



Synergistic effect of UV-A and Methyl Jasmonate on the Biosynthesis of Thymol and Carvacrol Metabolites in *Thymus*

Abyari M

Department of Science, Farhanghiyan University, Tehran, Iran. m.abiyari@cfu.ir

Original Article

Use your device to scan and read the article online



Citation: Abyari M. Synergistic effect of UV-A and Methyl Jasmonate on the Biosynthesis of Thymol and Carvacrol Metabolites in *Thymus*. Journal of Cell and Tissue. 2023; 13(4): 285–297.

<https://10.52547/JCT/13.4.285>

KEYWORDS

Thymus, Jasmonate, Ultraviolet light, Secondary metabolites

ABSTRACT

Aim: In thyme, thymol and carvacrol have attracted the attention of pharmacologists due to their various therapeutic properties such as anti-tumor activity. To date, a variety of treatments such as elicitors have been proposed to increase the content of thymol and carvacrol. This study was also conducted with the aim of evaluating the synergistic effect of UV-A ray and methyl jasmonate on the biosynthesis of thymol and carvacrol.

Material and Methods: Thyme seeds were planted in plastic pots at a factorial experiment in time with a completely randomized design with three replications under greenhouse conditions. The five-leaf seedlings were separately and simultaneously irradiated with UV-A and sprayed with 0.1 mM methyl jasmonate. After 24 and 48 h of treatment, the expression levels of *GTS*, *DXR*, *CYP180*, and *CYP178* genes were measured by Real-Time PCR and the metabolite levels were measured by HPLC.

Results: The expression of *GTS*, *DXR*, *CYP180*, and *CYP178* genes was affected by the synergistic impact of methyl jasmonate and UV-A. The transcript level of these genes increased significantly after 24 h of individual treatments and this increase was more in the combined treatment of hormone and radiation. However, the expression of these genes was linked with a significant decrease after 48 h of treatment. The increasing and decreasing trend of thymol and carvacrol content in the elicitor treatments was also in accordance with the expression of studied genes.

Conclusion: Our observations suggest that thyme uses synergistic signaling to increase its metabolite levels during the first 24 h of hormone and radiation treatments. And after that, other defense mechanisms are activated and then the level of secondary metabolites decreases.

* Corresponding author. . Tel.: +98-9142256346; Fax: +98-9142256346

E-mail address: m.abiyari@cfu.ir

DOI: <https://10.52547/JCT/13.4.285>

Received: August 28, 2022; Received in revised form: December 17, 2022; Accepted: December 28, 2022





اثر هم‌افزایی اشعه UV-A و متیل جاسمونات بر بیوسنتز متابولیت‌های تیمول و کارواکرول در گیاه داروئی آویشن

محمد آبیاری

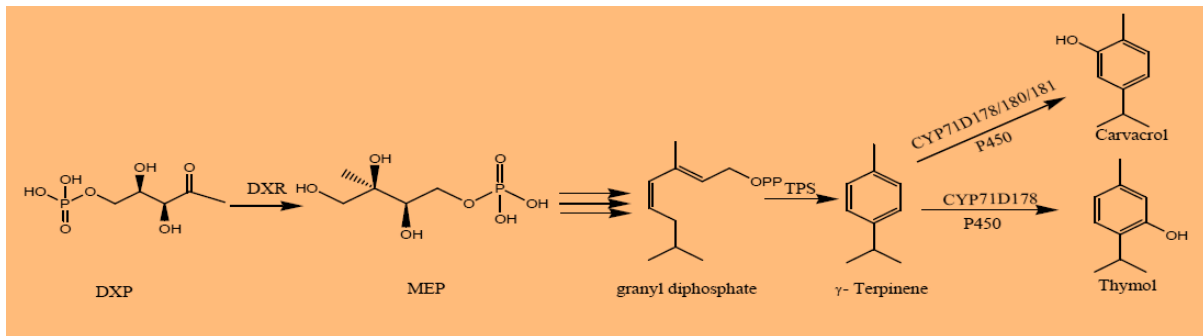
استادیار، گروه علوم پایه، دانشگاه فرهنگیان، تهران، ایران. ایمیل: m.abiyari@cfu.ir

چکیده	واژگان کلیدی
<p>هدف: در آویشن، تیمول و کارواکرول به دلیل برخورداری از خواص درمانی متنوعی نظیر ضد تومور مورد توجه فارماکولوژیست‌ها قرار گرفته‌اند. تاکنون، طیف متنوعی از تیمارها مثل الیسیتورها برای افزایش محتوی تیمول و کارواکرول پیشنهاد شده‌اند. این پژوهش نیز با هدف ارزیابی اثر هم‌افزایی اشعه UV-A و متیل جاسمونات بر بیوسنتز تیمول و کارواکرول صورت گرفت.</p> <p>مواد و روش‌ها: بذور آویشن در آزمایش فاکتوریل در زمان با طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار تحت شرایط گلخانه‌ای در گلدان‌های پلاستیکی کاشته شدند. گیاهچه‌های پنج‌برگی به‌طور جداگانه و هم‌زمان با UV-A پرتودهی و با متیل جاسمونات ۰/۱ میلی‌مولار محلول‌پاشی شدند. بعد از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت از اعمال تیمارها، سطح بیان ژن‌های GTS، DXR، CYP180 و CYP178 با Real-Time PCR و سطح متابولیت‌ها با HPLC اندازه‌گیری شد.</p> <p>نتایج: بیان ژن‌های GTS، DXR، CYP180 و CYP178 تحت تاثیر هم‌افزایی متیل جاسمونات و UV-A قرار گرفت. سطح رونوشت این ژن‌ها بعد از گذشت ۲۴ ساعت از اعمال جداگانه تیمارها به‌طور معنی‌داری افزایش یافت و این افزایش در تیمار ترکیبی هورمون و اشعه بیشتر بود. با این حال، بیان این ژن‌ها بعد از گذشت ۴۸ ساعت از اعمال تیمارها با کاهش معنی‌داری همراه بود. روند افزایشی و کاهش‌ی محتوی تیمول و کارواکرول در تیمار الیسیتورها نیز مطابق با بیان ژن‌های مورد مطالعه بود.</p> <p>نتیجه‌گیری: مشاهدات ما پیشنهاد می‌کند که آویشن در ۲۴ ساعت اول تیمار هورمون و اشعه، از هم‌افزایی پیام‌رسانی به‌منظور افزایش سطح متابولیت‌های خود استفاده می‌کند و بعد از آن، سازوکارهای دفاعی دیگر فعال می‌شوند و سطح متابولیت‌های ثانویه کاهش می‌یابد.</p>	<p>آویشن، جاسمونات، اشعه فرابنفش، متابولیت‌های ثانویه</p> <p>تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۶/۰۶</p> <p>تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۰۹/۲۶</p> <p>تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۰۷</p>

