فصلنامهٔ علمی پژوهش و توسعه جنگل
جلد ۸، شماره ۴، صفحه ۴۱۴-۴۰۳، (۱۴۰۱)

DOI: 10.30466/jfrd.2022.54278.1611
DOR: 20.1001.1.24763551.1401.8.4.5.9

مقالهٔ پژوهشی

بررسی الگوی بیان ژن dbat و تولید تاکسول در برگ سرخدار (*Taxus baccata*) تحت تأثیر متیل‌جاسمونات

یوسف محمدی*[۱]، محمدرضا مشایخی[۲]، یلدا ژولیده[۳] و شیوا قیطران‌پور سهریق[۴]

۱- استادیار، دکترای تخصصی اصلاح نباتات، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران. (y.mohamadi@rifr-ac.ir)

۲- استادیار، دکترای تخصصی ژنتیک مولکولی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران. (mashayekhi.mrz@gmail.com)

۳- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه زیست شناسی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران. (yaldazhoolideh@gmail.com)

۴- دانشجوی دکترای اصلاح نباتات، گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران. (shgh1989@yahoo.com)

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۴/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۰۶

چکیده

سرخدار یکی از با ارزش‌ترین منابع گیاهی است که فواید و کاربردهای متنوعی دارد. برگ این گیاه منبع خوبی برای استخراج ماده ضدسرطان تاکسول است. امروزه رویکردهای درمانی برای استفاده از داروهای گیاهی توسعه یافته است، بنابراین بررسی مسیر بیوسنتزی گیاهان دارویی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در این پژوهش، نمونه‌های گیاهی تحت تیمار با متیل‌جاسمونات با غلظت‌های متفاوت صفر، ۱۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکرومولار قرار گرفتند و در دو زمان متفاوت ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت در فیتوترون نگه‌داری شدند. پس از اعمال تیمار، بیان ژن *dbat* با روش Real Time PCR اندازه‌گیری شد. همچنین مقدار تاکسول تولیدی با کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (HPLC) بررسی شد و اطلاعات به‌دست‌آمده تجزیه و تحلیل شد. نتایج نشان داد که بیشترین مقدار بیان ژن با ۱/۶۸ برابر گیاه شاهد مربوط به تیمار ۲۵۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات در ۷۲ ساعت بود و همچنین کمترین بیان ژن نیز با کمتر از ۵ درصد گیاه شاهد مربوط به تیمار ۱۰۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات، در ۴۸ ساعت محاسبه شد. در این بررسی بیشترین مقدار تاکسول تولیدی در گیاه تحت تیمار با غلظت ۵۰۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات و زمان ۴۸ ساعت به مقدار ۰/۳۲۷۶ میلی‌گرم برگرم وزن خشک مشاهده شد. آزمون همبستگی پیرسون بیانگر این بود که هیچ رابطه معنی‌داری بین مقدار بیان ژن و تاکسول تولیدی وجود ندارد. امکان دارد علت این امر اختلاف بین زمان بیان ژن و تولید تاکسول تحت تأثیر محرک متیل‌جاسمونات باشد.

واژه‌های کلیدی: الیسیتور، پاکلیتاکسل، کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا، متابولیت ثانویه

* نویسنده مسئول شمارهٔ تماس: ۰۹۱۴۳۰۸۹۸۷۱

مقدمه

تاکسول که با نام پاکلیتاکسل نیز شناخته می‌شود، یک متابولیت ثانویه است که در اصل از گونه‌های جنس سرخدار (*Taxus*) جدا شده و به‌عنوان یک داروی ضدسرطان عمل می‌کند (Wani et al., 1971; Schiff et al., 1979). سالانه میلیون‌ها اصله از این درخت در فرانسه و آمریکا توسط ۴ شرکت بزرگ داروسازی به‌صورت تجاری و در جهت استخراج ماده ضدسرطان تاکسول کشت و کار می‌شود. سرخدار (*Taxus baccata*) گونهٔ درختی همیشه‌سبز، دوپایه و سایه‌پسند است که حساسیت آن نسبت به نور با نزدیک‌شدن به سن سالمندی کاهش یافته و با فرارسیدن دیرزیستی، به‌کلی برطرف شده و قادر است در اشکوب فوقانی جنگل مستقر شود (Razavi et al., 2018). سرخدار از قدیمی‌ترین گونه‌های درختی است که قدمت آن به دوران دوم زمین‌شناسی رسیده و بهره‌برداری غیرقانونی، بارآوری طولانی و نامنظم و رشد خیلی کند آن موجب تهدید رویشگاه‌های طبیعی آن شده و به‌همین دلیل در فهرست گونه‌های در معرض خطر انقراض دنیا قرار گرفته است (Jafari Afrapoly et al., 2018). با این حال به‌دلیل کمیاب بودن، رشد کند و غلظت بسیار پایین تاکسول در گیاه طبیعی و همچنین وجود بیش از ۴۰۰ ترکیب مشابه که عمل خالص‌سازی را بسیار پیچیده می‌کند، استخراج این مواد از گیاه روشی مقرون به‌صرفه نیست و روش‌های دیگری جایگزین آن شدند. روش‌های سنتز شیمیایی، نیمه‌سنتزی، تولید میکروبی از روش‌هایی هستند که به‌طور معمول جایگزین روش‌های قبلی شده‌اند اما، بازده بسیار پایین تولید به‌دلیل تولید ایزومرهای نامطلوب فراوان، نوسانات زیاد در مقدار تولید پیش‌سازها و تولید بسیار کم در مقایسه با خود گیاه از مهم‌ترین مشکلات این روش‌ها به‌شمار می‌روند (Onrubia et al, 2013). طبق پژوهش‌های انجام‌شده بیش از ۲۰ آنزیم در مسیر بیوسنتز تاکسول شرکت می‌کنند که از ترکیب ژرانیل ژرانیل دی فسفات شروع شده و به تاکسول ختم می‌شود. آنزیم داستیل باکاتین III استیل ترانسفراز (*dbat*) با استیلاسیون داستیل باکاتین III، سبب تشکیل باکاتین III می‌شود (Croteau et al., 2006). بنابراین شناسایی عوامل تأثیرگذار بر بیان ژن رمزکننده این آنزیم دارای اهمیت است.

