مجله بیوتکنولوژی کشاورزی

علمی-پژوهشی و ISC

شناسایی SNPها در نواحی اگزونی ژن‌های اوژنول O-متیل ترنسفراز و چاویکول O-متیل ترنسفراز در گیاه ریحان

مهدیه عزیزی[1]، بابک عبدالهی مندولکانی[2]*

[1]دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

[2]دانشیار گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۵/۱۴، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۰۲

چکیده

به منظور شناسایی تنوع‌های تک نوکلئوتیدی (Single nucleotide polymorphism) در ژن‌های اوژنول O-متیل ترنسفراز (EOMT) و چاویکول O-متیل ترنسفراز (CVOMT) در توده‌های مختلف ریحان از نشانگرهای CAPS (Cleaved amplified polymorphic sequences) و توالی‌یابی استفاده شد. قطعاتی با اندازه ۵۷۱ و ۹۰۸ جفت باز از نواحی کد کننده این دو ژن تکثیر و با آنزیم‌های برشی Pst1 و MseI هضم شد. آنزیم Pst1 در ژن EOMT دو قطعه با اندازه‌های ۴۸۰ و ۹۱ جفت باز و در ژن CVOMT قطعاتی با اندازه‌های ۶۲۱ و ۲۸۷ جفت باز تولید می‌کند. برش قطعات تکثیری هر دو ژن با آنزیم Pst1 الگوهای مشابهی در ۸۰ فرد تولید کرد. آنزیم MseI در این دو ژن به ترتیب قطعاتی با اندازه‌های ۵۹، ۱۳۵ و ۳۷۷ جفت باز و ۲۷۵، ۳۰۲ و ۳۳۱ جفت باز تولید می‌کند. برش قطعات تکثیر شده هر دو ژن با این آنزیم در افراد مورد مطالعه الگوهای برشی متنوعی تولید کرد. از هر نوع الگوی برشی یک نمونه انتخاب و توالی‌یابی شد. توالی‌ها با استفاده از نرم افزار Clustal Omega هم ردیف و SNPها در هر کدام از ژن‌ها شناسایی شدند. نتایج همردیفی نشان داد جهش‌های همجنس T<->C و A<->G در ژن EOMT مشاهده می‌شود ولی جهش‌های ناهمجنس در این ژن مشاهده نشد. در ژن CVOMT تبدیل بازهای A<->G، T<->C، A<->C و A<->T شناسایی گردید که بیشترین جهش مربوط به تبدیل بازهای A<->G بود. به‌طورکلی نتایج این تحقیق نشان داد که چندشکلی در نواحی اگزونی ژن‌های مورد مطالعه کم بوده و نواحی کد کننده این ژنها در طول تکامل ریحان محفوظ بوده است.

کلمات کلیدی: *ریحان، اوژنول O-متیل ترنسفراز، چاویکول O-متیل ترنسفراز، SNP، نشانگرهای CAPS.*

* نویسنده مسئول: بابک عبدالهی مندولکانی تلفن: ۰۹۱۲۲۳۸۶۹۹۰ Email: b.abdollahi@urmia.ac.ir

مقدمه

ریحان (*Ocimum basilicum* L.) یکی از سبزی‌های مهم برگی یکساله می‌باشد که بومی ایران، هند و سایر مناطق آسیایی، آفریقایی و آمریکای جنوبی است و به سبب اهمیت اقتصادی، تغذیه‌ای، صنعتی و دارویی که دارد به طور وسیع مصرف می‌شود (Labra *et al*., 2004). این گیاه (۲n=۴۸) متعلق به خانواده نعناعیان از دیرباز به عنوان یک گیاه دارویی در درمان بسیاری از بیماری‌ها مورد توجه بوده است. در حالت کلی اسانس ریحان متشکل از یک درصد ترکیبات پیچیده و متغیر می‌باشد. این اسانس در رقم‌های مختلف ریحان متفاوت است و شامل اجزای مونوترپنوئیدها و فنیل پروپانوئیدها می‌باشد (Labra *et al*., 2004) که از نظر مقدار و شدت عطر و بو با هم متفاوت می‌باشند (Charles *et al*., 1990; Vieira *et al*., 2000). از جمله ترکیبات فنیل پروپانوئیدی دارای خاصیت دفاعی، می‌توان اوژنول را نام برد که دارای خاصیت ضد باکتریایی و ضد قارچی است و مانع رشد بسیاری از باکتری‌ها و قارچ های بیماری‌زا می‌گردد (Gang *et al*., 2001). برخی از ترکیبات فنیل پروپانوئیدی گیاه را در برابر تنش‌های زیستی و غیر زیستی حفظ می‌کند. یکی از این ترکیبات مهم متیل چاویکول می‌باشد که فراوانترین ماده‌ی تشکیل دهنده‌ی اسانس ریحان است و مقدار آن در مراحل رویشی افزایش می‌یابد. متیل اوژنول ترکیب دیگری می‌باشد که گیاه را در برابر عوامل بیماری زا حفظ می‌کند و دارای نقش حفاظتی برای گیاه می‌باشد (Bilal *et al*., 2012; Zeai *et al*., 2014). بنابراین، استفاده از روش‌های زیست فناوری به منظور تکثیر و افزایش توان ژنتیکی گیاهان دارویی و همچنین شناسایی سریع‌تر و دقیق‌تر ژنوتیپ‌هایی که فرآورده‌ی بیشتری تولید می‌کنند، می‌تواند بسیار مفید باشد.

