

افزایش بیان ژن فنیل آلانین آمونیا لیاز *PAL* و ترکیبات فنیل پروپانوییدی گیاه ریحان تحت تاثیر کیتوزان

Increasing of phenyl alanine ammonia lyase (*PAL*) gene expression and phenylpropanoid compounds of basil (*Ocimum basilicum*) by chitosan

صالحه نادری^۱، براتعلی فاخری^۱، صدیقه اسمعیل زاده بهابادی^{۱*}، حسین کمال الدینی^۱

۱- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار و استادیاران، دانشگاه زابل، ایران

Naderi S¹, Fakheri BA¹, Esmailzadeh Bahabadi S^{*1}, Kamaladini H¹

1. MSc Student, Associate Professor and Assistant Professors, University of Zabol, Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: esmailzadeh@uoz.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۲/۸/۸ - تاریخ پذیرش: ۹۳/۳/۱۸)

چکیده

ریحان (*Ocimum basilicum*)، گیاه دارویی از خانواده نعناعیان (Lamiaceae) است که دارای ترکیبات حلقوی و اسانس بوده و خواص ضد باکتری و آنتی اکسیدانی دارد. کیتوزان از ترکیبات اصلی دیواره سلولی بسیاری از گونه‌های قارچی است که به عنوان الیسیستور زیستی در بهبود بیوستز متابولیت‌های ثانوی استفاده می‌شود. در این پژوهش، اثر کیتوزان بر ترکیبات فنیل پروپانوییدی و بیان ژن و فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز (*PAL*) مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور گیاه ریحان در مرحله پیش گلدهی با غلظت دو گرم در لیتر کیتوزان تیمار شد و سپس در زمان‌های یک، ۲، ۳ و ۵ روز بعد از اعمال تیمار کیتوزان برداشت شد. تجزیه اسانس نشان داد که میزان متیل چاویکول و متیل اوژنول تحت تاثیر کیتوزان در مقایسه با شاهد افزایش یافت، به طوری که بیشترین میزان آنها به ترتیب در زمان‌های اول و دوم بعد تیمار بود. بیان ژن و فعالیت آنزیم *PAL* نیز تحت تاثیر کیتوزان نسبت به شاهد نشان داد که بیشترین میزان بیان و فعالیت آنزیم یک روز بعد از اعمال تیمار کیتوزان بوده و در روز پنجم بعد از اعمال تیمار کاهش یافت. تغییرات میزان بیان ژن و فعالیت آنزیم *PAL* با روند تغییرات ترکیبات فنیل پروپانوییدی در زمان‌های مختلف برداشت مطابقت داشت. بنابراین کیتوزان به عنوان الیسیستور زیستی از طریق افزایش بیان ژن و فعالیت آنزیم *PAL* سبب افزایش ترکیبات فنیل پروپانوییدی شد.

واژه‌های کلیدی

اسانس
بیان ژن
ریحان
PAL gene

مقدمه

فنیل پروپانوئیدها است (Achnine et al. 2004; Iijima et al. 2004). این آنزیم یک آنزیم حد واسط بین متابولیسم اولیه و ثانویه (فنیل پروپانوئید) می باشد (Adams 2001)، که برای اولین بار توسط Koukol and Conn (1961) شرح داده شد و بطور وسیعی در گیاهان مورد مطالعه قرار گرفت. متابولیت هایی که در نتیجه فعالیت PAL به وجود می آیند به عنوان مشتقات فنلی طبقه بندی می شوند که شامل کومارین ها، اسانس ها، فلاونوئیدها، لیگنین و تانن می باشند. این ترکیبات در بیماری ها، مقاومت به آفات و پراکندگی دانه و گرده افشانی دخالت دارند (Creasy 1967; Howles et al. 1996; Iijima et al. 2004; Ritter and Schulz 2004; Meek and Bidlack 2005). روش های متعددی برای افزایش تولید متابولیت های ثانویه وجود دارد. الیستورها ترکیباتی با منشا زیستی یا غیر زیستی هستند که از طریق القای سیستم دفاعی باعث بیوستت و انباشت متابولیت های ثانویه می شوند (Zhao et al. 2005). کیتوزان از ترکیبات اصلی دیواره سلولی بسیاری از گونه های قارچی است. کیتوزان یک پلی ساکارید پلی کاتیونی، به عنوان الیستور زیستی کارآمد برای افزایش تولید متابولیت های ثانویه گیاهان دارویی زیادی تایید شده است (Cheng et al. 2006). مطالعات اندکی در زمینه استفاده از الیستورها به منظور تولید بیشتر متابولیت های ثانویه گیاه ریحان انجام شده است. افزایش تولید دو ترکیب فنلی اسید رزمارینیک (RA) و اسید کافنیک (CA) تحت تاثیر متیل جاسمونات گزارش شده است (Kim et al. 2006). تحقیقات نشان داده الیگومرهای کیتوزان و کیتین فعالیت آنزیم های فنیل آلانین آمونالیاز (PAL) و تیروزین آمونالیاز (TAL) را در برگ های سویا افزایش می دهد (Wajahatullah et al. 2003). افزایش بیان ژن و فعالیت آنزیم PAL تحت تاثیر کیتوزان نیز گزارش شده است (Esmailzadeh et al. 1391). بررسی ها نشان داده کیتوزان باعث افزایش سریع و قابل توجهی در میزان مشتقات فنیل پروپانوئیدی در کشت تعلیقی نارگیل می شود (Chakraborty et al. 2009). از آنجا که آنزیم PAL تنظیم کننده ابتدای مسیر بیوستت ترکیبات فنیل پروپانوئیدی می باشد، بنابراین هدف از مطالعه حاضر ارتباط بیان ژن و فعالیت آنزیم PAL با تغییرات میزان فنیل پروپانوئیدها از جمله متیل چاویکول و متیل اوژنول بود.

