

Effect of drought stress on different classes of chitinase genes expression in potato (*Solanum tuberosum*. L.) leaves

Maryam Faramarzi-Jafarbeiglou 

Ph.D. Student, Department of Plant Production and Genetic Engineering, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran. E-mail address: maryam.faramarzi.sh@gmail.com

Farhad Nazarian-Firouzabadi 

*Corresponding author. Professor, Department of Plant Production and Genetic Engineering, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran. E-mail address: nazarian.f@lu.ac.ir

Seyed Sajad Sohrabi

Assistant Professor, Department of Plant Production and Genetic Engineering, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran. E-mail address: sohrabi.seyed.8924@gmail.com

Ali Moghadam

Assistant Professor, Institute of biotechnology, Shiraz University, Iran. E-mail address: ali.moghadam@shirazu.ac.ir

Abstract

Objective

Potato (*Solanum tuberosum*. L.) belongs to the *Solanaceae* family. It is the third important crop plant as human food source after wheat and rice. Several biotic and abiotic stresses affect potato production and reduce its potential yield. In the drought stress and dehydration, the expression level of many genes changes and the accumulation of stress-related proteins is affected. Chitinases are proteins that show a basic level of expression in normal conditions, but their expression increases dramatically in disease conditions and some abiotic stresses. The existence of great diversity in plant chitinases and its induction by a wide range of biotic and abiotic factors indicates their important role in the functions related to defense and stress. According to the Economic importance and Limiting effects of drought stress for plant growth in this research, the effect of drought stress on the expression level of different classes of chitinase gene was investigated.

Materials and methods

In this research, the members of chitinase gene family were identified in potato genome by bioinformatics and computational methods. Then, one gene was selected from each class of chitinase gene based on RNA-Seq data analysis in drought stress, and their expression level was evaluated following a water deficit treatment (50% field capacity) by Real-time PCR analysis. The expression level of genes was measured using the Livak and Schmittgen method using the $2^{-\Delta\Delta ct}$ formula.

Results

Under drought stress conditions, the majority of chitinase gene classes exhibited distinct expression patterns. Notably, among the four classes of identified chitinase genes in potato, class I exhibited up-regulation, whereas class V displayed a down-regulated trend.

Conclusions

In conclusion, our findings suggest a significant role for chitinases in potato's response to drought stress. The outcomes of this study offer valuable insights for screening potato cultivars/genotypes for drought tolerance and provide a foundation for molecular genetic strategies aimed at engineering drought-resistant potatoes.

Keywords: Chitinase protein, Drought stress, Potato (*Solanum tuberosum*), Real-time PCR

Paper Type: Research Paper.

Citation: Faramarzi-Jafarbeiglou M, Nazarian-Firouzabadi F, Sohrabi S, Moghadam A (2024) Effect of drought stress on different classes of chitinase genes expression in potato (*Solanum tuberosum*. L.) leaves. *Agricultural Biotechnology Journal* 16 (4), 33-48.

Agricultural Biotechnology Journal 16 (4), 33-48.

DOI: 10.22103/jab.2024.22516.1525

Received: August 22, 2024.

Received in revised form: October 01, 2024.

Accepted: October 02, 2024.


Published online: December 30, 2024.



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


© the authors

بررسی اثر تنش خشکی بر میزان بیان کلاس‌های مختلف ژن کیتیناز در برگ سیب زمینی

مریم فرامرزی جعفریگلو 

دانشجوی دکتری، گروه ژنتیک و به‌نژادی دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران. رایانامه:

maryam.faramarzi.sh@gmail.com

فرهاد نظریان فیروزآبادی 

*نویسنده مسئول: استاد، گروه ژنتیک و به‌نژادی دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران. رایانامه:

nazarian.f@lu.ac.ir

سید سجاد سهرابی

استادیار، گروه ژنتیک و به‌نژادی دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران. رایانامه:

sohrabi.seyed.8924@gmail.com

علی مقدم

استادیار، پژوهشکده بیوتکنولوژی دانشگاه شیراز، شیراز، ایران. رایانامه: ali.moghadam@shirazu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۶/۰۱ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۳/۰۷/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۷/۱۱

چکیده

هدف: سیب زمینی (*Solanum tuberosum* L.) متعلق به خانواده *solanaceae* است و از نظر میزان مصرف در تغذیه انسان، در جایگاه سوم بعد از گندم و برنج قرار دارد. چندین عامل زیستی و غیرزیستی رشد سیب زمینی را محدود می‌کنند و باعث کاهش عملکرد بالقوه آن می‌شوند. در شرایط تنش خشکی و کم آبی، سطح بیان بسیاری از ژن‌ها تغییر می‌یابد و تجمع پروتئین‌های مرتبط با تنش تحت تاثیر قرار می‌گیرند. کیتینازها، پروتئین‌هایی هستند که در شرایط طبیعی سطح بیان پایه را نشان می‌دهند، اما در شرایط بیماری و برخی تنش‌های غیرزنده، بیان آنها به‌طور چشمگیری افزایش می‌یابد. وجود تنوع زیاد در کیتینازهای گیاهی و القای آن توسط طیف وسیعی از عوامل زیستی و غیرزیستی، نشان‌دهنده نقش مهم آنها در عملکردهای مربوط به دفاع و تنش می‌باشد. از آنجا که گیاه سیب زمینی از اهمیت اقتصادی بالایی در جهان برخوردار است و تنش خشکی، تولید جهانی کشاورزی را محدود می‌کند، در این پژوهش، اثر تنش خشکی بر میزان بیان کلاس‌های مختلف ژن کیتیناز مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش، خانواده ژنی کیتیناز در گیاه سیب زمینی به روش بیوانفورماتیکی و محاسباتی شناسایی شد. سپس بر اساس نتایج حاصل از آنالیز داده‌های RNA-Seq مربوط به تنش خشکی، از هر کلاس ژن کیتیناز یک ژن انتخاب و میزان بیان آنها در شرایط کم آبی (۵۰٪ ظرفیت زراعی) به روش Real-time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. آنالیز نتایج واکنش Real Time PCR با استفاده از روش لیواک و با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ انجام شد.

