

دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۱۹، شماره ۲، صفحه ۲۱۷-۲۰۵ (۱۳۹۰)

همسانه‌سازی و تعیین خصوصیات ژن دلتا سیکس دسچوراز (*d6d*)، از گیاه گل گاوزبان ایرانی (*Echium amoenum*)

احسان شکری^{۱*}، سیدکمال کاظمی تبار^۲، جعفر ذوالعلی^۳، قربانعلی نعمت‌زاده^۴، نورالدین حسین‌پور آزاد^۵ و نجمه نصیری^۵

- *۱- نویسنده مسئول مکاتبات، کارشناس ارشد اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، ساری، پست الکترونیک: e.shokri62@gmail.com
- ۲- دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
- ۳- استادیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان
- ۴- استاد و محقق ارشد دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، ساری
- ۵- کارشناس ارشد اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، ساری

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۰۳/۲۹

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۰۴/۲۴

چکیده

فعالیت آنزیم دلتا-۶- دسچوراز (*d6d*) در تعداد معدودی از میکروارگانیسم‌ها و گیاهان از جمله گونه‌های جنس *Echium* متعلق به تیره گل گاوزبان (*Boraginaceae*) دیده می‌شود. این آنزیم اسیدلینولیک و اسید آلفالینولیک را به ترتیب به اسید گامالینولیک و اسید استئاریدینیک تبدیل می‌نماید. جداسازی ژن کدکننده آنزیم مزبور و استفاده از آن در مهندسی مسیر بیوسنتز اسیدهای چرب در گیاهان زراعی، اطلاعات علمی و کاربردی ارزشمندی را بدست خواهد داد. در این تحقیق، با هدف جداسازی و همسانه‌سازی ژن *d6d* از گیاه گل گاوزبان ایرانی (*E. amoenum*)، پس از استخراج RNA کل و ساخت cDNA از بذره‌های نارس گیاه، قطعه کدکننده ژن با استفاده از آغازگرهای طراحی شده بر اساس توالی آنزیم متناظر در گونه‌های خویشاوند، تکثیر گردید. قطعه تکثیر شده به طول تقریبی ۱۳۵۰ bp در پلاسمید ناقل همسانه‌سازی pBluescript SK(+) درج گردیده و پلاسمید نوترکیب به باکتری *E. coli* سویه DH5 α منتقل شد. نتایج تعیین توالی نوکلئوتید، صحت همسانه‌سازی قطعه مورد نظر را تأیید نمود. توالی کدکننده آنزیم دلتا-۶- دسچوراز در گل گاوزبان ایرانی مشتمل بر ۱۳۴۷ نوکلئوتید کدکننده ۴۴۸ آمینواسید توصیف گردید. این توالی در سطح پروتئین از مشابهت ۹۶ - ۹۴ درصد با توالی آنزیم متناظر در سایر گونه‌های جنس *Echium* برخوردار بود. دامین‌های مورد انتظار سیتوکروم b₅ دسچوراز اسید چرب، موتیف‌های حفاظت شده غنی از هیستیدین و موتیف HPGG همگی در توالی پروتئین ترجمه شده شناسایی شدند. همچنین ساختار ثانویه، مناطق ترانس‌ممبران و الگوی هیدروپسی توالی پروتئین ترجمه شده تعیین گردید که از مطابقت بسیار بالایی با گزارش‌های متناظر از گونه‌های خویشاوند برخوردار بود. بررسی خصوصیات عملکردی آنزیم کدشونده توسط ژن *d6d* کلن شده، مستلزم بیان در سیستم گیاهی مناسب و بررسی کارکرد آن در سطوح بیوشیمیایی و آنزیمی می‌باشد. توالی کدکننده ژن دلتا-۶- دسچوراز گیاه *E. amoenum* در پایگاه NCBI با شماره دسترسی GU237486 ثبت گردید.

واژه‌های کلیدی: آنزیم دلتا سیکس دسچوراز، گامالینولیک اسید، استئاریدینیک اسید، همسانه‌سازی، اسیدهای چرب غیراشباع.

مقدمه

اسیدهای چرب غیراشباع، از اجزاء اصلی تشکیل دهنده غشاهای زیستی در موجودات زنده می‌باشند و به همین دلیل خصوصیات ویژه‌ای به آن می‌بخشند و باعث حفظ سیالیت و عملکرد مناسب غشاء دو لایه‌ای می‌شوند و در انتقال پیام سلولی نقش دارند (Needleman *et al.*, 1986 و Sakuradani *et al.*, 1999). اسیدهای چرب غیراشباع در تولید مثل، بهبود پاسخ ایمنی، تنظیم فشار خون، متابولیسم کلسترول و رشد و نمو مغز و شبکه رتینال در نوزادان مؤثرند (Van Gool و Horrobin, 1992). علاوه بر این امروزه کاملاً مشخص شده است که اسیدهای چرب غیراشباع اُمگا ۳ و ۶ (w_3 و w_6) در متابولیسم ترکیبات شبه هورمونی اکوزانوئیدها نقش دارند و بطور کلی باعث تنظیم عملکرد فیزیولوژیکی و سلامت عمومی بدن می‌شوند (Horrobin, 1995). عمل غیراشباع‌سازی اسیدهای چرب (Desaturation) طبق فرایندی صورت می‌گیرد که در طی آن، باندهای دوگانه کربن-کربن در نقاط ویژه‌ای به زنجیره‌های اسیل آلیفاتیک (Aliphatic acyl Chains) اضافه می‌گردد (Shanklin & Cahoon, 1998).

آنزیم‌هایی که عمل غیراشباع‌سازی (Desaturase) را انجام می‌دهند، با عنوان کلی آنزیم‌های دسچوراز نامیده می‌شوند. علاوه بر این آنزیم‌ها، آنزیم‌های دیگری (الانگازها) وجود دارند که باعث طویل‌شدن، طول زنجیره‌ی کربنی اسید چرب می‌شوند. فرآیندهای غیراشباع کردن و طویل‌سازی‌های متعدد و پی‌درپی که روی سوبستراهای خاص انجام می‌پذیرد، منجر به سنتز اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه (Poly Unsaturated Fatty Acid) و اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه بلند

زنجیر (Long Chain- Poly Unsaturated Fatty Acid) می‌گردد. در گیاهان سنتز اسیدهای چرب غیراشباع در پلاستیدها و در خلال یکسری از واکنش‌های تغلیظ (Condensing) شروع می‌شود که در غشای پلاستیدها یا شبکه آندوپلاسمی (Retlicom Andoplasmic) ادامه یافته و نهایتاً منجر به تجمع اسیدهای چرب غیراشباع می‌گردد (Kinney, 1994). بیشتر گیاهان عالی، سنتز اسیدهای چرب را بصورت یک زنجیره‌ی بلند ۱۸ کربنه به پایان می‌رسانند، بنابراین تمام اسیدهای چرب کلروپلاستی آنها ۱۶ یا ۱۸ کربنه هستند. به عبارت بهتر در بیشتر گیاهان، اسید چرب اشباع عمده اسیدپالمیتیک ($C_{16:0}$) و اسیدهای چرب غیراشباع اصلی نیز شامل اولئیک (OA, $C_{18:1}$)، لینولئیک (LA, $C_{18:2}$) و آلفا لینولنیک (ALA, $C_{18:3}$) می‌باشد (Qi *et al.*, 2004 و Hong *et al.*, 2002). اما علاوه بر اسیدهای چرب ۱۸ کربنه رایج (OA, LA, ALA) اسیدهای چرب غیراشباع دیگری نیز در برخی از گونه‌های گیاهی و میکروارگانیزم‌ها وجود دارند که از لحاظ تغذیه‌ای و صنعتی حائز اهمیت ویژه‌ای می‌باشند.

