

افزایش بیان ژن چاویکول o-متیل ترانسفراز و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز گیاه *Ocimum basilicum* L. تحت تأثیر کیتوزان

صالحه نادری^۱، براتعلی فاخری^۲، صدیقه اسمعیل زاده بهابادی^{۳*}

۱. دانشجوی دکتری اصلاح نباتات، دانشگاه زابل

۲. دانشیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل

۳. استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه زابل

(تاریخ دریافت: ۹۲/۱۲/۱۹ - تاریخ تصویب: ۹۳/۵/۱)

Increasing of Chavicol o-Methyl Transfrase Gene Expression and Catalase and Ascorbate Peroxidase Enzymes Activity of *Ocimum basilicum* by Chitosan

S. NADERI¹, B. FAKHERI², S. ESMAILZADEH BAHABADI³

1. Ph.D student of Plant Breeding, Zabol University, Zabol, Iran.

2. Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Zabol University, Zabol, Iran.

3. Assistant Professor, Department of Biology, Zabol University, Zabol, Iran.

(Received: Mar. 10, 2014 - Accepted: Jul. 23, 2014)

Abstract

Basil (*Ocimum basilicum* L.), a medicinal plant of the Lamiaceae family, is used in traditional Iranian medicine. Essential oils of basil are composed of phenylpropanoids. Chavicol o-methyl and eugenol o-methyl are the most important components in essential oil of basil. Chitosan, main compound of fungal species could be used as biotic elicitor to improve secondary metabolites. In the present study, the effect of chitosan on methylchavicol content, chavicol o-methyl transfrase gene expression and enzymes activity of catalase, ascorbate peroxidase was evaluated. The plants were treated at pre flowering stage with 2 g/L chitosan and harvested after 1, 2, 3, and 5 days. Essential oils analysis showed that methylchavicol increased under chitosan compare to untreated plants. Chavicol o-methyl transfrase gene expression and antioxidant enzymes activity increased significantly after chitosan. Totally, changes in gene expression in different harvest stages are consistent with methylchavicol changes. Thus, chitosan increased methylchavicol by increasing *CVOMT* gene expression.

Keywords: essential oils, gene expression, *Ocimum basilicum*, *CVOMT*, antioxidant enzyme activity.

چکیده

ریحان (*Ocimum basilicum* L.) گیاه دارویی از خانواده نعناعیان (Lamiaceae) است که در طب سنتی ایران مورد استفاده قرار می‌گیرد. اسانس ریحان سرشار از ترکیبات فنیل پروپانوئیدی است. متیل چاویکول و متیل اوژنول از مهم‌ترین اجزا سازنده اسانس ریحان به شمار می‌روند. کیتوزان از ترکیبات اصلی دیواره سلولی بسیاری از گونه‌های قارچی است که به عنوان الیسیتور زیستی برای بهبود بخشیدن بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه استفاده می‌شود. در این پژوهش، اثر کیتوزان بر میزان متیل چاویکول و بیان ژن چاویکول o-متیل ترانسفراز (*CVOMT*) و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور گیاهچه‌های ریحان در مرحله پیش‌گلدهی با غلظت ۲ گرم در لیتر کیتوزان تیمار شدند و سپس در زمان‌های ۱، ۲، ۳ و ۵ روز بعد از اعمال تیمار کیتوزان برداشت شدند. آنالیز اسانس نشان داد که میزان متیل چاویکول تحت تأثیر کیتوزان نسبت به نمونه‌های شاهد افزایش یافت. همچنین بیان ژن چاویکول o-متیل ترانسفراز و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز تحت تأثیر کیتوزان به طور معنی‌داری افزایش یافت. تغییرات میزان بیان ژن با روند تغییرات متیل چاویکول در مراحل مختلف برداشت مطابقت داشت. بنابراین کیتوزان از طریق افزایش بیان ژن چاویکول o-متیل ترانسفراز باعث افزایش متیل چاویکول گردید.