نتایج: کلاس‌های مختلف ژن کیتیناز میزان بیان متفاوتی را در شرایط اعمال تنش خشکی نشان دادند. ژن کیتیناز متعلق به کلاس I دارای بیشترین میزان بیان و کیتیناز متعلق به کلاس V کمترین میزان بیان را داشتند.

نتیجه‌گیری: با توجه به نقش پروتئین‌های خانواده کیتیناز در تحمل تنش‌های غیرزیستی، با تعیین میزان بیان هر کلاس ژنی، می‌توان از آنها برای اهداف انتقال ژن بهره گرفت. همچنین با شناسایی عناصر تنظیمی مرتبط با تنش خشکی و به دلیل نقش آنها بر میزان بیان ژن‌های کیتیناز، می‌توان توالی مربوط به عناصر تنظیمی این ژن‌ها را بطور مصنوعی سنتز نمود و از آنها برای تقویت پروموتور ژن‌ها، در سیستم‌های مختلف بیانی استفاده کرد.

کلیدواژه‌ها: تنش خشکی، پروتئین کیتیناز، سیب زمینی (*Solanum tuberosum*)، Real-time PCR

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: فرامرزی جعفریگلو مریم، نظریان فیروزآبادی فرهاد، سهرابی سید سجاده، مقدم علی (۱۴۰۳) بررسی اثر تنش خشکی بر میزان بیان کلاس‌های مختلف ژن کیتیناز در برگ سیب زمینی. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۶(۴)، ۳۳-۴۸.

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



© the authors

مقدمه

سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L) گیاهی متعلق به خانواده *Solanaceae* می‌باشد که از نظر میزان مصرف به‌عنوان غذای انسان، در جایگاه سوم بعد از گندم و برنج قرار دارد (Jalali et al. 2019; Devaux et al. 2014). این گیاه امکان رشد در شرایط آب و هوایی مختلف را دارد، اما در آب و هوای معتدل با روزهای بلند بیشترین محصول را تولید می‌کند (Abd elhamid et al. 2010). با این حال، چندین عامل زیستی و غیرزیستی، تولید محصول سیب زمینی را محدود می‌کنند و باعث کاهش عملکرد بالقوه آن می‌شوند (Mekonen et al. 2018). تنش خشکی سبب کاهش رشد گیاه از طریق تغییر فرایندهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی می‌شود. برگ‌های گیاه نسبت به سایر اندام‌های گیاهی حساسیت بیشتری نسبت به تنش خشکی از خود نشان می‌دهند (Jallel et al. 2009). پیام ایجاد شده به وسیله ریشه‌ها در شرایط تنش خشکی، از طریق آوند چوب به برگ‌ها منتقل می‌شود،

بنابراین نرخ رشد گیاه را تحت تأثیر قرار داده و رشد اندام هوایی را کاهش می‌دهد (Saxena et al. 2005). در شرایط تنش خشکی و کم آبی، سطح بیان بسیاری از ژن‌ها تغییر یافته و تجمع پروتئین‌های مرتبط با تنش تحت تأثیر قرار می‌گیرند (Agarwal et al. 2006). بیان متفاوت در سطح ژنوم و پروتئوم گیاه در شرایط تنش خشکی بیانگر این واقعیت است که این مکانیسم اولین نقش اساسی را در تحمل تنش خشکی دارد (Anupama et al. 2019). درک پاسخ‌های تنش غیرزیستی در گیاهان به دلیل پیچیدگی، روابط متقابل و تنوع مکانیسم‌ها و مولکول‌های دخیل دشوار است. با این حال، درک مکانیسم‌هایی که ارقام متحمل به تنش واکنش نشان می‌دهند برای انتخاب ژن‌هایی که ممکن است در برنامه‌های اصلاحی گیاه مفید باشند، مهم است (Recchia et al. 2013).

کیتینازها پروتئین‌هایی هستند که در شرایط طبیعی سطح بیان پایه را نشان می‌دهند، اما در شرایط بیماری و برخی تنش‌های غیرزنده، بیان آنها به‌طور چشمگیری افزایش می‌یابد (Návarová et al. 2012). کیتینازها متعلق به خانواده پروتئین‌های مرتبط با پاتوژن هستند (Gregorová et al. 2015; Hashimoto et al. 2004). بر اساس جدیدترین تقسیم‌بندی‌های مبتنی بر شباهت در سطح DNA، کیتینازها در خانواده گلیکوزیل هیدرولازها و در گروه‌های ۱۸، ۱۹، ۲۳ و ۴۸ (GH18, GH19, GH23, GH48) قرار می‌گیرند. کیتینازهای گیاهی در خانواده‌های GH18 و GH19 قرار دارند و بر اساس شباهت‌های ساختاری به گروه‌های مختلفی تقسیم‌بندی می‌شوند. کیتینازهای کلاس III و V، متعلق به خانواده GH18 و کیتینازهای کلاس‌های I، II و IV به خانواده GH19 تعلق دارند (Grover 2012). وجود تنوع زیاد در کیتینازهای گیاهی و القای آن توسط طیف وسیعی از عوامل غیرزیستی، نشان‌دهنده نقش مهم آنها در عملکردهای مربوط به دفاع و تنش می‌باشد. از آنجایی که تنش خشکی، تولید جهانی کشاورزی را محدود می‌کند و عملکرد گیاه سیب زمینی که از اهمیت اقتصادی در سر تا سر جهان برخوردار است تحت تأثیر این تنش قرار می‌گیرد. به‌علاوه، مطالعات و بررسی‌های به عمل آمده در اواخر دهه ۸۰ میلادی روشن نمود که مکانیسم‌های مولکولی در زمره مهم‌ترین فرایندهای ژنتیکی (مشمول بر همانندسازی DNA، رونویسی، ترجمه و حتی نحوه تنظیم ژن‌ها) هستند (Safaei et al. 2022; Shokri et al. 2023). ماده ژنتیکی^۱ یک سلول از تعداد زیادی ژن تشکیل شده است که هیچ‌گاه همه به‌طور همزمان بیان نمی‌شوند و در هر لحظه فقط تعداد کمی از آنها بیان شده و پروتئین یا آنزیم مورد نیاز سلول را تولید می‌نمایند (Barazandeh et al. 2016b). محیطی که موجود در آن رشد می‌کند، مشخص می‌کند که آیا ژن بیان شود و یا فرآورده آن ژن خاص نیاز نیست و باید غیرفعال و یا خاموش شود (Bordbar et al. 2022; Ahmadabadi et al. 2023). ساز و کار بیان ژن، اولین بار در باکتری *E. coli* کشف شد (Mohamadipoor et al. 2021; Masoudzadeh et al. 2020). ژن‌های یوکاریوتی بیان‌شان تحت کنترل موقت قرارگیری ژن ژنوم و چند بعدی است. در هر یک از انواع بافت‌ها، تنها یک مجموعه نسبتاً کوچک از تمام ژنوم بیان می‌شود و نیز بیان ژن‌ها به مرحله نمو بستگی دارد (Masoudzadeh et al. 2020).

