

افزایش بیان ژن فنیل آلانین آمونیالیاز *PAL* و ترکیبات فنیل پروپانوئیدی 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، براعتلی فاخری^۱، صدیقه اسمعیلزاده بهابادی^{*}، حسین کمال الدینی^۱

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

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

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

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: esmaeilzadeh@uozi.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 الیستور ذیستی در بهبود بیوسنتر متابولیت‌های ثانوی استفاده می‌شود. در این پژوهش، اثر کیتوزان بر ترکیبات فنیل پروپانوئیدی و بیان ژن و فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (*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 آنها 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 پروپانوئیدی در زمان‌های مختلف برداشت مطابقت داشت. بنابراین کیتوزان به عنوان الیستور ذیستی از طریق افزایش بیان ژن و فعالیت آنزیم *PAL* سبب افزایش ترکیبات فنیل پروپانوئیدی شد.

واژه‌های کلیدی

اسانس

بیان ژن

ریحان

PAL gene

مقدمه

Achnine et al. 2004; Iijima et al.) 2004). این آنزیم یک آنزیم حد واسط بین متابولیسم اوایله و ثانویه (فنیل پروپانوئید) می‌باشد (Adams 2001), که برای اولین بار توسط Koukol and Conn (1961) شرح داده شد و بطور وسیعی در گیاهان مورد مطالعه قرار گرفت. متابولیت‌هایی که در نتیجه فعالیت PAL به وجود می‌آیند به عنوان مشتقات فنلی طبقه‌بندی می‌شوند که شامل کومارین‌ها، اسانس‌ها، فلاکونوئیدها، لیگنین و تانن می‌باشند. این ترکیبات در بیماری‌ها، مقاومت به آفات و پراکندگی دانه و گرده افسانه‌ای دخالت دارند (Creasy 1967; Howles et al. 1996; Iijima et al. 2004; Ritter and Schulz 2004; Meek and Bidlack 2005). روش‌های متعددی برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه وجود دارد. الیستیورها ترکیباتی با منشا زیستی یا غیر زیستی هستند که از طریق القای سیستم دفاعی باعث بیوسنتز و انباست متابولیت‌های ثانویه می‌شوند (Zhao et al. 2005). کیتوزان از ترکیبات اصلی دیواره سلولی بسیاری از گونه‌های قارچی است. کیتوزان یک پلی ساکارید پلی کاتیونی، به عنوان الیستیور زیستی کارآمد برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارویی زیادی تایید شده‌است (Cheng et al. 2006). مطالعات اندکی در زمینه استفاده از الیستیورها به منظور تولید بیشتر متابولیت‌های ثانویه گیاه ریحان انجام شده‌است. افزایش تولید دو ترکیب فنلی اسید رزمارینیک (RA) و اسید کافنیک (CA) تحت تاثیر متیل جاسمونات گزارش شده‌است (Kim et al. 2006). تحقیقات نشان داده الیگومرهای کیتوزان و کیتین فعالیت آنزیم‌های فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) و تیروزین آمونیالیاز (TAL) را در برگ‌های سویا افزایش می‌دهد (Wajahatullah et al. 2003). افزایش بیان ژن و فعالیت آنزیم PAL تحت تاثیر کیتوزان نیز گزارش شده است (Esmaeilzadeh et al. 1391). بررسی‌ها نشان داده کیتوزان باعث افزایش سریع و قابل توجهی در میزان مشتقات فنیل پروپانوئیدی در کشت تعیقی نارگیل می‌شود (Chakraborty et al. 2009). از آنجا که آنزیم PAL تنظیم کننده ابتدای مسیر بیوسنتز ترکیبات فنیل پروپانوئیدی می‌باشد، 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.

