شناسایی SNPها در نواحی اگزونی واینترونی ژن‌های لینالول سینتاز و ژرماکرین D سینتاز در گیاه ریحان

سمانه علیاری[۱]، بابک عبدالهی مندولکانی[۱،۲*] و ایرج برنوسی[۱،۲]

۱ ایران، ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده کشاورزی، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی

۲ ایران، ارومیه، دانشگاه ارومیه، پژوهشکده زیست فناوری، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی

تاریخ دریافت: ۹۷/۴/۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۰/۲۵

چکیده

ریحان (*Ocimum basillicum* L.) از مهم‌ترین گیاهان دارویی حاوی ترکیبات ترپنوئیدی ازجمله مونوترپن و سزکوئی‌ترپن‌ها می‌باشد. ژن‌های لینالول سینتاز و ژرماکرین D سینتاز از ژن‌های کلیدی دخیل در سنتز ترپن‌ها می‌باشند. در مطالعه حاضر به‌منظور شناسایی SNPها دراین دو ژن در ۵ توده مختلف ریحان از نشانگرهای CAPS و توالی‌یابی استفاده شد. قطعاتی به‌اندازه ۶۰۰ و ۵۸۳ جفت باز از نواحی کد کننده این دو ژن تکثیر و با آنزیم‌های برشی *Pst1* و *MseI* هضم شد. بعد از توالی-یابی و بازیابی قطعه تکثیری هر ژن، شناسایی SNPها با استفاده از هم‌ردیفی توالی‌های هر ژن در افراد مختلف انجام گرفت. از نه SNPشناسایی شده در ژن لینالول سینتاز، به ترتیب چهار و پنج SNP در ناحیه اینترون و اگزون مشاهده شد. از کل SNPهای شناسایی شده دراین ژن، ۷۷/۸ درصد آنها از نوع هم‌جنس با فراوانی ۴۴/۴ درصد A/G و ۳۳/۳ درصد T/C و ۲۲/۲ درصد آنها از نوع ناهم‌جنس با فراوانی یکسان ناشی از تبدیلات C/G و C/A بود. از ۲۸ SNP شناسایی شده در ژن ژرماکرین D سینتاز، هفت SNP در ناحیه اگزون و ۲۱ SNP در ناحیه اینترون شناسایی شد که ۶۷/۸ درصد آنها از نوع هم‌جنس با فراوانی ۳۵/۷ درصد G/A و ۳۲/۱ درصد C/T و ۳۲/۱ درصد آنها از نوع ناهم‌جنس با فراوانی ۷/۱ درصد T/A، ۱۴/۳ درصد G/C و ۱۰/۷ درصد C/A بود. نتایج هم‌ردیفی توالی ژن‌ها بین افراد نشان داد که بیشترین جهش در ژن‌های لینالول سینتاز و ژرماکرین D سینتاز از نوع تبدیل بازهای هم‌جنس A/G و T/C می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: ریحان، لینالول سینتاز، ژرماکرین D سینتاز، SNP

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۴۴۳۱۹۴۲۴۸۲ ، پست الکترونیکی: b.abdollahi@urmia.ac.ir

مقدمه

ریحان (*Ocimum basilicum* L.) یکی از گیاهان مهم متعلق به خانواده نعناعیان (Lamiaceae) است. این گیاه بومی ایران، هند و مناطق گرم آفریقا هست (۱۶). اسانس ریحان غنی از ترکیبات فنولی است که در صنایع داروسازی و عطرسازی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۶). ریحان همانند سایر گیاهان خانواده نعناع منبع ترکیبات حلقوی و اسانس است که دافع حشرات بوده و عملکرد ضدانگلی، ضدباکتریایی، ضدقارچی و آنتی‌اکسیدانتی آن به خاطر وجود ترپنوئیدها می‌باشد که به‌طور عمده در بذر، ساقه و گل‌آذین تجمع می‌یابند (۱). گیاهان گروه بزرگ و متنوعی از ترکیبات آلی به نام متابولیت‌های ثانویه را تولید می‌کنند (۱۵). ترپنوئیدها بزرگترین و وسیع‌ترین گروه از متابولیت‌های ثانویه هستند که دارای بیش از ۲۰ هزار ترکیب شناخته شده می‌باشند. مونوترپن‌ها و سزکوئی‌ترپن-ها از ترکیبات اصلی ترپنوئیدها می‌باشند که از یک ساختار۱۰ و ۱۵ کربنی تشکیل شده‌اند که گروه‌های عاملی

گوناگونی بر اساس نوع ترکیب به این ساختارها افزوده می‌شود (۱۴). مونوترپن‌ها گروه بزرگی از ترپنوئیدها هستند که نقش‌های اکولوژیکی فراوانی را در گیاهان ایفا می‌کنند. این ترکیبات نقش مهمی در حفاظت گیاهان در برابر آفات گیاه‌خوار و بیماری‌ها، جلب گرده‌افشان‌ها، حشرات پراکنده بذر، ساختار غشاء، واکنش‌های اکسایشی، بازدارنده نوری، حفاظت نوری و تنظیم رشد و نمو بر عهده دارند (۲و ۱۸). لینالول به‌عنوان مهمترین مونوترپن، عمدتاً از مسیر غیرموالونات مشتق می‌شود. همچنین سزکوئی‌ترپن‌های با ارزش دارویی در ریحان شامل ژرماکرین D و گاما کادنین توسط مسیر موالونات در سیتوزول ساخته می‌شوند (۷). مطالعه ژن‌های دخیل در بیوسنتز این ترکیبات و بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های گیاهی به‌منظور تلاش برای بهبود تولید این ترکیبات ارزشمند در ریحان بسیار مهم است و ازنظر تجاری سودآور خواهد بود (۲۱).

