ژنتیک نوین
دوره نهم، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۳
صفحه ۲۶۶- ۲۵۹

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]، براتعلی فاخری[۱]، صدیقه اسمعیل‌زاده بهابادی*[۱]، حسین کمال الدینی[۱]

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

Naderi S[1], Fakheri BA[1], Esmaeilzadeh Bahabadi S[*1], Kamaladini H[1]

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

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: esmaeilzadeh@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 آنتی‌اکسیدانی دارد. کیتوزان از ترکیبات اصلی دیواره سلولی بسیاری از گونه-های قارچی است که به عنوان الیسیتور زیستی در بهبود بیوسنتز متابولیت‌های ثانوی استفاده می‌شود. در این پژوهش، اثر کیتوزان بر ترکیبات فنیل‌پروپانوئیدی و بیان ژن و فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور گیاه ریحان در مرحله پیش‌گلدهی 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 فنیل‌پروپانوئیدی در زمان‌های مختلف برداشت مطابقت داشت. بنابراین کیتوزان به عنوان الیسیتور زیستی از طریق افزایش بیان ژن و فعالیت آنزیم PAL سبب افزایش ترکیبات فنیل پروپانوئیدی شد.

واژه‌های کلیدی

اسانس
بیان ژن
ریحان
PAL gene

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

[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.3.2.5]

مقدمه

ریحان 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 شده‌است (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 دارد (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 خمیردندان 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 ترپنوئیدها (مونوترپن‌ها 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 کانال متابولیکی که در آنها این آنزیم‌ها آزاد یا به اجزای سلولی وصل می‌شوند، تنظیم می‌شوند (Dixon et al. 1992). فنیل پروپانوییدها از سینامیک اسید مشتق می‌شوند که این ترکیب با عمل آمین‌زدایی توسط PAL روی L–فنیل آلانین حاصل می‌شود و این اولین مرحله در تولید فنیل‌پروپانوئیدها است (Achnine et al. 2004; Iijima et al. 2004). این آنزیم یک آنزیم حد واسط بین متابولیسم اولیه 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، فلاوونوئیدها، لیگنین و تانن می‌باشند. این ترکیبات در بیماری‌ها، 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). روش‌های متعددی برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه وجود دارد. الیسیتورها ترکیباتی با منشا زیستی یا غیر زیستی هستند که از طریق القای سیستم دفاعی باعث بیوسنتز و انباشت 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 الیسیتور زیستی کارآمد برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارویی زیادی تایید شده‌است (Cheng et al. 2006). مطالعات اندکی در زمینه استفاده از الیسیتورها به منظور تولید بیشتر متابولیت‌های ثانویه گیاه ریحان انجام شده‌است. افزایش تولید دو ترکیب فنلی اسید رزمارینیک (RA) و اسید کافئیک (CA) تحت تاثیر متیل جاسمونات گزارش شده‌است (Kim et al. 2006). تحقیقات نشان داده الیگومرهای کیتوزان وکیتین فعالیت آنزیم های فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز (PAL) وتیروزین 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 فنیل‌پروپانوئیدی در کشت تعلیقی 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.

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

[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.3.2.5]

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 هفته ای 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 (Hydrodistilation) 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 آون 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 و نادیده گرفتن ضرایب پاسخ بدست آمد (Shibamoto et al. 1987).

تعیین فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز (PAL)

استخراج پروتئین

۳۰۰ میلی‌گرم از بافت برگی ریحان در ۶/۵ میلی‌لیتر بافر Tris–HCl (۵۰mM) با (pH =۸/۸) روی یخ سائیده شد تا حالت همگن در آمد. نمونه در $g \times$ ۵۰۰۰۰ 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 فنیل‌آلانین (۱۰ mM)، ۰/۴ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر، ۰/۱ میلی‌لیتر از پروتئین استخراج شده و یک میلی‌لیتر از بافر Tris–HCl (۵۰mM) با (pH =۸/۸) اضافه شد و نمونه کنترل تمام ترکیبات

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.3.2.5]

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 کاملا 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 µmol cinnamic acid/min و فعالیت ویژه آنزیمی به صورت µmol 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 کلروفرم، 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 فلورسنس 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.

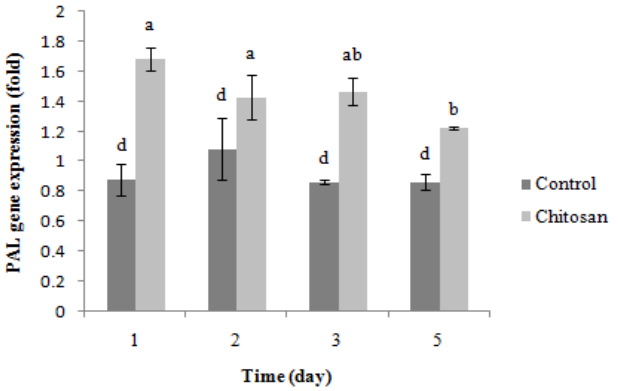
همچنین برنامه حرارتی برای تکثیر هر دو ژن با استفاده از روش Real time PCR یکسان و طبق جدول۲ بود. پس از انجام واکنش تکثیر به روش QReal time PCR داده‌های خام به صورت Ct (Thresholdcycle) از دستگاه استخراج شد. برای هر نمونه سه تکرار در نظر گرفته‌شد و از روش ΔΔCt برای تجزیه داده‌ها استفاده شد.