¹ DNA

(Mohammadabadi et al. 2023). بنابراین، بیان ژن در یوکاریوت‌ها برای هر بافت اختصاصی است. همچنین مقدار محصولات ژن در همان بافت و نیز در سایر بافت‌ها، سبب تنظیم بیان آن ژن می‌شود (Mohammadabadi et al. 2021; Shokri et al. 2023). یکی از اقدامات اساسی در به‌نژادی ملکولی مطالعه ژن‌ها و پروتئین‌های مرتبط با صفات مهم و مطالعه آنها در سطح سلولی یا کروموزومی است (Mohammadinejad et al. 2022; Shahsavari et al. 2022). از آنجایی که تنش خشکی تولید جهانی کشاورزی را محدود می‌کند و عملکرد گیاه سیب زمینی که از اهمیت اقتصادی در سرتا سر جهان برخوردار است، تحت تاثیر این تنش قرار می‌گیرد، در این پژوهش اثر تنش خشکی بر میزان بیان کلاس‌های مختلف ژن کیتیناز بررسی شد.

مواد و روش‌ها

به منظور شناسایی اعضای خانواده ژنی کیتیناز، ابتدا توالی‌های پروتئینی کیتیناز گیاه گوجه فرنگی، تنباکو و آرابیدوپسیس از بانک پروتئینی پایگاه NCBI دریافت شد. توالی مورد توافق حاصل از هم‌ردیفی کیتینازهای مختلف توسط نرم‌افزار DNASTAR به دست آمد. توالی مورد توافق، به‌عنوان ورودی در پایگاه داده Phytozome (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov>) با توالی کامل ژنوم سیب زمینی، توسط tBLASTn هم‌ردیف شد. در نهایت، نتایج هم‌ردیفی به‌عنوان ژن‌های کاندید کدکننده کیتیناز شناخته شد. به‌منظور تأیید توالی‌های کاندید، توالی‌های موردنظر با استفاده از ابزارهای پایگاه دمین‌های محافظت‌شده CDD مورد بررسی قرار گرفتند. با تجزیه تحلیل داده‌های مربوط به توالی‌یابی ترانسکریپتوم سیب زمینی در شرایط تنش خشکی (<https://ncbi.nlm.nih.gov/sra>)، برای هر کلاس کیتیناز، ژنی که بیشترین میزان بیان را داشت شناسایی شده و مقایسه بیان ژن روی این ژن‌های کاندید انجام شد. به منظور بررسی تاثیر عناصر تنظیمی ژن‌های کدکننده کیتینازها بر بیان ژن‌های منتخب این مطالعه در شرایط تنش خشکی، ۱۵۰۰ جفت‌باز در بالادست هر ژن منتخب، با استفاده از پایگاه اطلاعاتی PLACE (<https://www.dna.affrc.go.jp/PLACE>)، مورد تجزیه تحلیل‌های بیوانفورماتیکی قرار گرفتند.

کشت سیب زمینی و اعمال تنش: به منظور ارزیابی نحوه بیان مهمترین کیتینازهای سیب زمینی، آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در گلخانه اجرا شد. برای این منظور، غده‌های کوچک سیب زمینی در گلدان‌های حاوی کود ورمی کولیت پرومیکس و پرلیت کشت شده و در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد در گلخانه با فتوپریود ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی و رطوبت ۷۰ درصد، کشت شدند. قبل از انجام آزمایش، ظرفیت زراعی خاک^۲ توسط آزمایشگاه خاکشناسی اندازه‌گیری شد. اعمال تنش کم آبی (۵۰ درصد ظرفیت زراعی) در ابتدای غده زایی آغاز و طی یک هفته ادامه یافت (Barra et al. 2019). نمونه برداری

² Field capacity

از حداقل سه برگ گياه انجام گرفت و پس از فريز شدن در ازت مايع، نمونه‌ها در يخچال با دماى ۸۰- درجه سانتى‌گراد نگهدارى شدند.

استخراج RNA و سنتز cDNA: استخراج RNA از نمونه‌هاى برگى با استفاده از كيت استخراج RNA ستونى (Column RNA Isolation Kit) شركت دنا زيست و بر اساس شيوه‌نامه شركت سازنده، انجام شد. براى اندازه‌گيرى كميت و كيفيت RNA استخراج شده، به ترتيب از دستگاه اسپكتروفوتومترى و الكتروفورز ژل آگارز يك درصد استفاده شد. به‌منظور حذف آلودگى DNA ژنومى، نمونه‌هاى RNA با آنزيم DNaseI شركت سيناكلون، تيمار شدند. پس از هم غلظت‌سازى، از هر نمونه ۱ ميكروگرم بر ميكروليتر RNA تهيه شد و جهت سنتز cDNA استفاده گرديد. سنتز cDNA با استفاده از كيت سنتز cDNA شركت سيناكلون بر اساس دستورالعمل شركت سازنده انجام شد. با استفاده از آغازگرهاى (جدول ۱) ژن كنترل داخلى *elf1a* كيفيت cDNA هاى سنتز شده با استفاده از PCR و الكتروفورز ژل آگارز مورد بررسى قرار گرفتند.

