

تأثیر هورمون‌های اسید جیبرلیک، اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک بر بیان ژن فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL) در مراحل مختلف رشد *Ocimum basilicum* L.

سارا عبدخانی^{۱*}، محمود سلوکی^۲، یثوب شیری^۳

۱، دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ۲، دانشیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل

۳، مربی پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه زابل، زابل

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۱/۶ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۱۲/۲۵)

The Effect of Different Growth Hormones on Gene Expression of Phenylalanine Ammonia Lyase (PAL) in *Ocimum basilicum* L.

Sara Abdekhan^{1*}, Mahmood Solouki², Yasoub Shiri³

1, M.Sc. of Agricultural Biotechnology, University of Zabol, Zabol, Iran, 2, Associate Professor, Department of Biotechnology, University of Zabol, Zabol, Iran, 3, Lecturer, Biotechnology Research Institute of University of Zabol, Zabol, Iran.

(Received: Jan. 26, 2015 - Accepted: Mar. 16, 2015)

Abstract

Basil (*Ocimum basilicum* L.) is a member of a Lamiaceae family with aroma compounds and high essence. Furthermore, the essential oils of basil leaves are composed of phenylpropanoids, which have shown antibacterial and antioxidant properties. Phenylalanine ammonia Lyase is an important enzyme in phenylpropanoid pathway. The literature indicated that plant hormones affect gene expression in plants and increase the production of secondary metabolites. In addition, the hormones stimulate the immune system through transcriptional activation of defense related genes, and in turns, increase induced resistance of plants. In the current study, Real Time PCR was used to evaluate the gene expression and enzymatic activity of phenylalanine ammonia. The plants were treated with three different hormones including gibberellic acid, jasmonic acid, and salicylic acid with 0.1 mM/L concentration. The activities were studied during three different plant growth stages which included seedlings, pre-flowering stage, and flowering stage. The difference between gene expressions levels were analyzed by Duncan method ($P \leq 0.05$) using SAS software (version 9.0). During the flowering stage, the results showed an increase in gene expression of phenylalanine ammonia Lyase in plants treated with jasmonic acid. The gene expression of phenylalanine ammonia Lyase was significantly higher (5%) for all treated samples compared to the control samples. The studied hormones increased the gene expression and enzymatic activity of phenylalanine ammonia Lyase.

Keywords: phenylalanine ammonia lyase, hormone, RT-PCR.

چکیده

گیاه *Ocimum basilicum* L. از خانواده نعنائیان است که دارای ترکیبات حلقوی و اسانس بوده و خواص ضد باکتریایی و آنتی‌اکسیدانی دارد، که سرشار از ترکیبات فنیل پروپانوئیدی است. آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز یکی از آنزیم‌های کلیدی در مسیر تولید ترکیبات فنیل پروپانوئیدی می‌باشد. شواهد نشان می‌دهد که هورمون‌های گیاهی بر بیان ژن در گیاهان مؤثر بوده و موجب افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه می‌گردند. علاوه بر این سیستم دفاعی گیاه را از طریق فعال‌سازی رونویسی ژن‌های مرتبط با مکانیسم دفاعی گیاه تحریک نموده باعث تنظیم مقاومت القایی می‌گردند. در این تحقیق، بیان ژن فنیل آلانین آمونیا لیاز و فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز در گیاه ریحان تحت تیمار هورمون‌های اسید جیبرلیک، اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار در لیتر با روش Real Time PCR در مراحل رشدی گیاهچه‌ای، پیش‌گلدهی و گلدهی مورد بررسی قرار گرفت. اختلاف سطوح بیان ژن با روش دانکن در سطح $P \leq 0.05$ مقایسه و آنالیزها توسط نرم افزار SAS v9.0 صورت گرفت. نتایج نشان دهنده افزایش در میزان بیان ژن و فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز در تیمار هورمون اسید جاسمونیک در مرحله گلدهی بود. بیان ژن فنیل آلانین آمونیا لیاز بین تیمار هورمون‌های اسید جیبرلیک، اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک و نمونه شاهد در سطح احتمال ۵ درصد معنادار بود. تیمار اسید جاسمونیک، اسید جیبرلیک و اسید سالیسیلیک باعث افزایش بیان ژن و فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز شد.

واژه‌های کلیدی: فنیل آلانین آمونیا لیاز، هورمون، RT-PCR.

