ژنتیک نوین
دوره دوازدهم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۶
صفحه ۱۰ - ۱

بررسی الگوی بیان ژن متیل چاویکول *O*–متیل ترانسفراز (*CVOMTs*)، تعیین توالی و مشخصه یابی پروموتر ژن *CVOMTs* در گیاه ریحان تحت تنش خشکی

Study of gene expression pattern of chavicol *O*- methyl transferase gene (*CVOMTs*), sequencing and characterization of promoter of *CVOMTs* gene of basil (*Ocimum basilicum*) under water deficit stress

فاطمه خاکدان[۱]، فرج اله شهریاری احمدی*[۱]، مجتبی رنجبر[۲]، عبدالرضا باقری[۱]، هوشنگ علیزاده[۳]

۱- به‌ترتیب دانشجوی دکتری، استادان، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد
۲- استادیار،گروه بیوتکنولوژی میکروبی، دانشکده زیست فناوری، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل
۳- استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج

Khakdan F[1], Shahriari Ahmadi F[*1], Ranjbar M[2], Bagheri A[1], Alizadeh H[3]

1-PhD student, Professors, Department of Biotechnology, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
2- Assistant Professor, Department of Microbial Biotechnology, College of Biotechnology, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran
3- Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture and Natural Resources, Tehran University, Karaj, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: shahriari@um.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۵/۴/۲۱ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۶/۲۸)

چکیده

ریحان (*Ocimum basilicum* L.)، گیاهی از خانواده نعناعیان است که به‌عنوان یک گیاه دارویی در طب سنتی ایران مورد استفاده قرار می‌گیرد. اسانس ریحان منبع غنی از ترکیبات ترپنوئیدی و فنیل پروپانوئیدی است و در درمان بیماری‌هایی مانند اسهال، سرفه، انگل‌های روده و ناراحتی‌های کلیه و کبد مورد اهمیت می‌باشد. ترکیب با ارزش متیل‌چاویکول حجم عمده اسانس ریحان را تشکیل می‌دهد که اخیراً توجه زیادی به‌علت ارزش دارویی و فعالیت‌های فارماکولوژیکی خصوصاً به‌عنوان پیشگیری کننده میگرن به خود جلب نموده است. آنزیم متیل چاویکول *O*–متیل ترانسفراز (*CVOMTs*) یک آنزیم کلیدی در مسیر بیوسنتز فنیل پروپانوئید است و با انجام عمل متیلاسیون، چاویکول را به متیل چاویکول تبدیل می‌کند. در تحقیق حاضر، برای بررسی تاثیر تنش خشکی بر شکل‌گیری و کنترل تنظیم نسخه‌برداری مسیر بیوسنتز ترکیب متیل‌چاویکول در سه توده دارویی ریحان، پروفیل مقادیر mRNA ژن کلیدی متیل چاویکول *O*–متیل ترانسفراز (*CVOMTs*) در سه سطح تنش خشکی (S1:۷۵٪، S2: ۵۰٪ و S3: ۲۵٪ ظرفیت زراعی) با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در زمان واقعی (qRT-PCR) اندازه‌گیری شد. به منظور ارتباط دقیق‌تر الگوی بیان ژن *CVOMTs* در شرایط تنش خشکی جداسازی، مشخصه‌یابی و تجزیه عملکردی پروموتر *pCVOMTs* نیز انجام گرفت. بررسی الگوی بیان ژن *CVOMTs* نشان داد که مقادیر نسخه‌های این ژن به‌طور معنی‌داری تحت تاثیر توده و سطوح تنش قرار دارد. سطح نسخه‌های ژن *CVOMTs* در شرایط تنش خشکی افزایش تدریجی نشان داد و در توده سه بیش‌ترین میزان بیان این ژن در S_2 مشاهده شد. نتایج تجزیه پروموتر ژن *CVOMTs* نشان داد که این توالی شامل عناصر مهم تنظیمی پاسخ‌دهنده به دمای بالا و تنش خشکی از جمله MYB، MYC و HSE می‌باشد. بنابراین افزایش بیان این ژن در سطوح بالای تنش مربوط به جایگاه‌های اتصال فاکتورهای نسخه‌برداری است که در شرایط تنش خشکی موجب افزایش بیان این ژن می‌شود.

واژه‌های کلیدی

بیان ژن
پروموتر
تنش خشکی
ژن *CVOMTs*
عناصر تنظیمی

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.1.1.1]

