مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۷، شماره ۲، پاییز و زمستان ۹۷
صفحه ۲۰۲-۱۸۹

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 7, Number 2

جداسازی و مطالعه پیشبر ژن اوژنول *O*-متیل ترانسفراز (*EOMTs*) گیاه ریحان

Isolation and investigation of eugenol *O*-methyl transferase (*EOMTs*) gene promoter from *Ocimum basilicum* L.

فاطمه خاکدان[۱]، مجتبی رنجبر[۲*]، نادر چاپارزاده[۳]، اطهر سادات جوانمرد[٤]، هوشنگ علیزاده[٥]

Fatemeh Khakdan[1], Mojtaba Ranjbar[2*], Nader Chaparzadeh[3], Athar Sadat Javanmard[4], Houshang Alizadeh[5]

۱- گروه زیست‌فناوری، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جهرم، جهرم

۲- استادیار، گروه بیوتکنولوژی میکروبی، دانشکده زیست‌فناوری، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل

۳- استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز

٤- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه یاسوج، یاسوج

۵- دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج

1- Department of Biotechnology, College of Agriculture, Jahrom University, Jahrom, Iran
2- Assistant Professor, Department of Microbial Biotechnology, Faculty of Biotechnology, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran
3- Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran
4- Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Yasouj University, Yasuj, Iran
5- Associate Professor, Department of Agronomy & Plant Breeding, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: ranjbarf@ausmt.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۷/۱۰/۱۲ - تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۲/۲۶)

چکیده

ریحان *Ocimum basilicum* L. (۲n=٤۸)، گیاهی دارویی و معطر از تیره نعناعیان است. اوژنول یکی از ترکیبات مهم فنیل پروپانوئیدی موجود در اسانس ریحان است که بر علیه باکتری‌ها، قارچ‌ها، نماتدها، حشرات در صنایع مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد. فنیل‌پروپانوئیدها از جمله متیل اوژنول با داشتن خاصیت آنتی اکسیدانتی بر علیه رادیکال‌های آزاد ترکیبی حفاظتی در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی به شمار می‌آید. متیل اوژنول *O*-متیل ترانسفراز (*EOMTs*) به عنوان یک آنزیم کلیدی در مسیر بیوسنتز فنیل پروپانوئیدها، متیلاسیون اوژنول به متیل اوژنول را انجام می‌دهد. در تحقیق حاضر، برای بررسی احتمال تنظیم بیان ژن اوژنول *O*-متیل ترانسفراز در شرایط مختلف محیطی و شناسایی موتیف‌های تنظیمی، پیشبر این ژن از گیاه ریحان جداسازی و در ناقل pTG19-T همسانه‌سازی و سپس توالی‌یابی شد. سپس مشخصه‌یابی و بررسی عملکردی آن با استفاده از روش‌های تجزیه بیوانفورماتیکی انجام شد. نتایج تجزیه پیشبر ژن *EOMTs* (۱۲۰۹ bp) نشان داد که این توالی شامل عناصر مهم تنظیمی پاسخ‌دهنده به دمای بالا و تنش خشکی از جمله MYB، MYC، HSE و WRKY است. بیان موقت ژن گزارشگر *GUS* تحت کنترل پیشبر *ObEMOTs* در برگ‌های گیاه توتون نشان داد که با حضور عناصر پایه، این پیشبر قادر به هدایت و بیان این ژن است. با توجه به حضور جایگاه‌های تنظیمی پاسخ‌دهنده به تنش‌های زیستی و غیر زیستی در پیشبر ژن *ObEOMTs*، انتظار می‌رود این پیشبر علاوه بر بیان ژن *EOMTs* در حد پایه، قادر باشد در مواجهه با تنش‌های محیطی، میزان بیان ژن را تغییر دهد.

واژه‌های کلیدی

پیشبر *EOMTs*،
عناصر cis-acting،
تنش خشکی،
ریحان

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-15]

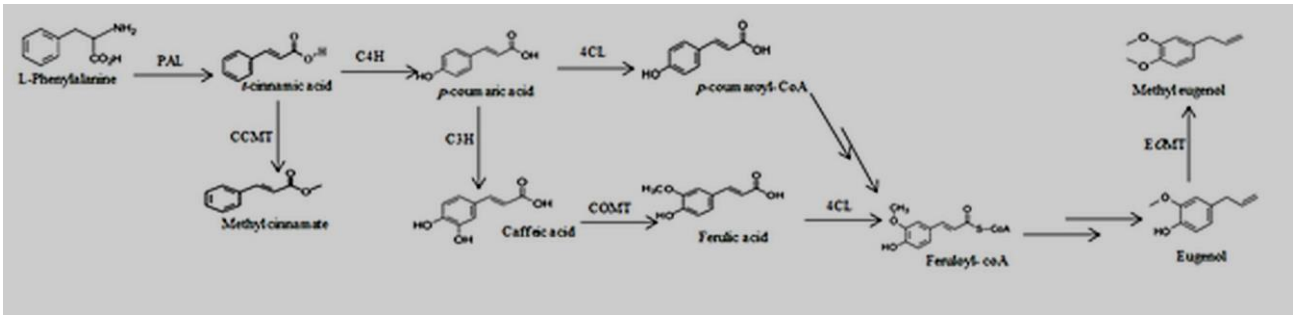
[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.2.7.8]

مقدمه

ریحان *Ocimum basilicum* L. (۲n=۴۸)، گیاهی دارویی و معطر از تیره نعناعیان در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری خصوصا ایران رشد می‌کند و به عنوان یکی از مهمترین گیاهان معطر برای تولید اسانس مورد استفاده قرار می‌گیرد (Kothari *et al*. 2004). این گیاه با داشتن ترکیبات مهم آروماتیک و دارویی دارای اهمیت اقتصادی در صنایع غذایی، دارویی، عطرسازی و آرایشی-بهداشتی است. از عصاره این گیاه به‌طور وسیعی برای درمان بیماری‌های گوناگون مانند سردردهای عصبی، گلودرد، آسم، سرماخوردگی، ورم کلیه و اسهال استفاده می‌شود. در علوم نوین آروماتراپی از این گیاه به دلیل اثرات ضد تشنجی در تقویت عملکرد سلول‌های مغز و قلب استفاده می‌شود. در اسانس ریحان ترکیبات شیمیایی زیادی شناسایی شده است که در بین آنها برخی فنیل پروپانوئیدها از جمله متیل-کاویکول (methyl chavicol)، متیل‌اوژنول (methyl eugenol) و مشتقات مونوترپنی و سسکوئی‌ترپنی حجم اصلی اسانس را تشکیل می‌دهند (Hiltunen and Holm, 2006). این ترکیبات در کرک‌های غده‌ای (glandular trichomes) بر سطح قسمت‌های هوایی گیاه تجمع می‌یابند (Gang *et al*. 2001).

فنیل پروپانوئیدها علاوه بر نقش حفاظتی در پاسخ‌های دفاعی، با دارا بودن خواص ضد باکتریایی، آنتی‌اکسیدانی، ضد سرطانی و ضد توموری در صنایع مختلف عطرسازی، غذایی و دارویی از جایگاه ویژه‌ای برخوردار هستند (Juliani and Simon, 2002; Lee *et al*. 2005). متیل اوژنول موجود در اسانس گیاهان معطر به خصوص گیاه ریحان، به علت اثر دفاعی بر علیه باکتری‌ها، قارچ‌ها، نماتدها و حشرات ترکیبی حفاظتی به شمار می‌رود. به علاوه با دارا بودن خاصیت ضد درد در دندان پزشکی به عنوان مسکن و ضد اکسایشی بسیار قوی در جذب و خنثی کردن رادیکال‌های آزاد نقش مهمی ایفا می‌کند (Koeduka *et al*. 2006; Politeo *et al*. 2007).

