Archive of SID

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی

علمی-پژوهشی و ISC

تاثیر تنش خشکی بر بیان ژن‌های کدکننده آنزیم‌های فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL)، اوژنول سینتاز ۱ (EGS1) و کافئیک O- متیل ترانسفراز (COMT) در ریحان

بابک عبدالهی مندولکانی*[۱]، محمد علی‌پور[۲]، رضا درویش زاده[۱]، بختیار مجرومی سنجی[۲]

[۱]به ترتیب دانشیار و استاد گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

[۲]دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۳/۰۷، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۰۲

چکیده

ریحان (*Ocimum basilicum* L.) از مهمترین گیاهان دارویی متعلق به خانواده نعناعیان است که اسانس آن سرشار از ترکیبات فنیل پروپانوئیدی می‌باشد. تنش‌های محیطی مانند خشکی می‌توانند درصد و میزان ترکیبات اسانس را تغییر داده و بر بیان ژن‌های دخیل در سنتز آن نیز تاثیر بگذارند. به منظور مطالعه اثر تنش خشکی بر بیان برخی ژن‌های کلیدی دخیل در بیوسنتز فنیل پروپانوئیدها از جمله فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL)، اوژنول سینتاز۱ (EGS1) و کافئیک o- متیل ترانسفراز (COMT) در رقم کشکنی لولوی ریحان، آزمایشی بر پایه طرح کاملا تصادفی با سه تکرار در گلخانه اجرا شد. تنش خشکی در سه سطح ۱۰۰ (کنترل)، ۷۵ و ۵۰ درصد ظرفیت زراعی در مرحله ۶ تا ۸ برگی اعمال شد. بیان ژن‌های مورد نظر با استفاده از تکنیک Real time PCR بررسی شد. تجزیه داده‌های مربوط به بیان ژن‌های موردنظر و مقایسه میزان بیان ژن EGS1 در تیمار ۷۵ و ۵۰ درصد ظرفیت زراعی نسبت به شاهد نشان داد که میزان بیان این ژن در تیمار ۷۵ درصد تغییر چندانی نسبت به کنترل نداشته ولی در تیمار ۵۰ درصد، ۹/۷۴ برابر کنترل افزایش یافت. میزان بیان ژن COMT در هر دو تیمار تنش خشکی نسبت به شاهد، تغییر چندانی نکرد ولی میزان بیان ژن PAL در هر دو تیمار تنش خشکی نسبت به کنترل، ۱/۵ تا ۲ برابر افزایش یافت. البته میزان بیان این ژن بین دو تیمار تنش خشکی معنی دار نبود. بنابراین احتمال می‌رود بتوان از طریق اعمال تنش خشکی و افزایش بیان ژن‌های EGS1 و PAL محتوای ترکیبات فنیل پروپانوئیدی را در ریحان افزایش داد.

واژه‌های کلیدی: *ریحان، تنش خشکی، Real time PCR، ترکیبات فنیل پروپانوئیدی، بیان ژن.*

* نویسنده مسئول: بابک عبدالهی تلفن: ۰۹۱۲۲۳۸۶۹۹۰ Email: b.abdollahi@urmia.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

ریحان (*Ocimum basillicum* L.) از خانواده Lamiaceae و بومی مناطق گرم آفریقا می‌باشد (Peyvast, 2007). این گیاه حاوی اسانس بوده و پیکر رویشی آن اشتها آور است و برای معالجه نفخ شکم و برخی ناراحتی‌های قلبی و کمک به هضم غذا استفاده می‌شود (Adigzel *et al*., 2005). گونه‌های ایرانی ریحان نیز در درمان تب، التهاب گلو و درد معده به کار می‌رود (Javanmardi *et al*., 2002). ریحان یک محصول مهم اقتصادی در سراسر جهان می‌باشد که تولید سالیانه اسانس آن به ۱۰۰ تن و ارزش فروش گلدانی آن به ۱۵ میلیون دلار می‌رسد. بزرگترین محل تجارت ریحان ایالات متحده، ژاپن و کشورهای اروپایی می‌باشد (Begum *et al*., 2002). اسانس این گیاه به‌طور گسترده‌ای در صنایع غذایی، عطرسازی، فرآورده‌های دهانی و دندانی و در طب سنتی کاربرد دارد و دارای خواص ضد میکروبی است (Khalid, 2006). اسانس ریحان حدود یک درصد است و شامل ترکیبات متنوع و پیچیده‌ای می‌باشد که به دو گروه ترپنوئیدها (مونوترپن‌ها و سزکوئی ترپن‌ها) و فنیل پروپانوئیدها (مانند اوژنول، چاویکول، متیل سینامات و غیره) تقسیم می‌شوند (Sangwan *et al*., 2001).

