخابی و نقش احتمالی آنها در ایجاد مقاومت به تنش زنده، ۱۵۰۰ جفت باز در بالادست هر ژن در نظر گرفته شد و با استفاده از پایگاه اطلاعاتی (https://www.dna.affrc.go.jp/PLACE) PLACE مورد تجزیه تحلیل قرار گرفت. جهت بررسی ساختار ژن و پراکنش نواحی اگزونی و اینترونی ژن‌های کیتیناز، و ارتباط آن با میزان بیان ژن از ابزار بیوانفورماتیکی TBtools استفاده شد.

کشت و اعمال تنش

به منظور ارزیابی نحوه بیان مهم‌ترین کیتینازهای سیب‌زمینی، آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در گلخانه دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان اجرا شد. برای این منظور، غده‌های کوچک سیب زمینی در گلدان‌های حاوی پرومیکس و پرلیت کشت و در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد در گلخانه با فتوپریود ۱۲-۱۴ ساعته و رطوبت ۷۰ درصد، نگه‌داری شدند.

1. Jelly

تلقیح کیتین به برگ‌های گیاه پس از گذشت ۵ هفته از رشد سیب‌زمینی انجام شد. برای تلقیح، شیارهای بسیار نازک در سطح برگ ایجاد شده و محلول کیتین با غلظت ۱۵۰ µg/ ml روی برگ‌ها اسپری شد (Mohammadi *et al*., 2020) برای تیمار شاهد نیز به جای محلول کیتین از آب مقطر استفاده شد. برگ‌ها توسط نایلون پوشیده شدند و نمونه‌برداری از برگ‌ها برای انجام مراحل آزمایشگاهی، ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار، صورت گرفت (Samet *et al*., 2018).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدان

به منظور اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، برای عصاره‌گیری از بافر فسفات پتاسیم استفاده شد. میزان فعالیت آنزیم کاتالاز با روش ابی (۱۹۸۴) اندازه گیری شد (Aebi, 1984) و قرائت نمونه‌های آنزیمی در طول موج ۲۴۰ نانومتر صورت گرفت. برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز از شیوه نامه ناکانو و آسادا (۱۹۸۱) استفاده شد (Nakano & Asada, 1981) و قرائت نمونه‌ها در طول موج ۲۹۰ نانومتر انجام گرفت. آنالیزهای آماری داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SAS. v 9 انجام شده و مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطوح احتمال پنج درصد و یک درصد صورت گرفت.

بررسی بیان ژن‌های کیتینازی

استخراج RNA کل توسط کیت تجاری دنا زیست و بر اساس شیوه نامه شرکت سازنده صورت گرفت. تعیین کیفیت و کمیت RNA با استفاده از اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز انجام شد. سنتز cDNA، توسط کیت Thermo Fisher Scientific و بر اساس شیوه‌نامه شرکت سازنده صورت گرفت. انتخاب ژن‌های کیتیناز بر اساس تجزیه و تحلیل‌های بیوانفورماتیکی و استفاده از داده‌های توالی‌یابی مربوط به ترانسکریپتوم گیاه سیب زمینی در شرایط تلقیح با قارچ‌های کیتین دار موجود در پایگاه‌های داده صورت گرفت. در هر کلاس ژنی از کیتینازها، ژن‌هایی انتخاب شدند که میزان بیان بالاتری نسبت به سایر ژن‌های همولوگ همان کلاس داشتند. برای ژن‌های انتخابی (جدول ۱)، آغازگرهای اختصاصی، بر اساس توالی CDS به کمک نرم افزار Primer-BLAST و Oligo analyser طراحی و نامگذاری شدند. واکنش Real-time PCR بر اساس برنامه زمانی و دماهای مشخص شده در جدول ۲ و توسط دستگاه Rotor Gene ساخت شرکت QIAGEN برای هریک از ژن‌ها در سه تکرار فنّی انجام شد. بر اساس غلظت‌های سریالی برای هر یک از ژنهای انتخابی با استفاده از آغازگرها اختصاصی (جدول ۱) واکنش PCR صورت گرفت که در همه موارد میزان کارایی در محدوده قابل قبول (۱۱۰٪-۸۵٪) بود. از این رو، مقایسه میزان بیان ژن‌ها با شاهد با استفاده از روش ΔΔCt، معروف به روش لیواک (Livak & Schmittgen, 2001) صورت گرفت. برای مقایسه میزان بیان ژن‌ها، از آزمون t و در سطح احتمال ۱ استفاده شد.