فنیل پروپانوئیدها از اسید آمینه فنیل آلانین مشتق می‌شوند که ابتدا توسط آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) در اثر دآمیناسیون به اسید ترانس سینامیک تبدیل می‌شود. سپس توسط سینامات 4-هیدروکسیلاز، *p*-کوماریک اسید به وجود می‌آید. این پیش ماده در طی مراحلی و توسط مجموعه‌ای از آنزیم‌ها شامل اکسیژناز، لیگاز، اکسیدوردوکتاز و ترانسفراز و آنزیم کلیدی اوژنول-*O*-متیل ترانسفراز (Eugenol *O*-methyl transferase, *EOMTs*) به متیل اوژنول تبدیل می‌شود (Gang *et al*. 2001) (شکل ۱).



شکل ۱- مسیر بیوسنتز متیل اوژنول.

Figure 1- Methyl eugenol biosynthesis pathway

PAL= Phenyl alanine ammonia-lyase, C4H= Cinnamate 4- hydroxylase, 4CL= 4- Coumarate Co A- ligase, COMT= Caffeic acid o- methyl transferase, E*O*MT= Eugenol *O*- methyl transferase, CV*O*MT: Chavicol *O*- methyl transferase, CCMT= P-Coumarate/ Cinnamate Carboxyl methyl transferase, E*O*MT: Eugenol *O*-methyl transferase (Gang *et al*. 2001).

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-15]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.2.7.8]

مطالعه‌ها نشان می‌دهد که فعالیت آنزیم‌های مسیر بیوسنتز فنیل پروپانوئیدها در سطح نسخه‌برداری تنظیم می‌شود و بسته به مراحل تمایز سلول و قرار گرفتن در معرض انواع گوناگون تنش از جمله پاتوژن، تابش UV، نور زیاد، کمبود مواد غذایی و دما به طور وسیعی تغییر می‌یابد (Dixon and Paiva, 1995). مطالعه گذشته نشان داد که سطح بیان آنزیم اوژنول متیل ترانسفراز و میزان ترکیب نهایی متیل اوژنول، در گیاه ریحان تحت تاثیر تنش خشکی تغییر می‌یابد (Khakdan *et al.* 2017). با توجه به این‌که پیشبر ژن‌ها، در بیوسنتز انواع ترکیبات ثانویه نقش تنظیمی مهمی را در سطح نسخه‌برداری ایفا می‌کند، بنابراین شناسایی موتیف‌های تنظیمی پیشبر این ژن اوژنول متیل ترانسفراز امکان مطالعه گسترده‌تر تنظیم بیان آن در شرایط تنش خشکی را فراهم خواهد کرد (Xie *et al.*, 2008). نقش عناصر cis-acting و فاکتورهای نسخه‌برداری به عنوان سازوکارهای متداول در تنظیم الگوی بیان ژن‌ها بسیار با اهمیت است. مطالعات گذشته نشان می‌دهد، تغییرات الگوی بیان زمانی و مکانی ژن‌های مرتبط با تنش بخش مهم پاسخ گیاه به تنش را شامل می‌شود که توسط شبکه پیچیده‌ای از پروتئین‌های تنظیم کننده نسخه‌برداری مانند پروتئین‌های MYC و MYB کنترل می‌شود (Liao *et al.* 2015).

به علاوه فناوری تراژن ابزاری قدرتمند جهت بررسی عملکرد و بیان پایدار ژن انتقال یافته در گیاهان به شمار می‌رود. در اغلب موارد از پیشبرهای قوی و دائمی مانند Cauliflower mosaic virus 35S (CaMV 35S) برای بیان تراژن استفاده می‌شود. این پیشبرهای غیراختصاصی در اغلب بافت‌ها و در تمام مراحل رشد و نمو گیاه بدون تنظیم زمانی یا مکانی بیان شده و در مسیر اصلاح ژنتیکی گیاه مشکلات بالقوه‌ای را ایجاد می‌کنند (Gittins *et al.* 2000) سنتز دائمی و تجمع بالای محصولات تراریخته با مسیرهای سوخت و سازی گیاه تداخل پیدا کرده و منجر به اثرهای پلیوتروپیک (Pleiotropic effects) در گیاهان تراریخت شود. بنابراین شناسایی پیشبرهای ژنی که بتوانند دارای بیان ویژه بافتی یا بیان ویژه نموی در گیاه تراریخته داشته باشند، بسیار مطلوب خواهد بود (Tu *et al.* 2009). در سال‌های گذشته، توجه زیادی به سمت ژن‌هایی جلب شده است که الگوی بیان آن‌ها در سطوح مختلف تنش متفاوت است؛ عناصر cis-acting موجود در پیشبر این ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش برای طراحی پیشبرهای مینیمال در بیوتکنولوژی کاربرد مهمی دارند. پیشبرهای مینیمال شامل ترکیب مختلف و تعداد کپی‌های متفاوت از عناصر cis-acting هستند که از پیشبرهای القایی تحت شرایط تنش به دست آمده‌اند و برای مطالعه پاسخ‌های خشکی و شوری در آرابیدوپسیس مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Hou *et al.* 2012).

تاکنون دانسته‌هایی درباره دومین‌های تنظیمی پیشبر ژن کلیدی مسیر بیوسنتز متیل اوژنول (*EOMTs*) و نیز نقش آن‌ها در بیان این ژن در شرایط تنش‌های محیطی در دسترس نیست. بنابراین برای درک بهتر تنظیم بیان این ژن در شرایط مختلف محیطی، این مطالعه با هدف جداسازی و مشخصه‌یابی پیشبر با بررسی بیان ژن گزارشگر *GUS* برای تایید فعال بودن پیشبر انجام شد و در نهایت تجزیه بیوانفورماتیکی پیشبر برای تعیین حضور موتیف‌های تنظیمی پاسخ‌دهنده به تنش‌های محیطی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

ماده گیاهی و شرایط کشت

بذرهای توده‌ای از گیاه ریحان (*O. basilicum* L.) از استان فارس تهیه و در شرایط گلخانه تحقیقاتی گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه تهران کشت شدند. بذور در خاک با

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-15]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.2.7.8]

بافت لومی-شنی در دمای ۳۰-۲۰ درجه سانتی‌گراد تحت نور طبیعی کرج رشد یافتند.

استخراج DNA، ساخت کتابخانه ژنومی و تکثیر توالی پیشبر ژن *ObEOMTs*

استخراج DNA ژنومی از برگ‌های جوان گیاه ریحان با استفاده از کیت کیاژن و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. با استفاده از ساخت کتابخانه Genome Walker از *O. basilicum* با الگو گرفتن از Universal Genome Walker Kit (Clontech, USA) کار جداسازی پیشبر انجام شد. به طور خلاصه، رقت‌های متفاوت DNA به کمک آنزیم‌های برشی *Eco*RV (*Eco*321)، *Eco*RI و *Hind*III برش خورده و سپس به آداپتورهای دو رشته‌ای متصل شد. لیست توالی آغازگرها و آداپتور در جدول (۱) آورده شده است.

