

بررسی الگوی بیان ژن متیل چاویکول O-متیل ترانسفراز (CVOMTs)، تعیین توالی و مشخصه یابی پروموتور 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- به ترتیب دانشجوی دکتری، استادن، 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 F¹, Shahriari Ahmadi F^{*1}, Ranjbar M², Bagheri A¹, Alizadeh H³

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 نعنائیان است که به عنوان یک گیاه دارویی در طب سنتی ایران مورد استفاده قرار می گیرد. اسانس ریحان منبع غنی از ترکیبات ترپنوئیدی و فینیل پروپانوئیدی است و در درمان بیماری‌هایی مانند اسهال، سرفه، انگل‌های روده و ناراحتی‌های کلیه و کبد مورد اهمیت می باشد. ترکیب با ارزش متیل چاویکول حجم عمده اسانس ریحان را تشکیل می دهد که اخیراً توجه زیادی به علت ارزش دارویی و فعالیت‌های فارماکولوژیکی خصوصاً به عنوان پیگیری کننده میگرن به خود جلب نموده است. آنزیم متیل چاویکول O-متیل ترانسفراز (CVOMTs) یک آنزیم کلیدی در مسیر بیوسنتز فینیل پروپانوئید است و با انجام عمل متیلاسیون، چاویکول را به متیل چاویکول تبدیل می کند. در تحقیق حاضر، برای بررسی تاثیر تنش خشکی بر شکل گیری و کنترل تنظیم نسخه برداری مسیر بیوسنتز ترکیب متیل چاویکول در سه توده دارویی ریحان، پروفیل مقادیر mRNA ژن کلیدی متیل چاویکول O-متیل ترانسفراز (CVOMTs) در سه سطح تنش خشکی (S₂: ۵۰٪، S₁: ۷۵٪، S₃: ۹۵٪) و (ظرفیت زراعی) با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمرز در زمان واقعی (qRT-PCR) اندازه گیری شد. به منظور ارتباط دقیق تر الگوی بیان ژن CVOMTs در شرایط تنش خشکی جداسازی، مشخصه یابی و تجزیه عملکردی پروموتور pCVOMTs نیز انجام گرفت. بررسی الگوی بیان ژن CVOMTs نشان داد که مقادیر نسخه های این ژن به طور معنی داری تحت تاثیر توده و سطوح تنش قرار دارد. سطح نسخه های ژن CVOMTs در شرایط تنش خشکی افزایش تدریجی نشان داد و در توده سه بیش ترین میزان بیان این ژن در S₂ مشاهده شد. نتایج تجزیه پروموتور ژن CVOMTs نشان داد که این توالی شامل عناصر مهم تنظیمی پاسخ دهنده به دمای بالا و تنش خشکی از جمله MYB، MYC و HSE می باشد. بنابراین افزایش بیان این ژن در سطوح بالای تنش مربوط به جایگاه های اتصال فاکتورهای نسخه برداری است که در شرایط تنش خشکی موجب افزایش بیان این ژن می شود.

واژه های کلیدی

بیان ژن
پروموتور
تنش خشکی
ژن CVOMTs
عناصر تنظیمی

مقدمه

ریحان (*Ocimum basilicum* L.)، گیاهی علفی، معطر و دارویی از خانواده نعنائیان 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). 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 فینیل پروپانویدها و ترپنویدهای موجود در اسانس این گیاه می‌باشد که در کرک‌های غده‌ای^۱ 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 فینیل پروپانویدها را ایوژینول^۲، متیل ایوژینول، چاویکول^۳ 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; Telci et al. 2006; Radácsi et al. 2010). فینیل پروپانویدها 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 به خصوص گیاه ریحان می‌باشد و به علت 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 فینیل پروپانوید تولید می‌شود، فینیل پروپانویدها از اسید آمینه فینیل آلانین مشتق می‌شوند که ابتدا توسط آنزیم فینیل آلانین آمونیالایز (PAL) و در اثر دامیناسیون به اسید ترانس سینامیک تبدیل می‌شود. سپس توسط سینامات ۴-هیدروکسیلاز، اسید p-کوماریک به وجود می‌آید. اسید p-کوماریک در طی مراحل و توسط آنزیم چاویکول-O-متیل ترانسفراز (CVOMTs)^۴ به متیل چاویکول تبدیل می‌شود (شکل ۱) (Zabala et al. 2006). اگرچه متیل چاویکول یکی از مهم‌ترین ترکیباتی است که از طریق مسیر فینیل پروپانوید 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 متیل چاویکول 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