جدول ۱. توالی آغازگرهای طراحی شده برای بیان کلاس‌های مختلف ژن کیتیناز سیب زمینی

نام ژن	دسترسی ژنومی	نام آغازگر	توالی آغازگر (´۳ -´۵)	طول قطعه (bp)
CH1	Soltu.DM.10G017450	F_Ch1 R_Ch1	TTGCCAGAGCTAGTGTTGTGATA CAGCAATTTTCCTTTTACAGCCA	218
CH3	Soltu.DM.11G026160	F_Ch2 R_Ch2	GGGCACAACCATTCCTCAGT TCTAGGAGACAAGCCACCAC	115
CH4	Soltu.DM.10G017290	F_Ch4 R_Ch4	GGTCCCGGTCCTTCAGAG CAGGAAAAGACCAAGCAGCA	149
CH5	Soltu.DM.07G000200	F_Ch5 R_Ch5	ACAGAATCGTGCCACAACAG CACGCAAAGTAACCACGCAA	150
elf1-α	NM_001288491	F_elf R_elf	ATTGGAAACGGATATGCTCCA TCCTTACCTGAACGCCTGTCA	101

جدول ۲. برنامه دمایی واکنش Real Time PCR برای بررسی بیان ژن‌های کیتیناز مختلف گیاه سیب زمینی پس از تیمار کیتین

تعداد چرخه	زمان	دما (درجه سانتی گراد)	اجزاء
۱	۱۵ دقیقه	۹۵	دناتوره سازی اولیه
۴۰	۳۰ ثانیه	۹۵	دناتوره سازی
۴۰	۳۰ ثانیه	۶۰	اتصال
۴۰	۳۰ ثانیه	۷۲	تکثیر
۱	هر ۵ ثانیه ۰/۵ درجه	۹۵- ۵۵	منحنی ذوب

یافته‌های پژوهش

خصوصیات پروتئین‌های کیتیناز انتخابی، از قبیل کلاس پروتئینی، طول ژن، طول پروتئین و نقطه ایزوالکتریک پروتئین در جدول ۲ نشان داده شده است. کمترین اندازه وزن مولکولی پروتئین، مربوط به پروتئین‌های کلاس IV کیتیناز و بیشترین اندازه وزن مولکولی مربوط به پروتئین‌های کلاس V در بین کیتینازها است. بر اساس گزارش‌های موجود، کیتینازهای کلاس I و IV دارای میزان شباهت بالایی با هم هستند و در گروه گلیکوزیل هیدرولازهای خانواده 19 (GH19) قرار دارند. این دو کلاس پروتئینی دارای یک دومین غنی از سیستئین در انتهای سر آمینی (N) خود هستند. اندازه وزن مولکولی پروتئین‌های کلاس IV بطور قابل توجهی کوچکتر از پروتئین‌های کیتیناز کلاس I می‌باشد (Fukamizo, 2000, Patil *et al.*, 2000). pH ایزو الکتریک پروتئین‌های کیتیناز در محدوده ۵/۹ تا ۹/۳ قرار دارد. دامنه pH ایزوالکتریک بیانگر تنوع در خصوصیات اسیدی و بازی پروتئین کیتیناز می‌باشد(جدول ۱). بر اساس مطالعات دامنه pH در داخل بیشتر سلول‌های یوکاریوتی در محدوده ۷/۵-۷/۲ می باشد(Felle 2001). گزارش‌ها نشان می‌دهند که pH سیتوسول قلیایی، اما pH ناحیه آپوپلاست اسیدی و در حدود ۵-۶ است (Felle 2001). با توجه به اینکه کیتینازها هم در داخل سیتوسول فعال هستند و هم دارای سیگنال پپتید بوده و لذا به آپوپلاست ترشح می‌شوند، لذا چنین دامنه فعالیتی در محدود pH جدول ۲ برای آنها قابل پیش بینی و قابل قبول است.