مقدمه

گیاه *Ocimum basilicum*. L از تیره نعنائیان *Lamiaceae* گیاهی است علفی، یک‌ساله، معطر که به ارتفاع ۱۵ تا ۴۵ سانتی‌متر می‌رسد و دارای ۵۰ الی ۱۵۰ گونه علفی و بوته‌ای می‌باشد (Javanmardi et al., 2002; Labra et al., 2004). این گیاه دارای تنوع زیادی در سطح مورفولوژیکی و ترکیبات ثانویه و مخصوصاً اسانس دارد (Telci et al., 2006). 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 از این گیاه به نام *Ocimum basilicum* وجود دارد که در تمام مناطق کشور کشت می‌شود (Ghahraman, 1994). بخش قابل توجه‌ای از اسانس ریحان را ترپنوئیدها تشکیل می‌دهند که نوع و مقدار آنها در کموتیپ‌های ریحان و نیز تحت شرایط اقلیمی و مراحل مختلف نمو گیاه، متفاوت است (Simon et al., 1999; Sajjadi, 2006). فنیل پروپانوئیدها از فنیل آلانین مشتق می‌شوند که ابتدا با دامینه شدن فنیل آلانین به وسیله آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز (PAL)، اسید سینامیک تشکیل می‌شود. سپس با اضافه شدن هیدروکسیل، پارا-کوماریک تشکیل می‌شود. شکل‌های آلدئیدی و الکلی پارا-کوماریک تشکیل شده و در نهایت به چاویکول و اوژنول تبدیل می‌شود، که از اجزای تشکیل‌دهنده اسانس *Ocimum basilicum* L. محسوب می‌شوند (Gang et al., 2002).

جیبرلین‌ها متعلق به گروه بزرگی از ترکیبات طبیعی به نام ترپنوئیدها (مثل کاروتنوئیدها) می‌باشند و از طریق مسیر مولونیک اسید در ساقه‌های سریع‌الرشد و بذور تکامل یافته تولید می‌شوند.

جیبرلین‌ها در فرآیندهای فیزیولوژیکی زیادی دخالت دارند. رشد ساقه، گلدهی، جوانه‌زنی بذر، رکود ظهور اندام‌های جنسی، پیری، پارتنوکارپی، تشکیل میوه و رشد همگی توسط جیبرلین‌ها تنظیم می‌شوند (Rodaway et al., 1991). تأثیر GA_3 روی افزایش بیوسنتز آرتیمیزین در قسمت‌های هوایی این گیاه گزارش شده است (Weathers et al., 1997). جاسمونات‌ها و استرمتیل آنها گروه جدیدی دیگر از تنظیم‌کنندگان رشد گیاهان، و از مشتقات اسید لینولینیک محسوب می‌شوند که از طریق مسیر بیوسنتزی اکتادکانوئید سنتز می‌شوند (Schaller, 2001). در آغاز جاسمونات‌ها به خاطر فعالیت بازدارندگی رشدی آنها مورد توجه قرار گرفت ولی امروزه دیده شده است که این ترکیبات در بیشتر گونه‌های سلسله گیاهی وجود داشته و نظرها روی قابلیت آنها در افزایش میزان بیان ژن‌های خاص گیاهی که در هنگام واکنش گیاه به ایجاد زخم صورت می‌پذیرد معطوف شده است (Staswick, 1992). جاسمونات‌ها به عنوان ترکیبات پیام‌رسان کلیدی در فرآیند القاء که منجر به تجمع متابولیت‌های ثانویه می‌شود معرفی شده‌اند (Yu et al., 2002). تیمار سوسپانسیون سلولی تنباکو با متیل جاسمونات منجر به افزایش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز می‌گردد (Sharan et al., 1998).

اسید سالیسیلیک یا اورتوهیدروکسی بنزوئیک اسید، به گروهی از ترکیبات فنلی تعلق داشته و از نام سالیکس^۱ (بید) مشتق شده است (Popova et al., 1997). اسید سالیسیلیک در برگ‌ها و ساختمان‌های زایشی گیاهان یافت شده است (Rskin, 1992) و اسید سالیسیلیک سیستم دفاعی گیاه را از طریق القای رونویسی گروه مشخصی از ژن‌های مرتبط با دفاع و توسعه مقاومت سیستمیک تحریک می‌کند.