ریحان با نام علمی *Ocimum basilicum* گیاه دارویی یکساله و علفی از خانواده (Lamiaceae) است. جنس *Ocimum* بین ۵۰ تا ۱۵۰ گونه علفی و بوته ای داشته (Javanmardi et al. 2002; Labra et al. 2004) و به طور طبیعی در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری آسیا، آفریقا، آمریکای مرکزی و جنوبی می روید. از گذشته های دور از ریحان به عنوان یک گیاه دارویی در درمان سردرد، سرفه، اسهال، انگل ها، زگیل ها و ناراحتی های کلیوی استفاده شده است (Labra et al. 2004). در ایران فقط یک گونه ریحان به نام *Ocimum basilicum* وجود دارد که در کرمان، آذربایجان، خراسان و تهران از آن نام برده اند و در تمام نقاط ایران نیز کاشته می شود (Ghahraman 1373). ریحان منبع ترکیبات حلقوی و اسانس است که دافع حشرات بوده و عملکرد ضد انگلی، ضد باکتری، ضد قارچی، ضد ویروسی و آنتی اکسیدانی دارد (Lewinsohn et al. 2000; Juliani et al. 2002; Labra et al. 2004). اسانس ریحان به عنوان ادویه در شیرینی پزی، سالاد، نوشیدنی های غیرالکلی و بستنی و نیز در کارخانجات عطرسازی و محصولات دهانی و دندان نظیر خمیردندان و دهان شویه ها کاربرد دارد (Labra et al. 2004). گونه های ایرانی ریحان در درمان تب، التهاب گلو و درد معده به کار می رود (Javanmardi et al. 2002). اسانس ها متابولیت های ثانویه ای هستند که در دوره رویشی و زایشی گیاهان دارویی تولید می شوند (Biavati et al. 2005). اسانس ریحان به دو گروه ترپنوئیدها (مونوترپن ها و سزکوئی ترپن ها) و فنیل پروپانوئیدها (مانند: اوژنول، چاویکول، متیل سینامات و غیره) تقسیم می شوند (Sangwan et al. 2001). در میان فنیل پروپانوئیدها دو ماده متیل چاویکول و متیل اوژنول از مهم ترین اجزا سازنده اسانس ریحان به شمار می روند. بیوستت ترکیبات فنیل پروپانوئیدی که بخش مهمی از اسانس ریحان می باشد از مسیر شیکیمات می گذرد و توسط چندین گروه از واکنش های آنزیمی از طریق چندین کانال متابولیکی که در آنها این آنزیم ها آزاد یا به اجزای سلولی وصل می شوند، تنظیم می شوند (Dixon et al. 1992). فنیل پروپانوئیدها از سینامیک اسید مشتق می شوند که این ترکیب با عمل آمین زدایی توسط PAL روی L-فنیل آلانین حاصل می شود و این اولین مرحله در تولید

مواد و روش‌ها

کشت و آماده‌سازی ریحان

برای انجام این پژوهش بذره‌های ریحان سبز از مرکز تحقیقات کشاورزی زابل تهیه و در پائیز سال ۱۳۹۱ در گلدان‌ها در خاک تقریباً سبک از مخلوط مساوی ماسه الک شده، رس، گیاجاک و کود حیوانی کشت شد. پس از کشت، گلدان‌ها به گلخانه منتقل شدند و در شرایط یکسان در دمای روزانه ۲۵ تا ۳۰ و شبانه ۱۸ تا ۲۰ درجه سانتی‌گراد تا انتهای مرحله گلدهی رشد کردند. گلدان‌ها روزانه آبیاری شدند و هفته‌ای دو بار به آنها مقدار ۵۰ میلی‌لیتر محلول غذایی هوگلند (Hoagland and Arnon 1938) داده شد.