واژه‌های کلیدی: اسانس، ریحان، ژن چاویکول o-متیل ترانسفراز، آنزیم‌های آنتی اکسیدان

ماسه الک شده، رس، گیاه خاک 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 ۲ بار به آنها مقدار ۵۰ میلی‌لیتر محلول غذایی هوگلند 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 ۲ گرم در لیتر به صورت محلول‌پاشی روی سطح برگ و در طی یک مرحله انجام شد سپس اندام‌های هوایی گیاه در زمان‌های ۱، 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 گردید 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. به منظور استخراج اسانس درصدی از گیاه در دمای اتاق دور از نور مستقیم، گرما و سرما خشک شدند.

اسانس‌گیری

در این پژوهش برای استخراج اسانس، از روش تقطیر با آب توسط کلونجر استفاده شد. عمل اسانس‌گیری به مدت ۳ ساعت ادامه یافته 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 هنگام آنالیز در یخچال نگهداری گردید (Shibamoto *et al.*, 1987).

الیستورهای زیستی توسط سلول‌های گیاهی، تولید گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر (ROS) مانند رادیکال سوپر اکسید ($O_2^{\cdot-}$)، هیدروژن پراکسید (H_2O_2)، رادیکال هیدروکسیل (OH^{\cdot}) و اکسیژن یکتایی (1O_2) می‌باشد که سمی هستند (Breusegem *et al.*, 2001). ROS های تولید شده در سلول‌های گیاهی بوسیله سیستم‌های آنتی‌اکسیدان آنزیمی و غیر آنزیمی کنترل می‌شوند (Vranova and Breusegem, 2002). کنترل سطح آنتی‌اکسیدان‌ها بوسیله سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی حاصل می‌شود که شامل متابولیت‌هایی چون گلوکاتینون، آسکورات، آلفاتوکوفرول، هیدرو کوئینون‌ها، بتا کاروتن، فلاونوئیدها و آنزیم‌های جاروب‌گر ROS مانند آسکورات پراکسیداز و کاتالاز می‌باشد (Vangronsveld and Clijsters, 1994). این آنزیم‌ها نقش بسیار مهمی در غیرفعال کردن ROS ها در سلول گیاهان دارند، بسته به گونه گیاهی و شدت تنش میزان فعالیت آنها در گیاهان تغییر می‌کند (Alscher *et al.*, 2002). کیتوزان اخیراً بدلیل فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی توجه زیادی را به خود جلب کرده است (Kim *et al.*, 2006).

در این تحقیق اثر کیتوزان بر میزان متیل چاویکول و ارتباط آن با بیان ژن *CVOMT* بررسی می‌گردد. در ادامه به منظور بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی کیتوزان، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان آسکورات پراکسیداز و کاتالاز مورد مطالعه قرار می‌گیرد.

مواد و روش‌ها

کشت و آماده‌سازی ریحان

برای انجام این پژوهش بذرهای ریحان در سال ۱۳۹۱ از مرکز تحقیقات کشاورزی زابل تهیه و در گلدان‌ها در خاک تقریباً سبک از مخلوط مساوی

آنالیز اسانس با GC-MS

برای آنالیز اسانس‌ها، از دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف‌سنج جرمی Thermoquest- Finnigan از مدل Jas Chromatograph Hewlett- Packard 5890 (USA) 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 ۱ میلی‌متر بر دقیقه و انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت استفاده گردید. 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).

اندازه‌گیری آنزیم‌های آنتی اکسیدان

جهت اندازه‌گیری آنزیم‌ها، ۰/۲ گرم از بافت سبز برگ برداشت و با ۴cc بافرپتاسیم فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار (pH=۷) و محلول EDTA ۰/۱mM در هاون سرد کاملاً ساییده، به صورت همگن در آورده شدند. مخلوط همگن به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۶۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. سپس فاز بالایی به عنوان عصاره پروتئینی برای سنجش فعالیت آنزیمی استفاده شد. همه این عملیات‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز از روش Sizer و Beers (۱۹۵۲) استفاده شد. مخلوط

واکنش آنزیم شامل بافر فسفات ۵۰ mM با اسیدیتیه ۷، آب اکسیژنه ۱۵ mM و ۱۰۰µl عصاره آنزیمی بود. افزایش جذب در طول موج ۲۴۰ به وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز با استفاده از روش Nakano و Asada (۱۹۸۱) اندازه‌گیری شد. محیط واکنش آنزیم شامل بافر فسفات پتاسیم ۵۰ mM و اسیدیتیه ۷، EDTA ۰/۱ µM و پراکسید هیدروژن ۱٪، آسکوربات ۰/۵ mM و ۱۰۰µl عصاره آنزیمی بود. در ادامه افزایش جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر ثبت گردید.