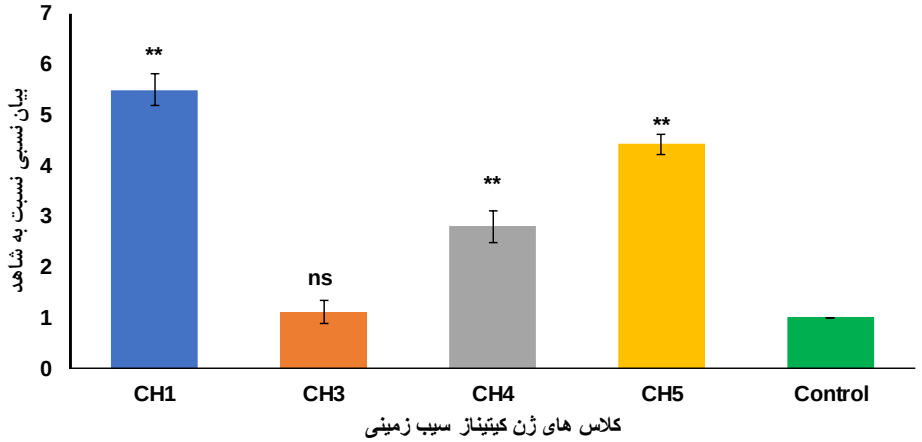
بررسی سطح بیان ژن‌های کدکننده کیتینازها

در این پژوهش، تغییرات بیان ژن کیتیناز کلاس I (Soltu.DM.10G017450)، کلاس III (Soltu.DM.11G026160)، کلاس IV (Soltu.DM.10G017290) و کلاس V (Soltu.DM.07G000200)، با استفاده از روش Real-Time PCR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بیانگر اثر گذاری القای کیتین بر سطح بیان هر چهار کلاس کیتینازی بود (شکل ۱).

همانطوری که در شکل ۱ دیده می‌شود، هر کدام از کلاس‌های ژن کیتیناز، سطح بیان متفاوتی را در شرایط القاء کیتین نشان دادند. بیشترین و کمترین میزان بیان ژن به ترتیب مربوط به کیتیناز کلاس I (Soltu.DM.10G017450) و کیتیناز کلاس III (Soltu.DM.11G026160) بود. در مطالعات انجام شده، با فوق بیان ژن کیتیاز کلاس I در گیاه چای، میزان مقاومت گیاه به قارچ عامل بیماری *blister blight* افزایش یافت (Singh *et al.*, 2015). هم‌چنین در پژوهشی که برای بررسی مقاومت گیاه برنج به قارچ *late leaf spot* و *A. flavus* انجام شد، کلاس I ژن کیتیناز در پاسخ به شرایط بیماری افزایش بیان داشته است (Prasad *et al.*, 2013). مرادی و همکاران (۲۰۱۶) در تحقیقی که روی گیاه خیار انجام دادند، نشان دادند که در این گیاه ، ۴۸ ساعت پس از تیمار قارچ *Sphaerotheca fuliginea* افزایش ناچیزی در میزان بیان کلاس III ژن کیتیناز صورت گرفت.

جدول ۳. ویژگی‌های ژنی و پروتئینی کلاس‌های مختلف کیتیناز سیب زمینی

نام ژن	کلاس	طول توالی نوکلئوتیدی (bp)	طول پروتئین (a.a)	pH ایزوالکتریک
Soltu.DM.10G017450	I	۹۹۹	۲۵۰	۹/۳۰
Soltu.DM.11G026160	III	۹۲۴	۳۰۸	۵/۹
Soltu.DM.10G017290	IV	۱۷۱۴	۱۲۲	۶/۸۹
Soltu.DM.07G000200	V	۲۵۵۸	۳۷۷	۹/۰۷