تیمار با کیتوزان

برای تهیه محلول کیتوزان (شرکت Sigma-Aldrich آمریکا)، با وزن مولکولی پایین، از روش (Khan et al. 2003) استفاده شد. اعمال محلول کیتوزان در مرحله پیش‌گلدهی با غلظت دو گرم در لیتر به صورت محلول‌پاشی روی سطح برگ و در طی یک مرحله انجام شد. لازم به ذکر است که غلظت مورد استفاده بر اساس نتایج به دست آمده قبلی در آزمایشگاه بوده است. سپس اندام‌های هوایی گیاه در زمان‌های یک، ۲، ۳ و ۵ روز پس از تیمار کیتوزان به منظور مطالعات بعدی، برداشت شدند. به این منظور بخش هوایی گیاهان از سطح خاک قطع شد و بخشی از گیاهان برای آزمایش‌های مولکولی با نیتروژن مایع تثبیت شدند و در فریزر در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و بخشی دیگر برای بررسی فعالیت آنزیم در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و در نهایت به منظور استخراج اسانس درصدی از گیاه در دمای اتاق (۲۵ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۳ هفته دور از نور مستقیم، گرما و سرما خشک شدند.

اسانس‌گیری

جهت استخراج اسانس گیاه ریحان از روش تقطیر با آب (Hydrodistillation) و دستگاه اسانس‌گیر طرح کلونجر (Clevenger apparatus) استفاده شد. بدین ترتیب که عمل اسانس‌گیری به مدت سه ساعت ادامه یافت و مایع روغنی بدست آمده به وسیله مواد جاذب رطوبت (سولفات سدیم) خشک شد. اسانس به دست آمده به دقت توزین شده و در ظرف‌های تیره

رنگ تا زمان تجزیه در یخچال نگهداری شد (Shibamoto et al. 1987).

تجزیه اسانس با GC-MS

برای تجزیه اسانس‌ها، از دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف سنج جرمی Thermoquest- Finnigan مدل Jas Chromatograph (USA) Hewlett- Packard 5890 مجهز به ستون DB-5 به طول ۵۰ متر و قطر داخلی ۰/۲ میلی‌متر و ضخامت لایه نازک ۰/۲۵ میکرومتر استفاده شد. دمای آن از ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد تا ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۴ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه افزایش یافت و به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد نگه داشته شد. از گاز حامل هلیوم با سرعت جریان یک میلی‌متر بر دقیقه و انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت استفاده شد.

شناسایی ترکیبات با استفاده از پارامترهای مختلف از قبیل زمان و شاخص بازداری (RI)، مطالعه طیف‌های جرمی و مقایسه این طیف‌ها با ترکیب‌های استاندارد و اطلاعات موجود در کتابخانه رایانه دستگاه GC-MS صورت گرفت (Adams 2001). درصد نسبی هر کدام از ترکیبات تشکیل دهنده اسانس با توجه به سطح زیر منحنی آن در کروماتوگرام GC به روش نرمال کردن سطح نادیده گرفتن ضرایب پاسخ بدست آمد (Shibamoto et al. 1987).

تعیین فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لایاز (PAL)

استخراج پروتئین

۳۰۰ میلی‌گرم از بافت برگ‌های ریحان در ۶/۵ میلی‌لیتر بافر-Tris HCl (۵۰ mM) با (pH = ۸/۸) روی یخ سائیده شد تا حالت همگن در آمد. نمونه در $50000 \times g$ به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. محلول رویی از رسوب با دقت جدا شده و بر روی یخ قرار گرفت. این محلول حاوی آنزیم PAL بود (Wang et al. 2006).

