دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

شناسایی و همسانه سازی ژن های سوپراکساید دیسموتاز *Cu/Zn* (*AlSOD*۱ و *AlSOD*۲) از گیاه هالوفیت *Aeluropus lagopoides*

م. مدرسی[۱]، ق. ع. نعمت زاده[۲] و ف. مرادیان[۳]

۱- دانشجوی دکتری دانشگاه تربیت مدرس، نویسنده مسوول: mstmodarresi@gmail.com
۲ و ۳- استاد و استادیار دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
تاریخ دریافت: ۹۰/۲/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۱/۴/۴

چکیده

رادیکال های آزاد اکسیژن مهمترین عامل تنش گیاهان به شمار می روند. آنزیم های سوپراکساید دیسموتاز به عنوان اولین سد دفاعی گیاهان در مقابل سمیت اکسیژن، رادیکال های سوپراکساید را تجزیه می نمایند. این آنزیم ها برای حیات هوازی ضروری بوده و در فرآیند مقاومت در برابر تنش ها و طول عمر گیاه نقش موثری ایفا می نمایند. گیاه آلروپوس لگوپوئیدس از جمله گیاهان هالوفیتی است که بدلیل تحمل بالا به شوری خاک، دارای فعالیت مناسبی از آنزیم های سوپراکساید دیسموتاز می باشد. با طراحی پرایمرهایی از ژن های SOD سایر گیاهان خانواده گندمیان، اقدام به جداسازی ژن هایی از گیاه هالوفیت آلروپوس لگوپوئیدس گردید. در فرآیند این تحقیق، دو ژن جدید به نام های پیشنهادی *AlSOD*۱ و *AlSOD*۲ از این گیاه هالوفیت جدا و پس از همسانه سازی در ناقل pTZ57R/T باکتریایی ای، کولی، تعیین توالی گردیدند. با تعیین توالی این ژن ها مشخص گردید که هر کدام از این ژن ها ۱۵۲ امینو اسید را کد می نمایند و از نظر توالی نیز شباهت زیادی با ژن سوپراکساید دیسموتاز سایر گیاهان خانواده گندمیان از جمله آلروپوس لیتورالیس (۹۲٪)، ذرت (۸۹٪)، ارزن (۸۸٪) و برنج (۸۷٪) دارند.

واژ های کلیدی: آلروپوس لگوپوئیدس، همسانه سازی، ژن های *AlSOD*۱ و *AlSOD*۲

مقدمه

استرس های اکسیداتیو در سطح سلولی، عامل اصلی کاهش عملکرد گیاهان در شرایط تنش های زنده و غیرزنده، می باشد (۱ و ۲۴). هرچند در شرایط عادی رشد و نمو، رادیکال های آزاد اکسیژن تولید می شوند، اما به هنگام تنش تجمع ردوکتانت ها در سیستم چرخه انتقال الکترون فتوسنتز، سبب تولید مقادیر زیادی از رادیکال های آزاد اکسیژن مانند اکسیژن آزاد، سوپراکساید، پراکسید هیدروژن و سایر رادیکال های هیدروکسیل می گردد، این رادیکال ها با اجزاء و ترکیبات

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-23]
[DOR: 20.1001.1.22286128.1391.4.10.2.1]

سلولی چون لیپیدها، پروتئین ها و اسیدهای نوکلئیک واکنش نشان داده و منجر به پراکسیداسیون غشاء، تخریب پروتئین ها و جهش در مولکول های DNA می گردند (۲۱ و ۲۹). ارگانیسم های هوازی بدون آنتی اکسیدانت هایی که آنها را، در مقابل رادیکال های آزاد اکسیژن حفظ کند قادر به ادامه بقای خود نمی باشند (۹ و ۱۱). سوپراکساید دیسموتاز، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز آنزیم های اصلی برای سمیت زدایی رادیکال های اکسیژن در گیاهان می باشند (۶ و ۸). سوپراکساید دیسموتاز (EC 1.15.1.1) آنزیم کلیدی است که به عنوان اولین خط دفاعی گیاهان در برابر مسمومیت اکسیژن به شمار می رود و وظیفه آن تجزیه آنیون های سوپراکساید به مولکول اکسیژن و پراکسید هیدروژن می باشد (۴، ۱۳ و ۲۰). گزارشات مختلف مؤید آن است که فرایند تجزیه رادیکال های آزاد در این سطح، متوقف نشده بلکه توسط سایر آنزیم ها از جمله کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز ادامه می یابد، تا پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن تبدیل گردد (۴، ۵ و ۲۸). لازم بذکر است که در گیاهان عالی براساس نوع کوفاکتورهای فلزی سه نوع سوپراکساید دیسموتاز شناخته شده اند، یعنی FeSOD در پلاستید ها، MnSOD در ماتریس میتوکندری و Cu/Zn SOD در سیتوسول و کلروپلاست (۳ و ۲۲). گزارشات مختلف حاکی از آن است که فعالیت سوپراکساید دیسموتاز تحت شرایط تنش در گیاهان افزایش می یابد (۷ ، ۱۲ و ۱۴).