مقدمه

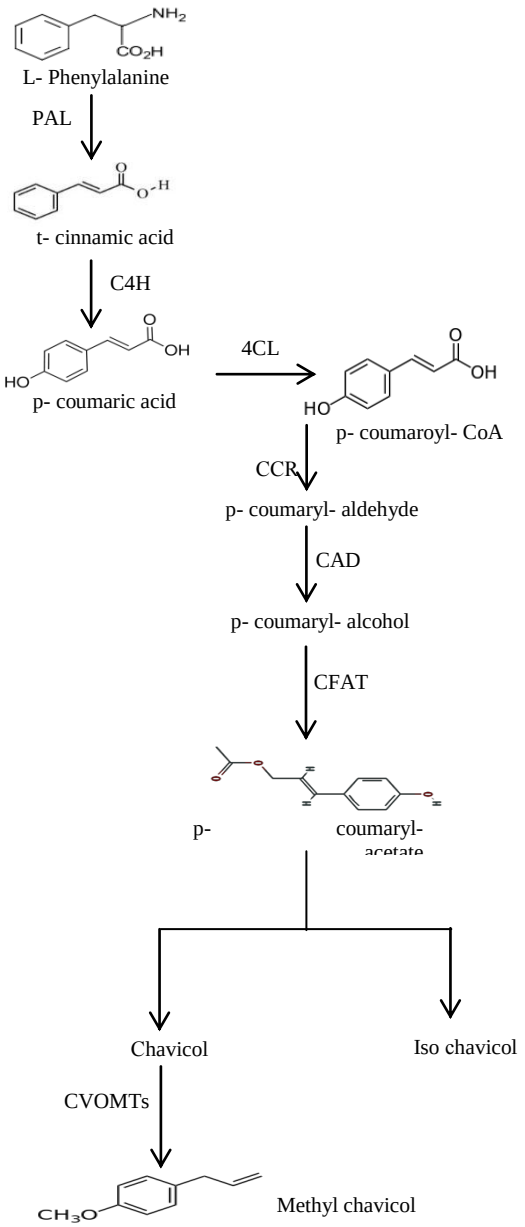
ریحان (*Ocimum basilicum* L.)، گیاهی علفی، معطر و دارویی از خانواده نعناعیان است که به فراوانی در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری آسیا، آفریقا، آمریکای مرکزی و جنوبی می‌روید (Javanmardi et al. 2002;Kothari et al. 2004) از عصاره این گیاه به طور وسیعی برای درمان بیماری‌های گوناگون مانند سردردهای عصبی، گلودرد، آسم سرماخوردگی، ورم کلیه و اسهال استفاده می‌شود. در علوم نوین آروماتراپی از این گیاه به خاطر اثرات ضد تشنجی در تقویت عملکرد سلول‌های مغز و قلب استفاده می‌شود. هم‌چنین ریحان به عنوان یک داروی تب‌بر، ضد مالاریا، تسکین دهنده درد، ضدافسردگی و نیز در ترکیب با داروهای ضد رماتیسم در صنایع داروسازی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Juliani and Simon 2002; Lee et al. 2005). محتویات گوناگون دارویی موجود در ریحان به خاطر تنوع وسیع ترکیبات عمده شامل فنیل پروپانوئیدها و ترپنوئیدهای موجود در اسانس این گیاه می‌باشد که در کرک‌های غده‌ای[1] بر سطح قسمت‌های هوایی گیاه تجمع می‌یابند (Gang et al. 2001). تنوع عظیم ترکیبات موجود در اسانس گونه‌های مختلف جنس Ocimum بسته به شرایط آب و هوایی محل رشد منجر به تنوع عظیم بیوشیمیایی آن‌ها می‌شود. بخش عظیمی از فنیل پروپانوئیدها را ایوژینول[2]، متیل ایوژینول، چاویکول[3] و متیل چاویکول تشکیل می‌دهند که مقدار و کیفیت آن‌ها در توده‌های ریحان و نیز در شرایط اقلیمی مختلف و مرحله نموی گیاه، متفاوت است (Ekren et al. 2012; Radácsi et al. 2010; Telci et al. 2006). فنیل پروپانوئیدها ترکیبات فعالی هستند و نقش بسیار مهمی در حفاظت گیاه در برابر صدمات وارد شده در شرایط نامطلوب محیطی ایفا می‌کنند. متیل چاویکول یکی از مهمترین ترکیبات موجود در اسانس گیاهان معطر به‌خصوص گیاه ریحان می‌باشد و به‌علت اثرات دفاعی بر علیه باکتری‌ها، قارچ‌ها، انواع حشرات و نماتدها در مکانیسم تحمل گیاه در برابر انواع تنش‌های محیطی بسیار مورد اهمیت می‌باشد (Koduka et al. 2006). متیل چاویکول از طریق مسیر سنتز فنیل پروپانوئید تولید می‌شود، فنیل پروپانوئیدها از اسید آمینه فنیل آلانین مشتق می‌شوند که ابتدا توسط آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) و در اثر دآمیناسیون به اسید ترانس سینامیک تبدیل می‌شود. سپس توسط سینامات ٤-هیدروکسیلاز، اسید *p*- کوماریک به وجود می‌آید. اسید *p*-کوماریک در طی مراحلی و توسط آنزیم چاویکول-O-متیل ترانسفراز (CVOMTs)[4] به متیل چاویکول تبدیل می‌شود (شکل ۱) (Zabala et al. 2006). اگرچه متیل چاویکول یکی از مهم‌ترین ترکیباتی است که از طریق مسیر فنیل پروپانوئید سنتز می‌شود اما تا چند دهه اخیر اطلاعات کافی برای تعیین جزئیات مسیر و آنزیم‌های بیوسنتز آن در دسترس نبود. گیاهان در طول چرخه حیات در معرض بسیاری از تنش‌های محیطی قرار می‌گیرند، این تغییرات محیطی به دو صورت تنش‌های زیستی و غیر زیستی قابل تشخیص هستند. فاکتورهای غیرزیستی یا شرایط محیطی نامطلوب شامل دمای بسیار زیاد، نور، خشکی، شوری، آلودگی فلزات سنگین و انواع کمبود مواد غذایی می‌باشد، در این بین، تنش خشکی یکی از مهم‌ترین فاکتورهای غیرزیستی به شمار می‌آید و اثرات نامطلوب بر رشد، باروری و متابولیسم گیاهان دارد (Rejeb et al. 2014). با حضور انواع تنش‌های محیطی، گیاهان برای حفظ حیات خود از سیستم دفاعی پیچیده‌ای بهره می‌گیرند تا بدین‌وسیله بتوانند در پاسخ به سیگنال‌های تنش، سازگاری خود را تنظیم کنند (Sairam et al. ; Gill and Tuteja 2012 2002).

مطالعات گذشته نشان می‌دهد که مقدار متیل‌چاویکول تحت انواع تنش‌های غیرزیستی در ریحان افزایش می‌یابد که این افزایش با افزایش اسانس در شرایط تنش شدید خشکی همراه بوده است (Ekren et al. 2012; Omidbaigi et al. 2003; Khalid 2006). با توجه به اینکه در مسیر بیوسنتزی متیل چاویکول آنزیم نهایی و مسئول تکمیل این ترکیب شناخته شده‌است و نیز عدم اطلاع از نحوه تنظیم این ژن در شرایط تنش خشکی، در این تحقیق به بررسی نقش آنزیم چاویکول-O-متیل ترانسفراز در سطوح مختلف تنش خشکی از طریق بررسی میزان بیان ژن آنزیم مذکور پرداخته شد. نقش عناصر Cis-acting و فاکتورهای نسخه برداری

[1] Glandular trichomes
[2] Eugenol
[3] Chavicol
[4] Chavicol *O*-methyl transferase

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.1.1.1]

