

اثر متیل جاسمونات بر روی تولید تاکسول و بیان ژن *bapt* سرخدار (*Taxus baccata*)

یلدا ژولیده^۱، یوسف محمدی^{۲*} و محمدرضا مشایخی^۳

۱- دانشجوی آموخته، کارشناسی ارشد گروه زیست‌شناسی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

۲- نویسنده مسئول، استادیار، دکترای تخصصی اصلاح نباتات، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران،

ایران، پست الکترونیک: y.mohamadi@rifr-ac.ir

۳- استادیار، دکترای تخصصی ژنتیک مولکولی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۶/۱۴

چکیده

تاکسول یکی از مهمترین متابولیت‌های ثانویه است که نقش مهمی در درمان انواع سرطان‌ها دارد. این ماده ارزشمند طی یک مسیر پیچیده تولید می‌شود و به دلیل تولید کم و در خطر انقراض بودن گونه سرخدار، افزایش میزان تولید تاکسول اهمیت زیادی پیدا کرده است. در این تحقیق، نمونه‌های گیاهی تحت تیمار متیل جاسمونات با مقادیر ۰، ۱۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکرومولار قرار گرفتند. نمونه‌ها به مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت در فیتوترون نگهداری شدند. پس از اعمال متیل جاسمونات، بیان ژن *bapt* ساقه با روش Real Time PCR و میزان تاکسول تولیدی با دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (HPLC) اندازه‌گیری شد. اطلاعات حاصل مورد تجزیه آماری قرار گرفت. نتایج نشان داد که بیان ژن *bapt* در غلظت ۱۰۰ میکرومولار در ۴۸ ساعت، ۵/۱۳ برابر گیاه شاهد بود. همچنین بیشترین میزان تاکسول در گیاه تیمار شده با متیل جاسمونات ۵۰۰ میکرومولار در ۷۲ ساعت با ۰/۳۱۵ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک مشاهده شد. آزمون همبستگی پیرسون نشان داد که رابطه‌ای بین میزان بیان ژن و تولید تاکسول وجود ندارد. به نظر می‌رسد علت این موضوع، اختلاف زمانی بین بیان ژن و تولید تاکسول تحت متیل جاسمونات می‌باشد. با توجه به اهمیت تاکسول در صنایع داروسازی، پیشنهاد می‌شود در تحقیقات آینده، از غلظت‌های بالاتر از ۵۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات با زمان‌های بیشتر از ۳ روز نیز برای بررسی احتمال افزایش تولید تاکسول استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، تاکسول، سرخدار، *bapt*، HPLC، Real Time PCR.

مقدمه

غذا و داروی آمریکا تأیید شده است (Hou et al., 2019; Khalifa et al., 2019; Zagouri et al., 2019). تاکسول با پلیمریزه کردن میکروتوبول‌ها و ممانعت از دپلیمریزاسیون آنها، از تقسیم سلول‌های سرطانی در مرحله G2/M جلوگیری می‌کند (Wani et al., 2014). اخیراً فروش سالانه تاکسول و محصولات مرتبط از یک میلیارد دلار فراتر رفته است (Howat et al., 2014). با این حال، به دلیل

تاکسول با نام تجاری پاکلی تاکسل، متابولیت ثانویه دی‌ترپنوئید ضد سرطانی است که اولین بار از پوست درخت *Taxus brevifolia* جداسازی شد (Wani et al., 1971). این ماده ارزشمند عمده‌تاً از گونه‌های جنس *Taxus* استخراج می‌شود و اثرهای درمانی بر روی سرطان‌های سینه، ریه، تخمدان، دهانه رحم و ... دارد و توسط سازمان

نشان داده که متیل جاسمونات باعث افزایش تولید تاکسول شده است (Yukimune *et al.*, 1996; Yukimune *et al.*, 2000; Kai *et al.*, 2005; Nail & Roberts, 2005; Nims *et al.*, 2006).

به دلیل اهمیت تاکسول، افزایش تعداد بیماران سرطانی و همچنین تولید کم تاکسول در سرخدار، سازوکار مولکولی بیوسنتز تاکسول در سرخدار به خوبی مورد مطالعه قرار گرفته است (Jiang *et al.*, 2021). به علاوه مطالعه اثر محرک‌های مختلف زیستی و غیرزیستی بر روی تولید تاکسول نیز بسیار ضروری به نظر می‌رسد. با توجه به مطالب ذکر شده، هدف از این مطالعه: (۱) مطالعه نقش متیل جاسمونات در تولید تاکسول و بیان ژن *bapt* (۲) تعیین بهترین غلظت متیل جاسمونات برای حداکثر تولید تاکسول در گیاه سرخدار بود.

مواد و روش‌ها

نمونه گیاهی

نمونه‌های گیاهی مورد نظر از پایه سرخدار موجود در باغ گیاه‌شناسی ملی ایران جمع‌آوری شد. شاخه‌های به طول ۳۰ سانتی‌متر در محلول متیل جاسمونات با غلظت‌های مختلف (۰، ۱۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکرومولار) به مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت در فیتوترون (خشک‌آزمای، تهران، ایران) با شرایط دمایی ۲۵ درجه سانتی‌گراد و ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با نور ۶۰۰۰ لوکس نگهداری شدند. آزمایش مورد نظر با ۲ تکرار انجام شد.