۱- مقدمه

آویشن (*Thymus vulgaris*) به‌عنوان یکی از گونه‌های مهم تیره نعناعیان، در نواحی مختلف آسیا و مدیترانه می‌روید و در مناطق مختلف جهان منجمله ایران کشت‌وکار می‌شود. این گیاه دارویی حاوی ۰/۸ تا ۲/۶ درصد اسانس می‌باشد که بخش بیشتر آن را الکل‌ها، هیدروکربن‌ها و فنل‌ها تشکیل می‌دهند (۱). اسانس آویشن در صنایع بهداشتی، آرایشی و دارویی و برگ‌های آن در فرآورده‌های غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد. روغن این گیاه دارای خواصی نظیر تاخیردهنده پیری، نگه‌دارنده طبیعی غذا، آنتی‌اکسیدانت، خلط‌آور، ضد‌ماتیسیم، ضد‌کرم، ضد‌عفونی‌کننده، ضد‌باکتریایی، ضد‌قارچی، بادشکن و ضد‌اسپاسم است (۲). براساس پژوهش‌های درون‌پیکری و درون‌شیشه‌ای، این ویژگی‌های درمانی به‌حضور برخی از ترکیبات فعال نظیر تیمول و کارواکرول نسبت داده می‌شوند (۱). با توجه به این موضوع، تحقیقات روز افزونی به‌سوی درک جنبه‌های مولکولی تنظیم و بیوسنتز ایندول آلکالوئیدهای تیمول و کارواکرول متمایل شده‌اند به‌طوری‌که طیف متنوعی از موضوعات، از شناسایی مسیر بیوسنتز و عوامل تنظیمی آن تا تعیین مکانیسم‌های اثرگذاری درمانی، را در بر می‌گیرند (۲).

سنتز تیمول و کارواکرول نیازمند هفت واکنش آنزیمی مرتبط با هم است (شکل ۱). نخست، پیش‌ماده ترپنوئیدها یعنی دی‌اکسی زایلوز ۵-فسفات (DXP) از طریق ترکیب پیرووات و دی‌گلسیر آلدهید ۳-فسفات با یکدیگر و پس از پشت‌سرگذاری واکنش‌های بیوشیمیایی لازم تولید می‌شود. ترکیب حد واسط بعدی یعنی ۲ سی متیل اریتریتول ۴-فسفات (MEP) توسط آنزیم ۱ دی‌اکسی زایلوز ۵-فسفات ردکتوایزومراز (DXR) از سوپسترای DXP به‌وجود می‌آید. در ادامه، ژرانیل ۲-فسفات (GP) بعد از پشت‌سرگذاری واکنش‌های بیوشیمیایی از MEP حاصل می‌شود. گام‌ترپینین نیز توسط گام‌ترپینین سنتاز (GST) از ترکیب GP تولید می‌شود. اکنون، تیمول و کارواکرول به‌کمک سیتوکروم‌های P450 (CYP178 و CYP180) از پیش‌ماده گام‌ترپینین ایجاد می‌شوند (۳).



شکل ۱: مسیر بیوسنتز تیمول و کارواکرول (۳).

کاربرد ایسیتورها یکی از رویکردهای مهم بیوتکنولوژیست‌ها جهت القای تولید متابولیت‌های ثانویه و افزایش بازدهی این ترکیبات فعال و با ارزش تجاری می‌باشد. ایسیتورها بر حسب ماهیت به دو دسته زیستی (اسیدهای چرب نام، گلیکوپروتئین‌ها، الیگوساکاریدها، ترکیبات پلی ساکاریدی دیواره سلولی و عصاره مخمر) و غیرزیستی (ترکیبات شیمیایی، پرتوهای فرابنفش و فلزات سنگین) تقسیم می‌شوند (۴). ایسیتورها از طریق فعال‌سازی سازوکارهای دفاعی منجر به القای تولید ترکیبات فعال‌زیستی و اعمال پاسخ‌های دفاعی سلول‌های گیاهی مثل سنتز فیتوالکسین‌ها، تغییرات ساختاری در دیواره

سلولی، بیان ژن‌های دفاعی، تولید گونه‌های فعال اکسیژن، افزایش جریان‌های یونی از غشای پلاسمایی و سنتز اسیدسالیسیک و اسید جاسمونیک به‌عنوان پیک‌های ثانویه می‌شوند (۵). الیسیتورها همچنین باعث افزایش طول و وزن ساقه و ریشه و متعاقباً رشد گیاه می‌شوند (۵). در نتیجه، تشخیص مولکولی الیسیتورها و برهمکنش آن‌ها با گیرنده‌های گیاه تا مکانیزم تاثیرگذاری آن‌ها بر مسیرهای بیوسنتزی و تجزیه‌ای متابولیت‌های ثانویه از جمله زمینه‌های تحقیقاتی جذاب در حوزه الیسیتورها و کشت بافت گیاهی است (۶).

