دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

کلونینگ و ارزیابی بیوانفورماتیکی ژن مونودهیدروآسکوربات ردوکتاز (MDHAR) در گیاه آلوروپوس لیتورالیس و بررسی بیش‌بیان آن در گیاه توتون (*Nicotina tobacum*)

آزاده محسنی[۱]، قربانعلی نعمت زاده[۲]، علی دهستانی کلاگر[۳]، بهزاد شاهین کلیبر[۴] و الهام سلیمانی[۵]

۱- دانشجوی دکتری، دانشگاه فردوسی مشهد، (نویسنده مسوول: azadehmohseni34@yahoo.com)
۲- استاد، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۳ و ۵- استادیار و دانشجوی دکتری، پژوهشکده‌ی ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی (GABIT) طبرستان، ساری
۴- دانشجوی دکتری، دانشگاه شیراز

تاریخ دریافت: ۹۴/۳/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۴/۸/۱۷

چکیده

شوری خاک یکی از مهم‌ترین عوامل غیرزنده، با برهم زدن شرایط مطلوب است که سبب بروز اختلالات متابولیسمی در سلول‌های گیاهی، از جمله افزایش تولید انواع گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) می‌گردد. مونودهیدروآسکوربات ردوکتاز (MDHAR) یکی از آنزیم‌های کلیدی در مسیر گلوتاتیون-آسکوربات است که به نقش احیاکنندگی رادیکال‌های مونودهیدروآسکوربات را بر عهده دارد. در تحقیق حاضر آنزیم مونودهیدرو آسکوربات ردوکتاز، از گیاه هالوفیت آلوروپوس لیتورالیس (*Aeluropus littoralis*) شناسایی، جداسازی و هم‌سانه‌سازی گردید و به گیاه توتون انتقال داده شد. برای این منظور با توجه به اطلاعات در دسترس در پایگاه NCBI، پرایمرهای مناسب طراحی و با روش RT-PCR توالی ژنی مذکور تکثیر و به منظور توالی یابی در وکتور pTZ57R/T درون باکتری ای.کلای (DH5α) هم‌سانه‌سازی شد. سپس به منظور انتقال به گیاه توتون، با آنزیم pfu دی. ان. آ. پلیمراز تکثیر گردید. پس از الحاق پروموتر و ترمیناتور 35S به ناقل بیانی pGreen0029، توالی ژنی MDHAR نیز به این ناقل وارد شد و سازه‌ی نوترکیب به سلول‌های اگروباکتریوم نژاد LBA4404 ترانسفورم شد و برای تراریخت‌سازی توتون به روش دیسک برگی مورد استفاده قرار گرفت. از گیاهان باززایی شده در محیط انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین استخراج DNA و سپس RNA صورت گرفت و آزمون‌های PCR و RT-PCR انجام شد. آزمون PCR با DNA گیاهان انتخابی نشان داد توالی ژنی MDHAR به سلول‌های گیاهان تراریخت وارد شده و بیان مستمر این ژن نیز توسط آزمون RT-PCR تأیید شد. بررسی‌های بیوانفورماتیکی روی ژن نشان داد که ژن MDHAR شامل ۱۴۳۶ جفت باز و فاقد نواحی اینترونی است. مقایسه‌ی توالی به دست آمده با توالی‌های سایر MDHARهای گیاهی ثبت شده در بانک ژن، بیانگر شباهت بالای این ژن با سایر MDHRهای جدا شده از گیاهان خانواده‌ی گندمیان بوده که با MDHAR سورگم (Sorghum bicolor)، بیشترین شباهت را داشت. آنالیز ساختار پروتئینی، بین سلولی بودن و نواحی موتیف pyr-redoxin و SDR را اثبات کرده و نیز بررسی ساختار ثانویه، نشان‌دهنده‌ی ۷۸/۳ درصد ساختار مارپیچ آلفا، ۴۱/۱ درصد ساختار چین خورده ی بتا و ۱۳/۶ درصد ساختار دور بتا یا دور معکوس بود.

واژه‌های کلیدی: گونه‌های اکسیژن فعال، مونودهیدروآسکوربات ردوکتاز (MDHAR)، آلوروپوس لیتورالیس، ناقل pGreen0029، توتون، تراریخت

مقدمه

تنش‌های غیرزنده از عوامل اصلی کاهش عملکرد محصول در سراسر جهان به شمار می‌آید که از بین آنها شوری مهم‌ترین عامل محیطی است که به نابودی زمین‌های کشاورزی و کاهش عملکرد محصول منجر می‌گردد (۳۷). حدود ۳/۴ درصد سطح زمین حاوی آب‌های شور می‌باشد، بنابراین عجیب نیست که مقدار قابل توجهی از سطح کره‌ی زمین، تحت تأثیر نمک باشد. نزدیک به ۸۰۰ میلیون هکتار از خشکی‌های کره‌ی زمین در شرایط شوری قرار دارند (۲۷). ناتوانایی گیاه برای جابه‌جایی از زیستگاه طبیعی خود، سبب شده است که گیاهان متحمل شرایط نامطلوب بسیاری چون شوری، خشکی و دمای بالا شوند (۱۰). داشتن خصوصیتی مانند تحمل به شوری، گیاهان را قادر می‌سازد تا در محیط دارای غلظت زیاد نمک رشد کنند و چرخه‌ی زندگی خود را تکمیل کنند.

به نظر می‌رسد که گونه‌های فعال اکسیژن یا ROS[1] که حسگرهای محیطی و یا تعدیل‌کننده‌های الگوی بیان ژن محسوب می‌شوند، نقش مهمی را در نمو و دفاع گیاه بر عهده داشته باشند. استرس‌های اکسیداتیو و مراحل نمو گیاه مثل بلوغ بذر نیز سبب تولید گونه‌های اکسیژن فعال می‌گردد. ROSها ترکیباتی نظیر پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، سوپراکسید (O_2^-) و (رادیکال هیدروکسیل (HO^-) هستند که به دلیل داشتن الکترون آزاد، بسیار واکنش پذیر بوده و ممکن است برای سلول‌های گیاهی سمی باشند. ROS اغلب که محصول جانبی متابولیسم‌های طبیعی سلول، در میتوکندری، کلروپلاست، پراکسی‌زوم و هسته‌ی بسیاری از انواع ارگانیسم‌های زنده تولید می‌گردد (۳۰). تولید و تخریب ROS یک پدیده‌ی سلولی تنظیم شده می‌باشد، با این حال اصطلاح تنش اکسیداتیو به شرایطی اطلاق می‌گردد که تجمع ROS بیشتر از ظرفیت ارگانیسم

1- Reactive Oxygen Species

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-10]

[DOI: 10.18869/acadpub.jcb.8.17.230]