گامالینولنیک اسید (GLA) و استئاریدونیک اسید (SDA) دو نوع از این اسیدهای چرب ویژه هستند که در تعداد معدودی از میکروارگانیزم‌ها و گونه‌های گیاهی مثل گل مغربی (*Evening primrose*)، گاوزبان اروپائی (*Borage*)، توت سیاه (*Black Currant*) و گونه‌های مختلف جنس *Echium* تولید می‌شوند (Garcia-Maroto *et al.*, 2002). گاما لینولنیک اسید (GLA)، یک اسید چرب ضروری اُمگا ۶ است که نقش حیاتی در ساختار زیستی دارد و اعمال آن از برخی بیماری‌ها پیشگیری می‌کند. بطور ویژه GLA باعث بهبود کارایی پوست در افراد مسن و کاهش چربی اضافی بدن

آنجائی که این گیاه بومی ایران بوده و در بیشتر مناطق شمالی کشور در ارتفاعات میان دست بصورت وحشی و زراعی وجود دارد. هدف از تحقیق حاضر، تعیین توالی کامل منطقه کدکننده ژن *d6d* در گونه گل گاوزبان ایرانی با نام علمی *Echinm amoenum*، بوده است. دستاورد این تحقیق می تواند برای انتقال ژن و دست‌ورزی‌های بعدی حائز اهمیت باشد.

مواد و روشها

تهیه مواد گیاهی

به منظور تهیه مواد اولیه گیاهی مورد نیاز در این تحقیق، بذرهای گیاه *E. amoenum* پس از انجام بررسی‌های گیاه‌شناسی و تأیید گونه، از رویشگاه‌های طبیعی آن در مناطق شمالی کشور (استان مازندران) جمع‌آوری و به گلخانه پژوهشکده برنج و مرکبات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری منتقل گردید. پس از انجام ضدعفونی سطحی بذرها، در تاریکی کشت و پس از جوانه‌زنی اندام‌های رویشی گیاهان در شرایط ۱۴ ساعت روشنایی با دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد و ۱۰ ساعت خاموشی با دمای 15 ± 2 درجه سانتی‌گراد پرورش داده شدند. پس از هفته ششم، مواد گیاهی برای استخراج DNA و RNA برداشت گردیدند.

طراحی آغازگرها

طراحی آغازگرها با استفاده از نرم‌افزار Primer Primeir 5 و با استفاده از اطلاعات بدست‌آمده از هم‌ردیفی چندگانه برای ژن مورد نظر در گونه‌های *Echium* و *Borago* انجام گردید. در مجموع دو جفت آغازگر رفت و برگشت طراحی شد. در طراحی آغازگرهای $\Delta 6F$ و $\Delta 6R$ که

می‌شود. همچنین GLA معمولاً در درمان آگزما، ماستالژیا و بهبود روند بیماری MS، سرطان روده بزرگ، سرطان پستان، ملانوما، دیابت و غیره نقش دارد (Preuss et al., 2000, Brosche et al., 2000, Das et al., 1995, Barre et al., 2001). SDA نیز می‌تواند در بدن به‌عنوان سوبسترا برای تولید اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه بلند زنجیره‌ای همچون ایکوزاپنتائونیک اسید (Eicosa Docosa) و دکوزاهگزانونیک اسید (Hexaenoic Acid) عمل کند، و همچنین دارای مزایای صنعتی مهمی نیز می‌باشد و از آن در ساخت فیلم‌های روغنی، پلاستیک و تولید واکس‌های مخصوص استفاده می‌گردد (Reddy & Thomas, 1996). گامالینونیک اسید و استئاریدونیک اسید به ترتیب توسط فعالیت آنزیم *d6d* (*delta-6-desaturase*) روی سوبستراهای لینولئیک اسید و آلفالینونیک اسید وجود می‌آیند. آنزیم *d6d* یک آنزیم غشایی است و از دسته‌ی دسچورازهای کربوکسیل‌گرا (*Carboxyl directed*) محسوب می‌شود، زیرا پیوند دوگانه را بین انتهای کربوکسیل اسید چرب و اولین پیوند دوگانه موجود در موقعیت کربن شماره ۶ اضافه می‌کند (Qiu & MacKenzie, 2001a, Cho et al., 1999, Heinz, 1993 و Qiu et al., 2001b). دسچورازهای کربوکسیل‌گرا سه موتیف حفاظت شده غنی از اسیدآمینو هیستیدین (*HXXXH*, *HXX(X)HH*, *Q / HXXHH*) و یک موتیف متصل شونده به هم (*HPGG*) در دمین سیتوکروم *b5* در انتهای متیلی توالی پپتیدی خود دارند (Qiu et al., 2002 و Sayanova et al., 1999b). دمین (*Domain*) سیتوکروم *b* تأمین‌کننده الکترون است و موتیف‌های غنی از هیستیدین به‌عنوان محل اتصال لیگاند اتم‌های آهن به این نوع آنزیم‌ها عمل می‌کنند. از

نارس در گیاه کامل بمنظور استخراج RNA کل استفاده گردید. استخراج RNA به روش گوانیدین ایزوتیوسیانات با اندکی تغییرات انجام شد (Siebert & Chenchik, 1993). بعد برای ساخت cDNA، واکنش نسخه‌برداری معکوس با استفاده از آنزیم M-Mulv Reverse transcriptase (شرکت Fermentas) و آغازگر $\Delta 6R$ انجام گردید. cDNA سنتز شده از اندام‌های مختلف گیاه، به‌عنوان الگو در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، برای سنتز DNA دو رشته‌ای و تکثیر ژن با استفاده از آغازگرها ($\Delta 6R$ و $\Delta 6F$) و آنزیم *Pfu polymerase* (تاکارای ژاپن) استفاده شد. شرایط این تکثیر شامل: واسرشت اولیه ۳ دقیقه، بعد ۳۰ چرخه بصورت واسرشت‌سازی ۱ دقیقه در دمای ۹۲ درجه، اتصال ۱ دقیقه در دمای ۵۷ درجه و بسط ۲ دقیقه در دمای ۷۲ درجه و نهایتاً بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس بمدت ۱۰ دقیقه در نظر گرفته شد. نوار ۱۳۵۰ bp بدست‌آمده از cDNA بذره‌های نارس با استفاده از کیت استخراج DNA از روی ژل شرکت *Roche*، استخراج و کمیت‌سنجی شد.