ريحان با نام علمی *Ocimum basilicum* گیاه دارویی یکساله و علفی از خانواده (Lamiaceae) است. جنس *Ocimum* بین ۵۰ تا ۱۵۰ گونه علفی و بوته‌ای 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 می‌روید. از گذشته‌های دور از ریحان به عنوان یک گیاه دارویی در درمان سردرد، سرفه، اسهال، انگل‌ها، زگیل‌ها و ناراحتی‌های 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 برده‌اند و در تمام نقاط ایران نیز کاشته می‌شود (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 Lewinsohn et al. 2000; Juliani et al. 2002; Labra et al. (2004). اسانس ریحان به عنوان ادویه در شیرینی‌پزی، سالاد، نوشیدنی‌های غیرالکلی و بستنی و نیز در کارخانجات عطرسازی و محصولات دهانی و دندانی نظیر خمیردنان و دهان‌شویه‌ها کاربرد دارد (Labra et al. 2004). گونه‌های ایرانی ریحان در درمان تب، التهاب گلو و درد معده به کار می‌رود (Javanmardi et al. 2002). اسانس‌ها متابولیت‌های ثانویه‌ای هستند که در دوره رویشی و زایشی گیاهان دارویی تولید می‌شوند (Biavati et al. 2005). اسانس ریحان به دو گروه ترپن‌های (مونوترين‌ها و سزکوئی ترپن‌ها) و فنیل پروپانوئیدها (مانند: اوژنول، چاویکول، متیل سینامات و غیره) تقسیم می‌شوند (Sangwan et al. 2001). در میان فنیل پروپانوئیدها دو ماده متیل چاویکول و متیل اوژنول از مهم‌ترین اجزا سازنده اسانس ریحان به شمار می‌روند. بیوسنتز ترکیبات فنیل پروپانوئیدی که بخش مهمی از اسانس ریحان می‌باشد از مسیر شیکیمات می‌گذرد و توسط چندین گروه از واکنش‌های آنزیمی از طریق چندین کanal متابولیکی که در آنها این آنزیم‌ها آزاد یا به اجزای سلولی وصل می‌شوند، تنظیم می‌شوند (Dixon et al. 1992). فنیل پروپانوئیدها از سینامیک اسید مشتق می‌شوند که این ترکیب با عمل آمین‌زدایی توسط PAL روی L-فینیل آلانین حاصل می‌شود و این اولین مرحله در تولید

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 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 آون از ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد تا ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۴ درجه سانتی‌گراد بر دقيقه افزایش یافت و به مدت ۱۰ دقيقه در ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد نگه داشته شد. از گاز حامل هلیوم با سرعت جريان یک میلی‌متر بر دقيقه و انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت استفاده شد.

شناسایی ترکیبات با استفاده از پارامترهای مختلف از قبیل زمان و ساختار 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 و شیباشی (Shibamoto et al. 1987).

تعیین فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) استخراج پروتئین

۳۰۰ میلی‌گرم از بافت برگی ریحان در ۶/۵ میلی‌لیتر بافر-Tris (۵۰ mM HCl pH = ۸/۸) با 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

مواد و روش‌ها

کشت و آماده‌سازی ریحان

برای انجام این پژوهش بذرهای 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، گیاخاک 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 محلول پاشی 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 ثبت 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

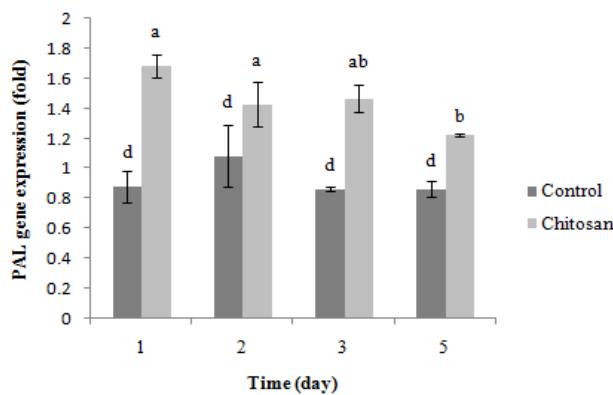
Real time PCR يكسان و طبق جدول ۲ بود. پس از انجام واکنش Ct تکثیر به روش QReal time PCR داده‌های خام به صورت Ct (Thresholdcycle) از دستگاه استخراج شد. برای هر نمونه سه تکرار در نظر گرفته شد و از روش $\Delta\Delta Ct$ برای تجزیه داده‌ها استفاده شد.

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 درسطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

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



شکل ۱- میزان بیان ڙن *PAL* تحت تاثیر کیتوzan. حروف یكسان عدم معنی داری در سطح پنج درصد

بررسی فعالیت آنزیم *PAL* نشان داد که در تمام زمان‌ها کیتوzan باعث افزایش فعالیت آن شد به طوری که بیشترین فعالیت آنزیم *PAL* یک روز بعد از تیمار کیتوzan حاصل شد و در روز پنجم پس از اعمال کیتوzan 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 غیرفعال 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 ۰/۰۵ M NaOH اضافه شد و رسوب کاملاً در آن حل شد. جذب نمونه‌ها به وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر 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 $\mu\text{mol cinnamic acid}/\text{min}$ و فعالیت ویژه آنزیمی به صورت acid/min acid/mg protein/min مطالعه بیان ڙن *PAL* (Wang et al. 2006) بود.