تجزیه وتحلیل 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 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 (شکل۱).



شکل۱- 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).

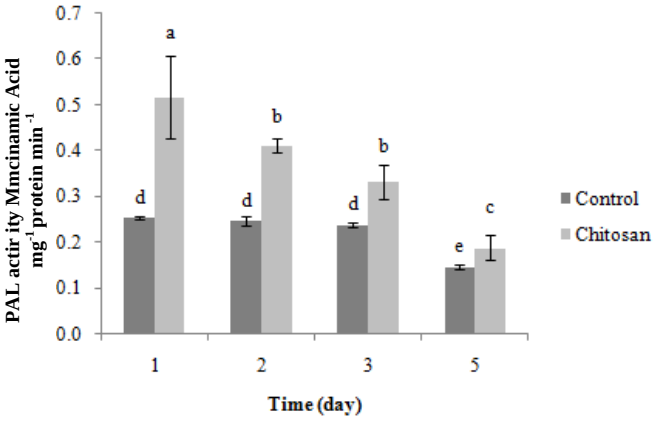
[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.3.2.5]

جدول۱- آغازگر طراحی شده برای ژن فنیل آلانین آمونیالیاز (*PAL*) و *Tubulin*

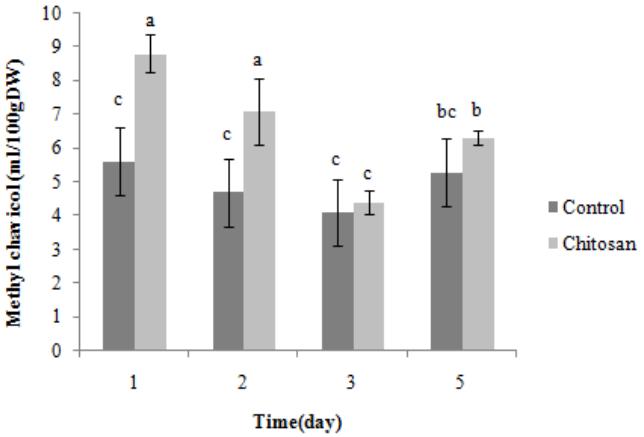
Gene name	Primer sequence (5′-3′)	T_m (ºC)	GC (%)
F: PAL	CTCAACCTCAACATCACCCC	60.5	55.0
R: PAL	TGAAGCTCAAAGAAGGACGG	58.4	55.0
F: Tub	CTCCTTGAGCTAGTCGTCGC	62.5	60.0
R: Tub	ACAAGGCAAAAACATTCCG	54.3	40.0

جدول۲- شرایط دمایی و زمانی واکنش Real time PCR

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



شکل ۲- فعالیت آنزیم PAL تحت تاثیر کیتوزان. حروف یکسان بیانگر عدم معنی‌داری درسطح ۵ درصد می‌باشد.

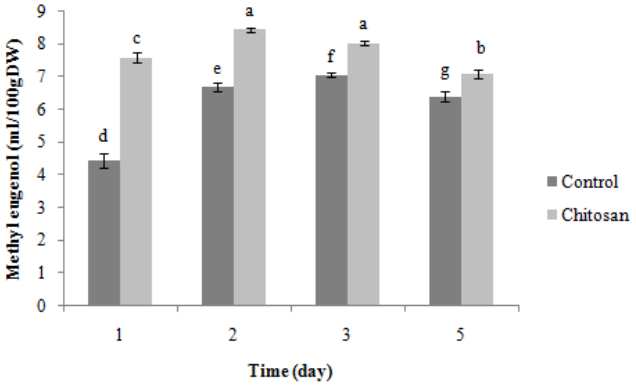


شکل۳- مقدار متیل چاویکول تحت تاثیر کیتوزان. حروف یکسان بیانگر عدم معنی‌داری درسطح ۵ درصد می‌باشد.

بررسی مقدار متیل چاویکول تحت تاثیر کیتوزان نشان داد که که متیل‌چاویکول 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 معنی‌داری نشان نداد (شکل ۳).

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 طوری‌که در روز دوم و سوم به بیشترین مقدار خود رسیده‌است (شکل ۴).

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.3.2.5]



شکل۴- مقدارمتیل 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 تشکیل‌دهندهٔ اسانس متیل‌چاویکول 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).

بیوسنتز فنیل پروپانوئیدها توسط یک گروه آنزیمی هدایت می‌شود 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 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 مورداثر الیسیتورها 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. 2004; Pu et al. 2009). 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 طوری‌که با افزایش بیان ژن و فعالیت آنزیم PAL مقدار متیل چاویکول، متیل اوژنول گیاه افزایش می‌یابد.

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

[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.3.2.5]

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 کیتوزان به عنوان الیسیتور زیستی کارآمد که از طریق القای سیستم دفاعی باعث بهبود بخشیدن بیوسنتز 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 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 secondry 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-lnduced Phenylpropanoid Metabolism. Plant Cell 7:1085-1097.

Esmaeilzadeh Bahabadi S, Sharifi M, Safaie N, Behmanesh M (2012) Enhancement of lignin and phenylpropanoid compounds production by chitosan in Linum album cell culthure. 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 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-lyaseand 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, 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.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.3.2.5]

Meek CR, Bidlack JE (2005) Arthropod population, phenylalaninamonia- lyase activity and fresh weight of Sweet Basil (O*cimum 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 annuaL. 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.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.3.2.5]