^۱ Glandular trichomes

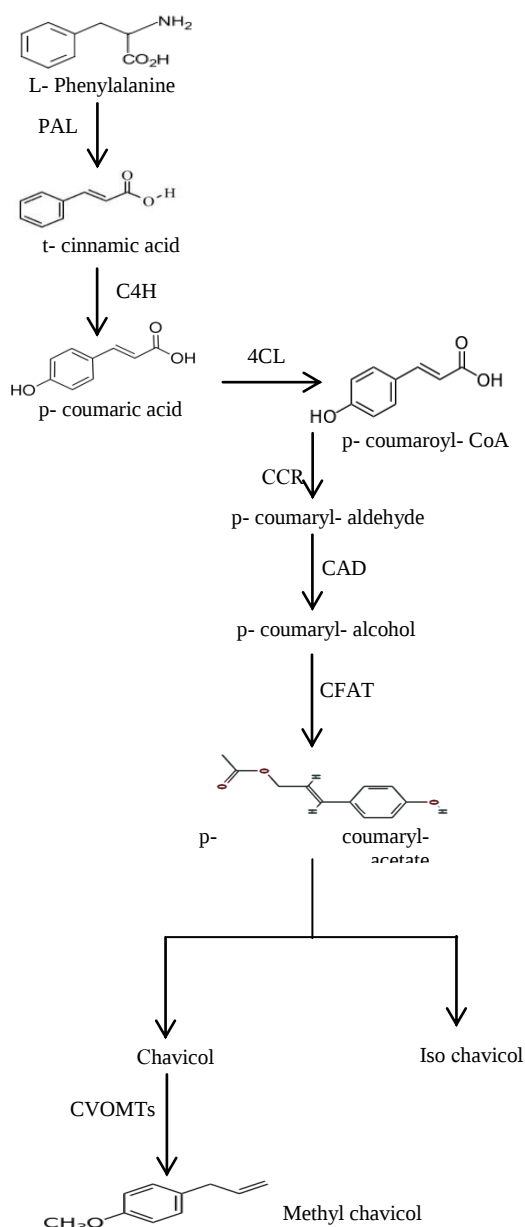
^۲ Eugenol

^۳ Chavicol

^۴ Chavicol O-methyl transferase

ترکیبات فنیل پروپانوئید نشان می‌دهد که اثرات تنظیمی پرموتر 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 پرموتر ژن CVOMTs و نقش آن‌ها در بیان این ژن در شرایط انواع تنش-های محیطی انجام نشده‌است.

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



شکل ۱- مسیر بیوسنتز متیل چاویکول

PAL: Phenyl alanine ammonia- lyase; C₄H: Cinnamate 4-hydroxylase; 4CL: 4- coumarate CoA ligase; CCR: Cinnamoyl-CoA reductase; CAD: Cinnamoyl alcohol dehydrogenase; CAAT: Coniferyl alcohol acyl transferase; CVOMT: Chavicol O- methyl transferase