برای نگهداری پایداری اکسیداسیون- احیا یا رداکس (Redox) سلولی است. برای مثال قرارگیری بافت گیاه در معرض تنش‌هایی مانند خشکی، شوری، سرما، یخ زدگی، اشعه‌ی فرابنفش (UV)، ازون، نور شدید، حشره‌کش‌ها و صدمات فیزیکی اغلب سبب تحریک تولید یا تقویت تولید ROSها می‌گردند (۴). این ترکیبات می‌توانند سبب اکسیداسیون پروتئین‌ها، DNA، لیپیدها و فتوسیستم II شوند و به طور جدی به آنها آسیب برسانند (۲۵). گیاهان در مقابل موقعیت‌هایی که سطوح بالایی از ROS تجمع می‌یابد، از سیستم آنتی‌اکسیدان پیچیده‌ای استفاده می‌کنند. اجزای ابتدایی مکانیسم آنتی‌اکسیدان شامل آنتی‌اکسیدان‌ها با وزن مولکولی پایین (آسکوربات، گلوتاتیون، کارتنوئید، فلاونوئید و توکوفرول)، آنزیم‌ها (سوپراکسیددیسموتاز، کاتالاز، گلوتاردوکسین (Glutaredoxins)، گلوتاتیون پراکسیداز و پراکسیدازهای دیگر) و آنزیم‌های دخیل در چرخه‌ی آسکوربات-گلوتاتیون (گلوتاتیون ردوکتاز (GR)، آسکوربات پراکسیداز (APX)، مونودهیدروآسکوربات ردوکتاز (MDHAR) و دهیدروآسکوربات‌ردوکتاز (DHAR) می‌باشند. در این میان MDHAR یک آنزیم با کوآنزیم فلاوین آدنین دی نوکلئوتیدی (FAD) است (۱۸،۱۷) که به صورت آیزوزیم‌های کلروپلاستی (۱۷)، میتوکندریایی و پراکسیزومی (۲۶،۱۹) و سیتوسلی (۷) یافت می‌شود. MDHAR برای مونودهیدروآسکوربات (MDHA) که پذیرنده‌ی الکترون این آنزیم است بسیار اختصاصی عمل می‌کند. NADH و NADPH بخشنده‌های الکترون برای این آنزیم محسوب می‌شوند، حال آن‌که MDHAR، NADH را ترجیح می‌دهد (۱۷). باز تولید فرم کاهش یافته‌ی آسکوربات در چرخه‌ی آسکوربات-گلوتاتیون توسط این آنزیم انجام می‌گیرد. MDHAR تنها آنزیم شناخته‌شده‌ای است که از یک رادیکال آلی به عنوان سوبسترا استفاده می‌کند. اعضای تیره‌ی Poaceae از رده‌ی تک‌لپه‌ای‌ها، گیاهان مقاوم به تنش‌های محیطی شناخته شده‌اند (۱۴). گیاه آلوروپوس لیتورالیس گونه‌ای متعلق به این تیره است که این قابلیت را دارد که یک منبع مهم ژنتیکی برای برنامه‌های بیوتکنولوژی، به منظور بهبود مقاومت به شوری در گیاهان مهم زراعی مثل گندم و برنج، مورد استفاده قرار گیرد. این گیاه یک هالوفیت چند ساله، از خویشاوندان نزدیک گندم است و به صورت علف هرز در مرداب‌ها و مناطق شور و خشک رشد می‌کند. آلوروپوس حاوی ژنوم دیپلوئید (2n=2X=14) است، که اندازه‌ی آن درحدود ۳۴۲Mb می‌باشد (۲۱). این گیاه قادر است نمک را از راه غدد نمکی به خارج ترشح کند و به این ترتیب شوری را تا سطح یک درصد، به خوبی تحمل می‌کند. علاوه بر این، فتوسنتز در این گیاه از نوع متابولیسم C4 است که به آن انعطاف پذیری بیشتری در برابر تنش‌های شوری و خشکی می‌دهد. با توجه به تحمل شرایط محیطی دشوار، این گیاه واجد خصوصیات فیزیولوژیکی و مولکولی برجسته‌ای است که می‌تواند منبعی برای شناسایی ژن‌های جدید و مفید مقاومت به تنش شوری برای بهبود و اصلاح عملکرد محصولات زراعی مورد استفاده قرار گیرد (۱۴).

با توجه به نقش مهم آنزیم MDHAR در ایجاد تحمل به تنش‌های متفاوت در گیاه، در این تحقیق امکان جداسازی ژن MDHAR از گیاه آلوروپوس لیتورالیس و انتقال آن به کمک ناقل بیانی pGreen0029 به گیاه مدل توتون مورد بررسی قرار گرفت. آنالیزهای بعدی از قبیل بررسی‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی تغییرات ایجاد شده در هورمون‌ها و سایر مواد دخیل در رشد و نمو گیاهان تراریخت در تنش شوری، سبب شناخت بهتر اثر ژن جدا شده از گیاه آلوروپوس خواهد شد و زمینه‌ی انتقال این ژن به گیاهان مهم زراعی از قبیل گندم و برنج را فراهم خواهد ساخت.

مواد و روش‌ها

تهیه‌ی مواد گیاهی و شرایط رشد

بذور گیاه آلوروپوس جمع‌آوری شده از منطقه‌ی رودشت اصفهان (زیستگاه‌های طبیعی) در گلدان‌های حاوی شن، تحت شرایط محیطی کنترل شده (۱۶ ساعت روشنایی، هشت ساعت تاریکی، دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۷۵٪) کشت داده شد. به منظور جوانه‌زنی، بذور ابتدا با آب و پس از رسیدن به مرحله‌ی دو برگی با محلول هوگلند آبیاری شد. چند هفته پس از رسیدن گیاهان به مرحله‌ی دو برگی، برگ‌های گیاه کامل جمع‌آوری و تا زمان استخراج RNAی کل در دمای ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری گردید.

طراحی پرایمر و جداسازی ژن MDHAR

به منظور طراحی پرایمر با توجه به این‌که قبلاً هیچ توالی از ژن MDHR مربوط به گیاه آلوروپوس در پایگاه‌های اطلاعاتی ثبت نشده بود، توالی‌های ژنی مربوط به ژن MDHAR از خانواده‌ی گرامینه، با برنامه‌ی clustalW مورد آزمون هم‌ردیفی قرار گرفتند و از مناطق حفاظت شده‌ی این توالی‌ها، پرایمرهای دجنره طراحی گردید. به منظور استخراج RNA کل از محلول TRIZOL (اینویتروژن)[1] مطابق دستورالعمل استفاده شد و کمیت و کیفیت RNA استخراج شده با اسپکتوفتومتر در طول موج ۲۶۰ نانومتر و و نیز با استفاده از ژل آگارز تعیین شد. پنج میکروگرم از کل RNA با آنزیم M-Mulv Reverse transcriptase به طور

1- Invitrogen

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-10]

[DOI: 10.18869/acadpub.jcb.8.17.230]

معکوس رونویسی شد و تک‌رشته‌های cDNA تهیه گردید. واکنش RT-PCR با ۳۵ چرخه در حجم 25µl که شامل cDNA 1µl تک‌رشته، ده پیکومول از هر یک از پرایمرهای اختصاصی ژن، dNTP 200µM، PCR-buffer 1x و DNA پلیمراز 2.5 unit بود، صورت گرفت. محصول PCR در ژل آگارز یک درصد، جداسازی و با استفاده از کیت خالص‌سازی محصول PCR (Rche USA) از روی ژل خالص‌سازی شد.

هم‌سانه‌سازی و تعیین توالی MDHAR

محصول خالص‌شده‌ی PCR درون وکتور PTZ57R/T شرکت فرمنتاز مطابق دستورالعمل هم‌سانه‌سازی شد. کلون‌های سفید نوترکیب با روش غربال‌گری سفید/ آبی در محیط حاوی آنتی‌بیوتیک AMP 70mg/l، IPTG و X-gal به وسیله‌ی PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن تأیید شدند. بر اساس دستورالعمل سامبروک و همکاران (۳۳) از کلون‌های نوترکیب استخراج پلاسمید صورت گرفت و توالی یابی DNA توسط شرکت بایونیر (Bioneer) کره در هر دو برای با پرایمرهای عمومی M13 صورت گرفت.

بررسی بیوانفورماتیکی ژن MDHAR

کلیه‌ی توالی‌ها از پایگاه اطلاعاتی NCBI تهیه و جستجو برای یافتن توالی‌های مشابه از طریق BLASTn صورت گرفت. ۲۶ توالی با امتیاز بالاتر و e-value صفر انتخاب شدند و به کمک هم‌ردیفی چندگانه همردیف شدند و سپس درخت فیلوژنتیکی برای آن ترسیم گردید. توالی نوکلئوتیدی در سایت insilico.ehu.es/translate به پروتئین ترجمه گردید. سپس توالی پپتیدی به دست آمده، برای یافتن توالی‌های پپتیدی مشابه، Blastp شد. توالی پروتئینی در سایت ncbi/structure/cdd، برای تشخیص دمین‌های احتمالی آنالیز گردید. و نرم‌افزار TMHMM برای یافتن نواحی بین غشایی استفاده گردید. وزن مولکولی، نقطه‌ی ایزوالکتریک و ضریب ناپایداری آن در سایت expasy/protparam، محاسبه شد.