مطالعه بیان ژن *CVOMT*

برای استخراج Total RNA از برگ ریحان، از کیت سیناژن محلول RNax Plus همراه با کلروفرم، ایزوپروپانول، اتانول ۷۵٪ 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 گردید. 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 *CVOMT* و Tubulin با استفاده از نرم افزار Oligo Therapeutics و سایت Oligonucleotide Properties Calculator انجام شد. ساخت آغازگرها با میانجی‌گری شرکت کیفیت پردازان، از شرکت Oligo کره صورت گرفت (جدول ۱).

تکثیر ژن‌های *CVOMT* و Tubulin برای اندازه‌گیری بیان ژن توسط واکنش Real time PCR بر اساس روش استاندارد به صورت نسبی صورت گرفت. کمیت نسبی به وسیله اندازه‌گیری افزایش تشعشع فلورسنس در نتیجه اتصال رنگ

جدول ۱- پرایمر طراحی شده برای ژن چاویکول 0-متیل ترانسفراز (*CVOMT*) و *Tubulin*

Gene name	Primer sequence	T _m (c)	GC(%)
Forward <i>cvomt</i>	5'-CTCACCTCAACATCACCC-3'	60.5	55.0
Reverse <i>cvomt</i>	5'-TGAGCTCAAAGAAGGAGG-3'	58.4	50.0
Forward <i>Tub.</i>	5'-CTCTTGAGCTAGTGTCGC -3'	62.5	60.0
Reverse <i>Tub.</i>	5'-AAAAGGCCAAAACTTCCG -3'	54.3	40.0

استفاده از روش Real time PCR و طبق جدول ۳ بود. پس از انجام واکنش تکثیر به روش Q Real Ct PCR داده‌های خام به صورت Ct (Threshold cycle) از دستگاه استخراج شد. برای هر نمونه ۳ تکرار در نظر گرفته شد و از روش $\Delta\Delta Ct$ برای آنالیز داده‌ها استفاده شد. پس از بدست آوردن Ct هر دو ژن *CVOMT* و *Tubulin* برای تمام نمونه‌ها و محاسبه $\Delta\Delta Ct$ برای هر یک از آنها با استفاده از نسخه ۹/۲ نرم افزار SAS و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال $P \leq 0.05$ داده‌ها مورد آنالیز قرار گرفت.

(Eva Green) با استفاده از دستگاه (RG-3000) (CorbettResearch) انجام گرفت. اجزای واکنش Real time PCR در حجم نهایی ۲۰ در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲- اجزاء واکنش استاندارد Real time PCR

ماده	مقدار
Master mix	۴ میکرولیتر
Forward primer	۱ میکرولیتر
Revers primer	۱ میکرولیتر
cDNA	۱ میکرولیتر
Nuclease free water	تا حجم ۲۰ میکرولیتر

همچنین برنامه حرارتی برای تکثیر هر دو ژن با

جدول ۳- 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 تا ۹۹ درجه هر ۵ ثانیه ۱ درجه

پس از اعمال کیتوزان به میزان دو برابر نسبت به نمونه‌های شاهد افزایش یافت است و در روز پنجم پس از اعمال کیتوزان کاهش یافت (شکل ۲).

تأثیر کیتوزان بر مقدار متیل چاویکول

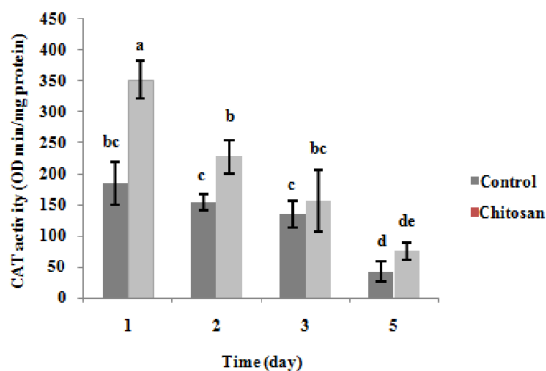
بررسی مقدار متیل چاویکول تحت تأثیر کیتوزان نشان داد که متیل چاویکول در روز اول و دوم تحت

