ژنتیک نوین
دوره شانزدهم، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۰
صفحه ۲۱۸ - ۲۱۱

# جداسازی و تعیین خصوصیات پروموتر ژن سینامات ۴–هیدروکسیلازدر ریحان

# Isolation and characterization of cinnamate- 4-hydroxylase gene promoter in *Ocimum basilicum* L.

رویا کریمی گویجه لو[۱]، بابک عبدالهی مندولکانی*[۱]

۱- به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استاد، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

**Karimi Goyjelo R[1], Abdollahi Mandoulakani B[*1]**

1- MSc Student of Plant Breeding, Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی:b.abdollahi@urmia.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۹/۰۸/ ۱۹ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۲۳)

## چکیده

**اسانس ریحان (*Ocimum basilicum* L.) سرشار از ترکیبات فنیل پروپانوئیدی مانند فنیل سینامات، متیل چاویکول، متیل اوژنول و اوژنول می‌باشد. در مسیر بیوسنتز فنیل پروپانوئیدها ژن‌های کلیدی مهمی از جمله سینامات-٤- هیدروکسیلاز دخالت دارد. امروزه با توجه به اهمیت پروموتر در دستکاری‌های ژنتیکی، انتقال ژن و تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان، آگاهی از توالی پروموتر و عناصر تشکیل‌دهنده آن ضروری می‌باشد. بنابراین در این تحقیق با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز نامتقارن دمایی (Thermal asymmetric interlaced PCR) توالی ناحیه بالادست ژن سینامات-٤- هیدروکسیلاز در گیاه ریحان شناسایی شد. در این تحقیق از دو نوع آغازگر که از نظر طول و دمای اتصال باهم متفاوت هستند استفاده شد تا توالی هدف تکثیر شود. آغازگرهای نوع اول اختصاصی با دمای اتصال بالا و دارای سه توالی متفاوت بود. آغازگرهای نوع دوم اختیاری (شش عدد) با طول کوتاه و دمای اتصال پایین بود. واکنش‌های TAIL- PCR در سه مرحله صورت گرفت که در مرحله دوم و سوم به‌ترتیب از فرآورده‌های رقیق شده مراحل اول و دوم به‌عنوان DNA الگواستفاده شد. بعد از الکتروفورز محصولات PCR و شناسایی باند مورد نظر، قطعه مورد نظر از ژل آگارز استخراج و تلخیص شد و توالی‌یابی آن در دو جهت انجام گرفت. آنالیزهای بیوانفورماتیکی توالی با استفاده از برنامه‌های PLACE، PLANT CARE، Softberry و Neural Network Promoter Prediction انجام گرفت و مشخص شد پروموتر مورد نظر ۷۹٤ جفت‌باز طول دارد. ناحیه TATA Box این پروموتر در اطراف نوکلئوتید ۳۵- و ناحیه شروع رونویسی ۱۷۰ نوکلئوتید بالا دست کدون آغاز ترجمه قرار دارد. چندین ناحیه تنظیمی عملکردی نظیر CAAT box، W box، G box و I box نیز در توالی پروموتر شناسایی شد. بنابراین پروموتر شناسایی شده (بعد از ارزیابی و تایید نهایی) می‌تواند در برنامه‌های انتقال ژن و دستکاری‌های ژنتیکی در گیاه ریحان جهت افزایش برخی متابولیت‌های با ارزش استفاده شود.**

**واژه‌های کلیدی**

**پروموتر**
**ریحان**
**سینامات-۴- هیدروکسیلاز**
**TAIL-PCR**

[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19 ]

[ DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.3.1.3 ]