در اصلاح نبات سنتی، تنوع ژنتیکی اغلب براساس صفات ظاهری مشخص می‌شود. امروزه با پیشرفت نشانگرهای مولکولی در بسیاری از محصولات زراعی، شناسایی تنوع ژنتیکی در سطح مولکولی و بر اساس تفاوت موجود در DNA و همچنین اثر آن بر صفات فنوتیپی نیز امکان‌پذیر است. نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA ازجمله ابزارهای قدرتمند تشخیصی هستند که نه‌تنها برای شناسایی چندشکلی در سطح ژنوم بلکه در ارتباط با ژن‌ها و مکان‌های ژنتیکی خاص نیز مورد استفاده قرار می‌گیرند. همچنین در حوزه ژنتیک و به‌نژادی، اطلاع از ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها، پیش‌نیاز حفظ ذخایر ژنتیکی و برنامه-ریزی طرح‌های اصلاح نژاد می‌باشد. استفاده از نشانگرهای مولکولی دراین زمینه یکی از بهترین راهکارها محسوب می‌شود، زیرا باتوجه به اطلاعات زیادی که به دست می‌دهد می‌تواند نتایجی که از تجزیه‌وتحلیل رکوردها با روش‌های آماری حاصل‌شده را تأیید و تکمیل نماید (۳). همچنین با نشانگرهای مولکولی می‌توان ژنوتیپ افراد را در مکان‌ها و جایگاه‌های ژنتیکی خاص تعیین نمود (۱۳) و در انتخاب و اصلاح نژاد ممکن است به‌طور مهیجی پیشرفت ژنتیکی را تسریع کند (۹). مطالعه تنوع ژنتیکی نژادهای بومی برای حفاظت از منابع ژنتیکی ذخایر بومی لازم و ضروری است (۱۲) و باید بر اساس دانش عمیقی از منابع ژنتیکی نژادهای خاص باشد، لذا تلاش برای شناسایی و تعیین خصوصیات ژنتیکی نژادهای بومی و محلی بسیار اهمیت دارد (۲۰ و۲۱). نشانگرهای SNP (Single nucleotide polymorphism) چندشکلی مبتنی بر تفاوت در یک نوکلئوتید است که منبع ژنتیکی عمده‌ای از تغییرات فنوتیپی درون یک‌گونه می‌باشد. این نشانگرها هم بارز و دو آللی می‌باشند و کارآیی بالای آنها به دلیل فراوانی زیاد و حضور در تمامی نواحی ژنوم (اینترون‌ها و اگزون‌ها) می‌باشد. هر فرد متعلق به یک‌گونه، دارای هزاران SNP می‌باشد که به علت پایداری بیشتر، موتاسیون کمتر و وجود آنها در بیشتر نقاط ژنوم به‌عنوان نشانگرهای ژنتیکی مهم و قابل‌اعتماد محسوب می‌شوند (۸و ۱۱). بنابراین به دلیل اهمیت گیاه دارویی ریحان و نقش کلیدی دو ژن لینالول سینتاز (*LIS*) و ژرماکرین *D* سینتاز (*GDS*) به ترتیب در مسیر بیوسنتز مونوترپن‌ها وسزکوئی‌ترپن‌ها و همچنین کارایی نشانگرهای SNP، تحقیقی به‌منظور شناسایی SNPها در ژن‌های مذکور در توده‌های مختلف *O. basilicum* و استفاده از نشانگرهای مبتنی بر این SNPها برای تمایز و تفکیک ژنوتیپ‌ها و توده‌های مختلف ریحان انجام شد.

مواد و روشها

دراین تحقیق۶۰ فرد از ۵ توده ریحان (۱۲ فرد از هر توده) که از مناطق مختلف ایران جمع‌آوری‌شده بود استفاده گردید (جدول۱). بذور توده‌های ریحان جهت استخراج DNAدر پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه ارومیه کشت شد. برای کشت بذور از پیت ماس و گلدان‌هایی با اندازه مناسب استفاده شد. از زمان جوانه‌زنی بذر تا رسیدن به

مرحله نمونه‌برداری، به فاصله هر ۲ روز یک‌بار آبیاری به‌صورت مرتب انجام گرفت و بعد از رسیدن گیاه به مرحله ۴-۸ برگی، نمونه‌برداری از برگ‌های تک بوته‌های هر جمعیت به‌صورت مجزا برای استخراج DNA انجام شد. نمونه‌های برگی درون نیتروژن مایع به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شد.

جدول ۱- محل جمع‌آوری و موقعیت جغرافیایی توده‌های ریحان

کد توده	محل جمع‌آوری	ارتفاع از سطح دریا	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی	رنگ برگ
۱	بیرجند	۱۴۹۱	۳۲-۵۲	۵۹-۱۳	سبز
۲	همدان	۱۸۲۴	۴۸-۳۴	۳۶-۴۶	سبز
۳	کرمانشاه ۱	۱۳۸۹	۴۷-۰۳	۳۴-۲۳	بنفش
۴	ری	۱۱۰۰	۳۵-۷	۵۱-۴	بنفش
۵	قم	۹۲۸	۵۰-۵۶	۳۴-۴۹	بنفش

استخراج DNA ژنومی: DNA ژنومی از برگ‌های جوان و سبز گیاه ریحان به روش CTAB استخـراج شد (۶). به‌منظور بررسی کیفیت و کمیت DNA از الکتروفورز ژل آگارز یک درصد و اسپکتوفتومتری استفاده شد.

طراحی آغازگر: ابتدا توالی ناحیه کد کننده ژن‌های لینالول سینتاز و ژرماکرن D سینتاز در ریحان با استفاده از بانک اطلاعاتی NCBI تعیین شدند و نواحی اینترونی و اگزونی آنها با استفاده از نرم‌افزار Softberry مشخص شد. ژن لینالول سینتاز دارای دو ناحیه اگزونی (۱-۴۷۳ و ۱۷۲۵- ۵۷۱) و یک ناحیه اینترونی و ژن ژرماکرین D سینتاز دارای یک ناحیه اگزونی (۱-۱۶۴۱) بود. آغازگرها (جدول۲) با نرم‌افزارهای FastPCR و Gene Runner طراحی و ازنظر وجود ساختارهای ثانویه مثل آغازگر- دایمر و ساختارهای سنجاق سری بررسی شدند.

جدول۲- مشخصات آغازگرهای طراحی شده برای تکثیر ژن‌های لینالول سینتاز و ژرماکرین *D* سینتاز در ریحان

ژن	شماره دسترسی	توالی آغازگر	اندازه محصول (جفت باز)	دمای اتصال
LIS	AY693647	GCTTCGTAGTGAGGTGGCGCAA (رفت) GCAATGGAGGGTCAGT (برگشت)	۴۳۴	۶۱
GDS	AY693644	CTTTGGTTAGGTTGGGTGCCAGAA (رفت) TTGGGAGTCTACTTTGAA (برگشت)	۲۳۶	۶۱

**LIS* :Linalool synthase ، *GDS* : Germacrene D synthase

واکنش‌های PCR : برنامه دمایی PCR به‌منظور تکثیر ژن-های مورد مطالعه در ۶۰ فرد، شامل واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، تکرار ۳۵ چرخه شامل ۳۰ ثانیه واسرشته سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۴۰ ثانیه در دمای اتصال بهینه هر آغازگر و ۲ دقیقه برای گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و گسترش نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ سانتی‌گراد بود. محصول واکنش PCR بر روی ژل آگارز ۱/۸درصد الکتروفورز و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید انجام گرفت.