فنیل پروپانوئیدها مولکول‌های کوچک فنلی هستند که دارای یک حلقه فنیلی و یک زنجیره سه کربنی هستند. این ترکیبات عامل طعم، بو و مزه در اسانس هستند و نقش‌های متفاوتی را در گیاهان بازی می‌کنند. در میان فنیل پروپانوئیدها دو ماده متیل چاویکول و اوژنول از مهمترین اجزای سازنده اسانس ریحان به شمار می‌روند. بیوسنتز ترکیبات فنیل پروپانوئیدی 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 پروپانوئیدها از فنیل آلانین مشتق می‌شوند که ابتدا توسط آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL)[1] در اثر دآمیناسیون به اسید ترانس سینامیک تبدیل می‌شود. سپس توسط سینامات۴- هیدروکسیلاز (C_4H)[2] اسید-کوماریک به وجود می‌آید و ۴-کومارات کوآنزیم آ لیگاز (4CL)[3] در ادامه مسیر P-کوماریک را به P-کوماریل آلدهید تبدیل می‌کند. این ترکیب توسط سینامیل الکل دهیدروژناز (CAD)[4] به فرم الکلی خود تبدیل می‌شود و در طی مراحلی به چاویکول و اوژنول تبدیل می‌شود که از اجزای تشکیل دهنده اسانس ریحان محسوب می‌شوند. یکی دیگر از آنزیم‌های اصلی واکنش‌های متابولیسم فنیل پروپانوئیدها، کافئیک اسید o-متیل ترانسفراز

1. Phenylalanine ammonia lyase
2. Cinnamate 4-hydroxylase
3. 4- coumarate coA ligase
4. Cinnamyl alcohol dehydrogenase

Journal of Agricultural Biotechnology; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500
www.SID.ir

(COMT)[1] بوده که تبدیل کافئیک اسید به فرولات را کاتالیز می‌نماید. مرحله انتهایی هم متیله شدن ۴-هیدروکسیل چاویکول، به وسیله آنزیم چاویکول O-متیل ترانسفراز و تشکیل متیل چاویکول می‌باشد. اوژنول از ترکیبات مهم انتهای مسیر بوده و توسط آنزیم اوژنول سینتاز۱ (EGS1)[2] از پیش ماده کونیفریل استات بوجود می‌آید (Gang *et al.*, 2001).

عوامل محیطی باعث تغییرات در رشد گیاهان دارویی و نیز در مقدار و کیفیت مواد موثره آنها نظیر آلکالوئیدها، استروئیدها و روغن‌های فرار (اسانس‌ها) می‌گردند (Omidbaigi, 2008). رشد و عملکرد گیاهان در بسیاری از مناطق دنیا به وسیله تنش‌های محیطی زنده و غیر زنده متعدد محدود می‌گردد. حدود یک سوم کره زمین را مناطق خشک و نیمه خشک در برمی‌گیرد که وسعت این مناطق بیش از ۴۵ میلیون کیلومتر مربع تخمین زده شده است. یکی از مهم‌ترین فاکتورهای محیطی موثر در زندگی گیاهان آب می‌باشد. به طور معمول یک دوره‌ی کمبود آب سبب اثرات منفی در رشد و نمو گیاهان می‌شود (Ebadi & Azizi, 2011). امروزه مشخص شده است که تنش خشکی همیشه به طور کامل مضر نیست و گزارش‌هایی مبنی بر تاثیر مثبت آن بر ساخت مواد موثره‌ی گیاهان دارویی و معطر وجود دارد (Omidbaigi, 2008). در گیاهان مختلف تنش خشکی باعث افزایش مواد موثره آنها می‌شود که این مطلب در گیاهان گل راعی (*Hypericum brasiliens*)، ریحان (*O. american* L.) و مرزه (*Satureja hortesis* L.) نشان داده شده است (Khalid, 2006). از آنجایی که شرایط تنشی در غالب نقاط کشور وجود دارد، با بررسی ارتباط بین تنش‌های محیطی از جمله خشکی و تولید و تجمع متابولیت‌های ثانویه در گیاهان و شناسایی ژن‌های کلیدی و موثر در مسیر بیوسنتز ترکیبات فنیل پروپانوئیدی از جمله فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL)، کافئیک اسید o-متیل ترانسفراز (COMT) و اوژنول سینتاز۱ (EGS1) می‌توان زمینه لازم برای دستکاری ژنتیکی مسیر بیوسنتز این ترکیبات و امکان افزایش تولید آنها در گیاهان را فراهم ساخت. بنابراین هدف از این پژوهش مطالعه تاثیر تنش خشکی بر میزان بیان ژن‌های PAL، COMT و EGS1 و شناسایی سطح بهینه تنش جهت تغییر بیان این ژن‌ها و احتمالا افزایش ترکیبات مهم فنیل پروپانوئیدی ریحان مانند اوژنول و متیل چاویکول بود.

