بررسی بیان نسبی ژن‌های *THCAS*، *CBDAS*، *PT* و *OLS* در مسیر بیوسنتزی کانابینوئیدها در شاهدانه (*Cannabis sativa* L.) تحت تأثیر الیسیتور و سنجش متابولیت‌های مرتبط با آن

کیوان سلطان[1] و سیدعلیرضا سلامی[2*] (نویسنده مسئول)

۱- فارغ‌التحصیل کارشناسی‌ارشد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران، k.st2020@yahoo.com

۲- استادیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، تهران، ایران، asalami@ut.ic.ir

تاریخ دریافت: فروردین ۱۳۹۶ *تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۹۶*

Major gene expression and related metabolites (THCAS، CBDAS، PT, OLS) in cannabinoids biosynthesis pathway in Cannabis sativa L. influenced by a elicitor

Keyvan Soltan[1] and Seyed Alireza Salami[2*]

1- MS.c graduated, Department of Horticulture, Agriculture and Natural resources college, Science and Research branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran, k.st2020@yahoo.com

2- Assistant Professor, University of Tehran, Tehran, Iran, asalami@ut.ac.ir*

**Corresponding author: Seyed Alireza Salami*

Received: April 2017 *Accepted: May 2017*

چکیده

شاهدانه (*Cannabis sativa* L.) گیاهی دو پایه و یکساله متعلق به تیره Cannabinaceae است که متابولیت‌های ثانویه متنوعی را تولید می‌کند و دارای ویژگی‌های فیبری، دارویی و غذایی متعددی می‌باشد. دو کانابینوئید مهم و ارزشمند در شاهدانه دلتا-۹-تتراهیدروکانابینول (THC) و کانابیدیول (CBD) می‌باشد. از روش‌های اساسی برای تولید متابولیت بیشتر علاوه بر گزینش و اصلاح، می‌توان به دستورزی ژنتیکی مسیرهای زیستی اشاره کرد. در این میان بهره‌گیری از روش‌های ساده و سهل‌الوصول همچون کاربرد الیسیتورهای ایمن و ارزان برای افزایش یک متابولیت خاص یک روش تجاری و ارزشمند است. در این تحقیق هدف اصلی، تأیید نقش الیسیتوری اسید آسکوربیک به عنوان یک مولکول کوچک زیستی و ارزان و ایمن در تحریک بیان ژن‌های مسیر بیوسنتزی کانابینوئیدها در شاهدانه و متناظر با آن نقش آن در افزایش متابولیت‌های کلیدی THC و CBD بود. نتایج، افزایش معناداری را در بیان ژن‌های *THCAS*، *CBDAS*، *PT* و *OLS* به عنوان ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتز کانابینوئیدها در شاهدانه نشان داد. اسید آسکوربیک به عنوان یک الیسیتور غیرزیستی افزایش معناداری را در دو کانابینوئید اصلی THC و CBD که همواره در تولید دارو از این دو ماده مؤثره بهره گرفته می‌شود، ایجاد کرد.

کلمات کلیدی: اسید آسکوربیک، الیسیتور، تولید دارو

Abstract

Hemp (*Cannabis sativa* L.) is an annual dioecious plant of the Cannabiaceae family that produces various secondary metabolites and has numerous dietary fiber and pharmaceutical properties and nutritional value. Dela-9-tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD) are two of the important cannabinoids in hemp. One of the basic steps for the increased production of metabolites is to study the contents of important metabolites and the effects various elicitors have on their production. Moreover, employing simple and convenient methods in the application of safe and inexpensive elicitors with the purpose of increasing the content of a specific metabolite is a commercial and valuable treatment. The main purpose of this research was to confirm the role played by ascorbic acid (a small, inexpensive, and safe biomolecules) as an elicitor in stimulating expression of genes involved in the biosynthetic pathways of cannabinoids in the valuable hemp plant, which leads to increased production of the key metabolites THC and CBD. Results showed a significant increase in the expression of the THCAS, CBDAS, PT, and OLS genes as the key genes in the biosynthetic pathways of cannabinoids in hemp. Based on biochemical measurements, gene expression patterns matched metabolite production. The abiotic elicitor ascorbic acid significantly increased production of the two main cannabinoids THC and CBD, the two active ingredients that are used in drug manufacturing.