نتایج

تأثیر کیتوزان بر بیان ژن *CVOMT*

نتایج بررسی میزان بیان ژن *CVOMT* تحت تأثیر کیتوزان نشان داد که بیان ژن *CVOMT* در مراحل مختلف برداشت نسبت به نمونه‌های شاهد افزایش نشان داد، به طوری که بیان ژن *CVOMT* یک روز

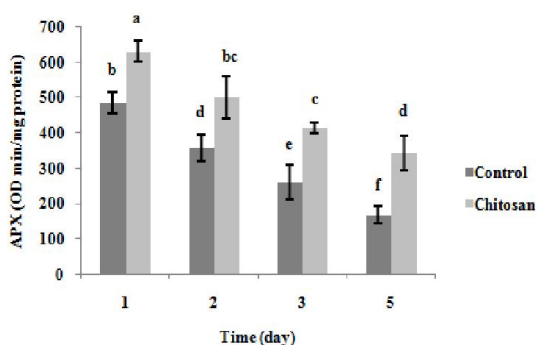
فعالیت آنزیم کاتالاز گردیده‌است و در روز سوم بین تیمار و شاهد تفاوت معنی‌داری نشان نداد (شکل ۴).



شکل ۴- میزان فعالیت آنزیم کاتالاز تحت تأثیر کیتوزان در زمان‌های مختلف. حروف یکسان بیانگر عدم معنی‌داری در سطح ۵ درصد می‌باشد.

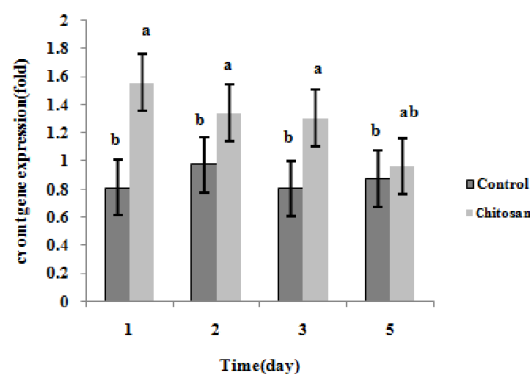
تأثیر کیتوزان بر میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز

بررسی میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز تحت تأثیر کیتوزان نشان داد که فعالیت این آنزیم در مراحل مختلف برداشت سیر کاهش داشت به طوری که بیشترین میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در یک روز پس از اعمال کیتوزان بود و در روز پنجم پس از اعمال کیتوزان کاهش یافت (شکل ۵).

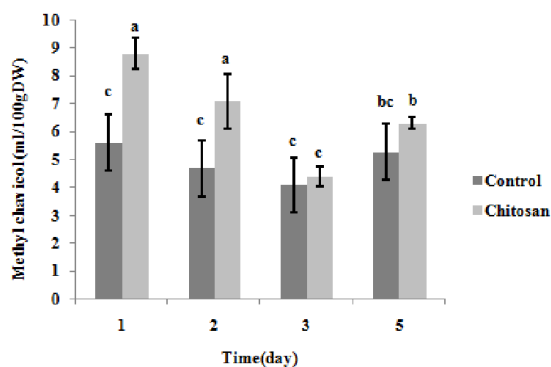


شکل ۵- میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز تحت تأثیر کیتوزان در زمان‌های مختلف. حروف یکسان بیانگر عدم معنی‌داری در سطح ۵ درصد می‌باشد.

تأثیر 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).



شکل ۲- میزان بیان ژن *CVOMT* تحت تأثیر کیتوزان در زمان‌های مختلف. حروف یکسان بیانگر عدم معنی‌داری در سطح ۵ درصد می‌باشد.



شکل ۳- تغییرات مقدار متیل چاویکول تحت تأثیر کیتوزان در زمان‌های مختلف. حروف یکسان بیانگر عدم معنی‌داری در سطح ۵ درصد می‌باشد.