جدول ۱- فهرست آداپتورها و آغازگرهای مورد استفاده جهت تکثیر پیشبر ژن *ObEOMTs*

Table 1- List of utilized adaptors and primers for amplification of *ObEOMT*s gene promoter

نام آغازگر/ آداپتور	شماره دسترسی	توالی	طول قطعه (جفت باز)
آداپتور ۱ Adapt-1		5'-CTATAGTGACTGCTGGTCGAGGGCCCGGGCTGGT-3'	
آداپتورهای ۲			
Adapt-EcoV		5'-ACCAGCCC-3'	
Adapt-EcoR		'5'-AATTACCAGCCC-3	
Adapt-Hind		5'-TCGAACCAGCCC-3'	
pEOMT- 1	AF435008	5'- ATGGGGATGGATTGGAGTAATTGGG -3'	۱۲۰۹
pEOMT- 2		5'- TAAGGACATTGAGTTGCAAAGGCGTAC -3'	
Ecomt- *Hind*III- F	KY49234	5'- CCCAAGCTTGAAATTGTCGGTCCTGGAAG-3'	۱۲۰۹
Ecomt- *Bam*HI-R	KY49234	5'- CGCGGATCCGCTCGGGCTGGTATCA - 3'	

سپس، از DNA متصل به آداپتور به عنوان الگو برای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در دو مرحله صورت گرفت: مرحله اول از آغازگر آداپتور به عنوان آغازگر برگشت و آغازگرهای اختصاصی به عنوان آغازگر رفت استفاده شد. مرحله دوم شامل واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی بود که رقت‌های $\frac{1}{10}$ و $\frac{1}{20}$ محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در مرحله اول به عنوان الگو برای آغازگرهای اختصاصی شماره ۲ به عنوان آغازگر رفت، آداپتور آغازگر به عنوان آغازگر برگشت مورد استفاده قرار گرفت. واکنش‌ها با استفاده از دستورالعمل touch-down PCR تکثیر یافت. برنامه واکنش شامل یک مرحله با دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ٤، سپس ٥ چرخه با دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤٥ ثانیه، دمای ٦٣ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤٥ ثانیه، دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤٥ ثانیه و ۲٦ چرخه بعد با دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤٥ ثانیه، دمای ٦١ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤٥ ثانیه، دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤٥ ثانیه اجرا شد. سپس محصول تکثیر یافته با روش glass-milk از ژل آگاروز خالص‌سازی و در ناقل pTG19-T (شرکت ویوانتیس- کره جنوبی) همسانه‌سازی شد. واکنش الحاق طبق جدول ۲ در دمای ١٦ درجه سانتی‌گراد و به صورت شبانه انجام گرفت. محصولات مرحله الحاق جهت ترانسفورماسیون سلول‌های مستعد *E.coli* سویه DH5α مورد استفاده قرار گرفتند (Russell and Sambrook 2001). از محیط مک‌کانکی برای غربالگری و شناسایی پلاسمیدهای

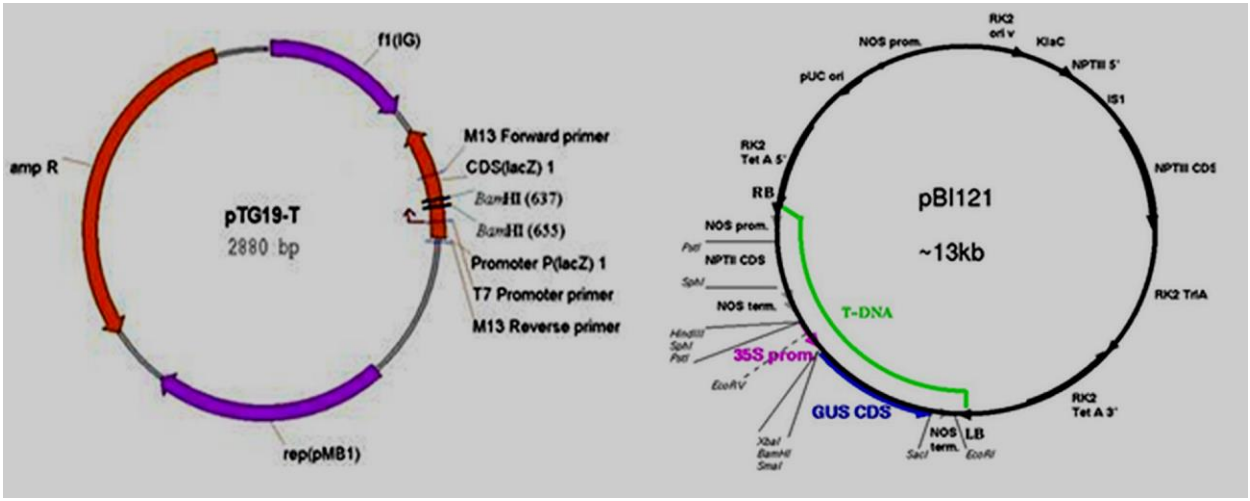
[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-15]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.2.7.8]

نوترکیب، بر اساس بیان و یا عدم بیان ژن بتا گالاکتوزیداز استفاده شد. کلونی‌های نوترکیب باکتری بر روی محیط کشت مک‌کانکی حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (۱۰۰ mg/L) و ماده X-gal انتخاب شدند. استخراج پلاسمید نوترکیب (با استفاده از روش لیز قلیایی، Russell and Sambrook 2001) از ه در دمای ۱۶ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و محصول واکنش بر روی ژل آگاروز ۱/۲ درصد بررسی شد. سپس وکتور نوترکیب جهت توالی‌یابی به شرکت بیونیر- کره جنوبی ارسال شد. جهت به دست آوردن توالی نهایی، نواحی ناخوانا و هم‌پوشان با استفاده از نرم‌افزارهای BioEdit و EditSeq اصلاح شد. در ادامه همردیفی قطعه توالی‌یابی شده در برنامه آنلاین BLAST انجام و صحت قطعه بدست‌آمده تایید شد. در نهایت، از نرم‌افزارهای TSSP و BDGP برای یافتن نقطه آغاز رونویسی (transcription start site) و از نرم‌افزارهای برخط PLANTCARE و PLACE (www.bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html، http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html) و PlantPAN (http://plantpan2.itps.ncku.edu.tw) برای یافتن جایگاه اتصال فاکتورهای نسخه‌برداری و موتیف‌های عملکردی مختلف در توالی موردنظر استفاده شد.

ساخت سازه‌بیانی *pEOMTs-GUS*

برای ساخت سازه ژنی شامل *pEOMTs* که به ژن گزارشگر متصل شده است، از ناقل pTG19-T حاوی *pEOMTs* و ناقل دوگانه pBI121 (شکل ۲) استفاده شد. در مرحله اول، قطعه پیشبر موجود در ناقل pTG19-T با استفاده از آغازگرهای دارای جایگاه برشی برای آنزیم‌های *Bam*HI و *Hind*III (Ecomt- *Hind*III- F و Ecomt- *Bam*HI-R) و طی واکنش PCR تکثیر شد. تکثیر توسط آنزیم Pfu پلیمراز و چرخه دمایی شامل ٤ دقیقه در دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد و ۳۰ چرخه سه مرحله‌ای، ٤٥ ثانیه در دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد ، کلونی‌های سفید انجام شده و وجود قطعه DNA پیشبر با استفاده از آنزیم برشی *Bam*HI مورد تائید قرار گرفت. مخلوط هضم آنزیمی حاوی پلاسمید (۱µg)، بافر X ۱۰ آنزیم *Bam*HI (۲µl)، آنزیم *Bam*HI با غلظت U/µl ۱۰ (۱µl) و آب دیونیزه (باقیمانده حجم تا ۲۰µl) به صورت شبان ۳ دقیقه در دمای بهینه شده ۵۷ درجه سانتی‌گراد و ٤٥ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد؛ و در نهایت ۱۰ دقیقه تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی از روی ژل آگاروز خالص‌سازی شده و سپس با دو آنزیم برشی *Bam*HI و *HindIII* برش داده شد. مخلوط واکنش هضم دوگانه حاوی پلاسمید (۱µg)، بافر X ۱۰ (۲µl)، آنزیم *Bam*HI با غلظت U/µl ۱۰ (۱µl)، آنزیم *Hind*III با غلظت U/µl ۱۰ (۱µl) و آب دیونیزه (باقیمانده حجم تا ۲۰µl) به صورت شبانه در دمای ۱٦ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت در مرحله دوم، ناقل pBI121 نیز توسط این دو آنزیم مورد هضم آنزیمی قرار گرفت؛ و *pEOMTs* به داخل ناقل pBI121 در محل پیشبر *CaMV 35S* الحاق شد. واکنش الحاق جهت اتصال قطعه هدف به ناقل با احتساب نسبت ۳:۱ (ناقل: قطعهPCR)، در حجم ۲۰ میکرولیتر، طبق جدول ۲ تهیه و مخلوط الحاق به صورت شبانه در ۱٦ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. ناقل‌های حاصل از این مرحله توسط فرآیند ترانسفورماسیون به*E.coli* منتقل شده و کلون‌های رشد یافته بر روی محیط کشت حاوی کانامایسین (۱۰۰mg/L) انتخاب شدند. پلاسمید نوترکیب از این کلون‌ها خالص‌سازی شده و با استفاده از عمل هضم آنزیمی (توسط آنزیم‌های برشی *Bam*HI و *Hind*III)، برای حضور قطعه پیشبر مورد نظر، تائید شد. بنابراین قطعه پیشبر *pEOMTs* در ناحیه بالادست ژن گزارشگر *GUS* قرار گرفت تا عملکرد آن مطالعه شود.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-15]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.2.7.8]