مواد و روش‌ها

به منظور بررسی تاثیر تنش خشکی بر بیان ژن‌های PAL، COMT و EGS1 در رقم کشکنی لولوی ریحان (پروفسور عباس حسنی، گروه علوم باغبانی دانشگاه ارومیه)، آزمایشی به صورت گلدانی در گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه بر پایه طرح کاملا تصادفی با سه تیمار و سه تکرار اجرا شد. جهت تعیین درصد ظرفیت زراعی،

5. Caffeic acid O-methyl transferase
6. Eugenol O-methyl transferase

www.SID.ir

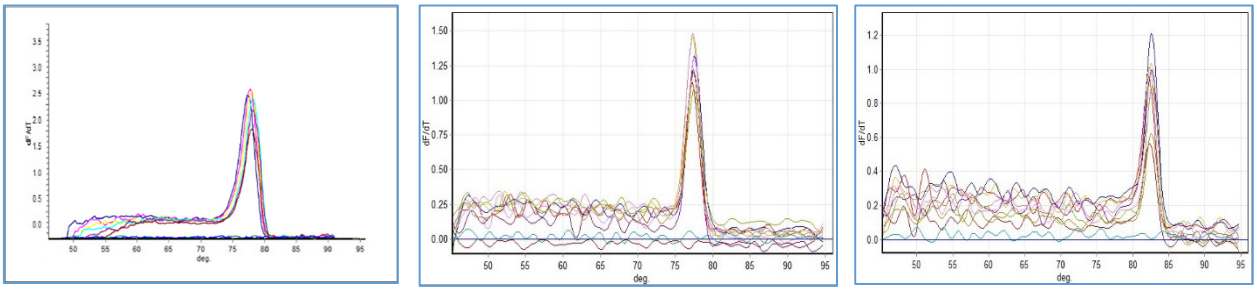
Archive of SID

نمونه‌هایی از خاک مورد استفاده که مقدار رطوبت آن در حد ظرفیت زراعی بود، با استفاده از استوانه برداشته و برای تعیین رطوبت به آزمایشگاه گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه منتقل و درصد ظرفیت زراعی با استفاده از دستگاه صفحات فشاری (شرکت آذر خاک آب، ارومیه) اندازه گیری شد. پس از آماده سازی گلدان‌ها، تعدادی بذر داخل آنها کاشته و تا رسیدن به مرحله ۸-۶ برگی، بوته‌ها بطور یکسان آبیاری شدند و از این مرحله به بعد تنش خشکی با ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ (کنترل) درصد ظرفیت زراعی اعمال شد.