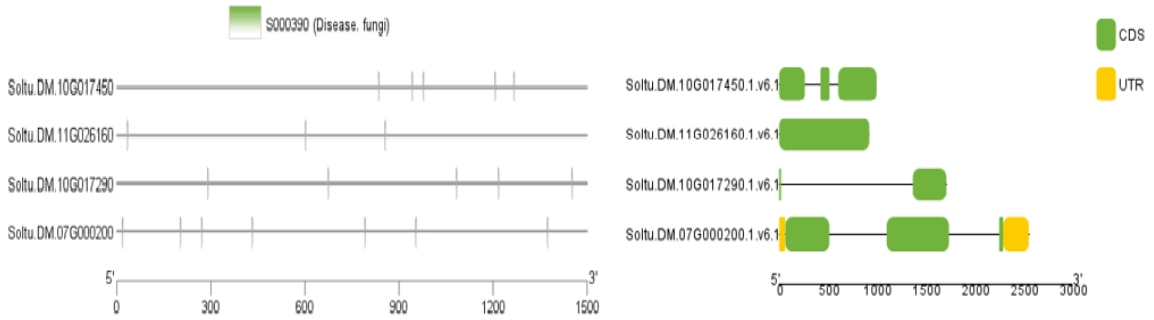
شکل ۱. تغییرات بیان ژن‌های کیتیناز در برگ‌های گیاه سیب زمینی در شرایط القای کیتین. مقایسه میزان بیان با شاهد توسط آزمون t در سطح ۱ درصد صورت گرفته است. CH1: کلاس I، CH3: کلاس III، CH4: کلاس IV، CH5 : کلاس V ، control: شاهد. میله‌های بالای هر کدام از ستون‌ها مقادیر انحراف استاندارد میانگین‌ها (±SD) را نشان می‌دهند.

هم‌چنین در تحقیقی که روی برگ خردل انجام شد، مشخص شد که بیان کلاس IV کیتیناز ۴۸ ساعت پس از تلقیح با قارچ *Alternaria*افزایش یافت (Rawat *et al*., 2017). بیان ژن‌های کیتینازی در مواجهه با پاتوژن در گیاه آرابیدوپسیس بررسی شد. نتایج این مطالعه نشان داد که رونوشت کلاس IV کیتیناز پس از تلقیح با قارچ به سرعت در برگ انباشته شد. این موضوع نشان داد که این کلاس ژنی از کیتینازها در وقایع اولیه واکنش فوق حساسیت دخالت دارند (Liliane *et al*., 1997). بعلاوه مشخص شده است که جراحت به اندام‌های گیاهی، موجب تحریک پروموتر ژن کدکنندهی کیتیناز در برگ‌های گیاه خردل می‌شود. تحریک پروموتر این ژن‌ها به این دلیل است که پروموتر ژن کیتیناز IV در گیاه مذکور دارای عناصر تنظیمی برای سالیسیلیک اسید، جاسمونیک اسید و زخم می‌باشد (Van loon *et al*., 2006). ژن‌های کیتیناز کلاس V بیشتر در فرآیندهای رشد و نمو درگیر هستند (Kopparapu *et al*., 2011; Santos *et al*., 2004). با توجه به اینکه افزایش استقامت گیاه، راه حل کلیدی برای مقابله با پاتوژن به شمار می‌آید، افزایش بیان این کلاس ژنی و تولید پروتئین‌های مربوط به آن در شرایط حمله پاتوژن و تلقیح کیتین توسط گیاه ضروری به نظر می‌رسد.