اسیدجاسمونیک و مشتقات آن از جمله متیل‌جاسمونات، به‌عنوان الیسیتور و تنظیم‌کننده رشد گیاهی شناخته می‌شوند که در نقش پیام‌رسان طی پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی ایفای نقش می‌کنند (۷). تاثیر اسید جاسمونیک بر فرایندهای فیزیولوژیکی گیاهان وابسته به‌نوع مشتقات جاسمونات و غلظت به‌کاررفته، گونه گیاهی و مرحله نموی می‌باشد (۸). تاکنون، مطالعات محدودی در حیطه محلول‌پاشی اسیدجاسمونیک و ردیابی اثرات آن بر ویژگی‌های کیفی و کمی گیاهان دارویی صورت گرفته است (۹). در یک مطالعه، Yang و همکاران (۱۰) نشان دادند که کاربرد متیل‌جاسمونات سبب افزایش تانن‌ها در گیاه دارویی *Salvia miltiorrhiza* می‌شود. Chen و همکاران (۱۱) نیز نشان دادند که اشعه UV-A به‌طور قابل ملاحظه‌ای تجمع متابولیت‌های ثانویه را افزایش می‌دهد به‌طوری‌که محتوای آنتوسیانین و اسکوربیک اسید به‌ترتیب تا ۴۰ و ۸۰ درصد افزایش یافت (۱۱). نویسندگان افزایش تولید این ترکیبات را به تحریک مسیرهای پیام‌رسانی وابسته به رادیکال‌های آزاد نسبت دادند. Mumivand و همکاران (۱۲) نیز مشاهده کردند که تیمار UV-A سبب افزایش محتوای لینالول در گیاه آویشن می‌شود به‌طوری‌که مقدار این متابولیت تا ۵۰ درصد افزایش یافت. علاوه بر ترکیبات شیمیایی نظیر اسید جاسمونیک، پژوهش‌های سال‌های گذشته گویای نقش اشعه UV-A در تنظیم ترکیب و نوع متابولیت‌های متابولوم گیاهان است به‌طوری‌که محققان متوجه شده‌اند که از ۳۰۰ گونه گیاهی مورد مطالعه، حدود ۵۰ درصد حساس، حدود ۳۰ درصد حساسیت متوسط و مابقی غیرحساس به تابش UV-A هستند (۱۳). در آزمایشی دیگر، Victório و همکاران (۱۴) نشان دادند که کاربرد UV-A سبب افزایش ژرانین و الاژیک اسید در گیاه دارویی *Phyllanthus tenellus* می‌شود. Kim و همکاران (۱۵) نیز نشان دادند استفاده از تیمار UV-A منجر به افزایش سطح متابولیت ثانویه رزماریک اسید در گیاه دارویی ریحان می‌شود. نویسندگان پیشنهاد کردند که تابش UV-A با فعال‌سازی گیرنده غشائی اختصاصی و سپس به راه‌انداختن آبشار پیام‌رسانی وابسته به رادیکال‌های آزاد منجر به افزایش سطح رزماریک اسید تا ۲ برابر می‌شوند. اگرچه اثرات اسید جاسمونیک و اشعه فرابنفش به‌طور مجزا بر تجمع ترکیبات فعال زیستی در گیاهان دارویی مورد ارزیابی قرار گرفته است (۱۳، ۱۰، ۱۴)، با این حال پاسخ هم‌افزایی گیاهان به حضور هر دو این الیسیتورها هنوز مورد مطالعه قرار نگرفته است.

بنابر آنچه گفته شد، اهمیت متابولیت‌های تیمول و کارواکرول در گیاهان دارویی نظیر آویشن و نقش ژن‌های کلیدی DXR، GTS، CYP178 و CYP180 در تولید این دو ترکیب بالارزش از یک سو، و پتانسیل متیل‌جاسمونات و UV-A در القای تولید متابولیت‌های ثانویه از سوی دیگر، ما را به این مطالعه رهنمود کرد که اثر هم‌افزایی اشعه فرابنفش UV-A و متیل‌جاسمونات بر بیوسنتز تیمول و کارواکرول را مورد ارزیابی قرار دهیم.

۲- مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و تیمار آزمایشی: بذره‌های آویشن تهیه‌شده از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی ایران تحت شرایط گلخانه‌ای با رطوبت نسبی ۶۰ درصد، فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، دمای ۲۵ درجه‌سانتی‌گراد روز، دمای ۲۰ درجه‌سانتی‌گراد روز در گلدان‌های پلاستیکی حاوی خاک‌برگ، خاک، ماسه با نسبت ۱:۲:۳ در قالب آزمایش فاکتوریل دوعاملی در زمان با سه

تکرار کاشته شدند. در مرحله پنج‌برگی، متیل‌جاسمونات با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار بر روی برگ‌های آویشن محلول‌پاشی شد (۱۰). همزمان با تیمار متیل‌جاسمونات، اشعه فرابنفش از طریق در معرض قراردادن گیاهیچه‌ها با لامپ‌های UV-A (۳۶۵ نانومتر) به مدت ۲۰ دقیقه اعمال شد (۱۴). جهت اطمینان از صحت تیمار اشعه، لامپ‌های UV-A (۳۶۵ نانومتر) ۴۰ وات در جعبه‌های شیشه‌ای در فاصله ۳۰ سانتی‌متری از گیاهیچه‌ها قرار گرفتند تا تعادل مابین پوشش گیاهیچه و آسیب پرتوی رعایت شود. ضمناً، از برگ‌های بالایی گیاهیچه‌ها برای نمونه‌برداری استفاده شد تا از تیمار برگ با اشعه UV-A اطمینان حاصل شود. نمونه‌گیری در ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از اعمال تیمار انجام گرفت. گیاهان شاهد با تابش نور معمولی تحت تیمار و با آب مقطر استریل تحت محلول‌پاشی قرار گرفتند. نمونه‌های گیاهی از برگ جوان کاملاً توسعه‌یافته در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد در فریزر نگهداری شدند تا متعاقباً اندازه‌گیری‌های بیان ژن بر روی آن‌ها انجام شود.

استخراج DNA و سنتز cDNA با استفاده از روش ترايزول، محتوی RNA از نمونه‌های برگی آویشن استخراج شد (۱۶). جهت نیل به این هدف، ۱ میلی‌لیتر ترايزول به ازای ۰/۱ گرم بافت برگی استفاده شد. به منظور دسترسی به RNA خالص و عاری از DNA، نمونه‌های RNA با آنزیم DNaseI تیمار شدند تا مولکول‌های تجزیه DNA شوند. غلظت RNA به دست‌آمده توسط دستگاه نانودراپ در طول موج‌های ۲۸۰ و ۲۶۰ نانومتر و کیفیت آن نیز به کمک ژل آگارز ۱/۲ درصد تعیین شد. از کیت سنتز cDNA (سیناژن) مطابق دستورالعمل شرکت در راستای سنتز DNA مکمل (cDNA) استفاده شد.