ساخت پلاسمید نو ترکیب و همسانه‌سازی

محصول ۱/۳۵ kb تکثیر شده توسط آنزیم *Pfu*، در جایگاه تشخیص آنزیم‌های برشی *SacI* و *XbaI* ناقل کلونینگ pBluescript SK(+) همسانه‌سازی شد. بدین منظور محصول پی‌سی‌آر و ناقل ابتدا با استفاده از آنزیم‌های *SacI* و *XbaI* بطور همزمان برش داده شدند و بعد انتهای چسبنده (Sticky) ایجاد شده در ژن و ناقل با استفاده از آنزیم T₄ لیگاز بهم متصل شدند. در گام بعدی به‌منظور تکثیر و نگهداری بلندمدت ژن مورد مطالعه، پلاسمید نو ترکیب به باکتری *E. coli* سویه DH5 α

جایگاه تشخیص آنزیم‌های برشی *SacI* و *XbaI* در انتهای ۵ پریم آنها وارد شده بود، به‌ترتیب از توالی‌های آمینواسیدی MANAIKKY پایانه آمین و توالی EALNTHG واقع در انتهای کربوکسیلی زنجیره‌ی پپتیدی دلتا سیکس دسچورازهای گزارش شده قبلی در جنس *Echium* و *Borago officinalis* استفاده گردید. همچنین آغازگرهای IF و IR نیز از مناطق حفاظت شده داخلی ژن، طراحی گردیدند.

استخراج DNA و انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای داخلی

DNA ژنومی از برگ‌های جوان با استفاده از روش سقایی معروف و همکاران (Saghai-Marooft *et al.*, 1984)، با اندکی تغییرات استخراج گردید. DNA استخراجی، با استفاده از روش‌های بررسی روی ژل آگارز، هضم آنزیمی و اسپکتروفتومتری از لحاظ کمی و کیفی سنجیده شد و بعد به‌عنوان الگو در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای داخلی IF و IR استفاده شد. این آزمون به‌منظور شناسایی وجود یا عدم وجود ژن در سطح DNA ژنومی قبل از انجام فرایندهای وقت‌گیر و هزینه‌بر استخراج RNA و ساخت cDNA، انجام پذیرفت. قطعه حدوداً ۹۰۰ bp تکثیر شده در این واکنش به‌طور مقدماتی تعیین ترادف شد و میزان همولوژی آن با توالی‌های موجود در Gene Bank بررسی گردید.

استخراج RNA، ساخت cDNA و تکثیر ژن

از اندام‌های مختلف گیاه *E. amoenum* شامل ریشه، ساقه و برگ در مرحله رزت و گل‌های کامل و بذره‌های

انتقال داده شد. برای تهیه باکتری مستعد و انتقال پلاسمید نو ترکیب به آن به ترتیب از روش‌های استاندارد، کلرید کلسیم سرد و شوک حرارتی استفاده گردید (Manatis et al., 1995). محصول انتقال در محیط انتخابی LB جامد حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین، IPTG, X-gal کشت گردید. با ظهور کلنی‌های سفید و آبی استخراج پلاسمید از این کلنی‌ها به روش miniprep انجام شد (Chowdhury, 1991) و بعد سایر آزمون‌های تأییدکننده صحت عمل کلن‌سازی، شامل هضم آنزیمی، Colony-PCR و تعیین ترادف انجام گردید.

نتایج

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای

داخلی IF و IR

نتیجه واکنش زنجیره‌ای پلیمرز روی DNA ژنومی منجر به تکثیر قطعه‌ای به طول تقریبی ۹۰۰ جفت باز گردید. آزمون میزان همسانی قطعه تکثیر شده پس از تعیین ترادف، در Gene Bank نشان داد که قطعه ۹۰۰ pb به دست آمده، بیشترین همسانی را در سطح نوکلئوتیدی با ژن‌های دلتا سیکس دسچوراز گزارش شده قبلی از جنس *Echium* و *Borago* دارد (جدول ۱).

جدول ۱- بررسی درجه همسانی قطعه ۹۰۰ bp، با سایر توالی‌ها توسط BLAST N در GeneBank

| شماره دسترسی | شرح | درجه همسانی |
|--------------|--|-------------|
| AY۰۵۵۱۱۷/۱ | <i>Echium gentianoides</i> (D6DES) gene, complete cds | ۸۹% |
| AY۰۵۵۱۱۸/۱ | <i>Echium pitardii var.pitardii</i> (D6DES) gene, complete cds | ۸۸% |
| AY ۹۵۲۷۸۰/۱ | <i>Echium plantagineum</i> (D6Des) gene, complete cds | ۸۷% |
| DQ ۰۶۷۶۱۲/۱ | <i>Echium sabulicola</i> (D6DES) gene, complete cds | ۸۷% |
| EF ۴۹۵۱۶۰/۱ | <i>Borago officinalis</i> (D6DES) gene, complete cds | ۸۵% |
| AY ۱۳۱۲۳۸/۱ | <i>Nonea caspica</i> (D6DES) gene, complete cds | ۸۴% |

مقدار E-value برای تمام موارد ذکر شده در جدول صفر می‌باشد.

پایین بودن سطح رونوشت در این اندام‌ها می‌باشد (Brosche & Platt, 2000).

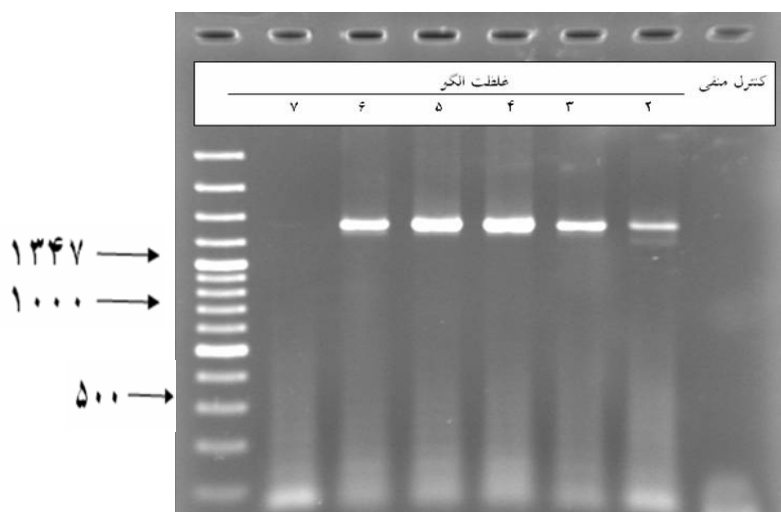
همسانه‌سازی و تعیین ترادف

مجموع نتایج آزمون‌های تأییدکننده صحت عمل کلن‌سازی، شامل هضم آنزیمی، Colony-PCR و تعیین ترادف نشان می‌دهد که ژن دلتا سیکس دسچوراز، از گیاه *E. amoenum* با موفقیت جداسازی و کلن شده است.

