

تأثیر متیل جاسمونات بر روی بیان ژن *ts* و تاکسول تولیدی در ساقه گیاه سرخدار (*Taxus baccata*)

The effect of Methyl jasmonate on the expression of *ts* gene and Taxol production in the stem of Yew (*Taxus baccata*)

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

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

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

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

Zhoolideh Y¹, Mohammadi Y^{*2}, Mashayekhi MR³

1- MSc, Department of Biology, Tabriz Branch, Islamic Azad university, Tabriz, Iran

2- Assistant Professor, Plant breeding, Research institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

3- Assitant Proffesor, Molecular Genetics, Department of Biology, Tabriz Branch, Islamic Azad university, Tabriz, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: y.mohamadi@rifr-ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۲/۰۲ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۲۹)

چکیده

گیاهان دارویی منبع تأمین بیش از ۲۵٪ کل داروهای مصرفی دنیا را تشکیل می‌دهند که نقش ویژه‌ای را در تأمین داروهای ضد سرطانی ایفا می‌کنند. یکی از مهم‌ترین این داروها تاکسول است. منبع طبیعی این ماده با ارزش گونه‌های جنس سرخدار (*Taxus*) است. تولید تاکسول در یک مسیر پیچیده آنزیمی صورت می‌گیرد که تحت تأثیر عوامل گوناگون می‌باشد، بنابراین در این مطالعه، شناسایی میزان تأثیر متیل جاسمونات در تغییر بیان ژن (*ts*) *Taxadiene synthase* و تولید تاکسول در گیاه سرخدار، هدف‌گذاری شده است. در تحقیق حاضر، نمونه‌های گیاهی با متیل جاسمونات در غلظت‌های متفاوت ۰، ۱۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکرومولار و دو زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند و در این مدت در فیتوترون نگهداری شدند. سپس بیان ژن *ts* با روش Real Time PCR اندازه‌گیری شد. علاوه بر این میزان تاکسول تولیدی نیز با تکنیک HPLC ارزیابی شد و اطلاعات به‌دست آمده مورد آنالیز قرار گرفت. نتایج نشان داد که بیشترین بیان ژن در تیمار ۲۵۰ میکرومولار متیل جاسمونات و در ۷۲ ساعت و معادل ۱/۱۳ برابر گیاه شاهد و کمترین میزان بیان ژن با کمتر از ۵ درصد گیاه شاهد مربوط به تیمار ۲۵۰ میکرومولار و در ۴۸ ساعت بود. داده‌های حاصل از کروماتوگرافی نشان داد که بیشترین میزان تاکسول در گیاه تحت تیمار با غلظت ۵۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات و زمان ۷۲ ساعت به میزان ۰/۳۰۷ میلی گرم تاکسول بر گرم وزن خشک نمونه گیاهی تولید شده است. همچنین تیمار ۲۵۰ میکرومولار متیل جاسمونات با ۷۲ ساعت و تولید ۰/۰۸ میلی گرم تاکسول، کمترین بود. آزمون همبستگی پیرسون بیان داشت که رابطه‌ی مشخصی بین بیان ژن و تاکسول تولیدی وجود ندارد. این امر به‌دلیل اثرات پیچیده متیل جاسمونات بر روی بیان ژن و تولید تاکسول در بازه‌های زمانی متفاوت می‌باشد. علی‌رغم تلاش‌های فراوان صورت گرفته در زمینه‌ی شناخت مسیر بیوسنتزی تاکسول، هنوز هم تصویر کاملاً روشن و دقیقی از آن در دسترس نمی‌باشد. به‌همین منظور بررسی ژن‌های دخیل در این مسیر بیوسنتزی حائز اهمیت می‌باشد.