انجام واكنش Real Time PCR: براى انجام واكنش Real Time PCR از مسترميكس Real Q Plus 2x Master Mix Green و آغازگرهاى مربوط به كلاس‌هاى مختلف ژن كيتيناز و آغازگر ژن كنترل داخلى استفاده شد (جدول ۱). ميزان بيان ۴ كلاس از ژن كيتيناز (Soltu.DM.10G017450، Soltu.DM.11G026160، Soltu.DM.10G017290، Soltu.DM.07G000200) به‌وسيله روش qRT-PCR مورد ارزيابى قرار گرفت و تجزيه و تحليل نتايج واكنش، با استفاده از روش ليواك (Livak & Schmittgen 2001) توسط فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ انجام شد. داده مربوط به بيان ژن‌ها، تجزيه واريانس شدند و ميانگين‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد با شاهد مقايسه شدند.

نتايج و بحث

كيتينازها نه تنها در فرايندهاى مربوط به دفاع و پاسخ به تنش نقش دارند، بلكه در فرايندهاى رشد و نمو هم دخالت دارند (Collinge et al. 1993, Regalado et al. 2000). بطور كلى با انجام تجزيه و تحليل‌هاى بيوانفورماتيكي، ۳۱ ژن از خانواده ژنى كيتيناز در كل ژنوم سيب زمينى شناسايى شد كه متعلق به ۴ كلاس ژنى I، III، IV و V بود. يافته‌هاى حاصل از اين پژوهش تنوع زيادى در اندازه مولكولى پروتئين‌هاى كيتيناز نشان داد و توالى‌هاى اسيد آمينه با طول ۴۵۰-۱۲۲ شناسايى شد. بيشترين طول توالى پروتئين مربوط به ژن Soltu.DM.07G000130 و كمترين اندازه مولكولى پروتئين مربوط به ژن Soltu.DM.10G017290 بود. نتايج حاصل مشابه با نتايج تجزيه و تحليل بيوانفورماتيكي گياه گوجه فرنگى بود كه در تحقيق ياد شده تعداد ۴۳ ژن كيتيناز در ژنوم گياه گوجه فرنگى شناسايى شدند كه اندازه پروتئين‌هاى كيتيناز گوجه فرنگى از ۶۰ اسيد آمينه تا ۳۸۶ اسيد آمينه متغير بود (Cao & Tan, 2019). خصوصيات فيزيكي پروتئين‌هاى كيتيناز از قبيل موقعيت آنها روى كروموزوم، نقطه شروع و پايان ژن كدكننده، طول ژن و تعداد اسيدهاى آمينه آنها در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۱. توالی آغازگرهای استفاده شده برای بررسی بیان کلاس‌های مختلف ژن کیتیناز در برگ گیاه سیب زمینی

Table 1. Oligonucleotide primer pairs used for different expression analysis of different classes of chitinase gene in potato leaves

طول قطعه تکثیر شده Amplicon Size	توالی آغازگر Primer sequence	نام ژن Gene Name
218	5'-TTGCCAGAGCTAGTGTGTGATA -3'	کلاس I ژن کیتیناز Class I chitinase
	5'-CAGCAATTTTCCTTTTACAGCCA-3'	آغازگر برگشت Reverse gene
115	5'-GGGCACAACCATTCTCAGT -3'	کلاس III ژن کیتیناز Class III chitinase
	5'-TCTAGGAGACAAGCCACCAC-3'	آغازگر برگشت Reverse gene
149	5'-GGTCCCGGTCCTTCAGAG -3'	کلاس IV ژن کیتیناز Class IV chitinase
	5'-CAGGAAAAGACCAAGCAGCA-3'	آغازگر برگشت Reverse gene
150	5'-ACAGAATCGTGCCACAACAG -3'	کلاس V ژن کیتیناز Class V chitinase
	5'-CACGCAAAGTAACCACGCAA-3'	آغازگر برگشت Reverse gene
101	5'-ATTGGAAACGGATATGCTCCA-3'	ژن کنترل داخلی
	5'-TCCTTACCTGAACGCCTGTCA-3'	آغازگر برگشت Reverse <i>elf1a</i>

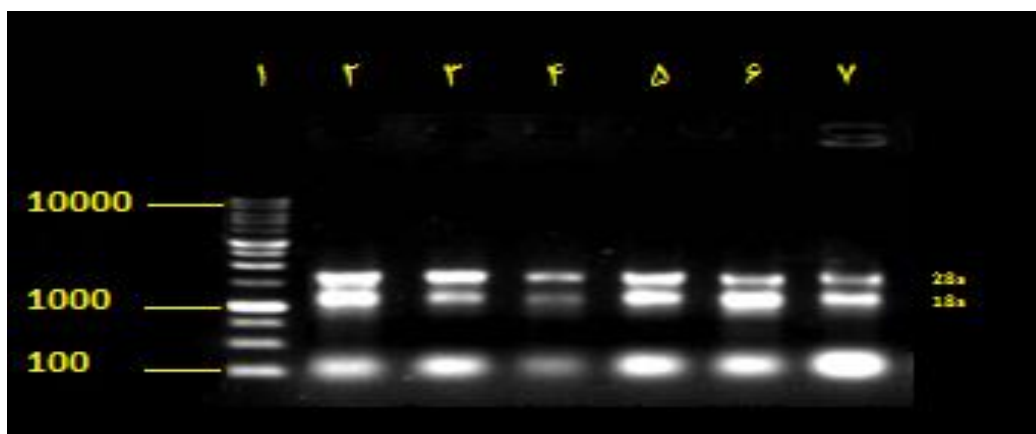
جدول ۲. کلاس، طول پروتئين، طول ژن و موقعيت ژن‌هاى کيتيناز شناسايى شده روى کروموزوم در ژنوم کياه

سيب زمينى

Table 2. Class, protein, gene length and chromosomal location of chitinase genes identified in potato genome

