

بررسی مقایسه‌ای ژن کیتیناز جداسازی شده از گیاه زعفران (*Crocus sativus* L.) با کیتینازهای گیاهان مختلف

بهمن فاضلی نسب^۱ و زیبا فولادوند^{۲*}

تاریخ دریافت: ۹۳/۸/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۴/۳/۶

چکیده

زعفران با دارا بودن خواص دارویی متعدد به‌ویژه خواص ضد سرطانی به عنوان گیاه دارویی مهم مورد توجه قرار گرفته است. این تحقیق با هدف بررسی جنبه‌های مختلف بیوانفورماتیکی ژن کیتیناز تولید شده در پیاز گیاه زعفران در مقایسه با سایر انواع شناخته شده آنزیم کیتیناز انجام شد. بر اساس نتایج این تحقیق ساختار Safchi A دارای شباهت ساختاری زیادی با کیتینازهای گیاهی متعلق به خانواده ۱۹ گلیکوزیل هیدرولازهاست. هر چند تفاوت‌هایی در دمین کاتالیزوری این آنزیم وجود دارد اما بیشترین تفاوت مربوط به جایگزینی گلوتامیک اسید با تیروزین در جایگاه فعال آنزیم است، که این تفاوت می‌تواند نقش این اسید آمینه را در تغییر فعالیت آنزیم توجیه کند. علی‌رغم آن‌که جداسازی ژن‌های کیتینازی و گلوکانازی از باکتری و گیاهان مختلف و انتقال آن‌ها به تنهایی یا به صورت انتقال توأم به گیاهان به منظور ایجاد مقاومت در برابر بیماری‌های قارچی صورت گرفته است ولی معمولاً منجر به ایجاد مقاومت در برابر طیف وسیع بیماری‌های قارچی در گیاهان تراریخته نشده‌اند اما آنزیم‌های هیدرولازی تخلیص شده که منشأ قارچی دارند، گاهی تا ۱۰۰ برابر آنزیم‌های تخلیص شده از منابع دیگر مثل آنزیم‌های گیاهی فعالیت ضد قارچی داشته و بر علیه طیف وسیع‌تری از گونه‌های بیماری‌زا عمل می‌کنند. مطالعات همچنین نشان می‌دهد که این آنزیم‌ها سمی نبوده و اثر مضر بر گیاهان و جانوران ندارند در نتیجه پیشنهاد می‌شود که ابراز توأم دو یا چند تراژن ضد قارچ از جمله کیتیناز و گلوکاناز در زعفران که خود نیز دارای ژن کیتیناز مؤثر می‌باشد، به دلیل اثر هم‌افزایی آن‌ها می‌تواند مؤثرتر از خود تک ژن باشد.

واژگان کلیدی: توالی، ردیف آرای، فیلوژنی، Safchi A

^۱ عضو هیات علمی پژوهشکده زیست فناوری کشاورزی دانشگاه زابل، Bfazeli@uoz.ac.ir

^{۲*} عضو هیات علمی پژوهشکده زیست فناوری کشاورزی دانشگاه زابل

Zibafooladvand@Gmail.com

مقدمه

خواص پاک‌کنندگی عمل کرده و خطر آسیب‌های هپاتیک و هیپولیپمیک را کاهش می‌دهند. وجود حالت ضد سرطان در ترکیبات این گیاه خاصیت ضدافسردگی آن همچنین افزایش مقاومت بدن به برخی بیماری‌ها و حساسیت‌ها و کاهش فشارخون سبب شده است که تحقیقات بر روی این گیاه از حالت خوراکی و ادویه‌ای آن خارج شده و بر روی خواص دارویی آن متمرکز گردد (Mohammadi & Fazeli-masab, 2014).

سالانه بخش عمده‌ای از محصولات کشاورزی بر اثر آفات و بیماری‌های گیاهی از بین می‌روند و در این بین قارچ‌ها از جمله مهم‌ترین عوامل بیماری‌زا می‌باشند. روش‌های مرسوم استفاده از قارچ‌کش‌ها در کشاورزی باعث آلودگی محیط‌زیست و افزایش هزینه‌های عملیات کشاورزی می‌شوند. برای جلوگیری از آلودگی محیط‌زیست و کاهش عملیات کشاورزی، فنون مهندسی ژنتیک از سال‌ها قبل برای تولید گیاهان مقاوم به بیماری‌های قارچی استفاده شده‌اند به طوری- که تولید گیاهان تراریخته‌ای که به صورت زود هنگام، میزان بالایی از پروتئین‌های ضد قارچ را بیان نمایند، راهبرد مناسبی جهت مبارزه با بیماری‌های قارچی می‌باشد (Esfahani et al., 2011).

قارچ‌های بیماری‌زا از جمله مهم‌ترین عوامل ایجاد خسارت در محصولات کشاورزی می‌باشند. یکی از روش‌های مبارزه با بیماری‌های قارچی استفاده از مهندسی ژنتیک برای انتقال ژن‌های رمز کننده آنزیم‌های هیدرولازی، خصوصاً کیتینازها و گلوکانازها به گیاهان زراعی است. از طرفی بعضی قارچ‌های آنتاگونیست مانند تریکودرما، با تولید آنزیم‌های هیدرولازی قدرتمند کیتیناز و گلوکاناز، اثر بازدارنده قابل توجهی بر رشد قارچ‌های بیماری‌زا داشته و آنزیم‌های جدا شده از گونه‌های مختلف این قارچ، بسیار مؤثرتر از آنزیم‌های جدا شده از منابع دیگر می‌باشند. گسترده‌ترین پژوهش‌های صورت گرفته در بخش

زعفران (*Crocus sativus* L.) یا طلای سرخ از خانواده Iridaceae، با ارزش‌ترین و گران‌بهاترین ادویه جهان است. گل‌های زعفران دارای سه کلالة هستند که به منظور تولید ادویه زعفران جمع‌آوری و خشک می‌شوند (Ahrazem et al., 2012). در واقع کلالة‌ها مهم‌ترین بخش اقتصادی گیاه می‌باشند که به شکل‌های مختلف به عنوان چاشنی و رنگ دهنده در تهیه غذا، در صنایع داروسازی، تولید محصولات آرایشی و مواد معطر و به عنوان ماده رنگ دهنده در صنایع نساجی کاربرد دارد. در سال‌های اخیر نیز اثرات ضد سرطانی و شمار دیگری از خصوصیات آنتی‌اکسیدانتی و ضد باکتریایی و ضد قارچی زعفران به شکل وسیعی مورد بررسی و مطالعه قرار گرفته و به این گیاه ارزش ویژه دیگری بخشیده است (Srivastava et al., 2010).

زعفران از زمان‌های بسیار دور در ایران و هندوستان کشت می‌گردیده و بعدها توسط اعراب که در قرون وسطی اروپا را فتح کردند به کشورهایی چون اسپانیا معرفی گردید. زعفران از قدیم‌الایام به عنوان یک داروی خانگی برای درمان دردهای معده گرفتگی‌های عضلانی، سرفه، گرفتگی‌های ریوی چون آسم و نیز به عنوان داروی آرام بخش (برای درمان لثه و دندان) به کار برده می‌شد. طی چند سال گذشته خواص ضد سرطانی عصاره زعفران در هر دو زمینه کشت *in vivo* و *in vitro* اثبات شده و همچنین تحقیقات نشان می‌دهد که ترکیبات فعال چون crocetin، crocin، انواع دیگری از کارتنوئیدها در زعفران وجود دارد که می‌توانند حالت توموری بافت‌ها را کاهش داده و یا شروع حالت سرطان‌زایی این گونه بافت‌ها مانند کارسینومای کبد انسان را به تأخیر بیندازد. این ترکیبات، چربی سرم خون (حالت Hypolipemic) را کاهش داده و اکسیژناسیون بافت‌ها را افزایش می‌دهند. کروسین و کروسنتین به عنوان رادیکال‌های آزاد با

