Crop Biotech.
Winter (2014) 8: 21-30.

مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال چهارم، شماره هشتم، زمستان ۱۳۹۳ (۳۰-۲۱)

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

سارا عبدخانی[۱*]، محمود سلوکی[۲]، یعثوب شیری[۲]
۱، دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد بیوتکنولوی کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ۲، دانشیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل
۳، مربی پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه زابل، زابل
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۱/٦- تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۱۲/۲۵)

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

Sara Abdekhani[1*], Mahmood Solouki[2], Yasoub Shiri[3]
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 نعناعیان است که دارای ترکیبات حلقوی و اسانس بوده و خواص ضد باکتریایی و آنتی‌اکسیدانی دارد، که سرشار از ترکیبات فنیل پروپانوئیدی است. آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز 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 فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز و فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز 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 $P \leq ۰/۰۵$ مقایسه و آنالیزها توسط نرم افزار SAS v9 صورت گرفت. نتایج نشان دهنده افزایش در میزان بیان ژن و فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز در تیمار هورمون اسید جاسمونیک در مرحله گلدهی بود. بیان ژن فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز 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 فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز شد.

واژه‌های کلیدی: فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز، هورمون،RT-PCR.

* نویسنده مسئول: سارا عبدخانی
E-mail: abdekhanisara@yahoo.com

مقدمه

گیاه *Ocimum basilicum.* L از تیره نعناعیان *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 د 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 دآمینه شدن فنیل آلانین به وسیله آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز (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 موالونیک 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 آرتمیزین 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 آمونیالیاز می‌گردد (Sharan *et al*., 1998).

اسید سالیسیلیک یا اورتوهیدروکسی بنزوئیک اسید، به گروهی از ترکیبات فنلی تعلق داشته و از نام سالیکس[1] (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*

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 مویین و اندام‌های مختلف شابیزک 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 آمونیالیاز 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، الیسیتورها (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 نموی ریحان است. تا از این طریق درک بهتر مسیر القاء و عکس‌العمل گیاه ریحان امکان‌پذیر گردد.

مواد و روش‌ها

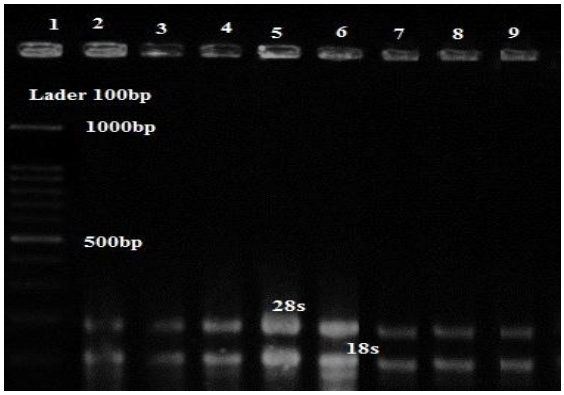
کشت گیاه و تیمار با هورمون‌ها

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 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 ضدعفونی 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 هوگلند 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.

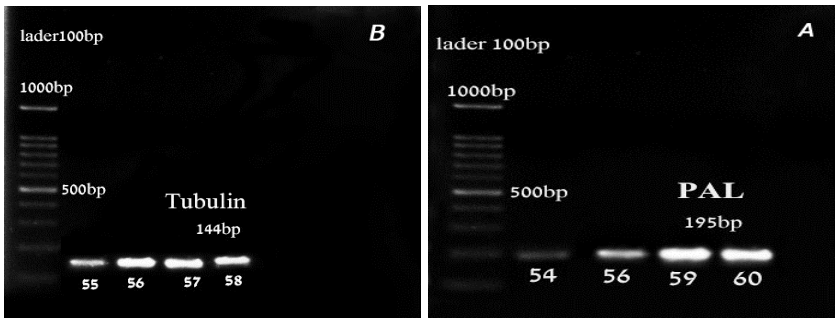
آنالیز بیان ژن

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 اسپکتروفتومتر 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 Tubulinبا استفاده از نرم‌افزار Oligo 5 Therapeutics و سایت Oligonucleotid Properties Calculator انجام شد. ساخت آغازگرها با میانجی‌گری شرکت کیفیت پردازان، از شرکت Oligo کره صورت گرفت (جدول ۱).