بررسی بیان ژن

پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت، استخراج RNA کل از ساقه با استفاده از کیت RNX-Plus تهیه شده از شرکت سینا کلون (تهران، ایران) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. سپس کنترل کمی و کیفی RNA استخراجی با روش اسپکتروفوتومتری دستگاه نانودراپ ۲۰۰۰ (Thermo Fisher Scientific, USA) و ژل آگارز یک درصد انجام گردید. سنتز رشته اول cDNA با کیت سنتز cDNA سیناکلون

تولید بسیار کم تاکسول در جنس *Taxus* (مقدار تاکسول در پوست سرخدار حدود ۰/۰۶ درصد است)، رشد کم سرخدار، کمبود سرخدار و همچنین ضعف در رقابت‌پذیری و بازپروری سرخدار، موجب کمبود تاکسول در بازار شده است (Priyadarshini & Keerthi, 2012).

تاکنون چندین روش جایگزین برای افزایش تولید تاکسول بررسی شده است که می‌توان سنتز کامل شیمیایی تاکسول با روش‌های مختلف، روش نیمه سنتزی با استفاده از پیش‌ساز باکاتین، استفاده از کشت بافت سرخدار، به کارگیری قارچ‌های اندوفیت تولیدکننده تاکسول و استفاده از میکروارگانیسم‌های مهندسی ژنتیک شده را نام برد. هر یک از این روش‌ها، مزایا و معایبی دارند ولی در بیشتر موارد پیچیدگی و غیرقابل کنترل بودن شرایط دیده شده است (Wang *et al.*, 2021).

در مورد مسیر بیوسنتز تاکسول، به‌طور کلی ۱۹ مرحله آنزیمی شناخته شده وجود دارد که از ترکیب ژرانیل ژرانیل دی فسفات شروع شده و به تاکسول ختم می‌شود. آنزیم باکاتین فنیل پروپانویل ترانسفراز (BAPT) با اتصال زنجیره جانبی به باکاتین III، نقش مهمی در تولید تاکسول دارد (Croteau *et al.*, 2006). بنابراین شناسایی عوامل تأثیرگذار بر روی بیان ژن رمزکننده این آنزیم حائز اهمیت است.

یکی از مهمترین روش‌های افزایش متابولیت‌های ثانویه گیاهی استفاده از محرک‌های زیستی و غیرزیستی در سیستم‌های کشت بافت گیاهی است. متیل جاسمونات (Methyl Jasmonate) یک ترکیب مهم در فرایندهای هدایت پیام گیاهی می‌باشد که سیستم‌های دفاعی القایی گیاهان را تنظیم می‌کند. کاربرد متیل جاسمونات به صورت برون‌زا (اگزوزن) در افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی بسیار مؤثر است (Gundlach *et al.*, 1992)، به طوری که باعث افزایش ترکیبات آلکالوئیدی، ترپنوئیدی و فنولی در گونه‌های توتون، بذرابنج و سرخدار شده است (Moon *et al.*, 1998; Singh *et al.*, 1998; Keinanen *et al.*, 2001; Bonfill *et al.*, 2006). مطالعات مختلف

آغازگرهای طراحی شده، بلاست آغازگرهای طراحی شده توسط نرم افزار پرایمر بلاست (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) انجام شد و برای سنتز به شرکت متابیون آلمان ارسال شد (جدول ۱). برای تأیید اختصاصی بودن آغازگر ژن *bapt*، ترسیم منحنی ذوب محصول تکثیر این ژن انجام گردید.

(Sinnaclon First Strand cDNA Synthesis Kit) و آغازگر الیگو dT انجام شد. برای طراحی آغازگرهای مستقیم و معکوس دو ژن مورد نظر (ژن *bapt* و ژن 18s (به عنوان ژن کنترل داخلی))، توالی های این دو ژن از پایگاه داده NCBI دانلود و طراحی آغازگرها با استفاده از نرم افزار 7 Oligo انجام شد. همچنین برای حصول اطمینان از اختصاصی بودن

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای طراحی شده برای ژن *bapt* و ژن کنترل داخلی *18s*

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

شماره دسترسی	نام آغازگر	توالی آغازگر	دمای اتصال آغازگر	طول محصول PCR
Accession Number	Primer name	Primer sequence	Primer Ta	PCR product size
KC218824	<i>baptF</i> #	ATCCTGCAAAAGTGATTCGAG	54	105
KC218824	<i>baptR</i>	ACTCCACTTCAAGTTCCCC	54	105
EF017310	18sF	GTGCACAAAATCCCGACTCT	54	102
EF017310	18sR	GCGATCCGTCGAGTTATCAT	54	102

F: Forward, R: Reverse

ابتدا توسط ژن کنترل داخلی نرمال شد و برای هر دو ژن کارایی PCR ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شده است. همچنین از روش Pfaffl (Pfaffl et al., 2002) برای محاسبه مقدار بیان استفاده و به وسیله نرم افزار REST 2009 میزان بیان ژن محاسبه شد. مقایسه میانگین داده های بیان ژن نیز با روش S-N-K و نرم افزار SPSS 16 انجام شد.

