



## شناسایی SNPها در نواحی اگزونی ژنهای اوژنول O-متیل ترنسفرز و چاویکول O-متیل ترنسفرز در

### گیاه ریحان

مهدیه عزیزی<sup>۱</sup>، بابک عبدالمی مندولکانی<sup>\*۲</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

<sup>۲</sup> 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 ترنسفرز (EOMT) و چاویکول O-متیل ترنسفرز (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 PstI و MseI هضم شد. آنزیم PstI 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 PstI 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 هم‌رديف و SNPها در هر کدام از ژن‌ها شناسایی شدند. نتایج هم‌رديفی نشان داد جهش‌های همجنس A<->G و T<->C 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. به‌طور کلی 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 ترنسفرز، چاویکول O-متیل ترنسفرز، SNP، نشانگرهای CAPS.

افزایش می‌یابد. متیل اوژنول ترکیب دیگری می‌باشد که گیاه را در برابر عوامل بیماری‌زا 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.

شناگرهای 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 آلی 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 SNPها مربوط به جهش‌های همجنس می‌باشد که از این میزان ۳۲/۶۶ درصد مربوط به تبدیل A/G و ۳۲/۵ درصد ناشی

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 مونوترپنئوئیدها و فینیل 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 فینیل 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 قارچ‌های بیماری‌زا می‌گردد (Gang et al., 2001). برخی از ترکیبات فینیل 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

ها برای تمایز و تفکیک ژنوتیپ‌ها و توده‌های مورد بررسی بود.

#### مواد و روش‌ها

بذور توده‌های مختلف *O. basilicum* (۸۰ فرد از ۸ توده) از مناطق مختلف ایران جمع‌آوری (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 سانتی‌گراد انتقال داده شدند. DNA ژنومی از برگ‌های جوان به روش CTAB استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکترومتری و الکتروفورز ژل آگارز یک درصد تعیین شد.

توالی نواحی کد کننده ژن‌های اوژنول O-متیل ترنسفرز (شماره ی دسترسی AF435008) و چاویکول O-متیل ترنسفرز (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 پلیمرز تکثیر شد.

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 quina* L.) نشان داد که می‌توان از SNP های شناسایی شده برای بهبود نقشه‌ی ژنتیکی، تهیه ژرم پلاسما 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 اوژنول-O-متیل ترنسفرز (EOMT<sup>۱</sup>) و چاویکول-O-متیل ترنسفرز (CVOMT<sup>۲</sup>) 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

<sup>1</sup>. Eugenol O-methyl transferase

<sup>2</sup>. Chavicol O-methyl transferase

پلیمراز (شرکت سیناکلون، ایران) و ۱۰ پیکومول از هر آغازگر در دستگاه ترموسایکلر FlexCycler (شرکت Analytikjena، آلمان) انجام شد.

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 DNA Taq

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

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

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

مدت دو دقیقه و بسط نهایی به مدت پنج دقیقه بود. پس از تکثیر قطعات ژنی، محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز و باندهای مربوطه مشاهده شد. سپس هضم قطعات تکثیر شده با استفاده از آنزیمهای Pst1 و Mse1 (شرکت

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

برشی این آنزیم (CTGCAG) ۶ جفت بازی می- باشد بنابراین تعداد قطعات کمتری در نتیجه برش این آنزیم حاصل می‌شود و احتمال تولید الگوی برشی چندشکل در افراد مطالعه شده کاهش می- یابد. 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 ترنسفرز 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 در نتیجه 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 ترنسفرز 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.