به‌منظور 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 numberهای 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 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 ۷۲°C درجه به مدت ۳۰ ثانیه، گسترش نهایی ۷۲°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 عکس‌برداری شد. دمای اتصال بهینه آغازگرها برای ژن PAL۶۰ و برای توبولین ۵۸°C به دست آمد (شکل ۲).



شکل ۱- نمونه‌ای از RNA کل استخراج شده از برگ‌های شاهد (2، 3) و تیمار شده با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار 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 میلی‌مولار) 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 (ºC)	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
Rerverse Tubulin	5´-AACAAGGCAAAAACATTCCG-3´	52.3	40.0	144

تکثیر ژن فنیل آلانین آمونیالیاز (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) نشان داده شده است. همچنین برنامه حرارتی برای تکثیر هر دو ژن با استفاده از روش Real time PCR و طبق (جدول۳) 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 نمونه۳ تکرار در نظر گرفته شد و از روش ΔΔCt برای آنالیز داده‌ها استفاده شد. پس از به دست آوردن Ct هر دو ژن PAL و Tubulin برای تمام نمونه‌ها و محاسبه ΔΔCt 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≤۰/۰۵ انجام گرفت.

جدول ۲- اجزاء واکنش استاندارد Real time PCR

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

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

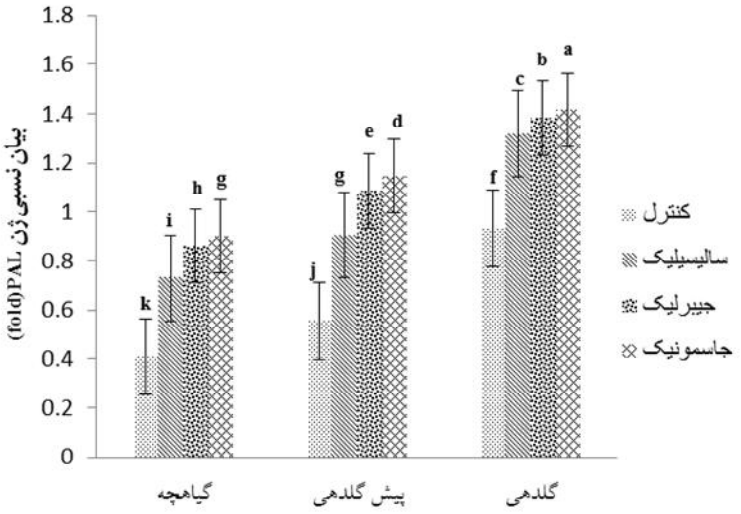
سنجش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL)

مقدار ۰/۳ گرم از بافت تازه برگ را توزین کرده و در ۶/۵ میلی‌لیتر بافر Tris-HCl ۵۰ میلی‌مولار (pH=۸/۸) روی یخ ساییده شد و عصاره حاصل به مدت ۳۰ دقیقه با دور ۵۰۰۰rpm سانتریفیوژ گردید. محلول رویی از رسوب جدا شد این محلول حاوی آنزیم PAL است. مخلوطی از ۱ میلی‌لیتر بافر استخراجی بالا، ۰/۵ میلی‌لیتر فنیل‌آلانین 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 اتیل‌استات افزوده شد. فاز روغنی تشکیل شده جدا و باقیمانده در دمای آزمایشگاه قرار داده 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 $۹۵۰۰M^{-1}cm^{-1}$ به دست آمد. فعالیت این آنزیم به صورت تغییر در OD_{290}/h/ mg protein بیان شد (Wang *et al*., 2006).