نشانگرهای ملکولی در بهبود و اصلاح گیاهان دارای اهمیت قابل توجهی می‌باشند (Ahmadizadeh *et al*., 2018). SNP یا چندشکلی تک نوکلئوتیدی یک منبع ژنتیکی عمده از تغییرات فنوتیپی درون یک گونه می‌باشد که تفاوت در تک نوکلئوتیدها را مشخص می‌کند. SNPها هم بارز و دو آللی می‌باشند و تراکم آنها در سطح ژنوم بسیار زیاد بوده (Gupta *et al*., 2001; Jehan and Lakhanpaul, 2006; Mammadov *et al*., 2012). و به علت پایداری بیش‌تر، موتاسیون کمتر و حضور آن‌ها در بیشتر نقاط ژنوم از اهمیت بالایی برخوردارند. در بررسی SNPها بین دو گونه از گیاه ریحان (*O. sanctum* و *O. basilicum*) گزارش شد که ۶۶/۶ درصد از SNP ها مربوط به جهش-های همجنس می باشد که از این میزان ۳۲/۶۶ درصد مربوط به تبدیل A/G و ۳۲/۵ درصد ناشی

Journal of Agricultural Biotechnology; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-650

از تبدیل C/T بوده است. میزان SNP های بدست آمده از جهش ناهمجنس در این مطالعه ۳۳/۸۴ درصد بود که ۱۰/۹۷ درصد ناشی از تبدیل A/T، ۷/۴ درصد به علت تبدیل G/T، ۷/۵۲ درصد از تبدیل به C/G و ۷/۹۵ درصد بخاطر تبدیل A/C بوده است (Rastogi *et al*., 2014). مطالعه SNP ها در بخشی از ژنوم گیاه تاج خروس وحشی (*Chinopodium qiuna* L.) نشان داد که می‌توان از SNP های شناسایی شده برای بهبود نقشه‌ی ژنتیکی، تهیه ژرم پلاسم و مطالعات تکاملی در جمعیت‌های تاج خروس وحشی استفاده کرد (Coles *et al*., 2005). چنانچه ذکر شد متیل چاویکول و متیل اوژنول از ترکیبات فنیل پروپانوئیدی مهم در گیاه ریحان می‌باشد و دو ژن اوژنولO-متیل ترنسفراز (EOMT[1]) و چاویکولO-متیل ترنسفراز (CVOMT[2]) از ژنهای مهم در مسیر بیوسنتز این ترکیبات می‌باشد (Abdollahi Mandoulakani *et al*., 2018; Gang *et al*., 2001). تاکنون تنوع‌های تک نوکلئوتیدی در این ژن‌ها در ریحان شناسایی نشده است بنابراین هدف از این تحقیق، شناسایی SNP ها در این دو ژن در توده‌های مختلف ریحان (*O. basilicum*) و همچنین استفاده از نشانگرهای مبتنی بر این SNP ها برای تمایز و تفکیک ژنوتیپ‌ها و توده‌های مورد بررسی بود.

مواد و روش ها

بذور توده‌های مختلف *O. basilicum* (۸۰ فرد از ۸ توده) از مناطق مختلف ایران جمع آوری (جدول ۱) و در گلخانه کشت شد و بعد از رسیدن به مرحله ۴-۶ برگی نمونه برداری از افراد هر توده (۱۰ فرد از هر توده) انجام گرفت. نمونه‌ها بعد از انجماد در نیتروژن مایع بلافاصله به دمای ۸۰- درجه سانتی گراد انتقال داده شدند. DNA ژنومی از برگ‌های جوان به روش CTAB استخراج گردید. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکترفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز یک درصد تعیین شد.

توالی نواحی کد کننده ژن‌های اوژنول O-متیل ترنسفراز (شماره ی دسترسی AF435008) و چاویکول O-متیل ترنسفراز (شماره دسترسی AF435007) از سایت NCBI ذخیره و آغازگرهای اختصاصی (جدول ۲) با استفاده از نرم افزارهای FastPCR و Gene Runner طراحی شد. قطعاتی با اندازه‌های ۵۷۱ (ژن EOMT) و ۹۰۸ (ژن CVOMT) جفت باز از نواحی کد کننده این دو ژن با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تکثیر شد.

[1]. Eugenol *O*-methyl transferase
[2]. Chavicol *O*-methyl transferase

واکنش‌های PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۵۰ نانوگرم DNA ژنومی، بافر PCR یک برابر (۱۰ میلی مول Tris-HCL، ۵۰ میلی مول KCL، pH=8.3)، ۱/۵ میلی مول $MgCl_2$، ۰/۲ میکرومول از هر dNTP، ۰/۵ واحد Taq DNA پلیمراز (شرکت سیناکلون، ایران) و ۱۰ پیکومول از هر آغازگر در دستگاه ترموسایکلر FlexCycler (شرکت Analytikjena، آلمان) انجام شد.

جدول ۱- محل جمع آوری توده‌های ریحان مطالعه شده در تحقیق حاضر.

Table 1- Collection sites of basil populations used in the current study.