گیاه *Aeluropus lagopoides* یک هالوفیت علفی چند ساله از خانواده گرامینه می باشد که توزیع اکولوژیکی آن از شمال آفریقا تا هندوستان امتداد دارد. این گیاه توانایی تحمل اراضی بسیار شور، مناطق ساحلی و بیابان ها با حرارت زیاد را دارد (۱۵، ۱۶ و ۱۷). پیش از این بررسی میزان فعالیت آنزیم سوپراکساید دیسموتاز در دیگر گونه این خانواده (*Aeluropus littoralis*) بیانگر افزایش بیش از ۵ برابری فعالیت به هنگام تنش ۶۰۰ میلی مولار NaCl بوده است (۲۰)، لذا این خانواده گیاهی می تواند به عنوان یک منبع ژنتیکی مناسب برای شناسایی ژن های جدید متحمل به خشکی، شوری و حرارت بالا، مورد استفاده قرار گیرد. با توجه به اینکه تاکنون در بانک ژن (NCBI) گزارشی نسبت به جداسازی ژن های سوپراکسید دیسموتاز گیاه هالوفیت آلروپوس لگوپوئیدس ارائه نشده است، هدف از این تحقیق شناسایی، جداسازی و همسانه سازی ژن های سوپراکساید دیسموتاز از گیاه هالوفیت آلروپوس لگوپوئیدس می باشد.

مواد و روشها

مواد گیاهی

کلون های آلروپوس از زیستگاه های طبیعی (میانکاله در استان مازندران) جمع آوری و در گلخانه پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری کشت شدند. در بهار ۱۳۸۹ برگ های توسعه یافته،

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-23]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1391.4.10.2.1]

جمع آوری و بلافاصله به نیتروژن مایع منتقل و تا زمان استخراج RNA در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردیدند.

استخراج RNA و ساخت cDNA

برای استخراج RNA کل، از معرف ترایزول (اینویتروژن، امریکا) طبق پروتکل شرکت سازنده استفاده گردید. سپس با استفاده از آنزیم نسخه برداری معکوس (M-MULV) و دو آغازگر برگشتی با توالی SODR1[5'-TCTAACCCTGGAGTCCGATGAT(A/T)CCGCAAG-3'] و SODR2[5'-(C/T)(C/T)A(A/G)CC(A/T)CC(A/G)AT GIC-3'] که از مناطق حافظت شده ژن سوپراکساید دیسموتاز سایر گیاهان خانواده گرامینه (ذرت، گندم و برنج) طراحی شده بودند، اقدام به ساخت cDNA گردید.

تکثیر ژن های سوپراکساید دیسموتاز

cDNA حاصل برای انجام PCR مورد استفاده قرار گرفت. برای انجام PCR و تکثیر ژن نیز از دو جفت پرایمر طراحی شده با توالی AlSODF1 [5'-GAGAACACATAGACAATGGTGAA-3'] AlSODR1 [5'-GGCAGTTG-3'، TCTAACCCTGGAGTCCGATGAT(A/T)CCGCAAG-3'] AlSODF2 [5'-CAATGGTGAAGGC(A/T)GTTG(A/T)TGT-3'] و AlSODR2 [5'-(C/T)(C/T)A(A/G)CC(A/T)CC(A/G)AT GIC-3'] از روی مناطق حفاظت شده این ژن ها در سایرگیاهان استفاده گردید.

جهت انجام PCR، ۱ میکرولیتر از cDNA ساخته شده به همراه ۱۰ پیکومول از آغازگرهای رفت و برگشت با ۲ میلی مولار $MgCl_2$، ۲۵۰µM از dNTPs و ۲/۵ میکرولیتر از بافر PCR و ۲/۵ واحد از آنزیم Taq polymerase مخلوط گردیدند. مخلوط واکنش با در نظر گرفتن برنامه دمایی ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه برای طبع برگشتی اولیه و ۹۴ درجه به مدت ۱ دقیقه، ۶۰ درجه به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه برای ۳۵ چرخه و ۷۲ درجه برای ۱۰ دقیقه تکثیر گردیدند. برای جداسازی و مشاهده محصولات تکثیر شده، انجام الکتروفورز در ژل آگارز ۱ درصد با ولتاژ ثابت ۶۵ ولت و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید صورت گرفته و سپس با استفاده از دستگاه ژل داکیومنت مطالعه گردیدند. قطعات تکثیر شده در PCR با وکتور همسانه سازی pTZ57R/T ادغام و سپس به باکتری *E. coli* سویه JM2163 انتقال داده شدند. باکتری های حامل پلاسمید نوترکیب از طریق رنگ های آبی/ سفید در محیط LB Agar حاوی آمپی سیلسن، Xgal و IPTG غربال و سپس استخراج پلاسمید انجام گرفت و قطعات همسانه سازی شده تعیین توالی گردیدند.

