زیست فناوری گیاهان دارویی
سال اول، شماره دوم، تابستان ۱۳۹٤

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

بهمن فاضلی‌نسب[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 جایگرینی 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 برعلیه طیف وسیع‌تری از گونه‌های بیماری‌زا عمل می‌کنند. مطالعات همچنین نشان می‌دهد که این آنزیم‌ها سمی نبوده و اثر مضری 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 مؤثری می‌باشد، به دلیل اثر هم‌افزایی آن‌ها می‌تواند مؤثرتر از خود تک ژن باشد.

واژگان کلیدی: توالی، ردیف آرایی، 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

زعفران (*Crocus sativus* L.) یا طلای سرخ از خانواده Iridaceae، با ارزش‌ترین و گران‌بهاترین ادویه جهان است. گل‌های زعفران دارای سه کلاله هستند که به‌منظور تولید ادویه زعفران جمع‌آوری و خشک می‌شوند (Ahrazem et al., 2012). درواقع کلاله‌ها مهم‌ترین بخش اقتصادی گیاه می‌باشند که به شکل‌های مختلف به‌عنوان چاشنی و رنگ دهنده در تهیه غذا، در صنایع داروسازی، تولید محصولات آرایشی و مواد معطر و به‌عنوان 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 به‌عنوان یک داروی خانگی برای درمان دردهای معده گرفتگی‌های عضلانی، سرفه، گرفتگی‌های ریوی چون آسم و نیز به‌عنوان داروی آرام‌بخش (برای درمان لثه و دندان) به‌کاربرده 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 crocin، crocetin، انواع دیگری از کارتنوئیدها در زعفران وجود دارد که می‌توانند حالت توموری بافت‌ها را کاهش داده و یا شروع حالت سرطان‌زایی این‌گونه 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 کروستین به‌عنوان رادیکال‌های آزاد با خواص پاک‌کنندگی عمل کرده و خطر آسیب‌های هپاتیکی و هیپولیفمیک 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 خارج‌شده و بر روی خواص دارویی آن متمرکز گردد (Mohammadi & Fazeli-nasab, 2014).

سالانه بخش عمده‌ای از محصولات کشاورزی براثر آفات و بیماری‌های گیاهی از بین می‌روند و دراین‌بین قارچ‌ها ازجمله 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 به‌طوری‌که تولید گیاهان تراریخته‌ای که به‌صورت 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 ازجمله مهم‌ترین عوامل ایجاد خسارت در محصولات کشاورزی می‌باشند. یکی از روش‌های مبارزه با بیماری‌های قارچی استفاده از مهندسی ژنتیک برای انتقال ژن‌های رمز کننده آنزیم های 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 جداشده از گونه‌های مختلف این قارچ، بسیار مؤثرتر از آنزیم‌های جداشده از منابع دیگر می‌باشند. گسترده‌ترین پژوهش‌های صورت گرفته در بخش

مبارزه با بیماری‌های قارچی با استفاده از فنون مهندسی ژنتیک، افزایش بیان آنزیم‌های هیدرولازی، خصوصاً کیتینازها و گلوکانازها در گیاهان بوده به‌طوری‌که 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 می شوند (Chao-Yun et al., 2001; Kuranda & Robbins. 1991; Rojas-Avelizapa et al., 1999).

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 ازجمله 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 داده‌شده است که تغییرات دیگر ازجمله 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 ازجمله گیاهان مفید باشد. کیتینازها، به‌طور گسترده‌ای در قلمرو گیاهی توزیع شده و نقش‌های مختلف ازجمله 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 ازGlycosyl-hydrolase و در طیف گسترده‌تری از موجودات، ازجمله باکتری‌ها، قارچ‌ها، گیاهان، حشرات، پستانداران و ویروس‌ها توزیع‌شده‌اند (Collinge et al., 1993; Hollis et al., 2000; Neuhaus et al., 1996).

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

ویژگی‌های موجود زنده شناخته شد. به این ترتیب تمایل برای شناخت هر چه بیشتر ژن‌ها به‌منظور توجیه پدیده‌های زیستی افزایش یافت؛ تا حدی که در چند دهه‌ی اخیر، تجهیزات موردنیاز 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 موردنظر 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 زعفران با استفاده از نرم افزارهای بیوانفورماتیکی موجود در مقایسه با سایر انواع شناخته‌شده آنزیم کیتیناز هست.