محرک‌ها (الیسیتورها) ترکیباتی هستند که نقش مهمی در سیستم دفاعی گیاهان اعمال کرده و می‌توانند به‌صورت زیستی و غیرزیستی تعریف شوند (Namdeo, 2007). این ترکیبات ماهیت شیمیایی متفاوتی داشته و از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان عصاره مخمر، متیل‌جاسمونات، سالیسیلیک‌اسید، وانادیل‌سولفات و کیتوزان را نام برد. این ترکیبات تأثیر مهمی بر روی بیان ژن‌های دخیل در سنتز متابولیت‌های ثانویه و یا بر روی عوامل رونویسی‌کننده ژن‌های دخیل در سنتز متابولیت‌های ثانویه داشته و در نتیجه استفاده از محرک‌ها یکی از موثرترین روش‌ها برای افزایش تولید تاکسول و دیگر متابولیت‌های ثانویه ارزشمند گیاهی است (Ramirez et al., 2016).

تجمع متابولیت‌های ثانویه در گیاهان، بخشی از پاسخ‌های دفاعی در برابر حملات پاتوژنی است که توسط محرک‌ها القاء و فعال می‌شود (Mendoza et al., 2018). تا به امروز، تلاش‌های زیادی برای بهبود تولید تاکسول با استفاده از روش‌های مختلف از مهندسی فرآیند بیولوژیکی گرفته تا رویکردهای بیوتکنولوژیکی و مصنوعی انجام شده است. یکی از راه‌حل‌های موجود استفاده از محرک‌ها است. جاسمونات‌ها به‌عنوان ترکیبات پیام‌رسان کلیدی در فرآیند القایی شناسایی شده‌اند که منجر به تجمع

متابولیت‌های ثانویه می‌شوند (Wasternack and Strnad, 2018).

سرطان سالانه عامل مرگ میلیون‌ها نفر در سراسر جهان است. اگرچه پیشرفت‌های زیادی در زمینه پزشکی حاصل شده است، اما هنوز مسائل زیادی وجود دارد که باید برای بهبود درمان سرطان مورد توجه قرار گیرند. یکی از راهبردها تولید داروهای مؤثر به‌ویژه با منشأ طبیعی است (Pucci et al., 2019). پژوهش‌های زیادی تاکنون نشان داده‌اند که افزودن متیل‌جاسمونات و دیگر محرک‌ها، یکی از استراتژی‌ها برای افزایش تولید تاکسول است زیرا کاربرد خارجی آن سبب افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در انواع گونه‌های گیاهی مانند گونه‌های سرخدار می‌شود (Yukimune et al., 1996; Yukimune et al., 2000; Kai et al., 2005; Naill and Roberts, 2005; Nims et al., 2006). بااینکه اثر متیل‌جاسمونات بر افزایش تولید تاکسول گزارش شده است اما مکانیسم آن هنوز به‌خوبی شناخته نشده است. بنابراین، در این پژوهش، تأثیر متیل‌جاسمونات بر بیان ژن *dbat* که در مسیر بیوسنتز تاکسول نقش دارد و متعاقبا مقدار تولید تاکسول در سرخدار ارزیابی شده است.

مواد و روش‌ها

نمونه گیاهی

نمونه‌های گیاهی مورد نظر (شاخه به‌همراه برگ) از سرخدار موجود در "باغ گیاه شناسی ملی" ایران تهیه و تحت غلظت‌های مختلف متیل‌جاسمونات (۰، ۱۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکرومولار) تیمار و به‌مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت در فیتوترون با شرایط دمایی ۲۵ درجه سانتی‌گراد و ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی با نور ۶۰۰۰ لوکس نگه‌داری شدند. آزمایش مورد نظر با دو تکرار و به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شد.

آزمون بیان ژن

برای بررسی بیان ژن، بایستی آغازگرهای اختصاصی ژن *dbat* و ژن خانه‌دار *18s* طراحی می‌شدند. بدین منظور ابتدا از داده پایگاه NCBI توالی mRNA ژن‌های *dpat* و توالی *18s* به فرمت FASTA دانلود و سپس با استفاده از آخرین نسخه از نرم‌افزار الیگو۷ طراحی آغازگرها انجام شد. در این حین پارامترهای طراحی آغازگر مانند تشکیل دوبلکس، سنجاق سر، درصد GC و اندازه‌ی محصول PCR آنالیز شد. سپس اختصاصیت آغازگرها با نرم‌افزار آنلاین Primer-BLAST بررسی شد (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast). پس از تأیید اختصاصی بودن، آغازگرها به شرکت متابیون آلمان سفارش داده شدند (https://www.metabion.com) (جدول ۱). در مرحله بعد و پس از گذشت ۴۸ و ۷۲ ساعت، استخراج RNA با استفاده از کیت RNX-PLUS™ شرکت سیناکلون از برگ انجام شد. برای این کار ابتدا برگ‌های تیمار شده با ازت مایع پودر و سپس عمل استخراج طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. برای اطمینان از صحت استخراج RNA نانودراپ (Thermo Fisher Scientific, USA) انجام شد که دارای غلظت مناسبی بود.