واژه‌های کلیدی

بیان ژن
تاکسول
سرخدار
کروماتوگرافی
ts

مقدمه

گیاهان دارویی به عنوان سرمایه های ژنتیکی ارزشمند در شمار میراث های بومی کشورها محسوب می شوند و دارای اهمیت جهانی هستند. امروزه برای درمان و حفظ سلامتی انسان تاکید زیادی بر استفاده از داروهایی با منشا طبیعی می شود (Pan et al. 2014). داروهای گیاهی به دلیل نزدیکی و سازگاری با فیزیولوژی بدن انسان در مقایسه با داروهای شیمیایی خطرات و عوارض جانبی کمتری دارند. این ویژگی یکی از دلایل اصلی رویکرد و تمایل دوباره ی مردم جهان به گیاهان دارویی و استفاده از آنها در قیاس با داروهای شیمیایی و مرکب از مواد مصنوعی است (Ekor 2014). داروهای همچون تاکسول، وین بلاستین، وین کریستین، کامپوتوسین و پودوفیلوتوکسین از مهم ترین داروهای ضدسرطانی با منشاء گیاهی هستند که تاکسول و ترکیبات هم خانواده ی آن (تاکسان ها Taxanes) یا (تاکسولیدها Taxoid) اهمیت بسیار زیادی دارند (Lichota and Gwozdzinski 2018). موارد استعمال این داروها در درمان سرطان هایی همچون تخمدان، سینه، ریه و نیز کاپوسی سارکومای وابسته به ایدز می باشد.

علی رغم تلاش های فراوان صورت گرفته در زمینه ی شناخت مسیر بیوسنتزی تاکسول، هنوز هم تصویر کاملاً روشن و دقیقی از آن در دسترس نمی باشد. تنوع بسیار زیاد ترکیبات تاکسانی و شباهت آنها با یکدیگر، غلظت پایین ترکیبات حد واسط و مراحل متابولیکی بسیار، از مهم ترین موانع موجود در راه شناخت این مسیر بیوسنتزی هستند. اما با این حال محققین با استفاده از ترکیبی از روش های بیوشیمیایی و ژنتیکی موفق شده اند تصویر نسبتاً واضحی از این مسیر بیوسنتزی را تهیه کنند (Onrubia et al. 2013). در مورد مسیر بیوسنتزی تاکسول، ۱۹ مرحله ی آنزیمی شناخته شده وجود دارد (Croteau et al. 2006).

الیستورها عواملی هستند که به عنوان محرک عمل می کنند و می توانند باعث پاسخ های فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی و تجمع فیتوالکسین ها در گیاه شوند. مولکول های محرک مانند متیل جاسمونات تنظیم کننده های رشد گیاهی هستند که نقش کلیدی در رشد گیاه و پاسخ به تنش های محیطی دارند و در سیگنال دهی در برخی از سیستم های ترارسانی علامت نقش دارند و فعالیت آنزیم های خاصی را القا می کنند (Qiao et al. 2017). متیل

جاسمونات یکی از ترکیباتی است که برای القای تولید تاکسول در گونه های تاکسوس استفاده می شود، اما مکانیسم اثر آن به طور دقیق مشخص نشده است (Yukimune et al. 1996; Yukimune et al. 2000; Kai et al. 2005; Naill and Roberts, 2005; Nims et al. 2006).

با افزایش سرطان، ارزش بازار تاکسول به شدت افزایش یافته است. با این حال، منابع طبیعی محدود گونه های تاکسوس، تولید تاکسول را مستقیماً از درختان سرخدار محدود می کند، که یک موضوع چالش برانگیز است (Gallego-Jara et al. 2020). این مطالعه، با فرض اینکه متیل جاسمونات به عنوان یک محرک شیمیایی منجر به افزایش سطح تاکسول در سرخدار و سطح بیان ژن های دخیل در مسیر بیوسنتز تاکسول در سطوح مختلف غلظت متیل جاسمونات می شود مورد انجام قرار گرفته است.

مواد و روش ها

نمونه های گیاهی مورد استفاده در این تحقیق، از پایه سرخدار موجود در باغ گیاه شناسی ملی ایران تهیه و تحت غلظت های مختلف متیل جاسمونات (۰، ۱۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکرومولار) (Yukimune et al. 1996) تیمار و به مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت در فیتوترون نگهداری شدند. آزمایش مورد نظر به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با ۲ تکرار انجام شد.