در مرحله گلدهی کامل برای مطالعه بیان ژن-های مذکور نمونه‌های برگی برداشت و به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شد. توالی ژن‌های مذکور از پایگاه‌های اطلاعاتی ذخیره و آغازگرهای اختصاصی با استفاده از نرم افزارهای Fast PCR و Gene Runner طراحی شد (جدول ۱). استخراج RNA از نمونه‌های برگی با استفاده از محلول استخراج RNX-plus^{TM} (سیناکلون، ایران) مطابق دستورالعمل پیشنهادی شرکت سازنده با کمی تغییرات انجام شد. جهت ساخت cDNA از آغازگر هگزامر تصادفی و کیت First Aid Revert Synthesis cDNA Strand (شرکت فرمنتاز، آلمان) مطابق دستوالعمل پیشنهادی شرکت سازنده استفاده شد. برای بررسی صحت ساخت cDNA از واکنش‌های کنترل منفی RT (عدم استفاده از آنزیم RT در مرحله سنتز cDNA) و NTC (عدم استفاده از RNA مورد مطالعه در مرحله سنتز cDNA) و همچنین از واکنش کنترل مثبت مطابق دستورالعمل کیت سنتز cDNA استفاده شد (Abdollahi Mandoulakani *et al*., 2017). میزان بیان ژن‌ها با استفاده از Real time PCR (Rotor gene Q-Pure Detection-Qiagen) مدل ۶۰۰۰ (شرکت کیاژن، آمریکا) در گیاهان تیمار شده نسبت به کنترل بررسی شد. در این فرایند از ژن 18SrRNA به عنوان ژن مرجع جهت نرمال سازی استفاده شد. واکنش‌های Real time PCR با در نظر گرفتن دو تکرار بیولوژیک در حجم ۱۲/۵ میکرولیتر با استفاده از کیت Maxima SYBR Green/Fluoresence qPCR Master Mix (2x) (شرکت فرمنتاز، آلمان) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. دوره‌های زمانی جهت تکثیر ژن‌های مورد نظر با توجه به توالی آغازگرها و محصول حاصل از تکثیر ژن شامل فعال سازی ابتدایی آنزیم در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه در یک سیکل و بعد ۴۰ چرخه شامل مراحل واسرشته سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و اتصال آغازگرها در دماهای اتصال مربوط به هر ژن (جدول ۱) به مدت ۳۰ ثانیه و بسط در دمای ۷۲ درجه به مدت ۴۰ ثانیه انجام شد. پس از انجام واکنش، منحنی ذوب (Melt curve) برای هر کدام از ژن‌ها (شکل ۱) رسم و صحت تکثیر محصول مربوط به هر ژن با استفاده از منحنی ذوب مربوط به آن ژن و همچنین آنالیز ژل تایید شد.

Journal of Agricultural Biotechnology; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱- منحنی ذوب ژن‌های کافئیک اسید o-متیل ترانسفراز (COMT)، اوژنول سینتاز۱ (EGS1) و فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) در واکنش‌های real time PCR. (از راست به چپ)

Figure 1- The Melt curve of caffeic acid O-methyl transferase (COMT), eugenol synthase 1 (EGS1) and phenylalanine ammonia lyase (PAL) genes in real time PCR reactions (from right to left)

در واکنش Real time PCR کمیت نسبی به وسیله اندازه‌گیری افزایش تشعشع فلورسنس در نتیجه اتصال رنگ SYBR Green با محصول دو رشته‌ای تکثیر شده با نرم افزار Rotor-Gene Q انجام می‌گیرد. پس از اتمام واکنش‌ها مقدار Threshold طوری در نظر گرفته شد که سیگنال-های فلورسنت را در فاز نمایی واکنش قطع کند. پس از بدست آوردن Ct، مقدار بیان نسبی ژن‌های مورد مطالعه با روش ΔΔCt (Pfaffl *et al.*, 2004) محاسبه شد. نرمال بودن اشتباهات و داده‌ها حاصل از بیان نسبی ژن‌ها با استفاده از روش کلموگراف-اسمیرنوف در نرم افزار Minitab نسخه ۱۶ بررسی شد. برای بررسی اختلاف بین تیمارهای تنش به لحاظ میزان نسبی بیان ژنهای مورد مطالعه، آزمون t جفت نشده با نرم افزار SAS نسخه ۹/۱ انجام گرفت.

نتایج و بحث

تجزیه داده‌ها و مقایسه میزان بیان ژن PAL در تنش شدید (۵۰ درصد ظرفیت زراعی) و تنش متوسط (۷۵ درصد ظرفیت زراعی) نسبت به کنترل (بدون اعمال تنش) نشان داد که میزان بیان این ژن به ترتیب ۱/۵ و ۲ برابر در تنش شدید و متوسط افزایش یافته است (شکل ۲). بنابراین می‌توان بیان کرد که تنش خشکی تاثیر چندانی بر میزان بیان این ژن نداشته است. مقایسه میزان بیان ژن COMT در هر دو تیمار تنش نسبت به کنترل، نشان داد که تنش ۵۰ درصد ظرفیت مزرعه‌ای میزان بیان این ژن را تغییر نداده است. همچنین تنش ۷۵ درصد ظرفیت مزرعه‌ای میزان بیان این ژن را نسبت به کنترل به میزان ناچیزی (۱/۲ برابر) افزایش داده است (شکل ۲). در مطالعه ای اثر تنش خشکی بر بیان برخی ژن‌های دخیل در بیوسنتز فنیل