طراحی آغازگرها و Real-Time PCR: از اطلاعات ژنی NCBI و نرم‌افزار Primer3 برای طراحی آغازگرهای مربوط به ژن‌های DXR، GTS، CYP178 و CYP180 استفاده شد (جدول ۱). سه نمونه RNA از هر تکرار بیولوژیکی باهم ادغام شدند تا خزانه RT-PCR را تشکیل دهند. برای هر خزانه نیز سه تکرار تکنیکی لحاظ شد و از میانگین آن‌ها برای برآورد فراوانی نسبی رونوشت‌ها استفاده شد. واکنش RT-PCR شامل ۳ میکرولیتر SYBR Green (5X)، ۲ میکرولیتر cDNA (1 µg/µl)، ۱ میکرولیتر Primer F (10 pmol/µl)، ۱ میکرولیتر Primer R (10 pmol/µl) و ۱۵ میکرولیتر ddH₂O بود که بعد از رقیق‌سازی به ۱۰۰ میکرولیتر، از ۵ میکرولیتر آن به‌عنوان الگو برای اجرای واکنش استفاده شد. جهت اندازه‌گیری بیان ژن‌های DXR، GTS، CYP178 و CYP180 از 18s-rRNA به‌عنوان کنترل داخلی یا ژن مرجع استفاده شد.

جدول ۱: مشخصات آغازگرهای مورد استفاده جهت بررسی بیان ژن

نام آغازگر	توالی آغازگر (۳→۵)	دمای اتصال
F-CYP178	TGGCCTTTGGAAGCGTCG	~۵۹
R-CYP178	TCAGGCTCATTCCAATAGAGG	
F-CYP180	GGTAAACTGGCGGACTTGGT	~۶۰
R-CYP180	CGAACGGGATTAACCTGAAA	
F-GTS	CTCTTGGATCAGACTCCTCAG	~۶۱
R-GTS	GAGGGAGAGCCAAAGAATG	
F-DXR	GCCTTTTGTCTTCTCTTG	~۶۱
R-DXR	TCCGCTCGATGCTTGTCCG	
18s-F	ATGTTTAGAAGGGTGAGTGAGCAGTTTAC	~۶۰
18s-R	GCCTCATCATCATACTTCTCATCATC	

۲- آنالیز داده‌ها

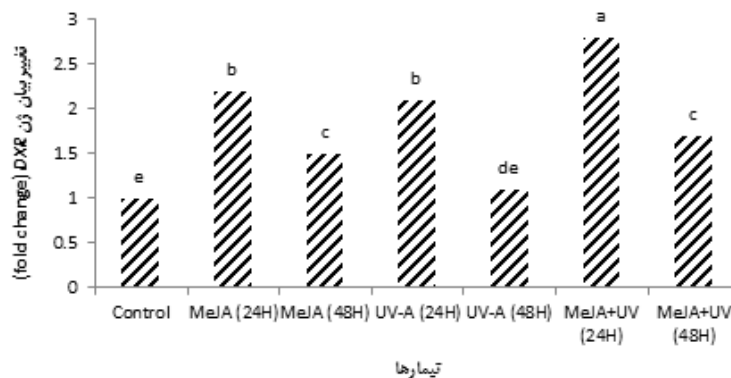
مقدار CT هر نمونه برای هر کدام از ژن‌ها به وسیله نرم‌افزار Line Gene K تعیین شد. تغییرات کمی بین نمونه‌ها به کمک رویکرد کمی‌سازی نسبی $\Delta\Delta CT$ تعیین شد (۱۶). جهت تجزیه آماری داده‌ها بر مبنای آزمایش فاکتوریل دو عاملی در زمان، آنالیز واریانس و مقایسات میانگین بین تیمارها با آزمون دانکن در نرم‌افزار SAS انجام شد. از برنامه Excel 2010 نیز به منظور ترسیم نمودارهای حاصل از آنالیز بیان ژن‌ها استفاده شد.

اندازه‌گیری محتوی تیمول و کارواکول: جهت تعیین غلظت تیمول و کارواکول در برگ‌های آویشن، کروماتوگرافی مایع با کار آبی بالا HPLC انجام شد. جهت آماده‌سازی برای عصاره‌گیری، نخست نمونه‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و تاریکی خشک شده و سپس ۰/۵ گرم بافت خشک خرد شده با ۲۵ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد ترکیب شد. بعد از فرایند استخراج در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت بر روی شیکر، محلول به دست آمده با کاغذ صافی واتمن فیلتر شد. بعد از سانتریفیوژ با دور ۴۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه، محلول کاملاً شفاف توسط دستگاه تبخیرکننده چرخان خشک شد. از هر نمونه، محلول استوک (۱۰۰۰ پی پی ام) توسط حلال متانول تهیه شد که این محلول‌ها برای سنجش غلظت تیمول و کارواکول به کار گرفته شدند. در ادامه، ۵۰ میکرولیتر از عصاره به دستگاه HPLC (مجهز به آشکارساز UV و ستون C18 با اندازه ذرات ۵ میکرومتر، قطر ۴ میلی‌متر و طول ۲۵۰ میلی‌متر) تزریق شد. سنجش کارواکول و تیمول در طول موج ۲۸۰ نانومتر صورت گرفت. برای آنالیز کمی ترکیبات، بعد از تزریق محلول‌های استاندارد با غلظت‌های مشخص و به حصول سطح زیر پیک هر کدام، منحنی کالیبراسیون هر ترکیب رسم شد و توسط معادله خطی منحنی کالیبراسیون، مقدار هر ترکیب در عصاره‌های آویشن برآورد شد (۱۰).

۳- نتایج

بیان ژن DXR تحت تاثیر اشعه UV-A و هورمون متیل‌جاسمونات

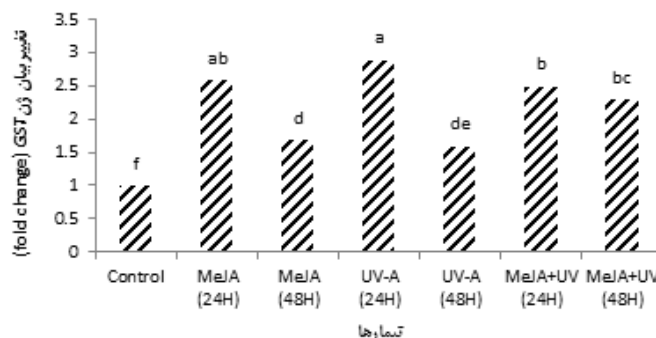
بیان ژن رمزگردان آنزیم DXR که در تولید متیل اریتریتول ۴-فسفات (MEP) از دی‌اکسی زایلوز ۵-فسفات (DXP) ایفای نقش می‌کند، به طور معنی‌داری بر اثر تیمار الیسیتورهای متیل‌جاسمونات و UV-A افزایش یافت (شکل ۲). بعد از ۲۴ ساعت، بیان ژن DXR در تیمار متیل‌جاسمونات، UV-A و تیمار ترکیبی آن‌ها به ترتیب ۲/۲، ۲/۱ و ۲/۸ برابر نسبت به کنترل افزایش یافت. اما بیان این ژن بعد از گذشت ۴۸ ساعت از تیمار متیل‌جاسمونات، UV-A و تیمار ترکیبی آن‌ها به ترتیب ۳۲، ۴۸ و ۳۹ درصد نسبت به روز قبل کاهش یافت.