به‌عنوان مکانیسم‌های متداول در تنظیم الگوی بیان ژن بسیار با اهمیت می‌باشد. مطالعات گذشته نشان می‌دهد، تغییرات الگوی بیان زمانی و مکانی ژن‌های مرتبط با تنش بخش مهم پاسخ گیاه به تنش را شامل می‌شود که توسط شبکه پیچیده‌ای از پروتئین‌های تنظیم کننده نسخه‌برداری مانند پروتئین‌های MYC و MYB کنترل می‌شود (Wang et al. 2006; Liao et al. 2015). اگرچه مطالعات نحوه تنظیم بیان ژن‌های کلیدی در مسیر بیوسنتز ترکیبات فنیل پروپانوئید نشان می‌دهد که اثرات تنظیمی پروموتر ژن‌های این مسیر در تجمع محصولات نهایی بسیار موثر است (Kao et al. 2002; Osakabe et al. 2009; Zhang et al. 2014)، اما تاکنون مطالعاتی درباره شناخت دومین‌های تنظیمی پروموتر ژن *CVOMTs* و نقش آن‌ها در بیان این ژن در شرایط انواع تنش-های محیطی انجام نشده‌است.



شکل ۱- مسیر بیوسنتز متیل چاویکول

PAL: Phenyl alanine ammonia- lyase; C_4H: Cinnamate 4-hydroxylase; 4CL: 4- coumarate CoA ligase; CCR: Cinnamoyl-CoA reductase; CAD: Cinnamoyl alcohol dehydrogenase; CAAT: Coniferyl alchol acyl transferase; CVOMT: Chavicol *O*- methyl transferase

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.1.1.1]

در این تحقیق برای فهم بهتر مکانیسم تنظیم ملکولی ژن *CVOMTs* در بیوسنتز متیل چاویکول در شرایط تنش خشکی، پس از بررسی الگوی بیان این ژن در شرایط تنش خشکی، جداسازی پروموتر و سپس بیان ژن گزارشگر *GUS* برای تایید فعال بودن پروموتر انجام شد و در نهایت تجزیه بیوانفورماتیکی پروموتر برای تعیین حضور موتیف‌های تنظیمی پاسخ دهنده به تنش خشکی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

بذور سه توده ریحان به‌ترتیب توده ۱ از استان فارس و توده ۲ و ۳ از استان مازندران تهیه و در گلخانه تحقیقاتی گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه تهران کشت شدند. بذور در خاک با بافت لومی شنی در دمای ۳۰–۲۰ درجه سانتی‌گراد تحت نور طبیعی کرج در اردیبهشت سال ۱۳۹٤ رشد یافتند. برای مطالعه پاسخ ژن *CVOMTs* به شرایط تنش خشکی، دو هفته پس از کشت بذور، تیمارهای مختلف تنش خشکی (C: ۱۰۰٪، S_1: ۷۵ ٪، S_2: ۵۰ ٪ و S_3: ۲۵ ٪ ظرفیت زراعی) بر روی گیاهچه‌ها اعمال شد. در ادامه، گلدان‌ها به مدت ۲۹ روز تا انتهای مرحله گلدهی در ظرفیت زراعی مورد نظر نگهداری شدند. نحوه‌ی نمونه‌برداری به صورت برداشت تمامی اندام هوایی گیاه بود. در این آزمایش برای هر مرحله سه گلدان (تکرار) استفاده شد. نمونه‌های برداشت شده تا زمان استخراج RNA در دمای ۸۰– درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

RNA کل از بافت‌های تیمار یافته برگ توده‌های مورد مطالعه ریحان در سطوح مختلف تنش خشکی با استفاده از محلول Biozol (Invitrogene) و مطابق دستورالعمل پیشنهادی شرکت سازنده استخراج شد. کیفیت و کمیت RNA استخراج شده، با استفاده از ژل آگارز یک درصد و اسپکتروفتومتر ارزیابی شد. از یک میکروگرم RNA کل با استفاده از کیت کیاژن (Thermo Scientific, EU) برای ساخت cDNA استفاده شد. در نهایت cDNA با غلظت ٤۰۰ نانوگرم در میکرولیتر در دمای ۲۰– درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. به منظور بررسی کمی بیان ژن *CVOMTs* از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در زمان واقعی استفاده شد. ژن اکتین با شماره دسترسی AB002819 به‌عنوان ژن مرجع مورد استفاده قرار گرفت. واکنش‌ها با حجم ۲۰ میکرولیتر شامل هشت میکرولیتر مخلوط دارای رنگ فلوئورسنت Eva Green (کیت شرکت Solis BioDyne)، ۱/۵ میکرولیتر cDNA رقیق شده (٦۰۰ng)، ۰/۲۵ میکرولیتر از پرایمرهای اختصاصی پیشرو و برگشتی (جدول ۱) و آب دیونیزه در دستگاه Rotor-Gene 6000 ساخت شرکت Qiagen انجام شد. شرایط چرخه‌های دمایی به ترتیب شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه برای واسرشت سازی اولیه سپس ٤۵ چرخه با ۹٦ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه جهت واسرشت سازی، ٦۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه برای اتصال و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه برای تکثیر دنبال شد. برای هر ژن سه تکرار بیولوژیک و تکنیکی در نظر گرفته شد. هم‌چنین برای هر جفت پرایمر کارایی PCR از طریق محاسبه ارزش Ctهای مربوط به رقت‌های سریالی cDNAها سنجیده شد.