Journal of Agricultural Biotechnology; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500
www.SID.ir

Archive of SID

پروپانوئیدها در ریحان گزارش شد که تنش خشکی ۵۰ و ۷۵ درصد ظرفیت مزرعه‌ای بیان ژن سینامیل الکل دهیدروژناز را تغییر نمی‌دهد و بیان ژن‌های ۴-کومارات کوآنزیم A لیگاز (4CL) و سینامات ۴-هیدروکسیلاز (C4H) را کاهش می-دهد (Abdollahi Mandoulakani *et al*., 2017). درمطالعه‌ای که روی بیان ژن‌های PAL و C4H در پاسخ به تنش خشکی در گیاه چای انجام شد؛ بیان این ژن‌ها کاهش یافت. در این تحقیق تنش خشکی به صورت قطع آبیاری انجام شد که در روزهای ۴ و ۶ شدیدا بیان این ژن‌ها کاهش یافته و تا روز هشتم این کاهش ادامه داشت. درمقایسه با شرایط کنترل، میزان بیان ژنهای PAL و C4H در روزهای مذکور به ترتیب ۶۱ و۷۰ درصد کاهش نشان داد (Singh *et al*., 2009). در حالی‌که، در مطالعه حاضر بیان ژن PAL تحت تاثیر تنش خشکی به میزان ۱/۵ تا ۲ برابر افزایش یافت. در تحقیقی دیگر اثر تنش خشکی بر بیان ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز گلیسیریزین (ترپنوئید) در گیاه شیرین بیان بررسی شد؛ ارزیابی بیان ژن با استفاده semi-quantitative RT-PCR نشان داد که بیان ژن‌های Sequalene synthase (SQS) و β-amyrin synthase (bAS) دراثر تنش خشکی در مرحله گیاهچه و گیاه بالغ افزایش داشت در حالی که سطح بیان ژن cyclo artenol synthase (CAS) نسبتا ثابت باقی ماند (Nasrollahi *et al*., 2014). در مطالعه حاضر نیز بیان ژن COMT در اثر تنش خشکی تغییر چندانی نشان نداد. تجزیه داده‌ها و مقایسه میزان بیان ژن EGS1 در تیمار ۷۵ و ۵۰ درصد ظرفیت زراعی نسبت به شاهد نشان داد میزان بیان این ژن در تیمار ۷۵ درصد تغییر چندانی نسبت به کنترل نداشته ولی در تیمار ۵۰ درصد، ۹/۷۴ برابر کنترل افزایش می‌یابد (شکل ۳). آنزیم EGS1 در انتهای مسیر بیوسنتز فنیل پروپانوئیدها در ریحان دخالت دارد و باعث تولید اوژنول می-شود (Gang *et al*., 2001). در مطالعه دیگری گزارش شده که تنش خشکی ۵۰ درصد ظرفیت مزرعه‌ای در ریحان میزان بیان ژن‌های چاویکول O-متیل ترنسفراز و اوژنول O-متیل ترانسفراز (از ژن‌های مهم دخیل در بیوسنتز فنیل پروپانوئیدها در ریحان) را به ترتیب ۶/۴۶ و ۴۶/۳۳ برابر نسبت به کنترل افزایش می‌دهد و تغییرات میزان بیان این ژن‌ها تحت تنش خشکی با میزان متیل چاویکول و متیل اوژنول در ریحان همبستگی معنی داری دارد (Abdollahi Mandoulakani *et al*., 2017). در تحقیقی تنش خشکی سبب افزایش بیان ژن لینالول سینتاز و افزایش تولید لینالول در گیاه ریحان گردید (Khakdan *et al*., 2015). در پژوهش دیگری افزایش بیان چشمگیر ژن S-like RNase در گندم و خویشاوند وحشی گندم (*Aegilops tauschii*) در پاسخ به تنش خشکی گزارش گردید (Ravash *et al*., 2013).