شکل ۲- ناقل‌های pTG19-T و pBI121 و جایگاه‌های برشی آن‌ها

Figure 2- pTG19-T and pBI121 vectors and their restriction sites.

جدول ۲- مخلوط واکنش الحاق

Table 2- Mixture of ligation reaction.

نام ماده	حجم مورد استفاده (میکرولیتر)
ناقل (۲۵ ng/ µl)	۲
قطعه PCR (۱۵۰ ng)	۱۰
بافر الحاق ۱۰X	۲
لیگاز T4 DNA (۲۰۰ u/ µl)	۱
آب دیونیزه	مابقی حجم واکنش

آگروباکتریوم، بیان موقت سازه‌موردنظر و سنجش کیفی (هیستوشیمیایی) ژن گزارشگر *GUS*

پس از تایید سازه نهایی pBI121، انتقال آن به *Agrobacterium tumefaciens* سویه C58 طبق دستورالعمل ترانسفورماسیون این باکتری توسط Wang انجام شد (Wang 2006) و سپس به اگروباکتریوم اجازه داده شد تا به‌مدت ۲۴–۱۸ ساعت در محیط کشت مورد نظر حاوی آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین با غلظت ۱۰۰µg/mL و ریفامپسین ۱۵µg/mL رشد کند تا OD در طول موج ۶۰۰nm به ۰/۷ تا ۱ برسد. سپس بافت برگی توتون با استفاده از روش اگروباکتریوم در شرایط خلاء تراریخت شد (Wang 2006)، و فعالیت ژن *GUS* در نمونه‌ها مورد مطالعه قرار گرفت (Jefferson *et al.* 1987). در ادامه برگ‌های اینفیلتره شده در محلول رنگ‌آمیزی ایکس گلوک (ساخت شرکت فرمنتاز) شناور شده و به مدت یک دقیقه تحت خلاء ۲۵۰ میلی‌بار قرار داده شدند و در نهایت نمونه‌های برگی بین سه ساعت تا یک شبانه روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از آن برگ‌ها در اتانول ۷۵ درصد قرار داده شد و تا زمان حذف کامل کلروفیل، اتانول آن به صورت مرتب تعویض شد. در انتها عکس‌برداری از نمونه‌ها پس از حذف کامل کلروفیل انجام گرفت.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-15]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.2.7.8]

نتایج

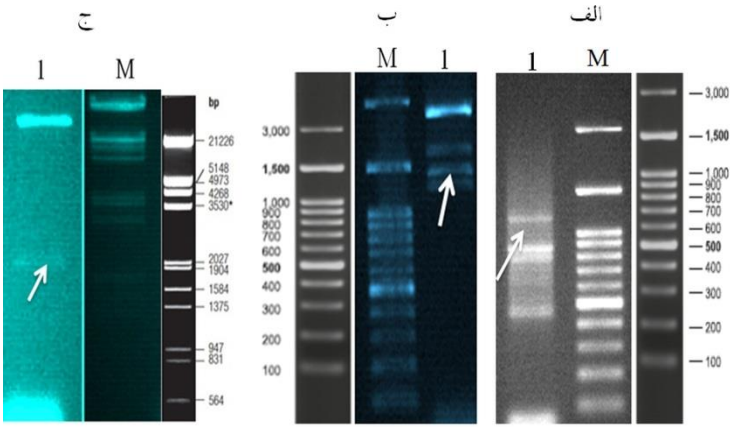
بیوسنتز، سوخت و ساز و تجمع متابولیت‌های ثانویه تحت تاثیر گونه، شرایط رشد، بافت گیاه و نیز مراحل رشد و نموی است. در بین ترکیبات فعال موجود در سیستم دفاعی گیاهان، فنیل پروپانوئیدهای فرار ملکول‌های علامتی هستند که هم در نمو گیاه و هم در حفاظت سلول‌های گیاهی در برابر انواع تنش‌های محیطی نقش مهمی ایفا می‌کنند (Dixon *et al*. 2002; Loreto *et al*. 2014). تنظیم سرعت تولید و تجمع ترکیبات مهم فرار موجود در اسانس گیاهان معطر و دارویی در شرایط مختلف نامطلوب محیطی مرتبط با کنترل میزان فعالیت آنزیم‌های درگیر در مسیرهای سوخت و سازی انجام می‌گیرد که معمولاً در سطوح مختلف نسخه‌برداری ژن، تغییرات پس از نسخه‌برداری، تغییرات حین ترجمه و تغییرات پس از ترجمه کنترل می‌شود (Xie *et al*. 2008; Liu *et al*. 2011).

مطالعه مسیرهای بیوسنتز فنیل پروپانوئیدهای فرار (شکل ۱) تحت شرایط انواع تنش‌های زیستی و غیرزیستی نسبت به مسیرهای بیوسنتز سایر ترکیبات فرار بسیار محدود هستند و کمتر مورد توجه واقع شده‌اند. نتایج مطالعات پیشین بر تاثیر تنش خشکی بر پروفایل بیان ژن اوژنول سنتاز بر روی سه توده ریحان، ۱ و ۲ از استان مازندران و توده ۳ از استان فارس نشان داد که با تغییر سطوح تنش الگوی بیان این ژن تغییر می‌یابد و این نحوه پاسخ‌دهی با تغییر میزان متیل اوژنول مطابقت داشت (Khakdan *et al*. 2017). کاهش پیش ماده‌های بالا دستی مسیر منجر به کاهش فعالیت آنزیم انتهایی مسیر بیوسنتز متیل اوژنول می‌شود. کاهش اوژنول در گیاهانی که کاهش بیان ژن شاخص مسیر را نشان می‌دهند، ممکن است نتیجه کاهش سطوح پیش ماده‌های مسیر در اثر عملکرد آنزیم‌های C3H، COMT، CCR، CAD، CAAT و در انتها EGS باشد(Gang *et al*. 2001). چنین نتایجی به تاثیر آنزیم‌های یک مسیر بیوسنتزی در هدایت ذخیره کربن در جهت بیوسنتز ترکیب نهایی اشاره می‌کند. به لحاظ تکاملی، سازماندهی سلول‌های موجود در هر توده گیاهی در جهت پاسخ به تنش خشکی، با توجه به نیاز گیاه به افزایش بیان این ژن‌ها صورت می‌گیرد. به علاوه برای بیان و تجمع متابولیت‌ها در شرایط مختلف، هر ژنی در ناحیه بالا دستی خود دارای گیرنده‌های تنظیمی زیست‌شناختی متفاوتی است، وجود این گیرنده‌ها این امکان را فراهم می‌کند که کمپلکس‌های پروتئینی (فاکتورهای نسخه‌برداری) بتوانند پاسخ‌های دفاعی گیاه را تحت شرایط مختلف محیطی تحریک کنند (Liu *et al*. 2014). یکی از بهترین راهکارها برای بررسی چگونگی تنظیم بیوسنتز ترکیب متیل اوژنول در شرایط تنش محیطی در توده ریحان مورد مطالعه، تجزیه و تحلیل پیشبر ژن کدکننده آنزیم سنتزکننده آن است. با توجه به عدم شناخت از توالی پیشبر این ژن، جداسازی و مطالعات بیوانفورماتیک و تایید عملکرد این پیشبر ضروری به نظر می‌رسد و به علاوه امکان مطالعه گسترده‌تر تنظیم بیان ژن در انواع شرایط محیطی را فراهم می‌کند.