1. *Salix*

کنترل منفی (آب دیونیزه) در سه مرحله رشدی گیاه شامل گیاهچه‌ای، پیش گلدهی و گلدهی، به طوری که برگ کاملاً خیس شود، اعمال شد. بذره‌ای ریحان سبز از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه گردید. بذرها قبل از کشت با کلرید سدیم ۱۵ درصد ضد عفونی سطحی شدند و بذره‌ای ضد عفونی شده به تعداد زیاد در گلدان‌های حاوی بستر مناسب متشکل از مخلوط مساوی ماسه الک شده، رس، خاک برگ و کود حیوانی کشت شد. پس از رشد گیاهچه‌ها، در هر گلدان ۶ گیاهچه حفظ شد و مابقی حذف گردید. گلدان‌ها در دمای روزانه ۲۵ تا ۳۰ و شبانه ۱۸ تا ۲۰ درجه سانتی‌گراد، با شدت نور ۳۵ تا ۴۰ هزار لوکس تا انتهای مرحله گلدهی نگهداری شدند. گیاهان روزانه آبیاری شدند و هفته‌ای ۲ بار به آنها مقدار ۵۰ میلی‌لیتر محلول غذایی هوگلدن داده شد. اندام‌های هوایی ریحان بعد از اعمال تیمار با هورمون‌های رشد برداشت شد و جهت استفاده در کارهای مولکولی در فریزر با دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

آنالیز بیان ژن

استخراج RNA کل: RNA کل از برگ‌های گیاه ریحان با استفاده از محلول استخراج RNX PLUS (Cinna Gen Kit) همراه با کلروفرم، ایزوپروپانول، اتانول ۷۵٪ و آب DEPC (دی اتیل پیرو کربنات) طبق پروتکل شرکت سیناژن استخراج شد. سپس کمیت و کیفیت RNA استخراج شده، با استفاده از ژل آگارز و اسپکتروفوتومتر ارزیابی گردید (شکل ۱). مرحله بعد از استخراج RNA سنتز cDNA 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 5 و سایت Oligonucleotide Properties Calculator انجام شد. ساخت آغازگرها با میانجی‌گری شرکت کیفیت پردازان، از شرکت Oligo کره صورت گرفت (جدول ۱).

نشان داده شد که اسید سالیسیلیک میزان تولید آرتیمیزین را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Gao-Bin *et al.*, 2009). در مطالعه‌ای بیان ژن *H6H* و ایزوفرم‌های *PMT* تحت تأثیر غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک در ریشه‌های موئین و اندام‌های مختلف شایبک افزایش یافت (Moradi *et al.*, 2010). همچنین تیمارهای اسید سالیسیلیک و متیل جاسمونات در کشت سوسپانسیون ریشه پاناکس و شیرین بیان باعث افزایش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالاز گردید (Ali *et al.*, 2007; Shabani *et al.*, 2009). مطالعات نشان داد میزان بیان ژن و فعالیت آنزیم PAL و EMOT در طی مراحل رشد رویشی و با افزایش رشد گیاه، افزایش داشت (Tahsili *et al.*, 2010; Ziaei *et al.*, 2012).

روش‌های متعددی برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه وجود دارد، الیستورها (القاءکننده‌ها) ترکیباتی با منشاء زیستی یا غیرزیستی هستند که از طریق القای سیستم دفاعی باعث بیوسنتز و انباشت متابولیت‌های ثانویه می‌شوند (Zhao *et al.*, 2005). مطالعات اندکی در زمینه استفاده از هورمون‌های گیاهی به منظور القاء بیان ژن PAL و تولید بیشتر متابولیت‌های ثانویه گیاه ریحان انجام شده است. بنابراین هدف از این پژوهش، ارزیابی میزان بیان ژن PAL و فعالیت آنزیم آن در سطح RNA تحت تیمار محرک‌های رشد در طی دوره نمو ریحان است. تا از این طریق درک بهتر مسیر القاء و عکس‌العمل گیاه ریحان امکان‌پذیر گردد.