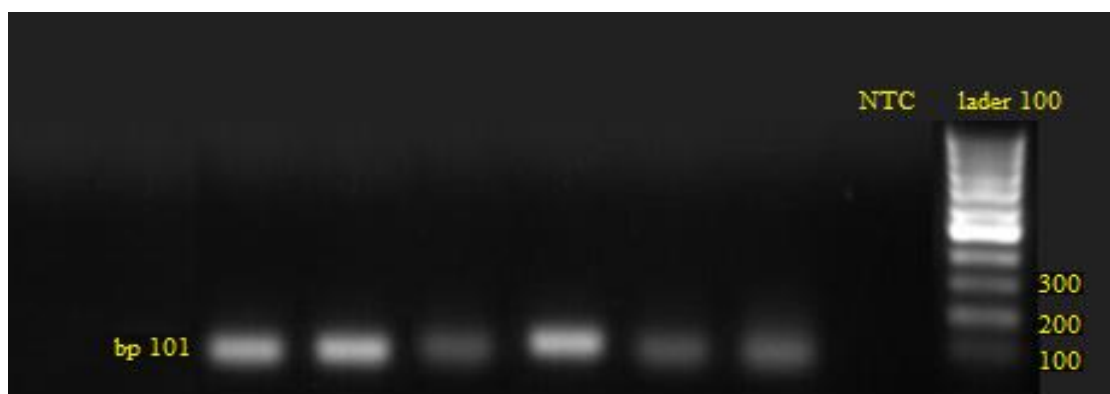
ژن Gene ID	کلاس Class	طول ژن Gene Length	طول پروتئين Protein Length	موقعيت کروموزومى ژن Chromosomal location
Soltu.DM.02G022960	I	1460	264	chr02:36639880..36641340 forward
Soltu.DM.02G005390	I	1863	265	chr02:18752689..18754552 forward
Soltu.DM.04G027770	I	1784	277	chr04:58871814..58873598 reverse
Soltu.DM.10G017450	I	999	250	chr10:47621885..47622884 forward
Soltu.DM.10G018000	I	1620	313	chr10:48725931..48727551 reverse
Soltu.DM.10G018010	I	2864	324	chr10:48745498..48748362 reverse
Soltu.DM.10G018020	I	1329	281	chr10:48752046..48753375 reverse
Soltu.DM.10G018030	I	1110	244	chr10:48759260..48760370 reverse
Soltu.DM.10G017880	I	6875	218	chr10:48519473..48526348 reverse
Soltu.DM.10G017910	I	5805	333	chr10:48575352..48581157 reverse
Soltu.DM.10G017920	I	1501	317	chr10:48585781..48587282 reverse
Soltu.DM.10G017970	I	1415	322	chr10:48688250..48689665 reverse
Soltu.DM.10G017980	I	1242	154	chr10:48701435..48702677 reverse
Soltu.DM.10G017990	I	1440	322	chr10:48714593..48716033 reverse
Soltu.DM.12G002170	I	3306	328	chr12:1791298..1794604 reverse
Soltu.DM.11G026160	III	924	308	chr11:46230865..46231789 reverse
Soltu.DM.11G026270	III	1183	304	chr11:46321307..46322490 forward
Soltu.DM.06G014260	IV	1394	286	chr06:39555953..39557347 reverse
Soltu.DM.09G031790	IV	1515	324	chr09:67472542..67474057 reverse
Soltu.DM.10G017290	IV	1714	122	chr10:47291245..47292959 reverse
Soltu.DM.07G000110	V	1242	414	chr07:414215..415457 forward
Soltu.DM.07G000120	V	1864	375	chr07:415783..417647 reverse
Soltu.DM.07G000130	V	3337	450	chr07:423801..427138 reverse
Soltu.DM.07G000140	V	1145	177	chr07:440310..441455 forward
Soltu.DM.07G000150	V	3609	337	chr07:444045..447654 reverse
Soltu.DM.07G000160	V	3408	448	chr07:452671..456079 reverse
Soltu.DM.07G000170	V	5016	379	chr07:463270..468286 forward
Soltu.DM.07G000190	V	792	264	chr07:470107..470899 reverse
Soltu.DM.07G000200	V	2558	377	chr07:475345..477903 forward
Soltu.DM.07G000210	V	1269	423	chr07:479817..481086 forward
Soltu.DM.07G000260	V	2227	156	chr07:543577..545804 forward

نتایج بررسی کیفیت RNA استخراج شده: وجود باندهای ۱۸S و ۲۸S نشان دهنده صحت استخراج RNA است (شکل ۱). در تمام نمونه‌های استخراج شده، نسبت طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نیز محاسبه شد. اکثر این نسبت، به ۲ بسیار نزدیک بود که نشان دهنده کیفیت مناسب RNA استخراج شده می‌باشد. وجود باند مربوط به ژن کنترل داخلی، روی ژل آگارز، تأیید کیفیت cDNA های سنتز شده بود (شکل ۲).



شکل ۱. الکتروفورز RNA استخراج شده روی ژل آگارز. چاهک ۱؛ نشانگر اندازه. چاهک‌های ۲، ۳، ۴ نمونه‌های شاهد و چاهک‌های ۵، ۶ و ۷ نمونه‌های تنش خشکی هستند