برای بررسی بیان ژن *ts*، توالی نوکلئوتیدی این ژن به همراه ژن کنترل داخلی *18s* از داده پایگاه اطلاعات بیوتکنولوژی آمریکا (NCBI) دانلود و با استفاده از نرم افزار OLIGO7، طراحی آغازگرهای مستقیم و معکوس هر دو ژن با در نظر گرفتن پارامترهای دوبلکس، سنجاق سر، دمای ذوب و هومولوژی، صورت گرفت (جدول ۱). برای پی بردن به اختصاصیت آغازگرهای اختصاصی از آنالیز پرایمر بلاست داده پایگاه NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) استفاده شد و پس از تأیید آغازگرهای طراحی شده، برای سنتز به شرکت متابیون آلمان فرستاده شدند. استخراج RNA کل با استفاده از کیت RNX-PLUS™ (سینا کلون، ایران) از ساقه گیاهان تیمار شده با متیل جاسمونات، صورت و پس از بررسی کمیت RNA استخراجی، سنتز رشته اول cDNA با کیت AddScript (Addbio)

ساقه‌های گیاهان تیمار شده با متیل جاسمونات تحت غلظت‌های ۰، ۱۰۰، ۲۵۰، و ۵۰۰ میکرومولار در ۴۸ و ۷۲ ساعت از گیاه اصلی جدا شده و به مدت ۸ روز در دمای اتاق خشک شدند. سپس ۵ گرم از نمونه‌های ساقه، پودر شده و در ۲۵ میلی‌لیتر استونیتریل حل شد. سپس مخلوط مورد نظر ۶۰ دقیقه تراسونیک شده و به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۱۵۰۰۰ سانتریفیوژ انجام شد. نهایتاً محلول رویی با فیلتر ۰/۴۵ میکرون صاف شد و برای تزریق آماده شد.

اندازه‌گیری میزان تاکسول تولیدی با ستون C18 با ابعاد ۲۵۰×۴۶ میلی‌متر و فاز متحرک شامل متانول و آب به نسبت ۲۰۰:۸۰۰ و با شدت جریان یک میلی‌متر بر دقیقه انجام شد. در این مطالعه میزان تزریق برای استاندارد و نمونه‌ها ۵۰ میکرولیتر بود و از طول موج ۲۲۷ نانومتر استفاده شد. پس از کالبره کردن ستون‌ها، سنجش تاکسول موجود در هر نمونه با استفاده از تزریق محلول استاندارد تاکسول (Sigma Aldrich) و به دست 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.

کره جنوبی) همراه با کنترل مثبت (با RNA شاهد که قبلاً نتیجه داده بود) و کنترل منفی (بدون RNA) انجام شد. در نهایت واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی با استفاده از مستر میکس Ampliqon (دانمارک) و با در نظر گرفتن شرایط جدول ۲ در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر در دستگاه Mic Real-Time PCR System (micrun، استرالیا) انجام شد. برای تأیید اتصال آغازگرهای طراحی شده به الگوی مکمل خود از منحنی ذوب نیز استفاده شد. وجود تک پیک در منحنی ذوب نشان دهنده اتصال اختصاصی آغازگرها به مکمل خود می‌باشد. داده‌های حاصل از چرخه آستانه (CT) برای تمامی ژن‌ها در حالات تیماری مختلف محاسبه و پس از نرمال سازی با ژن کنترل داخلی، محاسبه مقدار بیان با روش Pfaffl (Pfaffl et al. 2002) صورت گرفت. نرمال بودن توزیع داده‌ها با آزمون کولموگروف-اسمیرنوف و یکنواختی واریانس‌ها نیز با آزمون لون انجام و آنالیز واریانس داده‌ها و همچنین مقایسه میانگین بیان ژن با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16 انجام و نمودارها با Excel ترسیم شد.

سنجش میزان تاکسول تولید شده در ۸ تیمار مورد نظر با روش HPLC (دستگاه Knauer آلمان) صورت گرفت. بدین صورت که