آماده‌سازی سازه‌ی ناقل بیانی

برای انتقال ژن MDHAR از ناقل بیانی pGreen0029 استفاده گردید. با توجه به فقدان پروموتور و ترمیناتور در ناقل مذکور، سازه‌ی 35S حاوی پروموتور و ترمیناتور به آن الحاق شد. استخراج پلاسمید حاوی کاست 35S و پلاسمید حاوی ناقل pGreen0029 از کلونی‌های باکتری E.coli تشکیل شده روی محیط کشت جامد انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین برای کاست 35S و کانامایسین برای ناقل pGreen0029 صورت گرفت. پس از کنترل کیفیت هر دو پلاسمید روی ژل آگارز یک درصد، پلاسمید 35S در ۵ تکرار (به منظور خالص‌سازی)، با آنزیم EcoRV و پلاسمید 0029 در ۵ تکرار با آنزیم SmaI به طور جداگانه مورد هضم آنزیمی قرار گرفتند. ساختار خطی به دست آمده از هضم کاست 35S و هم‌چنین ساختار خطی به دست آمده از هضم ناقل بیانی pGreen به طور جداگانه با استفاده از کیت خالص‌سازی شرکت رش از روی ژل خالص‌سازی گردیدند. واکنش اتصال 35S و 0029 با رعایت نسبت ۳ به ۱ (35S به pGreen0029) از راه آنزیم T4Ligase و حضور پلی‌اتیلن گلیکول صورت گرفت. پس از اتمام واکنش اتصال و ترانسفورم شدن سلول‌های مستعد باکتری E.coli سویه‌ی DH5α، به منظور اطمینان از حضور 35S در 0029، پلاسمیدهای استخراج شده از کلونی‌های تشکیل شده در محیط انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین و کانامایسین، با آنزیم SmaI هضم شدند. ناقل 0029 حاوی 35S بار دیگر با آنزیم SmaI، برای ورود ژن MDHAR، هضم گردیده و ژن مذکور بعد از تکثیر با آنزیم pfu دی. ان. آ پلی‌مراز دارای قابلیت تصحیح اشتباه در تکثیر، به درون ناقل الحاق گشت. پلاسمید حاوی سازه‌ی ناقل بیانی pGreen:35s:MDHAR از باکتری E.coli، در محیط انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین و کانامایسین استخراج شد. به منظور تأیید پلاسمیدهای نوترکیب با پرایمرهای اختصاصی ژن واکنش PCR انجام شد. برای تراریخت سازی گیاه توتون از باکتری Agrobacterium tumefaciens سویه‌ی LBA4404 استفاده گردید. سازه‌ی ناقل pGreen، برای بیان شدن نیاز به ناقل کمکی pSoup دارد. بنابراین، ابتدا pSoup با روش ترانسفورماسیون ذوب و انجماد (۵) به اگروباکتریوم منتقل گردید، سپس ساختار به دست آمده‌ی pGreen0029، MDHAR و پروموتور و ترمیناتور 35S، با روش ترانسفورماسیون ذوب و انجماد به باکتری Agrobacterium tumefaciens سویه‌ی LBA4404 انتقال داده شد. پس از انتقال سازه به درون اگروباکتریوم محصول ترانسفورماسیون در محیط کشت جامد، حاوی LB و آنتی‌بیوتیک‌های ریفامپسین، کانامایسین و تتراسایکلین، گسترده شدند. با کلونی‌های مقاوم تشکیل شده، به منظور تأیید ورود ژن به درون اگروباکتریوم، آزمون Colony PCR صورت گرفت. از کلونی‌های نوترکیب برای تلقیح گیاه توتون استفاده گردید.

ترانسفورماسیون توتون

گیاه توتون رقم سامسون کشت شده در محیط کشت موراشی- اسکوگ (MS)، برای تلقیح به روش دیسک برگی انتخاب شد و پس از تلقیح در محیط MS، حاوی هورمون‌های NAA (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر)، BA (۱ میلی‌گرم در لیتر)، ویتامین B5 و آنتی‌بیوتیک کانامایسین (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) و سفوتاکسیم

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-10]

[DOI: 10.18869/acadpub.jcb.8.17.230]

(۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر) قرار داده شد. گیاهان باززایی شده در این محیط به محیط جدید بدون هورمون منتقل شدند. بعد از رشد کافی در محیط، برای استخراج RNA و DNA انتخاب شدند. گیاهان رشد یافته در محیط حاوی آنتی‌بیوتیک با احتمال تراریخت بودن، انتخاب شدند.

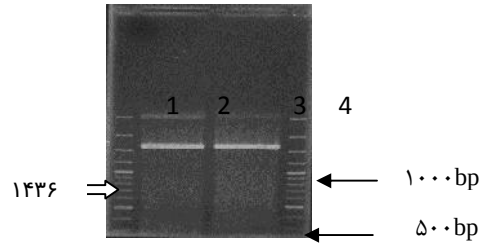
باززایی و سنجش‌های مولکولی

گیاهان رشد یافته در محیط کشت، بعد از ریشه‌زایی به خاک منتقل شده و برای تأیید حضور ژن MDHAR، استخراج DNA با روش دلاپورتا و همکاران (۸) صورت گرفت. سپس واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن انجام شد. به منظور تأیید بیان اولیه ژن MDHAR، استخراج RNA از گیاهان تراریخت با معرف ترایزول صورت گرفت و پس از سنتز cDNA، واکنش RT-PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن انجام شد. سپس هر دو محصول PCR روی ژل آگارز ۱ درصد مورد بررسی قرار گرفتند.

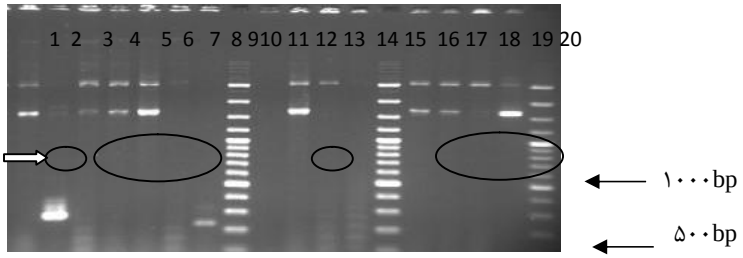
نتایج و بحث

جداسازی و هم‌سانه‌سازی ژن

با در نظر گرفتن توالی‌های به کار برده شده برای طراحی پرایمر از ژن MDHAR از گیاهان خانواده‌ی گرامینه، انتظار وجود باندی با اندازه‌ی ۱۴۳۶ نوکلئوتید وجود داشت که محصول PCR با cDNA سنتز شده از RNA، در ژل آگارز وجود این باند را تأیید کرد (شکل ۱). پس از کلون‌سازی ژن MDHAR درون سازه‌ی هم‌سانه‌سازی PTZ57R/T با هدف توالی‌یابی، به منظور اطمینان از حضور ژن درون سازه از پرایمرهای عمومی M13 برای انجام واکنش PCR استفاده گردید که با توجه به طراحی این پرایمر از نواحی نزدیک به انتهای سازه انتظار می‌رفت که ۲۰۰ نوکلئوتید به طول اصلی توالی اضافه نماید. بنابراین باید باندی با ۱۶۳۶ نوکلئوتید مشاهده می‌شد (شکل ۲). توالی‌یابی قطعه‌ی کلون شده با استفاده از پرایمرهای رفت و برگشت M13 که توالی آن در داخل ناقل هم‌سانه‌سازی حضور دارد، صورت گرفت. برای ایجاد یک توالی منفرد، توالی‌های رفت و برگشت به منظور شناسایی نواحی همپوشان، BLAST شدند. به این ترتیب نوکلئوتیدهای متفاوت در بین دو توالی مشخص گردید که با مراجعه به منحنی مربوطه، نوکلئوتیدهای دارای پیک مشخص و مجزا به عنوان نوکلئوتیدهای درست انتخاب شدند. در نهایت با اضافه کردن ابتدا و انتهای رشته‌ها به یکدیگر توالی کامل قطعه‌ی توالی یابی شده، به دست آمد. توالی کامل مجددا در سایت NCBI، بلاست شد که مشاهده‌ی نتایج آن، توالی یابی صحیح قطعه‌ی مورد نظر را تأیید کرد.