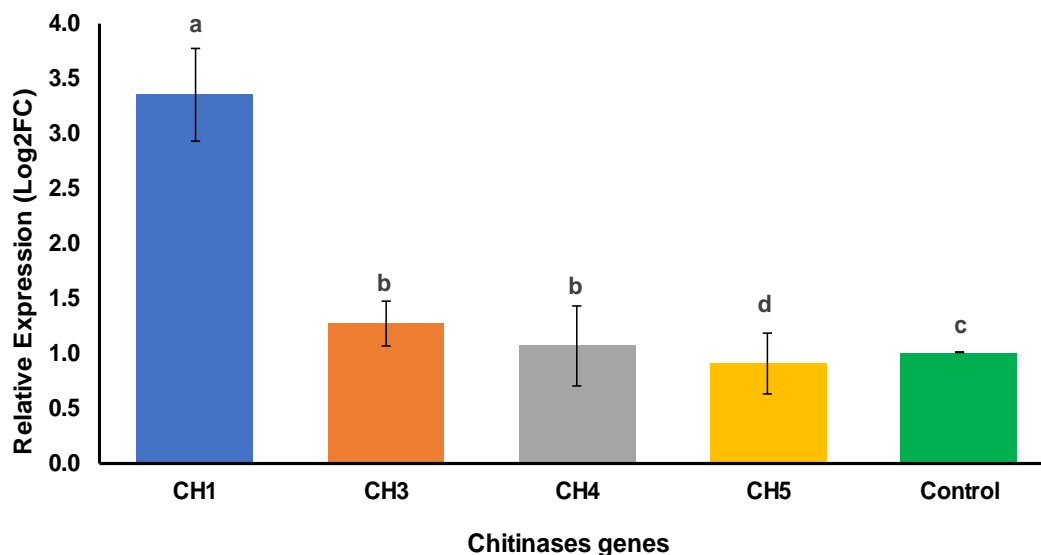
Figure 1. Gel electrophoresis of extracted total RNA. Lanes 1; size marker. Lanes 2, 3, 4 control and Lanes 5, 6, 7 represent drought stress treatment sample



شکل ۲. نتایج الکتروفورز محصول PCR از cDNA سنتز شده با استفاده از آغازگر ژن کنترل داخلی *elf1a*

Figure 2. The electrophoresis results of the PCR product of cDNA synthesized using the *elf1a* internal control gene primer

در اين پژوهش، بيان ۴ ژن از ۴ کلاس خانواده ژنى کيتيناز هاى گياه سيب زمينى در شرايط تنش خشكى، با استفاده از روش Real-time PCR مورد بررسى قرار گرفت. نتايج نشان داد که ميزان بيان اين ژن ها در برگ گياه تحت تاثير کم آبي قرار مى گيرد. اثر تنش خشكى بر بيان ۴ کلاس ژن کيتيناز در شکل ۳ نشان داده شده است.

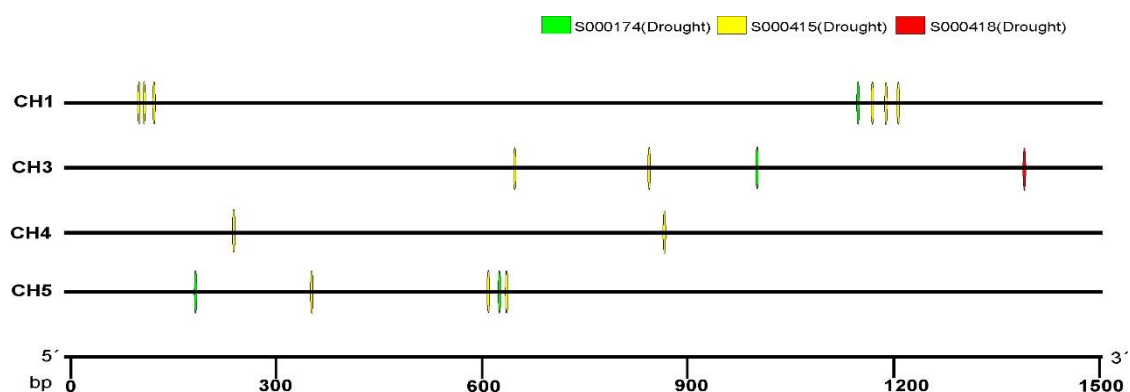


شکل ۳. تغييرات بيان ژن هاى (CH3: Soltu.DM.11G026160), (CH1: Soltu.DM.10G017450), (CH4: Soltu.DM.10G017290) و (CH5: Soltu.DM.07G000200) در برگ سيب زمينى تحت تنش خشكى. ميله ها نشان دهنده انحراف استاندارد (\pm SD) هستند. ميانگين ها با آزمون LSD در سطح احتمال $\alpha=0.05$ با شاهد مقايسه شده اند

Figure 3. Expression analysis of CH1:Soltu.DM.10G017450, CH3:Soltu.DM.11G026160, CH4:Soltu.DM.10G017290 and CH5:Soltu.DM.07G000200 chitinase genes in potato leaves. Bars represent the standard deviations (\pm SD). Expression means were compared with control by LSD at $\alpha=0.05$ probability level

کلاس هاى مختلف ژن کيتيناز ميزان بيان متفاوتى را در شرايط اعمال تنش خشكى نشان دادند. بالاترين سطح بيان در کيتيناز کلاس I (Soltu.DM.10G017450) مشاهده شد. کيتيناز کلاس III (Soltu.DM.11G026160) و کلاس IV (Soltu.DM.10G017290) نيز ميزان افزايش بيان معنى دارى نشان دادند. ميزان بيان ژن کيتيناز کلاس V (Soltu.DM.07G000200) نسبت به ساير ژن هاى کيتيناز بسيار پايين بود. براى درک مکانيسم هاى تنظيمى ژن هاى کيتيناز، از نواحى پروموتورى براى شناسايى عناصر تنظيمى و نقش آنها استفاده شد. بطور کلى، ۴ عنصر تنظيمى (S000415 (ACGTG)