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای طراحی‌شده برای ژن *dbat* و ژن کنترل داخلی *18s*

Table 1. Features of primers designed for the *dbat* gene and the *18s* internal control gene

اندازه‌ی محصول PCR (جفت باز) PCR product size (bp)	دمای اتصال (°C) Annealing temperature (°C)	توالی آغازگر Primer sequence	نام آغازگر Primer name	شماره دسترسی Accession number
147	54	GCCAGAAGACCCTTTATACCG	*dbatF*#	KC571283.1
147	54	TTACTTTCTTCCCTAAGGCAT	*dbatR*#	KC571283.1
102	54	GTGCACAAAATCCCGACTCT	*18s*F#	EF017310
102	54	GCGATCCGTCGAGTTATCAT	*18s*R#	EF017310

#F: آغازگر مستقیم، #R: آغازگر معکوس.

F: Forward, R: Reverse

سنتز cDNA با کیت AddScript (کره جنوبی) و آغازگرهای تصادفی و هگزامر انجام و در نهایت واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از مسترمیکس Ampliqon (دانمارک) و در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد. شرایط واکنش شامل یک چرخه واسرشت‌سازی اولیه به‌مدت پنج دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۴۰ چرخه شامل مراحل واسرشت‌سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۵ ثانیه، اتصال در دمای ۵۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۵ ثانیه، بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک دقیقه، یک چرخه بسط نهایی با دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت هفت دقیقه انجام شد. با توجه به اینکه رنگ فلورسنت سایبرگرین به قطعات غیراختصاصی نیز متصل می‌شود، برای پی‌بردن به وجود چنین خطایی از منحنی ذوب نیز استفاده شد و محاسبه بیان ژن تنها برای قطعات تکثیرشده اختصاصی انجام شد. داده‌های حاصل از Ct نمودارهای به‌دست آمده ابتدا توسط ژن کنترل داخلی نرمال شد و برای هر دو ژن کارآیی PCR، ۱۰۰ درصد د نظر گرفته شد. همچنین برای محاسبه مقدار بیان، از روش ΔΔCt (Pfaffl et al., 2002) استفاده و به‌وسیله نرم‌افزار REST 2009 مقدار بیان ژن محاسبه شد.

استخراج عصاره گیاهی و انجام کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (HPLC)

برای بررسی و سنجش مقدار تاکسول تولید شده در هر تیمار از روش HPLC استفاده شد. در این آزمایش از دستگاه Knauer (آلمان) استفاده شد. برای انجام کروماتوگرافی نیاز بود تا محلول مناسب برای تزریق به دستگاه کروماتوگرافی آماده شود، بدین منظور ابتدا نمونه‌ها که برگ‌های گیاه سرخدار بودند و در چهار غلظت ۰، ۱۰۰، ۲۵۰، و ۵۰۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات تیمار شده بودند، یک بار پس از گذشت ۴۸ ساعت و یک بار پس از گذشت ۷۲ ساعت از فیتوترون خارج شده و در دمای اتاق به‌مدت هشت روز قرار داده شدند تا کاملا خشک شوند. سپس پنج گرم از نمونه‌های برگ پودر شده و به آن ۲۵ میلی‌لیتر استونیتریل اضافه شد. در مرحله بعد ۶۰ دقیقه التراسونیک و به‌مدت ۲۰ دقیقه با دور ۱۵۰۰۰ سانتریفیوژ انجام شد. در آخر محلول رویی با فیلتر ۰/۴۵ میکرون صاف شد و برای تزریق آماده شد.

سنجش‌ها با استفاده از ستون C18 با ابعاد ۴۶×۲۵۰ میلی‌متر و فاز متحرک شامل متانول و آب به نسبت ۸۰۰:۲۰۰ و با شدت جریان یک میلی‌متر بر دقیقه انجام شد. طول موج مورد استفاده ۲۲۷ نانومتر و میزان تزریق برای استاندارد و نمونه‌ها ۵۰ میکرولیتر

بود. پس از کالیبره کردن ستون‌ها، میزان تاکسول موجود در هر نمونه با استفاده از تزریق محلول استاندارد تاکسول (Sigma Aldrich) و به‌دست آمدن منحنی کالیبراسیون و با مقایسه زمان بازداری ظاهر شدن پیک تاکسول خالص تزریق شده با غلظت‌های مختلف (۲/۴، ۴/۸ و ۹/۶ میکروگرم) و پیک‌های حاصل از عصاره‌های تزریقی انجام شد. برای تعیین میزان تاکسول هر یک از عصاره‌ها، سطح زیر پیک مربوطه در زمان مورد نظر اندازه‌گیری شد و با قرار دادن این سطح در معادله حاصل از منحنی کالیبراسیون ($y=126.28x+133.89$، $R^2 = 0.99$)، میزان تاکسول موجود بر حسب میلی‌گرم در یک گرم وزن خشک از هر نمونه تخمین زده شد. تعداد دفعات تزریق برای هر نمونه سه تکرار در نظر گرفته شد.

تجزیه و تحلیل آماری

برای آنالیز و بررسی نتایج به‌دست‌آمده، ابتدا نرمال بودن داده‌ها براساس آزمون کولموگروف-اسمیرنوف انجام و سپس آنالیز واریانس داده‌ها و همچنین مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک درصد با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16 و رسم نمودار در Excel، انجام شد.