نتایج

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

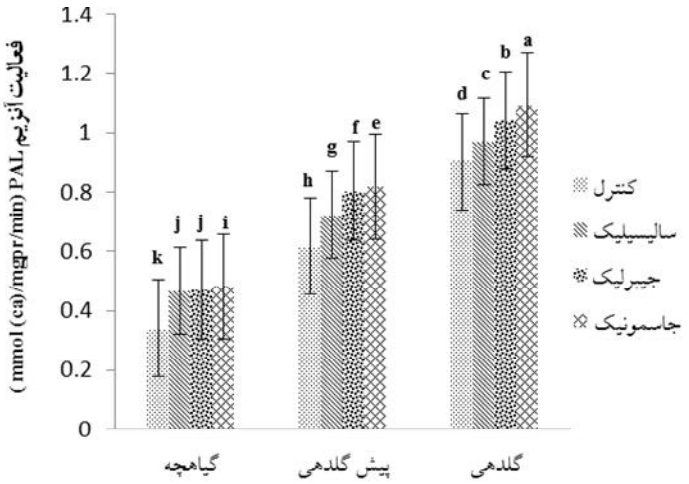
نتایج حاصل از اندازه‌گیری بیان ژن فنیل آلانین آمونیالیاز در برگ گیاه ریحان پس از تیمار با اسید جیبرلیک، اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک در غلظت ۰/۱ میلی‌مولار بر لیتر نشان داد که بیان این ژن به طور قابل توجه‌ای در تمام مراحل رشد افزایش یافت (شکل ۳). بیشترین میزان بیان این ژن برای هورمون اسید جاسمونیک 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≤۰/۰۵). 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).



شکل ۳- میزان بیان ژن فنیل آلانین‌آمونیالیاز در برگ‌های ریحان با تیمار متقابل تنظیم‌کننده‌های رشد و مراحل رشد گیاهی. حروف متفاوت بالای نمودارها نشان‌دهنده معنی‌دار بودن در سطح (P≤۰/۰۵) می‌باشد.

نتایج اثر مراحل رشد گیاهی و تنظیم کننده‌های رشد بر فعالیت آنزیم PAL

نتایج حاصل از اندازه گیری 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 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≤۰/۰۵). همچنین اسید جیبرلیک ۱/۱۵ و اسید سالیسیلیک ۱/۰۷ واحد نسبت به شاهد افزایش یافت و در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود (شکل۴).



شکل ۴- میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین‌آمونیالیاز در برگ‌های ریحان با تیمار متقابل تنظیم‌کننده‌های رشد و مراحل رشد گیاهی. حروف متفاوت بالای نمودارها نشان‌دهنده معنی‌دار بودن در سطح (P≤۰/۰۵) می‌باشد.

بحث

گیاه *Ocimum basilicum* L. 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 تأثیر عواملی چون آنتوژنی گیاه، مکان تولید اسانس، 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 تأثیر 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 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 ترانسفرازی 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

فنلی گیاه و فنیل پروپانوئیدها می‌باشد که یک عامل کلیدی تنظیم‌کننده در مسیر بیوسنتزی 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 تاثیر 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 پیش‌گلدهی به اوج خود رسیده و در مرحله گلدهی میزان بیان ژن‌های مذکور مجدداً به طور معنی‌داری کاهش یافت (Ziaei *et al*., 2012; Tahsili *et al*., 2010). با توجه به این که در سال‌های اخیر بیشتر تحقیقات پیرامون اثر هورمون‌های اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک بر میزان بیان ژن 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 آمونیالیاز 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 ($P\leq ۰/۰۵$). 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 بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه می‌شود در بسیاری از گیاهان دارویی استفاده کرد.

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-lnduced 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 persion).

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) Morphologicalcharacterization 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, 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.

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 salicyclic 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 hexaplpid wheat (*Triticum aestivum*), durum wheat (*Triticum durum*), and barley (*Hrdeum vulgare*) in response to the phthalimide growth regulant, AC 94,377. Pant 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 omamental herb. Plant Science 105: 499-505

Simon JE, Deshamps C (2002) Regulation of essential oil biosynthesis in basi (*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 ammonialyase 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 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 23: 283-333.