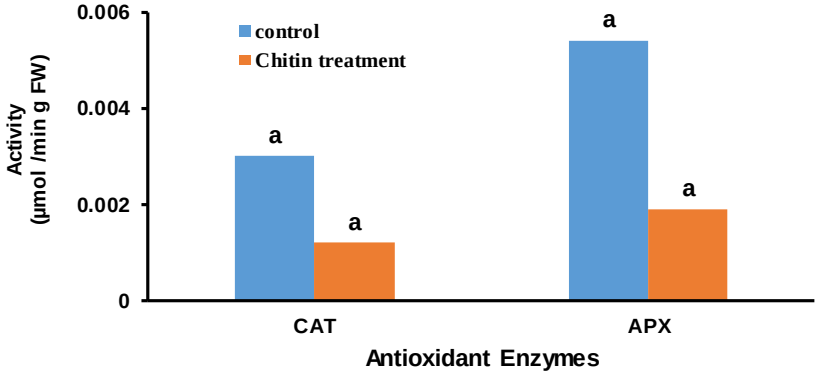
با توجه به عناصر تنظیمی شناسایی شده در نواحی پروموتری کلاس‌های مختلف ژن کیتیناز سیب زمینی در پایگاه داده PLACE، https://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/ می‌توان یکی از دلایل بیان پایین ژن کلاس III را به تعداد کمتر عناصر تنظیمی در پروموتر این کلاس ژنی مرتبط دانست (شکل ۳). بیان بالای کیتینازهای کلاس I علاوه بر تعداد زیاد عناصر تنظیمی، می‌تواند به کوتاه بودن طول ژن و اینترون‌های آن نیز بستگی داشته باشد. به‌طور کلی ژن‌های مرتبط با تنش، حاوی اینترون‌های کمتری هستند (Jeffares *et al*., 2008). البته در ژن کیتیناز کلاس V(Soltu.DM.07G000200) علی‌رغم طول زیاد اینترون، بعلت فراوانی خیلی زیاد عناصر تنظیمی در نواحی پروموتری، بیان بیشتری را نسبت به کلاس III (Soltu.DM.11G026160) و IV(Soltu.DM.10G017290) مشاهده شد (شکل ۲).

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

القاء برگ‌های سیب زمینی رقم متحمل به بیماری جلی توسط کیتین تاثیری بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان دخیل در فرآیند دفاعی نداشت. بر اساس نتایج این مطالعه، ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار کیتین، میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز نسبت به نمونه‌های شاهد تفاوت معنی داری نداشت (شکل ۳). در پژوهش انجام شده توسط مرادی و همکاران (۲۰۱۶) فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاه سیب زمینی، ۴۸ ساعت پس از تلقیح با قارچ تغییر معنی داری نسبت به شاهد نشان نداد. کینازها و فاکتورهای رونویسی در انتقال سیگنال غیر اختصاصی قارچ‌ها نقش دارند که در نهایت منجر به بیان ژن‌های دفاعی می‌شوند. با این حال مکانیسم دفاعی مستقل از رونویسی، ممکن است به تنظیم کننده‌های کلیدی دیگری بستگی داشته باشد. یکی از این عوامل، سیگنال‌های ایجاد شده حاصل از تجمع ROSها می‌باشد.



شکل ۲. ساختار ژن‌های کیتیناز انتخابی این مطالعه. عناصر تنظیمی مرتبط با بیماری در نواحی پروموتر ژن‌های کیتیناز در سمت چپ و نواحی اگزون و اینترون در ساختار ژن‌های کیتینازسیب زمینی انتخابی در سمت راست نشان داده شده است.



شکل ۳. مقایسه میانگین اثر تلقیح کیتین بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاه سیب زمینی. حروف لاتین مشابه عدم معنی‌داری در سطح ۱ درصد با آزمون دانکن را نشان می‌دهد. CAT: کاتالاز، APX: آسکوربات پروکسیداز.

تجمع ROSها مثل H_2O_2 اولین واکنش گیاه در شرایط تنش‌های مختلف در گیاه میزبان محسوب می‌شود. مولکول‌های ROS تشکیل شده در این مرحله ممکن است به‌عنوان یک عامل ضد میکروبی عمل کنند. هم‌چنین H_2O_2 با ایجاد اتصالات عرضی بین پروتئین‌های دیواره سلولی در تقویت دیواره سلولی شرکت می‌کند. گیاهان با استفاده از این روش، دسترسی پاتوژن‌های قارچی را به پروتوپلاست گیاهی محدود می‌کنند (Huckelhoven, 2007). مطالعات نشان می‌دهند که آسکوربات آپوپلاستی برای رشد و دفاع گیاه مهم است، ویتامینCهای جهش یافته یکسری زخم های میکروسکوپی را بصورت خودبخودی ایجاد می‌کنند که باعث بیان ژن‌های مرتبط با پاتوژن می‌شوند و مقاومت در برابر عوامل قارچی را ایجاد می‌کنند (Pavet *et al.*, 2005). با توجه به اینکه در تحقیقات اغلب ۹۶ ساعت پس از آلودگی قارچی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان برای کاهش و جمع‌آوری گونه‌های فعال اکسیژن افزایش می‌یابد (Moradi *et al.*, 2016)، حضور مقادیر پایه از گونه‌های فعال اکسیژن در ساعات اولیه تا ۴۸ ساعت پس از حمله پاتوژن و یا تلقیح کیتین، به دلیل اثر مثبت رادیکال‌های آزاد بر بیان ژن‌های دفاعی و همچنین محافظت از گیاه در مقابل نفوذ پاتوژن، منطقی به نظر می‌رسد.