مواد و روش‌ها:

توالی‌ها:

توالی‌های کد کننده مربوط به این خانوادهٔ 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 به‌منظور بررسی روابط تکاملی میان طبقات مختلف آنزیم کیتیناز استفاده می‌شود. در این روش کیتینازهای گیاهی به‌طور عمده با تکیه‌بر حضور دمین‌های مهمی ازجمله، دمین غنی از سیستئین(Cystein Rich Domain or CRD) و انتهاهای 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 دمین های مهم و مناطق مهم کاتالیزی در توالی اسیدآمینه‌ای ژن کیتیناز جداسازی شده از *C.sativus*:

با استفاده از سرویس‌های آنلاین پایگاه داده‌ای 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 اسیدآمینه‌ای ژن کیتیناز جداسازی شده از *C.sativus*:

با استفاده از پایگاه داده‌ای 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 موردنظر برای آنالیزهای بعدی در دسترس قرار گرفته است.

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

با استفاده از ساختمان سوم پیش‌بینی‌شده 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 اعلام‌شده، استفاده شد.

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

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

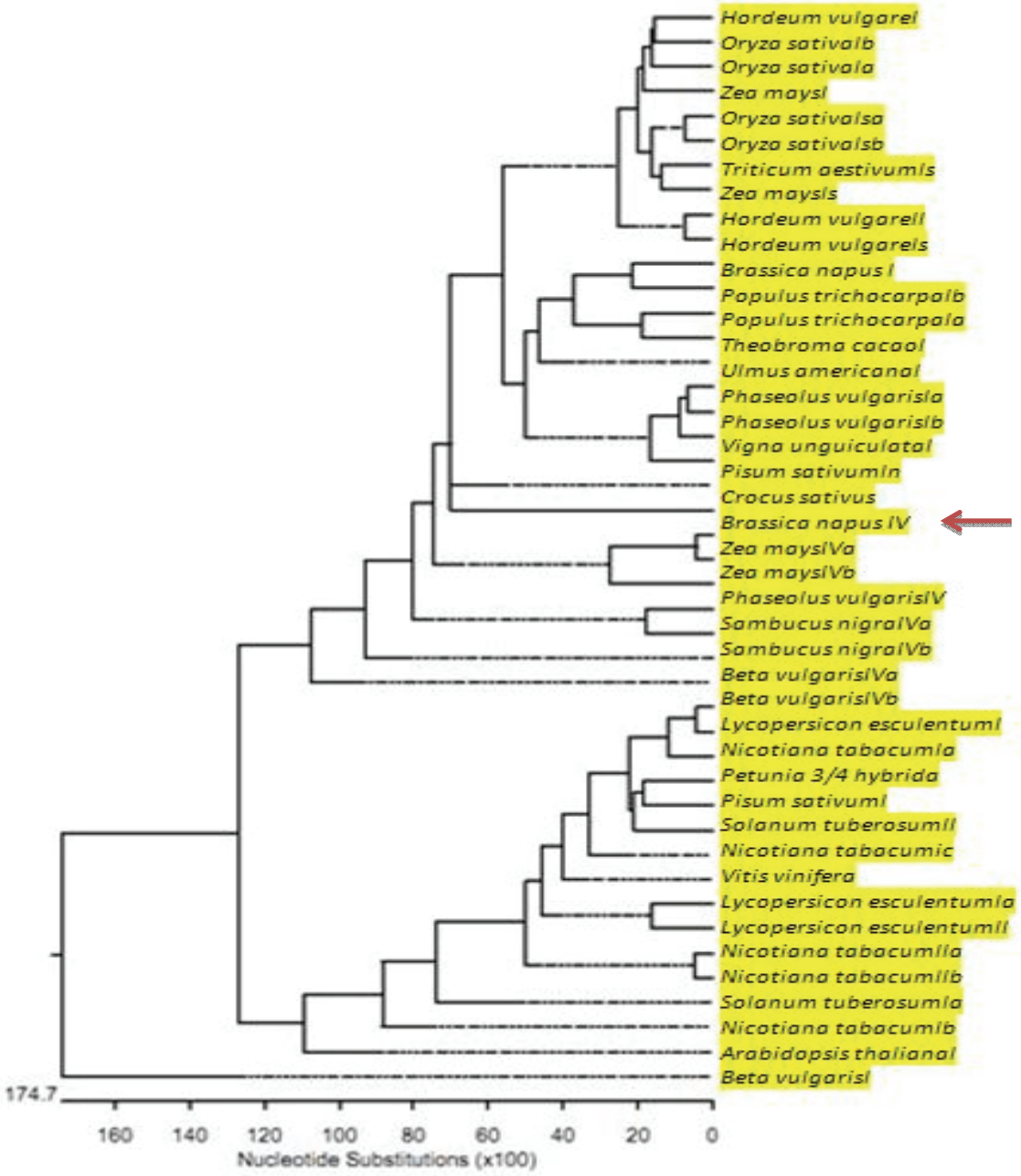
نتایج:

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 به‌دست‌آمده از مقایسه مطرح شده در شکل شماره (۱)، جدول شماره (۱) برای روشن‌تر شدن مطلب ارائه گردیده است. کیتینازهای گیاهی ازجمله 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 به‌دست‌آمده این توالی‌ها شامل گیاهانی بود که ژن کیتیناز آن‌ها فاقد دو منطقه ذکرشده بودند (Beintema, 1994; Leah et al., 1991; Nishizawa et al., 1993). کلاس دیگر معرفی‌شده 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 معرفی‌شده، بودند؛ اما نکته قابل‌توجه در مورد این گروه از توالی‌ها شباهت قابل توجه‌شان با کیتینازهای گروه قارچ‌ها و مخمر بود.

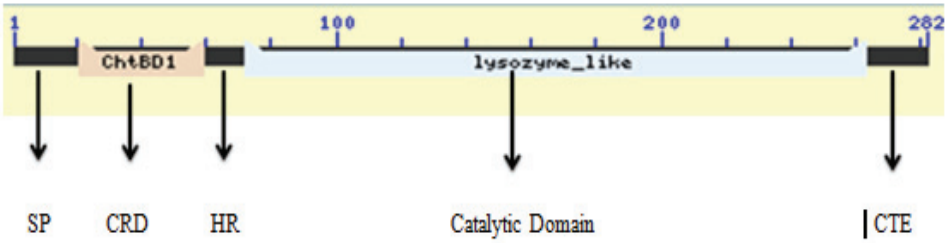
جدول ۱- طبقه‌بندی گونه‌های گیاهی و توالی‌های کیتیناز آنالیز شده در این مطالعه.

Class	subclass	family	species	Common name	Class of chitinases	Gen bank Accession No.
Magnoliopsida	Aseridae	caprifoliaceae	*Sambucuc nigra*	European elder	IV	(a) Z46948, (b) Z46950
		solanaceae	*Lycopersicon esculentum*	Tomato	I	Z15140
					II	(a) Z15141, (b) Z15139
			Nicotiana tabacum	Tobacco	I	(a) X16938, (b) X64519 (c) X64518
					II	(a) M29868, (b) M29869
					III	(a) Z11563, (b) Z11564
			Petunia × hybrida	Petunia	II	X51427
			Solanum tuberosum	Potato	I	(a) X15494, (b) X14133
					II	X67693
	Caryophyllidae	Chenopodiaceae	*Beta vulgaris*	Beet	I	X79301
					III	S6603
					IV	(a) A23392, (b) L25826
	Dilleniidae	Brassicaceae	*Arabidopsis thaliana*	Thale cress	I	M38240
					III	M34107
			Brassica napus	Rape	I	M95835
					IV	X61488
		Cucurbitaceae	*Cucumis sativus*	Cucumber	III	(a), (b), (c) M84214
		Salicaceae	*Populus trichocarpa × P. deltoides*	Poplar	I	(a) M25336, (b) M25337
		Sterculiaceae	*Theobroma cacao*	Cacao	I	U30324
	Hamamelidae	Ulmaceae	*Ulmus americana*	American elm	I	L22032
	Rosidae	Fabaceae	*Cicer arietinum*	Chick pea	III	X70660
			Phaseolus vulgaris	Kidney bean	I	(a) M13968, (b) S43926
					IV	X57187
			Pisum sativum	Pea	I	(a) X63899
					I	(b) L37876
			Psophocarpus tetragonolobus	Winged bean	III	D49953
			Vigna angularis	Adzuki bean	III	D11335
			Vigna unguiculata	Cowpea	I	X88800
					III	X88801
		Vitaceae	*Vitis vinifera*	Grapevine	I	Z54234
Liliopsida	Commelinidae	Poaceae	*Hordeum vulgare*	Barley	I	(a) U02287
					I	(b) L34211
					II	M62904
			Oryza sativa	Rice	I	(a) X54367, (b) X56063
					I	(c) L37289, (d) X56787
			Triticum aestivum	Wheat	I	X76041
			Zea mays	Maize	I	(a) L16798
					I	(b) L00973
					IV	(a) M84164, (b) M84165
	Asparagales	Iridaceae	*Crocus sativus*	saffron	New class	ACC68684.1



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

توالی کامل اسیدآمینه به‌دست آمده از SafchiA ساختار کلاس I آنزیم کیتیناز معمولی را نشان داد؛ دمین های مهم موجود در کیتیناز جداسازی شده از گیاه زعفران در شکل (۲) آمده است که شامل دو دمین مهم، دمین متصل شونده به کیتین (chtBD1)، دمین کاتالیز کننده مشابه لیزوزیم (Lysozyme-like) که نقش کاتالیتیکی را بر عهده دارد، هست.