هرچند که کیتینازهای گیاهی برخلاف کیتینازهای قارچی فقط رأس (نوک) هیف‌های قارچ پاتوژن را تحت تأثیر قرار می‌دهند و قادر به تجزیه ساختارهای سخت کیتینی نیستند (Harighi et al., 2006; Limon et al., 1995). اما به علت این‌که کیتین در مهره‌داران یافت نمی‌شود، پیشنهاد گردید که از خاصیت مهارکنندگی کیتیناز در درمان عفونت‌های قارچی استفاده شود. خطر بالقوه بیماری‌های همه‌گیر محصولات زراعی از جمله بیماری‌های قارچی امروزه نیز وجود دارد. آنچه در روش‌های جدید مهندسی ژنتیک نیاز است، ارائه ژن‌های جدید کد کننده خواص ضد میکروبی و قارچی با منشأ گیاهی هست. کیتینازها یکی از این کلاس‌های ژنی هست. نشان داده شده است که تغییرات دیگر از جمله جهش‌زایی در عناصر تنظیمی و یا وارد کردن دو نسخه از ژن به ژنوم میزبان در افزایش بیان ژن کیتیناز نقش دارند. پس بررسی منابع موجود این آنزیم در گیاهان می‌تواند برای معرفی ژن‌های جدید برای ایجاد مقاومت ضد قارچی و حتی استفاده‌های تجاری از این آنزیم با استخراج از منابع طبیعی از جمله گیاهان مفید باشد. کیتینازها، به‌طور گسترده‌ای در قلمرو گیاهی توزیع شده و نقش‌های مختلف از جمله واکنش‌های دفاعی را بر عهده دارند. کیتینازها توسط تشابه توالی به هفت گروه تقسیم‌بندی شدند که کلاس‌های I, II, IV و VII آنزیم‌های کیتیناز با منشأ گیاهی هستند و شامل خانواده ۱۹ از Glycosyl-hydrolases که فقط در گیاهان یافت شده‌اند (Henrissat & Bairoch, 1993). آنزیم‌های کیتیناز در کلاس‌های III, V و VI شامل خانواده ۱۸ از Glycosyl-hydrolase و در طیف گسترده‌تری از موجودات، از جمله باکتری‌ها، قارچ‌ها، گیاهان، حشرات، پستانداران و ویروس‌ها توزیع شده‌اند (Collinge et al., 1993; Hollis et al., 1996; Neuhaus et al., 2000).

با پیشرفت علم ژنتیک، ژن به عامل اصلی در برنامه‌ریزی عملکرد سلول و به دنبال آن کنترل

مبارزه با بیماری‌های قارچی با استفاده از فنون مهندسی ژنتیک، افزایش بیان آنزیم‌های هیدرولازی، خصوصاً کیتینازها و گلوکانازها در گیاهان بوده به-طوری‌که این آنزیم‌ها فعالیت ضد قارچی مناسبی را در شرایط آزمایشگاهی از خود نشان داده‌اند (Esfahani et al., 2011). گیاه زعفران دارای ژن کیتیناز بوده که در این تحقیق سعی شده است ژن کیتیناز زعفران با ژن بعضی از گیاهان و قارچ‌های مختلف دیگر مورد بررسی قرار گیرد.

کیتین دومین بیوپلیمر فراوان در طبیعت بعد از سلولز و جزء اصلی کوتیکول حشرات و پوسته سخت پوستان است. کیتین، دیواره سلولی بیشتر قارچ‌ها و بعضی از جلبک‌ها و نماتدها را تشکیل می‌دهد. کیتینازها از آنزیم‌هایی هستند که نقش تجزیه کیتین نامحلول را بر عهده دارند. باکتری‌ها کیتیناز را برای هضم کیتین تولید می‌کنند، اصولاً آن‌ها از کیتین به‌عنوان منبع کربن و انرژی استفاده می‌کنند (Harighi et al., 2006; Esfahani et al., 2011).

با توجه به اینکه پلی ساکارید نامحلول کیتین بخشی از اسکلت خارجی حشرات و نماتدها و دیواره سلولی قارچ‌ها را تشکیل می‌دهد، به‌عنوان یک هدف انتخابی در آنترل بیولوژیک پاتوژنهای گیاهی، قارچی و نماتدها می‌باشد. در این زمینه آنزیم کیتیناز می‌تواند به‌صورت بالقوه به‌عنوان یک آفت‌کش بیولوژیکی برای کنترل آفات عمل نماید (Harighi et al., 2006; Esfahani et al., 2011).

آنزیم‌های کیتینازی با شکستن پیوندهای گلیکوزیدی β -1,4 میان زیر واحدها، پلیمر کیتین را به اجزای سازنده‌اش تجزیه می‌کنند (Cohen-Kupiec et al., 1998; Limon et al., 1995). این آنزیم‌ها در طیف وسیعی از موجودات زنده از قبیل باکتری‌ها، قارچ‌ها، گیاهان عالی، حشرات، سخت‌پوستان دریایی و برخی از مهره‌داران یافت می‌شوند (Chao-Yun et al., 2001; Kuranda & Robbins, 1991; Rojas-Avelizapa et al., 1999).

زعفران با استفاده از نرم افزارهای بیوانفورماتیکی موجود در مقایسه با سایر انواع شناخته شده آنزیم کیتیناز هست.

مواد و روش‌ها:

توالی‌ها:

توالی‌های کد کننده مربوط به این خانواده ژنی از موجودات مختلف، شامل گونه‌های گیاهی متفاوت، قارچ‌ها و مخمر از بانک داده‌های NCBI از زیر بخش Nucleotide و با کلمات کلیدی Chitinases با فرمت FastA جمع‌آوری شدند. این پایگاه داده‌ای با آدرس زیر در دسترس است: www.ncbi.nlm.nih.gov

بررسی و طبقه‌بندی ارتباط فیلوژنتیکی کیتیناز موجود در گیاه زعفران در مقایسه با گیاهان دیگر و قارچ‌ها و مخمر با استفاده از رسم درخت فیلوژنی:

معمولاً توالی نوکلئوتیدی دمین کاتالیزوری این آنزیم‌ها به منظور بررسی روابط تکاملی میان طبقات مختلف آنزیم کیتیناز استفاده می‌شود. در این روش کیتینازهای گیاهی به‌طور عمده با تکیه بر حضور دمین‌های مهمی از جمله، دمین غنی از سیستئین (Cystein Rich Domain or CRD) و انتهای کربوکسیل توسعه یافته (Carboxy Terminal Extension or CTE) در ناحیه کاتالیزوری طبقه‌بندی می‌شوند. بر همین اساس در این پژوهش با استفاده از نرم افزار Meg align موجود در بسته نرم افزاری DNA STAR، ارتباطات بین کیتینازهای موجود در گونه‌های گیاهی مختلف و همچنین قارچ‌ها و مخمر تعیین شد.