آنالیز توالی ژن ها

انطباق و تعیین مشابهت توالی ژن های بدست آمده از طریق برنامه BLAST بانک ژن به آدرس p://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast، از طریق جستجوگر NCBI صورت گرفت. هم ترازی چندگانه توالی ها نیز از طریق نرم افزار CLUSTALX سایت انستیتو بیوانفورماتیک اروپا به آدرس

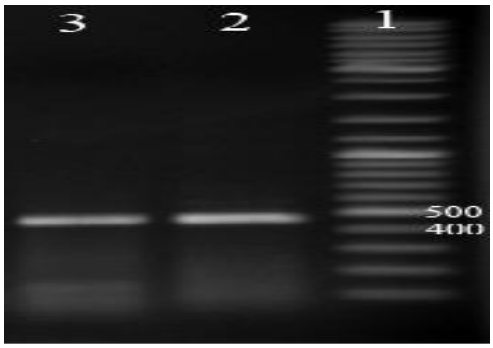
[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-23]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1391.4.10.2.1]

http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html و نـرم افـزار MEGA 4.0 انجـام پذیرفت.

نتایج و بحث

نتیجه بارگذاری cDNA های کامل بدست آمده از طریق RT-PCR روی ژل آگارز ۱٪، قطعاتی، در حدود bp ۴۵۰ را نشان دادند (شکل ۱). همچنین توالی این قطعات نشان داد که، یک قطعه با چارچوب باز خواندن[1] (ORF) ۴۵۶ جفت، به همراه ۹ باز غیرکدکننده در انتهای ۵′ می باشد. ترجمه توالی بدست آمده مؤید آن است که این قطعه توانایی سنتز پروتئینی با ۱۵۲ آمینواسید، با وزن مولکولی۱۵/۰۹۷ کیلو دالتون و نقطه ایزوالکتریک ۵/۶۵ را دارا می باشد (شکل ۲).



شکل ۱- محصول RT-PCR روی ژل آگارز. لاین ۱ نشانگر وزنی GeneRuler^{TM} SMO333، لاین های ۲ و ۳ محصولات تکثیر شده ژن های $AlSOD_1$ و $AlSOD_2$.

```
Aeluropus lagopoides SOD1      HRQMVKAVAVLGSNEGVKGTIFFTQEGDGPTTVTGSVSGLKPGLHGFHMH 50
Aeluropus lagopoides SOD2      --TMVKAVASLGSSEGVKGTIFFTQEGDGPTTVTGSVSGLNPGLHGFHMH 48
                                  ****** ***.**************************:********* 

Aeluropus lagopoides SOD1      ALGDTTNGCMSTGPHYNPAGKEHGAPEDEIRHAGDLGNVTAGADGVANIN 100
Aeluropus lagopoides SOD2      ALGDTTNGCMSTGPHYNPEGKEHGAPEDEIRHAGDLGNVTAGQDGVANVN 98
                               ****************** ********************** *****:** 

Aeluropus lagopoides SOD1      VTDCQIPLTGPSSIIGRAVVVHADPDDLGKGGHELSKTTGNAGGRVACGI 150
Aeluropus lagopoides SOD2      VTDSQIPLTGPHSIIGRAVVVHADPDDLGKGGHELSKTTGNAGGRFACEI 148
                               ***.******* ********************************.** * 

Aeluropus lagopoides SOD1      IGPQG 155
Aeluropus lagopoides SOD2      IELQG 153
                               *  ** 
```

شکل ۲- همترازی اسیدهای آمینه دو ژن ($AlSOD_1$ و $AlSOD_2$) سوپراکساید دیسموتاز گیاه آلروپوس لگوپوئیدس، اسید آمینه آغازین با مستطیل قهوه ای مشخص شده است. جایگاه های فعال آرژنین با مستطیل های قرمز مشخص شده اند. آمینواسیدهای هیستیدین و آسپارژین که نشان دهنده نقاط اتصال روی/ مس هستند با مستطیل های سیاه و آبی متمایز شده اند و دو اسید آمینه سیستئین که محل دایمرها را مشخص می کنند با مستطیل های سبز رنگ جدا شده اند.