روش سنجش فعالیت آنزیم PAL

برای سنجش فعالیت در یک لوله آزمایش ۰/۵ میلی‌لیتر محلول فنیل آلانین (۱۰ mM)، ۰/۴ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر، ۰/۱ میلی‌لیتر از پروتئین استخراج شده و یک میلی‌لیتر از بافر Tris-HCl (۵۰ mM) با (pH = ۸/۸) اضافه شد و نمونه کنترل تمام ترکیبات

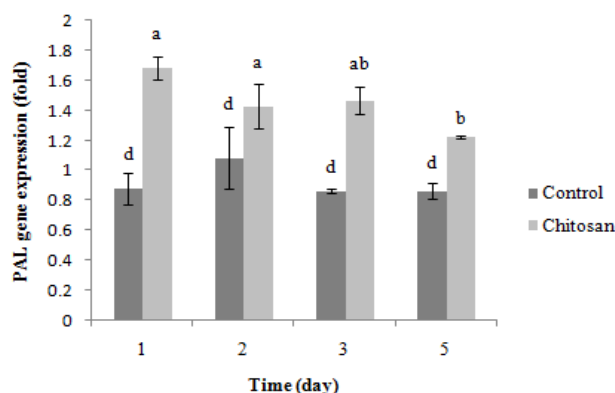
Real time PCR یکسان و طبق جدول ۲ بود. پس از انجام واکنش تکثیر به روش Real time PCR داده‌های خام به صورت Ct (Thresholdcycle) از دستگاه استخراج شد. برای هر نمونه سه تکرار در نظر گرفته شد و از روش $\Delta\Delta Ct$ برای تجزیه داده‌ها استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری

همه آزمایش‌ها با ۳ تکرار و ۳ نمونه مستقل انجام گرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از نسخه ۹/۲ نرم‌افزار SAS و آزمون چند دامنه‌ای در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج بررسی میزان بیان ژن PAL تحت تاثیر کیتوزان نشان داد که بیان ژن PAL در زمان‌های مختلف برداشت نسبت به نمونه‌های شاهد افزایش یافت. بیشترین مقدار بیان ژن PAL یک روز پس از اعمال کیتوزان مشاهده شد و در روز پنجم پس از اعمال کیتوزان کاهش یافت (شکل ۱).



شکل ۱- میزان بیان ژن PAL تحت تاثیر کیتوزان. حروف یکسان عدم معنی-داری در سطح پنج درصد

بررسی فعالیت آنزیم PAL نشان داد که در تمام زمان‌ها کیتوزان باعث افزایش فعالیت آن شد به طوری که بیشترین فعالیت آنزیم PAL یک روز بعد از تیمار کیتوزان حاصل شد و در روز پنجم پس از اعمال کیتوزان کاهش یافت ولی میزان بیان همچنان از نمونه‌های شاهد بیشتر بود (شکل ۲).

به جز پروتئین استخراج شده را شامل می‌شد. نمونه به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد که اوج فعالیت آنزیم PAL است، انکوبه شد. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از HCl (۶ M) برای غیر فعال کردن آنزیم PAL به نمونه اضافه شد. شستشوی نمونه با ۱۵ میلی‌لیتر از اتیل استات در ۵ مرحله انجام شد. سپس نمونه در معرض جریان هوا تبخیر شد. به رسوب حاصل سه میلی‌لیتر از NaOH (۰/۰۵ M) اضافه شد و رسوب کاملاً در آن حل شد. جذب نمونه‌ها به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. از آنجا که یک واحد آنزیم PAL مقداری از آنزیم است که در طی یک دقیقه، یک میکرومول اسید سینامیک را تولید کند، بنابراین فعالیت آنزیم بر حسب واحد آنزیمی با $\mu\text{mol cinnamic acid/min}$ و فعالیت ویژه آنزیمی به صورت $\mu\text{mol cinnamic acid/mg protein/min}$ بیان شد (Wang et al. 2006).

مطالعه بیان ژن PAL

برای استخراج Total RNA از برگ ریحان، از کیت سیناژن محلول RNAX Plus همراه با کلروفورم، ایزوپروپانول، اتانول ۷۵ درصد و آب DEPC (دی اتیل پیرو کربنات) طبق پروتکل شرکت سیناژن استفاده شد. پس از استخراج RNA کل، کیفیت آن به وسیله الکتروفورز ژل آگارز بررسی شد. مرحله بعد از استخراج RNA سنتز DNA معکوس با استفاده از کیت 2-Steps RT-PCR kit ساخت شرکت Vivantis بود. طراحی آغازگرهای اختصاصی برای ژن‌های PAL و Tubulin با استفاده از نرم‌افزار Oligo Therapeutics و سایت Oligonucleotid Properties Calculator انجام شد (جدول ۱).