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 (۶۰۰ ng)، 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 ۴۵ چرخه با ۹۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه جهت واسرشت سازی، ۶۱ 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 پروموتور انجام شد. به طور خلاصه، رقت‌های متفاوت DNA به کمک آنزیم‌های برشی *EcoRV* (Eco321)، *EcoRI* و *HindIII* برش خورده و سپس به آدپتورهای دو رشته‌ای متصل شد. لیست توالی آغازگرها و آدپتور در جدول ۱ به نمایش گذاشته شده است. سپس از DNA متصل به آدپتور به‌عنوان الگو برای واکنش زنجیره‌ای پلیمرز استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در دو مرحله صورت گرفت: در مرحله اول از آغازگر آدپتور به‌عنوان آغازگر برگشت و آغازگرهای اختصاصی به‌عنوان آغازگر رفت استفاده شد. مرحله دوم شامل واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بود که از رقت‌های یک دهم و پنج صدم محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در مرحله اول به‌عنوان الگو برای آغازگرهای اختصاصی شماره ۲ به‌عنوان پرایمر رفت، آدپتور پرایمر به‌عنوان پرایمر برگشت استفاده شد. واکنش‌ها با استفاده از دستورالعمل touch-down PCR تکثیر یافت، به‌طوری‌که بعد از یک مرحله واسرشته

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 پروموتور و سپس بیان ژن گزارشگر *GUS* برای تایید فعال بودن پروموتور انجام شد و در نهایت تجزیه بیوانفورماتیکی پروموتور 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 ۲۰-۳۰ درجه سانتی‌گراد تحت نور طبیعی کرج در اردیبهشت سال ۱۳۹۴ رشد یافتند. برای مطالعه پاسخ ژن *CVOMTs* به شرایط تنش خشکی، دو هفته پس از کشت بذور، تیمارهای مختلف تنش خشکی (C: ۱۰۰٪، S₁: ۷۵٪، S₂: ۵۰٪ و S₃: 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. نحوه 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 کایژن (Thermo Scientific, EU) برای ساخت cDNA استفاده شد. در نهایت cDNA با غلظت ۴۰۰ نانوگرم در میکرولیتر در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. به منظور بررسی کمی بیان ژن *CVOMTs* از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی استفاده

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 *BamHI* و *HindIII* برش داده شد. سپس *pCVOMTs* به داخل ناقل pBI121 در محل پروموتور CaMV 35S الحاق شد. بنابراین قطعه پروموتور مورد نظر در ناحیه بالادست ژن گزارشگر *GUS* برای مطالعه عملکرد پروموتور 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 آگروباکتریوم اجازه داده شد تا به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در محیط کشت مورد نظر حاوی آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین با غلظت ۱۰۰ µg/mL و ریفامپسین ۵۰ µg/mL رشد کند تا OD طول موج ۶۰۰nm به ۰/۷ تا ۱ برسد. سپس بافت برگ‌گی توتون با استفاده از روش آگرواینفیلتریشن در شرایط خلاء تراریخت شد (Wang 2006) و فعالیت ژن گاس در نمونه‌ها مورد مطالعه قرار گرفت (Jefferson et al. 1987).

سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه، با ۵ چرخه با ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۶۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و ۲۶ چرخه با ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۶۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه انجام 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 آنالین BLAST انجام و صحت قطعه به‌دست‌آمده تایید شد. سپس از نرم‌افزارهای TSSP و BDGP برای یافتن نقطه آغاز رونویسی^۱ و از برنامه‌های برخط PLANTCARE^۲، PLACE^۳ و PlantPAN^۴ برای یافتن

^۱ Transcription Start Site

^۲ bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html

^۳ http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html

^۴ http://plantpan2.itps.ncku.edu.tw

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

نام ژن/آداپتور	شماره دسترسی	توالی	طول قطعه (جفت باز)
CVOMTs- F	AB530137	5'-ACGCCACCCAGTTTGAGG-3' 5'-CCATTACCACCCCAACATC-3'	۱۸۰
CVOMTs- R	AB002819	5'- TCTATAACGAGCTTCGTGTTG-3' 5'- GAGGTGCTTCAGTTAGGAGGAC-3' 5'-CTATAGTGACTGCTGGTTCGAGGGCCCGGGCTGGT-3'	۱۸۰
Adapt-EcoV		5'-ACCAGCCC-3'	
Adapt-EcoR		5'-AATTACCAGCCC-3'	
Adapt-Hind		5'-TCGAACCAGCCC-3'	
Adapt-Hind		5'-TCGAACCAGCCC-3'	
pCVOMT- 1 2 -pCVOMT	AB530137	5'-TATCGGGTATGCCTAATTGAATTGCACAT-3' 5'-GAAGTTGCTCAGTCGACAATGAAATATCCAT-3'	۶۱۶