کد توده Code	محل جمع‌آوری Collection site	ارتفاع از سطح دریا(متر) Above sea level (m)	طول جغرافیایی(متر) Longitude (N)	عرض جغرافیایی(متر) Latitude (E)	رنگ برگ Leaf color
1	کرمانشاه ۱ Kermanshah1	1389	47° 3'	23° 34'	سبز Green
2	بیرجند Birjand	1491	32° 52'	59° 13'	سبز Green
3	قم Qom	928	50° 56'	34° 49'	بنفش Green
4	یزد Yazd	1230	54° 4'	32°	سبز Green
5	ورامین Varamin	1100	51° 39'°	35° 19'	سبز Green
6	همدان Hamadan	1824	48° 34'	36° 46'	سبز Green
7	شهر ری ۲ Shahr-e-Ray	1100	35° 7'	51° 4'	بنفش Green

شرایط دمایی مورد استفاده شامل واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت چهار دقیقه، ۳۵ چرخه شامل دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت دو دقیقه و بسط نهایی به مدت پنج دقیقه بود. پس از تکثیر قطعات ژنی، محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵درصد الکتروفورز و باندهای مربوطه مشاهده شد. سپس هضم قطعات تکثیر شده با استفاده از آنزیمهای Pst1 و Mse1 (شرکت

Journal of Agricultural Biotechnology; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-650

فرمنتاس، آلمان) انجام گرفت. یک نمونه از هر کدام از الگوهای برشی متنوع تولید شده انتخاب و برای خالص سازی و توالی‌یابی به شرکت فزاپژوه ارسال شد. با توجه به اینکه طول قطعه برای ژن چاویکول O-متیل ترنسفراز ۹۰۸ جفت باز بود برای قرائت کامل، توالی‌یابی در هر دو جهت رفت و برگشت انجام گرفت. نتایج توالی یابی با استفاده از نرم افزارChromas (نسخه۳.۱.۲) به توالی Fasta تبدیل شد. برای شناسایی SNPها، هم ردیفی توالی‌ها با استفاده از نرم افزارآنلاین Clustal Omega[3] انجام گرفت و SNPها شناسایی شدند.

نتایج و بحث

به منظور بررسی الگوی برش آنزیمی و شناسایی تنوع‌های تک نوکلئوتیدی در دو ژن اوژنول O-متیل ترنسفراز و چاویکول O-متیل ترنسفراز، ابتدا بخشی از نواحی کد کننده این دو ژن تکثیر و فراورده‌های حاصل از تکثیر با استفاده از آنزیم PstI هضم شد. اندازه قطعات حاصل از هضم این آنزیم در افراد مورد مطالعه برای ژن EOMT، ۹۱ و۴۸۰ و برای ژن CVOMT، ۶۲۱ و ۲۸۷ جفت باز بود. این آنزیم منجر به تولید قطعاتی با طول یکسان در هر دو ژن شد و چندشکلی در افراد مورد مطالعه مشاهده نشد. از آنجاییکه توالی برشی این آنزیم (CTGCAG) ۶ جفت بازی می‌باشد بنابراین تعداد قطعات کمتری در نتیجه برش این آنزیم حاصل می‌شود و احتمال تولید الگوی برشی چندشکل در افراد مطالعه شده کاهش می‌یابد. قطعات تکثیری این ژن‌ها با آنزیم MseI نیز هضم شد. پیش‌بینی نواحی برشی این آنزیم در توالی ژن‌های مورد مطالعه با استفاده از نرم‌افزار FastPCR نشان داد که هضم ناحیه اگزونی تکثیرشده ژن اوژنول O-متیل ترنسفراز با این آنزیم منجر به ایجاد سه قطعه به طول ۵۹، ۱۳۵ و ۳۷۷ جفت باز می‌شود. اما این آنزیم در برخی توده‌ها مانند ورامین، قم و بیرجند منجر به ایجاد الگوهای برشی متفاوت و درنتیجه قطعاتی با طول متفاوت شد که ناشی از وقوع جهش در سایت برشی آنزیم می‌باشد. ولی بین افراد داخل توده‌ها تنوعی به لحاظ الگوی برشی مشاهده نشد. همچنین بررسی نواحی برشی این آنزیم در توالی ژن چاویکول O-متیل ترنسفراز با استفاده از نرم‌افزار FastPCR نشان داد که هضم ناحیه کد کننده این ژن منجر به تولید سه قطعه به طول ۲۷۵، ۳۰۲ و ۳۳۱ جفت باز می‌شود. ولی این آنزیم در برخی توده‌ها شامل کرمانشاه، یزد، بیرجند، ورامین و شهر ری قطعاتی با طول متفاوت ایجاد نمود. اندازه‌ی این قطعات حدود ۴۰۰ و ۵۰۰ جفت باز بود. برای این ژن نیز در بین افراد داخل توده‌های مورد مطالعه چندشکلی به لحاظ الگوی برشی آنزیم مشاهده نشد.

[3] www.ebi.ac.uk

جدول .Error! No text of specified style in document- مشخصات آغازگرهای طراحی شده برای تکثیر دو ژن اوژنول O-متیل ترنسفراز و چاویکول O-متیل ترانسفراز در ریحان

Table 2- Characteristics of the primers designed for amplification of eugenol O-methyl transferase and chavicol O-methyl transferase genes in basil

شماره دسترسی Accession number	طول قطعه (جفت باز) Amplicon length (bp)	توالی آغازگر (´3→´5) Primer sequence	ژن Gene
AF435007	908	ctgcacaaacatgaccacccaa tcacaccaaatgctggagtaagc	چاویکولO-متیل ترنسفراز
AF435008	571	ttcaatgtccctaaagtgtgca ccataacgaccgcatctttgc	اوژنول O-متیل ترنسفراز