برای استخراج RNA از برگ ریحان، از کیت سیناژن محلول RNase Plus ۷۵ همراه با کلروفرم، ایزوپروپانول، اتانول 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 2-Steps RT-PCR RNA معکوس با استفاده از کیت RNA kit ساخت شرکت Vivantis بود. طراحی آغازگرهای اختصاصی Oligo برای ڙن‌های *PAL* و *Tubulin* با استفاده از نرم‌افزار Oligonucleotid Properties Calculator و سایت Therapeutics

انجام شد (جدول ۱).

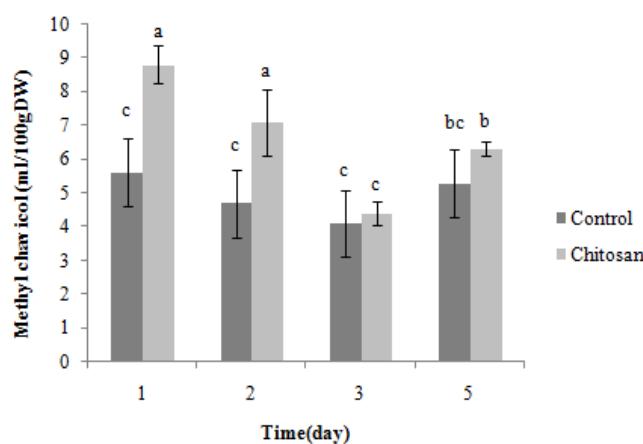
تکثیر ڙن‌های *PAL* و *Tubulin* برای اندازه‌گیری بیان ڙن توسط واکنش Real time PCR بر اساس روش استاندارد به صورت نسبی صورت گرفت. کمیت نسبی در Real time PCR به وسیله Eva Green (RG-3000 Corbett Research) با استفاده از دستگاه انجام گرفت. اجزای واکنش Real time PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۴ میکرولیتر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

جدول ۱- آغازگر طراحی شده برای ژن فنیل آلانین آمونیالیاز (*PAL*) و *Tubulin*

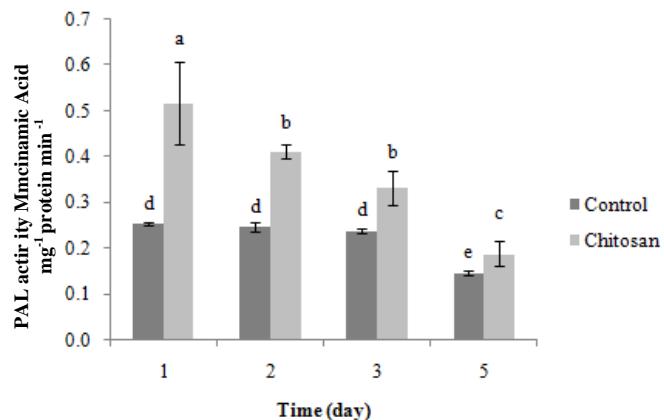
Gene name	Primer sequence (5'-3')	T _m (°C)	GC (%)
F: PAL	CTCAACCTCAACATCACCCCC	60.5	55.0
R: PAL	TGAAGCTCAAAGAAGGACGG	58.4	55.0
F: Tub	CTCCTTGAGCTAGTCGTCGC	62.5	60.0
R: Tub	ACAAGGCAAAACATTCCG	54.3	40.0

جدول ۲- شرایط دمایی و زمانی واکنش Real time PCR

مراحله	دما و زمان مورد استفاده
فعال سازی ابتدایی آنزیم	۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه
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.

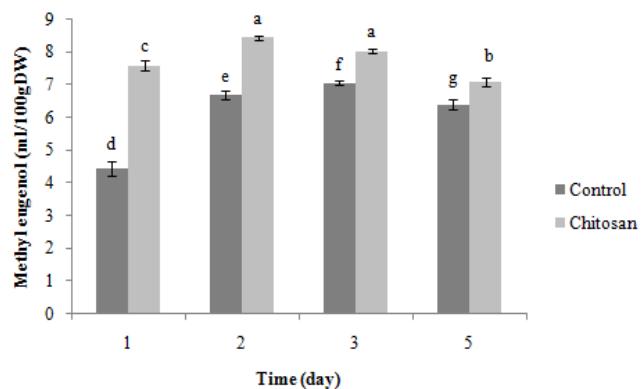


شکل ۲- فعالیت آنزیم *PAL* تحت تاثیر کیتوزان. حروف یکسان بیانگر عدم معنی داری در سطح ۵ درصد می باشد.