تعیین دمین‌های مهم و مناطق مهم کاتالیزی در توالی اسید آمینه‌ای ژن کیتیناز جداسازی شده از *C. sativus*:

ویژگی‌های موجود زنده شناخته شد. به این ترتیب تمایل برای شناخت هر چه بیشتر ژن‌ها به منظور توجیه پدیده‌های زیستی افزایش یافت؛ تا حدی که در چند دهه‌ی اخیر، تجهیزات مورد نیاز در تحقیقات مولکولی به‌طور گسترده‌ای افزایش یافته است و امروزه تحقیقات مولکولی جزء مطالعات رایج آزمایشگاه‌های زیستی شده است. اطلاعات به‌دست آمده از تحلیل داده‌های زیستی به‌وسیله علم بیوانفورماتیک، در به خط کردن توالی‌ها در بانک‌های اطلاعاتی برای یافتن شباهت‌ها و تفاوت‌های ژنی، پیش‌گویی ساختار و عملکرد محصولات ژن‌ها و یافتن ارتباط فیلوژنتیک میان ژن‌ها و توالی‌های پروتئینی کمک می‌کند (Hadizadeh et al., 2014). همچنین امروزه فن‌آوری‌های امیکس طلایه‌دار روش‌های جدیدی هستند که برای کاوش در ترانسکریپتوم، پروتئوم، متابولوم و دیگر سطوح کارکردی ژنوم به کار می‌روند. این فن‌آوری‌ها با روشن نمودن نحوه فعالیت ژنوم در یک شرایط تکاملی یا محیطی خاص، تعیین روابط بین ژن‌ها، شناسایی نقش بخش‌های کد کننده و غیر کد کننده ژنوم و مشخص نمودن نقاط کلیدی تنظیم فرآیندهای تکاملی و پاسخ به عواملی درونی و بیرونی گیاه، علاوه بر ایجاد تصویری جامع و روشن از نحوه فعالیت ژنوم، راه را برای دست ورزی ژنتیکی و مهندسی گیاهان در جهت بهبود صفات مورد نظر هموارتر و روشن‌تر می‌نمایند (Fleury et al., 2011; Urano et al., 2010).

داده‌های خام کتابخانه‌ها و جزئیات مربوط به هر کدام را می‌توان از پایگاه‌های داده مختلف همچون NCBI، TGI، PlandGDB و غیره به دست آورد. وجود این منابع غنی اطلاعات در کنار در دسترس بودن سرویس‌ها و نرم افزارهای مختلف بیوانفورماتیک راه را برای مطالعه و بررسی تغییرات ژنومی هموار نموده است (Ogata & Suzukim, 2011). هدف از این پژوهش نیز بررسی جنبه‌های مختلف بیوانفورماتیکی ژن کیتیناز تولید شده در پیاز گیاه

استفاده از شبکه موجود در گیاه آراییدوپسیس برای این آنزیم در گیاه زعفران به تصویر کشیده شد.

نتایج:

درخت فیلوژنی برای مشخص شدن ارتباط کیتیناز گیاه زعفران (SafchiA) در مقایسه با گیاهان دیگر و موجودات دیگر از جمله قارچ‌ها و مخمر رسم شد (شکل شماره ۱).

بر اساس نتایج به دست آمده از مقایسه مطرح شده در شکل شماره (۱)، جدول شماره (۱) برای روشن تر شدن مطلب ارائه گردیده است. کیتینازهای گیاهی از جمله کیتیناز جدا شده از گیاه زعفران، بر اساس وجود یا عدم وجود دو دمین (CRD,CTE)، تقسیم‌بندی شدند، تعدادی از آن‌ها در گروه I طبقه‌بندی شدند، اما تعدادی از این توالی‌ها با وجود اینکه دارای تفاوت‌هایی بودند به دلیل شباهت بالایی که با گروه I نشان دادند در گروه I* قرار گرفتند. کلاس II به دست آمده این توالی‌ها شامل گیاهانی بود که ژن کیتیناز آن‌ها فاقد دو منطقه ذکر شده بودند (Beintema, 1994; Leah et al., 1991; Nishizawa et al., 1993). کلاس دیگر معرفتی شده در جدول شماره (۱)، کلاس IV بود که شامل توالی‌های دارای یکی از این مناطق ولی فاقد منطقه دیگر بودند. باقیمانده توالی‌ها در گروه III قرار گرفتند که فاقد هر گونه توالی حفاظت شده در دمین‌های معرفتی شده، بودند؛ اما نکته قابل توجه در مورد این گروه از توالی‌ها شباهت قابل توجه‌شان با کیتینازهای گروه قارچ‌ها و مخمر بود.

با استفاده از سرویس‌های آنلاین پایگاه داده‌های NCBI و زیر بخش Conserved domains موتیف‌های حذف شده بر روی توالی ژن کیتیناز جداسازی شده از *C.sativus* مشخص شد.

پیش‌بینی ساختارهای دوم و سوم پروتئینی موجود در توالی اسید آمینه‌ای ژن کیتیناز جداسازی شده از *C.sativus*:

با استفاده از پایگاه داده‌های Expasy tools و استفاده از بخش پیشگویی ساختار دوم، PSIPred، ساختار دوم و با استفاده از بخش پیشگویی ساختار سوم، SWISS-MODEL، ساختار سوم پروتئینی مورد نظر برای آنالیزهای بعدی در دسترس قرار گرفته است.

بررسی واکنش آنزیم کیتیناز جداسازی شده از *C.sativus*

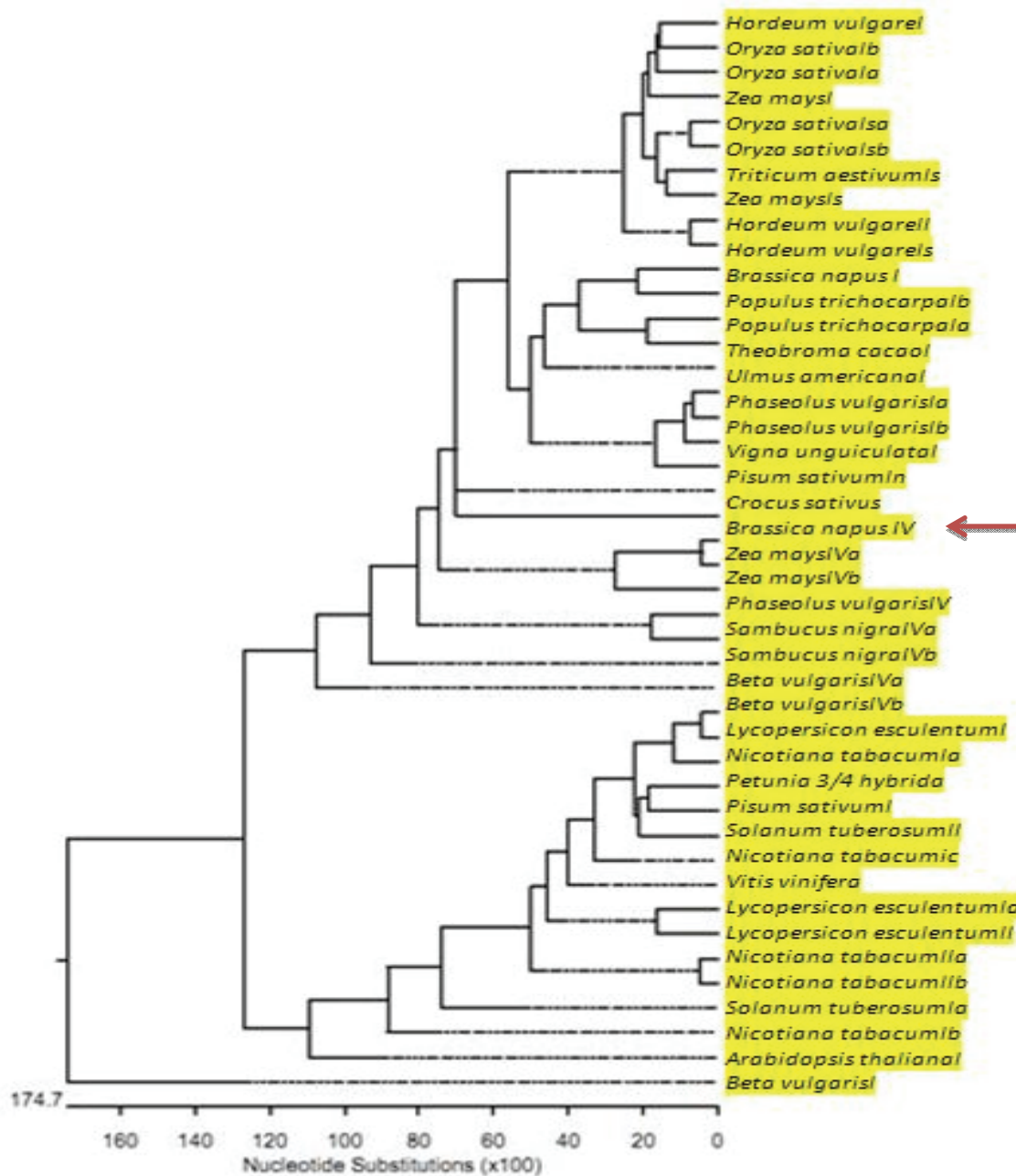
با استفاده از ساختمان سوم پیش‌بینی شده برای توالی شناخته شده، جایگاه واکنش کیتین بر روی این آنزیم مورد بررسی قرار گرفت. برای این پیش‌بینی از زیر بخش SwissDock در Expasy tools استفاده شد؛ و در نهایت از نرم افزار Chimera 1.5.3 برای تعیین بهترین حالت ممکن بر اساس Docking پروتئینی اعلام شده، استفاده شد.