به منظور شناسایی SNPها در ژن اوژنول O-متیل ترنسفراز، همردیفی بین توالی این ژن در توده‌های بیرجند، قم و همدان که الگوی برشی متفاوتی با آنزیم Mse1 نشان داده بودند انجام گرفت. در این هم ردیفی جهش‌های همجنس مربوط به بازهای T<->C و A<->G مشاهده گردید همچنین در توده‌ی قم یک حذف باز شناسایی شد (شکل ۱ و جدول ۳). به منظور شناسایی SNPها در ژن چاویکول O-متیل ترنسفراز، همردیفی بین توالی این ژن در توده‌های کرمانشاه، شهر ری، ورامین، بیرجند و یزد که الگوی برشی متفاوتی با آنزیم Mse1 نشان داده بودند انجام گرفت. در این هم ردیفی جهش مربوط به تبدیل بازهای A<->G، T<->C، A<->C و A<->T شناسایی شد که بیشترین جهش مربوط به تبدیل بازهای A<->G بود. علاوه بر این حذف باز در توده‌های کرمانشاه، ورامین و بیرجند شناسایی گردید (شکل ۲ و جدول ۴).

```
EOMT_Bir      caagaggtgtgctactggctcaccccagcgtcatgcctcctcttgaaggaggcgccccta
EOMT_Qom      Caagaggtgtgctactggctcaccccagcgtcatgcctcctcttgaaggaggcgccccta
EOMT_Ham      caagaggtgtgctactggctcaccccagcgtcatgcctcctcttgaaggaggcgccccta
              ************************************************************
EOMT_Bir      actgtgacacccctagtccaagtcgttttggatcccaccttcacaaacccatggcaccat
EOMT_Qom      actgtgacacccctagtccaagtcgttttggatcccactttcacaaacccatggcaccat
EOMT_Ham      actgtgacacccctagccaagtcgttttggatcccactttcacaaacccatggcaccat
              **************** ******************** ********************
EOMT_Bir      atgagtgaatggtttacacatgagaaacatgccacacagtttgaggcagcaaacggatgc
EOMT_Qom      atgagtgaatggtttacacatgagaaacatgccacacagtttgaggcagcaaacggatgc
EOMT_Ham      atgagtgaatggtttacacatgagaaacatgccacacagtttgaggcagcaaacggatgc
              ************************************************************
EOMT_Bir      acattttgggagaagttagcaaatgagccaagcaagggcagattttttgatgaagctatg
EOMT_Qom      acattttgggagaagttagcaaatgagccaagcaagggtagattctttgatgaagctatg
EOMT_Ham      acattttgggagaagttagcaaatgagccaagcaagggtagattttttgatgaagctatg
              ************************************** ***** ***************
EOMT_Bir      agttgtgactcgaggctataacacatgtattcaccaaggactacaagcatgtgattgag
EOMT_Qom      agttgtgactcgaggctatagcacatgtattcaccaaggactacgagcatgtgattgag
EOMT_Ham      agttgtgactcgaggctatagcacatgtattcaccaaggactacaagcatgtgattgag
              ********************* ********************** **************
EOMT_Bir      ggaatcagaacattggttgatgttggtggtggtaatggaacgatggctaaagctatcgtt
EOMT_Qom      ggaatcagaacattggttgatgttggtggtggtaatggaacgatggctaaagctatcgtt
EOMT_Ham      ggaatcagaacattggttgatgttggtggtggtaatggaacgatggctaaagctatcgtt
              ************************************************************
EOMT_Bir      gaagcaatgcccaccattaaatgcacagttattgacctcccacatgttgtggctggcttg
EOMT_Qom      gaagcaatgcccaccattaaatgc-cagttattgacctcccacatgttgtggctggcttg
EOMT_Ham      gaagcaatgcccaccattaaatgcacagttattgacctcccacatgttgtggctggcttg
              ************************ ************************* *********
EOMT_Bir      gaaagcaccgataacttaaactatattggaggagacatgttccagtctatcccttctgca
EOMT_Qom      gaaagcaccgataacttaaactatattggaggagacatgttccagtctatcccttctgca
EOMT_Ham      gaaagcaccgataacttaaactatattggaggagacatgttccagtctatcccttctgca
              ************************************************************
EOMT_Bir      gatgcaattcttctaaagtctataatacatgattgggacgatgtggagggcctcaaaatc
EOMT_Qom      gatgcaattcttctaaagtctataatacatgattgggacgatgtggagggcctcaaaatc
EOMT_Ham      gatgcaattcttctaaagtctataatacatgattgggacgatgtggagggcctcaaaatc
              ************************************************************
EOMT_Bir      ttgaagaaatgcaaagatgcggtcgttatgg
EOMT_Qom      ttgaagaaatgcaaagatgcggtcgttatgg
EOMT_Ham      ttgaagaaatgcaaagatgcggtcgttatgg
              ******************************
```

شکل ۱- همردیفی توالی ژن اوژنول O-متیل ترنسفراز در سه ژنوتیپ ریحان از توده‌های بیرجند، قم و همدان.

Figure 1- Alignments of eugenol O-methyl transferase gene sequence in three basil genotypes from populations Birjand, Qom and Hamedan.

جدول ۳- فراوانی SNPهای شناسایی شده در ژن اوژنول O-متیل ترنسفراز در توده‌های مختلف ریحان.

Table 3- Frequency of identified SNPs in eugenol O-methyl transferase gene in different basil populations.