از برگ‌های توده مورد مطالعه (توده ۳) ریحان DNA با استفاده از روش CTAB جداسازی شد. با استفاده از ساخت کتابخانه Genome Walker از *O. basilicum* با الگو گرفتن از Universal Genome Walker Kit (Clontech, USA) کار جداسازی پروموتر انجام شد. به طور خلاصه، رقت‌های متفاوت DNA به کمک آنزیم‌های برشی *Eco*RV (*Eco*321)، *Eco*RI و *Hin*dIII برش خورده و سپس به آداپتورهای دو رشته‌ای متصل شد. لیست توالی آغازگرها و آداپتور در جدول ۱ به نمایش گذاشته شده‌است. سپس از DNA متصل به آداپتور به‌عنوان الگو برای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در دو مرحله صورت گرفت: در مرحله اول از آغازگر آداپتور به‌عنوان آغازگر برگشت و آغازگرهای اختصاصی به‌عنوان آغازگر رفت استفاده شد. مرحله دوم شامل واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی بود که از رقت‌های یک دهم و پنج صدم محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در مرحله اول به‌عنوان الگو برای آغازگرهای اختصاصی شماره ۲ به‌عنوان پرایمر رفت، آداپتور پرایمر به‌عنوان پرایمر برگشت استفاده شد. واکنش‌ها با استفاده از دستورالعمل touch-down PCR تکثیر یافت، به‌طوری‌که بعد از یک مرحله واسرشته

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.1.1.1]

سازی در دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤ دقیقه، با ٥ چرخه با ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤٥ ثانیه، ٦٣ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤٥ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤٥ ثانیه و ۲٦ چرخه با ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤٥ ثانیه، ٦١ درجه سانتی-گراد به مدت ٤٥ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤٥ ثانیه دنبال شد. سپس محصول تکثیر یافته از ژل به روش glass-milk خالص‌سازی و در ناقل pTG19-T (شرکت ویوانتیس- کره جنوبی) همسانه‌سازی و برای توالی‌یابی ارسال شد (شرکت بیونیر- کره جنوبی). با استفاده از نرم‌افزار BioEdit و EditSeq نواحی ناخوانا و هم‌پوشان اصلاح و توالی نهایی به‌دست آمد. در ادامه هم‌ردیفی قطعه توالی‌یابی شده در برنامه آنلاین BLAST انجام و صحت قطعه به‌دست‌آمده تایید شد. سپس از نرم‌افزارهای TSSP و BDGP برای یافتن نقطه آغاز رونویسی[1] و از برنامه‌های برخط PLANTCARE[2]، PLACE[3] و PlantPAN[4] برای یافتن فاکتورهای رونویسی و موتیف‌های عملکردی مختلف در توالی موردنظر استفاده شد.

برای ساخت سازه ژنی شامل *pCVOMTs* که به ژن گزارشگر متصل شده‌است، ناقل pTG19 حاوی *pCVOMTs* و ناقل دوگانه pBI121 با دو آنزیم برشی *Bam*HI و *Hin*dIII برش داده شد. سپس pCVOMTs به داخل ناقل pBI121 در محل پروموتر CaMV 35S الحاق شد. بنابراین قطعه پروموتر مورد نظر در ناحیه بالادست ژن گزارشگر *GUS* برای مطالعه عملکرد پروموتر مورد نظر قرار گرفت.

پس از تایید سازه نهایی pBI121، انتقال آن به *Agrobacterium tumefaciens* سویه C58 طبق دستورالعمل ترانسفورماسیون این باکتری (Wang 2006) انجام شد.

به اگروباکتریوم اجازه داده شد تا به مدت ۲٤–۱۸ ساعت در محیط کشت مورد نظر حاوی آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین با غلظت ۱۰۰ µg/mL و ریفامپسین ٥۰ µg/mL رشد کند تا OD در طول موج ٦۰۰nM به ۰/۷ تا ۱ برسد. سپس بافت برگی توتون با استفاده از روش اگروایینفیلتریشن در شرایط خلاء تراریخت شد (Wang 2006) و فعالیت ژن گاس در نمونه‌ها مورد مطالعه قرار گرفت (Jefferson et al. 1987).

[1] Transcription Start Site
[2] bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html
[3] http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html
[4] http://plantpan2.itps.ncku.edu.tw

جدول ۱- آغازگرها و آداپتورهای طراحی شده به‌منظور تجزیه بیان ژن *CVOMTs* و تکثیر توالی پروموتر.

نام ژن/ آداپتور	شماره دسترسی	توالی	طول قطعه (جفت باز)
CVOMTs- F	AB530137	5′-ACGCCACCCAGTTTGAGG-3′	۱۸۰
CVOMTs- R		5′-CCATTACCACCCCCAACATC-3′	
Actin- F	AB002819	5′- TCTATAACGAGCTTCGTGTTG-3′	۱۸۰
Actin- R		5′- GAGGTGCTTCAGTTAGGAGGAC-3′	
Adapt-1		5′-CTATAGTGACTGCTGGTCGAGGGCCCGGGCTGGT-3′	
Adapt-EcoV		5′-ACCAGCCC-3′	
Adapt-EcoR		5′-AATTACCAGCCC-3′	
Adapt-Hind		5′-TCGAACCAGCCC-3′	
Adapt-Hind		5′-TCGAACCAGCCC-3′	
pCVOMT- 1	AB530137	5′-TATCGGGTATGCCTAATTGAATTGCACAT-3′	٦۱٦
2 -pCVOMT		5′-GAAGTTGCTCAGTCGACAATGAAATATCCAT-3′	

F: آغازگر رفت، R: آغازگر برگشتی، Adapt: آداپتور

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.1.1.1]

در ادامه، برگ‌های اینفیلتره شده در محلول رنگ‌آمیزی ایکس گلوک (ساخت شرکت فرمنتاز) شناور شد و به مدت یک دقیقه تحت خلاء ۲۵۰ میلی‌بار قرار گرفت و در نهایت نمونه‌های برگی بین سه ساعت تا یک شبانه روز در دمای ۳۷ درجه قرار گرفتند. پس از آن برگ‌ها در اتانول ۷۵ درصد قرار داده شد و تا زمان حذف کامل کلروفیل، اتانول آن مدام تعویض شد. در انتها عکس-برداری از نمونه‌ها پس از حذف کامل کلروفیل انجام گرفت.