نتیجه گیری و پیشنهادها

بر اساس بررسی داده‌های ریزآرایه، مشخص است که بیان ژن‌های کیتیناز در گیاه سیب زمینی، ۴۸ ساعت پس از تلقیح با کیتین فعال می‌شوند که این موضوع نشان دهنده نقش مهم آن‌ها در پاسخ به تنش‌های زیستی به ویژه قارچ‌ها و اوومیست‌های بیمارگری با دیواره سلولی کیتین‌دار است. کیتینازها یکی از موثرترین عوامل زیستی در کنترل قارچ‌های بیماریزای گیاهی هستند. از کیتینازها به صورت کاربرد خارجی، برای کنترل کپک پودری توت فرنگی به صورت اسپری روی میوه‌ها و برگ‌ها

استفاده شده است. هم‌چنین برای کنترل بیماری قارچی در گیاه جو به صورت ریزتزریقی در سلول‌های اپیدرمی کولئوپتیل جو نیز کاربرد دارد. کیتین، ماده اصلی دیواره سلولی برخی قارچ‌ها و اوومیست‌ها است. کیتینازها با تجزیه کیتین موجود در دیواره سلولی، باعث حفاظت از گیاه در برابر حمله قارچ و جلوگیری از گسترش آن در بافت‌ها می‌شوند. تولید آنزیم کیتیناز فرآیندی مشکل و هزینه‌بر است، ضمن انکه حفظ و نگهداری ساختار آنزیم و فعالیت کیتینازی آن مشکل است، از این رو استفاده از این آنزیم‌ها به صورت محلول پاشی تقریبا و در حال حاضر امکان‌پذیر نیست. با توجه به نتایج پژوهش حاضر، می‌توان از محلول پاشی کیتین برای القای ژن‌های کیتیناز و مقابله با پاتوژن استفاده کرد. همچنین می توان به کمک روش‌های مهندسی ژنتیک، ژن‌های پاسخ دهنده در اثر القای کیتین را همسانه سازی نمود و از انها برای ایجاد گیاهان تراریخت مقاوم به بیماری استفاده نمود.

References

Abd Elhamid, M. I., Makboul, H. E., Sedik, M. Z., Ismail, I. M., & Ibrahim, M. A. (2010). Cloning, expression and antifungal activity of an endochitinase gene derived from barley (*Hordeum vulgare*). *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 6 (3), 356-363.

Abeles, F. B., Bosshart, R. P., Forrence, L. E., & Habig, W. (1971). Preparation and purification of glucanase and chitinase from bean leaves. *Plant Physiology*, 47 (1), 129-134.

Aebi, H. (1984). [13] Catalase in vitro. In Methods in enzymology (Vol. 105, pp. 121-126). Academic press.

Boller, T., & He, S. Y. (2009). Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. *Science*, 324 (5928), 742-744.

Bravo, J. M., Campo, S., Murillo, I., Coca, M., & San Segundo, B. (2003). Fungus-and wound-induced accumulation of mRNA containing a class II chitinase of the pathogenesis-related protein 4 (PR-4) family of maize. *Plant molecular biology*, 52, 745-759.

Cao, J., & Tan, X. (2019). Comprehensive analysis of the chitinase family genes in tomato (Solanum lycopersicum). *Plants*, 8 (3), 52.