1- Open reading frame

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-23]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1391.4.10.2.1]

نتایج تعیین توالی قطعه دوم نشان داد که این قطعه نیز با طول ۴۶۶bp، دارای چارچوب بازخوان ۴۵۶ جفت باز می باشد که پس از ترجمه قادر است پروتئینی را با ۱۵۲ اسید آمینه کد کند. نکته حائز اهمیت این است که این پروتئین با وزن مولکولی ۱۵/۳۸ KDa و با نقطه ایزوالکتریک ۵/۱۵ با پروتئین اول متفاوت می باشد (شکل ۲). همچنین توالی بدست آمده نشان می دهد که در هر دو ژن مورد نظر دارای توالی مورد توافق Kozak در انتهای غیرکدکننده ′۵ می باشند. این توالی اتصال mRNA را به زیر واحد کوچک ریبوزوم تسهیل می نماید (۲۰). علاوه بر این نتایج بدست آمده نشان می دهد که هر دو توالی بدست آمده دارای کدون های آغاز (ATG) و پایان (TGA) می باشند لذا این موضوع مؤید آن است که توالی این ژن ها کامل بوده و می توان برای بررسی بیان آنها اقدام نمود. از سوی دیگر عدم وجود توالی های پپتیدی ترشحی در این ژن ها، نشان دهنده آن است که پروتئین های سنتز شده می توانند جایگاه سیتوسولی داشته باشند. اگرچه مقایسه میان وزن مولکولی و نقطه ایزوالکتریک ژن های بدست آمده با ژن های همولوگ آنها در سایر گیاهان خانواده گندمیان نشان می دهد که تفاوت چندانی از نظر وزن مولکولی، میان این ژن ها ($AlSOD_1$ و $AlSOD_2$) و ژن های سوپراکساید دیسموتاز سایر گیاهان وجود ندارد، اما میان نقطه ایزوالکتریک آنها تفاوت هایی مشاهده می گردد (جدول ۱).

جدول ۱- مقاسیه تطبیقی میان خواص بیوشیمیایی و شباهت اسیدهای آمینه سوپراکسید دیسموتازهای گیاه آلروپوس لگوپوئیدس با برخی از گیاهان. I: یکسانی، S: مشابهت، M: وزن مولکولی و pI بیانگر نقطه ایزوالکتریک می باشد.

گونه های گیاهی	ویژگی های بیوشیمیایی		اسیدهای آمینه	
	pI	M	S	I
Aeluropus lagopoides $AlSOD_1$	۵/۶۵	۱۵/۰۹۷	-	-
Aeluropus lagopoides $AlSOD_2$	۵/۱۵	۱۵/۳۸۷	۹۵/۳۹	۹۶
Aeluropus littoralis AlSOD	۵/۶۵	۱۵/۰۶۶	۹۶/۷۱	۹۲
Zea mays SOD4 ZmSOD4	۵/۶۵	۱۴/۱۱۴	۹۷	۸۹
Oryza sativa OsSOD	۵/۷۱	۱۵/۲۵۰	۹۴	۹۱
Bambusa oldhamii Bhsod	۵/۶۵	۱۵/۰۹۴	۹۵	۹۲
Pennisetum glaucum PgSOD	۵/۷۶	۱۵/۱۵۸	۹۶	۹۲

هر دو ژن ایزوله شده قادر به نمایش توالی پروتئینی ۱۵۲ آمینواسید می باشند که برای ساختار و فعالیت آنزیمی ضروری است، یعنی در توالی آن ها هفت اسیدآمینه His(H) و یک اسید آمینه Asp(D) و یا بعبارتی محل مهار یون های روی و مس وجود دارند. همچنین دارای دو سیستئین Cys(S) دخیل در ساخت پل دی سولفید بوده و پنج آرژنین نیز محل

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-23]
[DOR: 20.1001.1.22286128.1391.4.10.2.1]