نتایج و بحث

بیوسنتز، متابولیسم و تجمع متابولیت‌های ثانویه تحت تاثیر گونه، شرایط رشد، بافت گیاه و نیز مراحل توسعه‌ای و نموی می‌باشد (Angelova et al. 2006; Akula and Gokare 2011). در بین ترکیبات فعال موجود در سیستم دفاعی گیاهان، فنیل پروپانوئیدهای فرار نقش مهمی در حفاظت سلول‌های گیاهی در برابر تنش خشکی و گرما ایفا می‌کنند (Dixon et al. 2002; Loreto et al. 2014). عموماً مکانیسم تنظیم‌کننده بر سرعت تولید و تجمع ترکیبات مهم فرار موجود در اسانس گیاهان معطر و دارویی در شرایط مختلف نامطلوب محیطی مرتبط با کنترل فعالیت‌های نسخه‌برداری و آنزیمی ژن‌ها و آنزیم‌های درگیر در مسیرهای متابولیک می‌باشد که معمولاً در سطوح مختلف نسخه-برداری ژن، فرایندهایی از جمله تغییرات پس از نسخه برداری، ترجمه و تغییرات پس از ترجمه کنترل می‌شود (Liu et al. 2011; Xie et al. 2008). شناخت مسیرهای بیوسنتز فنیل پروپانوئیدهای فرار (شکل ۱) تحت شرایط تنش خشکی نسبت به مسیرهای بیوسنتز ترپنوئیدها (مسیر موالونات و غیر موالونات) بسیار محدود می‌باشند و کمتر مورد توجه عمیق واقع شده‌اند. برای به‌دست آوردن دید جامعی بر تنظیم تولید فنیل پروپانوئید فرار مهم موجود در گیاه ریحان در شرایط تنش خشکی، بیان ژن *CVOMTs* در سطوح مختلف تنش با استفاده از PCR در زمان واقعی مورد بررسی قرار گرفت.

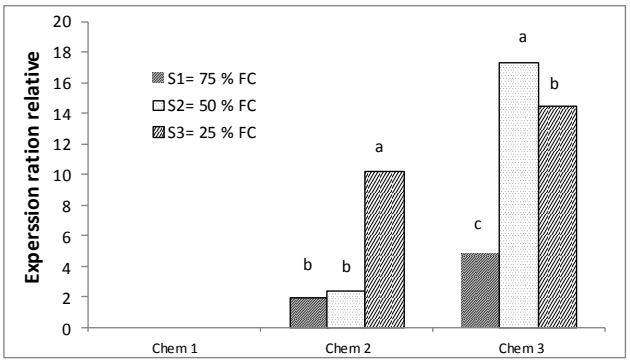
الگوی بیان نسبی ژن *CVOMTs* تحت شرایط تنش خشکی نشان داد که بیان این ژن در سطح اول تنش (۷۵ درصد ظرفیت زراعی) به‌تدریج افزایش یافته و سپس در شرایط تنش شدید (S_3) در توده ۲ افزایش قابل‌ملاحظه‌ای دارد (شکل ۲). به علاوه افزایش قابل توجهی در میزان بیان این ژن در سطح تنش ۵۰ درصد ظرفیت زراعی (S_2) در توده ۳ مشاهده شد. این روند افزایشی تا سطح S_2 دوام داشت و پس از آن تغییر تجمع رونوشت این ژن به‌طور معنی‌داری با افزایش سطح تنش مشاهده شد به‌طوری که کاهش بیان این ژن در سطح ۲۵ درصد ظرفیت زراعی در توده ۳ به خوبی مشهود بود. افزایش سطح رونوشت‌های ژن *CVOMTs* (۱۷ برابر نسبت به گروه کنترل) در سطح S_2 نشان داد که این سطح می‌تواند برای سنتز متیل چاویکول تحت شرایط تنش خشکی مناسب باشد و بیانگر تنظیم فعالیت این ژن در پاسخ به تنش خشکی است. این نتایج با مطالعات پیشین در خصوص افزایش تجمع انواع ترکیبات فنلی، مونوترپن‌ها، آلکالوئیدها و نیز سایر ترکیبات با فعالیت ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتز آن‌ها در سطوح تنش شدید مطابقت دارد (Grausgruber Groger et al. 2010; Yadav et al. 2013; Rastogi et al., 2014; Alavi-Nowak et al. 2010; Samani et al. 2015).

نتایج تجزیه بیان ژن بیانگر این است که میزان بیان ژن *CVOMTs* در توده سه نسبت به دو توده دیگر در سطوح انتهایی تنش بیشتر قابل توجه بود. به لحاظ تکاملی، احتمالا نیاز توده ۳ به متیل چاویکول نسبت به توده‌های دیگر بیشتر می‌باشد. به‌علاوه به نظر می‌رسد که هر توده‌ای سیستم دفاعی متفاوتی برای تحمل یا دفاع علیه شرایط متفاوت محیطی در پیش می‌گیرد. با توجه به نقش آنتی اکسیدانی ترکیبات فرار فنیل پروپانوئید، به نظر می‌رسد که توده سه به تنش خشکی متحمل‌تر باشد، بنابراین سلول‌های موجود در هر توده با توجه به شرایط محیطی، در جهت افزایش بیان ژن مورد نظر سازماندهی ژنومی و بیوشیمیایی خود را برای سازگاری با محیط تغییر می‌دهند. هر ژنی برای بیان در شرایط مختلف گیرنده‌های تنظیمی و بیولوژیکی متفاوتی دارد تا کمپلکس‌های پروتئینی بتوانند پاسخ‌های دفاعی گیاه را به خاطر حضور این گیرنده‌ها تحریک کنند (Jones et al. 2004; Wang et al. 2013). یکی از راهکارها برای بررسی چگونگی تنظیم بیان این ترکیب در شرایط تنش محیطی در توده‌های مختلف، تجزیه و تحلیل پروموتر ژن موردنظر است. با توجه به عدم شناخت از توالی راه‌انداز این ژن، جداسازی و تجزیه این راه‌انداز ضروری

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.1.1.1]