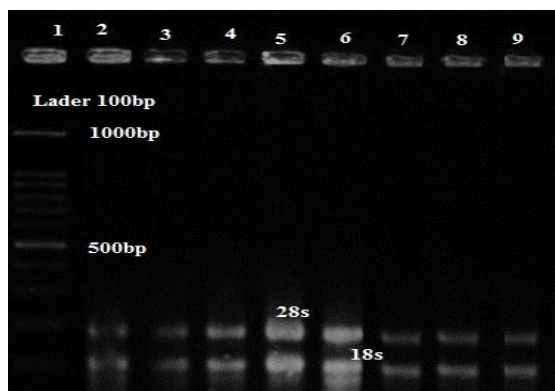
مواد و روش‌ها

کشت گیاه و تیمار با هورمون‌ها

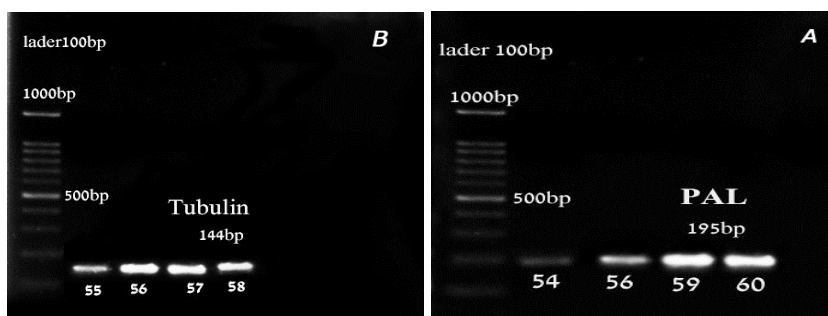
این مطالعه در قالب آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در سال ۱۳۹۲ در پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه زابل انجام شد. تیمارها شامل محلول اسید جیبرلیک، اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک با یک غلظت (۰/۱ میلی‌مولار در لیتر) و

دمای اتصال پرایمرها از گرادیان دمایی برای هر کدام از ژن‌ها استفاده شد. شرایط PCR برای تکثیر قطعه cDNA مورد نظر یک سیکل در دمای ۹۴°C به مدت ۵ دقیقه و به دنبال آن ۴۰ چرخه با، ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه برای واسرشت سازی، برای اتصال ۵۳ تا ۶۰°C به مدت ۴۵ ثانیه، گسترش ۷۳°C درجه به مدت ۳۰ ثانیه، گسترش نهایی ۷۳°C به مدت ۱۰ دقیقه اجرا شد. در پایان محصولات PCR بر روی ژل آگارز (۱ درصد) الکتروفورز و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید (Ethidium bromide) به مدت ۳۰ دقیقه مشاهده و عکس برداری شد. دمای اتصال بهینه آغازگرها برای ژن PAL ۶۰ و برای توبولین ۵۸°C به دست آمد (شکل ۲).

به منظور بررسی بیان ژن PAL از جفت آغازگرهای اختصاصی پیشرو و برگشتی و با توجه به تحقیق Tahsili و همکاران (۲۰۱۲) از ژن توبولین به عنوان کنترل داخلی (House keeping) با آغازگر اختصاصی پیشرو و برگشتی برای تکثیر cDNA در RT-PCR استفاده شد (جدول ۱). آغازگرها با استفاده از توالی‌های cDNA مربوط به PAL ریحان و توبولین گندم که از سایت NCBI با Accession number AB436791.1 و U76895.1 به دست آمد، طراحی شدند. جهت بررسی نیمه کمی بیان ژن و مقایسه با کنترل داخلی، بیان ژن در چرخه‌های دمایی متفاوت بررسی شد و پس از ارزیابی نتایج روی ژل، بهترین شرایط تعداد ۴۰ چرخه برای بررسی بیان ژن مورد نظر و کنترل داخلی آن انتخاب شد. برای پیدا کردن بهترین



شکل ۱- نمونه‌ای از RNA کل استخراج شده از برگ‌های شاهد (2، 3) و تیمار شده با غلظت ۰/۱ میلی مولار اسید جاسمونیک (4، 5)، اسید جیبرلیک (6، 7) و اسید سالیسیلیک (8، 9) بر روی ژل آگارز. دو باند مربوط به 28S و 18S، rRNA به وضوح قابل مشاهده می‌باشند.



شکل ۲- نمونه‌ای از دمای اتصال بهینه آغازگرها برای ژن PAL (A) و ژن توبولین (B) در برگ‌های تیمار شده اسید جیبرلیک، اسید جاسمونیک، اسید سالیسیلیک با غلظت (۰/۱ میلی مولار) بر روی ژل آگارز. قطعه تکثیر شده PAL باندی معادل ۱۹۵ bp و برای توبولین باندی تقریباً معادل ۱۴۴ bp بر روی ژل آگارز ظاهر گردید.

جدول ۱- توالی پرایمرهای مربوط به PAL و تولولین و Tm و درصد GC هر کدام

نام پرایمر	توالی	دمای اتصال (°C)	GC (%)	طول تکثیر (bp)
Forward PAL	5'-CCTCAACCTCAACATCAC-3'	52.6	50.0	195
Reverse PAL	5'-TGAAGCTCAAAGAAGGACGG-3'	57.8	50.0	195
Forward Tubulin	5'-CTCCTTGAGCTAGTCGTCGC-3'	52.6	60.0	144
Reverse Tubulin	5'-AACCAAGGCAAAAACATCCG-3'	52.3	40.0	144

(جدول ۲) نشان داده شده است. همچنین برنامه حرارتی برای تکثیر هر دو ژن با استفاده از روش Real time PCR و طبق (جدول ۳) بود. پس از انجام واکنش تکثیر به روش Q Real time 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 به دست آوردن Ct هر دو ژن PAL و Tubulin برای تمام نمونه‌ها و محاسبه $\Delta\Delta Ct$ برای هر یک از آنها با استفاده از نرم‌افزار SAS v9 مورد تجزیه واریانس قرار گرفت و مقایسه میانگین‌ها نیز به وسیله آزمون دانکن در $P \leq 0.05$ انجام گرفت.