نتایج

هدف از انجام Primer BLAST تشخیص اختصاصیت آغازگرهای طراحی شده بود. همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود آغازگر طراحی‌شده اختصاصی ژن *dbat* بوده و تنها در یک مکان به الگوی خود متصل می‌شود. علاوه براین برای پی‌بردن به تکثیر قطعات غیراختصاصی، منحنی ذوب برای ژن *dbat* و *18s* ترسیم و وجود پیک منفرد با دمای ذوب بالا، نشان‌دهنده تکثیر اختصاصی قطعات هدف بود (شکل ۲). نمونه‌ای از منحنی تکثیر ژن *dbat* در شکل ۳ آورده شده است.

نتایج تجزیه واریانس بیان ژن *dbat* و مقدار تاکسول تولید شده در برگ درخت سرخدار پس از تیمار با متیل‌جاسمونات در ۴ غلظت متفاوت و اعمال دو زمان متفاوت ۴۸ و ۷۲ ساعت نشان داد که اثر اصلی سطوح مختلف متیل‌جاسمونات، اثر اصلی زمان و اثر متقابل متیل جاسمونات و زمان، در سطح احتمال یک‌درصد معنی‌دار است. برای هر دو صفت مورد بررسی، ضریب تغییرات در سطح قابل‌قبولی قرار داشت (جدول ۲).

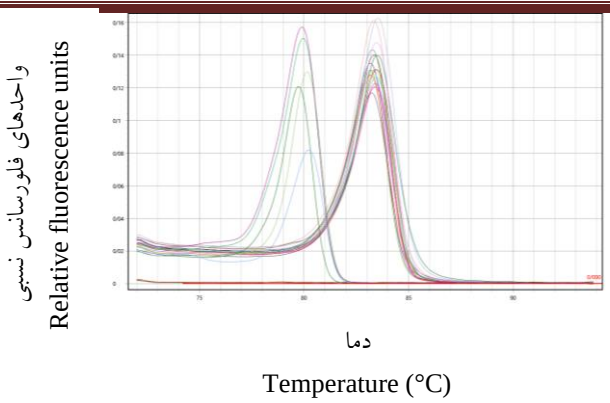
```
>JQ611238.1 Taxus baccata isolate Estena20B 10-deacetylbaccatin III-10-O-acetyl transferase (DBAT) gene, partial cds


product length = 147
Forward primer  1    GCCAGAAGACCCTTTATACCG  21
Template        729  ......................  749

Reverse primer  1    TTACTTTCTTCCCTAAGGCAT  21
Template        875  ......................  855
```

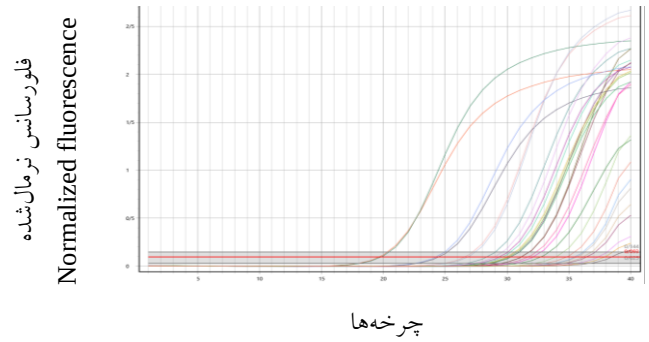
شکل ۱- بلاست مربوط به ژن *dbat*

Figure 1. Primer Blast of the *dbat* gene



شکل ۲- منحنی ذوب مربوط به ژن‌های مورد بررسی

Figure 2. Melting curve related to the studied genes



شکل ۳- منحنی تکثیر مربوط به ژن *dbat* در تیمارهای مختلف

Figure 3. Amplification plot for *dbat* genes in different treatments

جدول ۲- تجزیه واریانس مقدار بیان ژن *dbat* و تاکسول تولیدی

Table 2. Variance analysis of *dbat* gene and produced Taxol

میانگین مربعات Mean Square		درجه آزادی df	منبع تغییرات Source of variation
مقدار تاکسول Amount of Taxol	بیان ژن *dbat* *dbat* gene expression		
0.005**	0.462**	3	متیل‌جاسمونات Methyl Jasmonate
0.017**	1.080**	1	زمان Time
0.003**	1.160**	3	متیل جاسمونات × زمان Methyl jasmonate × Time
0.0000854	0.001	8	خطا Error
1.30	5.49		ضریب تغییرات Coefficient of variation

**معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد

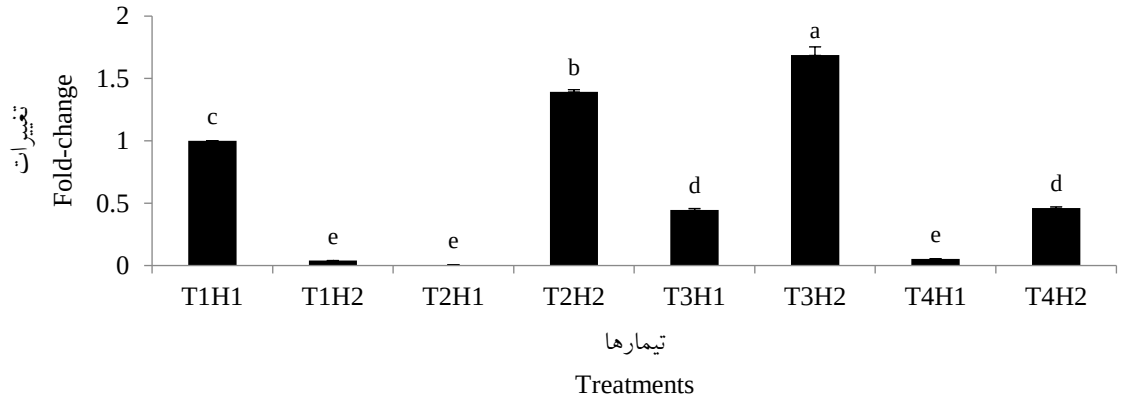
** Significant at 1% level

مقایسه میانگین اثر متقابل متیل‌جاسمونات و زمان بر بیان نسبی ژن dbat

آنالیز بیان ژن *dbat* در سطوح مختلف متیل‌جاسمونات با مقادیر ۰، ۱۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکرومولار و اعمال زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت نشان داد که بیشترین بیان ژن در تیمار ۲۵۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات و در ۷۲ ساعت انجام شده است که ۱/۶۸ برابر گیاه شاهد است. همچنین کمترین مقدار بیان ژن *dbat* در سطح ۱۰۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات و در ۴۸ ساعت مشاهده شده است. در این حالت بیان ژن تیمار مورد نظر کمتر از ۵ درصد گیاه شاهد است (شکل ۴).