به‌نظر می‌رسد و به‌علاوه امکان مطالعه گسترده‌تر تنظیم بیان ژن در شرایط تنش خشکی فراهم می‌شود. بنابراین توده سه با میزان بیان بیشتر این ژن در شرایط تنش خشکی، برای ادامه مطالعه که شامل جداسازی و شناسایی پروموتر ژن بیوسنتز کننده متیل‌چاویکول می‌باشد برای فهم بهتر عناصر تنظیمی موجود در پروموتر این ژن با میزان بیان متفاوت آن در پاسخ به تنش خشکی انتخاب شد. پس از تکثیر توالی بالادست ژن *CVOMTs* شامل توالی 5'UTR و پروموتر (*pCVOMTs*) با طول ٦١٦ جفت‌باز (شکل ۳)، تایید و ثبت آن به عنوان تنها توالی موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI برای پروموتر این ژن با شماره دسترسی KT310085 ثبت شد. تعیین جایگاه شروع رونویسی برای هر سه ژن در هر سه توده با استفاده از نرم‌افزارهای TSSP، BDGP انجام شد. نتایج نشان داد که جایگاه شروع رونویسی پیش‌بینی شده برای ژن *CVOMTs*، ۵۷ جفت‌باز بالاتر از کدون شروع ترجمه (ATG) قرار گرفته است. توالی پروموتر برای حضور Cis-elementها مورد بررسی قرار گرفت و نتایج در جدول ۲ ارائه شده‌است. نتایج نشان داد که پروموتر *pCVOMTs* حاوی Cis-elementهای ضروری شامل جعبه TATA و CAAT می‌باشد. نتایج بررسی‌ها برای شناسایی حضور عناصر تنظیمی Cis-elementها و موتیف‌های تنظیمی نشان داد که Pc-CMA2c و chs-CMA2b از جمله عناصر تنظیمی شناسایی شده در پروموتر ژن *CVOMTs* می‌باشند که از عناصر تنظیمی پاسخ‌دهنده به نور هستند.

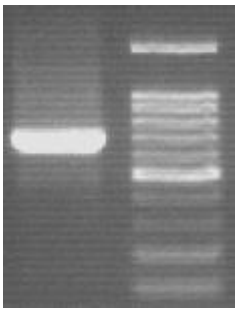


شکل ۲- بیان ژن *CVOMTs* در سه توده ریحان تحت تنش خشکی. بیان ژن خانه‌دار *Actin* به‌عنوان کنترل داخلی در نظر گرفته شد. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار برای سه تکرار بیان شده‌است. $Chem_1$: توده ۱، $Chem_2$: توده ۲ و $Chem_3$: توده ۳. S_1= ۷۵ درصد ظرفیت زراعی، S_2= ۵۰ درصد ظرفیت زراعی و S_3= ۲۵ درصد ظرفیت زراعی. حروف مختلف a، b، c، d بیانگر تفاوت معنی‌دار در هر توده در سطح پنج درصد

جدول ۲- نوع، تعداد و نقش عناصر تنظیمی پیش‌بینی شده در پروموتر ژن *pCVOMT* در توده سه ریحان.

نام عناصر	تعداد	توالی، موقعیت و عملکرد
ARE	۱	TGGTTT (۳٤۸ - تا ۳۵۳-) عناصر ضروری cis-acting برای تحریک در شرایط بی‌هوازی
Box-w1	۱	TTGACC (۲۸۰- تا ۲۸۵-) عناصر پاسخ‌دهنده به الیسیتور قارچی
CAT-Box	۱	GCCACT (۵۰۳- تا ۵۰۸-) عناصر تنظیمی Cis-acting مرتبط با بیان مریستم
CGTCA-motif	٤	CGTCA (۱٦۳ تا ۱٦۸)، (۳۷۳ تا ۳۷۳)، (۲۲۳ تا ۲۲۷) و (۳۹۵ تا ۳۹۹) عناصر تنظیمی Cis-acting در پاسخ به متیل جازمونات
HSE	۱	CNNGAANNTTCNNG (۵۰۹ تا ٦۱۲) عناصر تنظیمی Cis-acting در پاسخ به تنش گرما
MBS	۲	CAACTG و CGGTCA (۱۲٦- تا ۱۳۲-) (۱٤۸- تا ۱۵۳-) مکان اتصال فاکتور نسخه‌برداری MYB با تحریک در تنش خشکی
Pc-CMA2c	۱	GCCCACGCA (۳۵۸- تا ٦۳۳-) قسمتی از عنصر پاسخ‌دهنده به نور
BOXATGAP3	۱	CANNTG (۲۸۰- تا ۲۸۵-) مکان اتصال فاکتور نسخه‌برداری MYC
chs-CMA2b	۱	ATTGCAACTCAA (۵۹- تا ۷۰-) قسمتی از عنصر پاسخ‌دهنده به نور

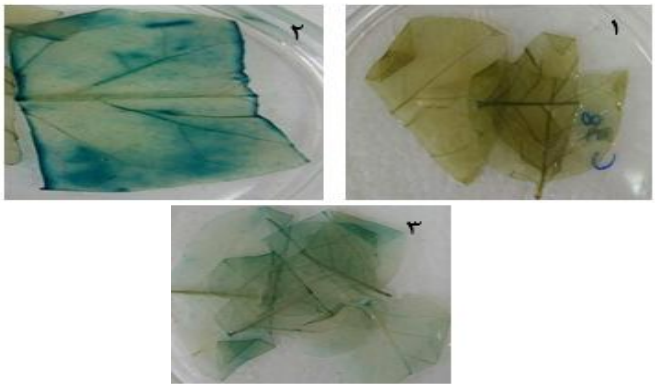
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.1.1.1]



شکل ۳- الکتروفورز محصول حاصل از واکنش *PCR* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای جداسازی پروموتر ژن *CVOMTs* (چاهک ۱). M: سایز مارکر ۱۰۰ جفت‌باز فرمنتاز

عناصر تنظیمی ARE با توالی TGGTTT یکی دیگر از عناصر موثر در بیان ژن‌ها در شرایط بی‌هوازی و یا عدم حضور اکسیژن است که در پروموتر ژن *CVOMTs* حضور دارد. عناصر تنظیمی پاسخ‌دهنده به الیسیتورهای زیستی از جمله قارچ‌ها و متیل جاسمونات نیز در این پروموتر مشاهده شد.