تکثیر ژن فنیل آلانین آمونیا لایز (PAL) و Tubulin
تکثیر ژن‌های PAL و Tubulin تیمار شده با هورمون‌های اسید جیبرلیک، اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار در لیتر نسبت به کنترل منفی (آب دیونیزه) در سه مرحله رشدی گیاه شامل گیاهچه‌ای، پیش گلدهی و گلدهی 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 (Eva Green) با استفاده از دستگاه (Corbett Research RG-3000) انجام گرفت. اجزای واکنش Real time PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر در

جدول ۲- اجزاء واکنش استاندارد Real time PCR

ماده	مقدار
Master mix(Eva Green)	۴ میکرولیتر
Forward primer	۰/۵ میکرولیتر
Revers primer	۰/۵ میکرولیتر
cDNA	۱ میکرولیتر
Nuclease free water	تا حجم ۲۰ میکرولیتر

جدول ۳- 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 تا ۹۹ درجه هر ۵ ثانیه ۱ درجه

به دست آمد. فعالیت این آنزیم به صورت تغییر در $\text{mg protein OD}_{290}/\text{h}$ (Wang *et al.*, 2006).

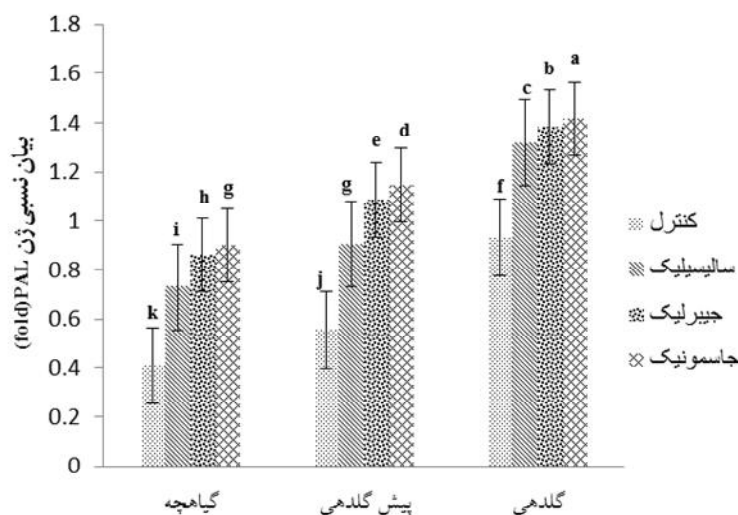
نتایج

نتایج اثر مراحل رشد گیاهی و تنظیم کننده‌های رشد بر بیان ژن PAL

نتایج حاصل از اندازه‌گیری بیان ژن فنیل آلانین آمونیاکاز در برگ گیاه ریحان پس از تیمار با اسید جیبرلیک، اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک در غلظت ۰/۱ میلی‌مولار بر لیتر نشان داد که بیان این ژن به طور قابل توجهی در تمام مراحل رشد افزایش یافت (شکل ۳). بیشترین میزان بیان این ژن برای هورمون اسید جاسمونیک در مرحله گلدهی به دست آمد که نسبت به شاهد مربوطه ۱/۵۱ برابر افزایش نشان داد و این افزایش در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود ($P \leq 0/05$). همچنین اسید جیبرلیک ۱/۴۷ و اسید سالیسیلیک ۱/۴۱ واحد نسبت به شاهد افزایش یافت و در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود (شکل ۳).

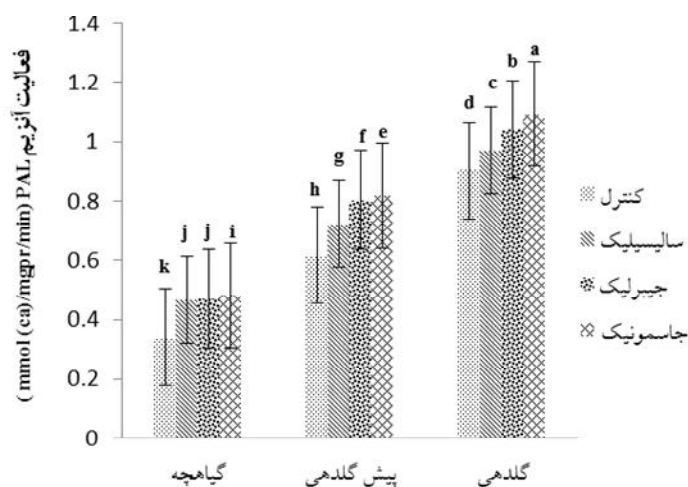
سنجش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیاکاز (PAL)