درصد SNP SNP percentage	تعداد SNP Number of SNPs	نوعSNP SNP type
33.33	2	A<->G
66.66	4	T<->C

```
CVOMT_Ker     ctgcacaaacatgaccacccaatgacactttcccaattactcaaggccatc-ccatcaac
CVOMT_Yaz     ctgcacaaacatgaccacccaatgacactttcccaattactcaaggccatccccatcaac
CVOMT_Bir     ctgcacaaacatgaccacccaatgacactttcccaattactcaaggccatctccatcaac
CVOMT_VAR     ctgcacaaacatgaccacccaatgacactttcccaattactcaaggccatccccatcaac
CVOMT_Ray     ctgcacaaacatgaccacccaatgacactttcccaattactcaaggccatccccatcaac
              ************************************************** ********
CVOMT_Ker     aaagaaaaatcccaaagtttcagcgtttgatgcgtgcactagtcaactccaatttcttc
CVOMT_Yaz     aaagaaaaatcccaaagtttccagcgtttgatgcgtgcactagtcaactccaatttcttc
CVOMT_Bir     aaagaaaaatcccaaagtttccagcgtttgatgcgtgcactagtcaactccaatttcttc
CVOMT_VAR     aaagaaaaatcccaaagtttccagcgtttgatgcgtgcactagtcaactccaatttcttc
CVOMT_Ray     aaagaaaaatcccaaagtttccagcgtttgatgcgtgcactagtcaactccaatttcttc
              ******************** ***************************************
CVOMT_Ker     atagaagaaaactctaataatcaagaggtgtgtttctggctcaccccagcctcacgcct
CVOMT_Yaz     atagaagaaaactctaataatcaggaggtgtgtttactggctcaccccagcctcacgcct
CVOMT_Bir     atagaagaaaactctaataatcaagaggtgtgt-tactggctcaccccagcctcacgcct
CVOMT_VAR     atagaagaaaactctaataatcaagaggtgtgt-tactggctcaccccagcctcacgcct
CVOMT_Ray     atagaagaaaactctaataatcaagaggtgtgt-tactgactcaccccagcctcacgcct
              ********************** ********* **************************
CVOMT_Ker     cctcttgaagggggcgcctttgactgtggcaccccttgttcaagtggttttggatcccac
CVOMT_Yaz     cctcttgaagggggcgcctttgactgtggcaccccttgttcaagtggttttggatcccac
CVOMT_Bir     cctcttgaagggggcgcctttgactgtggcaccccttgttcaagtggttttggatcccac
CVOMT_VAR     cctcttgaagggggcgcctttgactgtggcaccccttgttcaagtggttttggatcccac
CVOMT_Ray     cctcttgaagggggcgcctttgactgtggcaccccttgttcaagtggttttggatcccac
              ****** *****************************************************
CVOMT_Ker     tttcacaaacccatggcattatatgagtgaatggtttaaacatgagaaccacgccaccca
CVOMT_Yaz     tttcacaaacccatggcattatatgagtgaatggtttaaacatgagaatcacgccaccca
CVOMT_Bir     tttcacaaacccatggcattatatgagtga-tggtttaaacatgagaaccacgccaccca
CVOMT_VAR     tttcacaaacccatggcattatatgagtgaatggtttaaacatgagaaccatgccaccca
CVOMT_Ray     tttcacaaacccatggcattatatgagtgaatggtttaaacatgagaaccacgccaccca
              ****************************** ***************** ** ********
CVOMT_Ker     gtttgaggcagcaaatggatgcacgtttgggagaagttagcaaataagcccagcatggg
CVOMT_Yaz     gtttgaggcagcaaatggatgcacgtttgggagaagttagcaaataagcccagcatggg
CVOMT_Bir     gtttgaggcagcaaatggatgcacgtttgggagaagttagcaaataagcccagcatggg
CVOMT_VAR     gtttgaggcagcaaatggatgcacgtcttgggagaagttagcaaataagcccagcatggg
CVOMT_Ray     gtttgaggcagcaaatggatgcacgtttgggagaagttagcaaataagcccagcatggg
              ************************** *********************************
```

شکل ۲- همردیفی توالی ژن چاویکول O-متیل ترنسفراز در پنج ژنوتیپ ریحان از توده‌های کرمانشاه، یزد، بیرجند، ورامین و شهر ری.