پیش‌بینی شبکه پروتئینی کیتیناز جداسازی شده از *C.sativus* بر اساس مدل‌سازی در گیاه آراییدوپسیس:

با استفاده از امکانات سرویس آنلاین با آدرس اینترنتی <http://www.genemania.org>، شبکه پروتئینی برای نشان دادن پروتئین‌های مرتبط و همکار در فرآیندهای مربوط به آنزیم کیتیناز با

جدول ۱- طبقه‌بندی گونه‌های گیاهی و توالی‌های کیتیناز شده در این مطالعه.

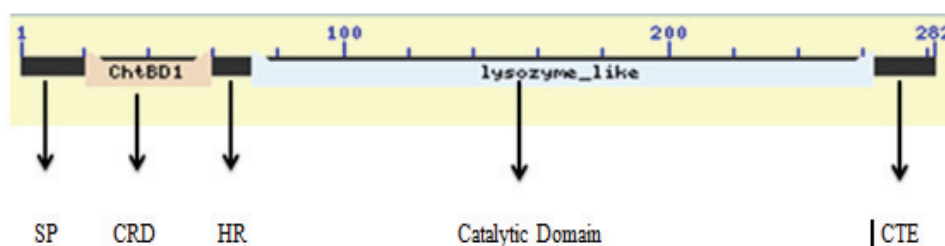
Class	subclass	family	species	Common name	Class of chitinases	Gen bank Accession No.				
Magnoliopsida	Aseridae	caprifoliaceae	<i>Sambucus nigra</i>	European elder	IV	(a) Z46948, (b) Z46950				
		solanaceae	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Tomato	I	Z15140				
					II	(a) Z15141, (b) Z15139				
		solanaceae	<i>Nicotiana tabacum</i>	Tobacco	I	(a) X16938, (b) X64519				
					II	(c) X64518				
					III	(a) M29868, (b) M29869				
					II	(a) Z11563, (b) Z11564				
		solanaceae	<i>Petunia × hybrida</i>	Petunia	II	X51427				
					<i>Solanum tuberosum</i>	Potato	I	(a) X15494, (b) X14133		
		Caryophyllidae	Chenopodiaceae	<i>Beta vulgaris</i>	Beet	I	X79301			
						III	S6603			
						IV	(a) A23392, (b) L25826			
	Dilleniidae		Brassicaceae	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Thale cress	I	M38240			
						III	M34107			
						<i>Brassica napus</i>	Rape	I	M95835	
			Cucurbitaceae	<i>Cucumis sativus</i>	Cucumber	IV	X61488			
						III	(a), (b), (c) M84214			
						<i>Populus trichocarpa × P. deltoides</i>	Poplar	I	(a) M25336, (b) M25337	
	Sterculiaceae		<i>Theobroma cacao</i>	Cacao	I	U30324				
	Hamamelidae		Ulmaceae	<i>Ulmus americana</i>	American elm	I	L22032			
			Rosidae	Fabaceae	<i>Cicer arietinum</i>	Chick pea	III	X70660		
	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Kidney bean			I	(a) M13968, (b) S43926				
					IV	X57187				
	<i>Pisum sativum</i>	Pea			I	(a) X63899				
	<i>Psophocarpus tetragonolobus</i>	Winged bean			I	(b) L37876				
	<i>Vigna angularis</i>	Adzuki bean			III	D49953				
	<i>Vigna unguiculata</i>	Cowpea			III	D11335				
	<i>Vigna unguiculata</i>	Cowpea			I	X88800				
	Vitaceae	<i>Vitis vinifera</i>	Grapevine	III	X88801					
	Liliopsida	Commelinidae	Poaceae	<i>Hordeum vulgare</i>	Barley	I	Z54234			
						I	(a) U02287			
						II	(b) L34211			
<i>Oryza sativa</i>						Rice	I	M62904		
I						(a) X54367, (b) X56063				
I						(c) L37289, (d) X56787				
<i>Triticum aestivum</i>						Wheat	I	X76041		
<i>Zea mays</i>						Maize	I	(a) L16798		
I						(b) L00973				
IV						(a) M84164, (b) M84165				
Asparagales						Iridaceae	<i>Crocus sativus</i>	saffron	New class	ACC68684.1



شکل ۱- درخت فیلوژنی ساخته شده بر اساس توالی‌های به دست آمده کیتینازهای Fam19 از بانک داده‌های NCBI و با استفاده از روش ClustalW موجود در بسته نرم‌افزاری DNASTAR. شماره دسترسی به توالی‌های به دست آمده از بانک داده‌های NCBI در ردیف آخر جدول شماره (۱) موجود است.

دمین مهم، دمین متصل شونده به کیتین (chtBD1)، دمین کاتالیز کننده مشابه لیزوزیم (Lysozyme-like) که نقش کاتالیتیکی را بر عهده دارد، هست.

توالی کامل اسیدآمین به دست آمده از SafchiA ساختار کلاس I آنزیم کیتیناز معمولی را نشان داد؛ دمین‌های مهم موجود در کیتیناز جداسازی شده از گیاه زعفران در شکل (۲) آمده است که شامل دو



شکل ۲- شکل شماتیک دومین‌های مشخص شده برای ساختار اسیدآمینوهای کیتیناز جداسازی شده از گیاه زعفران: SP: سیگنال پروتئینی، CTE: دنباله کربوکسیل توسعه‌یافته، CRD: دومین غنی از سیستئین، HR: منطقه لولا. این ساختار با استفاده از زیر بخش Conserved Domain پایگاه داده‌ی NCBI به دست آمده است.

در کیتیناز موجود در زعفران نیز اسید گلوتامیک است که به عنوان دهنده پروتون و در سیستم کاتالیزی اسید و باز به عنوان سیستم اصلی مورد استفاده در واکنش تجزیه به کار گرفته می‌شود. در ادامه مقایسه توالی اسیدآمینو با توالی‌های که از Chitinases قبلاً از گیاهان تک لپه و دو لپه منتشر شده، نشان می‌دهد که کیتیناز جداسازی شده از گیاه زعفران شامل دو حذف در دامنه کاتالیزوری است. اولین حذف در موقعیت ۱۶۴ و دومین حذف در موقعیت ۱۷۲، یکی از آن‌ها تا حدودی با حذف ارائه شده در برخی از آنزیم‌های کلاس II که البته به نسبت حذف موجود در کیتیناز زعفران بزرگ‌تر هستند، شباهت دارد، حذف دیگر در هیچ یک از توالی‌های مقایسه شده، مطابقتی ندارد. از طرف دیگر در موقعیت ۱۶۶ در کیتیناز موجود در زعفران اسیدآمینو هیستیدین وجود دارد و این در صورتی است که در سایر کیتینازها تیروزین وجود دارد که به دلیل وجود حلقه‌های ایمیدازولی موجود در هیستیدین فضای مناسبی برای فعالیت کاتالیتیکی ایجاد می‌شود که در صورت جایگزینی آن با اسیدآمینوهای دیگر مثل تیروزین این خصوصیت از بین می‌رود.