Keywords: Ascorbic acid, Elicitor, Medicine production

فصلنامه زیست شناسی سلولی و مولکولی گیاهی

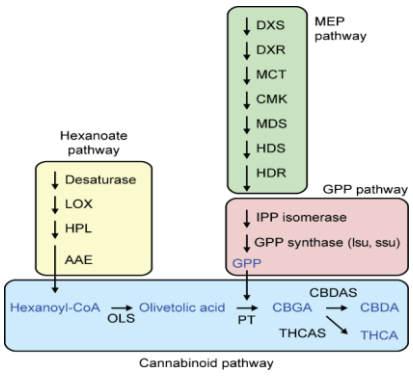
سال ۱۳۹۵، دوره ۱۱، شماره ۱ و ۲، صص ۲۳-۱۳

مقدمه و کلیات

شاهدانه (*Cannabis sativa* L.)گیاهی یکساله، علفی و دوپایه متعلق به راسته Urticales و خانواده Cannabinaceae و یک گیاه دارویی، فیبری، روغنی و خوراکی مهم و از قدیمی‌ترین گیاهان شناخته شده توسط بشر است که برای هزاران سال منبع مهم غذا، فیبر و دارو در آسیا و اروپا به شمار می‌آمده است. زیستگاه اصلی شاهدانه آسیای مرکزی است. شاهدانه بومی نواحی غرب و آسیای مرکزی مانند روسیه، چین، هند، پاکستان و ایران و مناطق حواشی هیمالیا به طرف هند می‌باشد (Ainsworth, 2000). شاهدانه را می‌توان بحث برانگیزترین گیاه در طول تاریخ بشر نامید، گیاهی شگفت انگیز که دارای پتانسیل درمانی بالا برای طیف وسیعی از بیماری‌ها از سردرد و اختلالات عصبی تا سرطان می‌باشد. با این حال، پتانسیل شاهدانه تا حد زیادی نادیده گرفته شد تا اینکه سیستم اندوکانابینوئیدی انسان در حدود یک دهه پیش کشف شد. امروزه مشخص شده است که بسیاری از عملکردهای بدن توسط موادی شبیه ترکیبات شاهدانه در مغز، سیستم ایمنی و سایر ارگان‌ها کنترل می‌شود. با وجود اینکه استفاده دارویی از شاهدانه دارای سابقه طولانی می‌باشد اما به علت در دسترس بودن درمان‌های جایگزین، عدم کنترل کیفیت و فشار اجتماعی و سیاسی، استفاده شاهدانه در قرن بیستم کاهش یافت و همچنان در این دهه اخیر، پتانسیل دارویی شاهدانه مورد بحث است. گیاهان دارویی از هزاران سال پیش به عنوان یکی از مهم‌ترین منابع دارویی کاربرد داشته‌اند. فناوری زیستی با استفاده از راهکارهایی نظیر کشت سلول‌ها، بافت‌ها و اندام‌ها، مهندسی ژنتیک قادر است کارایی و بهره وری گیاهان دارویی را به عنوان منابع تجدیدپذیر جهت تولید دارو افزایش دهد (امیدی و فرزین، ۱۳۸۸). بخش‌های مختلف رویشی و زایشی شاهدانه اغلب غده‌هایی تحت عنوان تریکوم دارند که محل تجمع متابولیت های ثانویه گیاه هستند. تاکنون بیش از ۴۲۰ ماده مختلف از شاهدانه جداسازی و شناسایی شده است که مهم‌ترین آن‌ها کانابینوئیدها هستند (Priyamvada and Sharma, 2012). امروزه از این گیاه به عنوان تونیک، برای درمان زخم، به عنوان مسکن، تب بر، جهت افتادگی رحم و کمک به وضع حمل، همچنین در درمان بیماری‌های ایدز (AIDS) و ام اس (MS) و سرطان استفاده می‌شود. از مواد مؤثره این گیاه می‌توان به THC, CBG, CBC CBGV, ،CBL, CBV, THCV, CBDV, CBCV, CBGM, اشاره نمود که استفاده‌های شایانی دارند (Erowid, 2006. در توضیح اهمیت این گیاه چندمنظوره صنعتی–دارویی همین بس که شاهدانه اولین گیاه دارویی است که کل ژنوم آن توالی یابی شده است و در نتیجه اطلاعات توالی قابل توجهی از آن در دسترس است که می‌تواند در راستای برنامه‌های اصلاحی این گیاه ارزشمند مورد استفاده قرار گیرد. یکی از مهمترین کاربردهای این گیاه تولید متابولیت های دارویی است که برخی از آنها در حال حاضر به عنوان داروی مورد تائید FDA در بازار جهانی مورد استفاده بیماران قرار می‌گیرند. از شاهدانه برای ساختن داروهای ارزشمندی مانند، Sativex® برای بهبود بیماری MS و Merinol® در درمان سرطان استفاده می‌شود (Lee *et al*., 2013). در گیاهان دارویی از جمله شاهدانه همواره پایین بودن ترکیبات مؤثره گیاه یکی از چالش‌های تولید دارو است. بعلاوه سنتز شیمیایی این متابولیت‌ها معمولاً پیچیده و پرهزینه می‌باشد. راهکارهای