مقدار ۰/۳ گرم از بافت تازه برگ را توزین کرده و در ۶/۵ میلی‌لیتر بافر Tris-HCl ۵۰ میلی‌مولار ($\text{pH}=8/8$) روی یخ ساییده شد و عصاره حاصل به مدت ۳۰ دقیقه با دور ۵۰۰۰rpm سانتریفیوژ گردید. محلول روئی از رسوب جدا شد این محلول حاوی آنزیم PAL است. مخلوطی از ۱ میلی‌لیتر بافر استخراجی بالا، ۰/۵ میلی‌لیتر فنیل آلانین ۱۰ میلی‌مولار، ۰/۴ میلی‌لیتر از عصاره آنزیمی در حمام آب گرم ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت قرار داده شد. سپس واکنش توسط ۰/۵ میلی‌لیتر کلریدریک اسید ۶ مولار متوقف گردید. در نهایت، به محلول حاصل ۱۵ میلی‌لیتر اتیل استات افزوده شد. فاز روغنی تشکیل شده جدا و باقیمانده در دمای آزمایشگاه قرار داد شد تا تبخیر شود. سپس باقیمانده که همان سینامیک اسید است در ۳ میلی‌لیتر سود ۰/۰۵ مولار حل شد و غلظت سینامیک اسید با اندازه‌گیری میزان جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر و با استفاده از ضریب خاموشی معادل $9500 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$



شکل ۳- میزان بیان ژن فنیل آلانین آمونیاکاز در برگ‌های ریحان با تیمار متقابل تنظیم کننده‌های رشد و مراحل رشد گیاهی. حروف متفاوت بالای نمودارها نشان دهنده معنی‌دار بودن در سطح ($P \leq 0/05$) می‌باشد.

یافت (شکل ۴). بیشترین فعالیت این آنزیم برای هورمون اسید جاسمونیک در مرحله گلدهی به دست آمد که نسبت به شاهد مربوطه ۱/۲۱ برابر افزایش نشان داد و این افزایش در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود ($P \leq 0.05$). همچنین اسید جیبرلیک ۱/۱۵ و اسید سالیسیلیک ۱/۰۷ واحد نسبت به شاهد افزایش یافت و در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود (شکل ۴).



شکل ۴- میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز در برگ‌های ریحان با تیمار متقابل تنظیم‌کننده‌های رشد و مراحل رشد گیاهی. حروف متفاوت بالای نمودارها نشان‌دهنده معنی‌دار بودن در سطح ($P \leq 0.05$) می‌باشد.

طرفی دیگر بلوغ و آنتوژنی برگ یا سن برگ به طور چشمگیری بر روی بازده اسانس مؤثر است. بازده اسانس در طول رشد رویشی ریحان سبز و بنفش تا مرحله گلدهی افزایش می‌یابد و بعد از 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). عوامل مختلف بر روی بیان ژن تأثیر دارد از جمله سن گیاه یک عامل مؤثر بر بیان ژن آنزیم‌های O-متیل ترانسفراز از جمله EOMT در ریحان است (Gang et al., 2002). آنزیم PAL یکی از مهمترین آنزیم‌های حدواسط بین متابولیسم اولیه و ثانویه در گیاهان است و اولین آنزیم در مسیر تولید ترکیبات

نتایج اثر مراحل رشد گیاهی و تنظیم‌کننده‌های

رشد بر فعالیت آنزیم PAL

نتایج حاصل از اندازه‌گیری فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز در برگ گیاه ریحان پس از تیمار با اسید جیبرلیک، اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک در غلظت ۰/۱ میلی‌مولار بر لیتر نشان داد که فعالیت این آنزیم به طور قابل توجه‌ای در تمام مراحل رشد افزایش

بحث

گیاه *Ocimum basilicum* L. همانند سایر گیاهان خانواده نعناعیان چون نعناع (*Mentha*)، مریم‌گلی (*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 تأثیر 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 تأثیر زیادی در بازده و تنوع ترکیبات اسانس بگذارد. از