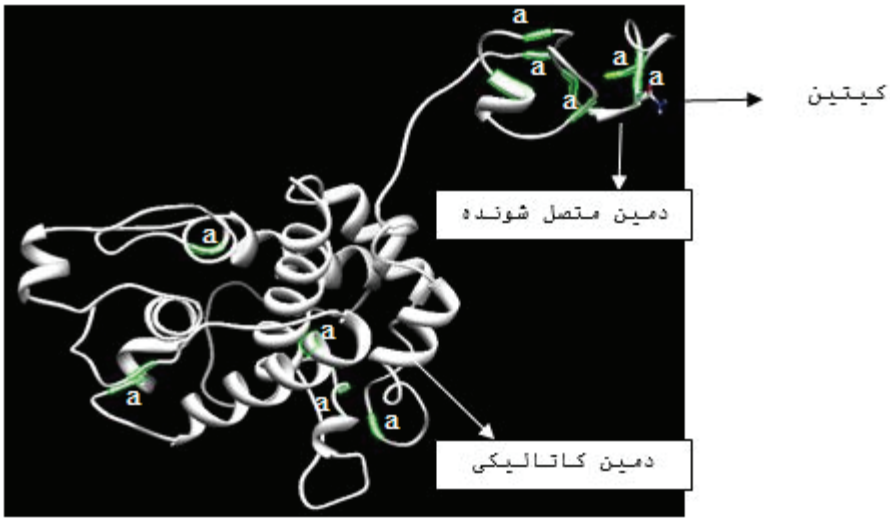
شکل ۲- شکل شماتیک دمین‌های مشخص شده برای ساختار اسیدآمینه‌ای کیتیناز جداسازی شده از گیاه زعفران.SP : سیگنال پروتئینی،CTE: دنباله کربوکسیل توسعه‌یافته، CRD: دمین غنی از سیستئین، HR: منطقهٔ لولا. این ساختار با استفاده از زیر بخش Conserved Domain پایگاه داده‌ای NCBI به‌دست‌آمده است.

۲۰ اسیدآمینه موجود در انتهای N، خصوصیات سیگنال پروتئینی را به نمایش می‌گذارد. در ادامه ۳۸ اسیدآمینه در دمین متصل شونده به کیتین وجود دارد که حاوی ۸ اسیدآمینهٔ سیستئین حفاظت شده، هستند. دمین حاوی سیستئین (دمین باند شونده به کیتین) و دمین کاتالیتیکی به‌وسیله یک منطقهٔ جدا کننده از هم جداشده‌اند. بر اساس مقایسات انجام‌شده همچنین مشخص‌شده است که در دمین کاتالیزوری کیتیناز جداسازی شده از زعفران (شکل ۳)، در مقایسه با دمین کاتالیزوری کیتیناز شناخته شده در سایر کیتینازهای شناخته شده، در موقعیت ۱۳۶ به‌جای اسیدآمینه گلوتامیک اسید، تیروزین و در موقعیت ۶۷ گلوتامیک اسید وجود دارد، این گلوتامیک اسید که به آن اشاره شد در کیتینازها به عنوان یک اسیدآمینه مهم در فعالیت کاتالیتیکی مطرح است. در موقعیت اسیدآمینه ۱۴۲، آسپارتات وجود دارد که در فعالیت گلیکوزیلاسیونی این آنزیم نقش مهمی دارد و تغییر در آن به صورتی که در کیتینازهای دیگر گزارش شده است موجب عدم نقش‌آفرینی آن در گلیکوزیلاسیون این آنزیم می‌شود. کدون مهم بعدی، در موقعیت ۱۴۹ در کیتیناز موجود در زعفران نیز اسید گلوتامیک است که به‌عنوان 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 اسیدآمینه با توالی‌های که از Chitinases قبلاً از گیاهان تک لپه و دو لپهٔ 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 ارائه‌شده 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 اسیدآمینه 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 اسیدآمینه‌های دیگر مثل تیروزین این خصوصیت از بین می‌رود.