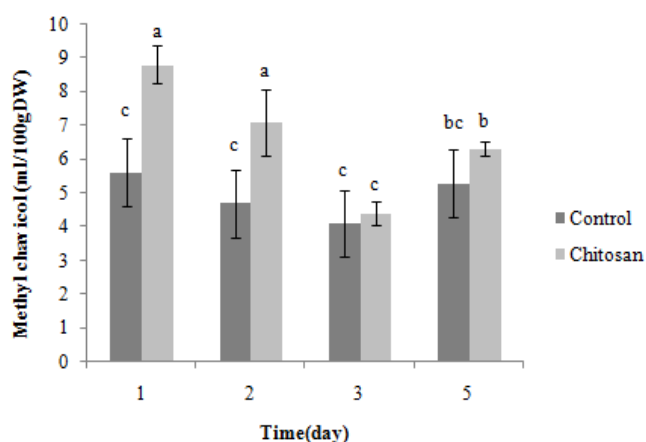
تکثیر ژن‌های PAL و Tubulin برای اندازه‌گیری بیان ژن توسط واکنش Real time PCR بر اساس روش استاندارد به صورت نسبی صورت گرفت. کمیت نسبی در Real time PCR به وسیله اندازه‌گیری افزایش تشعشع فلورسینس در نتیجه اتصال رنگ (Eva Green) با استفاده از دستگاه (RG-3000 Corbett Research) انجام گرفت. اجزای واکنش Real time PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۴ میکرولیتر Master mix، یک میکرولیتر cDNA و یک میکرولیتر از هر آغازگر با هم مخلوط شدند. همچنین برنامه حرارتی برای تکثیر هر دو ژن با استفاده از روش

جدول ۱- آغازگر طراحی شده برای ژن فنیل آلانین آمونیا لایز (PAL) و Tubulin

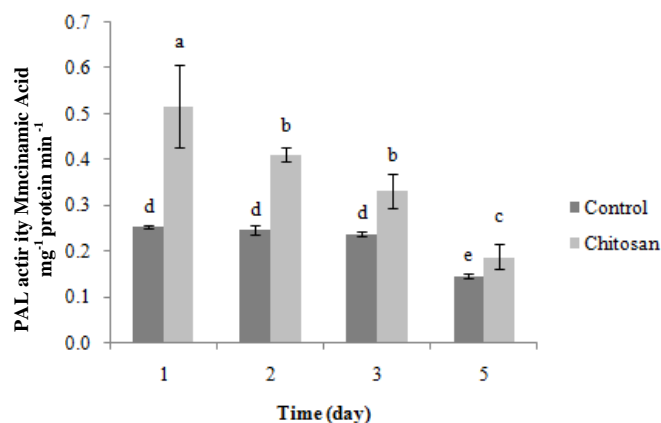
Gene name	Primer sequence (5'-3')	T _m (°C)	GC (%)
F: PAL	CTCAACCTCAACATCACCCC	60.5	55.0
R: PAL	TGAAGCTCAAAGAAGGACGG	58.4	55.0
F: Tub	CTCCTTGAGCTAGTCGTCGC	62.5	60.0
R: Tub	ACAAGGCAAAAACATTCCG	54.3	40.0

جدول ۲- شرایط دمایی و زمانی واکنش Real time PCR

مرحله	دما و زمان مورد استفاده
فعال سازی ابتدایی آنزیم	۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه
۴۰ چرخه شامل مراحل زیر	
واسرشت شدن	۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه
اتصال آغازگرها	۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه
بسط ترکیبی	۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه
منحنی ذوب	افزایش دما از ۵۰ درجه سانتی گراد تا ۹۹ درجه هر ۵ ثانیه یک درجه



شکل ۳- مقدار متیل چاویکول تحت تاثیر کیتوزان. حروف یکسان بیانگر عدم معنی داری در سطح ۵ درصد می باشد.

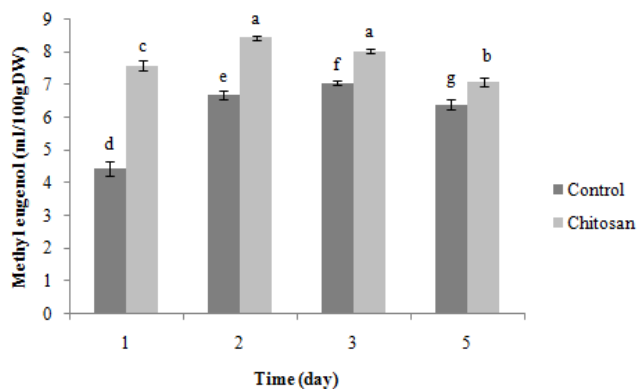


شکل ۲- فعالیت آنزیم PAL تحت تاثیر کیتوزان. حروف یکسان بیانگر عدم معنی داری در سطح ۵ درصد می باشد.

نتایج بررسی متیل اوژنول تحت تاثیر کیتوزان نشان داد که در تمام زمان ها متیل اوژنول تحت تاثیر کیتوزان در نسبت به نمونه های شاهد افزایش نشان داد به طوری که در روز دوم و سوم به بیشترین مقدار خود رسیده است (شکل ۴).