مختلفی به منظور افزایش متابولیت های دارویی وجود دارد که از آن جمله می‌توان به شناسایی و معرفی ژنوتیپ های جدید، مهندسی ژنتیک و دستورزی مسیرهای بیوسنتزی و تحریک تولید متابولیت های ثانوی توسط انواع الیسیتورها اشاره کرد (امیدبیگی، ۲۰۱۲). با توجه به اهمیت اقتصادی متابولیت‌های گیاهی و افزایش روزافزون تقاضا، تولید متابولیت‌ها با روش‌های مختلف زیست فناوری و یا تحریک تولید آنها توسط الیسیتورهای زیستی و غیر زیستی راه حل جایگزین و سودمندی است که در این پژوهش به تأثیر کاربرد الیسیتورها در تغییرات میزان متابولیت های ثانوی در گیاه شاهدانه و تغییرات میزان بیان ژنهای مرتبط با آن‌ها می‌پردازد. یکی از اهداف اصلی در حوزه گیاهان دارویی استحصال بیشترین متابولیت با کیفیت از کمترین بیوماس است. افزایش تولید متابولیت های ثانویه در شاهدانه با استفاده از محرک‌ها که در این راستا مطالعه الگوی بیان ژن و سنجش میزان متابولیت ها انجام می‌گیرد. در این میان بهره گیری از روش‌های ساده و سهل الوصول کاربرد الیسیتورهای زیستی ایمن و ارزان برای افزایش یک متابولیت خاص یک روش ارزشمند است. در این تحقیق هدف اصلی، تأیید نقش الیسیتوری آسکوربیک اسید به عنوان یک مولکول کوچک زیستی و ارزان و ایمن در تحریک بیان ژنهای مسیر بیوسنتزی کانابینوئیدها در گیاه ارزشمند شاهدانه و متناظر با ان نقش آن در افزایش متابولیت های کلیدی THC و CBD بود. کانابینوئیدها ترپنوفنولیک هایی هستند که در کانابیس ساتیوا یافت می‌شود. تاکنون دو مسیر احتمالی مسیر بیوسنتز کانابینوئید پیشنهاد شده است: اول از طریق عمل پلی کتید سینتاز که سینتاز اسید اولیوتولیک نام دارد که تراکم n–هگزانویل– CoA را با سه مولکول مالونیل –CoA کاتالیز می‌کند تا یک تتراکتید حاصل کند که اسید اولیوتولیک را از طریق یک واکنش تراکم کلیزن تشکیل می‌دهد (Raharjo *et al*., 2004). وجود مسیر برای تشکیل اسید اولیوتولیک از طریق تراکم استیل -CoA با ۵ مولکول مالونیل–CoA تأیید شده است (Fellermeier *et al*., 2001. Shoyama *et al*., 1975). مرحله بعد پرنیلاسیون اسیداولیوتولیک با جرانیل پیروفسفات ((GPP است. یک آنزیم این واکنش را کاتالیز می‌کند. محصول این واکنش واسطه نقطه انشعاب مرکزی یعنی کانابیجرولیت *(CBGA)* است. این آنزیم همچنین قادر است از نریل پیروفسفات به جای GPP به عنوان زنجیره پرنیل استفاده کند گرچه GPP را ترجیح می‌دهد. آنزیم‌هایی شناسایی شده‌اند که می‌توانند حلقه‌ای شدن *CBGA* را کاتالیز کنند، که هر کدام یک محصول حلقه‌ای شدن کانابینوئید متفاوت را تشکیل می‌دهند. نشان داده شد که هر کدام از این آنزیم‌ها قادر هستند از کانابینرولیت به جای *CBGA* استفاده کنند که به همان چرخه‌ی تولید *CBGA* منتهی می‌شود (Morimoto *et al*., 1998. Taura *et al*., 1996). مرحله آخر (کربوکسیل زدایی) این مسیر بطور خود به خود در یک واکنش غیرآنزیمی در طی نگهداری یا دود کردن صورت می‌گیرد اما در شرایط عرصه نیز یافت می‌شود (Baker *et al*., 1981. Bosy *et al*., 2000) . مسیر بیوسنتزی olivetolate بطور دقیق‌تر روشن شده است. هگزانویل– CoA از هگزانویت منشأ می‌گیرد. این مرحله بوسیله یک هگزانویل CoA سینتاز کاتالیز می‌شود که در کرک‌های غده‌ای درگل های ماده کانابیس ستیوا یافت می‌شود. این یک رویداد نادر است زیرا بیشتر پلی کتیدهای گیاهی معمولاً از آسیل چرب –CoA سنتز می‌شوند (Stout *et al*., 2012).