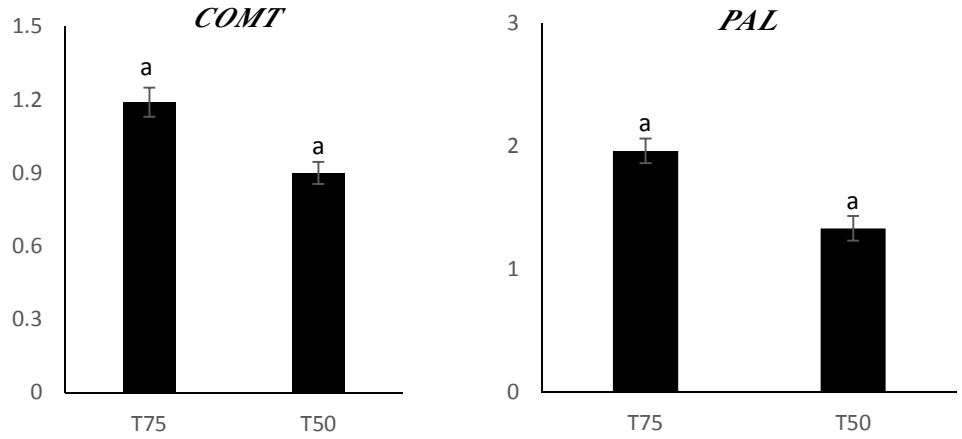
Journal of Agricultural Biotechnology; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500
www.SID.ir

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در واکنش‌های Real time PCR.

Table 1- Characteristics of the used primers in Real time PCR reactions.

دمای اتصال Annealing temperature	اندازه محصول (جفت باز) Amplicon length (bp)	توالی آغازگر Primer sequence	شماره دسترسی Accession number	نام ژن Gene name
60	65	F:CTACGTCCCTGCCCTTTGTACA R:ACACTTCACCGGACCATTCAA	AK059783	18s rRNA
55	158	F:CATTGCTGGTGTCCTCTTAG R:CCACTGCTGTCCCATTTACT	AB436791	PAL
53.5	85	F:ACCCATAGCAATCCTTCACTG R:AGTTGAAGCCTCCACATCGT	DQ372812.1	EGS1
55.8	96	F:TTGCCAGAAGCCCCAGACAC R:CGTCCTCTCCTTGCCACCACCTG	HM990154.1	COMT

PAL: phenyl alanine ammonialyase, EGS1: eugenol synthase 1, COMT: caffeic acid o-methyltransferase



شکل ۲- تاثیر سطوح مختلف تنش خشکی بر بیان نسبی ژنهای فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) و کافئیک‌o-متیل ترانسفراز(COMT) در گیاه ریحان (T50: تنش خشکی ۵۰ درصد ظرفیت زراعی و T75: تنش خشکی ۷۵ درصد ظرفیت زراعی. محور عمودی نمودار میزان نسبی بیان ژن را نشان می‌دهد و حروف متفاوت روی نمودار نشان دهنده اختلاف معنی دار درسطح ۵ درصد بین تیمارها می‌باشد).

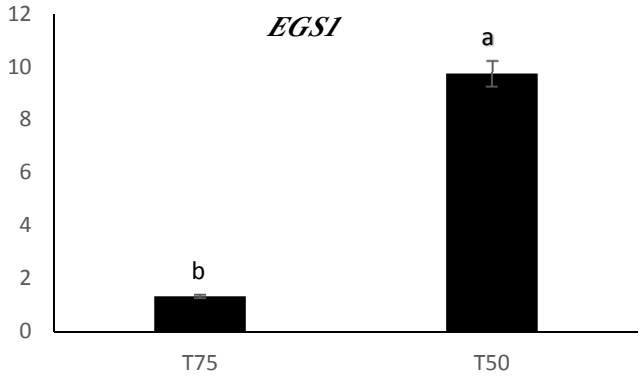
Figure 2- The Effect of drought stress on the expression levels of phenylalanine ammonia lyase (PAL) and caffeic acid O- methyltransferase (COMT) in basil (T50: 50% of field capacity and T75: 75% of field capacity, vertical axis of the graph shows the relative expression levels of the genes and common letters on the graph show no significant difference between drought treatments).

www.SID.ir

Archive of SID

در مطالعه ای تنش خشکی سبب افزایش بیان ژن پلیگون ردوکتاز (Polygon Redoctase) و انباشت ماده پلیگون در پونه شد (Hassanpour *et al*., 2014). در پژوهشی دیگر بیان ژن کلیدی دخیل در متابولیسم پرولین (P5CS) در برگ‌ها و جوانه‌های گل ژنوتیپ‌های لوبیای معمولی (*Phaseolus vulgaris* L.) تحت تنش خشکی مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاکی از افزایش بیان معنی دار ژن P5CS در اثر تنش خشکی بود (Garaghanipur e*t al*., 2014).