## مقدمه

ریحان یک گیاه مهم دارویی از خانواده نعناعیان (Lamiaceae) است که نام علمی آن *Ocimum basillicum* L. می‌باشد (Ziaei et al. 2014). منشأ این گیاه هند و ایران گزارش شده است (Omidbaigi 2008). مواد مؤثره پیکر رویشی این گیاه اشتهاآور است و برای معالجه نفخ شکم و کمک به هضم غذا استفاده می‌شود. از این گیاه برای معالجه برخی ناراحتی‌های قلبی و همچنین برای مداوای بزرگ شدن طحال استفاده می‌شود (Omidbaigi 2008). ریحان همانند سایر گیاهان خانواده نعناع عملکرد ضد انگلی، ضد باکتری، ضد قارچی و آنتی‌اکسیدانتی دارد (Labra et al. 2004). اسانس ریحان شامل ترکیبات متنوع و پیچیده‌ای است که به دو گروه ترپنوئیدها و فنیل پروپانوئیدها تقسیم می‌شوند (Sangwan et al. 2001). بخش عمده اسانس گیاه ریحان شامل فنیل پروپانوئیدها می‌باشند که ۹۰ درصد ترکیبات اسانس را شامل می‌شوند. ترکیبات فنولی به میزان فراوان در همه گیاهان وجود دارند که اساس ساختاری همه آن‌ها حلقه آروماتیک است. این ترکیبات باعث ایجاد رنگ، طعم و ویژگی‌های فیزیولوژیکی خاصی در گیاهان می‌شوند و از گیاه در برابر تنش‌های زیستی و غیر زیستی به‌خصوص علف‌کش‌ها حفاظت می‌کنند (Boudent 2007). ترکیبات مهم فنیل پروپانوئیدی شامل اوژنول[1]، چاویکول[2]، متیل اوژنول[3]، فنیل سینامات[4] و ترکیبات دیگر است که به اسانس ریحان خاصیت دارویی می‌دهند (Achine et al. 2004). بیوسنتز فنیل پروپانوئیدها از مسیر شیکیمات می‌گذرد و توسط یک گروه آنزیمی هدایت می‌شود که این آنزیم‌ها به‌صورت آزاد یا در ارتباط با غشاهای سلولی می‌باشند (Cochrane et al. 2004). ترکیبات فنولی از سینامیک اسید مشتق می‌شوند که این ترکیبات از عمل آمین زدایی توسط آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) بر روی L-فنیل آلانین حاصل می‌شود. آنزیمی که بعد از آنزیم PAL در مسیر تولید فنیل پروپانوئیدها نقش دارد آنزیم سینامات ٤- هیدروکسیلاز ($C_4H$) است که عمل اصلی آن هیدروکسیله کردن سینامیک اسید و تبدیل آن به P-کوماریک اسید است (Iijima et al. 2004). بسیاری از مطالعات، سینامیک اسید را به‌عنوان یک کانال بین آنزیم‌های PAL و $C_4H$ معرفی می‌کنند که درنتیجه باعث تولید P-کوماریک اسید می‌شود که یک ماده حد واسط در مسیر بیوسنتز فنیل پروپانوئیدها می باشد (Boudet 2007). P- کوماریک اسید یا توسط آنزیم P-کومارات ۳- هیدروکسیلاز ($C_3H$) تبدیل به کافئیک اسید می‌شود و در مسیر تولید اوژنول و متیل اوژنول قرار می‌گیرد و یا توسط آنزیم ٤-کومارات CoA لیگاز (4CL) تبدیل به P-کوماریل آلدهید می‌شود که در مسیر تولید چاویکول و متیل چاویکول قرار می‌گیرد (Ziaei et al. 2012). آنزیم‌های اوژنول سینتاز ۱ (EGS1)، اوژنول O- متیل ترانسفراز (EOMT )، سینامات ٤- هیدروکسیلاز و چاویکول O- متیل ترنسفراز ( CVOMT) از جمله آنزیم‌های مهمی هستند که نقش کلیدی در مسیر تولید ترکیبات فنیل پروپانوئیدی دارند (Iijima et al. 2004). ژن *$C_4H$* نقش اساسی در بیوسنتز لیگنین و سیستم دفاعی از طریق بیوسنتز فلاونوئیدها دارد (Liu et al. 2009). توسعه تنظیم بیان ژن *$C_4H$* با لیگنینی شدن و محل‌های فعال دیگر متابولیسم فنیل پروپانوئیدها در ارتباط است. این ژن باعث تولید ترکیب فنیل سینامات در اسانس ریحان می‌شود و آنزیم حد واسط برای ترکیبات مهم فنیل پروپانوئیدی مانند اوژنول و متیل اوژنول می باشد (Iijima et al. 2004). با توجه به اهمیت پروموتر در بهبود کارایی سیستم‌های ترانسژنیک گیاهی، مطالعات گسترده‌ای بر روی آن‌ها صورت می‌گیرد. شناسایی نواحی تنظیمی پروموتر نقش به سزایی در تنظیم بیان ژن‌ها دارد، بنابراین تلاش‌های بسیاری برای شناسایی توالی پروموتری ژن‌های مختلف صورت گرفته است (Choupani et al. 2015). استفاده از گیاهان به‌عنوان بیوراکتور زنده این امکان را فراهم آورده که بتوان محصول مورد نظر را در بافت‌های اختصاصی و با هزینه کم به‌دست آورد. با این‌حال استفاده از گیاهان به‌عنوان بیوراکتور دارای محدودیت‌هایی ازجمله تولید و پایداری کم پروتئین‌های نوترکیب است و بیان کم ژن‌های خارجی در گیاهان عامل محدودکننده در مهندسی ژنتیک گیاهان است که یکی از دلایل آن فعالیت تنظیم‌کنندگی پروموترها در گیاهان می‌باشد. به‌همین دلیل شناسایی و جداسازی پروموترهای ژن‌های کلیدی امری ضروری برای دستکاری و افزایش بیان ژن‌ها

[1] Eugenol
[2] Chavicol
[3] Methyl eugenol
[4] phenyl cinnamate



[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.3.1.3 ]