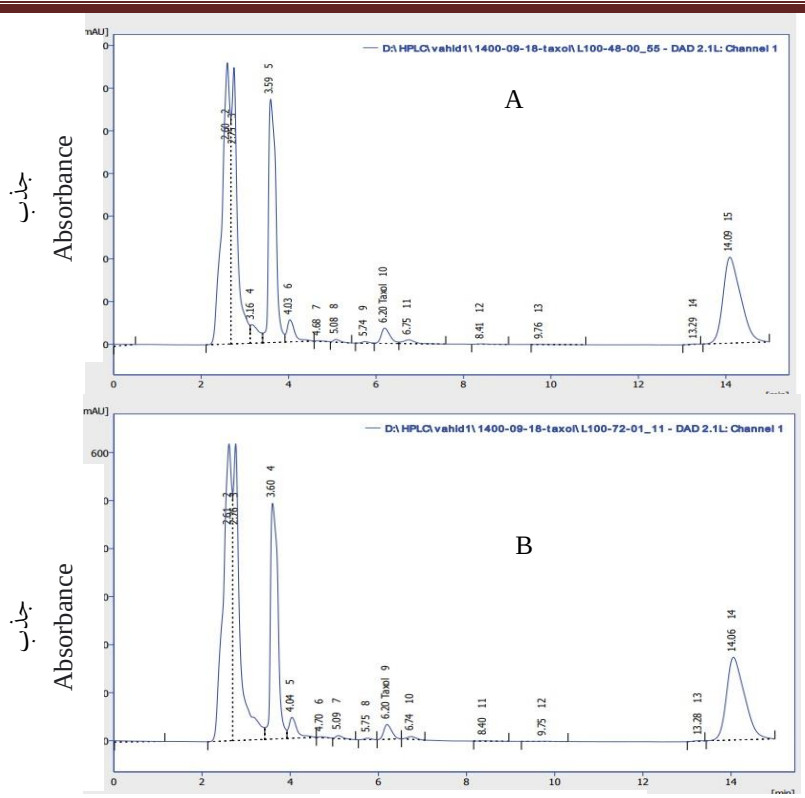
مقایسه میانگین اثر متقابل متیل‌جاسمونات و زمان بر مقدار تاکسول

داده‌های HPLC نشان داد که تاکسول در تمامی تیمارها تولید شده است (شکل ۵). تیمارهای ۴۸ ساعت در غلظت ۵۰۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات با تولید ۰/۳۲۷۶ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک، بیشترین تولید تاکسول و تیمار ۷۲ ساعت در غلظت ۱۰۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات با تولید ۰/۱۷۸۷ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک کمترین مقدار تولید تاکسول را داشتند (شکل ۶).



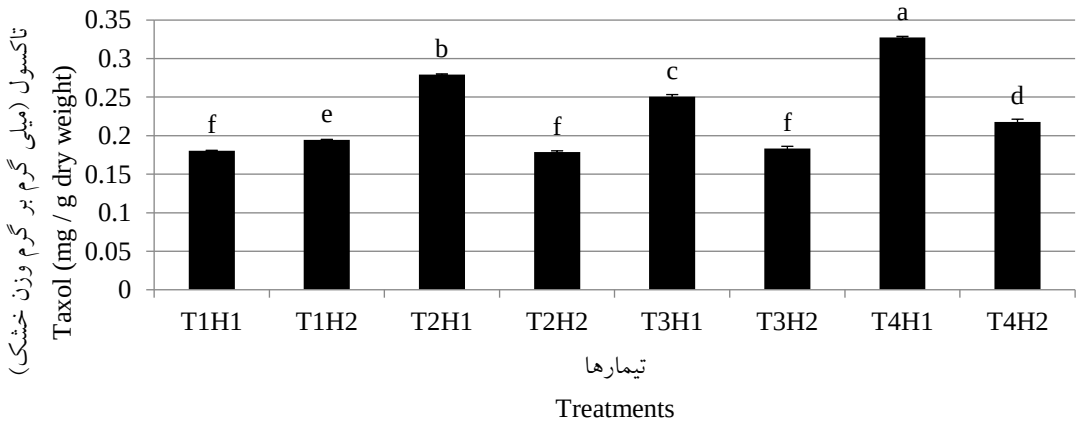
شکل ۴- مقایسه میانگین بیان ژن *dbat* در تیمارهای مختلف (T1=0، T2=100، T3=250، T4=500 میکرومولار و H1=48، H2=72 ساعت). حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است.

Figure 4. Comparison of means of *dbat* gene expression in different treatments (T1=0, T2=100, T3=250, T4=500 µM and H1=48, H2= 72 h). Different letters indicate significant differences between treatments.



شکل ۵- نتایج HPLC برای تیمارهای ۱۰۰ میکرومولار در ۴۸ ساعت (A) و ۷۲ ساعت (B): شناسایی تاکسول با زمان بازداری ۶/۲۷ دقیقه

Figure 5. HPLC results for 100 µM treatments at 48 h (A) and 72 h (B): Peak with Rt 6.27 min is Taxol.