شکل ۳- توالی اسیدآمینه‌ای پیش‌بینی‌شده 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 داده‌شده است. این ردیف آرایی 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); GalegaIA: *Galega Orientalis* class Ia chitinase AAP030).

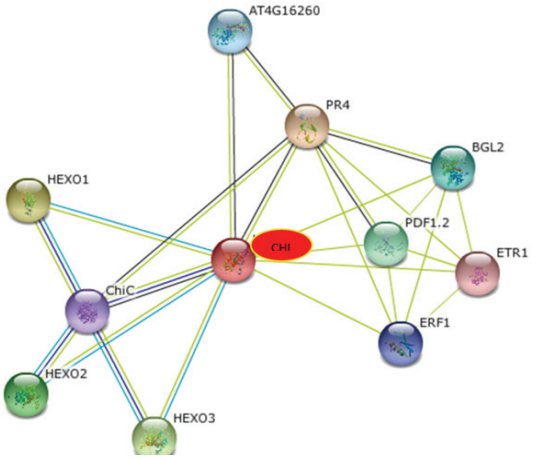
از دیگر اسیدآمینه‌های مهم در فعالیت کاتالیتیکی کیتیناز موجود در جو می‌توان به گلوتامیک اسید ۸۹ اشاره کرد که در کیتیناز موجود در زعفران در موقعیت ۱۵۷ قرار گرفته است. در موقعیت ۲۴۵، کدون موجود تیروزین می‌باشد که وجود آن باعث افزایش فعالیت هیدرولازی می‌شود. بر اساس همین تفاوت‌های مشاهده‌شده در دمین کاتالیتیکی، کیتیناز جداسازی شده از زعفران در گروه‌های دیگر کیتینازی جداسازی شده قرار نمی‌گیرد و به‌این‌ترتیب 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 انجام‌شده است، نشان می‌دهد که مشابه با دیگر کیتینازهای موجود در خانوادهٔ ۱۹ گلیکوزیل هیدرولازها، ساختارهای دوم موجود به‌صورت 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 منطقهٔ نزدیک به انتهای آمینی اسیدآمینه‌های سیستئین با فراوانی بالایی در دمین متصل شونده به کیتین برای اتصال مناسب سوبسترای این آنزیم در کیتیناز جداسازی شده از زعفران وجود دارد.

یکی از عملکردهای مهم اسیدآمینه‌های سیستئین، ایجاد باندهای دی سولفیدی است که در شکل‌گیری فضای مناسب برای اتصال کیتین مهم هستند و باعث افزایش فعالیت کاتالیتیکی کیتیناز به‌عنوان یک ضد قارچ می‌شود. در شکل (۴) نواحی حاوی اسیدآمینه‌های سیستئین حفاظت‌شده مشخص‌شده‌اند.



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

بر اساس شبکه پروتئینی موجود که بر اساس مدل‌سازی در گیاه آرابیدوپسیس ارائه‌شده 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.



شکل۵- 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 آرابیدوپسیس.

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 bianten.
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	beta-1,3-glucanase 2; Implicated in the defense of plants against pathogens
AT4G16260	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 (*Botrytis cinerea* and *Plectosphaerella cucumerina*) and to soil borne fungi (*Fusarium oxysporum* conglutinans and Fusiarium.
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

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 که در برابر اثر آنزیم‌های هیدرولازی قرار می‌گیرد. ازاین‌رو، بسیاری از آنزیم‌های هیدرولازی به‌ویژه آنزیم های 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 اسیدآمینه‌های سیستئین حفاظت شده‌ای هستند که در تشکیل ساختار پروتئینی اصلی و فعالیت آنزیمی مهم هستند. این اسیدآمینه‌ها، پل دی سولفیدی تشکیل‌دهنده

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 کاتالیکی 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 ازجمله 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 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 ازجمله 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). ازلحاظ فعالیت ضد قارچی، آنزیم‌های تخریب کننده دیواره سلولی قارچ های آنتاگونیست مثل تریکودرما بسیار قویی‌تر 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 اسکلروتیا را تخریب نمایند. این آنزیم‌های تخلیص شده که منشأ قارچی دارند، گاهی تا ۱۰۰ برابر آنزیم‌های تخلیص شده 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 به تنهایی هم مؤثر باشند. مطالعات همچنین نشان می‌دهد که این

آنزیم‌ها سمی نبوده و اثر مضری بر گیاهان و جانوران ندارند (Esfahani et al., 2011). همچنین گزارش‌های متعددی نشان می‌دهد که ابراز توأم دو یا چند تراژن ضد قارچ ازجمله 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 گلوکوناز و کیتیناز 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.

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 chitinasegenes. 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.