فرمنتاس، آلمان) انجام گرفت. یک نمونه از هر کدام از الگوهای برشی متنوع تولید شده انتخاب و برای خالص سازی و توالی‌یابی به شرکت فزپژوه ارسال شد. با توجه به اینکه طول قطعه برای ژن چاویکول O-متیل ترنسفرز ۹۰۸ جفت باز بود برای قرائت کامل، توالی‌یابی در هر دو جهت رفت و برگشت انجام گرفت. نتایج توالی‌یابی با استفاده از نرم‌افزار Chromas (نسخه ۳.۱.۲) به توالی Fasta تبدیل شد. برای شناسایی SNP‌ها، هم‌ردیفی توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار آنالین Clustal<sup>۳</sup> Omega 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 ترنسفرز و چاویکول O-متیل ترنسفرز، 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 و ۴۸۰ 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

<sup>3</sup> www.ebi.ac.uk

جدول -Error! No text of specified style in document. مشخصات آغازگرهای طراحی شده برای

تکثیر دو ژن اوژنول O-متیل ترنسفرز و چاویکول O-متیل ترانسفرز 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	ctgcacaaacatgaccaccaa tcacacaaatgctggagtaagc	چاویکول O-متیل ترنسفرز
AF435008	571	tcaatgtccctaaagtgtgca ccataacgaccgatctttgc	اوژنول O-متیل ترنسفرز

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، A<->T و A<->C، T<->C 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).

به منظور شناسایی SNPها در ژن اوژنول O-متیل ترنسفرز، 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 A<->G و T<->C 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 ترنسفرز، همردیفی بین توالی این ژن در توده‌های کرمانشاه، شهر ری، ورامین،

```

EOMT_Bir      caagaggtgtgctactggctcaccagcgtcatgcctcctcttgaaggaggcgccccta
EOMT_Qom      Caagaggtgtgctactggctcaccagcgtcatgcctcctcttgaaggaggcgccccta
EOMT_Ham      caagaggtgtgctactggctcaccagcgtcatgcctcctcttgaaggaggcgccccta
*****
EOMT_Bir      actgtgacaccctagtccaagtcgtttggatcccacttccacaacccatggcaccat
EOMT_Qom      actgtgacaccctagtccaagtcgtttggatcccacttccacaacccatggcaccat
EOMT_Ham      actgtgacaccctagtccaagtcgtttggatcccacttccacaacccatggcaccat
*****
EOMT_Bir      atgagtgaatggtttacacatgagaaacatgccacacagtttgaggcagcaaacggatgc
EOMT_Qom      atgagtgaatggtttacacatgagaaacatgccacacagtttgaggcagcaaacggatgc
EOMT_Ham      atgagtgaatggtttacacatgagaaacatgccacacagtttgaggcagcaaacggatgc
*****
EOMT_Bir      acatlttgggagaagttagcaaatgagccaagcaagggtagatttttgatgaagctatg
EOMT_Qom      acatlttgggagaagttagcaaatgagccaagcaagggtagatttttgatgaagctatg
EOMT_Ham      acatlttgggagaagttagcaaatgagccaagcaagggtagatttttgatgaagctatg
*****
EOMT_Bir      agttgtgactcgaggctcatacacatgtattcaccaaggactacaagcatgtgattgag
EOMT_Qom      agttgtgactcgaggctcatagcacatgtattcaccaaggactacagcatgtgattgag
EOMT_Ham      agttgtgactcgaggctcatagcacatgtattcaccaaggactacaagcatgtgattgag
*****
EOMT_Bir      ggaatcagaacattggttgatgttgggtggtggtaatggaacgatggctaaagctatcggt
EOMT_Qom      ggaatcagaacattggttgatgttgggtggtggtaatggaacgatggctaaagctatcggt
EOMT_Ham      ggaatcagaacattggttgatgttgggtggtggtaatggaacgatggctaaagctatcggt
*****
EOMT_Bir      gaagcaatgccaccattaaatgcaacagttattgacctcccacatggtgtggctggcttg
EOMT_Qom      gaagcaatgccaccattaaatgcaacagttattgacctcccacatggtgtggctggcttg
EOMT_Ham      gaagcaatgccaccattaaatgcaacagttattgacctcccacatggtgtggctggcttg
*****
EOMT_Bir      gaaagcaccgataaacttaactatattggaggagacatggtccagctctatcccttctgca
EOMT_Qom      gaaagcaccgataaacttaactatattggaggagacatggtccagctctatcccttctgca
EOMT_Ham      gaaagcaccgataaacttaactatattggaggagacatggtccagctctatcccttctgca
*****
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 ترنسفرز 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 SNP های شناسایی شده در ژن اوژنول O-متیل ترنسفرز در توده های 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	نوع SNP SNP type
33.33	2	A<->G
66.66	4	T<->C