برای اندازه گیری میزان بیان ژن *bapt* واکنش Real Time PCR با استفاده از کیت Sina SYBR Blue HS- qPCRMix (سیناکلون، تهران، ایران) با حجم ۲۰ میکرولیتر در دستگاه Mic Real-Time PCR System (استرالیا) انجام شد. شرایط انجام واکنش در جدول ۲ ذکر شده است. داده های حاصل از Ct نمودارهای بدست آمده

جدول ۲- شرایط دمایی و زمان مورد استفاده در چرخه های Real Time PCR

Table 2. Temperature and time conditions used in Real Time PCR cycles

مرحله	چرخه	دما	زمان	تعداد چرخه
Step	Cycle	Temperature	Time	Number of cycles
مرحله اول	واسرشت سازی اولیه	95°C	5min	1
Step1	Initial denaturation			
	واسرشت سازی	95°C	45s	
	Denaturation			
مرحله دوم	اتصال	54°C	45s	40
Step2	Annealing			
	بسط	72°C	1min	
	Extension			
مرحله سوم	بسط نهایی	72°C	7min	1
Step3	Final extension			

استخراج عصاره گیاهی و انجام کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) برای مطالعه تاکسول تولیدی، ساقه‌ها از نمونه‌های گیاهی تیمار شده با سطوح مختلف متیل جاسمونات و در دو بازه زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت جدا گردیدند. ساقه‌ها برای خشک شدن بمدت یک هفته در دمای اتاق قرار داده شدند. پس از خشک شدن، نمونه‌ها خرد شده و پودر شدند و پنج گرم از نمونه به دقت وزن شده و درون بالن ۵۰ میلی‌لیتری منتقل گردیدند. ۲۵ میلی‌لیتر استونیتریل به بالن اضافه شد و ۶۰ دقیقه التراسونیک گردید. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در سرعت ۲۰۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفوژ شد. محلول رویی با فیلتر ۰/۴۵ میکرون صاف و آماده تزریق شد.

۹/۶ میکروگرم) و بدست آمدن منحنی کالیبراسیون 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 $(R^2 = 0.99)$ ، میزان تاکسول موجود بر حسب میلی‌گرم در یک گرم وزن خشک از هر نمونه تخمین زده شد. تعداد دفعات تزریق برای هر نمونه ۳ تکرار در نظر گرفته شد. میانگین داده‌های بدست آمده از دستگاه HPLC، استفاده از آزمون S-N-K مقایسه شدند. برای تجزیه آماری از نرم‌افزار SPSS 16 و رسم نمودار از Excel استفاده شد.

نتایج

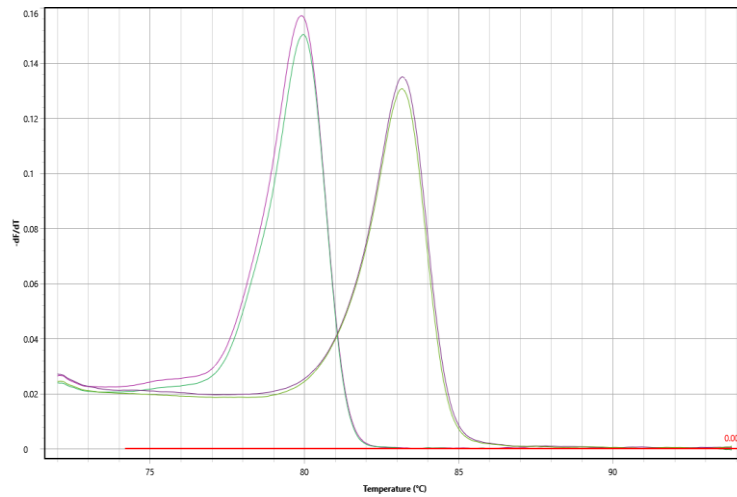
نتایج حاصل از بلاست آغازگرهای طراحی شده برای ژن‌های *bapt* و ژن کنترل داخلی *18s* نشان داد که آغازگرها کاملاً اختصاصی بوده و فقط به ناحیه مکمل خود بر روی سرخدار متصل می‌شوند (جدول ۳). همچنین منحنی ذوب برای هر دو ژن نیز نشان داد که آغازگرها به صورت صحیح طراحی شده و در سرخدار فقط به یک ناحیه متصل شده‌اند (شکل ۱). واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی نشان‌دهنده تکثیر هر دو ژن در تمامی تیمارهای مورد نظر بود (شکل ۲).

برای سنجش تاکسول موجود در نمونه‌ها از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و از دستگاه Knauer (آلمان) استفاده شد. سنجش‌ها با استفاده از ستون C18 با ابعاد ۲۵۰×۴۶ میلی‌متر و فاز متحرک شامل متانول و آب به نسبت ۸۰:۲۰ با شدت جریان یک میلی‌لیتر 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) (با غلظت‌های مختلف ۲/۴، ۴/۸ و

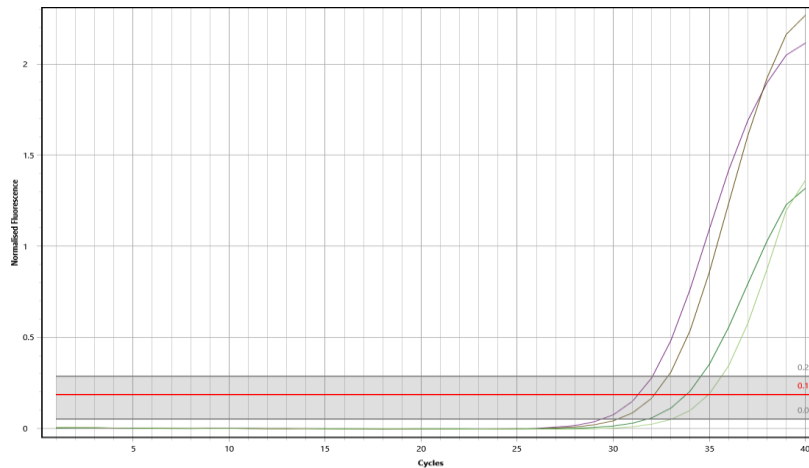
جدول ۳- پرایمر بلاست ژن *bapt* متصل شده به ناحیه هدف با شماره دسترسی KC218824.1