۲۰ اسیدآمینو موجود در انتهای N، خصوصیات سیگنال پروتئینی را به نمایش می‌گذارد. در ادامه ۳۸ اسیدآمینو در دومین متصل شونده به کیتین وجود دارد که حاوی ۸ اسیدآمینو سیستئین حفاظت شده، هستند. دومین حاوی سیستئین (دومین باند شونده به کیتین) و دومین کاتالیتیکی به وسیله یک منطقه جدا کننده از هم جدا شده‌اند. بر اساس مقایسات انجام شده همچنین مشخص شده است که در دومین کاتالیزوری کیتیناز جداسازی شده از زعفران (شکل ۳)، در مقایسه با دومین کاتالیزوری کیتیناز شناخته شده در سایر کیتینازهای شناخته شده، در موقعیت ۱۳۶ به جای اسیدآمینو گلوتامیک اسید، تیروزین و در موقعیت ۶۷ گلوتامیک اسید وجود دارد، این گلوتامیک اسید که به آن اشاره شد در کیتینازها به عنوان یک اسیدآمینو مهم در فعالیت کاتالیتیکی مطرح است. در موقعیت اسیدآمینو ۱۴۲، آسپارات وجود دارد که در فعالیت گلیکوزیلاسیون این آنزیم نقش مهمی دارد و تغییر در آن به صورتی که در کیتینازهای دیگر گزارش شده است موجب عدم نقش آفرینی آن در گلیکوزیلاسیون این آنزیم می‌شود. کدون مهم بعدی، در موقعیت ۱۴۹

BAR LEY	QAKG FYYT DAFVA AAAA FPGF GTTGS ADAQ KREV AAFLA QTSHE	ETTG GWATA PDGA FAWG	83
ORY ZA	PAKN FYYT DAFVA AANA FPSF ATTGD ANTR KREV AAFLA QTSHE	ETTG GWATA PDGP YSWG	160
ALL IUM	PANG FYYT DAFIA AANS FPGF GTTGD INAQ KREL AAFFA QTSHE	ETTG GYPSA PDGP YAWG	159
FRA GARI A	KGNG FYKY DAFVS AARS FNGF GTTGD VATQ KREL AAFLG QTSHE	ETTG GWPSA PDGP YAWG	102
PHA SEOL US	PARG FYYT DAFIA AAKS YPSF GNTGD TATR KREI AAFLG QTSHE	ETTG GWATA PDGP FAWG	178
GAL EGAI A	QKKG FYSY DAFIS AAKA FPNF GNNGD TATK KREV AAFLG QTSHE	ETTG GWPTA PDGP YAWG	154
PIC EA	PAKG FYYT SAFTA AAKS FPDF GNNGD LETS KREL AAFFG QTAQ	ETTG GWATA PDGP YAWG	118
SAF CHIA	PARG FYYT DAFVA AANS FPGF AAVGD MDNQ KRDV AAFLA QSSH	YTTG GWPDA PDGP FAWG	153
	... **.*.***: ** :: *. * . *::*:***.***: ****:. *** :***		
BAR LEY	YCFK QERG --ASS DYCT PSAQ WPCAP GKRY YGRG PIQLS	HNYN YGPA GRAIG VDLL ANPD	141
ORY ZA	YCFK EENN GNNGS DYCV QSSQ WPCAA GKKY YGRG PIQIS	YNYN YGPA GQAIG SNLL SNP	220
ALL IUM	YCFK QERG --NPS DYCC ASAQ YPCAP GKKY YGRG PIQIS	YNYN YGQC GNAIH QDLL NNPD	217
FRA GARI A	YCFI EEL --NEA VYCT PSAQ YPCAA GKKY YGRG PIQLT	HNYN YGPA GKAIG VDLI NNPD	159
PHA SEOL US	YCFV EELN ---PG TYCS ATPQ FPCAP GQQY YGRG PIQLS	WNYN YGQC GRAIG VDLL NNPD	235
GAL EGAI A	YCFI EELN ---PS DYCC SSSQ FPCAS GKKY YGRG PIQIS	WNYN YGPC GRAIG VDLL NNPD	211
PIC EA	YCFK EENS -----ADRY HGRG PIQLT GDYN YKAA	GDALG YDLI NNPD	160
SAF CHIA	FCYF LEDA -----FP HNHK NSPA R-----		172
	:*:	:. :. :	.
BAR LEY	LVAT DATV GFKTA IWFWM TQA PPKPS SHAV IAGQ WSPSG	ADRA AGRV PGFGV ITNI INGG	201
ORY ZA	LVAS DATV SFKTA FWFWM TPQ SPKPS CHAV MTGQ WTPNG	NDQA AGRV PGYGV VTNI INGG	280
ALL IUM	LVAT DPTI SFKTA IWFWM TQA PPKPS CHAV ATGQ WQPSA	ADQA AGRV PGFGV ITNI INGG	277
FRA GARI A	LVAT DPVI SFKTA IWFWM TPQ GNKPS SHDV I TGRWN	PSA ADRS AGRV PGYGV ITNI INGG	219
PHA SEOL US	LVAT DSVI SFKSA LWFWM TQA PPKPS SHDV I TSWR	WTPSS ADVA ARRL PGYGT VTNI INGG	295
GAL EGAI A	LVAT DPVI SFKTA LWFWM TPQ SPKPS CHDV I TGG	WKPS ADRA AGRV PGYGV VTNI INGG	271
PIC EA	LTVT DATV SFKTA VWFWM TPQ SPKPS CHDV ILGR	WSPSD TDTA AGRV PGYGM VTNI INGG	220
SAF CHIA	EVPT NATL SFEKA ISFW MTER PPKPS CHDV MSGM	WMP TI TDVS QGRL PGFGL TINI MNGR	232
	* : : : : : * : * . * * * : * * * * . * * . * : * : * * : * : * * * * * * * * *		

شکل ۳- توالی اسیدآمینه‌ای پیش‌بینی شده در دمین کاتالیتیکی ژن کیتیناز جداسازی شده از زعفران در مقایسه با کیتینازهای سایر گیاهان. گلوتامیک اسیدهای موجود در موقعیت‌های ۶۷، ۸۹ و توالی‌های اطراف آن‌ها در *H. vulgare* و همولوگ‌هایشان در دیگر گیاهان و گلوتامیک اسید موقعیت ۱۴۹ در *SafchiA* که در کاتالیز نقش دارند، در این شکل نشان داده شده است. این ردیف آرایشی با استفاده از

روش ClustalW موجود در بسته نرم‌افزاری DNASTAR انجام شده است. *Oryza: Oryza sativa* class I chitinase.

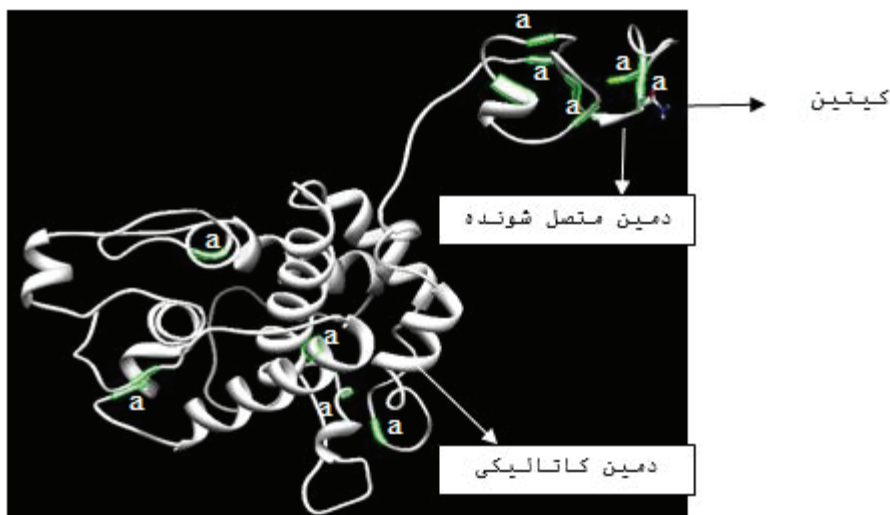
(AAC37516); barley: *Hordeum vulgare* class II chitinase (CAA55345); Phaseolus: *Phaseolus vulgaris* class I chitinase (AAB23263); Picea: *Picea abies* class IV chitinase (AAT09427); GalegaA: *Galega Orientalis* class Ia chitinase AAP030).