```

CVOMT_Ker      ctgcacaaacatgaccaccaatgacactttccaattactcaaggccatc-ccatcaac
CVOMT_Yaz      ctgcacaaacatgaccaccaatgacactttccaattactcaaggccatccccatcaac
CVOMT_Bir      ctgcacaaacatgaccaccaatgacactttccaattactcaaggccatctccatcaac
CVOMT_VAR      ctgcacaaacatgaccaccaatgacactttccaattactcaaggccatccccatcaac
CVOMT_Ray      ctgcacaaacatgaccaccaatgacactttccaattactcaaggccatccccatcaac
*****
CVOMT_Ker      aaagaaaaatcccaaagttttcagcgtttgatgctgactagtcaactccaatttcttc
CVOMT_Yaz      aaagaaaaatcccaaagttttcagcgtttgatgctgactagtcaactccaatttcttc
CVOMT_Bir      aaagaaaaatcccaaagttttcagcgtttgatgctgactagtcaactccaatttcttc
CVOMT_VAR      aaagaaaaatcccaaagttttcagcgtttgatgctgactagtcaactccaatttcttc
CVOMT_Ray      aaagaaaaatcccaaagttttcagcgtttgatgctgactagtcaactccaatttcttc
*****
CVOMT_Ker      atagaagaaaactctaataatcaagaggtgtgtttctggctcaccagcctcacgcct
CVOMT_Yaz      atagaagaaaactctaataatcaggaggtgtgtttactggctcaccagcctcacgcct
CVOMT_Bir      atagaagaaaactctaataatcaagaggtgtgt-tactggctcaccagcctcacgcct
CVOMT_VAR      atagaagaaaactctaataatcaagaggtgtgt-tactggctcaccagcctcacgcct
CVOMT_Ray      atagaagaaaactctaataatcaagaggtgtgt-tactgactcaccagcctcacgcct
*****
CVOMT_Ker      cctcttgaagggggcgcctttgactgtggcacccttgttcaagtggtttggatcccac
CVOMT_Yaz      cctcttgaagggggcgcctttgactgtggcacccttgttcaagtggtttggatcccac
CVOMT_Bir      cctcttgaagggggcgcctttgactgtggcacccttgttcaagtggtttggatcccac
CVOMT_VAR      cctcttgaagggggcgcctttgactgtggcacccttgttcaagtggtttggatcccac
CVOMT_Ray      cctcttgaagggggcgcctttgactgtggcacccttgttcaagtggtttggatcccac
*****
CVOMT_Ker      ttccacaaacccatggcattatagagtgaatggtttaaacatgagaaccagccacca
CVOMT_Yaz      ttccacaaacccatggcattatagagtgaatggtttaaacatgagaatcacgccacca
CVOMT_Bir      ttccacaaacccatggcattatagagtga-tggtttaaacatgagaaccagccacca
CVOMT_VAR      ttccacaaacccatggcattatagagtgaatggtttaaacatgagaaccagccacca
CVOMT_Ray      ttccacaaacccatggcattatagagtgaatggtttaaacatgagaaccagccacca
*****
CVOMT_Ker      gtttgaggcagcaaatggatgcacgttttgggagaagttagcaataaagccagcatggg
CVOMT_Yaz      gtttgaggcagcaaatggatgcacgttttgggagaagttagcaataaagccagcatggg
CVOMT_Bir      gtttgaggcagcaaatggatgcacgttttgggagaagttagcaataaagccagcatggg
CVOMT_VAR      gtttgaggcagcaaatggatgcacgtcttgggagaagttagcaataaagccagcatggg
CVOMT_Ray      gtttgaggcagcaaatggatgcacgttttgggagaagttagcaataaagccagcatggg
*****

```

شکل ۲- همردیفی توالی ژن چایکول O-متیل ترنسفرز در پنج ژنوتیپ ریحان از توده های 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 tagatttttgatgaagctatgagttgtgactcaaggcttgtggcacatgtactcactaa  
 CVOMT\_Yaz tagatttttgatgaagctatgagttgtgactcaaggcttgtggcacatgtactcactaa  
 CVOMT\_Bir tagattctttgatgaagctatgagttgtgactcaaggcttgtggcacatgtactcactaa  
 CVOMT\_VAR tagatttttgatgaagctatgagttgtgactcaaggcttgtggcacatgtactcactaa  
 CVOMT\_Ray tagatttttgatgaagctatgagttgtgactcaaggcttgtggcacatgtactcactaa  
 \*\*\*\*\*

CVOMT\_Ker ggactacaagcgtgtgattgatggaataaagaacattggtcgatgttgggggtgataatgg  