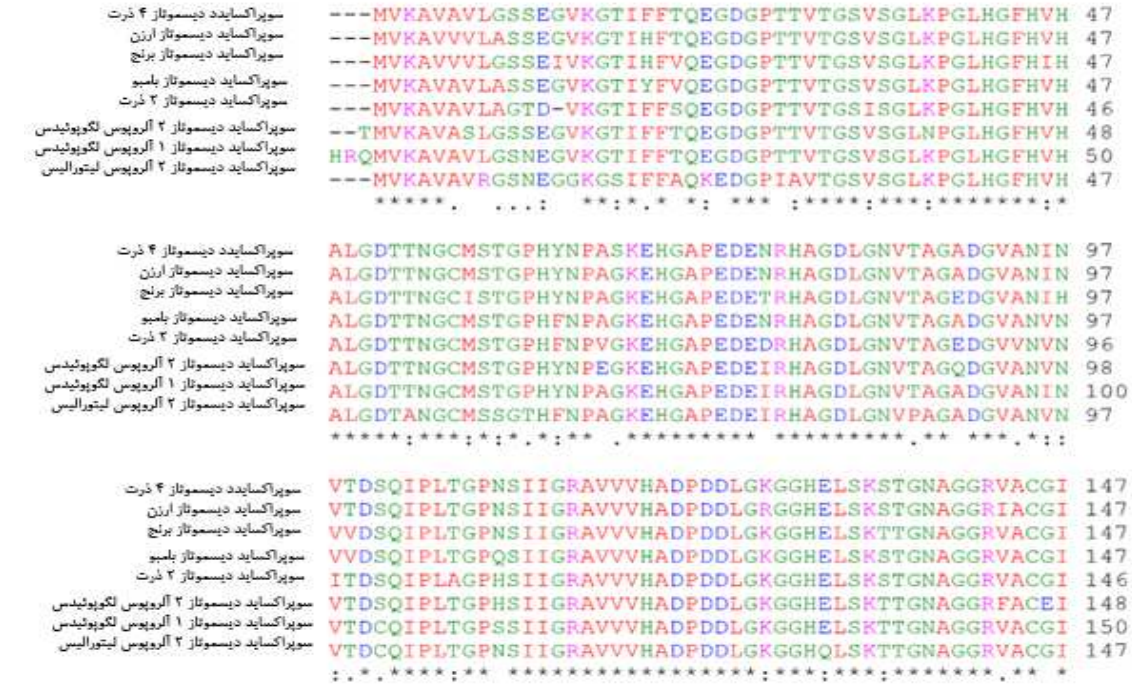
فعالیت کاتالیتیک آنزیم را دارا می باشند. همانگونه که تینر و همکاران (۲۶)، بنیستر و همکاران (۳) و زو و همکاران (۲۹) گزارش کردند، اسیدهای آمینه این ژن ها نیز دارای توالی حافظت شده برای مهار مس/ روی (His45, His47, His62, His70, His79, His119, Asp82) و آرژنین ۱۴۲ (Arg142) که بیانگر سایت فعال آنزیمی است، می باشند. دو سیستئین (Cys56 and Cys145) و ترکیبات دایمر (Gly36, Leu37, Gly40, His42, Arg78, Gly84, Ile112) نیز در این گونه پروتئین ها گزارش گردید (۱۰، ۲۵ و ۳۰).

نتیجه جستجوی BLAST در بانک های ژن نشان می دهد که تشابه بالایی میان توالی دو ژن سوپراکساید دیسموتاز گیاه آلروپوس لگوپوئیدس و سایر گیاهان خانواده گرامینه وجود دارد (جدول ۱ و شکل ۳). همانگونه که قبلاً اشاره گردید مقایسه تطبیقی اسیدهای آمینه این دو ژن نیز با ژن های مشابه در سایر گیاهان صورت گرفت و درخت فیلوژنتیکی آن رسم گردید (شکل ۴). نتایج درخت فیلوژنتیکی نشان می دهد که نزدیکترین ژن به ژن های جدید، ژن *Cu/Zn SOD* گیاه هالوفیت آلروپوس لیتورالیس (آلروپوس لیتورالیس و آلروپوس لگوپوئیدس هر دو از یک جنس و متعلق به خانواده گرامینه می باشند) می باشد و در مرحله بعد با ژن های متناظر گیاهان خانواده گندمیان از جمله با برنج (۸۷٪)، ارزن (۸۸٪) و ذرت (۸۹٪) که همگی از گیاهان تک لپه ای می باشند، تشابه دارند و پس از آنها با شاخه گیاهان دو لپه ای مانند گوجه فرنگی (۸۰٪) و فلفل (۸۰٪) بیشترین قرابت را نشان می دهند. همچنین این گروه از ژن ها در شاخه ای جدا از ژن های *FeSOD* و *MnSOD* سایر گیاهان قرار گرفته اند که با نتایج قبلی مطابقت دارد. پیش از این نیز وجود آیزوزایم های مختلف سوپراکساید دیسموتاز در گیاهان گوناگون گزارش شده است (۱۸، ۱۹، ۲۳ و ۲۷).