و به‌دنبال آن تولید محصول کافی است (Cunha et al. 2010). نتایج تجزیه پروموتر ژن متیل چاویکول O-متیل ترانسفراز (CVOMT) در گیاه ریحان نشان داد که این توالی شامل عناصر مهم تنظیمی پاسخ‌دهنده به دمای بالا و تنش خشکی ازجمله 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 (Khakdan et al. 2017). همچنین در تحقیقی دیگر پروموتر ژن آمورفا ٤-١١-داین سینتاز (ADS) دخیل در مسیر بیوسنتز آرتمیزینین که فارنسیل دی فسفات را به آمورفا داین در گیاه درمنه (*Artemisia annua*) تبدیل می‌کند توسط روش TAIL- PCR جداسازی شد. سه آغازگر داخلی یا اختصاصی که بر اساس ناحیه ′٥ توالی ژن ADS طراحی‌شده بود به‌همراه شش آغازگر تصادفی استفاده شد، پس از بررسی‌های بیوانفورماتیکی این توالی، گزارش شد که این پروموتر دارای موتیف‌های عملکردی پاسخ به برخی الیسیتورها مانند هورمون‌ها می‌باشد (Wang et al. 2008). با توجه به اهمیت پروموتر در دست‌کاری‌های ژنتیکی، انتقال ژن و تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان و همین‌طور اهمیت ژن $C_4H$ در گیاه ریحان، آگاهی از توالی پروموتر این ژن و عناصر تشکیل‌دهنده‌ی آن ضروری می‌باشد بنابراین در تحقیق حاضر توالی پروموتر ژن $C_4H$ و همچنین خصوصیات و اجزای این پروموتر با روش‌های بیوانفورماتیکی تعیین شد.

## مواد و روش‌ها

به‌منظور تهیه نمونه‌های گیاهی جهت استخراج DNA، بذر گیاه ریحان رقم کشکنی لولو در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه کشت شد. از زمان جوانه‌زنی بذرها تا رسیدن به مرحله ٤ تا ٨ برگی، آبیاری هر دو روز یک‌بار به‌صورت مرتب انجام گرفت. بعد از رسیدن گیاهان به مرحله ٤ تا ٨ برگی، نمونه‌برداری از برگ‌ها برای استخراج DNA به روش CTAB (De Masi et al. 2006) انجام گرفت. کمیت و کیفیت DNA استخراجی با استفاده از نانودراپ و الکتروفورز ژل آگارز یک درصد تعیین شد. به‌منظور شناسایی ناحیه بالادست ژن $C_4H$ در گیاه ریحان از روش TAIL-PCR استفاده شد (Kiem et al. 2008). در ابتدا توالی ناحیه کد کننده ژن $C_4H$ از سایت NCBI با شماره دسترسی HM990150.1 دانلود و ذخیره شد. برای اجرای TAIL-PCR نیاز به چند آغازگر داخلی (اختصاصی) و چند آغازگر غیراختصاصی می‌باشد، بنابراین برای تکثیر ناحیه هدف سه آغازگر اختصاصی بر اساس انتهای ′٥ ژن $C_4H$ طراحی شد. این آغازگرها به‌همراه شش آغازگر غیراختصاصی به طول ١٠ نوکلئوتید (Kiem et al. 2008) مورد استفاده قرار گرفتند. برای طراحی آغازگرهای اختصاصی از برنامه‌های Fast PCR نسخه ٦/٢ و GenRunner استفاده شد.

جدول ١- توالی آغازگرهای مورد استفاده در TAIL-PCR برای تکثیر پروموتر ژن $C_4H$ ریحان (*Ocimum basilicum* L.)

| آغازگر* | توالی (′٣ → ′٥) | دمای اتصال (درجه سانتی‌گراد) |
|---|---|---|
| TR1 | TGCGGTGGTTTAGGTCATCG | 55 |
| TR2 | TGGCGGCAGCTTGAACTT | 55 |
| TR3 | ACGACGATGGCGGAGAAGA | 55 |
| AD1 | GGTGCTCCGT | 49 |
| AD2 | GTGTGCCCCA | 50 |
| AD3 | ACGGTGCCTG | 50 |
| AD4 | CGATGAGCCC | 49 |
| AD5 | CTATCGCCGC | 49 |
| AD6 | CGCAGACCTC | 49 |

*TR1, TR2, TR3: آغازگرهای اختصاصی، AD1, AD2, AD3, AD4, AD5, AD6: آغازگرهای تصادفی



[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.3.1.3 ]

در این واکنش به‌منظور تکثیر ناحیه ناشناخته، از آغازگر اختصاصی اول (TR1) به‌همراه آغازگرهای غیراختصاصی (AD) استفاده شد. این واکنش در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۰/۷ میکرولیتر $MgCl_2$ ۵۰ میلی مولار، ۲ میکرولیتر بافر PCR ۱۰ برابر، ۰/۵ میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی‌مولار، ۲ میکرولیتر آغازگر AD ۱۰ میکرومولار، یک میکرولیتر آغازگر TR1 ۱۰ میکرومولار، ۳ میکرولیتر DNA الگو (۲۰ نانوگرم) و ۰/۲۵ واحد Taq DNA پلیمراز (سیناکلون، ایران) در دستگاه ترموسایکلر Flex Cycler (Analytikjen، آلمان) انجام شد. شرایط دمایی مورد استفاده شامل واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت چهار دقیقه، ۳۵ چرخه شامل دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۵ ثانیه، دمای اتصال ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه و بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه بود. پس از انجام واکنش، محصولات تکثیر شده روی ژل آگارز یک و نیم درصد تفکیک شد. غلظت محصول حاصل از واکنش اول به نسبت ۱:۱۰ رقیق و سه میکرولیتر از آن به‌عنوان الگو در مرحله دوم استفاده شد.