همسانه‌سازی و توالی‌یابی پیشبر ژن *ObEOMTs* در گیاه ریحان (*O. basilicum*)

با استفاده از روش Genome walking، توالی بالادستی پیشبر (توالی 5'UTR و پیشبر) با طول ۱۲۰۹ جفت باز (شکل ۳ الف) تکثیر یافت.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-15]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.2.7.8]



شکل ۳- تأئید مراحل جداسازی و همسانه‌سازی پیشبر ژن *ObEOMTs*. الف) الکتروفورز محصول حاصل از واکنش PCR. محصول حاصل از واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی pEOMT- 1 و pEOMT- 2 برای جداسازی پیشبر ژن *ObEOMTs* (چاهک ۱)، نشانگر اندازه DNA، ۱۰۰ جفت باز فرمنتاز (M). توالی آغازگرها در جدول ۱قابل مشاهده است. ب) تائید همسانه‌سازی قطعه پیشبر *pEOMTs* در ناقل pTG19-T. همسانه‌سازی قطعه پیشبر *pEOMTs* حاصل از واکنش PCR در ناقل pTG19-T با استفاده از هضم آنزیمی ناقل‌های نوترکیب توسط آنزیم *Bam*HI تائید شد. قطعه پیشبر *pEOMTs* (چاهک ۱)، نشانگر اندازه DNA، ۱۰۰bp، فرمنتاز (M). ج) تایید همسانه‌سازی توالی جداسازی‌شده پیشبر *pObEOMTs* در ناقل pBI121. هضم آنزیمی ناقل نوترکیب pBI121، جایگزینی پیشبر *CaMV 35S* توسط قطعه جداسازی‌شده پیشبر *EOMTs* را تأئید کرد. قطعه DNA حاصل از هضم آنزیمی ناقل نوترکیب pBI121 توسط آنزیم‌های برشی *Bam*HI و *Hind*III (چاهک ۱)، نشانگر اندازه DNA، لاندا (M). اندازه قطعه DNA قرار گرفته بین این دو جایگاه برشی در ناقل غیرنوترکیب pBI121 (شامل پیشبر *CaMV 35S*)، ۸۷۱ نوکلئوتید است.

Figure 3- Confirmation of isolation and cloning of *EOMTs* gene promoter. A) Electrophoresis of PCR product. PCR was performed with specific primers (pEOMT-1 and pEOMT-2) for *EOMTs* gene promoter isolation. Lane 1, PCR product., Lane M, DNA size marker, 100 bp, Fermentas. Sequences of specific primers have been showed in table 2. B) Cloning confirmation of *pEOMTs* DNA fragment in pTG19-T vector. Cloning of pEOMT DNA fragment, produced by PCR, was confirmed using of enzymatic digestion of recombinant vectors by BamHI restriction enzyme. Lane 1: *pEOMTs* DNA fragment, M: DNA size marker, 100 bp, Fermentas. C) Confirmation of isolated *pObEOMTs* cloning in pBI121 vector. Enzymatic digestion of recombinant pBI121 vector confirmed replacement of *CamV35S* promoter by isolated *pEOMTs* fragment in this vector. Lane 1: Produced DNA fragments from enzymatic digestion of recombinant pBI121 vector by *Bam*HI and *Hind*III restriction enzymes. Lane M: DNA size marker, Lambda. It is mention that DNA fragment flanked by these two restriction enzymes, including *CaMV 35S* promoter, has 871 nt size in pBI121 vector.

قطعه تکثیر یافته در ناقل pTG19T الحاق شد و این همسانه‌سازی با استفاده از آنزیم برشی *BamHI* تائید شد (شکل۳ ب).

ناقل‌های نوترکیب جهت توالی‌یابی مورد استفاده قرار گرفت. پس از توالی‌یابی برای بررسی‌های بیشتر، با استفاده از برنامه BLAST مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. در نهایت پس از تایید درستی توالی، توالی *pEOMTs* به عنوان تنها توالی موجود در پایگاه داده‌های NCBI برای پیشبر این ژن با شماره دسترسی KY492343 ثبت شد. تعیین جایگاه شروع رونویسی با استفاده از نرم‌افزارهای TSSP، BDGP انجام شد. نتایج نشان داد که جایگاه شروع رونویسی پیش‌بینی شده برای ژن *EOMTs*، ٦٦ جفت باز بالاتر از کدون شروع ترجمه (ATG) قرار گرفته است. توالی پیشبر برای حضور cis-elements مورد بررسی قرار گرفت و نتایج در جدول ۳ ارائه شده است.

نتایج نشان می‌دهد که پیشبر *ObEOMTs* حاوی cis-elementهای ضروری TATA و CAAT است. نتایج بررسی‌ها برای شناسایی حضور عناصر تنظیمی cis-elementها و موتیف‌های تنظیمی نشان داد که این ژن دارای عناصر تنظیمی cis-acting شامل AE-Box و CATT-Box از عناصر تنظیمی پاسخ‌دهنده به نور است (جدول ۳). حضور هر دو موتیف در ژن‌های درگیر در علامت‌دهی

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-15]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.2.7.8]

نوری AtPolλ در تنظیم چرخه سلولی در گیاه آرابیدوپسیس مورد بررسی قرار گرفته است. همچنین محققین با ایجاد جهش در این بخش از پیشبر به اهمیت این جایگاه بر میزان بیان این ژن در چرخه سلولی پی برده‌اند (Roy *et al*. 2012). توالی CCAAT box یکی از معمول‌ترین عناصر پیشبر است که در حدود ۳۰ درصد از پیشبرهای یوکاریوتی وجود دارد (Bucher, 1990) و بسیاری از فاکتورهای نسخه‌برداری از جمله CTF/NF1 (فاکتور نسخه‌برداری/ فاکتور هسته‌ای ۱)، C/EBP (CCAAT/ enhancer binding protein) و CDP (CCAAT displacement protein) به این موتیف تنظیمی متصل می‌شوند (Edwards *et al*. 1998).