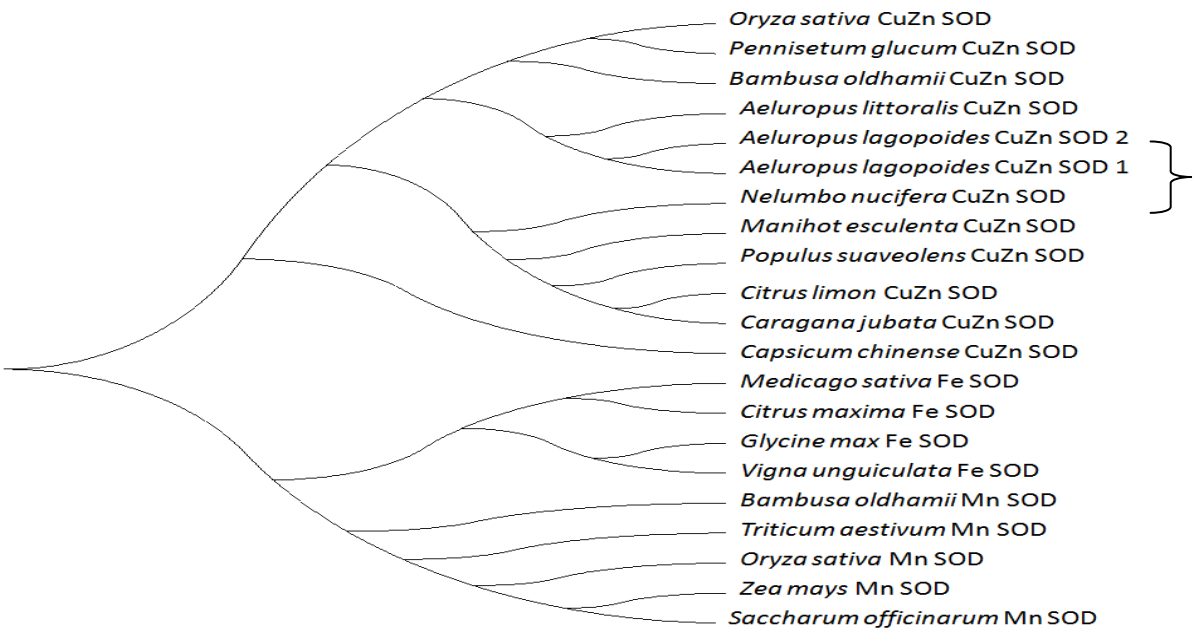
ذرت اولین گیاهی است که آیزوزایم های مختلف آنزیم SOD در آن کشف شد (۷) و تاکنون ۹ آیزوزایم مختلف در این گیاه معرفی گردیده اند. در آرابیدوپسیس نیز ۳ آیزوزایم مس/ روی، ۳ آیزوزایم آهن و یک آیزوزایم منگنز شناسایی شده اند (۲). وجود فرم های مختلف این آنزیم در سلول ها، بافت ها و اندام های مختلف و در شرایط متنوع محیطی و تحت تنش های گوناگون، نشان دهنده نقش های جداگانه این ایزوفرم ها می باشد. با توجه به نتایج بدست آمده در سایر گیاهان و مطالعه و جداسازی دو ژن نزدیک به هم $AlSOD_1$ و $AlSOD_2$ بنظر می رسد که این دو ژن نیز آیزوزایم یکدیگر باشند. بدیهی است که در مطالعات بعدی و بررسی فعالیت آیزوزایم ها می توان به طور قطع به این سوال پاسخ داد.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-23]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1391.4.10.2.1]



شکل ۳- همترازی چندگانه میان ژن های سوپراکساید دیسموتاز گیاه آلروپوس لگوپوئیدس یا برخی گیاهان دیگر
* نشان دهنده یکسانی اسیدهای آمینه ژن های SOD در همه گیاهان مورد مطالعه هم به ترتیب بیانگر شباهت زیاد و کم می باشند.



شکل ۴- درخت فیلوژنتیکی بیان کننده روابط تکاملی میان سوپراکساید دیسموتازها در گیاهان مختلف می باشد.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-23]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1391.4.10.2.1]

از آنجایی که ایران در کمربند خشکی جهان قرار دارد و بخش های بزرگی از کشور توسط عوامل نامساعد محیطی چون شوری، سرما، گرما و غیره تهدید می شود، شناسایی، جداسازی و انتقال ژن هایی که باعث افزایش تحمل گیاهان زراعی و باغی به طیف وسیعی از تنش ها می شوند از اولویت های تحقیقاتی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری محسوب می شود و در این میان، استفاده از گیاهانی که بومی مناطق نامساعد محیطی کشور هستند و به طور طبیعی واجد مکانیسم های تحمل به عوامل تنش زا از جمله خشکی، شوری، گرما و غیره می باشند، در اولویت کار تحقیقاتی قرار دارند. گونه های گیاهی آلروپوس (لیتورالیس و لگوپوئیدس) از خانواده گندمیان از جمله گیاهان بومی کشور می باشند که تحمل بسیار بالایی (تا ۸۰۰ میلی مولار غلظت نمک NaCl) به شوری دارند و می توانند بعنوان یک گیاه مدل در دستور کار مطالعاتی قرار گیرند. همچنین بررسی های بیشتری در سطوح مختلف از جمله: ترنسکریپتوم، پروتئوم، متابولوم و غیره صورت گیرد و از نتایج آنها بعنوان منابع ژنتیکی اصلاحی در اصلاح ارقام زراعی و باغی برای افزایش تحمل به شوری و سایر تنش های غیرزنده محیطی بکار گرفته شود، تحقیقاً بررسی آتی این ژن ها، مطالعه بیان آنها در گیاهان مدل و سپس انتقال به گیاهان زراعی خواهد بود.