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

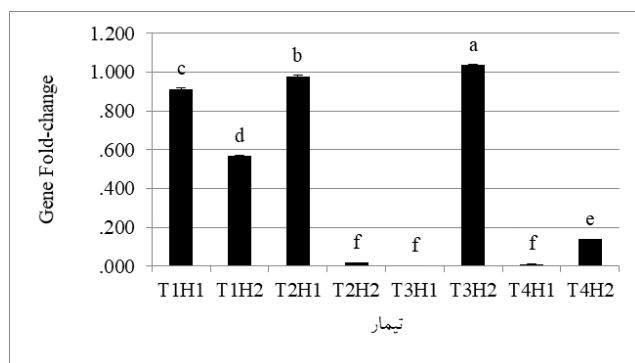
اندازه‌ی محصول PCR	دمای اتصال آغازگر	توالی آغازگر	نام آغازگر	شماره دسترسی
۷۳	۵۴	GGCAGATATAAATTTCACTCGAC	<i>tsF</i> *	KC188793.1
۷۳	۵۴	ATATTCGGGTTCAAATGTAGC	<i>tsR</i> *	KC188793.1
۱۰۲	۵۴	GTGCACAAAATCCCGACTCT	<i>18sF</i>	EF017310
۱۰۲	۵۴	GCGATCCGTCGAGTTATCAT	<i>18sR</i>	EF017310

* F: Forward, R: Reverse

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

تعداد چرخه‌ها	زمان	دما	مرحله
۱	۵ دقیقه	۹۵°C	واشرشت‌سازی اولیه
	۴۵ ثانیه	۹۵°C	واشرشت‌سازی
۴۰	۴۵ ثانیه	۵۴°C	اتصال
	۱ دقیقه	۷۲°C	بسط
۱	۷ دقیقه	۷۲°C	بسط نهایی

میکرومولار، بیان ژن *ts* کاهش چشمگیری داشته است. در این مطالعه کمترین میزان بیان ژن مذکور در تیمار ۲۵۰ میکرومولار و ۷۲ ساعت مشاهده شده است (شکل ۱). تحقیقات نشان داده است که بیان نسبی ژن ژرانیل دی فسفات سنتاز در سطح رونوشت در پاسخ به تیمار متیل جاسمونات در گیاه یونجه ۵ ساعت بعد از اعمال تیمار افزایش یافت (Fathi et al. 2012). نتایج حاصل از بررسی بیان نسبی ژن بتا آمیرین سنتاز در گیاه سیاهدانه در اثر تیمار با متیل جاسمونات نشان داد که بیان نسبی این ژن در اثر القاء تیمار افزایش می یابد و باعث افزایش تولید بتا آمیرین می شود (Scholz et al. 2009). نتایج مذکور با نتایج به دست آمده در این تحقیق مطابقت دارد.



شکل ۱- مقایسه میانگین بیان ژن *ts* در تیمارهای مختلف (T2=100, T1=0)، T2=100، T1=0، T3=250، T4=500 میکرومولار و H1=48، H2=72 (در هر ستون میانگین هایی که دارای حرف مشابه هستند، اختلاف معنی داری ندارند)

نتایج تحقیقات متعددی نشان می دهد که متیل جاسمونات تأثیرات متفاوتی بر روی بیان ژن های مسیر بیوسنتز تاکسول دارد. به طوری که سطح پایداری رونوشت ژن های مسیر بیوسنتز تاکسول و همچنین زمان اثر متیل جاسمونات بر روی بیان ژن و تولید تاکسول از مهمترین تفاوت ها می باشد. گزارشات نشان داد که شش ساعت پس از اعمال متیل جاسمونات، سطوح رونوشت ژن های مراحل اولیه و میانی مسیر بیوسنتز تاکسول افزایش یافته و در ۱۲-۱۸ ساعت به اوج رسیده و در ۳۰ ساعت به سطح پایین تنزل پیدا می کند (Nims et al. 2006). وجود اثرات متفاوت متیل جاسمونات بر روی بیان ژن های مختلف، با یافته های تحقیق حاضر مطابقت دارد. مطالعات (Lenka et al. 2012) نشان می دهد که اثر متیل جاسمونات وابسته به مدت زمان اعمال تیمار بوده

برای تعیین میزان تاکسول هر یک از عصاره ها، سطح زیر پیک مربوطه در زمان مورد نظر اندازه گیری شد و با قرار دادن این سطح در معادله حاصل از منحنی کالیبراسیون ($R^2 = 0.99$, $y=126.28x+133.89$)، میزان تاکسول موجود بر حسب میلی گرم در یک گرم وزن خشک از هر نمونه تخمین زده شد. تعداد دفعات تزریق برای هر نمونه ۳ تکرار در نظر گرفته شد. برای آنالیز داده های حاصل از HPLC، نرمال بودن داده ها براساس آزمون کولموگروف-اسمیرنوف انجام شد و سپس آنالیز واریانس داده ها و همچنین مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد با استفاده از نرم افزار SPSS16 و رسم نمودار در Excel، صورت گرفت.