WRKY710S، BOXATGAP3 و MBS از دیگر موتیف‌های شناسایی شده در پیشبر *ObEOMTs* است. این عناصر تنظیمی cis-acting به عنوان جایگاه اتصال دو فاکتور نسخه‌برداری ATMYB1 و ATMYB2 در تنظیم ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش خشکی، بیان فلاونوئید و توالی تنظیمی بالادستی ژن‌های دفاعی مشاهده شده است (Yamamoto *et al*. 2004). به علاوه مطالعات نشان می‌دهد که این موتیف تنظیمی، جایگاه اتصال فاکتورهای نسخه‌برداری R2R3-MYB، BZIP و BHLH بوده و در کنترل فعالیت ژن‌های پاسخ به نور و وابسته به بافت در مسیر بیوسنتز فنیل پروپانوئید نیز موثر است (Hartmann *et al*. 2005).

جدول ۳- نوع، تعداد و نقش عناصر تنظیمی پیش‌بینی‌شده در پیشبر ژن *pEOMTs* در ریحان

Table 3- Type, number and role of predicted regulatory elements of *pEOMTs* gene promoter from *O. basilicum* L.

نام عناصر	تعداد	توالی و عملکرد
AE-Box	٤	CANNTG قسمتی از عنصر تنظیمی پاسخ‌دهنده به نور
CATT-Box	۲	CATT قسمتی از عناصر پاسخ‌دهنده به نور
CCAATT-Box	٦	CCAATT محل اتصال فاکتور نسخه‌برداری MYBHv1
CGTCA-motif	۱	CCGTCC عناصر تنظیمی cis-acting مرتبط با فعالیت اختصاصی مریستم
CGTCA-motif	۳	CGTCA عناصر تنظیمی cis-acting در پاسخ به متیل جاسمونات
WBOXNTERF3	٤	TTGAC عناصر تنظیمی cis-acting در پاسخ به تنش زیستی
TCA-element	۱	TCATCTTCTT عناصر تنظیمی cis-acting در پاسخ به سالسیلیک اسید
BOXATGAP3	۱	CANNTG مکان اتصال فاکتور نسخه‌برداری MYB و p-gene در مسیر بیوسنتز فلاونوئید
I-Box	۲	ACTTTG قسمتی از عنصر پاسخ‌دهنده به نور
MBS	۳	CAACTG و CGGTCA مکان اتصال فاکتور نسخه‌برداری MYB با تحریک در تنش خشکی
WRKY710S	۲	TGAC جایگاه اتصال فاکتور نسخه‌برداری MYB-WRKY
DRE2COREZMRAB12	۱	عناصر پاسخ‌دهنده به خشکی در مسیر تولید ABA
HSE	۳	CNNGAANNTTCNNG عناصر تنظیمی cis-acting در پاسخ به تنش گرما

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-15]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.2.7.8]

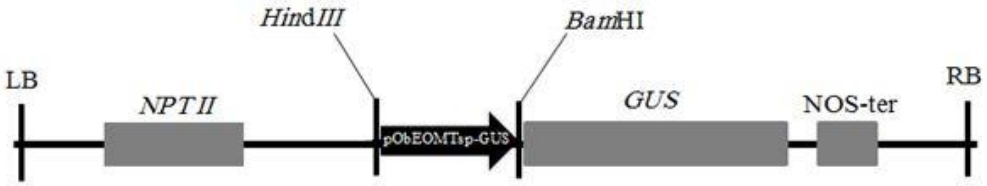
فاکتورهای نسخه‌برداری R2R3-MYB در کنترل بسیاری از فرآیندهای زیستی گیاهان مانند انتقال پیام هورمون‌ها، متابولیسم ثانویه و پاسخ به تنش‌ها نقش دارند (Dubos *et al*. 2010; Baldoni *et al*. 2015). فاکتورهای نسخه‌برداری bZIP نیز درطیف وسیعی از فرآیندهای زیستی از جمله پاسخ گیاه به انواع تنش‌های زیستی و غیرزیستی شامل دفاع در برابر حمله پاتوژن‌ها (Thurow *et al*. 2005; Kaminaka *et al*. 2006)، مسیرهای پیام‌رسانی هورمون‌ها (Uno *et al*. 2000; Nieva *et al*. 2005) و تحمل گیاه نسبت به تنش‌های شوری و خشکی (Liu *et al*. 2014) مشارکت دارند. بسیاری از فاکتورهای نسخه‌برداری bHLH در تنظیم پیام نور (Castelain *et al*. 2012) و در عملکرد پیام‌رسانی هورمون‌ها مانند آبسزیک اسید (Abe *et al*. 2003)، اتیلن و جاسمونیک اسید (Fernandez-Calvo *et al*. 2011) درگیر هستند. علاوه بر این، فاکتورهای نسخه‌برداری bHLH در پاسخ گیاه به تنش‌ها مانند کاهش دما، خشکی و شوری نقش دارند (Feng *et al*. 2013; Tang *et al*. 2017). در مجموع این پروتئین‌ها در پاسخ گیاه به تنش‌های زیستی و غیرزیستی درگیر هستند (Sun *et al*. 2018).

به علاوه توالی TGAC موجود در پیشبر ژن *ObEOMT* مکان اتصال فاکتورهای نسخه‌برداری MYB-WRKY است. فاکتورهای نسخه‌برداری WRKY به صورت گسترده در گیاهان یافت شده‌اند و در پاسخ به انواع تنش‌های غیرزیستی (Banerjee and Roychoudhury 2015; Muthamilarasan *et al*. 2015; Phukan *et al*. 2016) و زیستی (Eulgem and Somssich 2007; Buscaill and Rivas 2014; Phukan *et al*. 2016) نقش مهمی ایفا می‌کند. در میان ۲۸۷ ژن *BnWRKY* در *Brassica napus*، اغلب آن‌ها توسط تنش دمای پایین، شوری و خشکی القا می‌شوند و در شرایط خشکی سه تا از این ژن‌ها بیش‌تنظیم (up-regulated) می‌شوند (He *et al*. 2016) گیاهان تراریخته‌ای که ژن Chrysanthemum *CmWRKY1* را بیش‌بیان می‌کنند، افزایش در تحمل dehydration (کم‌آبی) را نشان می‌دهند (Fan *et al*. 2016). با توجه به نتایج حاضر حضور جایگاه‌های تنظیمی پاسخ‌دهنده به سایر تنش‌های غیرزیستی می‌تواند برای تحریک افزایش بیان ژن بیوسنتز کننده متیل اوژنول کارساز باشد که این ادعا نیازمند کاهش عملکرد (Loss of function) آن در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی است.

بررسی بیان ژن گزارشگر *GUS* تحت فعالیت پیشبر ژن *ObEOMT*

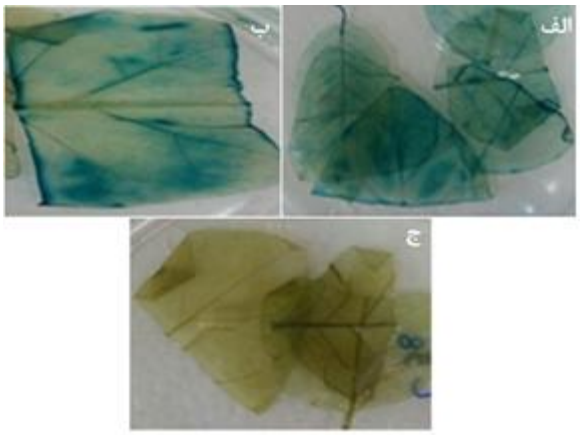
جهت بررسی پیشبر جداسازی شده، توالی مذکور جایگزین پیشبر *CaMV 35S* در ناقل pBI121 شد. همسانه‌سازی پیشبر ژن *ObEOMTs* در این ناقل با استفاده از آنزیم‌های برشی مورد تائید قرار گرفت (شکل ۳ ج). برای مقایسه بهتر بیان ژن *GUS* از پیشبر *CaMV 35S* در ناقل pBI121 استفاده شد. دو ناقل بیانی شامل p*EOMTs–GUS* و p*CaMV 35S-GUS* برای ترانسفورماسیون توتون از طریق روش اگروباکتریوم تحت خلا به کار گرفته شدند (شکل ٤) (Wang 2006). در نهایت پس از ۷۲ ساعت نمونه‌ها مورد سنجش هیستوشیمیایی GUS قرار گرفتند (Jefferson *et al*. 1987). بیان ژن *GUS* با دو سازه بیانی مذکور مشاهده شد (شکل ۵). عناصر موجود در پیشبر *pEOMTs* نشان می‌دهد که با حضور عناصر پایه، این پیشبر قادر به هدایت و بیان ژن *GUS* است. نتایج بیان هیستوشیمیایی ژن *GUS* فعالیت و عملکرد پیشبر *pEOMTs* را تایید می‌کند. برای تایید نقش موتیف‌های تنظیمی مرتبط با تنش خشکی و شناخت نقش آن‌ها در فعالیت ژن اوژنول *O*–متیل ترانسفراز بررسی حضور این عناصر تنظیمی در هدایت ژن گزارشگر *GUS* تحت شرایط تنش خشکی مورد نیاز است.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-15]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.2.7.8]