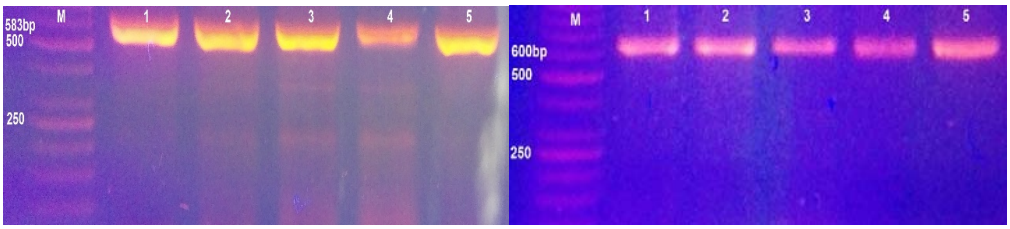
هضم قطعات تکثیر شده ژن‌های مورد مطالعه: الگو برشی و طول قطعات حاصل از برش در ژن‌های مورد مطالعه با استفاده از نرم‌افزار FastPCR پیش‌بینی شد. برش توالی‌های تکثیری هر دو ژن با آنزیم‌های *Pst1* و *Tru1(Mse1)* در افراد مورد مطالعه (۶۰ فرد) چندشکلی تولید نکرد. جهت

آشکارسازی قطعات حاصل از برش از الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد با ولتاژ ۸۰ استفاده شد.

توالی‌یابی: با توجه به این‌که هضم آنزیمی توالی‌های تکثیری دو ژن در افراد مطالعه شده چندشکلی تولید نکرد، بنابراین برای شناسایی نشانگرهای SNP در نواحی کد کننده ژن‌های لینالول سینتاز و ژرماکرین D سینتاز از روش توالی‌یابی استفاده شد. از هرکدام از توده‌های مورد مطالعه یک فرد انتخاب و توالی تکثیری ژن‌های مورد مطالعه در این افراد توالی‌یابی شد. بدین منظور بعد از انجام واکنش PCR، حدود ۸۰ میکرولیتر از محصول PCR هر نمونه روی ژل آگارز ۱/۵ درصد و تحت ولتاژ ۸۵ تفکیک گردید. با مشخص نمودن اندازه محصول روی ژل، باندهای مورد نظر برش داده شد و جهت خالص‌سازی و توالی‌یابی به شرکت تکاپو زیست (تهران، ایران) ارسال گردید. توالی‌یابی از هر دو انتهای قطعات PCR و با استفاده از هر دو آغازگر پیشرو و معکوس که در واکنش PCRاستفاده شده بود انجام گرفت. جهت جلوگیری از اشتباهات توالی‌یابی، هر قطعه سه بار از هر دو جهت توالی‌یابی شده و بعد توالی مورد توافق (Consensus) استخراج گردید. بعد از استخراج توالی دقیق، نواحی مشترک توالی‌های رفت‌وبرگشت هر قطعه شناسایی و توالی نهایی بازیابی شد. در هرکدام از ژن‌ها یک توالی به خاطر کیفیت پایین توالی‌یابی در شناسایی SNPها مورد استفاده قرار نگرفت. برای شناسایی SNPها در هر ژن هم‌ردیفی توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار Clastal Omega انجام گرفت.

نتایج

تکثیر قطعات ژنی و هضم آنزیمی: به‌منظور برسی الگوی برشی آنزیمی و شناسایی تنوع تک نوکلئوتیدی، قطعاتی از نواحی کد کننده این ژن‌ها به طول ۶۰۰ جفت باز از ژن لینالول سینتاز و۵۸۳ جفت باز از ژن ژرماکرین D سینتاز تکثیر شد (شکل ۱).

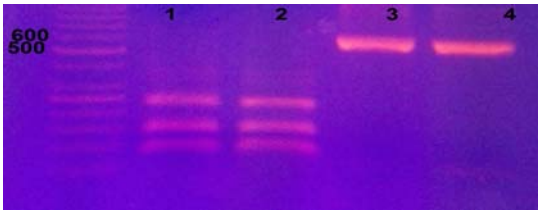


شکل۱- تکثیر ژن‌های لینالول سینتاز (سمت چپ) و ژرما کرین D سینتاز (سمت راست) و تولید قطعاتی به ترتیب به اندازه‌های ۶۰۰ و ۵۸۳ جفت باز در توده‌های مختلف ریحان (چاهک‌ها به ترتیب M: نشانگر 1Kb فرمنتاس، ۱: ری، ۲: همدان،۳: بیرجند، ۴: کرمانشاه، ۵: قم)

سپس قطعات تکثیری ژن لینالول سینتاز با آنزیم*Pst1* هضم شد. پیش‌بینی نواحی برشی این آنزیم در توالی ژن مورد مطالعه با استفاده از نرم‌افزار FastRCR نشان داد که هضم ناحیه اگزونی تکثیر شده ژن لینالول سینتاز با این آنزیم منجر به ایجاد دو قطعه به طول ۱۶۱ و ۳۰۲ جفت باز می‌شود که بعد از برش با این آنزیم چندشکلی در افراد مورد مطالعه مشاهده نگردید. بنابراین، قطعات تکثیری ژن لینالول سینتاز با آنزیم *Mse1* نیز هضم شد. پیش‌بینی نواحی برشی این آنزیم در این ژن با استفاده از نرم‌افزار FastRCR نشان داد که هضم ناحیه تکثیری این ژن با این آنزیم منجر به ایجاد سه قطعه به طول ۱۷۰، ۹۵ و ۲۱۵ جفت باز می‌شود. البته هضم توالی تکثیری این ژن با این آنزیم نیز در بین افراد مورد مطالعه چندشکلی ایجاد نکرد (شکل ۲).