جداسازی ژن *d6d* از گیاه *E. amoenum* به روش

RT – PCR

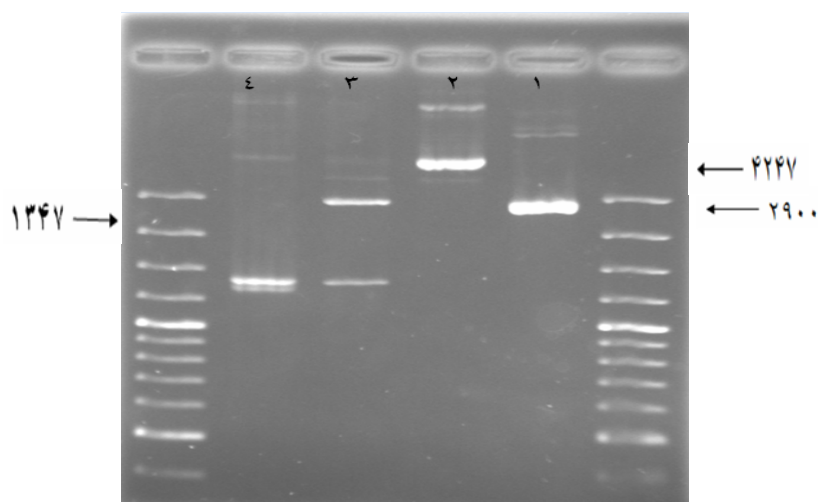
cDNA سنتز شده از اندام‌های مختلف بمنظور جداسازی و تکثیر نهایی ژن در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آنزیم *Pfu* استفاده شد و منجر به تکثیر نواری بطول تقریبی ۱۳۵۰ bp که معادل طول کامل منطقه کدکننده ژن مورد مطالعه می‌باشد با استفاده از cDNA بذرهای نارس گردید. در این آزمایش cDNA، سنتز شده از برگ، ریشه و ساقه عمل نکردند (شکل ۱)، که علت آن



شکل ۱- تکثیر ژن d6d با استفاده از آنزیم DNA پلیمرز *pfu* و غلظت‌های مختلف cDNA بذره‌های نارس (۲، ۳، ۴، ۵، ۶ و ۷ ماکرولیتر)

$\Delta 6R$ و $\Delta 6F$ ، مجدداً نوار ۱۳۵۰ جفت بازی مورد انتظار را تکثیر کرد. بعد برای تأیید بیشتر و بدست آوردن توالی ژن، قطعه وارد شده در پلاسمید نوترکیب با آغازگرهای عمومی M13R و M13F تعیین ترادف شد (شکل ۲).

بر این اساس هضم پلاسمید نوترکیب با آنزیم‌های برشی *XbaI* و *SacI* قطعه‌ای بطول تقریبی ۱۳۴۷ bp ایجاد نمود، که معادل طول کامل منطقه کدکننده ژن مورد مطالعه می‌باشد. همچنین انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از پلاسمید نوترکیب به‌عنوان الگو و آغازگرهای



شکل ۲- نتایج هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب و پی‌سی‌آر (۱- ناقل هضم شده، ۲- ناقل نوترکیب، ۳- ناقل نوترکیب هضم شده، ۴- محصول پی‌سی‌آر با استفاده از ناقل نوترکیب به‌عنوان الگو)

| Cytochrome b ₅ | |
|---------------------------|---|
| <i>pitardii</i> | MANAIKKYITAEELKHKHDKEGDLWISIQGKVIYDVSDDLKIDHPGGKFFLLSLAGQEVTDAF 60 |
| <i>gentianoides</i> | MANAIKKYITAEELKHKHDKEGDLWISIQGKVIYDVSDDLKIDHPGGKFFLLSLAGQEVTDAF 60 |
| <i>sabulicola</i> | MANAIKKYITAEELKHKHDKAGDLWISIQGKIYDVSDDLKIDHPGGKFFLLSLAGQEVTDAF 60 |
| <i>plantagineum</i> | MANAIKKYITAEELKHKHDKAGDLWISIQGKIYDVSDDLKIDHPGGKFFLLSLAGQEVTDAF 60 |
| <i>amoenum</i> | MANAIKKYITAEELKHKHDKAGDLWISIQGKVIYDVSDDLKIDHPGGKFFLLSLAGQEVTDAF 60 |
| <i>pitardii</i> | VAFHSGSTWKLKLDLDSFFTGYLLKDYVSVSEVSKDYRKLVEFENKMGFLDKKGGHIVLVTVFFI 120 |
| <i>gentianoides</i> | VAFHSGSTWKLKLDLDSFFTGYLLKDYVSVSEVSKDYRKLVEFENKMGFLDKKGGHIVLVTVFFI 120 |
| <i>sabulicola</i> | VAFHSGSTWKLLEKFFTGYLLKDYVSVSEVSKDYRKLVEFENKMGFLDKKGGHIVLVTVFFI 120 |
| <i>plantagineum</i> | VAFHSGSTWKLLEKFFTGYLLKDYVSVSEVSKDYRKLVEFENKMGFLDKKGGHIVLVTVFFI 120 |
| <i>amoenum</i> | VAFHSGSTWKLKLDLDSFFTGYLLKDYVSVSEVSKDYRKLVEFENKMGFLDKKGGHIVLVTVFFI 120 |
| <i>pitardii</i> | AMMFAMSVYGVLFCEGVLVHLLAGGLMGFVWIQSGWIGHDAGHYIVMPNPKLNKLMGIVA 180 |
| <i>gentianoides</i> | AMMFAMSVYGVLFCEGVLVHLLAGGLMGFVWIQSGWIGHDAGHYIVMPNPKLNKLMGIVA 180 |
| <i>sabulicola</i> | AMLFAMSVYGVLFCEGVLVHLLAGGLMGFVWIQSGWIGHDAGHYIVMPNPKLNKLMGIVA 180 |
| <i>plantagineum</i> | AMLFAMSVYGVLFCEGVLVHLLAGGLMGFVWIQSGWIGHDAGHYIVMPNPKLNKLMGIVA 180 |
| <i>amoenum</i> | AMLFAMSVYGVLFCEGVLVHLLAGGLMGFVWIQSGWIGHDAGHYIVMPNPKLNKLMGIVA 180 |
| <i>pitardii</i> | SNCLSGISIGWKKWVHNAHHIACNSLDYDPPDLQYIPFLVSSKLFSSLTSHFYEKKLTFFD 240 |
| <i>gentianoides</i> | SNCLSGISIGWKKWVHNAHHIACNSLDYDPPDLQYIPFLVSSKLFSSLTSHFYEKKLTFFD 240 |
| <i>sabulicola</i> | ANCLSGISIGWKKWVHNAHHIACNSLDYDPPDLQYIPFLVSSKLFSSLTSHFYEKKLTFFD 240 |
| <i>plantagineum</i> | ANCLSGISIGWKKWVHNAHHIACNSLDYDPPDLQYIPFLVSSKLFSSLTSHFYEKKLTFFD 240 |
| <i>amoenum</i> | ANCLSGISIGWKKWVHNAHHIACNSLDYDPPDLQYIPFLVSSKLFSSLTSHFYEKKLTFFD 240 |
| <i>pitardii</i> | SLSRFFVSHQHWTFFVPMCSARVNMFVQSLIMLLTKRNVFYRSQELLGLVVFVWYPLIV 300 |
| <i>gentianoides</i> | SLSRFFVSHQHWTFFVPMCSARVNMFVQSLIMLLTKRNVFYRSQELLGLVVFVWYPLIV 300 |
| <i>sabulicola</i> | SLSRFFVSHQHWTFFVPMCSARVNMFVQSLIMLLTKRNVFYRSQELLGLVVFVWYPLIV 300 |
| <i>plantagineum</i> | SLSRFFVSHQHWTFFVPMCSARVNMFVQSLIMLLTKRNVFYRSQELLGLVVFVWYPLIV 300 |
| <i>amoenum</i> | SLSRFFVSHQHWTFFVPMCSARVNMFVQSLIMLLTKRNVFYRSQELLGLVVFVWYPLIV 300 |
| <i>pitardii</i> | SCLPNWGERIMFVVASLVTGQQVQVFSLNHFASVYVGGPKGIDWFEKQTCGTLDISCP 360 |
| <i>gentianoides</i> | SCLPNWGERIMFVVASLVTGQQVQVFSLNHFASVYVGGPKGIDWFEKQTCGTLDISCP 360 |
| <i>sabulicola</i> | SCLPNWGERIMFVVASLVTGQQVQVFSLNHFSSVYVGGPKGNDWFEKQTCGTLDISCP 360 |
| <i>plantagineum</i> | SCLPNWGERIMFVVASLVTGQQVQVFSLNHFSSVYVGGPKGNDWFEKQTCGTLDISCP 360 |
| <i>amoenum</i> | SCLPNWGERIMFVVASLVTGQQVQVFSLNHFSSVYVGGPKGNDWFEKQTCGTLDISCP 360 |
| <i>pitardii</i> | SWMDWFHGGLOQVEHHLFPPKLPKCHLRKISPFVMELCKKHNLNLYNCASFSEANEMTLRT 420 |
| <i>gentianoides</i> | SWMDWFHGGLOQVEHHLFPPKLPKCHLRKISPFVMELCKKHNLNLYNCASFSEANEMTLRT 420 |
| <i>sabulicola</i> | SWMDWFHGGLOQVEHHLFPPKLPKCHLRKISPFVMELCKKHNLNLYNCASFSEANEMTLRT 420 |
| <i>plantagineum</i> | SWMDWFHGGLOQVEHHLFPPKLPKCHLRKISPFVMELCKKHNLNLYNCASFSEANEMTLRT 420 |
| <i>amoenum</i> | SWMDWFHGGLOQVEHHLFPPKLPKCHLRKISPFVMELCKKHNLNLYNCASFSEANEMTLRT 420 |
| <i>pitardii</i> | LRDTALQARDLTKPLPKNLVWEALNTHG 448 |
| <i>gentianoides</i> | LRDTALQARDLTKPLPKNLVWEALNTHG 448 |
| <i>sabulicola</i> | LRDTALQARDLTKPLPKNLVWEALNTHG 448 |
| <i>plantagineum</i> | LRDTALQARDLTKPLPKNLVWEALNTHG 448 |
| <i>amoenum</i> | LRDTALQARDLTKPLPKNLVWEALNTHG 448 |