شکل ۱- PCR با cDNA حاصل از RNA جدا شده از گیاه آلوروپوس و پرایمرهای MDHAR، چاهک شماره ۲ و ۳ محصول PCR با پرایمرهای ژن مذکور می‌باشد که باند حدود ۱۴۳۶ جفت باز را نشان می‌دهد. چاهک شماره‌ی ۱ و ۴ مارکر وزن مولکولی (SMO333, Fermentas) .



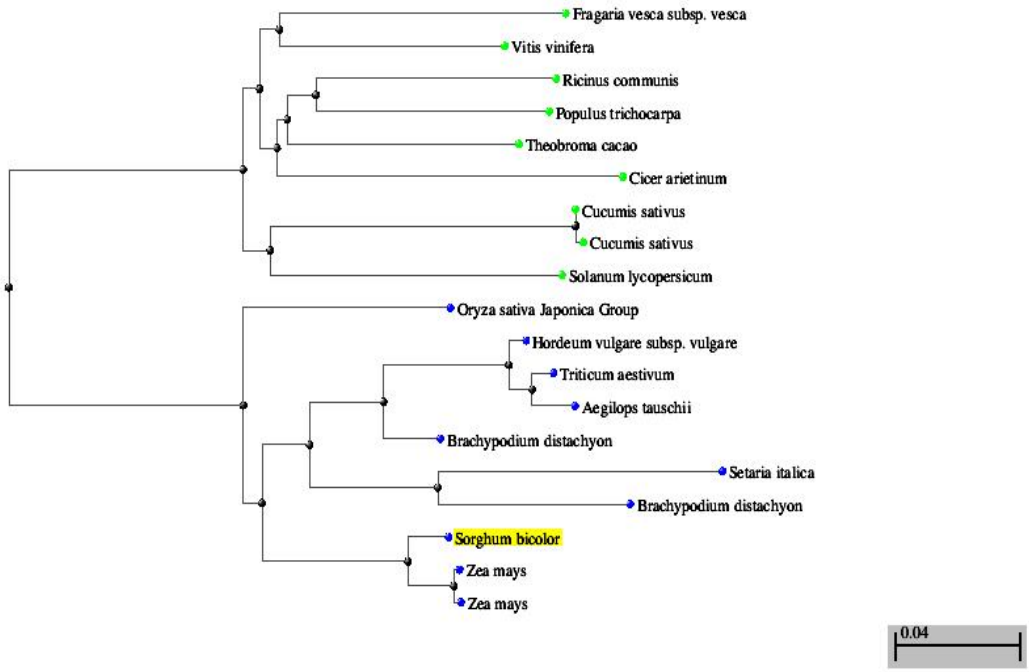
شکل ۲- الکتروفورز محصولات E. coli Colony PCR ترانسفورم شده با ناقل‌های نوترکیب که روی محیط‌های حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین و IPTG و X-gal رشد کردند و کلونی سفید تشکیل دادند بروی ژل آگارز ۱ درصد. چاهک‌های شماره ۱۶،۱،۳،۴،۵،۱۱،۱۵ و ۱۸ کلونی‌های ترانسفورم شده با پرایمر عمومی M13 دارای باند ۱۶۳۶. چاهک‌های شماره‌ی ۱۰، ۱۵ و ۲۰ مارکر وزن مولکولی (SMO333 Fermentas).

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-10]

[DOI: 10.18869/acadpub.jcb.8.17.230]

بررسی بیوانفورماتیکی

بررسی نوکلئوتیدی توالی ژن MDHAR نشان داد که این ژن دارای ۱۴۳۶ نوکلئوتید است با کدون آغاز ATG و کدون پایان UGA. محتوای AT آن ۵۲/۴۴ درصد و محتوای GC، ۴۷/۵۶ درصد است. هم‌چنین بلاست نوکلئوتیدی و پروتئینی ژن MDHAR با سایر گیاهان خانواده‌ی گرامینه، بیشترین شباهت این ژن در گیاه آلوروپوس را به گیاه سورگوم (Sorghum bicolor) نشان داده است (شکل ۳). به طور تئوری می‌توان اظهار داشت این ژن قادر به کد کردن پروتئینی با ۴۷۹ اسید آمینه می‌باشد. با بررسی دمین‌های توالی پروتئینی، دمین‌های نوکلئوتید پیریدین- دی‌سولفیداکسیدو ردوکتاز (pyr-redox) و زنجیره‌ی کوتاه دهیدروژناز/ ردوکتاز (SDR) در توالی نوکلوئوتیدی ژن MDHAR، شناسایی شدند. بررسی ساختار ثانویه‌ی پروتئین نیز حاکی از ۷۸/۳ درصد ساختار مارپیچ آلفا (H)، ۴۱/۱ درصد ساختار چین خورده‌ی بتا (E) و ۱۳/۶ درصد ساختار دور بتا یا دور معکوس (T) است. تجزیه‌ی توالی MDHAR برای تعیین موقعیت پروتئین آن در سلول نشان داد این ژن بیشتر در نواحی بین غشایی[1] وجود دارد و درصد کمی از آن در نواحی داخل غشایی و خارج غشایی قرار دارد. وزن مولکولی و نقطه‌ی ایزوالکتریک پروتئین به ترتیب ۵۱۷۵۷/۴ و ۸/۴۶ تخمین‌زده شده است. ضریب ناپایداری آن نیز ۳۱/۸۴ محاسبه شده است.



شکل ۳- درخت فیلوژنتیکی توالی آمینواسید MDHAR این درخت نشان‌دهنده‌ی بیشترین شباهت این ژن در گیاه آلوروپوس به گیاه سورگوم است.

آماده‌سازی سازه‌ی ناقل بیانی Green:35s:MDHAR

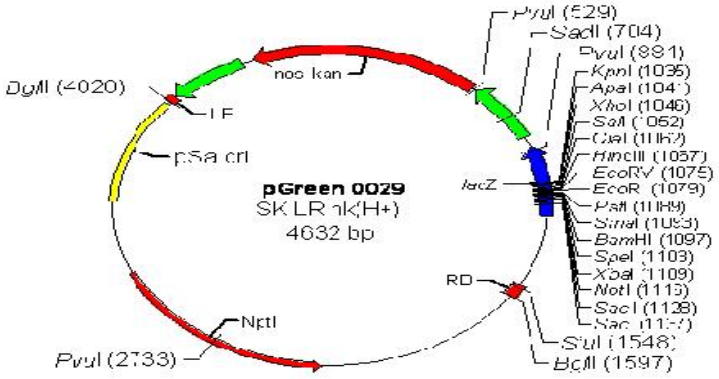
ناقل pGreen0029 فاقد پروموتور و ترمیناتور می‌باشد (شکل ۴)، بنابراین باید به آن پروموتور و ترمیناتور الحاق شود. جداسازی پروموتر و ترمیناتور از کاست 35S (شکل ۵)، بدین منظور صورت گرفت. با هضم سازه‌ی 35S در جایگاه آنزیم EcorV، ساختار خطی ۶۷۲ نوکلئوتیدی حاصل شد. هضم ناقل pGreen0029 با آنزیم *SmaI* نیز سبب خطی شدن این ناقل حلقوی برای ورود ساختار خطی ۶۷۲ نوکلئوتیدی گردید. پس از آماده‌سازی ناقل، ژن تکثیر یافته با آنزیم pfu دی. ان. آ. پلیمراز به درون سازه الحاق شد. با انجام واکنش Colony-PCR باندی با اندازه‌ی ۱۴۳۶ نوکلئوتید مشاهده شد که با در نظر گرفتن اندازه‌ی ژن MDHAR حضور آن درون سازه تأیید گردید (شکل ۶). با توجه به الحاق ژن به ناقل بیانی دارای انتهای صاف، برای‌گیری صحیح ابتدای ژن به سمت پروموتر و انتهای آن به سمت ترمیناتور نیز باید تأیید می‌گردید که این امر به کمک آزمون هضم آنزیمی با انتخاب آنزیم‌های SacI و HindIII صورت گرفت. با مراجعه به جایگاه‌های برش آنزیم SacI، باندهای دارای وزن‌های ۴۸۳۰، ۷۷۶، ۵۶۸ و ۵۶۶ مورد انتظار بودند که در شکل ۷-الف قابل مشاهده می‌باشد. همان‌طور که در شکل