در این مرحله نیز هر یک از آغازگرهای غیراختصاصی به‌طور جداگانه با آغازگر اختصاصی دوم (TR2) استفاده شد. در این مرحله آغازگرهای غیراختصاصی با حجم یک برابر بیشتر نسبت به آغازگر اختصاصی توالی استفاده شد. غلظت و مقدار سایر اجزای واکنش مشابه TAIL-PCR اول بود. شرایط دمایی مورد استفاده شامل واسرشت‌سازی اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت چهار دقیقه، ۲۸ چرخه شامل دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد یه مدت دو دقیقه، ۱٦ چرخه شامل ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال ۲۹ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه و بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه بود.

در سومین واکنش تکثیر، برای تهیه DNA الگو محصول واکنش مرحله دوم TAIL-PCR به نسبت ۱:۵ رقیق و مورد استفاده قرار گرفت. در این مرحله نیز هر یک از آغازگرهای غیراختصاصی به‌طور جداگانه با آغازگر اختصاصی سوم (TR3) به‌کار برده شد. در این مرحله برخلاف دو مرحله قبلی آغازگرهای غیراختصاصی با حجم برابر با آغازگرهای اختصاصی استفاده شد و غلظت و مقدار اجزای واکنش مشابه TAIL-PCR دوم بود. شرایط دمایی مورد استفاده شامل واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت چهار دقیقه، ۲۰ چرخه شامل دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال ۳۹ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه و بسط نهایی به مدت پنج دقیقه بود.

برای جداسازی و تخلیص باند مورد نظر، ابتدا مقدار زیادی از محصول PCR (٦۰ میکرولیتر) روی ژل آگارز ۱/۵ درصد لود و الکتروفورز در ولتاژ ۸۰ میلی‌آمپر انجام گرفت. بعد از اینکه باند مورد نظر به حد کافی ران شد، زیر نور UV تشخیص و برش داده شد. سپس تخلیص محصول PCR به‌وسیله کیت QIAquick Gel Extraction kit (کیاژن، آمریکا) انجام و برای توالی‌یابی به شرکت بایونیر کره جنوبی ارسال شد. توالی‌یابی در هر دو جهت و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و تصادفی انجام گرفت. توالی رفت و برگشت قطعه توالی‌یابی شده با استفاده از نرم‌افزار Fast PCR ترکیب و بعد از شناسایی نقاط مشترک براساس جایگاه آغازگرهای اختصاصی و تصادفی، توالی بازسازی شده برای آنالیزهای بیوانفورماتیکی استفاده شد. هم‌ردیفی توالی بازسازی شده با ژن $C_4H$ جهت اطمینان از صحت باند توالی‌یابی شده انجام گرفت. بعد از اطمینان از صحت توالی، شناسایی پروموتر با استفاده از نرم‌افزارهای Softberry و Neural network promoter prediction انجام گرفت. سپس برای جستجوی موتیف‌های عملکردی مهم در توالی از نرم‌افزارهای آنلاین PLANTCARE و PLACE استفاده شد.

## نتایج و بحث

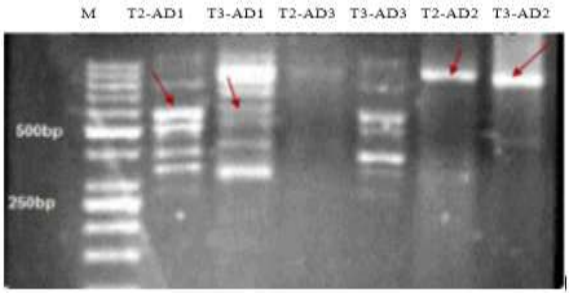
واکنش PCR در سه مرحله جداگانه با استفاده از پرایمرهای اختصاصی به‌عنوان برگشت و پرایمرهای تصادفی به‌عنوان رفت انجام گرفت. محصولات حاصل از تکثیر در هر واکنش بر روی ژل آگارز ۱/۵درصد تفکیک شد. ابتدا محصول TAIL-PCR بر روی ژل آگارز به‌صورت اسمیر دیده شد که یکی از معایب این روش می‌باشد. دلیل ایجاد اسمیر در این روش طول کوتاه و غیر



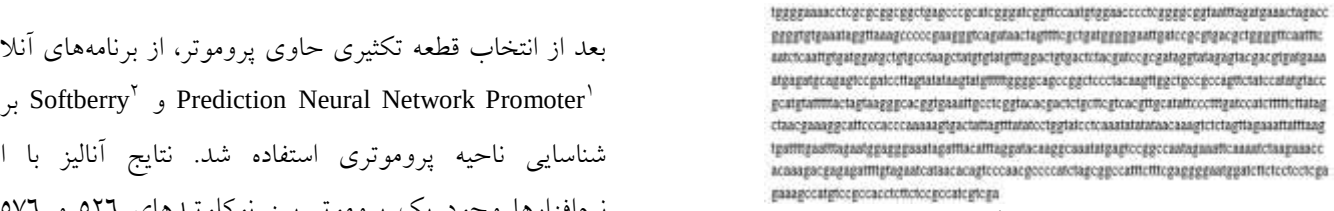
[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19 ]

[ DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.3.1.3 ]