تشکر و قدردانی

به این وسیله از مدیریت پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری به دلیل حمایت ها و فراهم نمودن امکانات مورد نیاز سپاسگزاری می گردد.

منابع

1. Allen, R.D. 1995. Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. Plant Physiology. 107: 1049-1054.
2. Attia, H., N. Karray and M. Lachaâl. 2009. Light interacts with salt stress in regulating superoxide dismutase gene expression in Arabidopsis. Plant Science. 177 (3): 161-167.
3. Bannister, J.V., W.H. Bannister and G. Rottilo. 1987. Aspects of the structure, function and applications of superoxide dismutase. CRC Critical Review Biochemistry, 22: 111-180.
4. Beyer, Y., J. Imalay and I. Fridovich. 1991. Superoxide dismutase. Progress nucleic acid research molecular biology, 40: 221-253.
5. Blokhina, O., E. Virolainen and K.V. Fagerstedt. 2003. Antioxidant, oxidative damage and oxygen deprivation stress. Annals of Botany, 91: 179-194.
6. Bohnert, H.J., D.E. Nelson and R.G. Jensen. 1995. Adaptations to environmental stresses. Plant Cell 7: 1099-1111.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-23]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1391.4.10.2.1]

7. Bowler, C., M. Van Montagu and D. Inzé. 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. Annual Review Plant Physiology, 43: 83-116.
8. Chang-Le, M., W. Ping-Ping, C. Zi-Yi, Z. Yan-Xio and H. Zhang. 2003. Cloning and differental expression of two Catalases in *Sauda salsa* in responce to salt stress. Acta Botanica Sinica, 45: 93-97.
9. Cope, T.A. 1982. Poaceae. In: Nasir E, Ali SI, eds. Flora of Pakistan. Karachi, Pakistan: University of Karachi. 25-30.
10. Deng, H.X., A. Hentati, J.A. Tainer, Z. Iqbal, A. Cayabyab, W.Y. Hung, E.D. Getzoff, P. Hu, B. Herzfeldt and R.P. Roos. 1993. Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu/Zn superoxide dismutase. Science, 261: 1047-1051.
11. Devasagayam, T.P.A., J.C. Tilak, K.K. Boloor, K.S. Sane, S.S. Ghaskadbi and R.D. Lele. 2004. Free Radicals and Antioxidants in Human Health: Current Status and Future Prospects. Journal Association Physicians India, 52: 794-804.
12. Droillard, M.G. and A. Paulin. 1990. Isozymes of Superoxide Dismutase in Mitochondria and Peroxisomes Isolated from Petals of Carnation (*Dianthus caryophyllus*) during Senescence. Plant Physiology, 94: 1187-1192.
13. Elstner, E.F. 1982. Oxygen activation and oxygen toxicity. Annual Review of Plant Physiology, (33): 73-96.
14. Foyer, C.H., P. Descouvieres and K.J. Kunert. 1994. Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants. Plant Cell Environment, 17: 507-523.
15. Fridovich, I. 1986. Superoxide dismutases. Advanced Enzymology, 58: 61-97.
16. Gulzar, S. and M. Ajmalkhan. 2001. Seed germination of a halophytic grass *Aeluropus lagopoides*. Annals of Botany, 87: 319-324.
17. Jiang, N., X. Luo, J. Zeng, Z.R. Yang, L.Y. Zheng and S.T. Wang. 2010. Lead Toxicity Induced Growth and Antioxidant Responses in *Luffa cylindrica* seedlings. International Journal Agriculture Biology, 12: 205-210.
18. Kanematsu, S. and K. Asada. 1991. Chloroplast and cytosol isozymes of Cu/Zn superoxide dismutase: their characteristic amino acid sequences. Free Radical Research, 12: 383-390.
19. Matters, G.L. and J.G. Scandalios. 1986. Effect of the free radical-generating herbicide paraquat on the expression of the superoxide dismutase (Sod) genes in maize. Biochemistry Biophysics Acta, 882: 29-38.
20. Modarresi, M., G. Nematzadeh and F. Moradian. 2010. Enzyme Assay of *Aeluropus littoralis* Parl. regarding to the salt (NaCl) stresses. Pazhouheshname Eslahe Giahane Zeraii, 5: 17-29.
21. Modarresi, M., G. Nematzadeh, F. Moradian and S.M. Alavi. 2012. Identification and Cloning of the Cu/Zn Superoxide Dismutase Gene from Halophyte Plant *Aeluropus littoralis*. Russian Journal of Genetics, 48(1): 130-134.
22. Ragusa, S., M.T. Cambria, M. Scarpa, M.L. Di Paolo, M. Falconi, A. Rigo and A. Cambria. 2001. Properties of purified cytosolic isoenzyme I of Cu/Zn superoxide dismutase from *Nicotiana plumbaginifolia* leaves. Protein Expression and Purification, 23: 261-269.
23. Ratnayaka, H.H., W.T. Molin and T.M. Sterling. 2003. Physiological and antioxidant responses of cotton and spurred anoda under interference and mild drought. Journal of Experimental Botany, 54(394): 2293-2305.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-23]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1391.4.10.2.1]