نتایج و بحث

نتایج آنالیز واریانس بیان ژن *ts* و تاکسول تولیدی در ساقه ی درخت سرخدار پس از اعمال تیمار با متیل جاسمونات در چهار غلظت متفاوت ۰، ۱۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ و اعمال دو زمان متفاوت ۴۸ و ۷۲ ساعت نشان داد که اختلاف معنی داری در سطح یک درصد وجود دارد (جدول ۳).

جدول ۳- تجزیه واریانس میزان بیان ژن *ts* و تاکسول تولیدی در ساقه

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	میزان تاکسول
متیل جاسمونات	۳	۰/۳۱۰**	۰/۰۱۹**
زمان	۱	۰/۰۰۵**	۰/۰۰۲**
زمان*متیل جاسمونات	۳	۰/۷۰۹**	۰/۰۰۴**
خطا	۸	۳/۱۲۱E-۵	۱/۸۶۵E-۵

** به معنی وجود اختلاف معنی دار در سطح یک درصد می باشد

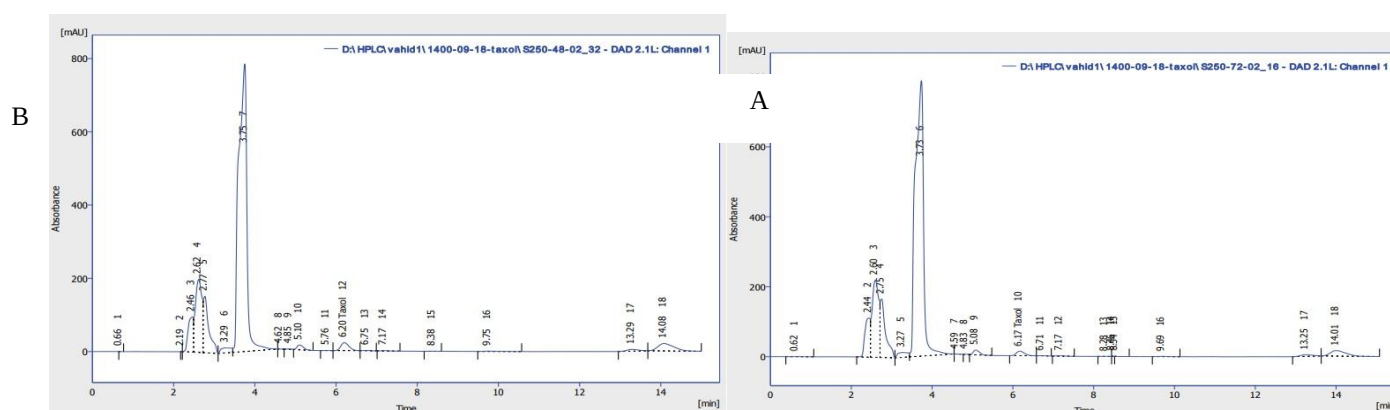
طبق شواهد به دست آمده از مقایسه میانگین بیان ژن *ts* در سطوح مختلف متیل جاسمونات با مقادیر ۰، ۱۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکرومولار و اعمال زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت، نتیجه گیری شد که در زمان ۴۸ ساعت، پس از اعمال تیمار ۲۵۰ میکرومولار متیل جاسمونات بیان ژن *ts* افزایش ۱/۱۳ برابری نسبت به گیاه شاهد پیدا کرده اما با افزایش غلظت متیل جاسمونات به ۵۰۰

همبستگی پیرسون جهت آزمون رابطه دو متغیر بیان ژن *ts* و میزان تولید تاکسول استفاده شد. بین بیان ژن *ts* و میزان تولید تاکسول همبستگی معنی‌دار مشاهده نشد ($p = 0.189$ و $N = 16$ و $r = -0.346$)، در نتیجه از جنبه آماری دو متغیر بیان ژن *ts* و میزان تولید تاکسول با یکدیگر رابطه ندارند. 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 می‌باشد که به‌طور جدی بر بقا گونه‌های سرخدار تأثیر می‌گذارد.