شکل ۳- هم‌راستایی در سطح آمینو اسید ژن *Ead6d* از گونه *E. amoenum* با گونه‌های

E. pitardii، *E. gentianoides*، *E. sabulicola*، *E. plantagineum*

علامت ستاره (*) بیانگر آمینواسیدهای همسان در هر ۵ توالی مورد مقایسه است. علامت (:): بیانگر نقاطی است که آمینو اسیدهای جایگزین شده، از یک گروه بیوشیمیایی مشابه هستند. علامت (.) نقاطی را مشخص می‌کند که در آنها آمینو اسیدها از گروه‌های بیوشیمیایی نزدیک بهم هستند و علامت () نیز به این مفهوم است که آمینواسیدهای جایگزین شده در آن محل از لحاظ خواص بیوشیمیایی از هم دور بوده و متعلق به گروه‌های متفاوت هستند. خطوط باریک محدوده دمین سیتوکروم b₅ و خطوط ضخیم محل هلیکس‌های ترانس ممبران پیش‌بینی شده را نشان می‌دهد. کادر بیضوی موتیف مهم متصل‌شونده بهم و فلشها به ترتیب از بالا به پایین موتیف‌های غنی از هیستیدین سه‌گانه را نشان می‌دهند.

بحث

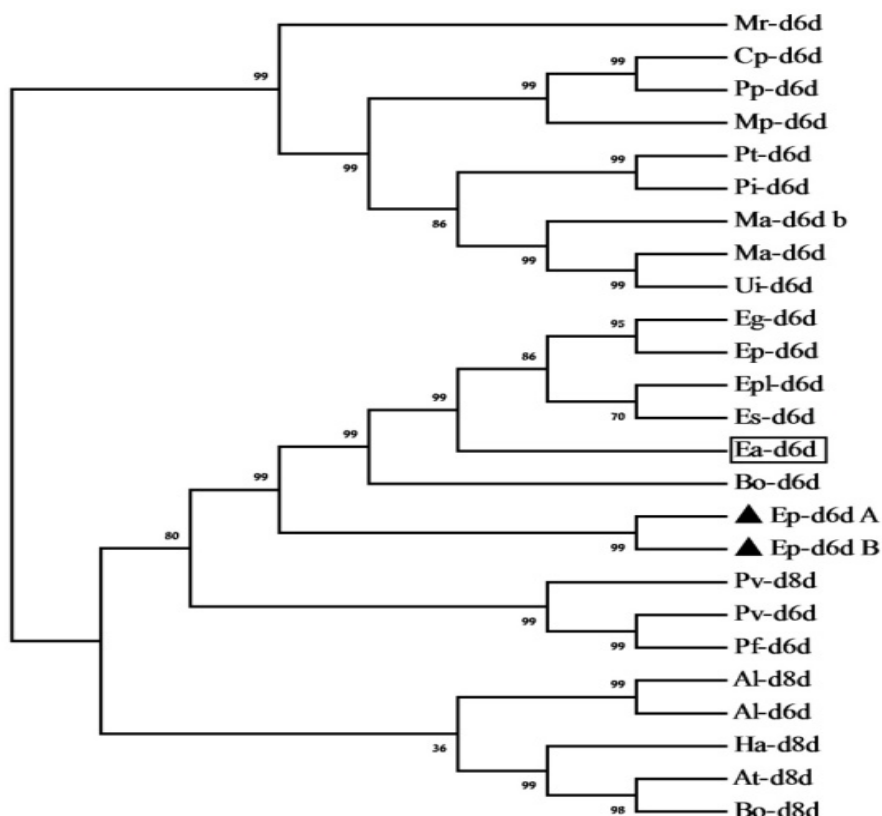
بررسی‌های بیوانفورماتیکی

بررسی گردید. این نتایج نشان داد در سطح DNA، بیشترین همسانی با ژن‌های *d6d* گزارش شده از گونه‌های *E. gentianoides* (۹۵٪) و *E. pitardii* (۹۴٪)، *E. sabulicola* (۹۳٪) و *E. plantagineum* (۸۷٪) می‌باشد. در سطح پروتئینی نیز توالی ترجمه شده به ترتیب با *E. sabulicola* (۹۶٪) و *E. gentianoides* (۹۵٪) می‌باشد.