بررسی نواحی برشی آنزیم *Pst1* در توالی ژن ژرماکرین D سینتاز با استفاده از نرم‌افزار FastPCR نشان داد که هضم ناحیه کد کننده این ژن منجر به تولید دو قطعه به طول ۲۲۳ و ۲۴۵ جفت باز می‌شود. برش قطعه تکثیری این ژن

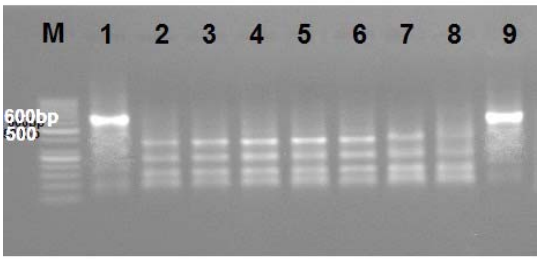
در افراد مورد مطالعه با آنزیم *Pst1* نیز چندشکلی تولید نکرد.



شکل۲- هضم قطعه تکثیری ژن لینالول سینتاز با آنزیم برشی *Mse1*، چاهک‌های ۱ و ۲ برش با آنزیم، و ۳ و ۴ بدون برش، شماره چاهک‌ها به ترتیب، ۱ و ۳: توده کرمانشاه، ۲ و ۴: توده بیرجند (اندازه باندهای نشانگر 1Kb فرمنتاس برحسب جفت باز می‌باشد)

بنابراین قطعه تکثیری ژن ژرماکرین D سینتاز با آنزیم *Mse1* هضم شد. بررسی نواحی برشی این ژن با نرم‌افزار FastPCR بیانگر تولید سه قطعه به طول ۱۱۷، ۱۰۴ و ۳۵۲ جفت باز بود ولی هضم آنزیمی قطعه تکثیری این ژن در افراد مورد مطالعه چهار قطعه تولید کرد که نشانگر وجود یک سایت برشی اضافی برای این آنزیم در توالی این ژن در افراد مطالعه شده می‌باشد. هضم آنزیمی این ژن نیز در افراد مطالعه شده چندشکلی تولید نکرد (شکل۳).

شناسایی نواحی اینترونی در دو ژن لینالول سینتاز و ژرماکرین D سینتاز: به‌منظور بررسی الگوی برشی آنزیمی و شناسایی تنوع تک نوکلئوتیدی، آغازگرها طوری طراحی شده بودند که اندازه محصول PCR در ژن لینالول سینتاز ۴۳۴ جفت باز و در ژرماکرین D سینتاز ۲۳۶ جفت باز باشد اما بعد از تکثیر و الکتروفورز نتایج متفاوتی حاصل گردید طوریکه اندازه محصول تکثیر شده در لینالول سینتاز ۶۰۰ جفت باز و در ژرماکرین D سینتاز ۵۸۳ جفت باز بود (شکل‌های ۲و ۳).



شکل۳- هضم آنزیمی ژن ژرماکرین *D* سینتاز با آنزیم برشی *Mse1*در توده‌های مختلف ریحان (M: نشانگر اندازه 1Kb فرمنتاس، اندازه باندهای نشانگر برحسب جفت باز می‌باشد، چاهک‌های ۱ و ۹ نمونه‌های بدون هضم، چاهک‌های ۲ تا ۸ نمونه‌های هضم شده، ۲ و ۳: کرمانشاه، ۴ و ۵: بیرجند، ۶ و ۷: ری، ۸: همدان)

باتوجه به تفاوت قطعات تکثیری پیش‌بینی شده با قطعات مشاهده شده روی ژل و بررسی توالی قطعات به‌وسیله نرم‌افزار Softberry مشخص شد نواحی اضافی تکثیری مربوطه به یک ناحیه اینترونی به طول۸۰ جفت باز در ژن لینالول سینتاز و یک ناحیه اینترونی به طول ۴۰۰ جفت باز در ژن ژرماکرین D سینتاز می‌باشد (شکل‌های ۴و ۵).

CCCCGGATAATTCAGAGCATCTGAGATGGCGAGGTTGGAAGCCACGACGATTCATCAGAGCAATATGGTGCACAGAGCGACCATCGGGCCAAC
CTTTTGGAGCTCGCAATTTCGGATTATAACCAAGTTCAGTCTCAACACCATTCGGAACTCACTGAAATTACCCGGTTTGGATATGCGATTACTTTA
TAGTCAATTACATGCAATTATAAATGTTTATGATTTAGTATTTGGCGAGATCGGCTCGCTGTGGTGGAAGCAGCTCGGTTTGGTTGAAAACTTGAGTTTTG
GGCGAGACAGACCGTTTCGGTGCTTTTTATGGCCCATGGGGTTCCTCCCGAACCCCAAGTATTCGAGCGTTAGAATAAAATTGGCAAAAACCATTTT
TATTCTGTTAGTGATGGATGACATTTTGGATACCTATGGAAAGATGGATGAATTCTTCTTTTTCACAGATGCAATTGGAAGGTTTCCTTCTGGATC
AACCCCCCAACCTTTCTTCTTACCAAAATAAATGATTATGGTGACGAACAATATCAGCGATAC

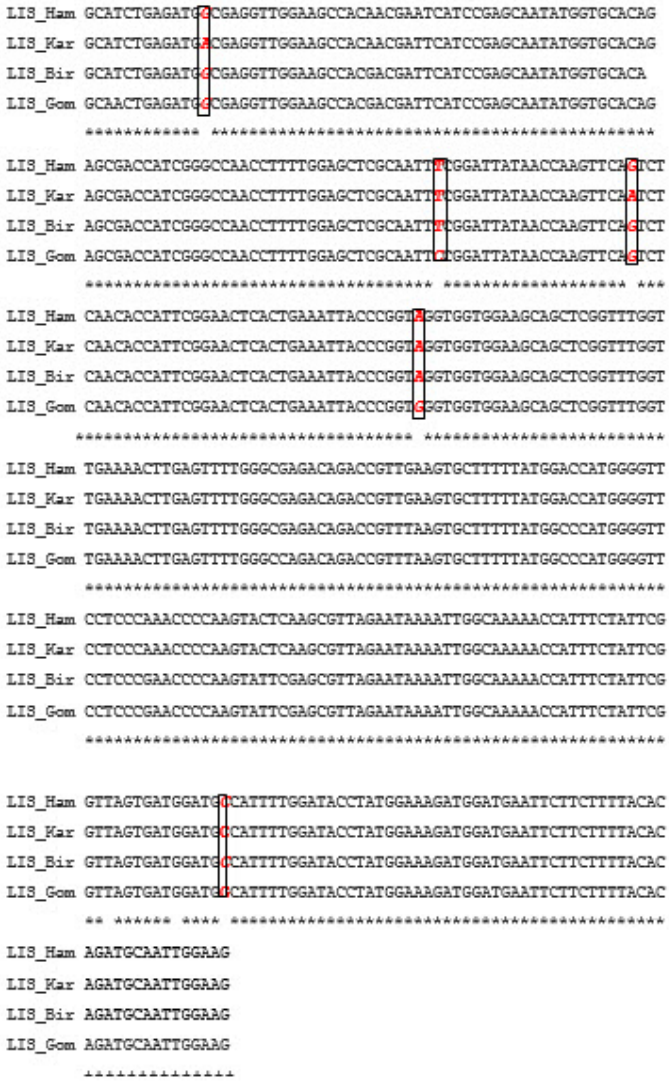
شکل۴- ناحیه اینترونی ۸۰ جفت بازی شناسایی شده در ژن لینالول سینتاز در ریحان