Figure 2- Alignment of chavicole O-methyl transferase gene sequence in five basil genotypes from populations Kermanshah, Yazd, Birjand, Varamin and Shahr-e-Ray.

```
CVOMT_Ker     tagattttttgatgaagctatgagttgtgactcaaggcttgtggcacatgtactcactaa
CVOMT_Yaz     tagattttttgatgaagctatgagttgtgactcaaggcttgtggcacatgtactcactaa
CVOMT_Bir     tagattctttgatgaagctatgagttgtgactcaaggcttgtggcacatgtactcactaa
CVOMT_VAR     tagattttttgatgaagctatgagttgtgactcaaggcttgtggcacatgtactcactaa
CVOMT_Ray     tagattttttgatgaagctatgagttgtgactcaaggcttgtggcacatgtactcactaa
              ****** ***************************************************
CVOMT_Ker     ggactacaagcgtgtgattgatggaataagaacattggtcgatgttgggggtgataatgg
CVOMT_Yaz     ggaccacaagcatgtgattgatggaataagaacattggtcgatgttgggggtggtaatgg
CVOMT_Bir     ggactacaagcatgtgattgatggaataagaacattggtcgatgttgggggtggtaatgg
CVOMT_VAR     ggactacaagcatgtgattgatggaataagaacattggtcgatgttgggggtggtaatgg
CVOMT_Ray     ggactacaagcatgtgattgatggaataagaacattggtcgatgttgggggtggtaatgg
              **** ****** ***************************************** ******
CVOMT_Ker     aacgatggctaaagctatcgtcgaagcagtgcccaccatgaaatgcactgttcttgacct
CVOMT_Yaz     aacgatggctaaagctatcgtcgaagcagtgcccaccatgaaatgcactgttcttgacct
CVOMT_Bir     aacgatggctaaagctatcgtcgaagcagtgcccaccatgaaatgcactgttcttgacct
CVOMT_VAR     aacgatggctaaagctatcgtcgaagcagtgcccaccatgaaatgcactgttcttgacct
CVOMT_Ray     aacgatggctaaagctatcgtcgaagcagtgcccaccatgaaatgcactgttcttgacct
              ************************************************************
CVOMT_Ker     accacatgttgtggctgggttggaaagcaccgacaaattaagctatattgggggagacat
CVOMT_Yaz     accacatgttgtggctgggttggaaagcaccgacaaattgagctatattgggggagacat
CVOMT_Bir     accacatgttgtggctgggttggaaagcaccgacaaattgagctatattgggggagacat
CVOMT_VAR     accacatgttgtcgctgggttggaaagcaccgacaaattaagctatattgggggagacat
CVOMT_Ray     accacatgttgtggctgggttggaaagcaccgacaaattaagctatattgggggagacat
              ************ ************************** ********************
CVOMT_Ker     gttccagtctatcccttctgcagatgcaattcttctcaagtttataatacacgattggga
CVOMT_Yaz     gttccagtctatcccttctgcagatgcaattcttctcaagtttataatacacgattggga
CVOMT_Bir     gttccagtctatcccttctgcagatgcaattcttctcaagtttataatacacgattggga
CVOMT_VAR     gttccagtctatcccttctgcagatgcaattcttctcaagtttataatacacgattggga
CVOMT_Ray     gttccagtctatcccttctgcagatgcaattcttctcaagtttataatacacgattggga
              ************************************************************
CVOMT_Ker     cgatgaggagggcctcaaaatcttgaagagatgtaaagatgcagttggcattggagggaa
CVOMT_Yaz     cgatgaggagggcctcaaaatcttgaagagatgtaaagatgcagttggcattggagggaa
CVOMT_Bir     cgatgaggagggcctcaaaatcttgaagagatgtaaagatgcagttggcattggagggaa
CVOMT_VAR     cgatgaggagggcctcaaaatcttgaagagatgtaaagatgcagttggcattggagggaa
CVOMT_Ray     cgatgaggagggcctcaaaatcttgaagagatgtaaagatgcagttggcattggagggaa
              ************************************************************
CVOMT_Ker     ggtgataatcatcgatgtggttgtgggtgtcaaccatgacgttgatgaggttttagaaga
CVOMT_Yaz     ggtgataatcatcgatgtggttgtgggtgtcaaccatgacgttgatgaggttttagaaga
CVOMT_Bir     ggtgataatcatcgatgtggttgagggtgtcaaccatgacgttgatgaggttttagaaga
CVOMT_VAR     ggtgataatcatcgatgtggttgtgggtgtcaaccatgacgttgatgaggttttagaaga
CVOMT_Ray     ggtgataatcatcgatgtggttgtgggtgtcaaccatgacgttgatgaggttttagaaga
              ********************** ************************************
CVOMT_Ker     tcaactccacttcgatatggcaatgatgtcttacttcaatgcgaaagaaagaactatgaa
CVOMT_Yaz     tcaactccacttcgatatggcaatgatgtcttacttcaatgcgaaagaaagaactatgaa
CVOMT_Bir     tcaactccacttcgatatggcaatgatgtcttacttcaatgcgaaagaaagaactatgaa
CVOMT_VAR     tcaactccacttcgatatggcaatgatgtcttacttcaatgcgaaagaaagaactatgaa
CVOMT_Ray     tcaactccacttcgatatggcaatgatgtcttacttcaatgcgaaagaaagaactatgaa
              ************************************************************
CVOMT_Ker     tgaatgggaaaaattgatttctgctgctggcttcacaagctataagcttactccagcatt
CVOMT_Yaz     tgaatgggaaaaattgatttctgctgctggcttcacaagctataagcttactccagcatt
CVOMT_Bir     tgaatgggaaaaattgatttctgctgctggcttcacaagctataagcttactccagcatt
CVOMT_VAR     tgaatgggaaaaattgatttctgctgctggcttcacaagctataagcttactccagcatt
CVOMT_Ray     tgaatgggaaaaattgatttctgctgctggcttcacaagctataagcttactccagcatt
              ************************************************************
CVOMT_Ker     tggtgtgag
CVOMT_Yaz     tggtgtgag
CVOMT_Bir     tggtgtgag
CVOMT_VAR     tggtgtgag
CVOMT_Ray     tggtgtgag
              *********
```

Figure 2- Continiued ادامه شکل ۲-

جدول ۴- فراوانی SNPهای شناسایی شده در ژن چاویکول O-متیل ترنسفراز.

Table 4- Frequency of identified SNPs in chavicol O-methyl transferase gene in different basil populations.