پس از این که مشخص شد، قطعه کلن شده دارای یک منطقه ORF با طولی معادل توالی پپتیدی ژن مورد مطالعه می‌باشد، میزان همسانی و مشابهت آن با سایر توالی‌های موجود در GenBank در سطح نوکلئوتیدی و پروتئینی

شده غنی از هیستیدین اول تا سوم و موتیف HPGG همگی در توالی ترجمه شده شناسایی شدند (شکل ۳).

E. pitardii (۹۴٪) و *E. gentianodes*, *E. plantagineum* بیشترین همسانی را داشت. همچنین دمین‌های مورد انتظار سیتوکروم b₅، فتی اسید دسچوراز، موتیف‌های حفاظت



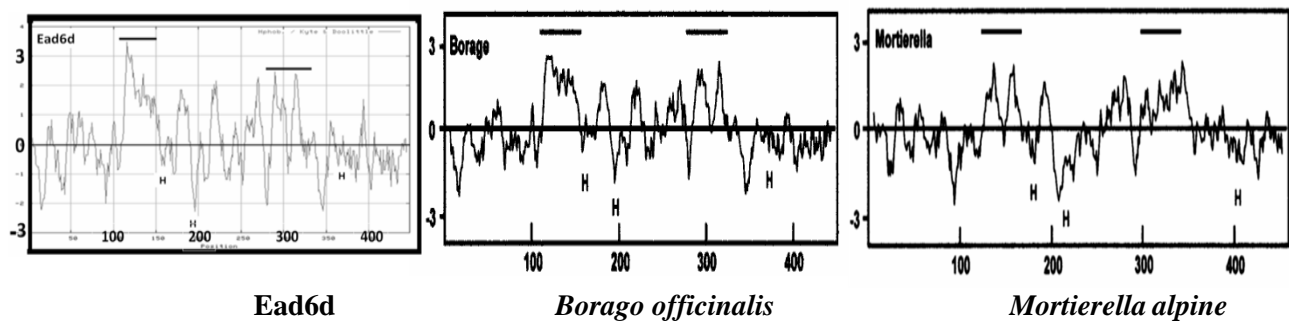
شکل ۴- درخت فیلوژنتیکی برای توالی‌های پروتئینی ژن‌های دلتا ۶ و ۸ با استفاده از نرم‌افزار

MEGA3 به روش Neighbour joining

Echium amoenum delta 6 desaturase (Ead6d), *E. gentianoides* delta 6 desaturase (Egd6d), *E. sabulicola* delta 6 desaturase (Esd6d), *E. pitardii* delta 6 desaturase (Epd6d), *E. pitardii* delta 6 desaturase pseudogene A (▲ Epd6dA), *E. pitardii* delta 6 desaturase pseudogene B (▲ Epd6dB), *E. plantagineum* delta 6 desaturase (Epld6d), *Anemone leveillei* delta 6 desaturase (Ald6d), *A. leveillei* delta 8 desaturase (Ald8d), *Mortiere alpine* delta 6 desaturase B (Mad6d b), *M. alpina* delta 6 desaturase (Mad6d), *Mucor rouxii* delta 6 desaturase (Mrd6d), *Pythium irregular* delta 6 desaturase (Pid6d), *Primula farinose* delta 6 desaturase (Pfd6d), *P. vialii* delta 6 desaturase (Pvd6d), *P. vialii* delta 8 desaturase (Pvd8d), *Arabidopsis thaliana* delta 8 desaturase (Atd8d), *Borago officinalis* delta 6 desaturase (Bod6d), *B. officinalis* delta 8 desaturase (Bod8d), *Ceratodon purpureus* delta 6 desaturase (Cpd6d), *Phaeodactylum tricornutum* delta 6 desaturase (Ptd6d), *Physcomitrella patens* delta 6 desaturase (Ppd6d), *Marchantia polymorpha* delta 6 desaturase (Mpd6d), *Umbelopsis isabellina* delta 6 desaturase (Uid6d), *Helianthus annuus* delta 8 desaturase (Had8d).

E. pitardii هم‌ردیف شد. نتیجه این هم‌ردیفی نشان داد هیچگونه تغییری، در موتیف‌های غنی از هیستیدین سه‌گانه و موتیف HPGG و نیز سایر نقاطی که تاکنون از طریق جهش‌زایی نقطه‌ای (Zhou, 2006) مشخص شده و تغییرات در آنها اثرات سوء و معنی‌داری در میزان فعالیت آنزیم می‌گذارد، رخ نداده و این مناطق در توالی مورد بررسی، بدون تغییر و حفاظت شده باقی مانده‌اند. همچنین با استفاده از نرم‌افزارهای موجود و سرورهای بیوانفورماتیکی ساختار ثانویه، مناطق ترانس ممبران (شکل ۳) و الگوی هیدروپسی (شکل ۵) توالی ترجمه شده تعیین گردید، که نتایج آن تطابق بسیار بالایی با سایر توالی‌های گزارش شده قبلی دارد.

تجزیه خوشه‌ای (به روش Neighbour joining) نیز نشان داد که توالی پروتئینی Ead6d همراه با توالی‌های d6d سایر گونه‌های *Echium* قرار می‌گیرد و علاوه بر این با ژن‌های d8d و ژن‌های d6d کاذب هم‌گروه نمی‌شود (شکل ۴). بر این اساس، پروتئین دلتا سیکس دسچوراز در گونه گل گاوزبان ایرانی از گونه‌های اکیوم اروپایی (*E. sabulicola*) و گونه‌های جزایر ماکارونزی (*E. pitardii*، *E. plantagineum*، *E. gentianodes*) و همچنین گیاه گاوزبان (*Borago officinalis*) مجزا می‌گردد. به منظور آشکارسازی تفاوت‌ها در سطح DNA و آمینواسید، توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی Ead6d با سایر توالی‌های این ژن در گونه‌های نزدیک (*E. gentianoides*، *E. sabulicola*، *E. plantagineum*)



شکل ۵- پلات هیدروپسی توالی آمینواسیدی Ead6d به روش (Kyte & Doolittle)

و مقایسه آن با *Borago officinalis* و *Mortierella alpine* قارچ

خطوط دو دمین هیدروفوب عمده در ژن‌های d6d را نشان می‌دهند. H نیز محل موتیف‌های غنی از هیستیدین را نشان می‌دهد.