شکل ۶- مقایسه میانگین مقدار تاکسول تولیدی در تیمارهای مختلف (T1=0، T2=100، T3=250، T4=500 میکرومولار و H1=48، H2=72 ساعت). حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است.

Figure 6. Comparison of means of produced Taxol in different treatments (T1=0, T2=100, T3=250, T4=500 µM and H1=48, H2= 72 h). Different letters indicate significant differences between treatments.

بحث

تاکسول یکی از مؤثرترین داروهای ضد سرطان است که می‌تواند برای درمان انواع سرطان استفاده شود. با این حال تولید صنعتی تاکسول همچنان به سنتز گیاهی نیازمند است که به‌طور جدی بر بقا گونه‌های سرخدار تأثیر می‌گذارد. بنابراین، شناسایی روش‌های جایگزین و افزایش بازده تولید تاکسول ضروری است، که بیشتر به درک مسیر بیوسنتزی و ژن‌های دخیل در این مسیر بستگی دارد (Wang et al., 2021). یکی از مهم‌ترین ژن‌های مسیر سنتز تاکسول، ژن *dbat* می‌باشد که در این پژوهش به بررسی بیان این ژن پرداخته شد. این بررسی بیان داشت که بهترین تیمار برای بیان ژن *dbat* در برگ درخت سرخدار، تیمار ۷۲ ساعته با غلظت ۲۵۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات است. بر خلاف انتظار زمانی‌که زمان تیمار و غلظت الیسیتور افزایش داده شد، همواره شیب بیان ژن *dbat* صعودی نبود که نشان دهندهٔ وجود عوامل تنظیمی و تأثیر فاکتورهای محیطی و ژنتیکی مختلف بر مسیر تولید تاکسول است.

اسیدجاسمونیک و مشتقات آن یعنی متیل‌جاسمونات، تنظیم‌کننده‌های رشد درونی یا بازدارنده‌های رشد گیاه هستند که نقش کلیدی در رشد، نمو و پاسخ به تنش‌های محیطی ایفا می‌کنند. اثرهای فیزیولوژیکی جاسمونات‌ها در گیاهان بسته به نوع گونه گیاهی، مرحله‌ی نمو، نوع جاسمونات و غلظت به‌کاررفته متفاوت است (Wang et al., 2020).

متیل‌جاسمونات در گیاهان در پاسخ به عوامل زیستی و غیرزیستی موجب تأثیر بر روی عوامل رونویسی القاشونده با متیل‌جاسمونات (MJ-inducible transcription factor) شده و با مسیر ترارسانی علامت و با اثر بر روی ناحیه راه‌انداز ژن-های مختلف، موجب افزایش بیان ژن‌های خاصی شده و در نتیجه با افزایش بیان ژن و افزایش سنتز پروتئین، متابولیت‌های ثانویه خاصی تولید می‌شود. تاکنون ۳ عامل رونویسی القاشونده با متیل‌جاسمونات در گیاه سرخدار شناسایی شده است که شامل *TcJAMYC1*، *TcJAMYC2*و *TcJAMYC4* هستند. این فاکتورها با شناسایی جایگاه E-Box (با توالی CANNTG) بر روی ژن‌های مسیر بیوسنتز تاکسول و اعمال اثرهای تنظیمی، موجب تنظیم بیان ژن‌های مورد نظر می‌شوند (Lenka et al., 2015).

نتایج پژوهش‌های متعدد حاکی از اثرهای متفاوت متیل‌جاسمونات بر روی ژن‌های مسیر بیوسنتز تاکسول است. به‌طوری که سطح پایداری رونوشت ژن‌های مسیر بیوسنتز تاکسول و همچنین زمان اثر متیل‌جاسمونات بر روی بیان ژن و تولید تاکسول از مهم‌ترین تفاوت‌ها است. گزارش شد که ۶ ساعت پس از اعمال متیل‌جاسمونات، سطوح رونوشت ژن‌های مراحل اولیه و میانی مسیر بیوسنتز تاکسول افزایش می‌یابد و در ۱۸-۱۲ ساعت به اوج رسیده و در ۳۰ ساعت به سطح پایین تنزل پیدا می‌کند (Nims et al., 2006). وجود پاسخ‌های متفاوت به متیل‌جاسمونات در بررسی مذکور با یافته‌های این پژوهش مطابقت دارد. پژوهش‌های Lenka et al. (2015) نشان می‌دهد که اثر متیل‌جاسمونات وابسته به‌مدت زمان اعمال تیمار بوده به‌طوری که بیشترین بیان ژن در ۱۸ ساعت پس از اعمال متیل‌جاسمونات مشاهده شده است. بررسی‌ها نشان داده است که تیمار متیل‌جاسمونات در کشت سلولی شیرین‌بیان موجب افزایش بیان ژن بتا-آمیرین‌سنتاز و در ادامه تولید ساپونین شده است (Hayashi et al., 2004). بررسی اثر تیمار متیل‌جاسمونات بر مقدار بیان ژن بتا-آمیرین‌سنتاز در گونه یونجه زرد (*Medicago truncatula*) نشان داد که این تیمار سبب افزایش بیان ۵۰ برابری ژن مورد

نظر شده و حداکثر بیان در ۲۴ ساعت بعد از تیمار مشاهده شد که این نتایج نشان‌دهنده تأثیر متیل‌جاسمونات بر روی بیان نسبی این ژن است (Suzuki et al., 2005). تمامی موارد حاکی از این است که اثر متیل‌جاسمونات بر روی بیان ژن‌های دخیل در سنتز متابولیت‌های ثانویه در کمتر از ۲۴ ساعت بعد از اعمال متیل‌جاسمونات انجام شده است و احتمالا نشان‌دهنده این موضوع است که این ترکیب به سرعت سبب فعال شدن مسیر ترارسانی علامت شده و بر روی عوامل رونویسی‌کننده ژن‌های دخیل در سنتز متابولیت‌های ثانویه، اثرهای فیزیولوژیکی خود را اعمال می‌کند.