GTGCTTCCTCTATGAGAGACGAGTCACGTGATAGAAGATTTATTAGAAGTTTGCCAAATTGGACTTCAATATATTACAAAAGA
TTCATCAGGAAGAGCTAACCCATATTGCAAGGTTAGCATTGTTAATAATGTTGAGGGAGTAGTACTCTATAGTCTACACATAC
TGTCTCAAGAATCATCCATATTCGACTTTCAATATTTCAAGTAATACTACCAAAATTGATGTCCTGTGAAAAACTTTTCCTTTG
ACTGTGAATTGGATATAAATCTCTTATTTTTCTAAGACGTGATCACAAGGTCTGTCCCCCCTATACGACCCCGAACAGATTTAC
CCGCGTGTCGACCAGCAGAGAAATGTTCCACCGGACGTCATTTTTCCCAGAAAAAACTAAATAACATGACTCTTTTTGTCATT
TTGTACTGACTGGAAAATCTTATAAAAATTTGTGTATAATATATATTTTGTATTTCATAAGTATTTAATGTAGCAAAAATAATA
TGATCATCAATCACTGAATGTAGGTGGTGGAAGGAACTAGACTTTGGAAACAAACTACCATTGCAAGGGATAGAGTCGTGAA
TGCCACAGAG

شکل۵- ناحیه اینترونی ۴۰۰ جفت بازی شناسایی شده در ژن ژرماکرین D سینتاز در ریحان

هم‌ردیفی توالی‌ها و شناسایی SNPها در ژن لینالول سینتاز: به‌منظور شناسایی SNPها در ژن لینالول سینتاز در نواحی اگزونی و اینترونی، هم‌ردیفی بین قطعات توالی‌یابی شده در توده‌های همدان، بیرجند، کرمانشاه و قم انجام گرفت (شکل‌های ۶و ۷). در این هم‌ردیفی جهش مربوط به تغییر بازهای G/A، T/C، C/A و C/G مشاهده گردید که بیشترین جهش در نواحی اگزونی و اینترونی به ترتیب مربوط به تبدیل بازهای G/A و T/C بود (جدول۳).

در ژن لینالول سینتاز از نه SNP شناسایی شده، به ترتیب چهار و پنج SNP در نواحی اینترونی و اگزونی مشاهده شد که ۷۷/۷۸ درصد آنها از نوع هم‌جنس با فراوانی ۴۴/۴۴ درصد A/G و ۳۳/۳۳ درصد T/C و ۲۲/۲۲ درصد جهش ناهم‌جنس با فراوانی یکسان ناشی از تبدیلات C/G و C/A بود. بیشترین جهش‌ها در هر دو ناحیه اگزونی و اینترونی از نوع هم‌جنس (C/Tو A/G) بود. تعداد کم SNPهای شناسایی شده در ناحیه اینترونی در این ژن به خاطر طول کوتاه آن (۸۰ جفت بازی) در مقایسه با طول ناحیه اگزونی (۳۷۴ جفت بازی) بود.



شکل۶- هم‌ردیفی توالی ناحیه اگزونی ژن لینالول سینتاز در چهار توده ریحان (Ham: همدان، Bir: بیرجند، kar:کرمانشاه، Gom: قم)

```
LIS_Bir TTGGATATGCGATTACTTTATAGTCAATTACATGCAATTATACATGTTTATGATGTAGTA
LIS_Kar TTGGATATGCGATTAATTTATAGTCAATTACATGCAATTATACATGTTTATGATGTAGTA
LIS_Ham TTGGATATGCGATTACTTTATAGTCAATTACATGCAATTATACATGTTTATGATGTAGTA
LIS_Gom TTGGATATGCGATTACTTTATAGTCAATTACATGCAATTATATATGTTTATGATATAGTA
        *************** ************************* *********** *****

LIS_Bir TTTGGCGCAATCGTCTAGCT
LIS_Kar TTTGGCGCAATCGTCTAGCT
LIS_Ham TTTGGCGCAATCGTCTAGCT
LIS_Gom TTTGGCGTAATCGTCTAGCT
        ******* ************
```

شکل۷- هم‌ردیفی توالی ناحیه اینترونی ژن لینالول سینتاز در چهار توده ریحان (Ham: همدان، Bir: بیرجند، kar:کرمانشاه، Gom: قم)

جدول۳- فراوانی SNP های شناسایی شده در ژن لینالول سینتاز در توده‌های مختلف ریحان

نوع SNP	تعداد در اگزون	تعداد در اینترون	کل SNP	درصد SNP
G/A	۳	۱	۴	۴۴/۴۴
T/C	۱	۲	۳	۳۳/۳۳
C/G	۱	-	۱	۱۱/۱۱
C/A	-	۱	۱	۱۱/۱۱

درکل در توالی ژن لینالول سینتاز به ازای هر ۱۰۰ جفت باز ۱/۵ SNP مشاهده شد (به‌طور متوسط ۱/۳ SNP در ناحیه اگزونی و ۵ SNP در ناحیه اینترونی به ازای هر ۱۰۰ جفت باز).