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

در ادامه، برگ‌های اینفیلتره شده در محلول رنگ‌آمیزی ایکس گلوک (ساخت شرکت فرمتاز) 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

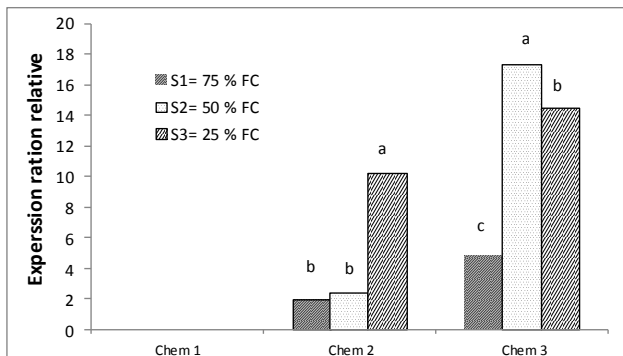
بیوسنتز، متابولیسم و تجمع متابولیت‌های ثانویه تحت تاثیر گونه، شرایط رشد، بافت گیاه و نیز مراحل توسعه‌ای و نمو می‌باشد (Angelova et al. 2006; Akula and Gokare 2011). در بین ترکیبات فعال موجود در سیستم دفاعی گیاهان، فنیل پروپانویدهای فرار نقش مهمی در حفاظت سلول‌های گیاهی در برابر تنش خشکی و گرما ایفا می‌کنند (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 پروپانویدهای 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. 2015; al. 2010; Yadav et al. 2013; Rastogi et al., 2014; Alavi-Nowak et al. 2010; Samani

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، احتمالاً 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 پروموتور ژن موردنظر است. با توجه به عدم شناخت از توالی راهانداز این ژن، جداسازی و تجزیه این راهانداز ضروری

حضور عناصر تنظیمی Cis-element ها و موتیف‌های تنظیمی نشان داد که Pc-CMA2c و chs-CMA2b از جمله عناصر تنظیمی شناسایی شده در پروموتور ژن CVOMTs می‌باشند که از عناصر تنظیمی پاسخ‌دهنده به نور هستند.

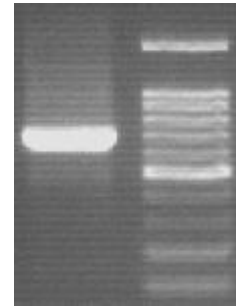


شکل ۲- بیان ژن CVOMTs در سه توده ریحان تحت تنش خشکی. بیان ژن خانه‌دار *Actin* به عنوان کنترل داخلی در نظر گرفته شد. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار برای سه تکرار بیان شده است. Chem₁: توده ۱، Chem₂: توده ۲ و Chem₃: توده ۳. S₁= ۷۵ درصد ظرفیت زراعی، S₂= ۵۰ درصد ظرفیت زراعی و S₃= ۲۵ درصد ظرفیت زراعی. حروف مختلف a, b, c, d بیانگر تفاوت معنی‌دار در هر توده در سطح پنج درصد

به نظر می‌رسد و به علاوه 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 پروموتور ژن بیوستز کننده متیل چاویکول می‌باشد برای فهم بهتر عناصر تنظیمی موجود در پروموتور 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 پروموتور (*pCVOMTs*) با طول ۶۱۶ جفت‌باز (شکل ۳)، تایید و ثبت آن به عنوان تنها توالی موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI برای پروموتور 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 پروموتور برای حضور Cis-element ها مورد بررسی قرار گرفت و نتایج در جدول ۲ ارائه شده است. نتایج نشان داد که پروموتور *pCVOMTs* حاوی Cis-element های ضروری شامل جعبه TATA و CAAT می‌باشد. نتایج بررسی‌ها برای شناسایی