در این پژوهش بیشترین مقدار تاکسول با ۰/۳۲۷۶ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک پس از ۴۸ ساعت تیمار با ۵۰۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات مشاهده شد و با افزایش زمان اعمال متیل‌جاسمونات، تولید تاکسول کاهش یافته است. نتایج حاصل نشان دهنده اثرهای متفاوت متیل‌جاسمونات با غلظت‌های یکسان ولی در زمان‌های متفاوت است. Nims et al. (2006) گزارش کردند که حداکثر مقدار تولید تاکسول با ۱۰۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات در روز هفتم به مقدار ۳/۳ میلی‌گرم بر لیتر است. در این تحقیق در ساعات اولیه، مقدار تولید تاکسول بسیار کم بوده و با افزایش زمان، افزایش یافت که به‌نظر می‌رسد با نتایج این بررسی مطابقت نداشته باشد که می‌تواند ناشی از تفاوت در گونه سرخدار مورد بررسی باشد. در این پژوهش با اینکه مقدار متیل‌جاسمونات ثابت بوده ولی با افزایش زمان از ۴۸ ساعت به ۷۲ ساعت، مقدار تولید تاکسول کاهش یافته است. Lenka et al. (2012) در بررسی‌های خود بر روی مقدار تولید تاکسول به این نتیجه رسیدند که بیشترین مقدار تولید تاکسول پس از ۶-۳ روز از اعمال متیل‌جاسمونات انجام شده است. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که باوجود افزایش شدید بیان ژن در ساعات اولیه تیمار با متیل‌جاسمونات (۱۹-۱۲ ساعت)، افزایش تولید تاکسول چند روز پس از اعمال متیل‌جاسمونات مشاهده می‌شود. علت این امر می‌تواند ناشی از زمان‌بر بودن سنتز پیش‌سازهای مورد نیاز برای تولید تاکسول و همچنین وجود مسیر پیچیده تولید تاکسول با بیش از ۲۰ آنزیم باشد. با توجه به نیاز روزافزون به داروهای ضد سرطان و ترجیح داروهایی با منشأ گیاهی، نیاز است تا روشی ارزان و با بازدهی بالا برای تولید این موارد ارزشمند از گیاهان فراهم آید که افزودن متیل‌جاسمونات به محیط گیاه به‌عنوان محرک با غلظت ۵۰۰ میکرومولار در ۴۸ ساعت، می‌تواند یکی از این روش‌های جایگزین باشد.

References

Croteau, R.; Ketchum, R. E.; Long, R. M.; Kaspera, R.; Wildung, M. R., Taxol biosynthesis and molecular genetics. *Phytochemistry Reviews* **2006,** *5* (1), 75-97.

Hayashi, H.; Huang, P.; Takada, S.; Obinata, M.; Inoue, K.; Shibuya, M.; Ebizuka, Y., Differential expression of three oxidosqualene cyclase mRNAs in Glycyrrhiza glabra. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **2004,** *27* (7), 1086-1092.

Jafari Afrapoly, M.; Sefidi, K.; Waez-Mousavi, S.M; Varamesh, S., Qualitative and quantitative evaluation of dead trees in English yew (*Taxus baccata*) in Afratakhteh Forests, Golestan Province, and northeastern Hyrcanian forests *Iran Journal of Forest Research and Development* **2018,** *3* (4), 305-316. (In Persian)

Kai, G.; Zhao, L.; Zhang, L.; Li, Z.; Guo, B.; Zhao, D.; Sun, X.; Miao, Z.; Tang, K., Characterization and expression profile analysis of a new cDNA encoding taxadiene synthase from Taxus media. *BMB Reports* **2005,** *38* (6), 668-675.

Lenka, S. K.; Boutaoui, N.; Paulose, B.; Vongpaseuth, K.; Normanly, J.; Roberts, S. C.; Walker, E. L., Identification and expression analysis of methyl jasmonate responsive ESTs in paclitaxel producing Taxus cuspidata suspension culture cells. *BMC genomics* **2012,** *13* (1), 1-10.

Lenka, S. K.; Nims, N. E.; Vongpaseuth, K.; Boshar, R. A.; Roberts, S. C.; Walker, E. L., Jasmonate-responsive expression of paclitaxel biosynthesis genes in Taxus cuspidata cultured cells is negatively regulated by the bHLH transcription factors TcJAMYC1, TcJAMYC2, and TcJAMYC4. *Frontiers in plant science* **2015,** *6*, 115.

Mendoza, D.; Cuaspud, O.; Arias, J. P.; Ruiz, O.; Arias, M., Effect of salicylic acid and methyl jasmonate in the production of phenolic compounds in plant cell suspension cultures of Thevetia peruviana. *Biotechnology reports* **2018,** *19*, e00273.

Naill, M. C.; Roberts, S. C., Flow cytometric analysis of protein content in Taxus protoplasts and single cells as compared to aggregated suspension cultures. *Plant cell reports* **2005,** *23* (8), 528-533.

Namdeo, A., Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. *Pharmacogn Rev* **2007,** *1* (1), 69-79.

Nims, E.; Dubois, C. P.; Roberts, S. C.; Walker, E. L., Expression profiling of genes involved in paclitaxel biosynthesis for targeted metabolic engineering. *Metabolic engineering* **2006,** *8* (5), 385-394.