هم‌ردیفی توالی‌ها و شناسایی SNP ها در ژن ژرماکرین D سینتاز: به‌منظور شناسایی SNPها در ژن ژرماکرین D سینتاز، هم‌ردیفی بین توالی ناحیه اینترون و اگزون در توده‌های بیرجند، کرمانشاه، همدان و ری انجام گرفت (شکل‌های ۸و ۹). در این هم‌ردیفی جهش‌های مربوط به تبدیل بازهای G/A، T/A،C/A، G/C و T/C شناسایی شد. بیشترین جهش در ناحیه اگزونی مربوط به تبدیل باز G/A و ناحیه اینترونی مربوط به تبدیل باز G/A و T/C بود. همچنین در این ژن یک حذف باز در توده همدان و یک درج باز در توده بیرجند شناسایی شد (جدول۴).

در ژن ژرماکرین D سینتاز از ۲۸ SNP شناسایی شده، هفت SNP در ناحیه اگزونی و ۲۱ SNP در ناحیه اینترونی مشاهده شد که ۶۷/۸۵ درصد آن از نوع هم‌جنس با فراوانی ۳۵/۷۱ درصد G/A و ۳۲/۱۴ درصد C/T و ۳۲/۱۵ درصد جهش از نوع ناهم‌جنس با فراوانی ۷/۱۴ درصد T/A، ۱۴/۲۸ درصد G/C و ۱۰/۷۳ درصد C/A بود. در این ژن تفاوت‌های تک نوکلئوتیدی در نواحی اینترونی بیشتر از نواحی اگزونی بود. درکل در توالی ژن ژرماکرین D سینتاز به ازای هر ۱۰۰جفت باز، ۴/۸ SNP مشاهده شد (به‌طور متوسط ۴ SNP در نواحی اگزونی و ۵/۲۵ SNP در نواحی اینترونی به ازای هر ۱۰۰ جفت باز).

```
GDS_Ham   TCTATGAGAGACGAGTCACGTGATGGAAA-GTTTTTTAAGAGTTTGCCAAATTGGACTTC
GDS_Kar   TCTATGAGAGACGAGTCACGTGATGGAAA-ATTTTTTAAGAGTTTGCCAAATTGGACTTC
GDS_Bir   TCTATGAGAGACGAGTCACGTGATGGAAAAGTTTTTTAAGAGTTTGCCAAATTGGACTTC
GDS_Ray   TCTATGAGAGACGAGTCACGTGATGGAAA-GTTTTTTAAGAGTTTGCCAAATTGGACTTC
          ***************************  ****************************

GDS_Ham   AATATATTACAAAAGATTCATCAGGGAGAGTTAACTCATATAGCAAGGTTGGGGGTGGAA
GDS_Kar   AATATATTACAAAAGATTCATCAGGAAGAGCTAACCCATATTGCAAGGTTAGGTGGTGGA
GDS_Bir   AATATATTACAAAAGATTCATCAGGAAGAGCTAACCCATATTGCAAGGTTAGGTGGTGGA
GDS_ Ray  AATATATTACAAAAGATTCATCAGGAAGAGCTAACCCATATTGCAAGGTTAGGTGGTGGA
          ************************* **** **** *************************

GDS_Ham   AGGAACTAGACTTTGGAAACAAACTAGCATTGCAGGAGATAGAGTCGTGAATG-
GDS_Kar   AGGAACTAGACTTTGGAAACAAACTACCATTGCAAGGGATAGAGTCGTGAATGC
GDS_Bir   AGGAACTAGACTTcGGAAACAAACTACCATTGCAAGGGATAGAGTCGTGAATGC
GDS_ Ray  AGGAACTAGACTTTGGAAACAAACTACCATTGCAAGGGATAGAGTCGTGAATGC
          ************* ************ ********* ****************
```

شکل۸- هم‌ردیفی توالی ناحیه اگزونی ژن ژرماکرین D سینتاز در ریحان (Bir: بیرجند، Ham: همدان، Kar:کرمانشاه، Ray: ری)

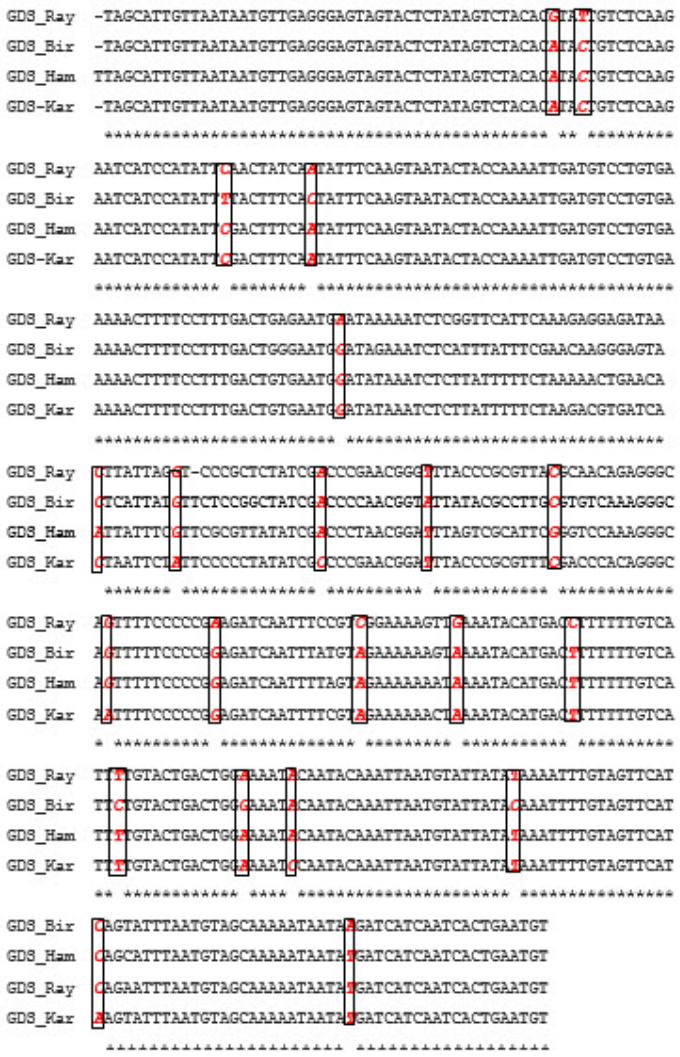
جدول۴- فراوانی SNPهای شناسایی شده در ژن ژرماکرین D سینتاز در توده‌های مختلف ریحان