Table 3. Primer blast of the *bapt* gene annealed to the target region with accession number KC218824.1

آغازگر	Primer	توالی آغازگر Sequence	طول Length	دمای ذوب Tm	درصد GC GC%
آغازگر مستقیم	Forward primer	ATCCTGCAAAAAGTGATTTCGAG	21	58	42.85
آغازگر معکوس	Reverse primer	ACTCCACTTCAAGTTCCCC	19	58	52.63
طول قطعه	Product length	105			
آغازگر مستقیم الگو	Template Forward primer	ATCCTGCAAAAAGTGATTTCGAG			
آغازگر معکوس الگو	Template Reverse primer	ACTCCACTTCAAGTTCCCC			



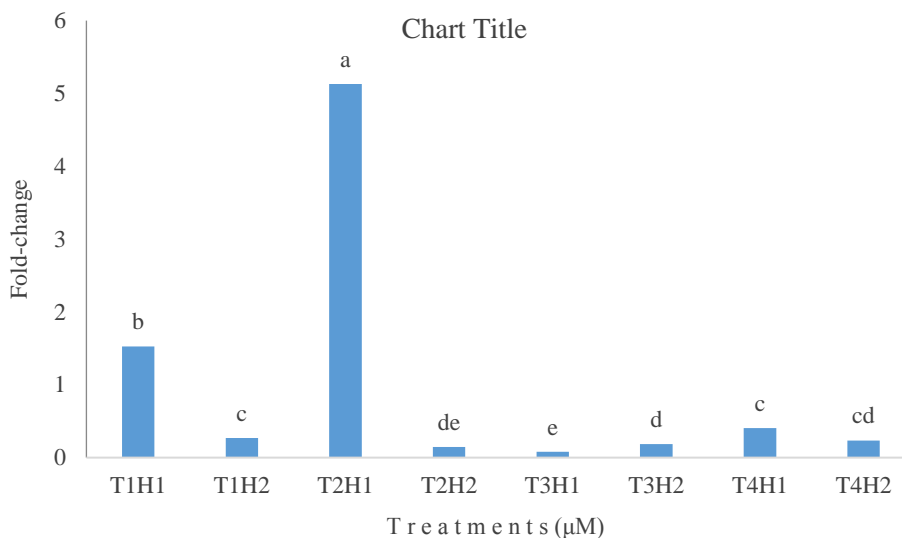
شکل ۱- منحنی ذوب مربوط به ژن‌های *bapt* (سمت راست) و *18s* (سمت چپ) در دو تکرار
Figure 1. Melting curve of the *bapt* (right) and *18s* (left) genes two replications



شکل ۲- منحنی تکثیر مربوط به ژن‌های *bapt* و *18s* در دو تکرار
Figure 2. Amplification plot for *bapt* genes in two replications

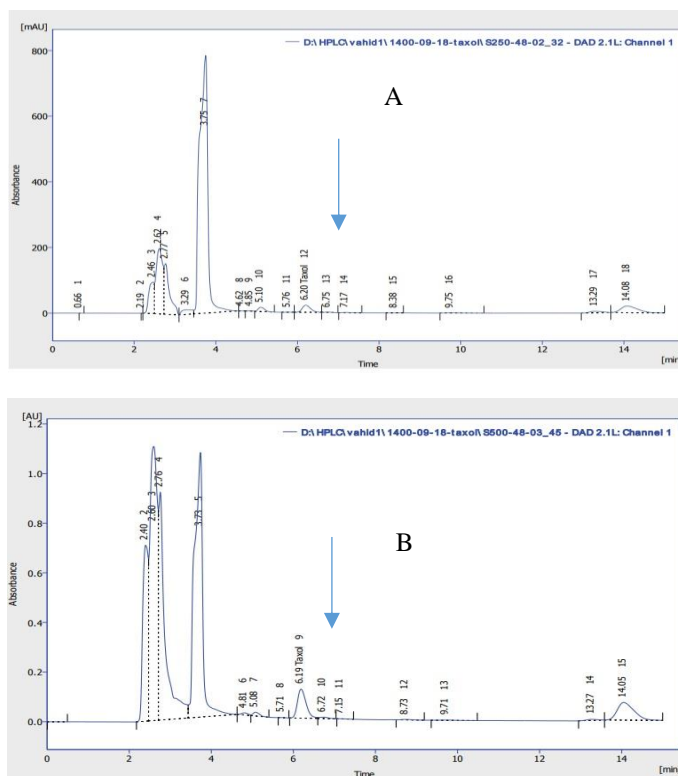
افزایش ۵/۱۳ برابری بیان ژن *bapt* نسبت به گیاه شاهد (تیمار ۰ متیل جاسمونات با ۴۸ ساعت) شده است. کمترین میزان بیان ژن نیز در تیمار متیل جاسمونات ۲۵۰ میکرومولار در ۴۸ ساعت و به نسبت ۰/۰۸ گیاه شاهد انجام شده است.