وجود دارد، بنابراین می‌توان این جایگاه را به‌عنوان عامل تفاوتی که ممکن است در میزان فعالیت کاتالیکی و ترجیح سوبسترای آنزیم دلتا ۶ دسچوراز گونه *E. amoenum* دیده شود، در سطح ژنی و پروتئینی کاندید نمود. علاوه بر این در ناحیه حفاظت شده سیتوکروم b₅، تمام اختلافات مشاهده شده بجز در محل اسیدآمینه ۷۴ در سایر گونه‌های اکیوم یا براگو دیده شده است و جدی نیست. در مورد اسیدآمینه ۷۴ در گونه‌های اکیوم و براگو اغلب آمینواسیدهای لیزین یا سرین وجود دارد، در حالی که در توالی *Ead6d*، اسیدآمینه ترئونین جایگزین شده است. هر سه این اسیدهای آمینه قطبی هستند و جایگزینی آنها با هم اتفاق نادر و سوئی نیست، به ویژه در خصوص سرین که اکثراً مشاهده شده با ترئونین جایگزین می‌شود. اما آنچه این جایگاه را حائز اهمیت ویژه می‌کند این است که، محل اسیدآمینه شماره ۷۴ به‌عنوان یکی از جایگاه‌های کاندید، که احتمالاً در میل ترکیبی سوبسترا به آنزیم نقش دارد، معرفی شده است (Marato, 2006). بنابراین تفاوت اسیدآمینه‌ای هر چند جزئی در این نقطه، می‌تواند راهگشای مطالعات آینده باشد و اهمیت آن زمانی درک خواهد شد که تجزیه‌های مولکولی بیشتری در سطح بیان ژن برای تعیین میل ترکیبی سوبسترا به آنزیم d6d در گونه ایرانی انجام پذیرد. همچنین شایان توجه است که در هیچکدام از موتیف‌های غنی از هیستیدین سه‌گانه و موتیف HPGG و نیز سایر نقاطی که تاکنون از طریق جهش‌زایی نقطه‌ای مشخص شده است (Zhou, 2006)، در توالی مورد مطالعه کوچکترین تغییری رخ نداده است و کاملاً حفاظت شده است.

آشکارسازی تفاوت‌های ژن *Ead6d* با سایر ژن‌ها در سطوح نوکلئوتیدی و پروتئینی

بمنظور آشکارسازی تفاوت‌ها در سطح DNA و اسیدآمینه، توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی *Ead6d* با سایر توالی‌های این ژن در گونه‌های نزدیک (*E. gentianoides*، *E. sabulicola*، *E. plantagineum* و *E. pitardii*) هم‌ردیف شد و مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۳). نتیجه این بررسی نشان داد، اگرچه تفاوت‌ها در سطح نوکلئوتیدی بالاست و ژن *Ead6d* در ۳۳ نوکلئوتید با هر ۴ گونه مورد مقایسه کاملاً اختلاف دارد، اما از لحاظ تغییرات اسیدآمینه بسیاری از این تفاوت‌ها بی‌معنی است، بدین مفهوم که در بیشتر نقاط محل اختلاف، تغییر نوکلئوتید منجر به تغییر اسیدآمینه نگردیده است و تنها یک اسم رمز اسیدآمینه جایگزین اسم رمز دیگر آن شده است. علاوه بر این، در نقاطی که جایگزینی در سطح اسیدآمینه اتفاق افتاده است بجز در سه مورد که در محل اسیدآمینه‌های شماره ۱۰۱، ۲۲۶ و ۲۸۰ واقع می‌شود بدلیل اینکه اسیدآمینه‌های جایگزین شده از یک گروه بیوشیمیایی و یا از گروه‌های بیوشیمیایی نزدیک هم هستند، اختلافات مشاهده شده چندان نمی‌تواند مهم و عامل تغییرات اساسی تلقی شوند. تغییرات اسیدآمینه در نقاط ۱۰۱، ۲۲۶ و ۲۸۰ به دلیل این که اسیدآمینه‌های جایگزین شده از گروه‌های بیوشیمیایی متفاوت و دور از هم هستند، می‌تواند بسیار پر اهمیت و قابل بررسی باشد. در نقطه ۱۰۱ و ۲۸۰ در توالی *Ead6d* به ترتیب اسیدآمینه سرین با آسپارژین و سرین با فنیل آلانین جایگزین شده است که این تغییرات عیناً در گونه *Borago officinalis* نیز اتفاق افتاده است، اما جایگزینی در اسیدآمینه شماره ۲۲۶ (جایگزینی نامشابه R با S)، منحصراً در گونه ایرانی

نتیجه‌گیری

در این مطالعه با استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک، توالی کامل کدکننده ژن دلتا سیکس دسچوراز در گونه گل‌گاوزبان ایرانی (*E. amoenum*) شناسایی، جداسازی و کلن‌گردید. درجه همسانی بسیار بالا توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی این ژن با سایر ژن‌های *d6d* گزارش شده در Gene Bank، تجزیه خوشه‌ای با ژن‌های دلتا ۸ و ژن‌های دلتا ۶ دروغین، کشف تمامی دمین‌ها و موتیف‌های حفاظت شده در توالی پروتئینی و عدم جایگزینی‌های اسیدآمینهای با معنی در نواحی حفاظت شده، به انضمام اطلاعات پایه‌ای که از پیش‌بینی ساختارهای ثانویه و عملکرد استنباط می‌شود، صحت این ادعا را تأیید می‌کند. بدیهی است که تعیین بیشتر خصوصیات این ژن مستلزم بیان آن در سیستم یوکاریوتی مناسب و بررسی کارکرد آن در سطوح بیوشیمیایی و آنزیمی می‌باشد. در مجموع یافته‌های تحقیق حاضر یک گام رو به جلو محسوب می‌شود و از این اطلاعات می‌توان برای دست‌کاری محتوای روغن دانه و تولید گیاهان تراریخته با قابلیت‌های ویژه و مطلوب استفاده نمود.

سپاسگزاری

از ریاست محترم پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان بدلیل ارائه نظرات علمی و کارشناسانه و تأمین هزینه‌های مالی و تجهیزاتی این پروژه کمال سپاس را دارم.

منابع مورد استفاده

- health. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 45:47–57.
- Brosche, T., and Platt, D., 2000. Effect of Borage Oil Consumption on Fatty Acid Metabolism, Trans epidermal Water Loss and Skin Parameters in Elderly People, *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 30: 139–150.
 - Cho, H.P., Takamura, M.T. and Clarke, S.D., 1999. Cloning, expression, and nutritional regulation of the mammalian 6 desaturase. *The Journal of Biological Chemistry*, 274: 471–477.
 - Chowdhury, K., (1991). One step 'miniprep' method for the isolation of plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 19:10 2792.
 - Das, U.N., Prasad, V.V.S.K., and Reddy, D.R., 1995. Local Application of γ -Linolenic Acid in the Treatment of Human Gliomas, *Cancer Letters*, 94: 147–155.
 - Garcia-Maroto, F., Garrido-Cardenas, J.A., Rodriguez-Ruiz, J., Vilches-Ferron, M., Adam, A.C., Polaina, J. and Alonso, D.L., 2002. Cloning and molecular characterization of the D6 desaturase from two *Echium* plant species: production of GLA by heterologous expression in yeast and tobacco. *Lipids*, 37: 417–426.
 - Heinz, E., 1993. Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids. In TS Moore Jr, ed, *Lipid Metabolism in Plants*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 33–89.
 - Hong, H., Datla, N., Reed, D.W., Covelto, P.S., MacKenzie, S.L. and Qiu, X., 2002. High-level production of γ -linolenic acid in *Brassica juncea* using a D6 desaturase from *Pythium irregulare*, *Plant Physiology*, 129: 354–362.
 - Horrobin, D. F., 1995. Medical roles of metabolites of precursor EFA. *Information*, 6:428–435.
 - Horrobin, D.F., 1992. Nutritional and medical importance of gamma linolenic acid, *Prog. The Journal of Lipid Research*, 31: 163–194.
 - Kinney, J.A., 1994. Genetic modification of the storage lipids of plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 5:144–151.
 - Manatis, T., Fritsch, E., and Sambrook, F., 1995. *Molecular cloning: a laboratory Manual*, Cold spring Harbor laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
 - Maroto, F., Fernandez, A. and Cardenas, J., 2006. Substrate specificity of acyl desaturase from continental versus macaronesian *Echium* species. *Phytochemistry*, 67: 540–544.
 - Needleman, P., Turk, J., Jackshik, B.A., Morrison, A.R. and Lefkowitz, J.B., 1986. Arachidonic acid metabolism, *Annual Review of Biochemistry*, 55: 69–102.
 - Preuss, M., Girmun, G.D., Darby, C.J., Khoo, N., Spector, A.A., and Robbins, M.E., 2000. Role of Antioxidant Enzyme Expression in the Selective