خانواده ۱۹ گلیکوزیل هیدرولازها، ساختارهای دوم موجود به صورت مارپیچ‌های آلفا می‌باشد که به تعداد ۱۲ عدد وجود دارند که در تعدادی از آن‌ها فقط یک دور مارپیچ دیده می‌شود، این مارپیچ‌ها در مناطق میانی و بخصوص در دمین کاتالیزوری وجود دارند و با فضای فیزیکی فراهم‌شده توسط آن‌ها، شرایط لازم برای انجام فرآیند هیدرولازی با استفاده از سیستم اسید و باز، فراهم می‌شود. البته در مناطق خارج از این مارپیچ‌ها و در برخی نواحی بین مارپیچ‌های آلفا و بخصوص در منطقه نزدیک به انتهای آمینی اسیدآمینه‌های سیستمین با فراوانی بالایی در دمین متصل شونده به کیتین برای اتصال مناسب سوبسترای این آنزیم در کیتیناز جداسازی شده از زعفران وجود دارد.

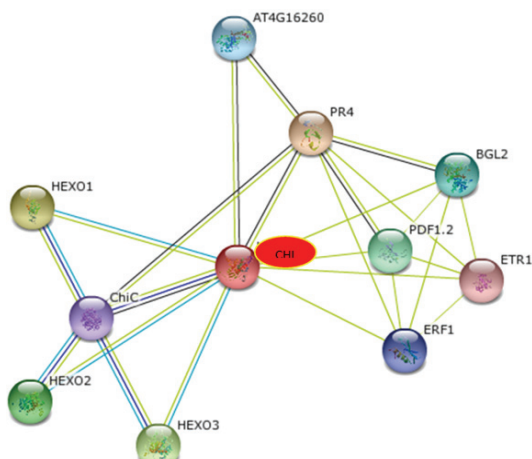
از دیگر اسیدآمینه‌های مهم در فعالیت کاتالیتیکی کیتیناز موجود در جو می‌توان به گلوتامیک اسید ۸۹ اشاره کرد که در کیتیناز موجود در زعفران در موقعیت ۱۵۷ قرار گرفته است. در موقعیت ۲۴۵، کدون موجود تیروزین می‌باشد که وجود آن باعث افزایش فعالیت هیدرولازی می‌شود. بر اساس همین تفاوت‌های مشاهده‌شده در دمین کاتالیتیکی، کیتیناز جداسازی شده از زعفران در گروه‌های دیگر کیتینازی جداسازی شده قرار نمی‌گیرد و به این ترتیب گروه جدیدی از کیتینازهای خانواده ۱۹ را در گیاهان نشان می‌دهد (Andersen et al., 1997; Brameld, 1998; García-Casado et al., 1998; Kezuka et al., 2004). پیش‌بینی ساختارهای دوم پروتئینی که برای کیتیناز جداسازی شده از زعفران انجام شده است، نشان می‌دهد که مشابه با دیگر کیتینازهای موجود در

افزایش فعالیت کاتالیتیکی کیتیناز به‌عنوان یک ضد قارچ می‌شود. در شکل (۴) نواحی حاوی اسیدآمینه‌های سیستئین حفاظت‌شده مشخص شده‌اند.

یکی از عملکردهای مهم اسیدآمینه‌های سیستئین، ایجاد باندهای دی سولفیدی است که در شکل‌گیری فضای مناسب برای اتصال کیتین مهم هستند و باعث



شکل ۴- اسیدآمینه‌های مشخص شده در شکل با رنگ سبز (a)، سیستئین‌های موجود در ساختار کیتیناز جداسازی شده از زعفران می‌باشد، به‌صورت حفاظت‌شده و به‌صورت غالب در قسمت انتهایی آمین وجود دارند؛ که بر اساس نتایج داکینگ ارائه شده برای این واکنش، بهترین حالت برای اتصال کیتین به آنزیم کیتیناز منطقه دارای سیستئین‌های حفاظت‌شده می‌باشد.



بر اساس شبکه پروتئینی موجود که بر اساس مدل‌سازی در گیاه آرابیدوپسیس ارائه شده است، شکل (۵)، آنزیم کیتیناز با پروتئین‌های مهمی که بخشی از آن‌ها مرتبط با دفاع سلولی هستند، ارتباط مؤثری را برقرار کرده است، لیست پروتئین‌های موردنظر و نقش آن‌ها در جدول (۲) آمده است.

شکل ۵- شبکه پروتئینی قابل پیشگویی بر اساس توالی پروتئینی کیتیناز جداسازی شده از زعفران با استفاده از مدل‌سازی آن در گیاه مدل آرابیدوپسیس.

جدول ۲- پروتئین‌های معرفی شده با عملکرد مربوط به آن‌ها در شبکه پروتئینی مرتبط با آنزیم کیتیناز بر اساس مدل‌سازی با استفاده از گیاه آراییدوپسیس.

PR4	hevein-like protein; Fungal growth inhibitors
HEXO1	beta-hexosaminidase 1; Has a broad substrate specificity. Can use synthetic substrates such as pyridylaminated chitotriose, pyridylaminated chitobiose, p-nitrophenyl-beta-N-acetylglucosaminide, p-nitrophenyl-2-acetamido-2-deoxy-beta-D-glucopyranoside (pNP-GlcNAc), p-nitrophenyl-2-acetamido-2-deoxy-beta-D-galactopyranoside (pNP-GalNAc), 4-methylumbelliferyl-2-acetamido-2-deoxy-beta-D-glucopyranoside (MU-GlcNAc), and 4-methylumbelliferyl-6-sulfo-2-acetamido-2-deoxy-beta-D-glucopyranoside (MU-GlcNAc-6SO(4)) as substrates. Removes terminal GlcNAc residues from alpha1,3- and alpha1,6-
HEXO3	beta-hexosaminidase 3; Has a broad substrate specificity. Can use synthetic substrates such as pyridylaminated chitotriose, p-nitrophenyl-beta-N-acetylglucosaminide, p-nitrophenyl-2-acetamido-2-deoxy-beta-D-glucopyranoside (pNP-GlcNAc), p-nitrophenyl-2-acetamido-2-deoxy-beta-D-galactopyranoside (pNP-GalNAc), 4-methylumbelliferyl-2-acetamido-2-deoxy-beta-D-glucopyranoside (MU-GlcNAc), and 4-methylumbelliferyl-6-sulfo-2-acetamido-2-deoxy-beta-D-glucopyranoside (MU-GlcNAc-6SO(4)) as substrates. Removes terminal GlcNAc residues from alpha1,3- and alpha1,6-mannosyl branches of biantennary N-glycans.
HEXO2	beta-hexosaminidase 2; Has a broad substrate specificity. Can use synthetic substrates such as p-nitrophenyl-beta-N-acetylglucosaminide, p-nitrophenyl-2-acetamido-2-deoxy-beta-D-glucopyranoside (pNP-GlcNAc), p-nitrophenyl-2-acetamido-2-deoxy-beta-D-galactopyranoside (pNP-GalNAc), 4-methylumbelliferyl-2-acetamido-2-deoxy-beta-D-glucopyranoside (MU-GlcNAc), and 4-methylumbelliferyl-6-sulfo-2-acetamido-2-deoxy-beta-D-glucopyranoside (MU-GlcNAc-6SO(4)) as substrates. Removes terminal GlcNAc residues from alpha1,3- and alpha1,6-mannosyl branches of biantennary N-glycans.
PDF1.2	plant defensin 1.2; Confers broad-spectrum resistance to pathogens. Has antifungal activity in vitro
BGL2 AT4G16260	beta-1,3-glucanase 2; Implicated in the defense of plants against pathogens catalytic/ cation binding / hydrolase
ERF1	ethylene response factor 1; Acts as a transcriptional activator. Binds to the GCC-box pathogenesis-related promoter element. Involved in the regulation of gene expression during the plant development, and/or mediated by stress factors and by components of stress signal transduction pathways. Seems to be a key integrator of ethylene and jasmonate signals in the regulation of ethylene/jasmonate-dependent defenses. Can mediate resistance to necrotizing fungi (<i>Botrytis cinerea</i> and <i>Plectosphaerella cucumerina</i>) and to soil borne fungi (<i>Fusarium oxysporum</i> conglutinans and <i>Fusarium</i>).
ChiC	class V chitinase
ETR1	ETHYLENE RESPONSE 1; Ethylene receptor related to bacterial two-component regulators. Acts as a redundant negative regulator of ethylene signaling