اختصاصی بودن آغازگرهای تصادفی و تکثیر بیش از حد محصول است. برای رفع این مشکل و حذف اسمیر، تعداد آغازگرهای تصادفی افزایش داده شد و دمای اتصال آغازگرها در چرخه‌های TAIL-PCR افزایش یافت. ترکیب سه نوع آغازگر اختصاصی به‌همراه شش نوع آغازگر تصادفی (مجموعاً ۱۸ نوع ترکیب آغازگری) باعث تولید باندهای متعددی در چرخه‌های PCR شد که مشاهده باند حاصل از واکنش اول (TR1 به‌همراه آغازگرهای تصادفی) به‌دلیل میزان تکثیر پایین محسوس نبود. آغازگرهای اختصاصی TR2 وTR3 با فاصله ٤٥ نوکلئوتیدی از هم روی توالی ژن طراحی شده بودند و از بین ترکیبات آغازگری مورد استفاده برای TAIL-PCR، محصولات حاصل از ترکیب آغازگری TR2 و TR3 با آغازگرهای غیراختصاصی AD1 و AD2 نشان‌دهنده این فاصله بودند (شکل ۱). در واقع این تفاوت ٤٥ جفت نوکلئوتیدی مشاهده شده بین باندهای حاصل از ترکیبات آغازگری مذکور نشانگر تکثیر احتمالی پروموتر مورد نظر بود بنابراین دو باند مربوط به ترکیبات آغازگری TR3-AD1 و TR3-AD2 توالی‌یابی شد (شکل ۲ و ۳).




شکل۱- محصولات حاصل از مراحل دوم و سوم TAIL-PCR ناحیه ′۵ ژن سینامات ٤-هیدروکسیلاز (*C4H*) ریحان، TR2 و TR3: آغازگرهای اختصاصی ژن، AD: آغازگر تصادفی



شکل۲- توالی باند تکثیر شده با ترکیب آغازگری TR3-AD2 با اندازه ۷۹٤ جفت نوکلئوتید



شکل۳- توالی باند تکثیر شده با ترکیب آغازگری TR3-AD1 با اندازه ۷۳۰ جفت نوکلئوتید

با توجه به اینکه آغازگر TR3، ٥٦ نوکلئوتید از ابتدای ′۵ ژن *C4H* فاصله داشت بنابراین برای اطمینان از انتخاب صحیح یکی از دو قطعه توالی‌یابی شده، BLAST این دو توالی در برابر ناحیه بین آغازگر TR3 تا ابتدای ′۵ ژن *C4H* انجام گرفت. با توجه به نتایج BLAST مشاهده شد که بین بخشی از قطعه تکثیر شده با ترکیب آغازگری TR3-AD2 و ناحیه فوق‌الذکر، ۸۵ درصد شباهت وجود دارد (شکل ٤) در حالی‌که درصد تشابه در همین ناحیه بین قطعه تکثیر شده با ترکیب آغازگری TR3-AD1 و ناحیه بین آغازگر TR3 تا ابتدای ′۵ ژن *C4H*، ٤٦ درصد بود بنابراین از توالی قطعه تکثیر شده با ترکیب آغازگری TR3-AD2 برای تشخیص پروموتر و دیگر آنالیزهای بیوانفورماتیکی استفاده شد.



شکل٤- BLAST توالی بین آغازگر TR3 و ابتدای ′۵ ژن *C4H* در برابر توالیهای قطعات تکثیری با ترکیب آغازگری TR3-AD2 (بالا) و TR3-AD1 (پایین)

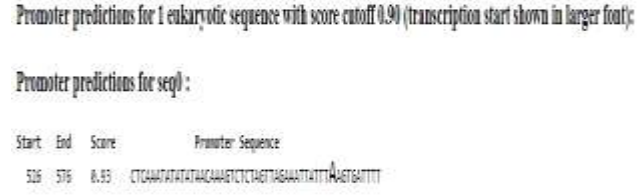
بعد از انتخاب قطعه تکثیری حاوی پروموتر، از برنامه‌های آنلاین Prediction Neural Network Promoter[1] و Softberry[2] برای شناسایی ناحیه پروموتری استفاده شد. نتایج آنالیز با این نرم‌افزارها وجود یک پروموتر بین نوکلوتیدهای ٥٢٦ و ٥٧٦ با احتمال ۹۳ درصد را تأیید کرد (شکل ۵). جایگاه آغاز رونویسی

[1] http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html
http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html



[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.3.1.3 ]

که توسط این برنامه‌ها شناسایی شد ۱۷۰ نوکلئوتید بالاتر از کدون آغاز ترجمه قرار دارد (شکل ٦). این توالی همان ناحیه 5′ UTR است که به پروتئین ترجمه نمی‌شود ولی نقش بسیار مهمی در پایداری و حفاظت mRNA از اگزونوکلئازها و نیز شروع ترجمه به‌عهده دارد.




شکل ٥- آنالیز اولیه توالی قطعه حاوی پروموتر با برنامه Neural Network Promoter Prediction به‌منظور شناسایی پروموتر در ناحیه ′٥ ژن $C_4H$



شکل ٦- توالی پروموتر شناسایی شده ژن $C_4H$ ریحان، TR3: آغازگر اختصاصی، ATG: کدون آغاز و A: جایگاه آغاز رونویسی

در مرحله بعد برای آنالیزهای بیوانفورماتیکی و شناسایی موتیف‌های عملکردی (جدول ۲) در توالی پروموتر شناسایی شده از برنامه‌های PlantCARE[1] و PLACE[2] استفاده شد.