بررسی مقدار متیل چاویکول تحت تاثیر کیتوزان نشان داد که که متیل چاویکول در روز اول و دوم تحت تاثیر کیتوزان افزایش یافت. در روز سوم و پنجم در میزان متیل چاویکول نسبت به روز اول و دوم کاهش مشاهده شد که با نمونه های شاهد اختلاف معنی داری نشان نداد (شکل ۳).

بیوسنتز فنیل پروپانوئیدها توسط یک گروه آنزیمی هدایت می‌شود که این آنزیم‌ها یا به صورت آزاد و یا در ارتباط با غشاهای سلولی می‌باشند (Sreere 1987). تمام ترکیبات فنیل پروپانوئیدی از سینامیک اسید مشتق می‌شوند که این ترکیب از عمل آمین زدایی توسط آنزیم PAL روی L-فنیل آلانین حاصل می‌شود. آنزیم PAL یکی از مهمترین آنزیم‌های حد واسط بین متابولیسم اولیه و ثانویه در گیاهان است و اولین آنزیم در مسیر تولید ترکیبات فنلی گیاه و فنیل پروپانوئیدها می‌باشد که یک عامل کلیدی تنظیم کننده در مسیر بیوسنتزی این ترکیبات به شمار می‌رود (Dixon and Paiva 1995). مطالعات اندکی در مورد اثر الیستورها بر میزان بیان ژن PAL و فعالیت آنزیم PAL صورت گرفته‌است. تحقیق حاضر نخستین گزارش اثر کیتوزان بر بیان ژن PAL و اسانس گیاه ریحان است. مطالعات متعددی نشان داده‌اند که ترکیبات اصلی دیواره سلولی بسیاری از گونه‌های قارچی، مانند کتین و کیتوزان، باعث افزایش میزان متابولیت‌های ثانویه می‌شود (Kang et al. 2009; Pu et al. 2004). مطالعات نشان می‌دهد که فعالیت آنزیم PAL تحت تاثیر کیتوزان نیز افزایش می‌یابد (Chakraborty et al. 2009). افزایش فنیل اتانوئید گلیکوزید در ارتباط با افزایش فعالیت آنزیم PAL تحت تاثیر کیتوزان بود (Cheng et al. 2006). در مطالعه‌ای تحت تاثیر کیتوزان میزان فعالیت آنزیم PAL افزایش یافته که حداکثر فعالیت پس از گذشت سه روز مشاهده شد (Esmaeilzadeh et al. 1391). در این تحقیق کیتوزان بر میزان بیان ژن PAL و فعالیت آنزیم PAL مورد بررسی قرار گرفت نتایج بررسی بیان ژن و فعالیت آنزیم PAL در مرحله پیش‌گلدهی در زمان‌های مختلف برداشت بیانگر این بود که فعالیت و بیان ژن در مراحل مختلف برداشت سیر کاهشی داشت به طوری که بیشترین مقدار بیان ژن و فعالیت آنزیم PAL در یک روز پس از اعمال تیمار کیتوزان حاصل گشت و در روز پنجم پس از اعمال کیتوزان کاهش یافت. به‌طور کلی روند تغییرات میزان بیان ژن و فعالیت آنزیم PAL با روند تغییرات ترکیبات فنل پروپانوئیدی همچون متیل چاویکول، متیل اوژنول در مراحل مختلف برداشت مطابقت داشت به طوری که با افزایش بیان ژن و فعالیت آنزیم PAL مقدار متیل چاویکول، متیل اوژنول گیاه افزایش می‌یابد.



شکل ۴- مقدار متیل اوژنول تحت تاثیر کیتوزان. حروف یکسان بیانگر عدم معنی‌داری در سطح ۵ درصد می‌باشد.