شکل ۲: بیان ژن DXR پس از اعمال اشعه UV-A و هورمون متیل‌جاسمونات. حروف یکسان گویای عدم تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد با آزمون دانکن است.

بیان ژن GST تحت تاثیر اشعه UV-A و هورمون متیل جاسمونات

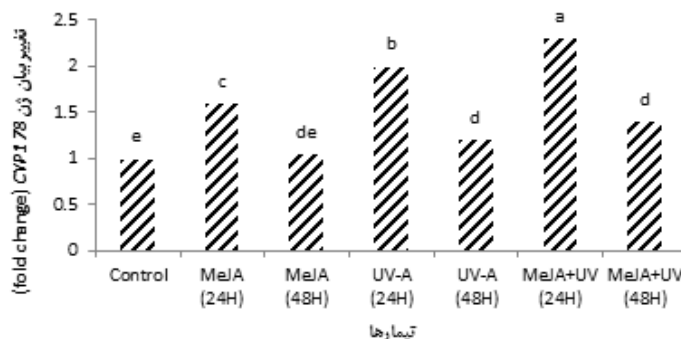
بیان ژن گاماترپین سنتاز (GST) که تولید گاماترپین از ژرانیل ۲-فسفات (GP) را کاتالیز می‌کند، به‌طور معنی‌داری بر اثر تیمار الیسیتورهای متیل جاسمونات و تابش اشعه UV-A افزایش یافت (شکل ۳). در ۲۴ ساعت پس از شروع تیمار، بیان این ژن توسط متیل جاسمونات و UV-A به ترتیب ۲/۶ و ۲/۹ برابر نسبت به کنترل افزایش یافت. با اینحال، بعد از گذشت ۴۸ ساعت، بیان ژن GST توسط متیل جاسمونات و UV-A به ترتیب ۳۴ و ۴۵ درصد نسبت به روز قبل کاهش یافت. تیمار ترکیبی باعث افزایش بیان GST شد؛ با این حال، اختلاف معنی‌داری مابین ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اعمال ترکیبی متیل جاسمونات و UV-A وجود نداشت.



شکل ۳: بیان ژن GST پس از اعمال اشعه UV-A و هورمون متیل جاسمونات. حروف یکسان گویای عدم تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد با آزمون دانکن است.

بیان ژن CYP178 تحت تاثیر اشعه UV-A و هورمون متیل جاسمونات

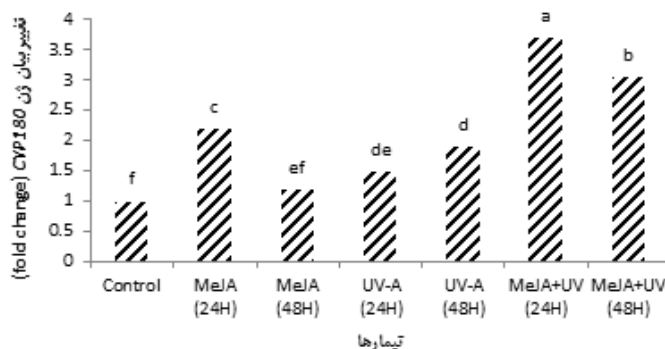
بر اثر تیمار الیسیتورهای متیل جاسمونات و UV-A، سطح رونوشت ژن CYP178 که واکنش تولید تیمول از گاماترپین را کاتالیز می‌کند، به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (شکل ۴). بعد از گذشت ۲۴ ساعت، بیان ژن CYP178 در تیمار متیل جاسمونات، UV-A و تیمار ترکیبی آن‌ها به ترتیب ۱/۶، ۲/۱۰ و ۲/۳ برابر نسبت به کنترل افزایش یافت. با این حال، بیان این ژن بعد از گذشت ۴۸ ساعت از تیمار متیل جاسمونات، UV-A و تیمار ترکیبی آن‌ها به ترتیب ۳۳، ۴۰ و ۳۰ درصد نسبت به روز قبل کاهش یافت.



شکل ۴: بیان ژن CYP178 پس از اعمال اشعه UV-A و هورمون متیل جاسمونات. حروف یکسان گویای عدم تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد با آزمون دانکن است.

بیان ژن CYP180 تحت تاثیر اشعه UV-A و هورمون متیل‌جاسمونات

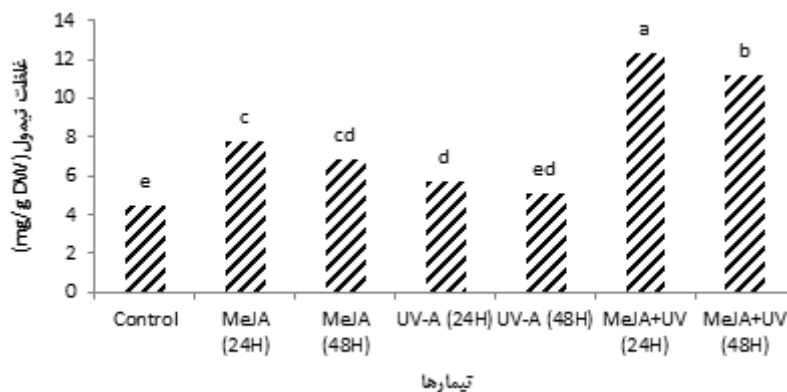
بر اثر تیمار الیسیتورهای متیل‌جاسمونات و UV-A، سطح رونوشت ژن CYP180 که واکنش تولید کارواکرول از گام‌ترین را کاتالیز می‌کند، به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (شکل ۵). بعد از گذشت ۲۴ ساعت، بیان ژن CYP180 در تیمار متیل‌جاسمونات، UV-A و تیمار ترکیبی آن‌ها به ترتیب ۱/۶، ۲/۰ و ۲/۳ برابر نسبت به کنترل افزایش یافت. با این حال، بیان این ژن بعد از گذشت ۴۸ ساعت از تیمار متیل‌جاسمونات، UV-A و تیمار ترکیبی آن‌ها به ترتیب ۳۳، ۴۰ و ۳۰ درصد نسبت به روز قبل کاهش یافت.