هر یک از این موتیف‌ها فاکتورهای مهمی هستند که در تنظیم رونویسی و بیان ژن‌ها تحت شرایط محیطی مختلف و در پاسخ به فرآیندهای بیولوژیکی متفاوت مثل پاسخ به هورمون‌ها، فرآیندهای نموی و تنش‌های زنده و غیر زنده دخالت دارند. در سازمان‌دهی ژنی، ناحیه رونویسی در پایین‌دست کدون آغاز قرار دارد و عناصر تنظیمی ( شامل موتیف های عملکردی پروموتر) در بالادست کدون آغاز قرار دارد. شماره‌گذاری نوکلئوتیدی این ناحیه بدین‌صورت است که اولین نوکلئوتید رونویسی شده با علامت ۱+ نام‌گذاری شده و اعداد به‌ترتیب بعد ازآن ناحیه افزایش می‌یابد. موقعیت صفر وجود ندارد و نواحی قبل از این ناحیه با اعداد منفی نمایش داده می‌شوند. در توالی پروموتری شناسایی شده در این تحقیق، ناحیه TATA box در منطقه ۳۵- قرار داشت و موتیف CAAT box در نواحی ۱۵۸- (رشته آنتی‌سنس)، ۳۷۹- و ۳۹۱- قرار داشت. ناحیه شروع رونویسی ۱۷۰ نوکلئوتید بالادست کدون آغاز قرار دارد. توالی بین کدون آغاز و نقطه ۱+ تحت عنوان ناحیه ترجمه نشدنی′٥ (5′UTR) نامیده می‌شود که نقش مهمی در محافظت mRNA از اگزونوکلئازها و نیز در شروع ترجمه بر عهده دارد.

جدول ۲- موتیف‌های مهم شناسایی شده در پروموتر ژن $C_4H$ ریحان و عملکرد آن‌ها

| نام موتیف | عملکرد |
|---|---|
| TATA Box | عنصر پایه ای در اغلب پروموتر های یوکاریوتی |
| CAAT Box | عنصر پایه ای در اغلب پروموتر های یوکاریوتی |
| G Box | توالی تنظیمی پاسخ به نور |
| GATA Box | عوامل پاسخ به نور |
| CCAAT Box | پاسخ به شوک حرارتی |
| ABRE | پاسخ به هورمون هایی مانند آبسیزیک اسید |
| I Box | پاسخ به نور |
| W Box | مسئول پاسخ به محرک های قارچی |
| HSE | پاسخ به شوک حرارتی |
| MBS | عوامل تنظیمی در زمان خشکی |
| DOFCOREZM | پاسخ به تنش‌های زیستی و غیر زیستی |

موتیف‌های TATA box و CAAT box توالی‌های کاملاً شناخته‌شده‌ای هستند که در اکثر پروموترهای ژن‌های یوکاریوتی وجود دارند. این موتیف‌ها در شروع رونویسی نقش عمده‌ای دارند. بدین صورت که آنزیم RNA پلیمراز II از طریق فاکتور سیگمای خود توالی CAAT box را شناسایی کرده و بعد از شناسایی پروموتر توسط آنزیم، باز شدن دو رشته DNA در ناحیه TATA box صورت گرفته و بدین ترتیب کمپلکس باز رونویسی تشکیل می‌شود (Smale and Kandonaga 2003). یکی از موتیف‌های مهم که در توالی این پروموتر شناسایی شد، G box است که یک موتیف با توالی حفاظت‌شده در اکثر پروموترهای ژن‌های گیاهی می‌باشد (Menkens et al. 1995). این توالی اولین توالی تنظیمی شناسایی‌شده در پاسخ به نور است. این موتیف و موتیف ABRE در شروع پاسخ به یک سری از هورمون‌های گیاهی مهم نظیر آبسیزیک اسید نقش دارند. آبسیزیک اسید به‌عنوان یک مولکول پیام‌رسان مهم در پاسخ به تنش‌های خشکی

[1] http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE



[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.3.1.3 ]