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

نام عناصر	تعداد	توالی، موقعیت و عملکرد
ARE	۱	TGGTTT (۳۴۸ - تا - ۳۵۳)
		عناصر ضروری cis-acting برای تحریک در شرایط بی‌هوای
Box-w1	۱	TTGACC (۲۸۰ - تا - ۲۸۵)
		عناصر پاسخ‌دهنده به الیستور قارچی
CAT-Box	۱	GCCACT (۵۰۳ - تا - ۵۰۸)
		عناصر تنظیمی Cis-acting مرتبط با بیان مرستم
CGTCA-motif	۴	CGTCA (۱۶۳ تا ۱۶۸)، (۳۷۳ تا ۳۷۸)، (۲۲۳ تا ۲۲۷) و (۳۹۵ تا ۳۹۹)
		عناصر تنظیمی Cis-acting در پاسخ به متیل جازمونات
HSE	۱	CNNGAANNNTTCNNG (۵۰۹ تا ۶۱۲)
		عناصر تنظیمی Cis-acting در پاسخ به تنش گرما
MBS	۲	CAACTG و CGGTCA (۱۲۶ - تا - ۱۳۲) و (۱۴۸ - تا - ۱۵۳)
		مکان اتصال فاکتور نسخه‌برداری MYB با تحریک در تنش خشکی
Pc-CMA2c	۱	GCCCCACGCA (۳۵۸ - تا - ۶۳۳)
		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

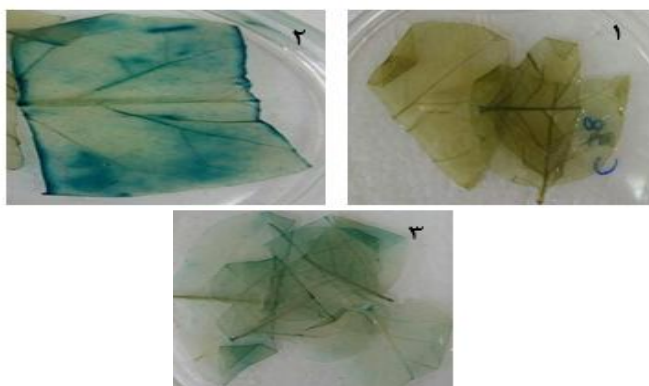


شکل ۳- الکتروفورز محصول حاصل از واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای جداسازی پروموتور ژن CVOMTs (چاهک ۱). M: سایز مارکر ۱۰۰ جفت‌باز فرمتاز

مشاهده تعداد عناصر تنظیمی در پروموتور 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.

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 پروموتور ژن CVOMTs حضور دارد. عناصر تنظیمی پاسخ‌دهنده به الیستورهای زیستی از جمله قارچ‌ها و متیل جاسمونات نیز در این پروموتور 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 متیل‌چاویکول 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 پروموتور این ژن نشان داد که جایگاه اتصال فاکتورهای نسخه‌برداری مرتبط با تنش خشکی و گرما (MYB و HSE) در پروموتور 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 بر روی ژن مذکور، میزان فرآورده نهایی متیل‌چاویکول تحت تاثیر قرار می‌گیرد. با توجه به تغییر فعالیت پروموتور 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 پروموتور پیچیده‌ای هستند. به‌علاوه با



شکل ۴- آزمون هیستوشیمیایی ژن گزارشگر β -گلوکونیداز (GUS) در توتون ترانسژنیک. ۱- کنترل منفی: آگروباکتریوم 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 pCaMV 35S-GUS مشاهده شد (شکل ۴). تجزیه عناصر موجود در پروموتور pCVOMTs نشان می‌دهد که با حضور عناصر پایه، این پروموتور قادر به هدایت و بیان ژن GUS می‌باشد. نتایج بیان هیستوشیمیایی ژن GUS فعالیت و عملکرد پروموتور 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.

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-Groger 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 Agriculture 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, Umamo 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 Quality* 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.

- 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 phenylpropanoid pathway of *Glycine max* in response to *Pseudomonas 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.