Chen, R. D., Yu, L. X., Greer, A. F., Cheriti, H., & Tabaeizadeh, Z. (1994). Isolation of an osmotic stress-and abscisic acid-induced gene encoding an acidic endochitinase from Lycopersicon chilense. *Molecular and General Genetics MGG*, 245, 195-202.

Chen, J., Piao, Y., Liu, Y., Li, X., & Piao, Z. (2018). Genome-wide identification and expression analysis of chitinase gene family in Brassica rapa reveals its role in clubroot resistance. *Plant science*, 270, 257-267.

Cota, I. E., Troncoso-Rojas, R., Sotelo-Mundo, R., Sánchez-Estrada, A., & Tiznado-Hernández, M. E. (2007). Chitinase and β-1, 3-glucanase enzymatic activities in response to infection by Alternaria alternata evaluated in two stages of development in different tomato fruit varieties. *Scientia Horticulturae*, 112 (1), 42-50.

Ellis, J., Dodds, P., & Pryor, T. (2000). Structure, function and evolution of plant disease resistance genes. *Current opinion in plant biology*, 3 (4), 278-284.

Felle, H. H. (2001). pH: signal and messenger in plant cells. *Plant biology*, 3 (06), 577-591.

Gurr, S. J., & Rushton, P. J. (2005). Engineering plants with increased disease resistance: how are we going to express it?. *TRENDS in Biotechnology*, 23 (6), 283- 290.

Gregorova, Z., Kovacik, J., Klejdus, B., Maglovski, M., Kuna, R., Hauptvogel, P., & Matusikova, I. (2015). Drought-induced responses of physiology, metabolites, and PR proteins in Triticum aestivum. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63 (37), 8125-8133.

Hashimoto, M., Kisseleva, L., Sawa, S., Furukawa, T., Komatsu, S., & Koshiba, T. (2004). A novel rice PR10 protein, RSOsPR10, specifically induced in roots by biotic and abiotic stresses, possibly via the jasmonic acid signaling pathway. *Plant and cell physiology*, 45 (5), 550-559.

Heller, J., & Tudzynski, P. (2011). Reactive oxygen species in phytopathogenic fungi: signaling, development, and disease. *Annual review of phytopathology*, 49, 369-390.

Hückelhoven, R. (2007). Cell wall–associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. Annu. Rev. *Phytopathol*,45,101-127.

Jeffares, D. C., Penkett, C. J., & Bähler, J. (2008). Rapidly regulated genes are intron poor. *Trends in genetics*, 24 (8), 375-378.

Liliane, B. D. A., Sachetto-Martins, G., Contarini, M. G., Sandroni, M., Ferreira, R. D. P., de Lima, V. M., ... & Margis-Pinheiro, M. (1997). Arabidopsis thaliana class IV chitinase is early induced during the interaction with Xanthomonas campestris. *Febs Letters*, 419 (1), 69-75.

Livak, K.J., & Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Methods, 25(4), 402-408.

Moghaddam, G. A., Rezayatmand, Z., Esfahani, M. N., & Khozaei, M. (2019). Genetic defense analysis of tomatoes in response to early blight disease, Alternaria alternata. *Plant Physiology and Biochemistry*, 142, 500-509.

Moradi, N., Rahimian, H., Dehestani, A., & Babaeizad, V. (2016). Cucumber Response to Sphaerotheca fuliginea: Differences in antioxidant enzymes activity and pathogenesis-related gene expression in susceptible and resistant genotypes. *J Plant Mol Breed*, 4(2), 33-40.

Muleta, H. D., & Aga, M. C. (2019). Role of nitrogen on potato production: a review. *Journal of Plant Sciences*, 7 (2), 36-42.

Nakano, Y., & Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and cell physiology*, 22 (5), 867-880.

Návarová, H., Bernsdorff, F., Döring, A. C., & Zeier, J. (2012). Pipecolic acid, an endogenous mediator of defense amplification and priming, is a critical regulator of inducible plant immunity. *The Plant Cell*, 24 (12), 5123-5141.

Navarro, L., Zipfel, C., Rowland, O., Keller, I., Robatzek, S., Boller, T., & Jones, J. D. (2004). The transcriptional innate immune response to flg22. Interplay and overlap with Avr gene-dependent defense responses and bacterial pathogenesis. *Plant physiology*, 135 (2), 1113-1128.