تأثیر کیتوزان بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز

نتایج تجزیه آماری داده‌ها نشان داد فعالیت آنزیم کاتالاز در مراحل مختلف برداشت سیر کاهش داشت به طوری که بیشترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در یک روز پس از اعمال کیتوزان است و در روز پنجم پس از اعمال کیتوزان کاهش می‌یابد و کیتوزان نسبت به شاهد باعث افزایش معنی‌داری میزان

بحث

مثبتی بین میزان فعالیت هر دو آنزیم در طی تیمار با کیتوزان وجود دارند، این امر بیان می‌کند در گیاه ریحان تحت تیمار با کیتوزان همکاری آنزیم‌های حفاظتی مانند آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز توانست ROS را حذف کند و باعث بالانس همواستاتیک بین تولید و حذف ROS گردد و مقدار رادیکال‌های آزاد را کاهش دهد، در واقع هر دو آنزیم آنتی اکسیدان با هم فعال شده و سبب کاهش اثرات سوء تنش اکسیداتیو می‌شوند. بنابراین ویژگی‌های آنتی اکسیدانی کیتوزان می‌تواند مقاومت در برابر تنش اکسیداتیو در گیاه را افزایش دهد. بررسی‌های انجام شده حاکی از آن است که مطالعات اندکی در مورد اثر الیستورها بر میزان بیان ژن‌های مسیر فیل پروپانوییدی از جمله *CVOMT* صورت گرفته است. تحقیق حاضر نخستین گزارش در رابطه با تأثیر کیتوزان بر بیان ژن *CVOMT* گیاه ریحان است. نتایج بررسی بیان ژن *CVOMT* در مرحله پیش گلدهی در زمان‌های مختلف برداشت بیانگر این است که بیان ژن *CVOMT* در مراحل مختلف برداشت نسبت به نمونه‌های شاهد افزایش یافت. روند تغییرات میزان بیان ژن *CVOMT* با روند تغییرات ترکیبات فنل پروپانوییدی همچون متیل چاویکول در مراحل مختلف برداشت مطابقت دارد، به‌طوری‌که با افزایش بیان ژن *CVOMT* مقدار متیل چاویکول، گیاه افزایش می‌یابد. بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق می‌توان از 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.

سنتر اسانس در گیاهان تحت تأثیر عوامل متعددی از جمله تنش‌های زیستی و غیرزیستی تغییر می‌کند (Werker *et al.*, 1993). مطالعات متعددی نشان داده‌اند که ترکیبات اصلی دیواره سلولی بسیاری از گونه‌های قارچی، مانند کیتوزان، باعث افزایش میزان متابولیت‌های ثانویه می‌شود (Kang *et al.*, 2004; Pu *et al.*, 2009). فعالیت آنتی‌اکسیدانی کیتوزان توسط مکانیسم‌های مختلفی صورت می‌گیرد (Muzzarelli and Terbojerich, 1997, Park and Kim, 2004). از جمله باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت می‌شود و همچنین می‌تواند رادیکال‌های آزاد O_2^- و OH^- را از بین ببرد و از DNA محافظت کند (Harish Prashanth *et al.*, 2007; Kim and Thomas, 2007). تحقیقات انجام شده تیمار کیتوزان باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و ترکیبات فنلی در گوجه‌فرنگی شده است (Liu *et al.*, 2007). همچنین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز و پلی‌فنل اکسیداز در ریشه بادمجان تحت تیمار با الیستور کیتوزان افزایش یافته است (Sudhamoy and Mandal, 2010). افزایش فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز در گیاهچه‌های گلرنگ و ذرت نیز تحت تأثیر کیتوزان گزارش شده است (Mahdavi *et al.*, 2012; Guan *et al.*, 2009). آنزیم کاتالاز در پراکسیزوم، سیتوزول و میتوکندری سبب تبدیل H_2O_2 به H_2O و O_2 می‌شود و آسکوربات پراکسیداز از آسکوربات به عنوان دهنده الکترون در ابتدای سیکل گلوکوتایون آسکوربات استفاده می‌کند و نقش مهمی در سمیت‌زدایی H_2O_2 در سلول دارد (Leshem and Mckersie, 1994). نتایج تحقیق حاضر نشان داد همبستگی معنی‌دار و