و سایر تنش‌های محیطی نقش دارد. در ریحان گزارش شد که تنش خشکی روی بیان ژن سینامات ٤-هیدروکسیلاز (*C4H*) تأثیر گذاشته و آن را کاهش می‌دهد (Abdollahi Mandoulakani et al. 2017). وجود موتیف‌های تنظیمی GT1 و GATAbox در پروموتر ژن *C4H* که از عوامل پاسخ به نور هستند تأییدکننده اهمیت نور در افزایش بیان ژن *C4H* است (Ko and Engel 1993). نور یک فاکتور ضروری برای رشد گیاهان است و نه‌تنها به‌عنوان یک منبع برای تولید انرژی است بلکه به‌عنوان یک محرک فرآیندهای رشدی و متابولیکی زیادی را نیز تنظیم می‌کند. توالی تنظیمی I box که توسط برنامه Plant CARE در پروموتر ژن *C4H* شناسایی شد، در بالادست ژن‌های پاسخ به نور قرار داشته و در تنظیم بیان این دسته از ژن‌ها دخالت دارد (Giuliano et al. 1988). همچنین توالی تنظیمی CCAAT box که یکی از توالی‌های مهم پاسخ به شوک حرارتی است در پروموتر ژن *C4H* شناسایی شد. حضور نواحی تنظیمی HSE و CCAAT box تأییدکننده این موضوع است که بیان ژن *C4H* تحت تأثیر تغییرات دمایی قرار دارد. همچنین در ریحان گزارش شد که بیان ژن *C4H* در ریحان تحت تیمار سرمایی ٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ساعت نسبت به شاهد افزایش می‌یابد (Rezaie et al. 2020). چندین ناحیه تنظیمی به‌نام DOFCOREZM نیز در توالی پروموتر شناسایی شد که محل اتصال پروتئین‌های تنظیمی DOF می‌باشد. DOF یک فاکتور رونویسی در گیاهان می‌باشد که دمین اتصال به DNA آن دارای حفاظت‌شدگی بالا و شامل سیستئین $C_2C_2$ است که قادر به تشکیل یک حلقه به‌همراه اتم Zn می‌باشد. این فاکتورهای رونویسی برای اولین بار از برگ ذرت جدا شده و منحصراً در گیاهان یافت می‌شوند و نقش بسیار مهمی در متابولیسم کربن، رشد دانه یا جوانه‌زنی و پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی دارد (Yanagisawa and Schmidt 1999). همچنین چندین ناحیه W box نیز در این تحقیق در پروموتر ژن *C4H* مشخص شد. این ناحیه جایگاه اتصال اصلی برای فاکتورهای رونویسی متعلق به خانواده WRKY است. ساختار دمین[1] WRKY شامل چهار صفحه بتا[2] است که در آن‌ها اسید آمینه‌های حفظ شده سیستئین و هیستیدین در ساختار انگشت روی قرار دارند (Yamasaki et al. 2005). توالی آمینو اسیدی WRKYGQK موجب برآمدگی سطح پروتئین شده و توانایی پروتئین را در اتصال به شیارهای DNA افزایش می‌دهد. عوامل رونویسی WRKY توالی حفاظت شده W (TTGACC/T) را به‌عنوان علامت موجود در پروموتر شناسایی کرده و موجب تنظیم بیان ژن می‌شوند. ویژگی خاص عوامل رونویسی WRKY در اتصال به DNA وجود پهنه تقریباً غیرقابل تغییر WRKY در انتهای آمینی پروتئین است. این فاکتورهای رونویسی در تنظیم اعمال مختلف گیاه نقش ایفا می‌کنند. این موتیف در کنترل بیان ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز ترکیبات ثانویه در گیاهان دارویی اهمیت زیادی دارند (Rushton et al. 2010). همچنین توالی تنظیمی MBS نیز در این پروموتر شناسایی شد که مهم‌ترین جایگاه اتصال فاکتورهای رونویسی نوع MYB است. فاکتورهای رونویسی دخیل در پاسخ به تنش‌های محیطی MYB پروتئین‌هایی مشتمل بر یک، دو یا سه توالی تکراری ناقص (۵۱-۵۳ آمینو اسید) در دامنه اتصال به DNA هستند. این عوامل تنظیمی در زمان بروز تنش خشکی فعال می‌شوند و بیان ژن *C4H* را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Ling et al. 2005). مقایسه بین موتیف‌های عملکردی واقع در ناحیه پروموتر ژن‌های *C4H* و *CVOMT* مشخص کرد که علاوه بر دو ناحیه TATA box و CAAT box که در اغلب پروموترهای یوکاریوتی وجود دارد، سه موتیف W box، HSE و MBS بین آن‌ها مشترک بود که به‌ترتیب در پاسخ به محرک‌های قارچی و شوک حرارتی و عوامل تنظیمی در زمان تنش خشکی نقش دارند (khakdan et al. 2017). در نهایت بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق پیشنهاد می‌شود عملکرد این پروموتر از طریق انتقال ژن و مهندسی ژنتیک بررسی شود. همچنین موتیف‌های تنظیمی شناسایی شده در این تحقیق با موتیف‌های شناسایی شده در پروموتر سایر ژن‌های درگیر در بیوسنتز فنیل پروپانوئیدها از نظر موقعیت و تعداد مقایسه و نقش دقیق موتیف‌های عملکردی مانند W box و HSE نیز مورد مطالعه قرار گیرد.

[1] Domain
[2] b- sheet



[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.3.1.3 ]

## منابع


Abdollahi Mnadoulakani B, Eyvazpour E, Ghadimzadeh M (2017) The effect of drought stress on the expression of key genes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids and essential oil components in basil (*Ocimum basilicum* L.). Phytochemistry 139:1-7.

Achnine L, Blancaflor E, Rasmussen S, Dixon R (2004) Colocalization of L phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-Hydroxylase for metabolic channeling in phenylpropanoid biosynthesis. The Plant Cell 16: 90-98.

Boude A (2007) Evolution and current status of research in phenolic compounds. Phytochemistry 68:22-35.

Chupani A, Bagheri KH, Maleki Zanjani B (2015) Isolation of the beta-phageolin promoter from *phaseolus vulgaris* and its cloning in the expression vector .International conference on sustainable development, strategies and challenges with a focus on Agriculture, Natural Resources, Environment and Tourism. Tabriz, Iran (In Farsi).