در تحقیق حاضر نیز بیان ژن EGS1 در اثر تنش خشکی شدید (۵۰ درصد) افزایش یافته است و به نظر می‌رسد با تغییر میزان بیان ژن‌های دخیل در سنتز ترکیبات فنیل پروپانوئیدی بتوان میزان برخی از این ترکیبات از جمله اوژنول را در ریحان افزایش داد. البته لازم است در مطالعات آینده میزان ترکیبات تولیدی توسط این ژن‌ها نیز اندازه گیری شود و ارتباط آن‌ها با میزان بیان ژن‌ها مطالعه شود تا با اطمینان بیشتری ژن‌های کلیدی جهت دستکاری‌های ژنتیکی به منظور تولید واریته‌های ریحان دارای میزان بالایی از ترکیبات با ارزش شناسایی شود.



شکل ۳- تاثیر سطوح مختلف تنش خشکی بر بیان نسبی ژن اوژنول سینتاز ۱ (EGS1) در گیاه ریحان (T50: تنش خشکی ۵۰ درصد ظرفیت زراعی و T75: تنش خشکی ۷۵ درصد ظرفیت زراعی. محور عمودی نمودار میزان نسبی بیان ژن را نشان می‌دهد و حروف متفاوت روی نمودار نشان دهنده اختلاف معنی دار درسطح ۵ درصد بین تیمارها می باشد).

Figure 3- The Effect of drought stress on expression levels of eugenol synthase 1 (EGS1) in basil (T50: 50% of field capacity and T75: 75% of field capacity. Vertical axis of the graph shows the relative expression level of the gene and different letters on the graph shows significant difference between treatments).

Journal of Agricultural Biotechnology; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500
www.SID.ir

Archive of SID

منابع

Abdollahi Mandoulakani B, Eyvazpour E, Ghadimzadeh M (2017). The effect of drought stress on the expression of key genes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids and essential oil components in basil (*Ocimum basilicum* L.). Phytochemistry 139: 1-7.

Adigzel A, Gulluce M, Sengul M, Ogutcu H, Karaman I (2005). Antimicrobial Effects of *Ocimum basilicum* (Labiatae) Extract. Turkish Journal of Biology 29: 155-160.

Begum F, Amin MN, Azad M.A.K. (2002). In vitrorapid clonal propagation of *Ocimum basilicum* L. Plant Tissue Culture 12: 27-35.

Dixon RA, Choudhary AD, Dalkin D, Edwards R, Fahrendorf T, Gowri G, Harrison MJ, Lamb CJ, Loake GJ, Maxwell CA, Orr J, Paiva NL (1990). Molecular biology of stress induced phenyl propanoid and isoflavonoid biosynthesis in alfalfa. Phenolic Metabolism in Plants 26: 91-138.

Ebadi M, Azizi M (2011). A review of the effects of drought stress on quality and quantity of active ingredients of medicinal and aromatic plants. Olive Journal. 219: 24-29.

Gang DR, Wang J, Dudareva N, Nam KH, Simon J.E, Lewinsohn E, Pichersky E (2001). An investigation of the storage and biosynthesis of phenylpropenes in sweet basil. Plant Physiology 125: 539-555.

Garaghanipur N, Shiran B, Khodambashie M, Molaie AR (2014). Study of Proline accumulation and gene expression of P5CS in leaves and flower buds of common bean cultivars under drought stress. Journal of Agricultural Biotechnology 6: 129-142 (In Farsi).

Hassanpour H, Khavari-Nejad RA, Niknam V, Razavi Kh, Najafi F (2014). Effect of penconazole and drought stress on the essential oil composition and gene expression of *Mentha pulegium* L. (Lamiaceae) at flowering stage. Acta Physiologiae Plantarum 36: 1167-1175.