مقایسه میانگین اثر غلظت‌های متیل جاسمونات در دو بازه زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت بر بیان نسبی ژن *bapt* و مقایسه میانگین بیان ژن *bapt* حاصل از غلظت‌های متیل جاسمونات در دو بازه زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت در شکل ۳ آمده است. نتایج حاصل نشانگر این بود که تیمار متیل جاسمونات ۱۰۰ میکرومولار در ۴۸ ساعت، باعث



شکل ۳- مقایسه میانگین بیان ژن *bapt* در غلظت‌های متیل جاسمونات (شاهد، T1=100، T2=250، T3=500، T4=500 میکرومولار در دو بازه زمانی H1=48، H2=72 ساعت)

Figure 4. Mean comparisons of *bapt* gene expression in different Methyl Jasmonate concentrations (T1=control, T2=100, T3=250, T4=500 µM over two periods of H1=48, H2= 72 h)



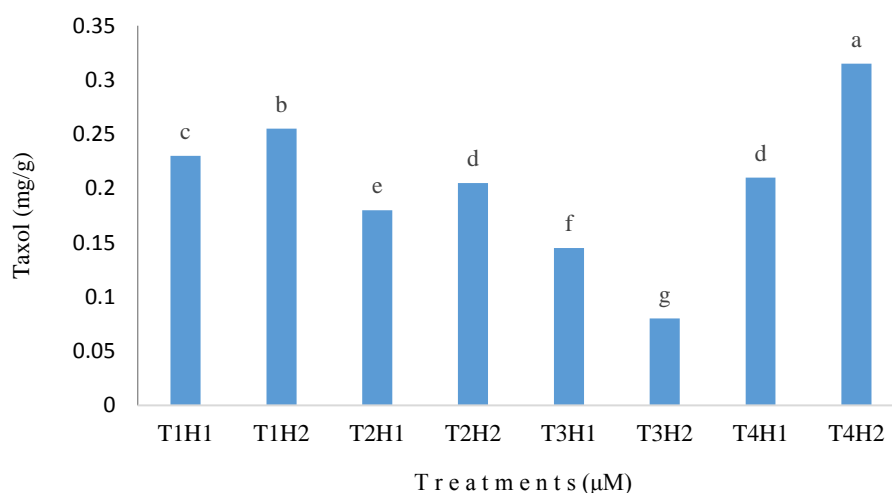
شکل ۴- نتایج HPLC برای تیمارهای ۲۵۰ میکرومولار (A) و ۵۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات (B): شناسایی تاکسول با زمان بازداری ۶/۲۷ دقیقه

Figure 5. HPLC results for A) 250 µM and B) 500 µM methyl jasmonate: Identification of Taxol with Rt 6.27 min.

۰/۰۸ میلی گرم بر گرم وزن خشک، کمترین میزان تولید تاکسول را داشت (شکل ۵).

از آزمون همبستگی پیرسون برای آزمون رابطه دو متغیر بیان ژن *bapt* و میزان تولید تاکسول استفاده شد. بین بیان ژن *bapt* و میزان تولید تاکسول همبستگی معنی دار مشاهده نشد ($r = -0.017$)، در نتیجه جنبه آماری دو متغیر بیان ژن *bapt* و میزان تولید تاکسول با یکدیگر رابطه ندارند.

مقایسه میانگین اثر غلظت‌های متیل جاسمونات در دو بازه زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت بر میزان تاکسول تولیدی نتایج حاصل از کروماتوگرافی HPLC نشان داد که تاکسول در تمامی تیمارها شناسایی شده است (شکل ۴). برای میزان تاکسول تولیدی، تیمار ۵۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات در ۷۲ ساعت با تولید ۰/۳۱۵ میلی گرم بر گرم وزن خشک، بیشترین تولید تاکسول را داشت. همچنین تیمار ۲۵۰ میکرومولار متیل جاسمونات در ۷۲ ساعت با



شکل ۵- مقایسه میانگین میزان تاکسول تولیدی در غلظت‌های متیل جاسمونات (شاهد=T1, T2=100, T3=250, T4=500 میکرومولار و H1=48, H2=72 ساعت)

Figure 6. Mean comparisons of Taxol production in different Methyl Jasmonate concentrations (T1=Control, T2=100, T3=250, T4=500 μM and H1=48, H2= 72 h)

مطالعات اندکی در مورد تأثیر الیسیتورهای زیستی و غیرزیستی روی تغییر بیان ژن *bapt* و میزان تاکسول تولیدی انجام شده است. این مطالعه نشان داد که سطح ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات نقش به‌سزایی در افزایش بیان ژن مذکور دارد ولی با افزایش میزان متیل جاسمونات به ۲۵۰ میکرومولار، میزان بیان ژن به شدت کاهش یافته است. سپس با افزایش سطح متیل جاسمونات به ۵۰۰ میکرومولار، دوباره بیان ژن شیب افزایشی داشته است. بنابراین به نظر می‌رسد که مسیرهای تنظیمی متفاوتی در پاسخ به سطوح مختلف متیل جاسمونات در سطح بیان ژن و میزان تولید متابولیت‌های ثانویه فعال می‌شود. به طوری که

بحث

تاکسول مهمترین متابولیت ثانویه جنس *Taxus* است که اهمیت به‌سزایی در درمان انواع سرطان‌ها دارد. در مسیر بیوسنتزی تاکسول ۱۹ مرحله آنزیمی شناخته شده وجود دارد (Croteau et al., 2006). یکی از مهمترین آنزیم‌های مسیر بیوسنتز تاکسول، آنزیم باکاتین آمینو فنیل پروپانویل ترانسفراز (BAPT) می‌باشد که موجب اتصال زنجیره جانبی به باکاتین شده و نقش اساسی در تولید تاکسول دارد (Walker et al., 2002). با توجه به اهمیت این آنزیم در تولید تاکسول، مطالعه جنبه‌های مختلف ژنتیکی ژن *bapt* تحت شرایط مختلف محیطی و زیستی حائز اهمیت است.