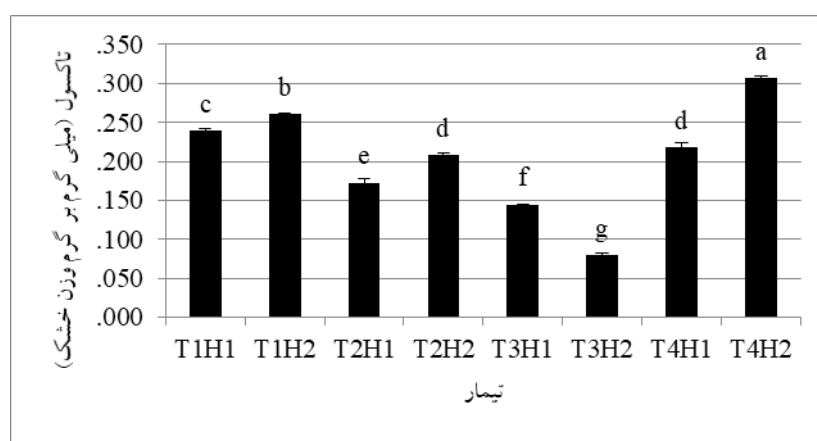
به‌طوری که بیشترین بیان ژن در ۱۸ ساعت پس از اعمال متیل جاسمونات مشاهده شده است.

نتایج HPLC نشان می‌دهد که تاکسول در تمامی تیمارها تولید شده است (شکل ۲). در مورد میزان تاکسول تولیدی، بهترین تیمار ۷۲ ساعت در غلظت ۵۰۰ میکرومولار متیل‌جاسمونات با تولید ۰/۳۰۷ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک و کمترین میزان تولید با ۰/۰۷۹ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک در تیمار ۲۵۰ میکرومولار و ۷۲ ساعت مشاهده شد (شکل ۳).

نتایج حاصل نشان دهنده اثرات متفاوت متیل جاسمونات با غلظت‌های یکسان ولی در زمان‌های متفاوت می‌باشد. از آزمون



شکل ۲- نتایج HPLC برای تیمارهای ۲۵۰ میکرومولار در ۴۸ ساعت (A) و ۷۲ ساعت (B): شناسایی تاکسول با زمان بازداری ۶/۲۷ دقیقه



شکل ۳- مقایسه میانگین میزان تاکسول تولیدی در تیمارهای مختلف: (T1=0, T2=100, T3=250, T4=500 میکرومولار و H1=48 و H2=72 ساعت) (در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حرف مشابه هستند، اختلاف معنی‌داری ندارند)

بنابراین، شناسایی روش‌های جایگزین و افزایش بازده تولید تاکسول ضروری است، که عمدتاً به درک مسیر بیوسنتزی و ژن‌های دخیل در این مسیر بستگی دارد (Wang et al. 2021). یکی از مهم‌ترین ژن‌های مسیر سنتز تاکسول، ژن *ts* می‌باشد که در تحقیق حاضر به بررسی بیان این ژن پرداخته شده است. مطالعه‌ی حاضر بیان داشت که بهترین تیمار برای بیان ژن *ts* در ساقه درخت سرخدار، تیمار ۷۲ ساعته با غلظت ۲۵۰ میکرومولار متیل جاسمونات است. بر خلاف انتظار زمانی که زمان تیمار و غلظت الیستور افزایش داده شد، همواره شیب بیان ژن *ts* صعودی نبود که نشان دهنده‌ی وجود عوامل تنظیمی و تاثیر فاکتورهای محیطی و ژنتیکی مختلف بر مسیر تولید تاکسول است.

اسیدجاسمونیک و مشتقات آن یعنی متیل جاسمونات، تنظیم کننده‌های رشد درونی یا بازدارنده‌های رشد گیاه هستند که نقش کلیدی در رشد، نمو و پاسخ به تنش‌های محیطی ایفا می‌کنند. اثرات فیزیولوژیکی جاسمونات‌ها در گیاهان بسته به نوع گونه‌ی گیاهی، مرحله‌ی نمو، نوع جاسمونات و غلظت به کار رفته متفاوت است (Wang et al. 2020).