درصد SNP SNP percentage	فراوانیSNP Number of SNPs	نوع SNP SNP type
33.33	4	A<->G
50	6	T<->C
8.33	1	G<->C
8.33	1	A<->T

در بررسی SNPها در ناحیه‌ی اگزونی دو ژن چاویکول O-متیل ترنسفراز و اوژنول O-متیل ترنسفراز مشاهده گردید که SNPهای کمتری در این نواحی پراکنده شده است ولی از این تعداد کم، تبدیل بازهای هم جنس (A/G و T/C) دارای درصد فراوانی بالایی می‌باشد. همچنین مطالعاتی که تاکنون در افراد درون یک گونه و در ناحیه‌ی اگزونی از توالی ژن‌های مورد بررسی انجام شده است نتیجه‌ی مشابهی نشان داده‌اند. در بررسی SNPها بین دو گونه *O. sanctum* و *O. basilicum* گزارش شد که ۶۶/۶ درصد از SNPها مربوط به جهش‌های هم جنس می‌باشد که از این میزان ۳۲/۶۶ درصد مربوط به تبدیل A/G و ۳۲/۵ درصد ناشی از تبدیل C/T بوده است. میزان SNPهای به دست آمده از جهش غیرهمجنس در این مطالعه ۳۳/۴ درصد بود که ۱۰/۹۷ درصد ناشی از تبدیل A/T، ۷/۴ درصد به علت تبدیل G/T، ۷/۵۲ درصد از تبدیل به C/G و ۷/۹۵ درصد به خاطر تبدیل A/C بوده است (Rastogi *et al.*, 2014). در مطالعه حاضر نیز درصد جهش‌های همجنس در هر دو ژن بیشتر از جهش‌های ناهمجنس بود. در تحقیقی دیگر SNP های موجود در ESTهای دور قم MU16 و UPV96 گیاه کدوی تخمه کاغذی (*Cucurbita pepo* L.) با استفاده از تکنولوژی Roch454 شناسایی گردید. در این مطالعه حدود ۱۹۹۸۰ SNP گزارش گردید که از این تعداد ۶۸ درصد مربوط به SNP های ناشی از جهش همجنس با فراوانی یکسان A/G و C/T و ۳۲ درصد ناشی از جهش ناهمجنس با فراوانی یکسان ناشی از تبدیلات A/T، A/C، G/T و C/G بود. همچنین در این تحقیق گزارش شد که می‌توان از این SNPها برای اشباع نقشه‌های ژنتیکی، مکان یابی ژنهای کنترل کننده صفات مختلف و انتخاب بر اساس نشانگر در برنامه‌های اصلاحی کدوی تخمه کاغذی استفاده کرد (Barbazuki *et al.*, 2006). فراوانی SNPها در انتهای ´۳ توالی‌های EST در سویا بررسی و گزارش شد که در نواحی اگزونی و اینترونی این ESTها به ترتیب در هر

Journal of Agricultural Biotechnology; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-650

هزار جفت باز، ۱/۴ و ۲ SNP دیده می‌شود و فراوانی SNPها در نواحی اینترونی بیشتر می‌باشد (Choi *et al*., 2003). در مطالعه‌ای دیگر تنوع ژنتیکی بین برنج زراعی و خویشاوندان وحشی آن با استفاده از نشانگرهای SNP بررسی شد. بدین منظور قطعاتی به طول ۵۴۴ تا ۱۰۵۷ جفت باز تکثیر و سپس توالی یابی شد. این قطعات شامل ۱۰ جایگاه جدا از هم از ۶۰ فرد به نمایندگی از دو زیر گونه‌ی *Oriza sativa* و خویشاوندان وحشی آن بود که هشت جایگاه مربوط به نواحی کد کننده و غیر کننده و ۲ جایگاه مربوط به اینترون‌های Adh1 و CatA بود. بعد از توالی یابی ۳۵۷ SNP با میانگین یک SNP در هر ۲۳ جفت باز و ۶۹ جهش از نوع حذف و اضافه مشاهده شد و اعلام گردید که تنوع نوکلئوتیدی در نواحی کد کننده کمتر از نواحی غیر کد کننده می‌باشد (Zhu *et al*., 2007). در تحقیق حاضر بطور میانگین یک و ۱/۳ SNP در هر ۱۰۰ جفت باز به ترتیب در ژن‌های EOMT و CVOMT مشاهده شد که فراوانی آن بیشتر از سویا ولی کمتر از برنج و خویشاوندان وحشی آن بود. دلیل فراوانی بالای SNP ها در برنج نسبت به تحقیق حاضر احتمالا ناشی از بررسی نواحی اینترونی همراه با نواحی اگزونی و همچنین مقایسه خویشاوندان وحشی برنج در کنار گونه‌های زراعی باشد. در کل نتایج تحقیق حاضر نشان داد که جهش‌های همجنس در این دو ژن بیشتر از جهش-های ناهمجنس می‌باشد. همچنین تنوع‌های تک نوکلئوتیدی در نواحی اگزونی ژن‌های مورد مطالعه کم بود و نواحی کد کننده این ژن‌ها در طول تکامل ریحان محفوظ بوده و جهش کمی در این نواحی رخ داده است. پیشنهاد می‌شود ارتباط SNPهای شناسایی شده در این ژن‌ها با میزان ترکیبات فنیل پروپانوئیدی مانند متیل اوژنول و متیل چاویکول بررسی شود و نشانگرهای پیوسته با میزان بالای این ترکیبات توسعه یابد. همچنین نواحی اینترونی این ژنها و سایر ژنهای کلیدی دخیل در بیوسنتز فنیل پروپانوئیدها شناسایی و SNPها در این نواحی شناسایی شود تا بتوان از آنها به عنوان نشانگرهای کارا در تحقیقات اصلاحی ریحان استفاده نمود.

منابع

Abdollahi Mandoulakani B, Alipoor M, Darvishzadeh R, Majroomi Senji B (2018) The effect of drought stress on the expression of genes encoding phenylalanine ammonialyase (PAL), eugenol synthase 1 (EGS1) and caffeic acid O-methyltransferase (COMT) enzymes in Basil (*Ocimum basilicum*). Journal of Agricultural Biotechnology 4: 117-128.