جاسمونات با غلظت ۱۰۰ میکرومولار پس از ۱۶ ساعت، باعث افزایش بیان ژن‌های دخیل در هدایت پیام گیاهی، مسیر دفاعی، عوامل رونویسی و مسیر بیوسنتز تاکسول شده است. در این مطالعه بیان بعضی از ژن‌ها تا ۱۷ برابر افزایش یافته است که نشان‌دهنده نقش مهم متیل جاسمونات در پاسخ‌های فیزیولوژیکی گیاهان می‌باشد که با نتایج این مطالعه در ارتباط با افزایش بیان ژن *bapt* تحت تیمار با متیل جاسمونات ۱۰۰ میکرومولار پس از ۴۸ ساعت مطابقت دارد.

در این مطالعه کمترین میزان تاکسول با ۰/۰۸ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک پس از ۷۲ ساعت تیمار با متیل جاسمونات ۲۵۰ مشاهده گردید و با افزایش سطوح متیل جاسمونات به ۵۰۰ میکرومولار در ۷۲ ساعت، تولید تاکسول به ۰/۳۱۵ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک افزایش یافته است. نتایج حاصل نشان‌دهنده اثرهای متفاوت متیل جاسمونات با غلظت‌های مختلف می‌باشد. Yukimune و همکاران (۱۹۹۶) در مطالعات خود بر روی تأثیر سطوح مختلف متیل جاسمونات بر روی تولید تاکسول در سه گونه جنس *Taxus*، به این نتیجه رسیدند که متیل جاسمونات باعث افزایش تولید تاکسول از روز پنجم به بعد شده، به طوری که بیشترین تاکسول تولیدی در غلظت ۱۰۰ میکرومولار و روز ۱۴ مشاهده شده است. در این مطالعه بیشترین تاکسول و باکاتین III تولیدی به ترتیب در گونه‌های *Taxus media* و *Taxus bacata* گزارش شد. همچنین با افزایش غلظت متیل جاسمونات از صفر تا ۰/۱ میکرومولار، تولید تاکسول کاهش یافته است که با نتایج این مطالعه مبنی بر کاهش تولید تاکسول با افزایش غلظت متیل جاسمونات از صفر تا ۱۰۰ میکرومولار، مطابقت دارد. با توجه به نتایج، به نظر می‌رسد که اثر متیل جاسمونات ۵ روز پس از اعمال آن رخ می‌دهد. نتایج مطالعات Nims و همکاران (۲۰۰۶) نشان داد که حداکثر میزان تولید تاکسول پس از ۷ روز از اعمال ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات به میزان ۳/۳ میلی‌گرم بر لیتر گزارش شد. در این مطالعه در ساعات اولیه، میزان

سطوح ملایم متیل جاسمونات موجب افزایش شدید بیان ژن شده، همچنین سطوح بالای متیل جاسمونات نیز همین نقش را دارد.

نقش حیاتی متیل جاسمونات در گیاهان در پاسخ به عوامل زیستی و غیرزیستی از طریق تأثیر بر روی عوامل رونویسی القاء‌شونده با متیل جاسمونات (MJ-inducible transcription factor) انجام می‌شود. عوامل رونویسی القاشونده با متیل جاسمونات تحت تأثیر متیل جاسمونات فعال شده و با اثر بر روی ناحیه راه‌انداز ژن‌های مختلف، موجب افزایش بیان ژن‌های خاصی شده، در نتیجه با افزایش بیان ژن و افزایش سنتز پروتئین، متابولیت‌های ثانویه خاصی تولید می‌شود. در سرخدار چندین عامل رونویسی القاشونده با متیل جاسمونات شناسایی شده است که شامل *TcJAMYC1*، *TcJAMYC2* و *TcJAMYC4* می‌باشد. این عوامل با شناسایی جایگاه E-Box (با توالی CANNTG) بر روی ژن‌های مسیر بیوسنتز تاکسول، باعث افزایش بیان ژن‌های مورد نظر می‌شوند (Lenka et al., 2015).

مطالعات نشان می‌دهد که متیل جاسمونات، اثرهای متفاوتی بر روی بیان ژن‌های مراحل اولیه، میانی و انتهایی در مسیر بیوسنتز تاکسول دارد. به طوری که شش ساعت پس از اعمال متیل جاسمونات، سطوح رونوشت ژن‌های مراحل اولیه و میانی مسیر بیوسنتز تاکسول افزایش می‌یابد و در ۱۸-۱۲ ساعت به اوج خود می‌رسد و در ۳۰ ساعت به سطح پایین کاهش می‌یابد، در حالی که پایداری و سطح رونوشت ژن‌های مسیر انتهایی کمتر می‌باشد (Nims et al., 2006). وجود پاسخ‌های متفاوت به متیل جاسمونات در مطالعه مذکور با یافته‌های این تحقیق مطابقت دارد. مطالعات Lenka و همکاران (۲۰۱۲) نیز نشان داد که متیل جاسمونات بر روی ژن‌های مسیر بیوسنتز تاکسول در زمان‌های مختلف (۶ ساعت، ۱۸ ساعت و ۵ روز) اثرهای متفاوتی دارد، به طوری که بیشترین بیان ژن در ۱۸ ساعت پس از اعمال متیل جاسمونات مشاهده شده است. نتایج تحقیقات Li و همکاران (۲۰۱۲) نشان داد که متیل