ریحان (*Ocimum basilicum*) همانند سایر گیاهان خانواده نعناعیان چون نعناع (*Mentha*)، مریم گلی (*Salvia*)، مرزنجوش (*Origanum*) و آویشن (*Thyme*) به علت اسانسی که تولید می‌کند به طور وسیعی کشت می‌شود (Lewinsohn et al. 2000). سنتز اسانس در گیاهان تحت تاثیر عواملی چون آنتوژنی گیاه، مکان تولید اسانس، فتوسنتز، تغییرات فتوپریودیک، اثرات شدت نور، تنوع فصلی، شرایط اقلیمی، روابط تغذیه‌ای، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و نیز تنش‌های محیطی چون خشکی، شوری و دما تغییر می‌کند (Werker et al. 1993). همچنین شرایط اکولوژیکی و اقلیمی نیز می‌تواند تاثیر زیادی در بازده و تنوع ترکیبات اسانس بگذارد. از طرفی دیگر بلوغ و آنتوژنی برگ یا سن برگ به طور چشمگیری بر روی بازده اسانس موثر است. بازده اسانس در طول رشد رویشی ریحان سبز و بنفش تا مرحله پیش‌گلدهی افزایش می‌یابد و به هنگام گلدهی کاهش می‌یابد. به عبارت دیگر بیشترین مقدار اسانس در ریحان زمانی است که گیاه در مراحل نهایی رشد رویشی خود قرار دارد (Ziaei et al. 2012). در تحقیق حاضر، نتایج بررسی ترکیب‌های تشکیل‌دهنده اسانس ریحان سبز در مرحله پیش‌گلدهی نشان داد که مهمترین ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس متیل چاویکول و متیل اوژنول می‌باشد. در تحقیقات دیگر، متیل چاویکول، لینالول، متیل سینامات، کامفور، متیل اوژنول، اوژنول و ژرانیول مهمترین اجزای اسانس در کولتیوارهای مختلف ریحان گزارش شده است (Marotti et al. 1996; Sangwan et al. 2001; Vinaand Murillo 2003; Sajjadi 2006).

کیتوزان به عنوان الیستور زیستی کارآمد که از طریق القای سیستم دفاعی باعث بهبود بخشیدن بیوستنز متابولیت‌های ثانویه می‌شود در بسیاری از گیاهان دارویی استفاده کرد و به نظر می‌رسد این گامی با ارزش در جهت مهندسی متابولیت و تولید داروهای گیاهی باشد.

Ziaei et al. (2012) گزارش کردند روند تغییرات میزان بیان ژن و فعالیت PAL با روند تغییرات میزان متیل چاویکول در مراحل مختلف رشد ریحان مطابقت دارد. از آنجا که در این تحقیق نتایج حاصل از میزان بیان و فعالیت آنزیم PAL در مرحله پیش‌گلدهی با نتایج حاصل از بازده اسانس مطابقت دارد، بنابراین می‌توان از

منابع

Achnine L, Blancaflor EB, Rasmussen S, Dixon RA (2004) Colocalization of L-phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-Hydroxylase formetabolic channeling in phenylpropanoidbiosynthesis. *Plant Cell* 16:3098-3109.

Adams RP (2001) Identification of essential oils components by gas chromatography/ quadrupole mass spectroscopy. Allured Publishing Co., Illinois, USA, 119-146.

Biavati B, Piccaglia R, Marotti M (2005) Antimicrobial activity of plant essential oils. *Food Chemistry* 92:128-137.

Bjorn H, Muller R (2003) Possibility of bacterial recruitment of plant genes associated with the biosynthesis of secondary metabolites. *Journal of Plant Physiology* 132:1153-1161.

Chakraborty M, Karun A, Mitra A (2009) Accumulation of phenylpropanoid derivatives in chitosan-induced cell suspension culture of *Cocosnucifera*. *Journal of Plant Physiology* 166:63-71.

Cheng X, Zhou U, Cui X (2006) Improvement of phenylethanoid glycosides biosynthesis in *Cistanche deserticola* cell suspension cultures by chitosan elicitor. *Journal of Biotechnology* 121:253-260.

Creasy LL (1987) The role of enzyme in activation in the regulation of 19 synthetic pathways: A case history. *Journal of Plant Physiology* 71:389-392.

Dixon RA, Choudhary AD, Dalkin D, Edwards R, Fahrendorf T, Gowri G, Harrison MJ, Lamb CJ, Loake GJ, Maxwell CA, Orr J, Paiva NL (1992) Molecular biology of stress induced phenylpropanoid and isoflavonoid biosynthesis in alfalfa, In H.A, Stafford and R.K, Ibrahim (eds). *Phenolic Metabolism in Plants* 91-138.

Dixon RA, Paiva NL (1995) Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *Plant Cell* 7:1085-1097.

Esmailzadeh Bahabadi S, Sharifi M, Safaie N, Behmanesh M (2012) Enhancement of lignin and phenylpropanoid compounds production by chitosan in *Linum album* cell culture. *Journal of Plant Biology* 11:13-26 (In Farsi).

Hoagland DR, Arnon DI (1938) The water-method for growing plants without soil. Berkeley: University of California.

Howles PA, Sawalt VJH, Paiva NL, Elkind Y, Bate NJ, Lamb C, Dixon RA (1996) Overexpression of L-phenylalanine ammonia- lyase in transgenic tobacco plants

reveals control points for flux into phenylpropanoid biosynthesis. *Journal of Plant Physiology* 112:1617-1624.