Onrubia, M.; Moyano, E.; Bonfill, M.; Cusidó, R. M.; Goossens, A.; Palazón, J., Coronatine, a more powerful elicitor for inducing taxane biosynthesis in Taxus media cell cultures than methyl jasmonate. *Journal of plant physiology* **2013,** *170* (2), 211-219.

Pfaffl, M. W.; Horgan, G. W.; Dempfle, L., Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic acids research* **2002,** *30* (9), e36-e36.

Pucci, C.; Martinelli, C.; Ciofani, G., Innovative approaches for cancer treatment: Current perspectives and new challenges. *Ecancermedicalscience* **2019,** *13*.

Ramirez-Estrada, K.; Vidal-Limon, H.; Hidalgo, D.; Moyano, E.; Golenioswki, M.; Cusidó, R. M.; Palazon, J., Elicitation, an effective strategy for the biotechnological production of bioactive high-added value compounds in plant cell factories. *Molecules* **2016,** *21* (2), 182.

Razavi, S.A.; Hosseini Nasr, S.M.; Valizadeh, M., Effect of cutting type and plant growth regulators (IBA, NAA, 2, 4-D) on rooting of *Taxus baccata* L. cuttings *Iran Journal of Forest Research and Development* **2018,** *4* (1), 73-83. (In Persian)

Schiff, P. B.; Fant, J.; Horwitz, S. B., Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature* **1979,** *277* (5698), 665-667.

Suzuki, H.; Reddy, M.; Naoumkina, M.; Aziz, N.; May, G. D.; Huhman, D. V.; Sumner, L. W.; Blount, J. W.; Mendes, P.; Dixon, R. A., Methyl jasmonate and yeast elicitor induce differential transcriptional and metabolic re-programming in cell suspension cultures of the model legume Medicago truncatula. *Planta* **2005,** *220* (5), 696-707.

Wang, J.; Song, L.; Gong, X.; Xu, J.; Li, M., Functions of jasmonic acid in plant regulation and response to abiotic stress. *International Journal of Molecular Sciences* **2020,** *21* (4), 1446.

Wang, T.; Li, L.; Zhuang, W.; Zhang, F.; Shu, X.; Wang, N.; Wang, Z., Recent Research Progress in Taxol Biosynthetic Pathway and Acylation Reactions Mediated by Taxus Acyltransferases. *Molecules* **2021,** *26* (10), 2855.

Wani, M. C.; Taylor, H. L.; Wall, M. E.; Coggon, P.; McPhail, A. T., Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from Taxus brevifolia. *Journal of the American Chemical Society* **1971,** *93* (9), 2325-2327.

Wasternack, C.; Strnad, M., Jasmonates: News on occurrence, biosynthesis, metabolism and action of an ancient group of signaling compounds. *International journal of molecular sciences* **2018,** *19* (9), 2539.

Yukimune, Y.; Hara, Y.; Nomura, E.; Seto, H.; Yoshida, S., The configuration of methyl jasmonate affects paclitaxel and baccatin III production in Taxus cells. *Phytochemistry* **2000,** *54* (1), 13-17.

Yukimune, Y.; Tabata, H.; Higashi, Y.; Hara, Y., Methyl jasmonate-induced overproduction of paclitaxel and baccatin III in Taxus cell suspension cultures. *Nature biotechnology* **1996,** *14* (9), 1129-1132.

Study of *dbat* gene expression pattern and Taxol production in Yew (*Taxus baccata*) leaves under the influence of Methyl Jasmonate

Y. mohammadi[*1], M. R. Mashayekhi[2], Y. Zhoulideh[3] and Sh. Gheytaranpour-Sehrigh[4]

1- Assitant Professor, Plant breeding, Research institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, I. R. Iran. (y.mohamadi@rifr-ac.ir)
2- Assitant Professor, Molecular Genetics, Department of Biology, Tabriz Branch, Islamic Azad university, Tabriz, I. R. Iran. (mashayekhi.mrz@gmail.com)
3- MSc of Biology, Tabriz Branch, Islamic Azad university, Tabriz, I. R. Iran. (yaldazhoolideh@gmail.com)
4- PhD student, Plant Breeding and Biotechnology Department, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, I. R. Iran. (shgh1989@yahoo.com)

Received: 09.07.2022 Accepted: 28.08.2022

Abstract

Taxus is one of the most valuable plant resources that has a variety of benefits and uses. The leaves of this plant are a good source for extracting an anti-cancer drug called Taxol. Today, therapeutic approaches for use herbal medicines have been developed, so the study of the biosynthetic pathway of medicinal plants is important. In the present study, plant samples were treated with Methyl Jasmonate at different concentrations of 0, 100, 250 and 500 µM and kept for 48 hours and 72 hours. After treatment, *dbat* gene expression was measured by Real Time PCR, also the amount of Taxol produced was examined by High-performance liquid chromatography (HPLC) and the obtained data were analyzed. The results showed that at 72 hours, the expression of *dbat* gene at a concentration of 250 µM was 1.68 times higher than the control plant. In addition, at 48 hours and 100 µM, the expression of *dbat* gene was lower than all treatments. Also, the highest amount of *Taxol* produced in the treated plant was observed with a concentration of 500 µM Methyl Jasmonate and a time of 48 hours at the rate of 0.3276 mg / g dry weight. Pearson correlation test showed that there was no significant relationship between gene expression and *Taxol* production. This may be due to the difference between the expression time of the gene and the *Taxol* produced under the influence of the Methyl Jasmonate.

Keywords: Elicitor, Paclitaxel, HPLC, Secondary metabolites.

[*] Corresponding author Tel: +989143089871