- culture mixing and elicitation of paclitaxel and baccatin III production in *Taxus baccata* suspension cultures. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 42(5), 422-426.
- Croteau, R., Ketchum, R.E., Long, R.M., Kaspera, R. and Wildung, M.R., 2006. Taxol biosynthesis and molecular genetics. *Phytochemistry Reviews*, 5(1), 75-97.
- Gundlach, H., Müller, M.J., Kutchan, T.M. and Zenk, M.H., 1992. Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(6), 2389-2393.
- Hou, L., Zhao, Y., Song, G.Q., Ma, Y.H., Jin, X.H., Jin, S.L., Fang, Y.H. and Chen, Y.C., 2019. Interfering cellular lactate homeostasis overcomes Taxol resistance of breast cancer cells through the microRNA-124-mediated lactate transporter (MCT1) inhibition. *Cancer cell international*, 19(1), 1-12.
- Howat, S., Park, B., Oh, I.S., Jin, Y.W., Lee, E.K. and Loake, G.J., 2014. Paclitaxel: biosynthesis, production and future prospects. *New biotechnology*, 31(3), 242-245.
- Jiang, L., Zhang, K., Lü, X., Yang, L., Wang, S., Chen, D., Yang, Y. and Qiu, D., 2021. Characterization and expression analysis of genes encoding Taxol biosynthetic enzymes in *Taxus* spp. *Journal of Forestry Research*, 32(6), 2507-2515.
- Kai, G., Zhao, L., Zhang, L., Li, Z., Guo, B., Zhao, D., Sun, X., Miao, Z. and Tang, K., 2005. Characterization and expression profile analysis of a new cDNA encoding taxadiene synthase from *Taxus media*. *BMB Reports*, 38(6), 668-675.
- Keinänen, M., Oldham, N.J. and Baldwin, I.T., 2001. Rapid HPLC screening of jasmonate-induced increases in tobacco alkaloids, phenolics, and diterpene glycosides in *Nicotiana attenuata*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(8), 3553-3558.
- Khalifa, A.M., Elsheikh, M.A., Khalifa, A.M. and Elnaggar, Y.S., 2019. Current strategies for different paclitaxel-loaded Nano-delivery Systems towards therapeutic applications for ovarian carcinoma: A review article. *Journal of Controlled Release*, 311, 125-137.
- Lenka, S.K., Boutaoui, N., Paulose, B., Vongpaseuth, K., Normanly, J., Roberts, S.C. and Walker, E.L., 2012. Identification and expression analysis of methyl jasmonate responsive ESTs in paclitaxel producing *Taxus cuspidata* suspension culture cells. *BMC genomics*, 13(1), 1-10.
- Lenka, S.K., Nims, N.E., Vongpaseuth, K., Boshar, R.A., Roberts, S.C. and Walker, E.L., 2015. Jasmonate-responsive expression of paclitaxel biosynthesis genes in *Taxus cuspidata* cultured cells is negatively regulated by the bHLH transcription factors TcJAMYC1, TcJAMYC2, and TcJAMYC4.

تولید تاکسول بسیار کم بوده و با افزایش زمان، افزایش یافته است. در این مطالعه با اینکه زمان اعمال متیل جاسمونات ثابت بوده ولی با افزایش غلظت به ۵۰۰ میکرومولار، میزان تولید تاکسول نیز افزایش یافته است. Lenka و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند که بیشترین میزان تولید تاکسول پس از ۳-۶ روز از اعمال متیل جاسمونات انجام شده است. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت با وجود افزایش شدید بیان ژن در ساعات اولیه تیمار با متیل جاسمونات (۱۹-۱۲ ساعت)، افزایش تولید تاکسول چند روز پس از اعمال متیل جاسمونات مشاهده می‌شود. با توجه به نتایج بدست آمده، می‌توان استنتاج کرد که در ساعات اولیه پس از اعمال متیل جاسمونات، افزایش بیان ژن‌های دخیل در مسیره‌های مختلف انجام می‌شود ولی افزایش سنتز فراورده‌های مسیر بیوسنتزی مانند تاکسول، چندین روز پس از اعمال متیل جاسمونات انجام می‌شود. با توجه به کاربرد تاکسول و ارزش اقتصادی و دارویی آن و عدم نیاز به روش‌های پیچیده‌تر دستوری ژنتیکی گیاهان برای بالا بردن سطح محتوای فراورده‌های ارزشمند، پیش‌بینی می‌شود با اعمال مقادیر کمی از الیسیتورهای مختلف مانند متیل جاسمونات، بتوان تولید تاکسول و بقیه متابولیت‌های ثانویه ارزشمند را افزایش داد. همچنین عدم مشاهده همبستگی بین بیان ژن و سطح تاکسول احتمالاً به دلیل انتخاب نکردن زمان مناسب برای بررسی سطح تاکسول باشد. بنابراین نتیجه‌گیری شد که بیشترین میزان تاکسول با استفاده از متیل جاسمونات ۵۰۰ میکرومولار در ۷۲ ساعت با ۰/۳۱۵ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک بدست آمد و با توجه به اهمیت تاکسول در صنایع داروسازی، پیشنهاد می‌شود در تحقیقات آینده، از غلظت‌های بالاتر از ۵۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات با زمان‌های بیشتر از ۳ روز نیز برای بررسی احتمال افزایش تولید تاکسول استفاده شود.