S000418 (ACGTG), S000174 (CACATG) مرتبط با تنش خشکی در ژن‌های مورد مطالعه شناسایی شد (شکل ۴). عناصر تنظیمی برای تنش خشکی در پیشبر همه کلاس‌های ژن کیتیناز دیده می‌شود، تعداد ۷ عنصر تنظیمی مرتبط با خشکی در پروموتور ژن Soltu.DM.10G017450، ۴ عنصر تنظیمی در ژن Soltu.DM.11G026160، ۲ جایگاه در ژن Soltu.DM.10G017290 و ۵ عنصر تنظیمی در نواحی پروموتوری ژن Soltu.DM.07G000200 مشاهده شد. که این نتایج بیانگر این بود که این ژن‌ها در تنش‌های غیر زیستی نقش داشته و باعث افزایش مقاومت گیاه می‌شود. البته این عناصر تنظیمی بطور گسترده در پروموتور ژن کیتیناز کلاس I نسبت به سایر کلاس‌ها دیده می‌شود که بیانگر نقش موثر این کلاس ژن در پاسخ به تنش خشکی می‌باشد. در همین راستا، بررسی بیان ژن کیتیناز در برگ‌های گیاه آراییدوپسیس در شرایط خشکی و سرما، نشان داد که ژن کیتیناز متعلق به کلاس I، بیان بالایی نشان دادند (Takenaka et al. 2009). همچنین گزارش کردند که این موضوع که وقتی کلاس III کیتیناز در گیاه آراییدوپسیس خاموش شود، بیان ژن مسئول سنتز گلیکولپید را کاهش می‌دهد، بنابراین می‌توان گفت فعالیت کیتیناز کلاس III ممکن است منجر به تولید یا تخریب گلیکولپیدی شود. این گلیکو لیپید، بعنوان یک مولکول سیگنال در القای عملکرد پروتئین‌هایی عمل می‌کند که در تحمل تنش غیر زنده نقش دارند، همچنین نتایج یک مطالعه نشان داد که تنش‌های غیر زیستی تاثیر معنی‌داری بر بیان کلاس IV کیتیناز ندارند و از این رو، می‌توان گفت که این کلاس از ژن کیتیناز تاثیری در مقابله با تنش غیر زنده ندارد (Takenaka et al. 2009). بنابراین چنین بیان اندکی را می‌توان به تعداد کم عناصر تنظیمی مرتبط با خشکی در نواحی پروموتوری کیتینازهای کلاس IV مرتبط دانست.



شکل ۴. جایگاه عناصر تنظیمی در پروموتور کلاس‌های مختلف ژن کیتیناز سیب زمینی.

CH1:Soltu.DM.10G017450 ، CH3:Soltu.DM.11G026160، CH4:Soltu.DM.10G017290 و

CH5:Soltu.DM.07G000200

Figure 4. Location of cis-acting elements in promoter regions of different classes of chitinase genes in potato. CH1:Soltu.DM.10G017450, CH3:Soltu.DM.11G026160, CH4:Soltu.DM.10G017290 and CH5:Soltu.DM.07G000200

كمتريـن ميزان بيان ژن در پژوهش حاضر مربوط به ژن كيتيناز كلاس V مىـباشد كه يك CHITINASE-LIKE PROTEIN محسوب مىـشود و بيشتر در فرآيند رشد و نمو درگير است و شباهت زيادى به كيتيناز باكتريايى دارد (Kopparapu et al. 2011; Santos et al. 2004). كيتيناز باكتري از كيتين بعنوان يك منبع غذايى براى توليد انرژى استفاده مىـكند و اين كلاس از كيتيناز عمدتاً به منظور تامين نيتروژن و كربن افزايش بيان پيدا مىـكند (Cohen-Kupiec et al. 1998; Chernin et al. 1997). از آنجا كه در شرايط تنشـهاى محيطى مثل كم آبي، محدود شدن رشد و گسترش گياه يك مكانيسم دفاعى محسوب مىـشود، کاهش بيان اين كلاس ژنى كه مرتبط با رشد گياه است كاملاً منطقي و ضرورى به نظر مىـرسد.

نتيجه گيرى: كيتينازهاى گياهى، جزئى از پاسخ دفاعى عمومى در گياه محسوب مىـشوند. تنوع زياد اين خانواده ژنى نشان دهنده تنوع در عملکرد آن مىـباشد. باتوجه به پژوهش انجام شده كلاس I كيتيناز كه تعداد بيشترى نواحى تنظيمى مرتبط با خشكى در نواحى پروموتري داشت بيشترين بيان را به خود اختصاص داده و بيان كلاس V كه درگير در مسير رشد و نمو گياه بود عليرغم تعداد بالاي عناصر تنظيمى در ناحيه پروموتري، کاهش بيان داشت. شناسايى اين نواحى پروموتري و استفاده از آن در بالادست ژن هاى پاسخ دهنده به تنش هاى مختلف در ساير گياهان روش مناسبى براى كنترل تنش هاى غير زيستى محسوب مىـشود. با توجه به اينكه عنصر تنظيمى S000415 در نواحى پروموتري هر چهار كلاس ژنى كيتيناز وجود دارد و در بالادست ژن كيتيناز كلاس I كه بيشترين ميزان بيان را در شرايط خشكى داشته فراوانى بيشترى دارد، مىـتوان نتيجه گرفت كه اين عنصر تنظيمى با توالى ACGTG اثر بيشترى بر ميزان بيان ژن ها در پاسخ به تنش كم آبي دارند. پس بعنوان يك راهكار، مىـتوان توالى عنصر تنظيمى شناسايى شده را بطور مصنوعى سنتز و براى تقويت پروموتري ژن هاى مختلف استفاده كرد. استفاده از اين توالى براى تقويت پروموتري، منجر به بيان موضعى و هدفمند ژن مىـشود و مىـتوان براى ايجاد ترايخته هاى مقاوم به تنش استفاده كرد.

سپاسگزارى: از معاونت محترم پژوهشى دانشگاه لرستان به خاطر همكارى در اجراى پژوهش حاضر سپاسگزارى مىـشود.

References

- Abd Elhamid MI, Makboul HE, Sedik MZ, et al. (2010) Cloning, expression and antifungal activity of an endochitinase gene derived from barley (*Hordeum vulgare*). *Res J Agric Biol Sci* 6, 356-363.
- Agarwal PK, Agarwal P, Reddy MK, et al. (2006) Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Cell Rep* 25, 1263–127
- Ahmadabadi SAAJ, Askari-Hemmat H, Mohammadabadi M, et al. (2023) The effect of cannabis seed on DLK1 gene expression in heart tissue of Kermani lambs. *Agric Biotechnol J* 15(1), 217-234.