PAL و فعالیت آنزیم PAL در شرایط کشت درون شیشه‌ای انجام شده است برای مشخص شدن مکانیسم دقیق تأثیر القاء کننده‌ها در این تحقیق، بیان ژن PAL تحت تأثیر هورمون‌های اسید جیبرلیک، اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک (غلظت ۰/۱ میلی‌مولار) در مراحل مختلف رشد ریحان در شرایط گلدانی مورد مطالعه گرفت و نتایج نشان داد که بیان ژن فنیل آلانین آمونیاکاز نسبت به شاهد در طی مراحل رشد رویشی و با افزایش رشد گیاه به طور معنی‌داری افزایش یافت، و در مرحله گلدهی به اوج خود رسید ($P \leq 0.05$). در این تحقیق بیشترین میزان بیان ژن PAL در مرحله گلدهی و برای تیمار اسید جاسمونیک ۱/۵۱، اسید جیبرلیک ۱/۴۷ و اسید سالیسیلیک ۱/۴۱ واحد نسبت به شاهد افزایش داشت و فعالیت آنزیم PAL، برای تیمار اسید جاسمونیک ۱/۲۱، اسید جیبرلیک ۱/۱۵ و اسید سالیسیلیک ۱/۰۷ واحد نسبت به شاهد افزایش داشت. از آنجایی که در این تحقیق نتایج حاصل از میزان بیان ژن و فعالیت آنزیم PAL تحت تأثیر تیمار هورمون‌های اسید جیبرلیک، اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک در غلظت ۰/۱ میلی‌مولار در لیتر در سطح ۵ درصد معنی‌دار شد، بنابراین می‌توان از هورمون‌های مذکور به عنوان القاء کننده غیرزیستی و زیستی کارآمد که از طریق القای سیستم بیان ژن باعث بهبود بخشیدن بیوستنز متابولیت‌های ثانویه می‌شود در بسیاری از گیاهان دارویی استفاده کرد.

فنلی گیاه و فنیل پروپانوئیدها می‌باشد که یک عامل کلیدی تنظیم‌کننده در مسیر بیوستنزی این ترکیبات به شمار می‌رود (Dixon & Paiva, 1995). مطالعات نشان داده‌اند هورمون‌های متیل جاسمونات و اسید سالیسیلیک باعث افزایش میزان متابولیت‌های ثانویه در گیاهان می‌گردد (Kang *et al.*, 2004). مطالعات بر روی آنزیم‌های خانواده O-متیل ترانسفراز در گیاهان مختلف تا حدودی صورت گرفته و تأثیر تیمارهای مختلف بررسی شده است به طور مثال در ریحان، در تیمارهای شیمیایی مانند متیل جاسمونات، متیل سالیسیلات و کیتوزان بیان ژن آنزیم‌های O-متیل ترانسفراز مانند CVOMT افزایش داشتند (Simon & Deshamps, 2002). مطالعات نشان می‌دهد که فعالیت آنزیم PAL تحت تأثیر کیتوزان نیز افزایش می‌یابد (Chakraborty *et al.*, 2009). افزایش فنیل اتانوئید گلیکوزید در ارتباط با افزایش فعالیت آنزیم PAL تحت تأثیر کیتوزان گزارش شد (Cheng *et al.*, 2006). مطالعات نشان داد میزان بیان ژن و فعالیت آنزیم PAL و EMOT در طی مراحل رشد رویشی و با افزایش رشد گیاه، افزایش داشت، در اواخر دوره رویشی در مرحله پیش گلدهی به اوج خود رسیده و در مرحله گلدهی میزان بیان ژن‌های مذکور مجدداً به طور معنی‌داری کاهش یافت (Ziaei *et al.*, 2012). با توجه به این که در سال‌های اخیر بیشتر تحقیقات پیرامون اثر هورمون‌های اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک بر میزان بیان ژن

REFERENCES

- Ali MB, Hahn EJ, Paek KY (2007) Methyl jasmonate and salicylic acid induced oxidative stress and accumulation of phenolics in *Panax ginseng* bioreactor root suspension cultures. *Molecules* 12: 607-621.
- Chakraborty M, Karun A, Mitra A (2009) Accumulation of Phenylpropanoid derivatives in chitosan-induced cell suspension culture of *Cocos nucifera*. *Journal of Plant Physiology*. 166: 63-71.
- Chen C, Zheng Z, Huang J, Lai Z, Fan B (2006) Biosynthesis of salicylic acid in plants. *Plant Signaling and Behavior* 4: 493-496.
- Dixon RA, Paiva NL (1995) Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *Plant Cell* 7:1085-1097.