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.

Khakdan F, Alizadeh H, Ranjbar M, Shahriari Ahmadi F (2015). The effect of water deficit stress on the expression of key genes involved in the biosynthesis of monoterpene and sesquiterpene in basil (*Ocimum basilicum*). 1st International and 9st National Biotechnology congress of Islamic Republic Iran. Shahid Beheshti University, Tehran, Iran (In Farsi).

Khalid Kh.A. (2006). Influence of water stress on growth, essential oil, and chemical composition of herbs (*Ocimum* sp.) Int. Agrophysics, 20: 289-296.

Nasrollahi V, Mirzaie-asl A, Piri Kh, Nazeri S, Mehrabi R (2014). The effect of drought stress on the expression of key genes involved in the biosynthesis of triterpenoid saponins in liquorice (*Glycyrrhiza glabra*). Phytochemistry 103: 32–37.

Omidbaigi R (2008). Production and Processing of medicinal plants. Astan'e Qods'e Razavi publication. Vol 3. Tehran-Iran, 397 pp. (In Farsi).

Peyvast Gh (2007). Olericulture. Fifth Edition. University of Guilan. Daneshpazir Publishing, 577 pp. (In Farsi).

Pfaffl MW (2004). Quantification strategies in real-time PCR. In: Bustin SA, editor. The real-time PCR Encyclopedia A–Z of Quantitative PCR. International University Line; La Jolla, pp. 87–112.

Journal of Agricultural Biotechnology; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

www.SID.ir

Ravash R, Shiran B, Ebrahimie E, Houshmand SA (2013). Study of S -Like RNase expression in wheat and its wild relatives under drought stress. Journal of Agricultural Biotechnology 5: 27-38 (In Farsi).

Sangwan NS, Farooqi AHA, Shabih F, Sangwan, RS (2001). Regulation of essential oil production in plants. Plant Growth Regulation 34: 3-21.

Singh K, Kumar S, Rani A, Gulati A, Ahuja PS (2009). Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and cinnamate 4-hydroxylase (C4H) and catechins (flavan-3-ols) accumulation in tea. Functional and Integrative Genomics 9: 125-134.

www.SID.ir

Archive of SID

The effect of drought stress on the expression of genes encoding phenylalanine ammonia lyase (PAL), eugenol synthase 1 (EGS1) and caffeic acid O-methyltransferase (COMT) enzymes in Basil (*Ocimum basilicum*)

Abdollahi Mandoulakani B.[1*], Alipoor M. [2], Darvishzadeh R.[1], Majroomi Senji B. [2]

[1]Associate professor and Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.
[2]MSc students of Agricultural Biotechnology, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.

Abstract

Basil (*Ocimum basilicum* L.) is one of the important medicinal plants belonging to the mint family which is a rich source of phenylpropanoid compounds such as methylchavicol and methyleugenol. Environmental stresses such as drought could change the percentage and content of the essential oils and expression level of the genes involved in their biosynthesis. In the current study, an experiment based on completely randomized design (CRD) with three replications was conducted in greenhouse to study the effect of drought stress on the expression of key genes involved in phenylpropanoids biosynthesis in *O. basilicum* c.v. Keshkeni luvelou. The genes studied, were phenylalanine ammonialyase (PAL), eugenol synthase 1 (EGS1) and caffeic acid O-methyltransferase (COMT). Plants were exposed to three levels of 100 (control), 75 and 50 % field capacity (FC) at the 6-8 leaf stage. The expression level of the studied genes were determined by real time PCR technique in plant leaves at the flowering stage. Analysis of gene expression data indicated that 50% FC increases the expression level of EGS1 by about 9.74, whereas those of COMT relatively remained unchanged. The expression level of PAL was increased 1.5 to 2 times under drought stress, although no significant difference for its expression was observed between 50% and 75% FC. Thus, it is possible to enhance the content of the phenylpropanoid compounds in basil through the application of controlled drought stress and consequently increasing the expression levels of EGS1 and PAL genes.

Keywords*: Basil, Drought stress, Real time PCR, Phenylpropanoid compounds, Gene expression.*

* Corresponding Author: Abdollahi Mandoulakani B. Tel: 09122386990 Email: b.abdollahi@urmia.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

Journal of Agricultural Biotechnology; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500
www.SID.ir