 CVOMT\_Yaz ggaccacaagcatgtgattgatggaataaagaacattggtcgatgttgggggtgataatgg  
 CVOMT\_Bir ggactacaagcgtgtgattgatggaataaagaacattggtcgatgttgggggtgataatgg  
 CVOMT\_VAR ggactacaagcgtgtgattgatggaataaagaacattggtcgatgttgggggtgataatgg  
 CVOMT\_Ray ggactacaagcgtgtgattgatggaataaagaacattggtcgatgttgggggtgataatgg  
 \*\*\*\*\*

CVOMT\_Ker aacgatggctaaagctatcgtcgaagcagtgcccaccatgaaatgactgttcttgacct  
 CVOMT\_Yaz aacgatggctaaagctatcgtcgaagcagtgcccaccatgaaatgactgttcttgacct  
 CVOMT\_Bir aacgatggctaaagctatcgtcgaagcagtgcccaccatgaaatgactgttcttgacct  
 CVOMT\_VAR aacgatggctaaagctatcgtcgaagcagtgcccaccatgaaatgactgttcttgacct  
 CVOMT\_Ray aacgatggctaaagctatcgtcgaagcagtgcccaccatgaaatgactgttcttgacct  
 \*\*\*\*\*

CVOMT\_Ker accacatgttggctgggtggaaagcaccgacaaattaaagctatattgggggagacat  
 CVOMT\_Yaz accacatgttggctgggtggaaagcaccgacaaattaaagctatattgggggagacat  
 CVOMT\_Bir accacatgttggctgggtggaaagcaccgacaaattaaagctatattgggggagacat  
 CVOMT\_VAR accacatgttggctgggtggaaagcaccgacaaattaaagctatattgggggagacat  
 CVOMT\_Ray accacatgttggctgggtggaaagcaccgacaaattaaagctatattgggggagacat  
 \*\*\*\*\*

CVOMT\_Ker gttccagctctatccctctgacagatgcaattcttctcaagtttataatacacgattggga  
 CVOMT\_Yaz gttccagctctatccctctgacagatgcaattcttctcaagtttataatacacgattggga  
 CVOMT\_Bir gttccagctctatccctctgacagatgcaattcttctcaagtttataatacacgattggga  
 CVOMT\_VAR gttccagctctatccctctgacagatgcaattcttctcaagtttataatacacgattggga  
 CVOMT\_Ray gttccagctctatccctctgacagatgcaattcttctcaagtttataatacacgattggga  
 \*\*\*\*\*

CVOMT\_Ker cgatgaggaggcctcaaaatcttgaagagatgtaaaagatgcagttggcattggagggaa  
 CVOMT\_Yaz cgatgaggaggcctcaaaatcttgaagagatgtaaaagatgcagttggcattggagggaa  
 CVOMT\_Bir cgatgaggaggcctcaaaatcttgaagagatgtaaaagatgcagttggcattggagggaa  
 CVOMT\_VAR cgatgaggaggcctcaaaatcttgaagagatgtaaaagatgcagttggcattggagggaa  
 CVOMT\_Ray cgatgaggaggcctcaaaatcttgaagagatgtaaaagatgcagttggcattggagggaa  
 \*\*\*\*\*

CVOMT\_Ker ggtgataatcatcgatgtggttgtgggtgtcaaccatgacgttgatgaggttttagaaga  
 CVOMT\_Yaz ggtgataatcatcgatgtggttgtgggtgtcaaccatgacgttgatgaggttttagaaga  
 CVOMT\_Bir ggtgataatcatcgatgtggttgtgggtgtcaaccatgacgttgatgaggttttagaaga  
 CVOMT\_VAR ggtgataatcatcgatgtggttgtgggtgtcaaccatgacgttgatgaggttttagaaga  
 CVOMT\_Ray ggtgataatcatcgatgtggttgtgggtgtcaaccatgacgttgatgaggttttagaaga  
 \*\*\*\*\*

CVOMT\_Ker tcaactccacttcgatatggcaatgatgtcttacttcaatgcaaagaaagaactatgaa  
 CVOMT\_Yaz tcaactccacttcgatatggcaatgatgtcttacttcaatgcaaagaaagaactatgaa  
 CVOMT\_Bir tcaactccacttcgatatggcaatgatgtcttacttcaatgcaaagaaagaactatgaa  
 CVOMT\_VAR tcaactccacttcgatatggcaatgatgtcttacttcaatgcaaagaaagaactatgaa  
 CVOMT\_Ray tcaactccacttcgatatggcaatgatgtcttacttcaatgcaaagaaagaactatgaa  
 \*\*\*\*\*

CVOMT\_Ker tgaatgggaaaaattgatttctgctgctggcttcaagctataagcttactccagcatt  
 CVOMT\_Yaz tgaatgggaaaaattgatttctgctgctggcttcaagctataagcttactccagcatt  