شکل ٤- طرح شماتیک از ساخت ناقل بیانی pObEOMTsp-GUS

Figure 4- Schematic diagram of expression vector pObEOMTsp-GUS



شکل ٥- آزمون هیستوشیمیایی ژن گزارشگر *β*- گلوکورونیداز (*GUS*) در توتون تراریخته. الف) نتیجه بیان موقت ژن گزارشگر *GUS* تحت هدایت پیشبر *ObEOMTs*، ب) کنترل مثبت: نتیجه بیان موقت ژن گزارشگر *GUS* تحت هدایت پیشبر *CaMV 35S*، ج) کنترل منفی: اگروباکتریوم بدون پلاسمید نوترکیب.

Figure 5- Histochemical test of the β- glucuronidase (*GUS*) gene reporter in transgenic *Nicotiana tabacum*. A) Results of transient expression of the *GUS* reporter gene under *ObEOMTs* promoter control, B) Positive control: results of transient expression of the *GUS* gene reporter under *CaMV35S* promoter control, C) Negative control: Agrobacterium without recombinant plasmid.

سپاسگزاری

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران برای فراهم آوردن محیط مناسب آزمایشگاهی جهت انجام این پژوهش تشکر و قدردانی کنند.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-15]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.2.7.8]

منابع

Abe H, Urao T, Ito T, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2003. *Arabidopsis* AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. The Plant Cell 15(1):63-78.

Baldoni E, Genga A, Cominelli E. 2015. Plant MYB transcription factors: their role in drought response mechanisms. International Journal of Molecular Sciences 16(7):15811-15851.

Banerjee A, Roychoudhury A. 2015. WRKY proteins: signaling and regulation of expression during abiotic stress responses. The Scientific World Journal 2015:807560. doi: 10.1155/2015/807560.

Bucher P. 1990. Weight matrix descriptions of four eukaryotic RNA polymerase II promoter elements derived from 502 unrelated promoter sequences. Journal of Molecular Biology 212(4):563-578.

Buscaill P, Rivas S. 2014. Transcriptional control of plant defence responses. Current Opinion in Plant Biology 20:35-46.

Castelain M, Le Hir R, Bellini C. 2012. The non-DNA-binding bHLH transcription factor PRE3/bHLH135/ATBS1/TMO7 is involved in the regulation of light signaling pathway in *Arabidopsis*. Physiologia Plantarum 145(3):450-60.

Dixon RA, Achnine L, Kota P, Liu CJ, Reddy MS, Wang L. 2002. The phenylpropanoid pathway and plant defence-a genomics perspective. Molecular Plant Pathology 3(5):371-390.

Dixon RA, Paiva NL. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. The Plant Cell 7(7):1085–1097.

Dubos C, Stracke R, Grotewold E, Weisshaar B, Martin C, Lepiniec L. 2010. MYB transcription factors in *Arabidopsis*. Trends in Plant Science 15(10):573-581.

Edwards D, Murray JA, Smith AG. 1998. Multiple genes encoding the conserved CCAAT-box transcription factor complex are expressed in Arabidopsis. Plant Physiology 117(3):1015-1022.

Eulgem T, Somssich IE. 2007. Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. Current Opinion in Plant Biology 10(4):366-371.

Fan Q, Song A, Jiang J, Zhang T, Sun H, Wang Y, Chen S, Chen F. 2016. CmWRKY1 enhances the dehydration tolerance of chrysanthemum through the regulation of ABA-associated genes. PLoS One 11(3):e0150572. doi: 10.1371/journal.pone.0150572.

Feng HL, Ma NN, Meng X, Zhang S, Wang JR, Chai S, Meng QW. 2013. A novel tomato MYC-type ICE1-like transcription factor, SlICE1a, confers cold, osmotic and salt tolerance in transgenic tobacco. Plant Physiology and Biochemistry 73:309-320.

Fernández-Calvo P, Chini A, Fernández-Barbero G, Chico JM, Gimenez-Ibanez S, Geerinck J, Eeckhout D, Schweizer F, Godoy M, Franco-Zorrilla JM, Pauwels L. 2011. The *Arabidopsis* bHLH transcription factors MYC3 and MYC4 are targets of JAZ repressors and act additively with MYC2 in the activation of jasmonate responses. The Plant Cell 23(2):701-715.

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(2):539-555.

Gittins JR, Pellny TK, Hiles ER, Rosa C, Biricolti S, James DJ. 2000. Transgene expression driven by heterologous ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small-subunit gene promoters in the vegetative tissues of apple (*Malus pumila* Mill.). Planta 210(2):232-240.

Hartmann U, Sagasser M, Mehrtens F, Stracke R, Weisshaar B. 2005. Differential combinatorial interactions of cis-acting elements recognized by R2R3-MYB, BZIP, and BHLH factors control light-responsive and tissue-specific activation of phenylpropanoid biosynthesis genes. Plant Molecular Biology 57(2):155-171.

He GH, Xu JY, Wang YX, Liu JM, Li PS, Chen M, Ma YZ, Xu ZS. 2016. Drought-responsive WRKY transcription factor genes TaWRKY1 and TaWRKY33 from wheat confer drought and/or heat resistance in *Arabidopsis*. BMC Plant Biology 16(1):116. doi: 10.1186/s12870-016-0806-4.

Hiltunen R, Holm Y. 2006. Essential oil of *Ocimum*. In: Hiltunen R, Holm Y (Eds.) The genus *Ocimum*, Harwood Academic Publisher, Amesterdam, 77-111.

Hou L, Chen L, Wang J, Xu D, Dai L, Zhang H, Zhao Y. 2012. Construction of stress responsive synthetic promoters and analysis of their activity in transgenic *Arabidopsis thaliana*. Plant Molecular Biology Reporter 30(6):1496-1506.

Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW. 1987. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. The EMBO Journal 6(13):3901-3907.

Juliani HR, Simon JE. 2002. Antioxidant activity of basil. In: Janic J, Whipkey A (Eds.) Trends in New Crops and New Uses, ASHS Press, Alexandria, 575-579.

Kaminaka H, Näke C, Epple P, Dittgen J, Schütze K, Chaban C, Holt BF, Merkle T, Schäfer E, Harter K, Dangl JL. 2006. bZIP10-LSD1 antagonism modulates basal defense and cell death in *Arabidopsis* following infection. The EMBO Journal 25(18):4400-4411.