1- Transe Membrane

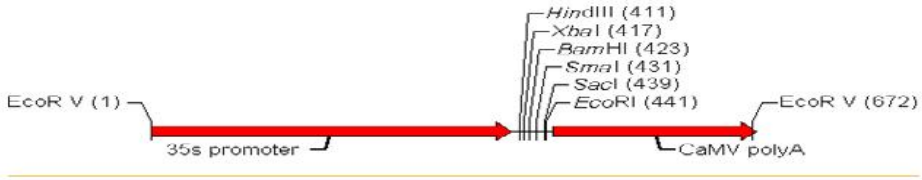
[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-10]

[DOI: 10.18869/acadpub.jcb.8.17.230]

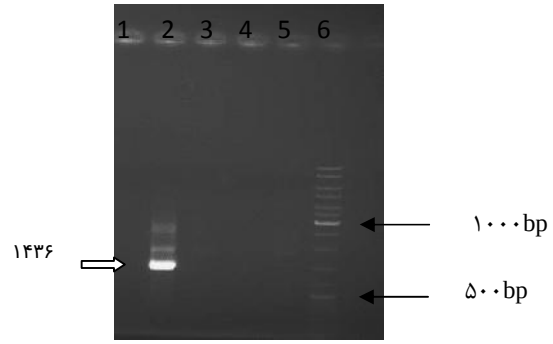
مشاهده می‌شود باند مابین وزن مولکولی ۵۰۰ و ۶۰۰ ضخیم‌تر می‌باشد که به علت هم‌پوشانی باندهای دارای وزن ۵۶۶ و ۵۶۸ است. با آنزیم HindIII، باندهای دارای وزن‌های ۵۰۲۰، ۹۳۷ و ۶۷۶ مورد انتظار می‌بودند، که از سه باند مورد نظر تنها دو باند مشاهده شد اما با توجه به اینکه باند ۹۳۷ تنها در حالت صحیح قرارگیری ژن قابل مشاهده است، می‌توان صحیح قرار گرفتن ژن را تأیید نمود (شکل ۷- ب).



شکل ۴- ناقل بیانی pGreen 0029 برای خطی شدن و ورود پروموتر و ترمیناتور، در جایگاه آنزیمی SmaI در توالی نوکلئوتیدی ۱۰۸۳هضم گردید.



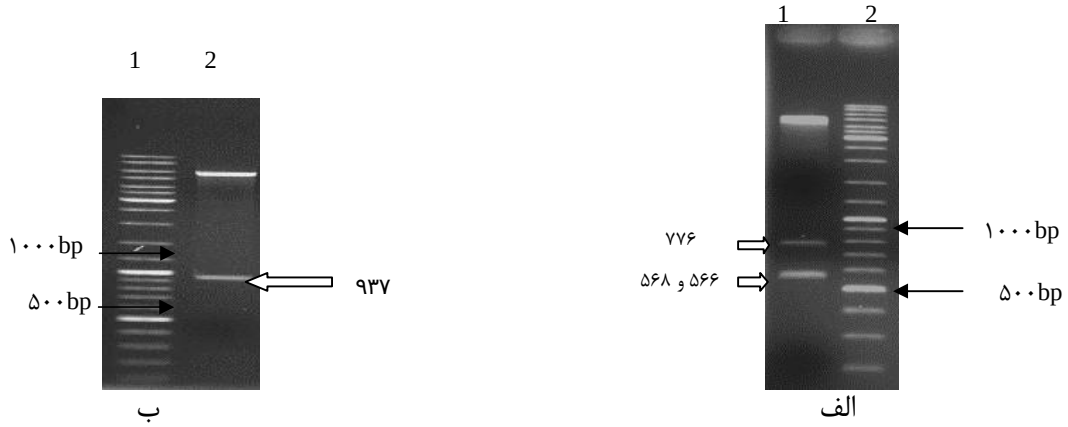
شکل ۵- کاست 35s دارای پروموتر و ترمیناتور برای ورود به ناقل pGreen0029، در جایگاه آنزیمی EcorV در دو سر کاست هضم گردید و بعد از قرار گیری در ناقل بیانی در جایگاه SmaI هضم گردید تا برای ورود ژن MDHAR ساختار خطی ایجاد شود.



شکل ۶- کلونی-PCR با کلونی‌های مقاوم تشکیل شده در محیط کشت انتخابی با پرایمرهای اختصاصی ژن MDHAR .چاهک شماره‌ی ۲ دارای وزن ۱۴۳۶ نوکلئوتید، نشاندهنده‌ی تکثیر ژن موردنظر می‌باشد. چاهک شماره‌ی ۶ مارکر وزن مولکولی (SMO333 Fermentas).

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-10]

[DOI: 10.18869/acadpub.jcb.8.17.230]

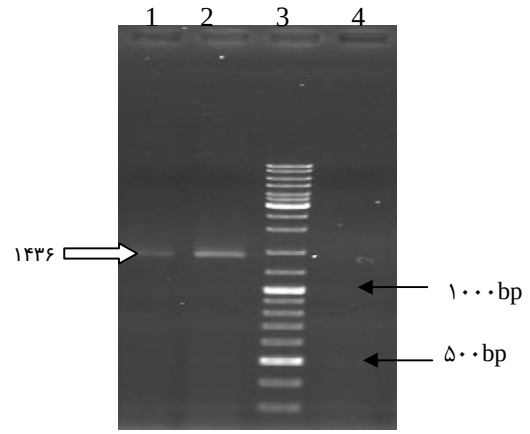


شکل ۷- هضم سازه‌ی ناقل بیانی pGreen0029 با آنزیم SacI (الف) و HindIII (ب) به منظور تأیید برای‌گیری صحیح ژن MDHAR درون سازه.

شکل الف، چاهک شماره‌ی ۱ باندهای حاصل از هضم آنزیمی با آنزیم SacI و چاهک شماره‌ی ۲ مارکر وزن مولکولی (SMO333, Fermentas)، هم‌پوشانی باندهای دارای وزن ۵۶۸ و ۵۶۶، علت ضخیم‌تر شدن باند مابین ۵۰۰ و ۶۰۰ می‌باشد. شکل ب، چاهک شماره‌ی ۱ مارکر وزن مولکولی (SMO333, Fermentas) و چاهک شماره‌ی ۲ باند حاصل از هضم آنزیمی با آنزیم HindIII.

ترانسفورماسیون گیاه توتون (Nicotiana tabacum)

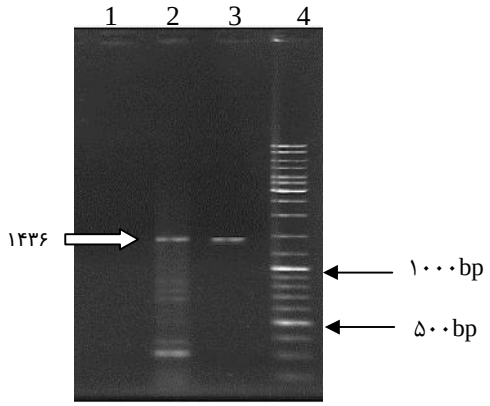
پس از ورود سازه‌ی بیانی به درون گیاه توتون، گیاهان تراریخت باید به منظور تأیید حضور ژن MDHAR مورد آزمون قرار می‌گرفتند. باززایی و سنجش‌های مولکولی به منظور تأیید مولکولی حضور ژن MDHAR، محصول PCR با نمونه‌ی DNA استخراج شده از گیاهان منتخب در ژل آگارز یک درصد مورد بررسی قرار گرفت. وجود باند با وزن ۱۴۳۶ نوکلئوتید در گیاه منتخب وعدم حضور باند در گیاه شاهد، نشانه‌ی حضور ژن MDHAR و تراریخت بودن گیاه منتخب می‌باشد (شکل ۸). برای تأیید نسخه‌برداری ژن در گیاهان تراریخت، محصول PCR با نمونه‌ی cDNA سنتز شده از RNA مستخرج از گیاه تراریخت در ژل آگارز ۱ درصد مورد بررسی قرار گرفت. در این مورد نیز وجود باند با وزن ۱۴۳۶ نوکلئوتید و فقدان باند در گیاه شاهد نشانه‌ی بیان اولیه‌ی ژن در نسل اول گیاه تراریخت می‌باشد (شکل ۹).