نوع SNP	تعداد در اگزون	تعداد در اینترون	کل SNP	درصد SNP
G/A	۳	۷	۱۰	۳۵/۷۱
T/A	-	۲	۲	۷/۱۴
C/T	۳	۶	۹	۳۲/۱۴
G/C	۱	۳	۴	۱۴/۲۸
C/A	-	۳	۳	۱۰/۷۳

بحث و نتیجه‌گیری

SNP ها چندشکلی تک نوکلئوتیدی و معمولاً دو آللی می‌باشند که در بیش از یک درصد افراد جمعیت مشاهده می‌شوند (۱۰). از آنجایی که در مقایسه با دیگر نشانگرها، SNPها عموماً فراوانی بالایی دارند و قابل اتوماسیون شدن و کارآمد و مقرون به‌صرفه بودن از ویژگی‌های بارز آنها می‌باشد بنابراین این نشانگرها در برنامه‌های اصلاح گیاهان برای تهیه نقشه‌های ژنتیکی با وضوح بالا و انتخاب ژنومی جزو نشانگرهای پرکاربرد هستند (۱۷و ۱۵). چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی ممکن است به‌طور ویژه مسئول تنوع فنوتیپی یک صفت باشد یا با SNPهای دیگر پیوسته باشند (۱۱). انتخاب مناسب‌ترین مجموعه SNPها در یک روش مقرون به‌صرفه یک گام اساسی در جهت کاربرد نشانگرهای مولکولی برای توسعه محصولات می‌باشد. امروزه نشانگرهای SNPها در مطالعات اشباع نقشه‌های ژنتیکی، مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده صفات مختلف و انتخاب براساس نشانگر در برنامه‌های اصلاحی گیاهان مورد استفاده قرار می‌گیرند. در مطالعه حاضر SNPهای موجود در نواحی اگزونی و اینترونی ژن‌های لینالول سینتاز و ژرماکرین D سینتاز (از ژن‌های کلیدی دخیل در سنتز ترپن‌ها) به‌منظور استفاده از

آنها در برنامه‌های اصلاحی ریحان شناسایی شد. در بررسی SNPها بین دو گونه *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 از تبدیل C/T بود (۱۹).



شکل۹- هم‌ردیفی توالی ناحیه اینترونی ژن ژرماکرین *D* سینتاز در ریحان (Bir: بیرجند، Ham: همدان، Kar: کرمانشاه، Ray: ری)

میزان SNPهای به‌دست‌آمده از جهش ناهم‌جنس 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 بود. در مطالعه حاضر نیز درصد جهش‌های هم‌جنس در هر دو ژن لینالول سینتاز و ژرماکرین D سینتاز بیشتر از جهش‌های ناهم‌جنس بود. در بررسی توالی‌های EST در گیاه سویا نیز گزارش شد که فراوانی SNPها در نواحی اینترونی بیشتر از نواحی اگزونی می‌باشد و نسبت آن ۲ به ۱/۴ در هر هزار جفت باز بود (۵). در گیاه کدوی تخمه کاغذی *(Cucurbita pepo L.)* نیز حدود ۱۹۹۸۰ SNP شناسایی شد که ۶۸ درصد آنها از نوع جهش‌های هم‌جنس با تبدیلات A/G و C/T و ۳۲ درصد مربوط به جهش‌های ناهم‌جنس با تبدیلات A/T، A/C، G/T و C/G بود (۴). نسبت جهش‌ها و تبدیلات این مطالعه با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد.

به‌طور کلی نتایج مطالعه حاضر نشان داد که در هر دو ژن لینالول سینتاز و ژرماکرینD سینتاز تعداد SNPها در نواحی اگزونی کمتر از نواحی اینترونی می‌باشد. همچنین بیشترین تعداد تنوع‌های تک نوکلئوتیدی در این ژن‌ها از نوع تبدیل‌های هم‌جنس A/G و T /C بود. در کل در توالی‌های بررسی‌شده این دو ژن، فراوانی SNPها در ژن لینالول سینتاز نسبت به ژرماکرینD سینتاز کمتر و فراوانی SNPها در نواحی اینترونی ژرماکرینD سینتاز بیشتر از ژن لینالول سینتاز بود. بیشترین تعداد جهش‌های حذف و اضافه در ژن ژرماکرین D سینتاز مشاهده گردید. پیشنهاد می‌شود از این SNPها در برنامه‌های اصلاحی ریحان برای تهیه نقشه‌های ژنتیکی با وضوح بالا و انتخاب ژنومی و نقشه‌یابی ارتباطی و بهبود محصولات و شناسایی سریع ارقام مختلف زراعی استفاده شود.

سپاسگزاری

از گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی و پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه ارومیه به خاطر فراهم نمودن امکانات تحقیق قدردانی می‌نماید. از پروفسور عباس حسنی استاد گروه علوم باغبانی دانشگاه ارومیه به خاطر تهیه بذور ریحان سپاسگزاری می‌نماید.

منابع

۱- هدایتی، ا.، میرجلیلی، م. ح.، وهادیان، ج.، ۱۳۹۵. بررسی تنوع شیمیایی اسانس اندام‌های مختلف گیاه مریم‌گلی سهندی (*Salvia sahendica* Boiss. & Buhse)، مجله پژوهش‌های گیاهی، جلد۲۹، شماره ۴، صفحات ۹۱۸-۹۰۸.

۲- رامک، پ.، کاظم پور اوصالو، ش.، ابراهیم‌زاده، ح.، شریفی، م.، و بهمنش، م.، ۱۳۹۳. بیان ژن ۱. دئوکسی گزیلولوز ۵. فسفات ردوکتاز ایزومراز و ارتباط آن با بیوسنتز مونوترپن کارواکرول در گیاه مرزه خوزستانی، مجله پژوهش‌های گیاهی، جلد۲۷، شماره ۴، صفحات۶۲۳-۶۲۲.

3- Alinaghizadeh, H., Mohammadabadi, M. R., and Zakizadeh, S., 2010. Exon 2 of BMP15 gene polymorphism in Jabal Barez Red Goat, Journal of Agricultural Biotechnology, 2 (1), PP: 69-80 (In Farsi).

4- Barbazuki, W. B., Emrich, S. J., Chen, H. D., Li, L., Schnble, P. S., 2006. SNP discovery via 454 transcriptome sequencing, Plant Journal, 51, PP: 910-918.

5- Choi, I., Hyten, D. L., Kumar, L., and Cergan, P. B., 2003. Single nucleotide polymorphism discovery in 3-EST sequence of soybean, in Proceeding of Plant, Animal Genomes XI Conference (San Diego, California), January 11-15, 2003.