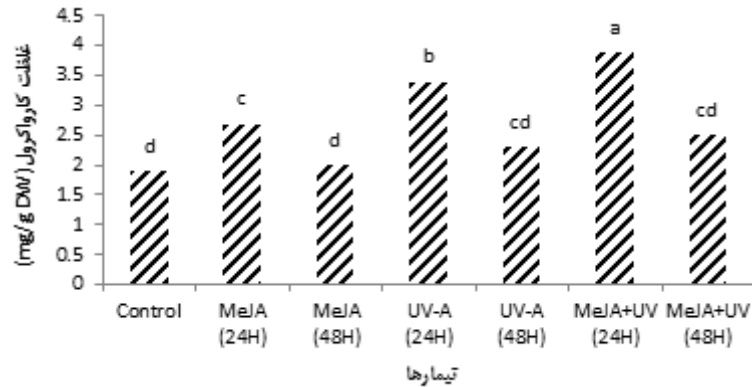
شکل ۵: بیان ژن CYP180 پس از اعمال اشعه UV-A و هورمون متیل‌جاسمونات. حروف یکسان گویای عدم تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد با آزمون دانکن است.

غلظت ترکیبات تیمول و کارواکرول تحت تاثیر اشعه UV-A و هورمون متیل‌جاسمونات

نتایج این آزمایش نشان داد که غلظت ترکیبات فنولی تیمول و کارواکرول به‌شدت متأثر از هم‌افزایی دو الیسیتور غیژیستی UV-A و متیل‌جاسمونات قرار گرفت به‌گونه‌ای که غلظت تیمول و کارواکرول در ترکیب تیماری بعد از گذشت ۲۴ ساعت، به ترتیب ۱/۷ و ۱/۰۵ برابر نسبت به شاهد بود و بعد از ۴۸ ساعت با کاهش همراه بود (شکل ۶ و ۷).



شکل ۶: غلظت تیمول پس از اعمال اشعه UV-A و هورمون متیل‌جاسمونات. حروف یکسان گویای عدم تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد با آزمون دانکن است.



شکل ۷: غلظت کارواکرول پس از اعمال اشعه UV-A و هورمون متیل جاسمونات. حروف یکسان گویای عدم تفاوت معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد با آزمون دانکن است.

همبستگی غلظت متابولیت‌ها و بیان ژن‌های درگیر در بیوسنتز تیمول و کارواکرول

نتایج این آزمایش نشان داد که همبستگی معنی داری مابین غلظت متابولیت‌ها و بیان ژن‌های درگیر در بیوسنتز تیمول و کارواکرول وجود دارد به طوری که بیان ژن‌های DXR و GTS دارای رابطه مثبت و معنی داری با غلظت تیمول و کارواکرول بودند. در حالی که، بیان ژن CYP178 فقط با غلظت تیمول رابطه مثبت معنی داری داشت. به طور مشابهی، بیان ژن CYP180 فقط با غلظت کارواکرول رابطه مثبت معنی داری داشت و با غلظت تیمول رابطه معنی داری نشان نداد (جدول ۲).

جدول ۲: همبستگی غلظت متابولیت‌ها و بیان ژن‌های درگیر در بیوسنتز تیمول و کارواکرول

بیان ژن CYP180	بیان ژن CYP178	بیان ژن GTS	بیان ژن DXR	
۰/۲۷	۰/۸۷*	۰/۷۱*	۰/۶۵*	تیمول
۰/۷۴*	۰/۲۳	۰/۶۳*	۰/۵۹*	کارواکرول

۴- بحث

تاکنون، تکنیک‌های مختلفی به منظور افزایش تولید ترکیبات فعال و متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارویی اتخاذ شده است که در این میان، استفاده از الیسیتورهای زیستی و غیرزیستی به خاطر تنوع و سهولت به طور چشمگیری در کشت بافت و حتی در گلخانه و مزرعه مورد توجه قرار گرفته‌اند (۱۷). هرچند گزارشاتی در خصوص کاربرد جداگانه متیل جاسمونات و UV-A به منظور القای بیوسنتز ترکیباتی همچون ترپنوئیدها در گیاهان مختلف منتشر شده است (۱۸، ۱۹)، با این حال اثر هم‌افزایی آن‌ها بر مسیرهای بیوسنتزی هنوز ناشناخته مانده است.

متیل‌جاسمونات از کارآمدترین الیستورهای شیمیایی به شمار می‌رود که با مسیر پیام‌رسانی اختصاصی خود منجر به افزایش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیا لیاژ و متعاقبا القای مسیر فنیل‌پروپانوئیدی می‌شود که پیامد آن، افزایش محتوای متابولیت‌های فنلی می‌باشد (۱۶ و ۲۰). یک روز بعد از تیمار، بیان ژن‌های DXR، GTS، CYP178 و CYP180 افزایش معنی‌داری داشت و با گذشت زمان، روند کاهشی در پیش‌گرفت. با توجه به رابطه مستقیم بین بیان ژن‌های کلیدی یادشده و فرآورده‌های حاصل از آن‌ها یعنی تیمول و کارواکرول، به‌نظر می‌رسد که زمان ایده‌آل تیمار متیل‌جاسمونات جهت افزایش تولید این دو ترکیب، ۲۴ ساعت بعد از اعمال تیمار متیل‌جاسمونات باشد. همراستا با یافته‌های ما، Ruiz-May و همکاران (۲۱) نشان دادند که تیمار متیل‌جاسمونات در گیاه دارویی *Catharanthus roseus* سبب افزایش چشمگیر آلکالوئیدهای ایندول‌ترین می‌شود (۲۱). در پژوهشی دیگر، Gadzovska و همکاران (۲۲) با به‌کارگیری متیل‌جاسمونات بر روی گیاه دارویی *Hypericum perforatum* نشان دادند که آلکالوئیدها و فنیل‌پروپانوئیدها به‌طور قابل‌توجهی پس از اعمال تیمار در مقایسه با گیاهان شاهد افزایش پیدا کردند. با مقایسه مشاهدات ما با سایر محققان (۲۳-۳۰)، می‌توان پیشنهاد کرد که تیمار متیل‌جاسمونات سبب افزایش بیان ژن‌های درگیر در بیوسنتز تیمول و کارواکرول خواهد شد که این امر به نوبه خود راه را برای افزایش تولید تیمول و کارواکرول فراهم می‌کند. به‌نظر می‌رسد که متیل‌جاسمونات با اتصال به پروتئین‌های گیرنده واقع بر روی غشا و متعاقبا القای آبشار پیام‌رسانی وابسته به گونه‌های فعال اکسیژن سبب فعالسازی فاکتورهای رونویسی می‌شود که مسئولیت بیان ژن‌های درگیر در بیوسنتز تیمول و کارواکرول را برعهده دارند (۱۵).