شکل ۸- تأیید حضور ژن MDHAR با مشاهده‌ی باند bp ۱۴۳۶ مطابق با وزن باند ژن MDHAR. چاهک شماره‌ی ۱، گیاه تراریخت، چاهک شماره‌ی ۲، پلاسمید دارای ژن(کنترل مثبت) چاهک شماره‌ی ۳ مارکر وزن مولکولی (SMO333, Fermentas) و چاهک شماره‌ی ۴ گیاه شاهد (کنترل منفی).

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-10]

[DOI: 10.18869/acadpub.jcb.8.17.230]



شکل ۹- تأیید بیان اولیه‌ی ژن MDHAR با RT-PCR، با مشاهده‌ی باند ۱۴۳۶ bp مطابق با وزن باند ژن MDHAR. چاهک شماره‌ی ۱، گیاه شاهد (کنترل منفی)، چاهک شماره‌ی ۲، گیاه تراریخت، چاهک شماره‌ی ۳ پلاسمید دارای ژن (کنترل مثبت) و چاهک شماره‌ی ۴ مارکر وزن مولکولی (SMO333, Fermentas).

به طور طبیعی رشد و نمو گیاه اغلب در معرض تنش‌های محیطی متفاوت مانند شوری است که یکی از مشکلات اصلی کشاورزی در نواحی خشک و نیمه خشک می‌باشد (۱). تنش‌های زنده و غیر زنده سبب تولید ROS می‌گردد. تجمع این رادیکال‌ها در گیاه سبب آسیب به اجزای متفاوت سلولی مانند لیپیدها می‌گردد. توانایی پاک‌سازی یا خنثی نمودن ROS به وسیله‌ی سیستم‌های متنوع نجات سلول بسیار مهم است. گیاهان، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان متفاوتی از جمله MDHAR را در چرخه‌ای به نام گلوتاتیون- آسکوربات به کار می‌برند. عملکرد APX در سیستم آنتی‌اکسیدان گیاهی شناخته شده است، این آنزیم، اکسیداسیون آسکوربات را برای تبدیل شدن به مونودهیدروآسکوربات کاتالیز می‌کند، تا بتواند اثر سمی پراکسید هیدروژن را از طریق چرخه‌ی گلوتاتیون- آسکوربات از بین ببرد و آن را به آب تبدیل کند. آسکوربات مورد نیاز APX به کمک آنزیم MDHAR فراهم می‌شود. به این ترتیب که این آنزیم MDA را به آسکوربات احیا می‌کند و آسکوربات به عنوان دهنده‌ی الکترون در اختیار APX قرار می‌گیرد. برای حفظ پایداری ردااکس، تجمع آسکوربیک اسید (ASA) از MDA به وسیله‌ی MDHAR بسیار مهم است و همواره باید مقدار ASA بیشتر از DHA باشد. حضور ASA اولین خط دفاعی در برابر اثرات مخرب ROS می‌باشد (۳).

در گیاهان ژن MDHAR در پراکسی‌زوم، گلی‌اکسیزوم، کلروپلاست، میتوکندری و سیتوسول یافت شده است که ثابت می‌کند این ژن در همه جای سلول حضور دارد (۲۰). آنالیز توالی این ژن از گیاه آلوروپوس با ژن گیاهان دیگر نشان داد که درجه‌ی بالایی از پلی‌مورفیسم در بین این کلاس از پروتئین‌ها مشاهده می‌شود. آنالیزهای فیلوژنیک ژن MDHAR نشان‌دهنده‌ی خوشه‌بندی مشابه این گروه با ژن‌های سیتوسولی است. بیشترین شباهت این ژن در گیاه آلوروپوس به گیاه سورگوم (Sorghum bicolor) (۸۹٪) بوده است و سپس به‌ترتیب با ذرت (Zea mays) (۸۸٪)، برنج (Oreyza sativa) (۸۶٪) و گندم (Triticum aestivum) (۸۵٪) بیشترین شباهت را نشان داده است. آنالیزهای بیوانفورماتیکی دقیق‌تر بر اساس نواحی N-ترمینال پیش‌بینی نمود، پروتئین این ژن بین غشایی می‌باشد و بیشتر در غشای شبکه‌ی آندوپلاسمی قرار دارد و فاقد نواحی N- ترمینال سیگنال برای ارگانل‌های کلروپلاست و میتوکندری است. ژن MDHAR دارای دو نوع دمین، شامل دمین نوکلئوتید پیریدین- دی‌سولفیداکسیدوردوکتاز (pyr-redox) و دمین زنجیره‌ی کوتاه دهیدروژناز/ ردوکتاز (SDR) می‌باشد. دمین pyr-redox در دو ناحیه از توالی نوکلئوتیدی قرار گرفته است. یک ناحیه در توالی نوکلئوتیدی ۴۹۳ تا ۷۴۱ و ناحیه‌ی دیگر در توالی نوکلئوتیدی ۱۹ تا ۹۱۵ است. خانواده‌ی دمین pyr-redox شامل هر دو کلاس اکسیدوردوکتاز I و II و هم‌چنین NADH اکسیداز و پراکسیداز می‌باشد. در واقع این دمین، شامل یک دمین کوچک باند شونده با NADH است که درون دمین بزرگ‌تری قرار گرفته است که با FAD اتصال برقرار می‌کند. دمین SDR در توالی نوکلئوتیدی ۲۴۷ تا ۵۸۲ ژن MDHAR قرار گرفته است. این دمین از خانواده‌ی اکسیدوردوکتاز مشتق شده است که یک دمین انفرادی است و دارای تاخوردگی حفاظت شده (الگوی تاخوردگی آلفا/ بتا با صفحات بتای مرکزی)، ناحیه‌ی NAD(P)H و ناحیه‌ی C-ترمینال می‌باشد.

در تحقیق حاضر، امکان انتقال ژن MDHAR از گیاه آلوروپوس لیتورالیس به گیاه توتون رقم سامسون از

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-10]
[DOI: 10.18869/acadpub.jcb.8.17.230]

طریق ناقل بیانی pGreen0029، مورد مطالعه قرار گرفته است. برای بیان مؤثر ژن خارجی در گیاهان، یک سیستم بیانی خوب با استفاده از پروموتر مناسب و شرایط بهینه شده برای بیان بالا ضروری است. پیشرفت در طراحی پروموتر در کنار سایر عوامل و ژن مطلوب، سبب افزایش عملکرد ارگانیسم‌ها می‌گردد (۶). پروموتر قوی و پایداری مانند CaMV 35S برای بیان پروتئین در گیاهان مختلف به منظور بررسی مکانیسم تحمل مورد استفاده قرار گرفته است. اما باید این نکته را نیز خاطر نشان کرد که بیان مداوم فاکتور رونویسی که تنها در شرایط تنش فعالیت می‌کند، سبب کند شدن رشد و نمو گیاه از طریق خاموشی ژن می‌گردد. بنابراین استفاده از پروموتری که بیان پروتئین را تحت شرایط عوامل خارجی[1] تحریک می‌کند، مناسب‌تر است (۳۶). ناقل بیانی pGreen 0029 به کار برده شده در این تحقیق دارای خصوصیاتی است که استفاده از آن را در تحقیقات مولکولی مطلوب می‌سازد. با توجه به در حال رشد بودن تولید ناقل‌های دوگانه با اندازه‌ای کوچک به منظور افزایش کارایی انتقال ژن، این ناقل در اندازه‌ای در حدود kb ۴/۵، طراحی شد. ناقل pGreen فاقد پروموتور و ترمیناتور می‌باشد، بنابراین امکان دستورزی بیشتر آن برای افزایش جایگاه‌های آنزیم برشی در ناحیه‌ی چندگانه‌ی کلونینگ (MCS)[2]، ایجاد می‌گردد. از دیگر ویژگی‌های این ناقل می‌توان به قابلیت انعطاف آن اشاره کرد، به گونه‌ای که اجازه می‌دهد ژن‌های نشانگر انتخابی برای شناسایی به شیوه‌های انفرادی (single)، دوتایی (double) و یا جایگزینی به داخل آن وارد شوند (۱۵). لازم به ذکر است که ناقل pGreen بدون pSoup به‌عنوان ناقل کمکی، قادر به همانندسازی در اگروباکتریوم نخواهد بود (۳۲) و در محیط‌های آنتی‌بیوتیک بسیار ناپایدار است (۲۲).