بعلاوه دو آنزیم یعنی تتراکتیدسینتاز/ اولیوتول سینتاز (TKS/ OLS) و اولیوتولیک اسید سیکلاز (OAC) به نحوی منحصر به فرد و هماهنگ تبدیل هگزانویل CoA به اولیوتولیت را کاتالیز می‌کنند (Taura *et al*., 2009. Gagne *et al*., 2012). فقط تأثیر متقابل هماهنگ شده این دو آنزیم می‌تواند واسطه مهم بیوسنتز کانابینوئید یعنی اولیوتولیت را تولید کند که بوسیله این آنزیم‌ها به تنهایی کاتالیز نمی‌شود. OAC به تنهایی فعالیت سینتاز پلی کتید را نشان نمی‌دهد و OLS بدون کمک فقط محصولات جانبی اولیوتول و آلفا- پیرون را تولید می‌کند که در شاهدانه یافت نمی‌شوند. با توجه به محدودیت‌های مرتبط با این گیاه گزارشات چندانی از کاربرد الیسیتورها در این گیاه وجود ندارد. در گزارشی نشان داده است که جاسمونیک اسید انباشت ترپنوئیدهای اولیه و ثانویه را در کلروپلاست شاهدانه تحریک می‌کند (Mansouri *et al*., 2012). مطالعات مختلف موید این است که تائید کرک‌های غده‌ای محل اصلی تولید کانابینوئید می‌باشند. البته کانابینوئیدها در ساقه، دانه گرده و ریشه نیز وجود دارند. بیوسنتز کانابینوئید *THCA* و *CBDA* از تولید اسید چرب و پیش سازهای ایزوپرنوئید از طریق یک چرخه کوتاه، هگزانوآت و مسیر دی اکسی زایلوز فسفات/ متیل- اریتریتول فسفات (DOXP/MEP) شروع می‌شود. در مسیر هگزانوآت اسیدهای چرب تخریب می‌شوند که شامل مراحل تبدیل دی‌ساتوراز به لیپواکسیژناز (LOX) و لیپواکسیژناز به هیدروپراکسیداز لیاز (HPL) می‌شود. فعال سازی مسیر هگزانوآت توسط آنزیم آکیل اکتیویتینگ (AAE) موجب تولید هگزانویل کوآ، می‌گردد که این ترکیب در مسیر پلیکتید که مسیر اصلی و نهایی ساخت کانابینوئیدها محسوب می‌شود، تحت تأثیر آنزیم اولیوتول سینتاز (OLS) به الیوتولیک اسید تبدیل می‌گردد. همچنین از مسیر DOXP/MEP گرانیل دی فسفات (GPP) تولید شده (شکل ۱) که در نهایت هر دو توسط آنزیم پرینیل ترنسفراز (PT) به کانابیگرولیک اسید (CBGA) سوبسترای معمول برای سه اکسیدوسیکلاز، کانابیدیولیک اسید سنتتاز، تتراهیدروکانابینولیک اسید سنتتاز و کانابیکرومنیک اسید سنتتاز تشکیل دهنده کانابیدیولیک اسید، تتراهیدروکانابینولیک اسید و کانابیکرومنیک اسید تبدیل می‌شوند. در اثر گرما فرایند دکربوکسیلاسیون رخ داده و دو کانابینوئید خنثی یعنی THC و CBD به ترتیب از کانابینوئیدهای اسیدی THCA و CBDA حاصل می‌شوند (Andre *et al*., 2016; De Backer *et al*., 2009; Flores-Sanchez and Verpoorte, 2008). طی این مسیر آنزیم‌های THCAS، CBDAS، PT و OLS نقش کلیدی دارند. این چهار آنزیم توسط توالی چهار ژن *THCAS*، *CBDAS*، *PT* و *OLS* کد می‌شوند که در نهایت منجر به تولید دو کانابینوئید اصلی THC و CBD می‌گردند (Flores-Sanchez and Verpoorte, 2008; Sirikantaramas *et al*., 2004).