امواج نوری نظیر فرابنفش به‌طریق مختلف بر فرایندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی تاثیر می‌گذارند. یکی از ساز و کارهای درگیر در تاثیر تابش فرابنفش بر متابولوم گیاهان، متاثرسازی نسبت‌های هورمونی است. برای مثال، اکسین یکی از هورمون‌های هدف اشعه فرابنفش است که بر اثر تابش طولانی تخریب می‌شود و بدین ترتیب نسبت اکسین به سیتوکینین و متعاقبا برخی از ویژگی‌های رشدی گیاه دچار تغییر می‌شود (۱۳). یکی دیگر از ساز و کارهای عمل فرابنفش، مشابهت رفتاری با نور آبی است. از آنجایی که گیرنده‌های نور آبی و فرابنفش یکسان است، لذا فرابنفش در طول موج نزدیک به آبی شبیه به آن عمل می‌کند و بدین ترتیب سبب افت رشد گیاه و افزایش متابولیت‌های آن می‌شود (۱۴). به‌عنوان ساز و کار بعدی، حساسیت برخی آنزیم‌ها (همچون انواع درگیر در تولید آنتوسیانین‌ها) به فرابنفش را می‌توان نام برد که به‌شدت و زمان اشعه فرابنفش پاسخ می‌دهند و از این طریق بر سطح متابولیت‌های گیاهان اثر می‌گذارند (۲۰). در تحقیق اخیر، اثر اشعه UV-A بر بیان ژن‌های DXR، GTS، CYP178 و CYP180 مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاکی از این بود که سطح رونوشت آن‌ها به‌طور معنی‌داری تحت تاثیر اشعه قرار گرفت. در توافق با یافته‌های ما، Victório و همکاران (۱۴) نشان دادند که کاربرد UV-A سبب افزایش ژرانین و الاژیک اسید در گیاه دارویی *Phyllanthus tenellus* می‌شود (۱۴). در تحقیق دیگر، Rai و همکاران (۲۰) نشان دادند که استفاده از UV-A منجر به افزایش آرتیمیزین در گیاه آرتیمیزیا می‌شود. روی هم‌رفته، مشاهدات ما در کنار گزارشات قبلی حاکی از نقش بالقوه اشعه UV-A در افزایش تولید تیمول و کارواکرول می‌باشد. به‌نظر می‌رسد که تابش اشعه UV-A سبب فعالسازی مسیرهای پیام‌رسانی القا شونده با UV می‌شود که به‌نوبه خود فاکتورهای رونویسی دخیل در بیان ژن‌های بیوسنتز تیمول و کارواکرول را فعال می‌کنند (۳۰، ۳۱). البته هنوز مکانیزم‌های دقیق درگیر در افزایش بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه با تابش UV-A معلوم نشده است.

تاثیر هم‌افزایی متیل‌جاسمونات و UV-A در افزایش سطح دو ترکیب فنلی مهم یعنی تیمول و کارواکرول گویای پتانسیل بالای مسیر پیام‌رسانی متیل‌جاسمونات و مسیر پاسخ به آسیب‌های ناشی از UV-A در القا و تولید متابولیت‌هایی ثانویه‌ای است که از گیاه به هنگام شرایط نامطلوب محیطی حفاظت به‌عمل می‌آورند (۱۰، ۱۴). بنابراین از این پتانسیل می‌توان به‌منظور افزایش بازدهی تولید ترکیبات فعال در گیاهان دارویی بهره برد.

در رابطه با مکانیزم‌های پشت‌پرده این تاثیرگذاری ایسیتورها بر محتوی ترکیبات فنولی می‌توان گفت که ایسیتورها سبب بروز آرایه‌ایی از واکنش‌های دفاعی نظیر تجمع مجموعه‌ای متنوعی از متابولیت‌های ثانویه دفاعی در گیاه می‌شوند. هرچند مکانیسم دقیق این تاثیرگذاری به‌خوبی شناخته نشده است، با این حال پیشنهاد شده است که مکانیسم‌هایی مختلفی در این پدیده دخالت دارند. برخی محققان اعتقاد دارند که نخست ایسیتورهایی مثل جاسمونات به گیرنده‌های غشای پلاسمایی متصل می‌شوند و سپس آبشارهای پیام‌رسانی را فعال می‌کنند. در واقع، تحریک سلول با ایسیتور، شامل اتصال ایسیتور به گیرنده‌های غشای پلاسمایی، اسیدی‌شدن محیط سیتوزول، تولید گونه‌های فعال اکسیژن و در نهایت فعال‌سازی بیان ژن‌های درگیر در فرآیندهای پاسخ دفاعی نظیر سنتز متابولیت‌های ثانویه است (۲۲-۳۱).

۵- نتیجه‌گیری

ایسیتورها به‌عنوان یکی از دستاوردهای مهم بیوتکنولوژیست‌ها از پتانسیل قابل توجهی در القا و تولید ترکیبات زیستی برخوردار هستند. جدا از این اثرگذاری مثبت، تاثیر هم‌افزایی آن‌ها می‌تواند گویای ظرفیت بالای گیاهان در پاسخ به این ایسیتورها باشد. در راستای پاسخ به این سوال، مطالعه اخیر نشان داد که بیان ژن‌های کلیدی درگیر در بیوسنتز تیمول و کارواکرول یعنی GTS, DXR, CYP178 و CYP180 به‌طور چشمگیری در تیمار ترکیبی نسبت به تیمارهای جداگانه افزایش یافت. از آنجایی که محتوی تیمول و کارواکرول مستقیماً تحت تاثیر بیان این ژن‌ها قرار دارد، لذا استفاده از ایسیتورهای متیل‌جاسمونات و UV-C می‌تواند راه‌کاری مناسب و ساده در تولید این ترکیبات بارزش تلقی شود.

۶- تشکر و قدردانی

کمال سپاسگزاری را از همکارانی داریم که ما را در اجرای این مطالعه مساعدت نمودند.