- Gang DR, Lavid N, Zubieta C, Chen F, Beuerle T, Lewinsohn E, Noel J P, Pichersky E (2002) Characterization of phenylpropene O-methyltransferases from sweet basil: facile change of substrate specificity and convergent evolution within a plant O-methyltransferase family. *Journal of Plant Cell* 14: 505-519.
- Gao-Bin P, Dong-Ming M, Jian-Lin C, Lan-Qing M, Hong W, Guo-Feng L, He-Chun Y, Ben-Ye L (2009) Salicylic acid activates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. *Plant Cell Report* 28: 1127-1135.
- Ghahreman A (1994) Cormophytes of Iran. Academic Publishing Center of Iran 89: 325-237. (In persian).
- Javanmardi J, Khalighi A, Khashi A, Bais HP, Vivanco JM (2002) Chemical characterization of Basil (*Ocimum basilicum* L.) found in local accessions and used in traditional medicines in Iran. *Agricultural and Food Chemistry* 50: 5878-5883.
- 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.
- Labra M, Milele M, Ledda B, Grassi F, Mazzei M, Sala F (2004) Morphological characterization essential oil composition and DNA genotyping of *Ocimum basilicum* L. cultivars. *Journal of 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.
- Moradi A, Sharifi M, Mousavi A (2010) Study on gene expression of Hyoscyamine 6- β hydroxylase (H6H) and Putrescine N-methyl transferase (PMT) isozymes under different concentrations of salicylic acid in hairy roots and different organs of *Atropa belladonna* L. *Journal of Biology* 24(3): 366-372.
- Popova L, Pancheva T, Uzonova A (1997) Salicylic acid: properties, biosynthesis and physiological role. *Plant Physiology* 23: 85-93.
- Raskin I (1992) Salicylate, a new plant hormone. *Plant Physiol.* 99: 799-803.
- Rodway SJ, Gates DW, Brindle C (1991) Control of early seedling growth in varietal lines of hexaploid wheat (*Triticum aestivum*), durum wheat (*Triticum durum*), and barley (*Hordeum vulgare*) in response to the phthalimide growth regulant, AC 94,377. *Plant Growth Regulation* 10: 243-259.
- Sajjadi SE (2006) Analysis of the essential oils of two cultivated Basil (*Ocimum basilicum* L.) from Iran. *Daru* 14: 1-3.
- Schaller F (2001) Enzymes of the biosynthesis of octadecanoid-derived signaling molecules. *Journal Experimental Botany*. 52: 11-23.
- Simon JE, Morales MR, Phippen WB, Vieiram RF, Hao Z (1999) Basil a source of arom compounds and popular culinary and ornamental herb. *Plant Science* 105: 499-505
- Simon JE, Deshamps C (2002) Regulation of essential oil biosynthesis in basil (*Ocimum basilicum* L.). *Plant Science* 115: 741-746.
- Shabani L, Ehsanpour AA (2009) Induction of antioxidant enzymes, phenolic and flavonoid compounds in *in vitro* culture of licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) using methyl jasmonate and salicylic acid. *Iranian Journal of Plant Biology* 21(3):421-432.
- Sharan M, Taguchi G, Gonda K, Jouke T, Shimosaka M, Hayashida N, Okazaki M (1998) Effects of methyl jasmonate and

- elicitor on the activation of phenylalanine ammonia-lyase and the accumulation of scopoletin and scopolin in tobacco cell cultures. *Plant Science* 132: 13-19.
- Staswick PE (1992) Jasmonate, genes, and fragrant signals. *Plant Physiol* 99: 892-807.
- Tahsili J, Sharifi M, Behmanesh B, Pourbozorgi Rudsari N, Ziaei M (2010) Gene expression of eugenol O - methyl transferase and components of essential oils in (*Ocimum basilicum* L.) at different stages of growth. *Journal of Biology* 23 (1): 25-18.
- Telci I, Bayram E, Yilmaz G, Avc B (2006) Variability in essential oil composition of Turkish basils (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Biochemistry and System Ecology* 34: 489-497.
- Wang JW, Zheng LP, Wu JY, Tan RY (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. *Nitric Oxide* 15: 351-358.
- Weathers PJ, Bunk G, McCoy MC (1997) Effects of gibberellic acid on hairy root cultures of *Artemisia annua*: growth and artemisinin production. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant* 41: 47-53.
- 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. Botany* 71: 43-50.
- Yu KW, Gao W, Hahn EJ, Paek KY (2002) Jasmonic acid improves ginsenoside accumulation in adventitious root culture of *Panax ginseng* C.A. Meyer. *Journal of Biochemistry* 11: 211-215.
- Ziaei M, Sharifi M, Behmanesh M, Razavi K (2012) Gene expression and activity of phenyl alanine ammonia-lyase 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* 23: 283-333.