Cochrane F, Davin L, Lewis N (2004) The arabidopsis phenylalanin amonia lyase gene Family: kinetic characterization of the four PAL isoforms. Phytochemistry 65:57-64.

Cunha N, Araújo A, Leite A, Murad A, Vianna G, Rech E (2010) Correct targeting of proinsulin in protein storage vacuoles of transgenic soybean seeds. Genetics and Molecular Research 9:63-70.

DE MASI L, Siviero P, Esposito C, Castaldo D, Siano, F, Laratta B (2006) Assessment of Agronomic, chemical and genetic variability in common basil (*Ocimum basilicum* L.*)*. European Food Research and Technology 223:273-281.

Giuliano G, Pichersky E, Malik V, Timko M, Scolnik P, Cashmore A (1988) An evolutionarily conserved protein binding sequence upstream of a plant light-regulated gene. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 85:7089-7093.

Iijima Y, Davidovich-Rikanati R, Fridman E, Gang D, Bar E, Lewinsohn E, Pichersky E (2004) The biochemical and molecular basis for the divergent in the biosynthesis of terpenes and phenylpropenes in the peltate gland of three cultivars of basil. Plant Physiology 136:24-36.

Khakdan F, Shahryari F, Ranjbar M, Bagheri A, Alizadeh H (2017) Study of gene expression pattern of chavicol O-methyl transferase gene (*CVOMT*s), sequencing and characterization of promoter of *CVOMTs* gene of basil (*Ocimum basilicum l.*) under water deficit stress .Modern Genetics Journal 12:1-10 (In Farsi).

Kim S, Chang J, Kim S (2008) Tissue specificity and developmental pattern of Amorpha-4, 11-diene synthase (ADS) proved by ADS promoter-driven GUS expression in the heterologous plant, *Arabidopsis thaliana*. Planta Medica 74:188.

Ko L, Engel J (1993) DNA-binding specificities of the GATA transcription factor family. Molecular and Cellular Biology 13:11-22.

Labra M, Miele M, Ledda B, Grassi F, Mazzei M, Sala F (2004) Morphological Characterization essantial oil composition and DNA genotyping of *Ocimum basilicum* L. cultivars. Plant Science 167:25-31.

Liang Y, Dubos C, Dodd I, .Holroyd G, Hetherington A, Campbell M (2005) AtMYB61, an R2R3-MYB Transcription Factor Controlling Stomatal Aperture in *Arabidopsis thaliana*. Current Biology 15:1201-1206.

Liu S, Hu Y, Wang X, Han L, Song S, Cheng H, Lin Z (2009) Isolation and characterization of a gene encoding cinnamate 4-hydroxylase from *Parthenocissus henryana*. Molecular Biology Reports 36:5-10.

Menkens A, Schindler U, Cashmore A (1995) The G-box: a ubiquitous regulatory DNA element in plant bound by the GBF family of bZIP proteins. Trends in Biochemical Science 20:506-510.

Omidbaigi R. Production and Processing of medicinal plants. Astan'e Qods'e Razavi publication. Vol 3. Tehran-Iran, 2008-397 (In Farsi).

Rezaie, R, Abdollahi Mandoulakani B, Fattahi M (2020) Cold stress changes antioxidant defense system, phenylpropanoid contents and expression of genes involved in their biosynthesis in *Ocimum basilicum* L. Scientific Reports 10:5290 (In Farsi).

Rushton P, Smossich I, Ringler P, Shen Q (2010) WRKY transcription factors. Trends in Plant Science 15:247-258.

Smale S, Kadonaga T (2003) The RNA polymerase II core promoter. Annual review of Biochemistry 72:49-79.

Sangwan N, Farooqi A, Shabih F, Sangwan R (2001) Regulation of essential oil production in plants. Plant Growth Regulation 34:3-21.

Telci I, Bayram E, Yılmaz G, Avc B (2006) Variability in essential oil composition of turkish basils (*Ocimum basilicum* L.). Biochemical Systematics and Ecology 34:89-97.

Wang H, Olofsson L, Lundgren A, Brodelius PE (2011) Trichome-Specific Expression of Amorpha-4, 11-Diene Synthase, a Key Enzyme of Artemisinin Biosynthesis in *Artemisia annua L*., as Reported by a Promoter-GUS Fusion. American Journal of Plant Sciences 2:619-628.

Yamasaki K, Kigawa T, Inoue M, Tateno M, Yamasaki T, Yabuki T, Aoki M, Seki E, Matsuda T, Tomo Y, Hayami N, Terada T, Shirouzu M, Tanaka A, Seki M, Shinozaki K, Yokoyama Sh (2005) Solution structure of an Arabidopsis WRKY DNA binding domain. Plant Cell 17:44-56.

Yanagisawa S, Schmidt R (1999). Diversity and similarity among recognition sequences of Dof transcription factors. The Plant Journal 17:9-14.

Zieai M, Sharifi M, Tahsili J, NaghdiBadi H (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 (In Farsi).

Ziaei M, Sharifi M, Behmanesh M, Razavi K (2012) Gene expression and activity of phenyl alanine amonialyase and essential oil composition of *Ocimum basilicum L*. at different growth stages. Iranian Journal Biotechnology 10:32-39.




[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19 ]

[ DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.3.1.3 ]