شکل ۱: مسیر بیوسنتزی کانابینوئیدها

(http://genome.ccbr.utoronto.ca)

فرآیند پژوهش

کشت شاهدانه دارویی اکسشن ۸۹۱۳۸۵: در این

پژوهش اثر آسکوربیک اسید بر بیان نسبی ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز کانابینوئیدها و سنجش میزان متابولیت‌های مرتبط با آنها (THC و CBD) صورت گرفت. بذور اکسشن دارویی **۸۹۱۳۸۵** تهیه شده از بانک بذر CGN هلند، در گلدان‌های محتوای خاک، خاک‌برگ و ماسه، تحت شرایط کنترل شده گلخانه کشت گردید و مراقبت از گیاهان طی مراحل رشد و نمو انجام گردید.

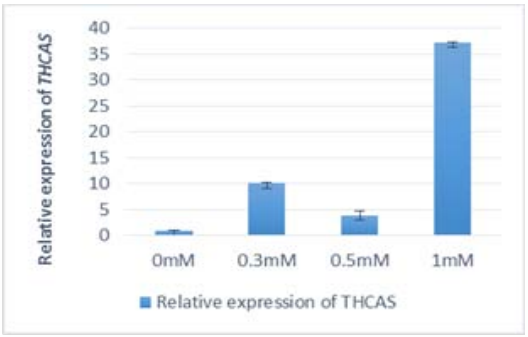
اعمال تیمار اسید آسکوربیک: گیاهان ماده برای تولید متابولیت های دارویی به تعداد کافی پرورش داده شدند. اسپری اسید آسکوربیک روی گیاهان یکنواخت با غلظت‌های صفر (کنترل)، ۰/۳، ۰/۵، ۱ میلی مولار درست قبل از مرحله گلدهی انجام گرفت. تعدادی گیاه به عنوان شاهد با آب مقطر اسپری شدند.

مطالعه بیان نسبی ژن‌های *THCAS*، *CBDAS*، *OLS* و *PT* تحت تیمار اسید آسکوربیک: پس از گذشت ۷۲ ساعت از تیمار اسید آسکوربیک، نمونه‌گیری از سرگل گیاهان ماده انجام شد و نمونه‌ها بلافاصله در داخل ازت مایع و سپس در فریزر ۸۰- قرار گرفتند. ارزیابی میزان رونوشت‌های ژن‌های کلیدی دخیل در مسیر بیوسنتزی کانابینوئیدها پس از کاربرد اسید آسکوربیک، با استفاده از Real-Time PCR، مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور آغازگرهای اختصاصی بر اساس توالی ژن‌های مذکور از مکان‌های ژنی مناسب طراحی شدند.

آنالیز داده‌ها با روش $2^{-\Delta\Delta C_T}$: روش $2^{-\Delta\Delta C_T}$ یکی از روش‌های استاندارد برای آنالیز تغییرات نسبی بیان ژن در Real-Time PCR می‌باشد. در این روش تفاوت نسبی در سطح بیان ژن هدف در نمونه‌های مختلف با استفاده از ژن مرجع قابل تعیین است. ابتدا نرمال کردن مقادیر C_T ژن هدف با استفاده از ژن مرجع برای نمونه‌های تیمار شده و نمونه شاهد انجام گرفت و سپس بیان ژن هدف برای هر نمونه محاسبه شد.