Iijima Y, Rikanati RD, Fridman E, Gang DR, 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. *Journal of Plant Physiology* 136:3724-3736.

Javanmardi J, Khalighi A, Kashi A, Bais, HP, Vivanco JM (2002) Chemical characterization of basil (*Ocimum basilicum* L.) found in local accessions and used in traditional medicines in Iran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:5878-5883.

Juliani HR, Simon JE (2002) Antioxidant Activity of Basil, Trends in new crops and new uses. 575-579.

Kang SM, Jung HY, Kang YM, Yun DJ, Bahk JD, Yang JK, Choi MS (2004) Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on the production of tropane alkaloids and the expression of PMT and H6H in adventitious root cultures of *Scopoliaparviflora*. *Plant Science* 166:745-751.

Khan W, Prithiviraj B, Smith DL (2003) Chitosan and chitin oligomers increase phenylalanine ammonia-lyase and tyrosine ammonia-lyase activities in soybean leaves. *Journal of Plant Physiology* 160:859-863.

Kim HY, Chen F, Wang Z, Rajapakse N (2006) Effect of methyl jasmonate on secondary metabolites of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:2327-2332.

Koukol J, Conn EE (1961) The metabolism of aromatic compounds in higher plants, IV Purification and properties of the phenylalanine deaminase of *Hordeumvulgare*. *Journal of Biology Chemistry* 236:2692-2698.

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

Lewinsohn E, Ziv-Raz I, Dudai N, Tadmor Y, Lastochkin E, Larkov O, Chaimovitch D, Ravid U, Putievsky E, Pichersky E, Shoham Y (2000) Biosynthesis of estragole and methyl- eugenol in sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.) Developmental and chemotypic association of allylphenol O-methyltransferase activities. *Plant Science* 160:27-35.

Marotti M, Piccaglia R, Giovanelli E (1996) Difference in essential oil composition of basil (*Ocimum basilicum* L.) Italian cultivars related to morphological characteristics. *Journal of Agronomic Food Chemistry* 44:392-399.

- Meek CR, Bidlack JE (2005) Arthropod population, phenylalaninamonia- lyase activity and fresh weight of Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.) as affected by plant age and *Bacillus thuringiensis* treatment. *Plant Science* 85:9-17.
- Pu GB, Dong-Ming M, Chen JL, Ma LQ, Wang H, Li GF (2009) Salicylic acid activates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. *Plant Cell Report* 28:1127-1135.
- Ritter H, Schulz GE (2004) Structural Basis for the Entrance into the Phenylpropanoid Metabolism Catalyzed by Phenylalanine Ammonia-Lyase. *Plant Cell* 16:3426-3436.
- Sajjadi SE (2006) Analysis of the essential oils of two cultivated Basil (*Ocimum basilicum* L.) from Iran. *Daru* 14:1-3.
- Sangwan NS, Farooqi AHA, Shabih F, Sangwan RS (2001) Regulation of essential oil production in plants, *Plant Growth Regulation* 34:3-21.
- Shibamoto T, Sandra P, Bicchi C (1987) Capillary gas chromatography in essential oil analysis. *Plant Science* 135:921-927.
- Srere PA (1987) Complexes of sequential metabolic enzymes. *Journal of Biochemistry* 56:89-124.
- Vina A, Murillo E (2003) Essential oil composition from twelve varieties of basil (*Ocimum spp*) grown in Colombia. *Journal of Brazilian Chemical Society* 5:744-749.
- Wajahatullah Kh, Balakrishnan P, Donald S (2003) Chitosan and chitin oligomers increase phenylalanine ammonia-lyase and tyrosine ammonia-lyase activities in soybean leaves. *Journal of Plant Physiology* 160: 859-863.
- Wang J, Zheng L, Wu J, Tan R (2006) Involvement of nitric oxide in oxidative burst, phenylalanine ammonia-lyase activation and Taxol production induced by low-energy ultrasound in *Taxus yunnanensis* cell suspension cultures. *Cell Physiology* 14:391-397.
- Werker E, Putievsky E, Ravid U, Dudai N, Katzir I (1993) Glandular h and essential oil in developing leaves of *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae). *Annual Botany* 71:43-50.
- Ziaei M, Sharifi M, Behmanes, M, Razavi K (2012) Gene expression and activity of phenyl alanine ammonialyase and essential oil composition of *Ocimum basilicum* L. at different growth stage. *Journal of Biotechnology* 10:32-39.
- Zhao J, Davis LC, Verpoorte R (2005) Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances* 23:283-333.