Nürnberger, T., Brunner, F., Kemmerling, B., & Piater, L. (2004). Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunological reviews*, 198 (1), 249-266.

Pandey, P., Irulappan, V., Bagavathiannan, M. V., & Senthil-Kumar, M. (2017). Impact of combined abiotic and biotic stresses on plant growth and avenues for crop improvement by exploiting physio-morphological traits. *Frontiers in plant science*, 8, 537.

Pavet, V., Olmos, E., Kiddle, G., Mowla, S., Kumar, S., Antoniw, J., ... & Foyer, C. H. (2005). Ascorbic acid deficiency activates cell death and disease resistance responses in Arabidopsis. *Plant physiology*, 139 (3), 1291-1303.

Prasad, K., Bhatnagar-Mathur, P., Waliyar, F., & Sharma, K. K. (2013). Overexpression of a chitinase gene in transgenic peanut confers enhanced resistance to major soil borne and foliar fungal pathogens. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 22, 222-233.

Que, Y., Su, Y., Guo, J., Wu, Q., & Xu, L. (2014). A global view of transcriptome dynamics during Sporisorium scitamineum challenge in sugarcane by RNA-Seq. *PLoS One*, 9 (8), e106476.

Rawat, S., Ali, S., Mittra, B., & Grover, A. (2017). Expression analysis of chitinase upon challenge inoculation to Alternaria wounding and defense inducers in Brassica juncea. *Biotechnology reports*, 13, 72-79.

Roby, D., Toppan, A., & Esquerré-Tugayé, M. T. (1988). Systemic induction of chitinase activity and resistance in melon plants upon fungal infection or elicitor treatment. *Physiological and molecular plant pathology*, 33 (3), 409-417.

Saboki Ebrahim, K. U., & Singh, B. (2011). Pathogenesis related (PR) proteins in plant defense mechanism. Sci. Against Microb. *Pathog*, 2, 1043-1054.

Samet, M., Charfeddine, M., Kamoun, L., Nouri-Ellouze, O., Gargouri-Bouzid, R. (2018) Effect of compost tea containing phosphogypsum on potato plant growth and protection against Fusarium solani infection. *Environmental Science and Pollution Research* 25, 18921-18937.

Schutzendubel, A., & Polle, A. (2002). Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of experimental botany*, 53 (372), 1351-1365.

Singh, H. R., Deka, M., & Das, S. (2015). Enhanced resistance to blister blight in transgenic tea (Camellia sinensis [L.] O. Kuntze) by overexpression of class I chitinase gene from potato (Solanum tuberosum). *Functional & integrative genomics*, 15, 461-480.

Su, Y., Xu, L., Wang, S., Wang, Z., Yang, Y., Chen, Y., & Que, Y. (2015). Identification, phylogeny and transcript of chitinase family genes in sugarcane. *Scientific reports*, 5 (1), 10708.

Tehrani, M. M., Esfahani, M. N., Mousavi, A., Mortezaiinezhad, F., & Azimi, M. H. (2020). Regulation of related genes promoting resistant in Iris against root rot disease, Fusarium oxysporum f. sp. gladioli. *Genomics*, 112 (5), 3013-3020.

Van Loon, L. C., & Van Strien, E. A. (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and molecular plant pathology*, 55 (2), 85-97.

van Loon, L. C., Rep, M., & Pieterse, C. M. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. Annu. Rev. *Phytopathol*., 44, 135-162.

Wessels, J. G. H., & Sietsma, J. H. (1981). Fungal cell walls: a survey. In Plant carbohydrates II: extracellular carbohydrates (pp. 352-394). Berlin, Heidelberg: *Springer Berlin Heidelberg*.

Zhu, M., Kong, C., Zhuang, M., Zhang, Y., Lv, H., Ji, J., ... & Yang, L. (2020). Genome-wide identification and expression analysis of chitin-binding gene family in *Brassica oleracea* L. reveals its role in different disease resistance.

Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J. D., Boller, T., & Felix, G. (2006). Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts Agrobacterium-mediated transformation. *Cell*, 125 (4), 749-760.