- Anupama A, Bhugra, S, Lall B, et al. (2019) Morphological, transcriptomic and proteomic responses of contrasting rice genotypes towards drought stress. *Environ Exp Bot* 166, e103795.
- Barazandeh A, Mohammadabadi MR, Ghaderi-Zefrehei M, Nezamabadipour H (2016) Genome-wide analysis of CpG islands in some livestock genomes and their relationship with genomic features. *Czech J Anim Sci* 61, e487.
- Barra M., Meneses C, Riquelme S, et al. (2019) Transcriptome profiles of contrasting potato (*Solanum tuberosum* L.) genotypes under water stress. *J Agron* (12), 848.
- Bordbar F, Mohammadabadi M, Jensen J, et al. (2022) Identification of candidate genes regulating carcass depth and hind leg circumference in simmental beef cattle using Illumina Bovine Beadchip and next-generation sequencing. *Animals* 12(9), e1103.
- Cao J, Tan X (2019). Comprehensive analysis of the chitinase family genes in tomato (*Solanum lycopersicum*) *Plants* 8(3), 52.
- Chernin LS, De la Fuente L, Sobolev V (1997) Molecular cloning structural analysis and expression in *Escherichia coli* of a chitinase gene from *Enterobacter agglomerans*. *Appl Environ Microbiol* 63, 834-839.
- Cohen-Kupiec R, Chet I (1998) The molecular biology of chitin digestion. *Curr Opin Biotechnol* 9, 270-277.
- Collinge DB, Kragh KM, Mikkelsen JD, et al. (1993) Plant chitinases. *Plant J* 3, 31-40.
- Devaux A, Kromann P, Ortiz O (2014) Potatoes for sustainable global food security. *Potato Res* 57, 185-199.
- Gregorova Z, Kovacik J, Klejdus B, et al. (2015) Drought-induced responses of physiology, metabolites, and PR proteins in *Triticum aestivum*. *J Agric Food Chem* 63(37), 8125-8133.
- Grover A (2012) Plant chitinases: genetic diversity and physiological roles. *Critic Rev J Plant Sci* 31, 57-73.
- Hashimoto M, Kisseleva L, Sawa S, et al. (2004) A novel rice PR10 protein, RSOsPR10, specifically induced in roots by biotic and abiotic stresses, possibly via the jasmonic acid signaling pathway. *Plant Cell Physiol* 45(5), 550-559.
- Jaleel CA, Manivannan P, Lakshmanan GMA, et al. (2008) Alterations in morphological parameters and photosynthetic pigment responses of *Catharanthus roseus* under soil water deficits. *Colloids Surf B: Biointerfaces* 61, 298–303.
- Jaleel CA, Manivannan P, Wahid A, et al. (2009) Drought characteristics and pigments compositions. *Int J Agric Biotech* 11, 100-105.

- Kazan K (2013) Auxin and the integration of environmental signals into plant root development. *Ann Bot* 112(9), 1655-1665.
- Kopparapu NK, Liu Z, Yan Q, et al. (2011) A novel thermostable chitinase (PJC) from pomegranate (*Punica granatum*) juice. *Food Chem* 127(4), 1569-1575.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25(4), 402-408.
- Masoudzadeh SH, Mohammadabadi MR, Khezri A, et al. (2020) Dlk1 gene expression in different Tissues of lamb. *Iran J Appl Anim Sci* 10, 669-677.
- Mekonen S, Tadesse T (2018) Effect of Varieties and Fungicides on Potato Late Blight (*Phytophthora infestans*, (Mont.) de Bary) Management. *Agrotech J* 7, e2.
- Mohamadipoor L, Mohammadabadi M, Amiri Z, et al. (2021) Signature selection analysis reveals candidate genes associated with production traits in Iranian sheep breeds. *BMC Vet Res* 17(1), 1-9.
- Mohammadabadi M, Golkar A, Askari Hesni M (2023) The effect of fennel (*Foeniculum vulgare*) on insulin-like growth factor 1 gene expression in the rumen tissue of Kermani sheep. *Agric Biotechnol J* 15 (4), 239-256.
- Mohammadabadi M, Masoudzadeh SH, Khezri A, et al. (2021) Fennel (*Foeniculum vulgare*) seed powder increases Delta-Like Non-Canonical Notch Ligand 1 gene expression in testis, liver, and humeral muscle tissues of growing lambs. *Heliyon* 7 (12), e08542 .
- Mohammadinejad F, Mohammadabadi M, Roudbari Z, Sadkowski T (2022) Identification of Key Genes and Biological Pathways Associated with Skeletal Muscle Maturation and Hypertrophy in *Bos taurus*, *Ovis aries*, and *Sus scrofa*. *Animals* 12(24), e3471.
- Návarová H, Bernsdorff F, Döring AC, Zeier J (2012) Pipecolic acid, an endogenous mediator of defense amplification and priming, is a critical regulator of inducible plant immunity. *Plant Cell* 24, 5123-5141.
- Recchia G. H, Caldas D. G. G, Beraldo A. L. A, et al. (2013) Transcriptional analysis of drought-induced genes in the roots of a tolerant genotype of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Int. J. Mol. Sci* 14 (4), 7155-7179.
- Regalado AP, Pinheiro C, Vidal S, et al. (2000) The *Lupinus albus* class-III chitinase gene, IF3, is constitutively expressed in vegetative organs and developing seeds. *Planta* 210, 543-550.
- Santos IS, Da Cunha M, Machado OLT, Gomes VM (2004) A chitinase from *Adenanthera pavonina* L. seeds: Purification, characterisation and immunolocalisation. *Plant Sci J* 167(6), 1203-1210.

- Saxena NP, Singh O, Sethi SC, et al. (2005) Genetic enhancement of drought tolerance in chickpea (short note). (WWW. ICRISAT.org). -Sayed, O.H. 2003. Chlorophyll fluorescence as a tool in cereal crop research. *Photosynthetica* 41, 321-330.
- Shokri S, Khezri A, Mohammadabadi M, Kheyrodin H (2023) The expression of *myh7* gene in femur, humeral muscle and back muscle tissues of fattening lambs of the kermani breed. *Agric Biotechnol J* 15(2), 217-236
- Sinclair TR (2011) Challenges in breeding for yield increase for drought. *Trends Plant Sci* 16, 289–293.
- Takenaka Y, Nakano S, Tamoi M, et al. (2009) Chitinase gene expression in response to environmental stresses in *Arabidopsis thaliana*: chitinase inhibitor allosamidin enhances stress tolerance. *Biosci Biotechnol Biochem* 73(5), 1066-1071.