نتایج بررسی متیل اوژنول تحت تاثیر کیتوزان نشان داد که در تمام زمان‌ها متیل اوژنول تحت تاثیر کیتوزان در نسبت به نمونه‌های 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 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 نمونه‌های شاهد اختلاف معنی داری نشان نداد (شکل ۳).

بیوسنتز فنیل پروپانوئیدها توسط یک گروه آنزیمی هدایت می-شود که این آنزیم‌ها یا به صورت آزاد و یا در ارتباط با غشاهای سلولی می‌باشند (Srere 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 فنیل گیاه و فنیل پروپانوئیدها می‌باشد که یک عامل کلیدی تنظیم کننده در مسیر بیوسنتز این ترکیبات به شمار می‌رود (Dixon and Paiva 1995). مطالعات اندکی در مورد اثر الیسترورها بر میزان بیان ژن PAL و فعالیت آنزیم PAL صورت گرفته است. تحقیق حاضر نخستین گزارش اثر کیتوزان بر بیان ژن PAL و انسانس گیاه ریحان است. مطالعات متعددی نشان داده‌اند که ترکیبات اصلی دیواره سلولی بسیاری از گونه‌های قارچی، مانند کتین و کیتوزان، Kang et al. (2004; Pu et al. 2009) تحت تاثیر کیتوزان نیز افزایش می‌شود (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 حداقل 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. به طور 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 بیانگر عدم معنی داری در سطح ۵ درصد می‌باشد.

ریحان (*Ocimum basilicum*) همانند سایر گیاهان خانواده نعناعیان چون نعناع (*Salvia*), مریم گلی (*Mentha*), مرزنجوش (*Thyme*) و آویشن (*Origanum*) کند به طور وسیعی کشت می‌شود (Lewinsohn et al. 2000). ستر انسانس در گیاهان تحت تاثیر عواملی چون آتوژنی گیاه، مکان تولید انسانس، فتوسنتز، تغییرات فتوپریودیک، اثرات شدت نور، تنوع فصلی، شرایط اقلیمی، روابط تغذیه‌ای، تنظیم کننده‌های 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 انسانس بگذارد. از طرفی دیگر بلوغ و آتوژنی برگ یا سن برگ به طور چشمگیری بر روی بازده انسانس موثر است. بازده انسانس در طول رشد رویشی ریحان سبز و بنفش تا مرحله پیش‌گلدهی افزایش می‌یابد و به هنگام گلدهی کاهش می‌یابد. به عبارت دیگر بیشترین مقدار انسانس در ریحان زمانی است که گیاه در مراحل نهایی رشد رویشی خود قرار دارد (Ziae et al. 2012). در تحقیق حاضر، نتایج بررسی ترکیبات تشکیل‌دهنده انسانس ریحان سبز در مرحله پیش‌گلدهی نشان داد که مهمترین ترکیبات تشکیل-دهنده انسانس متیل چاویکول و متیل اوژنول می‌باشد. در تحقیقات مختلف ریحان گزارش شده است (Marotti et al. 1996; Sangwan et al. 2001; Vina and Murillo 2003; Sajjadi 2006).

کیتوزان به عنوان الیستیور زیستی کارآمد که از طریق القای سیستم دفاعی باعث بهبود بخشیدن بیوستز 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.

منابع

- Achnine L, Blancaflor EB, Rasmussen S, Dixon RA (2004) Colocalization of L-phenylalanineammonia-lyase and cinnamate 4-Hydroxylase form metabolic 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 isoflavanoid 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.
- Esmaeilzadeh Bahabadi S, Sharifi M, Safaei 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-phenylalaninamonia- lyaseintransgenictabacco plants

Ziae et al. (2012) گزارش کردند روند تغییرات میزان بیان ژن و فعالیت PAL با روند تغییرات میزان میتل 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 پیش گلدهی با نتایج حاصل از بازده اسانس مطابقت دارد، بنابراین می‌توان از

- 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 *Scopolia parviflora*. *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 *Hordeum vulgare*. *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, Chaimovitsh 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.
- Ziae 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.