Khakdan F, Nasiri J, Ranjbar M, Alizadeh H. 2017. Water deficit stress fluctuates expression profiles of 4Cl, C3H, COMT, CVOMT and EOMT genes involved in the biosynthetic pathway of volatile phenylpropanoids alongside accumulation of methylchavicol and methyleugenol in different Iranian cultivars of basil. Journal of Plant Physiology 218:74-83.

Koeduka T, Fridman E, Gang DR, Vassão DG, Jackson BL, Kish CM, Orlova I, Spassova SM, Lewis NG, Noel JP. 2006. Eugenol and isoeugenol, characteristic aromatic constituents of spices, are biosynthesized via reduction of a coniferyl alcohol ester. Proceedings of the National Academy of Sciences 103(26):10128-10133.

Kothari S, Bhattacharya ARamesh S. 2004. Essential oil yield and quality of methyl eugenol rich *Ocimum tenuiflorum* Lf (syn. *O. sanctum* L.) grown in south India as influenced by

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-15]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.2.7.8]

method of harvest. Journal of Chromatography A 1054(1-2):67-72.

Lee SJ, Umano K, Shibamoto T, Lee KG. 2005. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. Food Chemistry 91(1):131-137.

Liao YL, Shen YB, Chang J, Zhang WW, Cheng SY, Xu F. 2015. Isolation, expression, and promoter analysis of GbWRKY2: a novel transcription factor gene from *Ginkgo biloba*. International Journal of Genomics 2015, 607185. doi: 10.1155/2015/607185.

Liu C, Mao B, Ou S, Wang W, Liu L, Wu Y, Chu C, Wang X. 2014. OsbZIP71, a bZIP transcription factor, confers salinity and drought tolerance in rice. Plant Molecular Biology 84(1-2):19-36.

Liu H, Wang X, Wang D, Zou Z, Liang Z. 2011. Effect of drought stress on growth and accumulation of active constituents in *Salvia miltiorrhiza* Bunge. Industrial Crops and Products 33(1):84-88.

Liu JH, Peng T, Dai W. 2014. Critical cis-acting elements and interacting transcription factors: key players associated with abiotic stress responses in plants. Plant Molecular Biology Reporter 32(2):303-317.

Loreto F, Pollastri S, Fineschi S, Velikova V. 2014. Volatile isoprenoids and their importance for protection against environmental constraints in the Mediterranean area. Environmental and Experimental Botany 103:99-106.

Muthamilarasan M, Bonthala VS, Khandelwal R, Jaishankar J, Shweta S, Nawaz K, Prasad M. 2015. Global analysis of WRKY transcription factor superfamily in Setaria identifies potential candidates involved in abiotic stress signaling. Frontiers in Plant Science 6:910. doi: 10.3389/fpls.2015.00910.

Nieva C, Busk PK, Domínguez-Puigjaner E, Lumbreras V, Testillano PS, Risueño MC, Pagès M. 2005. Isolation and functional characterisation of two new bZIP maize regulators of the ABA responsive gene rab28. Plant Molecular Biology 58(6):899-914.

Phukan UJ, Jeena GS, Shukla RK. 2016. WRKY transcription factors: molecular regulation and stress responses in plants. Frontiers in Plant Science 7:760. doi: 10.3389/fpls.2016.00760.

Politeo O, Jukic M, Milos M. 2007. Chemical composition and antioxidant capacity of free volatile aglycones from basil (*Ocimum basilicum* L.) compared with its essential oil. Food Chemistry 101(1):379-385.

Roy S, Choudhury SR, Singh SK, Das KP. 2012. Functional analysis of light-regulated promoter region of AtPolλ gene. Planta 235(2):411-432.

Russell DW, Sambrook J. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor,New York, USA.

Sun X, Wang Y, Sui N. 2018. Transcriptional regulation of bHLH during plant response to stress. Biochemical and Biophysical Research Communications 503(2):397-401.

Tang S, Li L, Wang Y, Chen Q, Zhang W, Jia G, Zhi H, Zhao B, Diao X. 2017. Genotype-specific physiological and transcriptomic responses to drought stress in *Setaria italica* (an emerging model for Panicoideae grasses). Scientific Reports 7(1):10009. doi: 10.1038/s41598-017-08854-6.

Thurow C, Schiermeyer A, Krawczyk S, Butterbrodt T, Nickolov K, Gatz C. 2005. *Tobacco* bZIP transcription factor TGA2. 2 and related factor TGA2. 1 have distinct roles in plant defense responses and plant development. The Plant Journal 44(1):100-113.

Tu CH, Liu WP, Huang LL, Mo YQ, Yang DZ. 2009. Cloning and transcriptional activity of a novel ovarian-specific promoter from rat retrovirus-like elements. Archives of Biochemistry and Biophysics 485(1):24-29.

Uno Y, Furihata T, Abe H, Yoshida R, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2000. *Arabidopsis* basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. Proceedings of the National Academy of Sciences. 97(21):11632-11637.

Wang K. 2006. Agrobacterium protocols. Humana press, New York, USA:

Xie Z, Kapteyn J, Gang DR. 2008. A systems biology investigation of the MEP/terpenoid and shikimate/phenylpropanoid pathways points to multiple levels of metabolic control in sweet basil glandular trichomes. The Plant Journal 54(3):349-361.

Yamamoto S, Nakano T, Suzuki K, Shinshi H. 2004. Elicitor-induced activation of transcription via W box-related cis-acting elements from a basic chitinase gene by WRKY transcription factors in tobacco. Biochimica et Biophysica Acta 1679(3):279-287.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-15]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.2.7.8]

Genetic Engineering and Biosafety Journal

Volume 7, Number 2

Isolation and investigation of eugenol *O*-methyl transferase (*EOMTs*) gene promoter from *Ocimum basilicum* L.

Fatemeh Khakdan[1], Mojtaba Ranjbar[2*], Nader Chaparzadeh[3], Athar Sadat Javanmard[4], Houshang Alizadeh[5]

1- Department of Biotechnology, College of Agriculture, Jahrom University, Jahrom, Iran
2- Assistant Professor, Department of Microbial Biotechnology, Faculty of Biotechnology, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran
3- Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran
4- Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Yasouj University, Yasuj, Iran
5- Associate Professor, Department of Agronomy & Plant Breeding, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

Abstract

Ocimum basilicum L. (2n=48) is a medicinal plant that belongs to Lamiaceae family. Eugenol is one of the most important components of basil essential oil which is utilized as an anti-bacterial and anti-fungal material in various industries. Phenylpropanoids such as methyl eugenol possess anti-oxidant properties against free radicals and act as protective compounds in plant responses to the biotic and abiotic stresses. Methyl eugenol O-methyl transferase (EOMTs), as a key enzyme of phenylpropanoids biosynthesis pathway, converts eugenol into methyl eugenol by methylation. In this study, we isolated *EOMTs* gene promoter from the basil plant and cloned in pTG19-T vector for sequencing. Then, this sequence was characterized and analyzed by bioinformatics softwares. We aimed to investigate the possible gene expression regulation of *EOMTs* gene under different environmental conditions and recognition different regulatory motifs of its promoter. Analysis of *EOMT*s gene promoter (1209 bp) indicated that this sequence included some important regulatory elements which could respond to high temperature and drought stress such as MYB, MYC, HSE, and WRKY. Transient expression of the *GUS* gene under *ObEOMT*s promoter control in *Nicotiana tabacum* leaves showed that this promoter including core elements was able to direct the basal expression of this gene. It is expected that this promoter will be capable of changing the expression levels of *EOMTs* gene in reaction to different environmental stresses because there are stress-responsive regulatory sites in *ObEOMT*s gene promoter.

Key words: *EOMT*s promoter, cis-acting elements, drought stress, *Ocimum basilicum* L.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-15]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.2.7.8]