- Barre, D.E., 2001. Potential of evening primrose, borage, black currant, and fungal oils in human

- Academy of Sciences of the United States of America, 81: 8014-8018.
- Sakuradani, E., Kobayashi, M., Ashikari, T. and Shimizu, S., 1999. Identification of D12-fatty acid desaturase from arachidonic acid-producing *Mortierella* fungus by heterologous expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and the fungus *Aspergillus oryzae*, *European Journal of Biochemistry*, 261: 812-820.
 - Sayanova, O., Shewry, P.R. and Napier, J.A., 1999b. Histidine-41 of the cytochrome b5 domain of the borage 6 fatty acid desaturase is essential for enzyme activity. *Plant Physiology*, 121: 641-644.
 - Shanklin, J. and Cahoon, E.B., 1998. Desaturation and related modifications of fatty acids. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49: 611-641.
 - Siebert, P.D. and Chenchik, A., 1993. Modified acid guanidinium thiocyanate- phenol -chloroform RNA extraction method which greatly reduces DNA contamination. *Nucleic Acids Research*, 21: 2019-2020.
 - Van Gool, C.J., Thijs, C., Henquet, C.J., Van Houwelingen, A.C., Dagnelie, P. C., Schrandt, J., Menheere, P.P. and Van Den Brandt, P.A., 2003. γ -Linolenic acid supplementation for prophylaxis of atopic dermatitis: a randomized controlled trial in infants at high familial risk, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 77: 943-951.
 - Cytotoxic Response of Glioma Cell to γ -Linolenic Acid Supplementation, *Free Radical Biology & Medicine*, 28: 1143-1156.
 - Qi, B., Fraser, T., Mugford, S., Dobson, G., Sayanova, O., Butler, J., Napier, J.A., Stobart, A.K. and Lazarus, C.M., 2004. Production of very long chain polyunsaturated omega-3 and omega-6 fatty acids in plants, *Nature Biotechnology*, 22: 739-745.
 - Qiu, X., Hong, H.P. and MacKenzie, S.L., 2001a. Identification of delta 4 fatty acid desaturase from *Thraustochytrium* sp. involved in biosynthesis of docosahexaenoic acid by heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* and *Brassica juncea*. *The Journal of Biological Chemistry*, . 276: 31561-31566.
 - Qiu, X., Hong, H.P., Datla, N., MacKenzie, S.L., Tayler, C.D. and Thomas, L.T., 2002. Expression of borage delta 6 desaturase in *Saccharomyces cerevisiae* and oilseed crops. *Canadian Journal of Botany*, 80:42-49.
 - Qiu, X., Reed, D.W., Hong, H.P., MacKenzie, S.L. and Covello, P.S., 2001b. Identification and analysis of a gene from *Calendula officinalis* encoding a fatty acid conjugase. *Plant Physiology*, 125: 847-855.
 - Reddy, A.S. and Thomas T.L., 1996. Expression of a cyanobacterial D6-desaturase gene results in γ -linolenic acid production in transgenic plants. *Nature Biotechnology*, 14: 639-642.
 - Saghai-Marouf, M.A., Soliman, K.M., Jorgensen, R.A. and Allad, R.W., 1984. DNA length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, Chromosomal location and Population dynamics. *Proceedings of the National*

Cloning and characterization of full length CDS of delta-6 desaturase (*d6d*) from Iranian borage (*Echium amoenum*)

E. Shokri^{*1}, S.K. Kazemi Tabar², j. Zolala³, G.A Nematzadeh⁴, N. Hoseinpoor azad⁵ and N. Nasiri⁵

1*- Corresponding author, M.Sc. in Plant Breeding, University of Agriculture Sciences and Natural Resources, Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan (GABIT), Sari, I.R.Iran, E-mail: e.shokri62@gmail.com

2- Assoc. Prof., Plant Breeding, Department of agronomy and Plant Breeding, University of Agriculture Sciences and Natural Resources, Sari, I.R. Iran

3- Assis. Prof., Biotechnology, College of Agriculture, Shahid Bahonar University, Kerman, I.R.Iran

4- Prof., Molecular Genetics, University of Agriculture Sciences and Natural Resources, Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan (GABIT), Sari, I.R.Iran

5- M.Sc., Plant Breeding, University of Agriculture Sciences and Natural Resources, Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan (GABIT), Sari, I.R.Iran

Received: 19.01.2011

Accepted: 19.06.2011

Abstract

Delta-6 desaturase (D6D), an enzyme of a lipid metabolic pathway, has been found as active form in some microorganisms and plants like different species of the genus *Echium* from family Boraginaceae. The enzyme converts essential fatty acids linoleic acid and α -linolenic acid into long-chain polyunsaturated ones, γ -linolenic acid and stearidonic acid, respectively. In this research, to isolate the *d6d* gene from Iranian borage (*Echium amoenum*), we followed total RNA isolation from immature seeds, total cDNA synthesis and PCR amplification using the gene specific primers designed according to the sequence of *d6d* in the other *Echium* species. Approximately a 1350 bp amplified fragment was inserted into the vector pBluscript SK(+) and cloned in *Escherichia coli* strain DH5 α . Nucleic acid sequence analysis of the cloned fragment verified the successful isolation and cloning of the full length CDS of *d6d* gene from *E. amoenum*. The cloned CDS include 1347 nucleotides coding for 448 amino acids. The translated protein possessed high similarity of 94–96% to its counterparts previously reported in other *Echium* species. All the expected domains, i.e., cytochrome b5, fatty acid desaturase, HPGG motif and histidine rich conserved motifs were found in the sequence of translated protein. Furthermore, secondary structure, transmembrane domains and the hydropathy profile of the protein were highly similar to its counterparts in the other *Echium* species. The *d6d* gene is a promising gene to engineer the fatty acid metabolism in crop plants. Gene expression studies are necessary for further characterization of the cloned gene and its encoded enzyme. The sequence of the coding region of *d6d* gene from *E. amoenum* was submitted to GenBank under the accession number GU237486.

Key words: Delta-6 desaturase, Cloning, *Echium amoenum*, γ -linolenic acid, Stearidonic acid, Unsaturated Fatty Acids.