با توجه به اهمیت ژن MDHAR در پاکسازی ROSها در گیاه در شرایط تنش، محققان زیادی روی فعالیت این آنزیم متمرکز شده‌اند. به گونه‌ای که عده‌ای از آنها بیش‌بیانی ژن مذکور را در گیاهان تراریخت و غیرتراریخت در شرایط تنش مورد ارزیابی قرار داده‌اند و گزارشات متعددی مبنی بر بیش‌بیانی MDHAR در تنش‌های متفاوت از جمله شوری، سرما، ازن، خشکی، علف‌کش پاراکوات و غیره که سبب افزایش استرس اکسیداتیو می‌گردند، ارائه کرده‌اند. مطالعات بیانی در گونه‌های متنوع گیاهی نشان داده است که MDHAR سیتوسولی، کلروپلاستی و میتوکندریایی در طول تنش‌های شوری، خشکی، سرما، به صورت افزایشی تنظیم می‌شود که می‌تواند در بیشتر موارد سبب افزایش تحمل گیاه گردد (۳۹،۳۱،۲۹،۱۶،۲). نتایج تحقیقات مختلف نشان داده است که بیش‌بیانی MDHAR در گیاهان، سبب افزایش تحمل به ازن، شوری، PEG (۱۰، ۱۱) و تحمل افزایش و کاهش دما و متیل ویولوژن (MV) (۳۵،۳۴،۲۸) شده است. هم‌چنین گزارشاتی ارائه شده است که نشان می‌دهد بیش‌بیانی DHAR و MDHAR در سیتوسول با افزایش نسبت ASA به DHA، تحمل به تنش شوری را افزایش می‌دهد (۳۹،۳۸،۲۴،۱۰،۹) کاهش پراکسیداسیون لیپیدها و افزایش میزان فتوسیستم II از دیگر اثرات بیش‌بیان این آنزیم می‌باشد (۲۳،۲۰،۱۳،۱۱). محتوای ASA نیز در اثر فعالیت این آنزیم افزایش پیدا می‌کند (۲۳،۲۰،۱۲،۱۰) و صدمات غشایی در طی تنش‌های متفاوت از جمله شوری کاهش می‌یابد (۱۲).

بررسی و تجزیه و تحلیل گیاهان تراریخت توتون در نسل دوم (T1) در شرایط تنش شوری با نسبت‌های متفاوت صورت خواهد گرفت و میزان فعالیت آنزیم و تغییر در بیان آن و هم‌چنین تغییرات فیزیولوژیکی گیاهان تراریخت مورد سنجش و ارزیابی قرار خواهد گرفت.

تشکر و قدردانی

تحقیق حاضر با حمایت مالی پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان انجام شد. بدین وسیله از ریاست محترم پژوهشکده و کارکنان آن مرکز صمیمانه تشکر می‌شود.

1- Exogenous

2- Multiple Cloning Site

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-10]

[DOI: 10.18869/acadpub.jcb.8.17.230]

منابع

1. Ashraf, M. and N.A. Akram. 2009. Improving salinity tolerance of plants through conventional breeding and genetic engineering: an analytical comparison. Biotechnology Advances, 27: 744-752.
2. Baek, K.H. and D.Z. Skinner. 2003. Alteration of antioxidant enzyme gene expression during cold acclimation of nearisogenic wheat lines. Plant Science, 165: 1221-1227.
3. Barnes, J.D., Y. Zheng and T.M. Lyons. 2002. Plant resistance to ozone: the role of ascorbate. In: K. Omasa, H. Saji, S. Youssefian, N. Kondo (Eds.), Air Pollution and Plant Biotechnology. Springer, Tokyo, pp: 235-254.
4. Bowler, C. and R. Fluhr. 2000. The role of calcium and activated oxygenes as signals for controlling cross-tolerance. Trends Plant Science, 5: 241-245.
5. Chen, H., R.S. Nelson and J.L. Sherwood. 1994. Enhanced recovery of transformants of Agrobacterium tumefaciens after freeze thaw transformation and drug selection. Biotechniques, 16: 664-670.
6. Choi, S., O. Lee, S. Kwon, S. Kwak, D. Yu and H. Lee. 2003. High expression of a human lactoferrin in transgenic tobacco cell cultures. Biotechnology Letters, 25: 213-218.
7. Dalton, D., L. Baird, L. Langeberg, C. Taugher, W. Anyan, C. Vance and G. Sarath. 1993. Subcellular localization of oxygen defense enzymes in soybean (Glycine max [L.]Merr.) Root nodules. Plant Physiology, 102: 481-489.
8. Dellaporta, S.L., J. wood and J.B. Hicks. 1983. PMB Reporter, 4: 19-21.
9. Eltayeb, A.E., N. Kawano and G.H. Badawi. 2006. Enhanced tolerance to ozone and drought stresses in transgenic tobacco overexpressing dehydroascorbate reductase in cytosol. Physiology Plant 127 57e65Dellaporta, S.L.J. wood and J.B. Hicks. 1983. PMB Reporter, 4: 19-21.
10. Eltayeb, A.E., N. Kawano, G.H. Badawi, H. Kaminaka, T. Sanekata, T. Shibahara, S. Inanaga and K. Tanaka. 2007. Overexpression of monodehydroascorbate reductase in transgenic tobacco confers enhanced tolerance to ozone, salt and polyethylene glycol stresses Planta, 225: 1255-1264.
11. Eltelib, H.A., A.A. Badejo, Y. Fujikawa and M. Esaka. 2011. Gene expression of monodehydroascorbate reductase and dehydroascorbate reductase during fruit ripening and in response to environmental stresses in acerola (Malpighia glabra). Journal of Plant Physiology, 168: 619-627.
12. Eltelib, H.A., Y. FUjikawa and M. Esaka. 2012. Overexpression of the acerola (Malpighia glabra) monodehydroascorbate reductase gene in transgenic tobacco plants results in increased ascorbate levels and enhaced tolerance to salt stress. South African Journal of Botany, 78: 295-310.
13. Gautier, H., F. Lopez-Lauri, C. Massot, R. Murshed, I. Marty, D. Grasselly, D. Keller, C. Sallanon and Genard. 2010. Impact of ripening and salinity on tomato fruit ascorbate content and enzymatic activities related to ascorbate recycling. Functional Plant Science and Biotechnology, 4: 66-75.
14. Grantz, A., D.A. Brummell and A.B. Bennett. 1995. Ascorbate free-radical reductase messenger-RNA levels are induced by wounding, Plant Physiology, 108: 411-418.
15. Hellens, R.P., E.A. Edwards, N.R. Leyland, S. Bean and Ph.M. Mullineaux. 2000. pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Molecular Biology*, 42: 819-832.
16. Hernandez, J.A., A.B. Aguilar, B. Portillo, E. Lopez-Gomez, J.M. Beneyto, and M.F. Garcia-Legaz. 2003. The effect of calcium on the antioxidant enzymes from salt-treated loquat and anger plants. Funct. Plant Biology, 30: 1127-1137.
17. Hossain, M.A., Y. Nakano and K. Asada. 1984. Monodehydroascorbate reductase in spinach chloroplasts and its participation in regeneration of ascorbate for scavenging hydrogen peroxide, Plant Cell Physiology, 25: 385-395.
18. Hossain, M.A. and K. Asada. 1985. Monodehydroascorbate reductase from cucumber is a flavin adenine dinucleotide enzyme, J. Biol. Chem. 260: 12920-12926.
19. Jimenez, A., J.A. Hernandez, L.A. del Río and F. Sevilla. 1997. Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. Plant Physiology, 114: 275-284.
20. Kavitha, K., S. George, G. Venkataraman and A. Parida. 2010. salt-inducible chloroplastic monodehydroascorbate reductase from halophyte Avicennia marina confers salt stress tolerance on transgenic plants. Biochimie, 92: 1321-1329
21. Kaya, C., H. Kirnak, D. Higgs and K. Saltali. 2002. Supplementary calcium enhances plant growth and fruit yield in strawberry cultivars grown at high (NaCl) salinity. Scientia Horticulturae, 93: 65-74.
22. Li, F., SH. Xing and Q. Guo. 2011. Drought tolerance over expression of expansin gene TaEXPB23 in transgenic tabacco. Journal of Plant Physiology, 168: 960-966.
23. Li, F., Q.Y. Wu, Y.L. Sun, L.Y. Wang, X.H. Yang and Q.W. Meng. 2010. Over expression of chloroplastic monodehydroascorbate reductase enhanced tolerance to temperature and methyl viologen-mediated oxidative stresses. Physiologic Plant arum, 139: 421-434.
24. Lunde, C., U. Baumann, N.J. Shirley, D.P. Drew and G.B. Fincher. 2006. Gene structure and expression pattern analysis of three monodehydroascorbate reductase (Mdhar) genes in Physcomitrella patens: implications for the evolution of the MDHAR family in plants. Plant Molecular Biology, 60: 259-275.
25. McDonald, M.B. 1999. Seed eterioration: physiology, repair and assessment. Seed Science and Technology, 27: 177-237
26. Mittova, V., M. Tal, M. Volokita and M. Guy. 2003. Up-regulation of the leaf mitochondrial and peroxisomal antioxidative systems in response to salt-induced oxidative stress in the wild salt-tolerant tomato species Lycopersicon pennellii. Plant, Cell & Environment, 26: 845-856.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-10]