REFERENCES

- Achnine L, Blancaflor EB, Rasmussen S, Dixon RA (2004) Colocalization of L-phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-hydroxylase formetabolic channeling in phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell*. 16: 3098-3109.
- Adams RP (2001) Identification of essential oils components by gas chromatography/ quadrupole mass spectroscopy. Illinois: Allured. Publishing Corporation. USA. pp 119-146.
- Alscher RG, Erturk N, Heath LS (2002) Role of superoxide dismutase (SOD) in controlling oxidative stress in plants. *J. Exp. Bot.* 53: 1331-1341.
- Beers GR, IW, Sizer (1952) Aspectrophotometric method for measuring the breakdown to hydrogen peroxide by catalase. *Biol. Chem.* 195: 133-140.
- Biavati B, Piccaglia R, Marotti M (2005) Antimicrobial activity of plant essential oils. *Food Chem.* 92: 128-137.
- Bjorn H, Muller R (2003) Possibility of bacterial recruitment of plant genes associated with the biosynthesis of secondary metabolites. *Plant Physiol.* 132: 1153-1161.
- Breusegem FV, James F, Dat D, Inze D (2001) The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Sci.* 161: 423-431.
- Chakraborty M, Karun A, Mitra A (2009) Accumulation of phenylpropanoid derivatives in chitosan-induced cell suspension culture of *Cocos nucifera*. *J. Plant Physiol.* 166: 63-71.
- Cheng X, Zhou U, Cui X (2006) Improvement of phenylethanoid glycosides biosynthesis in *Cistanchedeserticolacell* suspension cultures by chitosan elicitor. *J. Bio.* 121: 253-260.
- Creasy LL (1987) The role of enzyme in activation in the regulation of 19 synthetic pathways: A case history. *J. Plant Physiol.* 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. *Phenolic Metabolism in Plants* H.A. Stafford and R.K. Ibrahim (eds). pp 91-138.
- Dixon RA, Paiva NL (1995) Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *Plant Cell*. 7: 1085-1097.
- 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. *J. Plant Physiol.* 112: 1617-1624.
- 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 Sci.* 166: 745-751.
- Khan W, Prithiviraj B, Smith DL (2003) Chitosan and chitinoligomers increase phenylalanine ammonia-lyase and tyrosine ammonia-lyase activities in soybean leaves. *J. Plant. Physiol.* 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.). *J. Agri. Food Chem.* 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*. J. Bio. Chem. 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 Sci. 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 Sci. 160: 27-35.
- Meek CR, Bidlack JE (2005) Arthropod population, phenylalanine ammonia-lyase activity and fresh weight of Sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) as affected by plant age and *Bacillus thuringiensis* treatment. Plant Sci. 85: 9-17.
- Mckersie DB, Leshem Y (1994) Stress and Coping in Cultivated Plants. Kluwer Acad. Pub., London.
- Nakano YK (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidases in spinach chloroplast. Plant Cell Physiol. 16: 15-24.
- 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 Phenyl alanine ammonia-lyase. Plant Cell. 16: 3426-3436.
- Shibamoto T, Sandra P, Bicchi C (1987) Capillary gas chromatography in essential oil analysis. Plant Sci. 135: 921-927.
- Srere PA (1987) Complexes of sequential metabolic enzymes. J. Bio. 56: 89-124.
- Vangronsveld J, Clijsters H (1994) Toxic effects of metals. In: Plants and the Chemical Elements: Biochemistry, Uptake, Tolerance and Toxicity. Edited by M.E. Farago, Wienheim.
- Vranova E, Inze D, Breusegem VF (2002) Signal transduction during oxidative stress. J. Exp. Bot. 53: 1227-1236.
- Wang J, Zheng L, Wu J, Tan R (2006) Involvement of nitric oxide in oxidative burst, phenyl alanine ammonia-lyase activation and Taxol production induced by low-energy ultrasound in *Taxus yunnanensis* cell suspension cultures. Plant Cell Physiol. 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). Ann. Bot. 71: 43-50.
- Zhao J, Davis LC, Verpoorte R (2005) Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnology Adv. 23: 283-333.