Ahmadizadeh M, Babaeian-Jelodar N, Mohammadi-Nejad Gh, Bagheri N, Singh RK (2018) Identification of QTLs for rice yield and yield-related traits using high density SNPs linkage

map. Journal of Agricultural Biotechnology 3: 1-24

Barbazuki WB, Emrich SJ, Chen HD, Li L, Schnble PS (2006). SNP discovery via 454 transcriptome sequencing. Plant Journal 51: 910-918.

Bilal A, Jahan N, Ahmed A, Bilal SN, Habib S, Hajra S (2012). Phytochemical and pharmacological studies on *Ocimum basilicum* Linn-A review. International Journal of Current Research and Review 4: 73-83.

Charles D, Simon J, Wood K (1990). Essential oil constituents of *Ocimum micranthum* Willd. The Journal of Agricultural and Food Chemistry 38: 120–122.

Choi I, Hyten D L, Kumar l, Cergan PB (2003). Single nucleotide polymorphism discovery in 3-EST sequence of soybean, in Proc Plant, Animal Genomes XI Conference (San Diego, California).

Coles ND, Coleman CE, Christensen SA, Jellen EN, Stevens MR, Bonifacio A, Rojas-Beltran JA, Fairbanks DJ, Maughan PJ (2005). Development and use of an expressed sequenced tag library in quinoa (*Chinopodium qiuna*) for the discovery of single nucleotide polymorphism. Plant Science 168: 439-447.

Gang DR, Wang J, Dudareva N, Nam KH, Simon JE, Lewinsohn E, Pichersky E (2001). An investigation of the storage and biosynthesis of phenylpropenes in sweet basil. Plant Physiology 125: 539-555.

Gupta PK, Roy JK, Prasad M (2001). Single nucleotide polymorphisms; A new paradigm for molecular marker technology and DNA polymorphism detection with emphasis on their use in plants. Current Science 80: 524-535.

Jehan T, Lakhanpaul S (2006). Single nucleotide polymorphism (SNP)–Methods and applications in plant genetics: A review. Indian Journal of Biotechnology 5: 435-459

Labra M, Miele M, Ledda BL, Grassi F, Mazei M, Sala F (2004). Morphological characterization essential oil composition and DNA genotyping of *Ocimum basilicum* L. Cultivars. Plant Science 167: 725-731.

Mammadov J, Aggarwal R, Buyyarapu R, Kumpatla S (2012). SNP markers and their impact on plant breeding. International Journal of Plant Genomics DOI:10.1155/2012/728398

Rastogi Sh, Meena S, Bhattacharya A, Ghosh S, Shukla RK, Songwan NS, Lal RK, Gupta MM, Lavania UC, Gupta V, Nagegowda D, Shasany AK (2014). De novo sequencing and comparative analysis of holy and sweet basil transcriptomes. BMC Genomic 15: 588

Vieira RF, Simon JE (2000). Chemical characterization of basil (Ocimum SPP) found in the markets and used in the traditional medicine in Brazil. Economic Botany 54(2): 207-216.

Zeai M, Sharifi M, Naghd bady H, Tahsili GH, Ghorbany nahoji M (2014). Review of Basil with emphasis on the major secondary compounds the major secondary compounds (*Ocimum basilicum* L.) and characteristics of agricultural and pharmaceutical. Journal of Medicinal Plants 52: 26-40

Zhu Q, Zheng X, Jingchu Luo J, Brandon S, Gaut B.S, Ge S (2007). Multilocus Analysis of Nucleotide Variation of *Oryza sativa* and Its Wild Relatives: Severe Bottleneck during Domestication of Rice. Molecular Biology and Evolution 24(3):875–888.

Identification of SNPs in exonic regions of eugenol O-methyl transferase and chavicol O-methyl transferase genes in basil

Azizi M.[1], Abdollahi Mandoulakani B.[2*]

[1]MSc student of Agricultural Biotechnology, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.
[2]Associate professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.

Absrtact

To identify single nucleotide polymorphisms (SNPs) in eugenol O-methyl transferase (EOMT) and Chavicol O-methyl transferase (CVOMT) genes, cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) markers and direct sequencing were used in different basil populations. Fragments with sizes of 571 and 908 bp of coding regions of both genes were amplified and digested with restriction enzymes Pst1 and MseI. *In silico* digestion of the coding region of the genes by Pst1 produced fragments of 480 and 91 bp in EOMT and 621 and 287 bp in CVOMT. However, no polymorphic restricted patterns were produced in 80 basil individuals using Pst1 digestion. *In silico* MseI digestion of EOMT and CVOMT gene sequences produces fragments of 59, 135 and 377 bp, and 275, 302 and 331 bp, respectively. Digestion of the amplified fragments of both genes generated polymorphic banding patterns in studied basil genotypes. One out of each different restriction patters which is produced for both genes in basil genotypes, was selected for sequencing. Sequences obtained, were aligned for both genes using Clustal Omega and SNPs were identified. The results of EOMT alignment revealed transition mutations T<->C and A<->G, but no transversion was observed in this gene. Mutations A<->G, T<->C, A<->C and A<->T were found in CVOMT gene with the highest frequency of A<->G. In conclusion, the results of the current investigation revealed low polymorphism in coding regions of the studied genes and demonstrated the conservity of the coding regions of both genes during basil evolution.

Keywords: *basil, eugenol O-methyl transferase, chavicole O-methyl transferase, SNP, CAPS markers.*

* Corresponding Author: Abdollahi Mandoulakani B. Tel: 09122386990 Email: b.abdollahi@urmia.ac.ir