[DOI: 10.18869/acadpub.jcb.8.17.230]

27. Munns, R. and M. Tester. 2008. Mechanism of salinity tolerance. Annual Rev. of Plant Biology, 59: 651-681.
28. Olien, C. and M. Smith. 1977. Ice adhesions in relation to freeze stress. Plant Physiology, 60: 499-503.
29. Ozturk, Z.N., V. Talame, M. Deyholos, C.B. Michalowski, D.W. Galbraith, N. Gozukirmizi, R. Tuberosa, R. and H.J. Bohnert. 2002. Monitoring large-scale changes in transcript abundance in drought- and salt-stressed barley. Plant Molecular Biology, 48: 551-573.
30. Prasad, T.K., M.D. Anderson, B.A. Martin and C.R. Stewart. 1994. Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedling and a regulatory role for hydrogen peroxide. Plant Cell, 6: 65-74.
31. Rizhsky, L., H.J. Liang and R. Mittler. 2002. The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. Plant Physiology, 130: 1143-1151.
32. Rodrigues, R.B., G. Sabat, B.B. Minkoff, H.L. Burch, T.T. Nguyen and M.R. Sussman. 2014. Expression of a translationally fused TAP-tagged plasma membrane proton pump in Arabidopsis thaliana. Biochemistry, 53: 566-578.
33. Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning (Vol. 2, pp. 14-9). New York: Cold spring harbor laboratory press.
34. Shin, S.Y., I.S. Kim, Y.S. Kim, H. Lee and H.S. Yoon. 2013. Ectopic expression of Brassica rapa L. MDHAR increased tolerance to freezing stress by enhancing antioxidant systems of host plants. South African Journal of Botany, 88: 388-400.
35. Shin, S.Y., M.H. Kim, Y.H. Kim3, H.M. Park and H.S. Yoon. 2013. Co-Expression of Monodehydroascorbate Reductase and Dehydroascorbate Reductase from *Brassica rapa* Effectively Confers Tolerance to Freezing-Induced Oxidative Stress Mol. Cells 36: 304-315, 10059-013-0071-4
36. Tang, L., M. Kim, K. Yang, S. Kwon, S. Kim, J. Kim, D. Yun, S. Kwak and H. Lee. 2008. Enhanced tolerance of transgenic potato plants overexpressing nucleoside diphosphate kinase 2 against multiple environmental stresses. Transgenic Research, 17: 705-715.
37. Vaidyanathan, H., P. Sivakumar, R. Chakrabarsty and G. Thomas. 2003. Scavenging of reactive oxygen species in NaCl-stressed rice (*Oryza sativa* L.) differential response in salt-tolerant and sensitive varieties. Plant Science, 165: 1411-1418.
38. Yabuta, Y., T. Maruta, K. Yoshimura, T. Ishikawa and S. Shigeoka. 2004. Two distinct redox signaling pathways for cytosolic APX induction under photooxidative stress. Plant & Cell Physiology, 45: 1586-1594.
39. Yoon, H.S., H. Lee, I.A. Lee, K.Y. Kim and J.K. Jo. 2004. Molecular cloning of the Monodehydroascorbate reductase gene from Brassica campestris and analysis of its mRNA level in response to oxidative stress. Biochimica et Biophysica Acta, 1658: 181-186.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-10]

[DOI: 10.18869/acadpub.jcb.8.17.230]

Cloning and Bioinformatics Analysis of MDHAR Gene from *Aeluropus Littoralis* and Over-Expression Analysis in *Nicotina Tabacum*

Azadeh Mohseni[1], Ghorbanali Nematzadeh[2], Ali Dehestani Kelagari[3], Behzad Shahin Kaleybar[4] and Elham Soleimani[5]

1- Ph.D. Student, Ferdoesi University (Corresponding authors: azadehmohseni34@yahoo.com)
2- Professor, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
3 and 4- Assistant Professor and Ph.D. Student, Genetics & Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan (GABIT), Sari
5- Ph.D. Student, University of Shiraz
Received: June 11, 2015 Accepted: November 8, 2015

Abstract

Salinity as one of the most important stresses disturbs favorable growth conditions of the plants leading to several metabolic disorders such as reactive oxygen species (ROS). Monodehydroascorbate reductase (MDHAR) with FAD (Flavin adenine dinucleotide) co-factor is one of the key enzymes in Glutathione-ascorbate pathway which reduces monodehydroascorbate (MDHA) radicals. In this study MDHAR gene was isolated from *Aeluropus littolaris*, a halophyte plant with, characterized and was transferred to tobacco plants after cloning. Gene specific primers were designed using similar sequences in NCBI and the desired sequence was amplified via RT-PCR, cloned in pTZ57R/T vector and sequenced. Primary bioinformatics assessments revealed that MDHAR gene consisted of 1436 bp lacking intron sequences. For tobacco transformation, cDNA fragment was amplified with Pfu DNA polymerase, inserted into pGreen0029 containing 35s promoter and terminator sequences. The recombinant vector was then introduced to LBA4404 agrobacterium cells, which were used for tobacco transformation via leaf disc method PCR analysis of the putative transgenic plants, indicated successful gene insertion into plant cells and gene transcription was confirmed by RT-PCR. Comparing which MDHAR sequences form other plants in NCBI, A. *littoralis* gene exhibited a high similarity with genes isolated from gramineae family. The highest similarity (89%) was observed for MDHARs from sorghum (*Sorghum bicolor*). Protein also analysis has proven that this gene is outside cell, pyr-redoxin and NAD-binding motif area. Secondary structure showed 78.3% alpha helix, 41.1% beta sheet and structure 13.6% B-turn structure or reverse turn.

Keywords: *Aeluropus littolaris*, Mono Dehydro Ascorbate Reductase (MDHAR), Pgreen Vector, Reactive Oxygen Spices (ROS), Tobacco, Transgenic

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-10]

[DOI: 10.18869/acadpub.jcb.8.17.230]