 CVOMT\_Bir tgaatgggaaaaattgatttctgctgctggcttcaagctataagcttactccagcatt  
 CVOMT\_VAR tgaatgggaaaaattgatttctgctgctggcttcaagctataagcttactccagcatt  
 CVOMT\_Ray tgaatgggaaaaattgatttctgctgctggcttcaagctataagcttactccagcatt  
 \*\*\*\*\*

CVOMT\_Ker tggtgtgag  
 CVOMT\_Yaz tggtgtgag  
 CVOMT\_Bir tggtgtgag  
 CVOMT\_VAR tggtgtgag  
 CVOMT\_Ray tggtgtgag  
 \*\*\*\*\*

Figure 2- Continued

ادامه شکل ۲-

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

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

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

(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 اشیاع 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 ایترونی این ESTها به ترتیب در هر

در بررسی SNPها در ناحیه‌ی اگزونی دو ژن چاویکول O-متیل ترنسفرز و اوژنول O-متیل ترنسفرز 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.,

دلیل فراوانی بالای SNP ها در برنج نسبت به تحقیق حاضر احتمالاً ناشی از بررسی نواحی ایترونی 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 جهش‌های 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 پروپانوییدی مانند متیل اوژنول و متیل چاویکول بررسی شود و نشانگرهای پیوسته با میزان بالای این ترکیبات توسعه یابد. همچنین نواحی ایترونی این ژن‌ها و سایر ژن‌های کلیدی دخیل در بیوستتر فنیل پروپانوییدها شناسایی و SNP‌ها در این نواحی شناسایی شود تا بتوان از آنها به عنوان نشانگرهای کارا در تحقیقات اصلاحی ریحان استفاده نمود.

هزار جفت باز، ۱/۴ و ۲ SNP دیده می‌شود و فراوانی SNP‌ها در نواحی ایترونی 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 توالی‌یابی 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 ایترونی‌های *Adh1* و *CatA* بود. بعد از توالی‌یابی 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.

## 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.
- Ahmadzadeh 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 I, 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 (*Chenopodium quinoa*) 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.<sup>1</sup>, Abdollahi Mandoulakani B.<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>MSc student of Agricultural Biotechnology, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.

<sup>2</sup>Associate professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.

### Abstract

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 patterns 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 $\leftrightarrow$ C and A $\leftrightarrow$ G, but no transversion was observed in this gene. Mutations A $\leftrightarrow$ G, T $\leftrightarrow$ C, A $\leftrightarrow$ C and A $\leftrightarrow$ T were found in CVOMT gene with the highest frequency of A $\leftrightarrow$ 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, chavicol O-methyl transferase, SNP, CAPS markers.

\* Corresponding Author: Abdollahi Mandoulakani B. Tel: 09122386990

Email: b.abdollahi@urmia.ac.ir