بحث

که در برابر اثر آنزیم‌های هیدرولازی قرار می‌گیرد. از این‌رو، بسیاری از آنزیم‌های هیدرولازی به‌ویژه آنزیم‌های کیتینازی، وظیفه اختصاصی از بین بردن اجزای تشکیل دهنده دیواره قارچی را بر عهده می‌گیرند (Harighi et al., 2006). مطالعات نشان می‌دهد که کیتینازهای گیاهی حاوی اسیدآمینوهای سیستئین حفاظت شده‌ای هستند که در تشکیل ساختار پروتئینی اصلی و فعالیت آنزیمی مهم هستند. این اسیدآمینوها، پل دی سولفیدی تشکیل‌دهنده

قارچ‌ها یکی از عوامل مهم بیماری‌زا در گیاهان زراعی مختلف می‌باشند. یکی از راه‌های کنترل بیماری‌های قارچی، محدود کردن رشد قارچ‌ها در ریزوسفر گیاه می‌باشد. از مؤثرترین روش‌های مورد استفاده می‌توان از ژن‌های کیتینازی در گیاه جهت تولید آنزیم‌های کیتینازی نام برد. این آنزیم‌ها، غالباً با فرو پاشیدن اجزای ساختاری قارچ‌ها، به مبارزه با این عوامل بیماری‌زا می‌پردازند. در میان اجزای ساختاری قارچ، دیواره قارچی، نخستین و مهم‌ترین سدی است

سامانه‌ای دفاع مستحکم‌تری را در برابر قارچ‌ها و در زمان مناسب از خود بروز دهند؛ و این بیانگر این مسئله است که کشاورزی امروزی می‌تواند با بهره‌گیری از فناوری‌های نوین از جمله انتقال ژن در کنار تکامل طبیعی، تکامل توسعه‌یافته‌تر و هدفمندتری را در محصولات کشاورزی در برابر میکروارگانیسم‌های همراه با آن‌ها از جمله قارچ‌ها فراهم کنند (Henrissat, 1990; Neuhaus, 1999; Xoconostle-Cazares et al., 2010). علی‌رغم آن‌که جداسازی ژن‌های کیتینازی و گلوکانازی از باکتری و گیاهان مختلف مانند جو، برنج، نخود و لوبیا و انتقال آن‌ها به‌تنهایی یا به‌صورت انتقال توأم به گیاهان مانند سیب‌زمینی، برنج، پنبه و توتون به‌منظور ایجاد مقاومت در برابر بیماری‌های قارچی صورت گرفته است ولی معمولاً منجر به ایجاد مقاومت در برابر طیف وسیع بیماری‌های قارچی در گیاهان تراریخته نشده‌اند (Esfahani et al., 2011). از لحاظ فعالیت ضد قارچی، آنزیم‌های تخریب‌کننده دیواره سلولی قارچ‌های آنتاگونیست مثل تریکودرما بسیار قوی‌تر از آنزیم‌های مشابه با منشأ گیاهی هستند. آنزیم‌های هیدرولازی خالص‌شده از *Trichoderma harzianum* بازدارنده قوی از بسیاری از قارچ‌های بیماری‌های گیاهی بوده و قادرند ساختارهای شکننده‌ای مثل نوک هیف تا ساختارهای محکم‌تری مانند دیواره کیتینی هیف‌های بالغ، کنیدی، کلامیدوسپور و اسکروتیا را تخریب نمایند. این آنزیم‌های تخلیص‌شده که منشأ قارچی دارند، گاهی تا ۱۰۰ برابر آنزیم‌های تخلیص‌شده از منابع دیگر مثل آنزیم‌های گیاهی فعالیت ضد قارچی داشته و برعلیه طیف وسیع‌تری از گونه‌های بیماری‌زا عمل می‌کنند به نظر می‌رسد ایجاد گیاهان تراریخته با استفاده از این آنزیم‌های قارچی، سطح تحمل بالاتری در گیاهان زراعی بر علیه انواع قارچ‌های بیماری‌زا ایجاد نماید و برخلاف ژن‌های با منشأ گیاهی شاید به‌تنهایی هم مؤثر باشند. مطالعات همچنین نشان می‌دهد که این

حلقه را در ساختار سوم پروتئین به وجود می‌آورند. در *SafchiA* حضور یک حذف اصلی باعث فقدان دو اسیدآمینه سیستئین در دامنه کاتالیزوری می‌شود که باعث تفاوت در ساختار اصلی بین این آنزیم کیتیناز و کیتینازهای کلاس I، گیاهان تک‌لپه و دولپه می‌شود. البته محققان دیگر بر این باورند که حلقه تشکیل‌شده توسط اسیدآمینه‌های سیستئین حفاظت شده برای فعالیت آنزیم کیتیناز ضروری است؛ اما اولین و دومین سیستئین حفاظت شده در دامنه کاتالیزوری از *SafchiA* برای فعالیتش ضروری نیست. بررسی‌های بیشتر برای تعیین نقش اسیدهای آمینه مختلف در دمین کاتالیزی کیتیناز زعفران با استفاده از مدل قرار دادن کیتیناز گیاه جو نشان می‌دهد که یکی از باقی‌مانده‌های اسید گلوتامیک محافظت شده دخیل در رویداد کاتالیزوری این آنزیم در کلاس‌های I و II کیتینازها توسط اسیدآمینه تیروزین (Tyr136) در کیتیناز جداسازی شده از زعفران جایگزین شده است. به‌طوری‌که جایگذاری گلوتامیک اسید در این مکان و به‌عنوان یک جهش مناسب در نزدیکی اسید گلوتامیک (Glu149) بر روی فعالیت آنزیم تأثیر می‌گذارد، ولی جهش جایگذاری دیگر که در موقعیت دوم یعنی (Glu159) بود در فعالیت آنزیم تأثیر خاصی بر جای نگذاشته است؛ بنابراین به نظر می‌رسد که تنها یک اسیدآمینه گلوتامیک اسید برای فعالیت آنزیم مذکور در زعفران نیز لازم و کافی است. از طرف دیگر تنوع به وجود آمده در کیتینازها به دلیل وجود یا عدم وجود دمین‌های مطرح‌شده از جمله دمین CTE که به‌عنوان سیگنال پروتئینی برای هدف‌یابی کیتیناز برای ورود به واکوئل ضروری هست طبقه‌بندی دیگری را برای ما روشن می‌سازد که بر اساس آن کیتینازهای فاقد این سیگنال به دلیل ترشح به داخل فضای بین سلولی نقش فعال‌تری در دفاع ضد قارچی به‌صورت سامانه‌ای در گیاه دارند؛ و از طرف دیگر به دلیل وجود این سیگنال کیتینازهایی که به درون فضای واکوئل وارد می‌شوند، سلول‌ها می‌توانند به دلیل داشتن چنین

برگرفته از گیاهان، باکتری‌ها و قارچ‌ها بر علیه قارچ‌ها، پیشنهاد می‌شود که ابراز توأم دو یا چند تراژن ضد قارچ از جمله کیتیناز و گلوکاناز برگرفته از قارچ‌های آنتاگونیست در زعفران که خود نیز دارای ژن کیتیناز مؤثری می‌باشد، به دلیل اثر هم‌افزایی آن‌ها می‌تواند مؤثرتر از خود تک ژن موجود در زعفران باشد.