24. Scandalios, J.G. 1993. Oxygen Stress and Superoxide Dismutases. Plant Physiology, 101: 7-12.
25. Rodriguez-Serrano, M., M.C. Romero-Puertas, G.M. Pastori, F.J. Corpas, L.M. Sandalio, L.A. del Rio and J.M. Palma. 2007. Peroxisomal membrane manganese superoxide dismutase: characterization of the isozyme from watermelon (*Citrullus lanatus* Schrad.) cotyledons. Journal of Experimental Botany, 58: 2417-2427.
26. Tainer, J.A., E.D. Getzoff, J.S. Richardson and D.C. Richardson. 1983. Structure and mechanism of copper, zinc superoxide dismutase. Nature, 306: 284-287.
27. Wang, J., L. Xuequn and Y. Guanghui. 2009. Identification of superoxide dismutase isoenzymes in tobacco pollen. Frontiers of Biology in China, 4: 442-445.
28. Wu, T.H., M.H. Liao, W.Y. Kuo, C.H. Uang, H.L. Hseieh and T.L. Jinn. 2011. haracterization of copper/zinc and manganese superoxide dismutase in green bamboo (*Bambusa oldhamii*): Cloning, expression and regulation. Plant Physiology and Biochemistry, 49: 195-200.
29. Xu, X., Y. Zhou, S. Wei, D. Ren, M. Yang, H. Bu, M. Kang, J. Wang and J. Feng. 2009. Molecular cloning and expression of a Cu/Zn Containing superoxide dismutase from *Thellungiella halophila*. Molecules and Cells, 27(4): 423-428.
30. Yiu, J.C. and M.J. Tseng. 2005. Manipulation of superoxide dismutase and catalase exhibit enhanced sulfur dioxide tolerance in transgenic Chinese cabbage. Acta Horticulture, 692: 91-99.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-23]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1391.4.10.2.1]

Isolation and Cloning of *Cu/Zn* Superoxide Dismutase Genes (*AlSOD$_1$* and *AlSOD$_2$*) From Halophyte Plant *Aeluropus lagopoides*

M. Modaressi[1], G. Nematzadeh[2] and F. Moradian[3]

1- Ph.D. Student of Tarbiat Modares University (Corresponding author: mstmodarresi@gmail.com)
2 and 3- Professor and Assistant Professor of Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University

Received: 30, April, 2011 Accepted: 24, June, 2012

Abstract

The active oxygen species are the most important plant stress agents. Superoxide dismutase is a key enzyme which constitutes the first line of defence against oxygen toxicity. This enzyme is necessary for aerobic life and play an effective role in the process of tolerance to stress and plant longevity. *Aeluropus lagopoides* is a halophyte plant that tolerate high soil salinity and have high activity of superoxide dismutase enzyme. We used the sequences of SOD genes from another plants in Poaceae family for primer designing and isolated genes from halophyte plant *Aeluropus lagopoides*. In this investigation two novel SOD genes AlSOD$_1$ and AlSOD$_2$ isolated and cloned in *E.coli* via pTZ57R/T cloning vector. These two genes encoding 152 amino acids and also have high homology with *Cu/Zn* SOD *Aelurous littoralis*, *Zea mays*, *Phyllostachys edulis* and *Oryza sativa* with 92, 89, 88 and 87% respectively.

Keywords: *Aeluropus lagopoides*, Cloning, *AlSOD$_1$* and *AlSOD$_2$* genes

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-23]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1391.4.10.2.1]