مطالعات صورت گرفته در گیاه ریحان تحت سطوح متفاوت تنش‌های غیرزیستی نشان داده است که میزان ترکیبات فرار از جمله متیل‌چاویکول تحت تنش‌های غیرزیستی افزایش می‌یابد (Simon 1992; Omidbaigi et al. 2003; Khalid 2006; Radcási et al. 2010; Ekren et al. 2012). به دنبال مطالعات صورت گرفته، مطالعه حاضر نیز افزایش بیان ژن کلیدی مسیر بیوسنتز متیل چاویکول در سطح mRNA در شرایط تنش خشکی را نشان داد. برای تعیین ارتباط بین مطالعه بیان ژن و عناصر تنظیمی موثر در شرایط تنش خشکی تجزیه پروموتر این ژن نشان داد که جایگاه اتصال فاکتورهای نسخه‌برداری مرتبط با تنش خشکی و گرما (MYB و HSE) در پروموتر این ژن وجود دارد. در تنش خشکی بیان مؤثر فاکتورهای رونویسی مرتبط از جمله MYB، MYC و HSE افزایش می‌یابد (Skibbe et al. 2008; Wu et al. 2009) و سپس با افزایش بیان آن‌ها و اتصال به جایگاه تنظیمی خود برروی ژن مذکور، میزان فرآورده نهایی متیل چاویکول تحت تاثیر قرار می‌گیرد. با توجه به تغییر فعالیت پروموتر این ژن تحت عوامل متفاوت می‌توان چنین گفت که بیان این ژن دچار نوسانات زیادی است که معمولاً این نوع ژن‌ها به خاطر اثر متقابل با عوامل مختلف دارای پروموتر پیچیده‌ای هستند. به‌علاوه با مشاهده تعداد عناصر تنظیمی در پروموتر ژن *CVOMTs* می‌توان این‌طور نتیجه‌گیری نمود که حجم وسیعی از این عناصر اختصاص به عناصر تنظیمی پاسخ‌دهنده به نور، تنش خشکی، جایگاه فاکتورهای رونویسی MYB، MYC و سایر فاکتورهای مرتبط دارد. بنابراین انتظار می‌رود یکی از دلایل احتمالی حضور این ترکیب و افزایش قابل توجه این ژن در توده ۳ در تنش خشکی مربوط به وجود عناصر تنظیمی پاسخ‌دهنده به نور، خشکی و گرما باشد. بنابراین در شرایط تنش خشکی افزایش بیان این ژن در این توده نیز قابل انتظار خواهد بود.



شکل ٤- آزمون هیستوشیمیایی ژن گزارشگر β- گلوکورونیداز (*GUS*) در توتون ترانسژنیک. ۱- کنترل منفی: اگروباکتریوم بدون پلاسمید نوترکیب، ۲- نتیجه بیان موقت ژن گزارشگر *GUS* تحت هدایت راه‌انداز ۳۵S CaMV (35S-GUS)، ۳- نتیجه بیان موقت ژن گزارشگر *GUS* تحت هدایت راه‌انداز *pCVOMTs* (*pCVOMTs-GUS*).

بیان ژن *GUS* با دو سازه بیانی شامل *pCVOMTs–GUS* و p*CaMV 35S-GUS* مشاهده شد (شکل ٤). تجزیه عناصر موجود در پروموتر *pCVOMTs* نشان می‌دهد که با حضور عناصر پایه، این پروموتر قادر به هدایت و بیان ژن *GUS* می‌باشد. نتایج بیان هیستوشیمیایی ژن *GUS* فعالیت و عملکرد پروموتر *pCVOMTs* را تایید می‌نماید. برای تایید نقش موتیف‌های تنظیمی مرتبط با تنش خشکی و شناخت نقش آن‌ها در فعالیت ژن چاویکول *O*–متیل ترانسفراز بررسی حضور این عناصر تنظیمی در هدایت ژن گزارشگر *GUS* تحت شرایط تنش خشکی مورد نیاز می‌باشد.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.1.1.1]

منابع

Alavi-Samani SM, Ataei Kachouei M, Ghasemi Pirbalouti A (2015) Growth, yield, chemical composition, and antioxidant activity of essential oils from two thyme species under foliar application of jasmonic acid and water deficit conditions. Horticulture, Environment and Biotechnology 56:411-420.

Akula R and Gokare A (2011) Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. Plant Signaling and Behavior 6: 1720-1731.

Angelova Z, Georgiev S, Roos W (2006) Elicitation of plants. Biotechnology Equipment 20: 72-83.

Dixon RA and Paiva N (1995) Stress-Induced phenylpropanoid metabolism. American Society of Plant Physiologist 7: 1085-1097.

Dixon RA, Achenine L, Kota P, Liu C, Reedy MSS, Wang L (2002) The phenylpropanoid pathway and plant defence-a genomics perspective. Molecular Plant Pathology 3: 371-390.

Ekren C, Emrah Ozakal YSK, Emine Bayram HG (2012) The effect of different irrigation water levels on yield and quality characteristics of purple basil (*Ocimum basilicum* L.). Journal of Food Agriculture and Environment 109: 155-161.

Gang D, Wang J, Dudareva N, Nam K, Simon JE, Lewinsohn E, Pichersky E (2001) An Investigation of the Storage and Biosynthesis of Phenylpropenes in Sweet Basil. Plant Physiology 125: 539-555.

Gill S, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiology and Biochemistry 48:909-930

Grausgruber-Gr0ger S, Schmiderer C, Steinborn R, and Novak, J., 2010. Seasonal influence on gene expression of monoterpene synthases in *Salvia officinalis* (Lamiaceae). *Journal of Plant Physiology*, 169: 353- 359.

Hartmann U, Sagasser M, Mehrtens F, Stracke R, Weisshaar B (2005) Differential combinatorial interactions of cis-acting elements recognized by R2R3-MYB, BZIP, and BHLH factors control Light-responsive and tissue-specific activation of phenylpropanoid biosynthesis genes. Plant Molecular Biology 57: 155-171.

Javanmardi J, Khalighi A, Khashi A, Bais HP, Vivanco JM (2002) Chemical characterization of Basil (*Ocimum basilicum* L.) found in local accessions and used in traditional medicine in Iran. Journal of Agriculre and Food Chememstry 50: 5878 -588.

Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusions: b-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO J 6:3901-3907.

Jones J, Tonelli C, Weisshaar B, Martin C (2000) Transcriptional repression by AtMYB4 controls production of UV-protecting sunscreens in Arabidopsis. EMBO Journal 19: 6150-6161.