۷- منابع

1. Jarić S, Mitrović M, Pavlović P. Review of ethnobotanical, phytochemical and pharmacological study of *Thymus serpyllum* L. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2015; 101978:1-10.
2. Naghdi-Badi H, Maki-Zadeh M. Review of Common Thyme. Journal of Medicinal Plants. 2003; 2(7): 1-12.
3. Krause ST, Liao P, Crocoll C, Boachon B. The biosynthesis of thymol, carvacrol, and thymohydroquinone in Lamiaceae proceeds via cytochrome P450s and a short-chain dehydrogenase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2021; 118(52):e2110092118.
4. Halder M, Sarkar S, Jha S. Elicitation: a biotechnological tool for enhanced production of secondary metabolites in hairy root cultures. Engineering in Life Sciences. 2019; 19:880-895.
5. Murthy HN, Lee EJ, Paek KY. Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2014; 118:1-16
6. Nabi N, Singh S, Saffeuallah P. Responses of in vitro cell cultures to elicitation: regulatory role of jasmonic acid and methyl jasmonate: a review. In Vitro Cellular & Developmental Biology- Plant. 2021; 57:341-355.
7. Ali MS, Baek KH. Jasmonic acid signalling pathway in response to abiotic stresses in plants. International Journal of Molecular Sciences. 2020; 21:621.
8. Han GZ. Evolution of jasmonate biosynthesis and signalling mechanisms. Journal of Experimental Botany. 2017; 68:1323-1331.
9. Ruan J, Zhou Y, Zhou M, Yan J, et al. Jasmonic acid signaling pathway in plants. International Journal of Molecular Sciences. 2019; 20:2479.

10. Yang D, Ma P, Liang X, Wei Z, et al. PEG and ABA trigger methyl jasmonate accumulation to induce the MEP pathway and increase tanshinone production in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. *Physiologia Plantarum*. 2012; 146 (2): 173-83.
11. Zhen Y, Li T, Yang Q, Zhang Y, Zou J, Bian Z, Wen X. UVA radiation is beneficial for yield and quality of indoor cultivated lettuce. *Frontiers in Plant Science*. 2019;10:1563.
12. Zmumivand H, Shayganfar A, Tsaniklidis G, Emami Bistgani Z, Fanourakis D, Nicola S. Phenomorphological and essential oil composition responses to UVA radiation and protectants: A case study in three *Thymus* species. *Horticulturae*. 2021;8(1):31.
13. Verdaguer D, Jansen MA, Llorens L, Morales LO, et al. UV-A radiation effects on higher plants: Exploring the known unknown. *Plant Sciences*. 2017; 255:72-81.
14. Victório CP, Leal-Costa MV, Tavares ES, Kuster RM, et al. Effects of supplemental UV-A on the development, anatomy and metabolite production of *Phyllanthus tenellus* cultured in vitro. *Photochemistry Photobiology*. 2011; 87(3):685-9.
15. Zkim HJ, Chen F, Wang X, Rajapakse NC. Effect of methyl jasmonate on secondary metabolites of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006;54(6):2327-32.
16. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in Real-Time RT-PCR. *Nucleic acids research*. 2001; 29(9): e45-e45.
17. Ghanati F, Bakhtiarian S. Effect of methyl jasmonate and silver nanoparticles on production of secondary metabolites by *Calendula officinalis* L. (Asteraceae). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2014; 13:1783–1789.
18. Ho TT, Murthy HN, Park SY. Methyl Jasmonate induced oxidative stress and accumulation of secondary metabolites in plant cell and organ cultures. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020; 21:716.
19. Lee MJ, Son JE, Oh MM. Growth and phenolic content of sowthistle grown in a closed-type plant production system with a UV-A or UV-B lamp. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*. 2013; 54: 492–500.
20. Rai R, Meena RP, Smita SS, Shukla A. UV-B and UV-C pre-treatments induce physiological changes and artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L- An antimalarial plant. *Journal of Photochemistry and Photobiology-B: Biology*. 2011; 105(3): 216-225.
21. Ruiz-May E, Galaz-Ávalos RM, Loyola-Vargas VM. Differential secretion and accumulation of terpene indole alkaloids in hairy roots of *Catharanthus roseus* treated with methyl jasmonate. *Molecular Biotechnology*. 2009; 41 (3): 278-85.
22. Gadzovska S, Maury S, Delaunay A, Spasenoski M, et al. Jasmonic acid elicitation of *Hypericum perforatum* L. cell suspensions and effects on the production of phenylpropanoids and naphthodianthrones. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2007; 89:1–13.
23. Khan A, Khan MA, Alam M, Akbar R, et al. Analysis of the differential effects of methyl jasmonate on induction of adventitious roots and antioxidant potential in *Artemisia scoparia*. *International Journal of Biosciences*. 2019; 15:547–558.
24. Largia MJV, Pothiraj G, Shilpha J, Ramesh M. Methyl jasmonate and salicylic acid synergism enhances bacoside A content in shoot cultures of *Bacopa monnieri* (L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2015; 122:9–20
25. Mendoza D, Cuaspuud O, Arias JP, Ruiz O, et al. 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
26. Portu J, López R, Santamaría P, Garde-Cerdán T. Elicitation with methyl jasmonate supported by precursor feeding with phenylalanine: effect on Garnacha grape phenolic content. *Food Chemistry*. 2017; 237:416–422.
27. Saeed S, Ali H, Khan T, Kayani W, et al. Impacts of methyl jasmonate and phenyl acetic acid on biomass accumulation and antioxidant potential in adventitious roots of *Ajuga bracteosa* (Wall ex Benth) a high valued endangered medicinal plant. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 2017; 23:229–237
28. Sellapan P, Rohani ER, Noor NM. Sesquiterpene production in methyl Jasmonate-induced *Persicaria* minor cell suspension culture. *Sains Malaysiana*. 2018; 47:3051–3059

29. Zabala MA, Angarita M, Restrepo JM, Caicedo LA, et al. Elicitation with methyl-jasmonate stimulates peruvoside production in cell suspension cultures of *Thevetia peruviana*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology– Plant*. 2010; 46:233–238
30. Zaragoza-Martínez F, Lucho-Constantino GG, Ponce-Noyola T, Esparza-García, et al. Jasmonic acid stimulates the oxidative responses and triterpene production in *Jatropha curcas* cell suspension cultures through mevalonate as biosynthetic precursor. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2016; 127:47–56
31. Zhou M, Memelink J. Jasmonate-responsive transcription factors regulating plant secondary metabolism. *Biotechnology Advances*. 2016; 34:441–449.