6- De Masi, L., Castaldo, D., Galano, G., Minasi, P., and Laratta, B., 2005. Genotyping of fig (*Ficus carica* L.) via RAPD markers. Journal of the Science Food and Agriculture, 85, PP: 22-35.

7- Ferreira, F. S., Davanad, L., Luthria, D. L., Sasaki, T., and Heyerick, A., 2010. Flavonids from *Artemisia annua* L. as antioxidants and their potential synergism with artemisinin against malaria and cancer. Molecules, 15, PP: 3135-3170.

8- Gupta, P. K., 2008. Single nucleotide polymorphisms, a new paradigm for molecular marker technology and DNA polymorphism detection with emphasis on their use in plants. Current Science, 80 (4), PP: 524-535.

9- Javanmard, A., Mohammadabadi, M. R., Zarrigabayi, G. E., Gharahedaghi, A. A., Nassiry, M. R., Javadmansh, A., and Asadzadeh, N., 2008. Polymorphism within the intron region of the bovine leptin gene in Iranian Sarabi cattle (Iranian Bos taurus), Russian Journal of Genetics, 44 (4), PP: 495-497.

10- Kim, S., and Misra, A., 2007. SNP genotyping: technologies and biomedical applications. Annual Review of Biomedical Engineering, 9, PP: 289-320.

11- Mohammadi, A., Nassiry, M. R., Mosafer, J., Mohammadabadi, M. R., Sulimova, G. E., 2009. Distribution of BoLA-DRB3 allelic frequencies and identification of a new allele in the Iranian cattle breed Sistani (Bos indicus). Russian journal of genetics, 45(2), PP: 198-202.

12- Mousavizadeh, A., Mohammadabadi, M. R., Torabi, A., Nassiry, M. R., Ghiasi, H., and Esmailizadeh, A. K., 2009. Genetic polymorphism at the growth hormone locus in

Iranian Talli goats by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP), Iranian Journal of Biotechnology, 7 (1), PP: 51-53.

13- Nagegowda, D. A., 2010. Plant volatile terpenoid metabolism: biosynthetic genes, transcriptional regulation and subcellular compartmentation. FEBS letters, 584, PP: 2965-2973.

14- Oksman-Caldentey, K. M., and Inzé, D., 2004. Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. Trends in Plant Science, 9(9), PP: 433-440.

15- Ozcan, M., Derya, A. M., and Unver, A., 2005. Effect of drying methods on the mineral content of basil (*Ocimum basilicum* L.). Journal of Food Engineering, 69, PP: 375-379.

16- Phillipson, J. D., 2007. Phytochemistry and pharmacognosy. Phytochemistry, 68, PP: 2960-2972.

17- Pyne, R., Honig, J., Vaiciunas, J., Koroch, A., Wyenandt, C., Bonos, S., and Simon, J., 2017. A first linkage map and downy mildew resistance QTL discovery for sweet basil (*Ocimum basilicum*) facilitated by double digestion restriction site associated DNA sequencing (ddRADseq). Plose One, 12(9), PP: 1-23.

18- Rastogi, S., Meena, S., Bhattacharya, A., Ghosh, S., kumar Shukla, R., Sing Songwan, N., Kishorilal, R., Mohan Gupta, M., Chandra Lavania, U., Gupta, V., Nagegowda, D., and Shasany, A., 2014. De novo sequencing and comparative analysis of holy and sweet basil transcriptomes. BMC Genomic, 15(588), PP: 2-18.

19- Shojaei, M., Mohammadabadi, M. R., Asadi Fozi, M., Dayani, O., Khezri, A., and Akhondi, M., 2010. Association of growth trait and leptin gene polymorphism in Kermani sheep. Journal of Cell and Molecular Research, 2, PP: 67-73.

20- Tester, M., 2010. Breeding technologies to increase crop production in a changing World .Science, 327, PP: 818-822.

21- Wang, D. G, Fan, J. B., Siao, C. J., Berno, A., Young, P., Sapolsky, R., Ghandour, G., Perkins, N., Winchester, E., Spencer, J., Krugiyak, L., Stein, L., Hsie, L., Topaloglou, T., Hubbell, E., Robinson, E., Mittmann, M., Morris, M. S., Shen, N., Kilburn, D., Rioux, J., Nusbaum, C., Rozen, S., Hudson, T. J., Lipshutz, R., Chee, M., and Lander, E. S., 1998. Large-scale identification, mapping and genotyping single nucleotide polymorphisms in the human genome. Science, 280, PP: 1077-1082.

SNP discovery in exon and intron regions of Linalool synthase and Germacrene D synthase genes in basil

Aliyari S.[1], Abdollahi Mandoulakani B.[1,2] and Bernousi I.[1,2]

Dept. of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, I.R. of Iran

Dept. of Agricultural Biotechnology, Institute of Biotechnology, Urmia University, Urmia, I.R. of Iran

Abstract

Basil (*Ocimum basillicum* L.), one of the most important medicinal plants, contains monoterpene and sesquiterpene compounds. Linalool synthase (*LIS*) and Germacrene D synthase (*GDS*) are two key genes involved in terpenes biosynthesis. In the current investigation, cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) markers and sequencing were used to identify single nucleotide polymorphisms (SNPs) in both genes in five different basil populations. For this means, fragments of 600 and 583 bp from the coding sequences of these genes were amplified and digested by using *Pst1* and *Mse1* restriction enzymes. After retrieval of the sequences of the amplified gene fragments, SNPs were identified based on multiple sequence alignment in both genes in studied basil genotypes. Out of the nine SNPs identified in *LIS* gene, five occurred in exon region while the number of SNPs identified in intron was four. Of the total SNPs detected in this gene, the proportion of transition was 77.8%, with frequencies of A/G: 44.4% and T/C: 33.3% and C/G and C/A (transversion) with the same frequencies of 22.2%. In *GDS* gene, in total, 28 SNPs was detected (seven in exon and 21 in intron) of which 67.8% was transient with a frequency of G/A: 35.7% and C/T: 32.1%, and 32.1% transversion (T/A: 7.15%, G/C: 14.3% and C/A: 10.7%). The results of the sequence alignments revealed that the highest number of the identified SNPs in the studied genes are A/G and T<->C.

Key words: Basil, Linalool Synthase, Germacrene D Synthase, SNP marker