مطالعات نشان داده است که تیمار متیل جاسمونات در کشت سلولی شیرین بیان موجب افزایش بیان ژن بتا-آمرین سنتاز و در ادامه تولید ساپونین شده است (Hayashi et al. 2004). بررسی اثر تیمار متیل جاسمونات بر میزان بیان ژن بتا-آمرین سنتاز در گونه‌ی یونجه‌ی 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 نشان دهنده‌ی تاثیر متیل جاسمونات بر روی بیان نسبی این ژن می‌باشد (Suzuki et al. 2005).

متیل جاسمونات در گیاهان در پاسخ به عوامل زیستی و غیر زیستی موجب تأثیر بر روی عوامل رونویسی القا شونده با متیل جاسمونات (MJ-inducible transcription factor) شده و با مسیر ترانسکریپشنی علامت و با اثر بر روی ناحیه راه انداز ژن‌های مختلف، موجب افزایش بیان ژن‌های خاصی شده و در نتیجه با افزایش بیان ژن و افزایش سنتز پروتئین، متابولیت‌های ثانویه خاصی تولید می‌شود. تاکنون سه عامل رونویسی القا شونده با

متیل جاسمونات در گیاه سرخدار شناسایی شده است که شامل *TcJAMC1*، *TcJAMC2* و *TcJAMC4* می‌باشند. این فاکتورها با شناسایی جایگاه E-Box (با توالی CANNTG) بر روی ژن‌های مسیر بیوسنتز تاکسول و اعمال اثرات تنظیمی، باعث تنظیم بیان ژن‌های مورد نظر می‌شوند (Lenka et al. 2015). در مطالعه حاضر بیشترین میزان تاکسول با ۰/۳۰۷ میلی گرم بر گرم وزن خشک پس از ۷۲ ساعت تیمار با ۵۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات مشاهده شد. ولی برای تیمار ۲۵۰ میکرومولار متیل جاسمونات، با افزایش زمان اعمال، تولید تاکسول کاهش یافته است. نتایج حاصل نشان دهنده اثرات متفاوت متیل جاسمونات با غلظت‌های یکسان ولی در زمان‌های متفاوت می‌باشد. (2006) Nims et al. گزارش کردند که حداکثر میزان تولید تاکسول با ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات در روز هفتم به میزان ۳/۳ میلی گرم بر لیتر می‌باشد. در این مطالعه در ساعات اولیه، میزان تولید تاکسول بسیار کم بوده و با افزایش زمان، افزایش یافته است که به نظر می‌رسد با نتایج مطالعه حاضر مطابقت داشته باشد. در مطالعه حاضر با این که میزان متیل جاسمونات ثابت بوده ولی با افزایش زمان از ۴۸ ساعت به ۷۲ ساعت، میزان تولید تاکسول افزایش یافته است. (Lenka et al. 2012) در مطالعات خود بر روی میزان تولید تاکسول به این نتیجه رسیدند که بیشترین میزان تولید تاکسول پس از ۶-۳ روز از اعمال متیل جاسمونات صورت گرفته است. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که علی‌رغم 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 نیاز روزافزون به داروهای ضد سرطان و ترجیح داروهای با منشاء گیاهی، نیاز است تا روشی ارزان و با بازدهی بالا برای تولید این موارد ارزشمند از گیاهان فراهم آید که افزودن متیل جاسمونات به محیط گیاه به عنوان محرک می‌تواند یکی از این روش‌های جایگزین باشد. پیشنهاد می‌شود که بازه زمانی اعمال متیل جاسمونات تا ۲ هفته افزایش یابد تا اثرات این ماده بر روی بیان ژن‌های دخیل در سنتز تاکسول و همچنین تولید تاکسول به خوبی مشخص شود.