آنزیم‌ها سمی نبوده و اثر مضر بر گیاهان و جانوران ندارند (Esfahani et al., 2011). همچنین گزارش‌های متعددی نشان می‌دهد که ابراز توأم دو یا چند تراژن ضد قارچ از جمله کیتیناز و گلوکاناز در یک گیاه تراریخته، به دلیل اثر هم‌افزایی آن‌ها، مؤثرتر از انتقال تک ژنی آن‌ها می‌باشد (Esfahani et al., 2011). بر اساس نتایج این تحقیق و مطالعات انجام شده در زمینه تأثیرات ژن‌های گلوکاناز و کیتیناز

منابع:

- Ahrazem, O., Trapero, A., Gómez, M.D., Rubio-Moraga, A. and Gómez-Gómez, L. (2012). Genomic analysis and gene structure of the plant carotenoid dioxygenase 4 family: A deeper study in *Crocus sativus* L. and its allies. *Genomics* 96: 239-250.
- Andersen, M.D., Jensen, A., Robertus, J.D., Leah, R. and Skriver, K. (1997). Heterologous expression and characterization of wild-type and mutant forms of a 26 kDa endochitinase from barley (*Hordeum vulgare*). *Biochemistry Journal*, 322:815-822.
- Beintema, J.J. (1994). Structural features of plant chitinases and chitin-binding proteins. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. 350:159-163.
- Brameld, K.A. and Goddard, W.A. (1998). The role of enzyme distortion in the single displacement mechanism of family 19 chitinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* 95:4276-4281.
- Chao-Yun, T.S., KHAN, A.A., IA, S.J., Wu, J. and Shih, D.S. (2001). Purification, Characterization, and Molecular Cloning of a Chitinase from the Seeds of *Benincasa hispida*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 65(3), 501-509
- Cohen-Kupiec, R. and Chet, I. (1998). The molecular biology of chitin digestion. *Current Opinion in Biotechnology* 9: 270-277.
- Collinge, D. B., Kragh, K.M., Mikkelsen, J. D., Nielsen, K.K., Rasmussen, U. and Vad, K. (1993). Plant chitinases. *Plant Journal*, 3:31-40.
- Esfahani, K., Motallebi, M. and Zamani, M.R. (2011). Construction of plant expression vectors harboring chitinase (chit42) and glucanase (bgn13.1) genes from *Trichoderma* species. *Iranian Journal of Biology* 24(6): 880-894.
- Fleury, D., Jefferies, S., Kuchel, H. and Langridge, P. (2010). Genetic and genomic tools to improve drought tolerance in wheat. *Journal of Experimental Botany* 61: 3211-3222.
- García-Casado, G., Collada, C., Allona, I., Casado, R., Pacios, L.F., Aragoncillo, C. and Gómez, L. (1998). Site-directed mutagenesis of active site residues in a class I endochitinase from chestnut seeds. *Glycobiology* 8: 1021-1028.
- Hadizadeh, M., Niazi, A., Mohammad-Abadi, M., Esmailizadeh, A. and Mehdizadeh-Gazooei, Y. (2014). Bioinformatics analysis of the BMP15 exon 2 in Tali and Beetal goats. *Genetic Modern*, 9(1): 117-120
- Harighi, M.J., Motallebi, M. and Zamani, M.R. (2006). Purification of chitinase 42 from *Trichoderma atroviride* PTCC5220. *Irania Biology Journal* 19(2): 203-214
- Henrissat, B. and Bairoch, A. (1993). New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemistry Journal* 293:781-788.
- Henrissat, B. (1990). Weak sequence homologies among chitinases de-tected by clustering analysis. *Protein Sequence Data Analysis* 3:523-526
- Hollis, T., Monzingo, A.F., Bortone, K., Ernst, S., Cox, R. and Robertus, J. D. (2000). The X-ray structure of a chitinase from the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. *Protein Science* 9: 544-551.
- Kezuka, Y., Kitazaki, K., Itoh, Y., Watanabe, J., Takaha, O., Watanabe, T., Nishizawa, Y. and Nonaka, T. (2004). Crystallization and preliminary X-ray analysis of plant class I chitinase from rice. *Protein and Peptide Letters* 11:401-405.
- Kuranda, M.J. and Robbins, P.W. (1991). Chitinase is required for cell separation

- during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. The Journal of biological chemistry. 266(29):19758- 19767
- Leah, R., Tommerup, H., Svendsen, I. and Mundy, J. (1991). Biochemical and molecular characterization of three barley seed proteins with anti-fungal properties. The Journal of Biological Chemistry 266:1564–1573
- Limon, M.C., Lora, J.M., Garcia, I., De-la-Cruz, J., Liobell, A., Benitez, T. and Pintor-Toro, J.A. (1995). Primary structure and expression pattern of the 33-kDa chitinase gene from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*. Current Genetic 28: 478-483.
- Mohammadi, D. and Fazeli-nasab, B. (2014). Overview medicinal properties and hazards of saffron stigma and petals with an emphasis on the anti-tumor effects and lowers blood pressure. 2nd National Conference on Medicinal Plants and Sustainable Agriculture, University of Hamedan (in Persian with abstract english),
- Neuhaus, J. M. (1999). Plant chitinases (PR-3, PR-4, PR-8, PR-11). In SK Datta, S Muthukrishnan, eds, Pathogenesis-Related Proteins in Plants. Chemical Rubber Company Press, Boca Raton, Florida, pp 77-105.
- Neuhaus, J., Fritig, B., Linthorst, H.J.M., Meins, F.J., Mikkelsen, J.D. and Ryals, J.D. (1996). A revised nomenclature for chitinase genes. Plant Molecular Biology Reporter 14:102-104.
- Nishizawa, Y., Kishimoto, N., Saito, A. and Hibi, T. (1993). Sequence variation, differential expression and chromosomal location of rice chitinase genes. Molecular Genetics and Genomics 214: 1–10.
- Ogata, O. and Suzukim, H. (2011). Plant expressed sequence tags databases: practical uses and the improvement of their searches using network module analysis. Plant Biotechnology 28: 351-360.
- Rojas-Avelizapa, L.I., Cruz-Camarillo, R., Guerrero, M.I., Rodriguez-Vazquez, R. and Ibarra, J.E. (1999). Selection and characterization of a proteo-chitinolytic strain of *Bacillus thuringiensis*, able to grow in shrimp waste media. World journal of Microbiology and Biotechnology 15: 261-268
- Srivastava, R., Ahmed, H., Dharamveer, D.R.K., Saraf, S.A. and Crocus sativus, L. (2010). A comprehensive review. Pharmacognosy Review 4(8): 200-208.
- Urano, K., Kurihara, Y., Seki, M. and Shinozaki, K. (2010). Omics' analyses of regulatory networks in plant abiotic stress responses. Current Opinion in Plant Biology 13: 132-138.
- Xoconostle-Cazares, B., Ramirez-Ortega, F., Flores-Elenes, L. and Ruiz-Medrano, R. (2010). Drought tolerance in crop plants. American Journal of Plant Physiology 5: 241-25.