منابع مورد استفاده

- Bonfill, M., Exposito, O., Moyano, E., Cusidó, R.M., Palazón, J. and Pinol, M.T., 2006. Manipulation by

- CoA acyltransferase that functions in Taxol biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(20), 12715-12720.
- Wang, T., Li, L., Zhuang, W., Zhang, F., Shu, X., Wang, N. and Wang, Z., 2021. Recent Research Progress in Taxol Biosynthetic Pathway and Acylation Reactions Mediated by Taxus Acyltransferases. *Molecules*, 26(10), p.2855.
 - Wani, M.C. and Horwitz, S.B., 2014. Nature as a Remarkable Chemist: A personal story of the discovery and development of Taxol®. *Anti-cancer drugs*, 25(5), p.482.
 - Wani, M.C., Taylor, H.L., Wall, M.E., Coggon, P. and McPhail, A.T., 1971. Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of Taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *Journal of the American Chemical Society*, 93(9), 2325-2327.
 - Yukimune, Y., Hara, Y., Nomura, E., Seto, H. and Yoshida, S., 2000. The configuration of methyl jasmonate affects paclitaxel and baccatin III production in *Taxus* cells. *Phytochemistry*, 54(1), 13-17.
 - Yukimune, Y., Tabata, H., Higashi, Y. and Hara, Y., 1996. Methyl jasmonate-induced overproduction of paclitaxel and baccatin III in *Taxus* cell suspension cultures. *Nature biotechnology*, 14(9), 1129-1132.
 - Zagouri, F., Korakiti, A.M., Zakopoulou, R., Kyriazoglou, A., Zografos, E., Haidopoulos, D., Apostolidou, K., Papatheodoridi, M.A. and Dimopoulos, M.A., 2019. Taxanes during pregnancy in cervical cancer: A systematic review and pooled analysis. *Cancer Treatment Reviews*, 79, p.101885.
 - Li, S.T., Zhang, P., Zhang, M., Fu, C.H., Zhao, C.F., Dong, Y.S., Guo, A.Y. and Yu, L.J., 2012. Transcriptional profile of *Taxus chinensis* cells in response to methyl jasmonate. *BMC genomics*, 13(1), 1-11.
 - Moon, W.J., Yoo, B.S., Kim, D.I. and Byun, S.Y., 1998. Elicitation kinetics of taxane production in suspension cultures of *Taxus baccata* Pendula. *Biotechnology techniques*, 12(1), 79-81.
 - Naill, M.C. and Roberts, S.C., 2005. Flow cytometric analysis of protein content in *Taxus* protoplasts and single cells as compared to aggregated suspension cultures. *Plant cell reports*, 23(8), 528-533.
 - Nims, E., Dubois, C.P., Roberts, S.C. and Walker, E.L., 2006. Expression profiling of genes involved in paclitaxel biosynthesis for targeted metabolic engineering. *Metabolic engineering*, 8(5), 385-394.
 - Pfaffl, M.W., Horgan, G.W. and Dempfle, L., 2002. Relative expression software tool (REST®) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research* 30: 1-10.
 - Priyadarshini, K. and Keerthi, A.U., 2012. Paclitaxel against cancer: a short review. *Med chem*, 2(7), 139-141.
 - Singh, G., Gavrieli, J., Oakey, J.S. and Curtis, W.R., 1998. Interaction of methyl jasmonate, wounding and fungal elicitation during sesquiterpene induction in *Hyoscyamus muticus* in root cultures. *Plant cell reports*, 17(5), 391-395.
 - Walker, K., Fujisaki, S., Long, R. and Croteau, R., 2002. Molecular cloning and heterologous expression of the C-13 phenylpropanoid side chain-

Effect of methyl jasmonate on Taxol production and *bapt* gene expression of *Taxus baccata*

Y. Zhoulideh¹, Y. mohammadi^{2*} and M. R. Mashayekhi³

1- M.Sc graduated. Dept. Biology, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, I.R. Iran

2* - Corresponding author, Assit. Prof., Research institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, I.R. Iran, Email: y.mohamadi@rifr-ac.ir

3- Assit. Prof., Molecular Genetics, Department of Biology, Tabriz Branch, Islamic Azad university, Tabriz, I.R. Iran

Received: 09.02.2022

Accepted: 05.09.2022

Abstract

Taxol is one of the most important secondary metabolites that plays an important role in the treatment of various cancers. This valuable substance is produced through a complex pathway. Due to the low production of Taxol and the risk of extinction of yew, increasing demand of Taxol production has become very important. In this research, plant samples were treated with 0, 100, 250 and 500 μM methyl jasmonate and kept in phytotron for 48 and 72 hours. After treatment with methyl jasmonate, the expression of the stem *bapt* gene was investigated by Real Time PCR method and the amount of the produced Taxol was measured using high performance liquid chromatography (HPLC). The obtained data were analyzed statistically. The results showed that the expression of *bapt* gene at a concentration of 100 μM in 48 hours was 5.13 times higher than that of the control. In addition, the highest amount of Taxol was observed in the plant treated with 500 μM methyl jasmonate in 72 hours with 0.315 mg/g dry weight. Pearson's correlation test showed that there was no relationship between gene expression and Taxol production. It seems to be due to the time difference between gene expression and Taxol production under methyl jasmonate. Considering the importance of Taxol in the pharmaceutical industry, it was recommended using methyl jasmonate with concentration of higher than 500 μM with periods longer than three days to examine the possible increasing of Taxol production

Keywords: *bapt*, Gene expression, HPLC, Real-Time PCR, Taxol, Yew