Juliani HR and Simon JE (2002) *Antioxidant activity of basil.* In: Janic J and Whipkey A (Ed.), Trends in New Crops and New Uses. ASHS Press, Alexandria, 168-195.

Khalid KhA (2006) Influence of water stress on growth, essential oil, and chemical composition of herbs *Ocimum* sp.). Int Agrophy 20:289-296.

Kao YY, Harding SA, Tsai CJ (2002) Differential expression of two distinct phenylalanine ammonia-lyase genes in condensed tannin-accumulating and lignifying cells of quaking aspen. Plant physiology. 130: 796-807.

Koduka T, Fridman E, Gang D, Vassao DJ, Jackson B, Orlova I, Spassova M, Pichersky E (2006) Eugenol and isoeugenol, characteristic aromatic constituents of spices, are biosynthesized via reduction of a coniferyl alcohol ester. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 26: 10128-10133.

Kothari SK; Bhattacharya AK; Ramesh S (2004) Essential oil yield and quality of methyl eugenol rich *Ocimum tenuiflorum* L.f. (syn. *O. sanctum* L.) grown in south India as influenced by method harvest. Journal of Chromatography A 1054:67-72.

Lee SJ, Umano K, Shibamoto T, Lee KG (2005) Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. Food Chemistry 91:131–137.

Liao Y, Shen Y, Cheng J, Zhang W, Cheng Sh, Xu F (2015) Isolation, expression and promoter analysis of GbWRKY2: a novel transcription factor gene from *Ginkgo biloba*. International Journal of Genomics. dx.doi.org/10.1155/2015/607185.

Loreto F, Pollastri S, Fineschi S, Velikova V (2014) Volatile isoprenoids and their importance for protection against environmental constraints in the Mediterranean area. Environmental Experimental Botany 103:99–106.

Liu H, Wang X, Wang D, Zou Z, Lianga Z (2011) Effect of drought stress on growth and accumulation of active constituents in *Salvia miltiorrhiza* Bunge. Industrial Crops and Products 33:84-88.

Nowak M, Manderscheid R, Weigel HJ, Kleinwachter M, Selmar D (2010) Drought stress increases the accumulation of monoterpenes in sage (*Salvia officinalis*), an effect that is compensated by elevated carbon dioxide concentration. Journal of Applied Botany and Food Qualilty 83:133-136.

Omidbaigi R, Hassani A, Sefidkon F (2003) Essential oil content and composition of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) at different irrigation regimes. Journal of Essential Oil-Bearing Plants 6:104-108.

Osakabe Y, Osakabe K, Chiang VL (2009) Characterization of the tissue-specific expression of phenylalanine ammonia-lyase gene promoter from loblolly pine (*Pinus taeda*) in *Nicotiana tabacum*. Plant Cell Reports. 28:1309-1317.

Radácsi P, Inotai K, Sárosi Sz, Czövek P, Bernáth J, Németh É (2010) Effect of water supply on the physiological characteristic and production of Basil (*Ocimum basilicum* L.). European Journal of Horticulture Science 75:193-197.

Rastogi Sh, Kumar R, Chanotiya CS, Shanker K, Gupta MM, Nagegowda DA, Shasany AK (2013) 4-Coumarate: CoA Ligase Partitions Metabolites for Eugenol Biosynthesis. Plant Cell Physiology 54: 1238-1252.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.1.1.1]

Rejeb I, Pastor V, Mauch-Mani B (2014) Plant Responses to Simultaneous Biotic and Abiotic Stress: Molecular Mechanisms. Plants 3: 458-475.
Sairam RK, Rao KV, Srivastava G (2002) Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolytes concentrations. Plant Science 163: 1037-1046.
Sambrook J, Russell DW (2001) Molecular Cloning: A laboratory manual, 3rd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
Simon JE, Reiss-bubenheim D, Joly RJ, Charles DJ (1992) Water stress-induced alterations in essential oil content and composition of sweet basil. Journal of Essential Oil Research 4:71-75.
Skibbe M, Qu N, Galis I, Baldwin IT (2008) Induced plant defenses in the natural environment: *Nicotiana attenuate* WRKY3 and WRKY6 coordinate responses to herbivory. Plant Cell 20: 1984-2000.
Telci I, Bayram E, Yılmaz G, Avcı B (2006) Variability in essential oil composition of Turkish basils (*Ocimum basilicum* L.). Biochemical Systematics and Ecology 34:489-497
Wang K (2006) Agrobacterium protocols. Humana press, New York, USA
Wang L, Li L, Xu L, Zhou J, Zhuang H, Gong X, Wang I, Samuel S Qiang Zhuge, S (2013) Isolation and Functional Analysis of the Poplar *RbcS* Gene Promoter. Plant Molecular Biology Reporter 31:120-127.
Wu XL, Shiroto Y, Kishitani S, Ito Y, Toriyama K (2009) Enhanced heat and drought tolerance in transgenic rice seedlings overexpressing *OsWRKY11* under the control of *HSP101* promoter. Plant Cell Reports 28: 21-30.
Zabala G, Zou J, Tuteja J, Gonzalez D, Clough S, Vodkin L (2006) Transcriptome changes in the phenylpropanois pathway of *Glycine max* in response to *Pseudomonans syringae* infection. BMC Plant Biology 6: 26- 29.
Zhang WW, Li JB, Xu F, Tang Y, Cheng SY, Cao FL. 2014. Isolation and characterization of a phenylalanine ammonia-lyase gene (PAL) promoter from *Ginkgo biloba* and its regulation of gene expression in transgenic tobacco plants. Plant Omics Journal 7:353-360.
Xie Zh, Kapteyn J, Gang D (2008) A systems biology investigation of the MEP/terpenoid and shikimate/ phenylpropanoid pathways points to multiple levels of metabolic control in sweet basil glandular trichomes. The plant Journal 54: 349-361.
Yadav R, Sangwan R, Sabir F, Srivastava A (2013) Effect of prolonged water stress on specialized secondary metabolites, peltate glandular trichomes, and pathway gene expression in *Artemisia annua* L. Plant Physiology and Biochemistry 74: 70-83.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.1.1.1]