منابع

- Croteau R, Ketchum R. E, Long R. M, Kaspera R, Wildung M. R (2006) Taxol biosynthesis and molecular genetics. *Phytochemistry Reviews* 5:75-97.
- Ekor M (2014) The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Frontiers in pharmacology* 4 177.
- Fathi I, Majdi M, Maroufi A, Dastan D (2020) Expression pattern analysis of some genes involved in the biosynthetic pathway of terpenoids and phenylpropanoids in tissues, developmental stages and under methyl jasmonate treatment in yarrow (*Achillea millefolium* subsp. *millefolium*). *Cellular and Molecular Researches (Iranian Journal of Biology)* 33:87-102. (In Farsi).
- Gallego-Jara J, Lozano-Terol G, Sola-Martínez R. A, Cánovas-Díaz M, de Diego Puente T (2020) A compressive review about taxol®: History and future challenges. *Molecules* 25:5986.
- Hayashi H, Huang P, Takada S, Obinata M, Inoue K, Shibuya M, Ebizuka Y, (2004) Differential expression of three oxidosqualene cyclase mRNAs in *Glycyrrhiza glabra*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 27:1086-1092.
- Kai G, Zhao L, Zhang L, Li Z, Guo B, Zhao, D, Sun X, Miao Z, Tan K, 2005. Characterization and expression profile analysis of a new cDNA encoding taxadiene synthase from *Taxus media*. *Biochemistry and Molecular Biology Reports* 38:668-675.
- Lenka S.K, Boutaoui N, Paulose B, Vongpaseuth K, Normanly J, Roberts S.C. Walker E.L. (2012) Identification and expression analysis of methyl jasmonate responsive ESTs in paclitaxel producing *Taxus cuspidata* suspension culture cells. *BMC genomics* 13:1-10.
- Lenka S.K, Nims N.E, Vongpaseuth K, Boshar R.A, Roberts S.C, 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. *Frontiers in plant science* 6:115.
- Lichota A, Gwozdziński K (2018) Anticancer activity of natural compounds from plant and marine environment. *International journal of molecular sciences* 19:3533.
- Naill M.C. 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: 528-533.
- Nims E, Dubois C. P, Roberts S. C, Walker E. L (2006) Expression profiling of genes involved in paclitaxel biosynthesis for targeted metabolic engineering. *Metabolic engineering* 8:385-394.
- Onrubia M, Moyano E, Bonfill M, Cusidó R. M, Goossens A, Palazón J (2013) Coronatine, a more powerful elicitor for inducing taxane biosynthesis in *Taxus media* cell cultures than methyl jasmonate. *Journal of plant physiology* 170:211-219.
- Pan SY, Litscher G, Gao SH, Zhou SF, Yu ZL, Chen HQ, Ko KM (2014) Historical perspective of traditional indigenous medical practices: the current renaissance and conservation of herbal resources. *Evidence-based complementary and alternative medicine*.
- Pfaffl MW, Horgan GW, 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.
- Qiao W, Ling F, Yu L, Huang Y, Wang T (2017) Enhancing Taxol production in a novel endophytic fungus, *Aspergillus aculeatinus* Tax-6, isolated from *Taxus chinensis* var. *mairei*. *Fungal biology* 121:1037-1044.
- Suzuki H, Reddy M.S, Naoumkina M, Aziz N, May G.D, Huhman D.V, Sumner L.W, Blount J.W, Mendes P, Dixon R.A, (2005) Methyl jasmonate and yeast elicitor induce differential transcriptional and metabolic re-programming in cell suspension cultures of the model legume *Medicago truncatula*. *Planta* 220:696-707.
- Scholz M, Lipinski M, Leupold M, Luftmann H, Harig L, Ofir R, Müller K. J (2009) Methyl jasmonate induced accumulation of kalopanaxsaponin I in *Nigella sativa*. *Phytochemistry* 70:517-522.
- Wang J, Song L, Gong X, Xu J, Li M, (2020) Functions of jasmonic acid in plant regulation and response to abiotic stress. *International Journal of Molecular Sciences* 21:1446.
- Wang T, Li L, Zhuang W, Zhang F, Shu X, Wang N, Wang Z, (2021) Recent Research Progress in Taxol Biosynthetic Pathway and Acylation Reactions Mediated by *Taxus* Acyltransferases. *Molecules* 26:2855.
- Yukimune Y, Hara Y, Nomura E, Seto H, Yoshida S, (2000) The configuration of methyl jasmonate affects paclitaxel and baccatin III production in *Taxus* cells. *Phytochemistry* 54:13-17.
- Yukimune Y, Tabata H, Higashi Y, Hara Y, (1996) Methyl jasmonate-induced overproduction of paclitaxel and baccatin III in *Taxus* cell suspension cultures. *Nature biotechnology* 14:1129-1132.