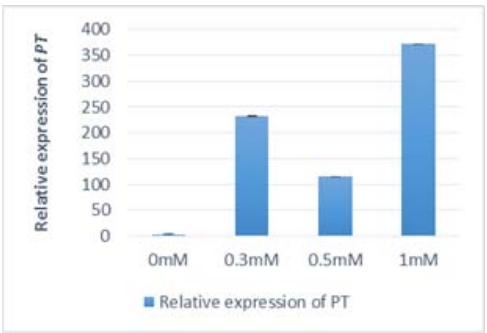
آنالیز HPLC کانابینوئیدهای THC و CBD: سنجش کانابینوئیدها به روش(Rustichelli *et al*., 1998) با روش HPLC انجام شد. ستون مورد استفاده C18ODS3 با طول ۲۵۰ میلی‌لیتر و قطر ۴/۶ میلی-متر بود. از فاز متحرک به صورت ایزوکراتیک شامل متانول ۸۰ درصد با سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه استفاده شد و طول‌موج دستگاه روی ۲۲۰ نانومتر تنظیم شد. ۲۰ میکرولیتر عصاره به دستگاه تزریق شد. میزان دو کانابینوئید THC و CBD در هریک از نمونه‌های مورد بررسی بر اساس سطح زیر منحنی به دست آمده با استفاده از منحنی استاندارد آن‌ها بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن خشک محاسبه گردید. استخراج کانابینوئیدها با استفاده از روش متانول/کلروفرم انجام شد(De Backer *et al*., 2009). مقدار ۰/۰۵ گرم از سرگل در ۲ میلی‌لیتر متانول/کلروفرم با نسبت ۹:۱ ساییده شده تا به صورت همگن درآمد. نمونه‌ها به مدت ۴۰ دقیقه در حمام اولتراسونیک قرار داده شدند. سپس نمونه‌ها با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. فاز رویی جدا و به وسیله هوادهی کاملاً خشک شد. عصاره خشک شده در یک میلی‌لیتر متانول حل و با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. در نهایت محلول رویی جدا و به دستگاه HPLC تزریق گردید(Salari & Mansori , 2013).

میزان بیان نسبی ژن *THCAS* در بافت سرگل شاهدانه در سطوح مختلف اسید آسکوربیک: بر اساس فرمول، بیان نسبی نمونه شاهد یک و بقیه نمونه‌ها بر اساس آن سنجیده شدند. با افزایش غلظت اسید آسکوربیک میزان بیان ژن *THCAS* تغییر یافت. با افزایش سطح اسید آسکوربیک به سطح ۰/۳ میلی مولار بیان این ژن ۱۰ برابر افزایش و در غلظت نیم میلی مولار با ۳ برابر کاهش یافت. میزان بیان این ژن در غلظت یک میلی مولار تا ۳۷ برابر افزایش نشان داد.



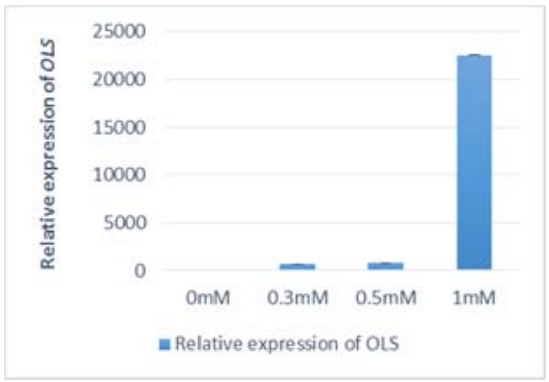
نمودار ۱: بیان نسبی ژن *THCAS* در سرگل شاهدانه در سطوح مختلف اسید آسکوربیک

میزان بیان نسبی ژن *PT*: با افزایش غلظت اسید آسکوربیک میزان بیان ژن *PT* تغییر یافت. با افزایش سطح اسید آسکوربیک به ۰/۳ میلی مولار بیان ژن ۲۳۲ برابر افزایش و سپس در سطح ۰/۵ میلی مولار بیان نسبی به ۱۰۰ برابر شاهد کاهش یافت. در غلظت یک میلی مولار بیشترین بیان *PT* با ۳۷۲ برابر افزایش مشاهده شد.



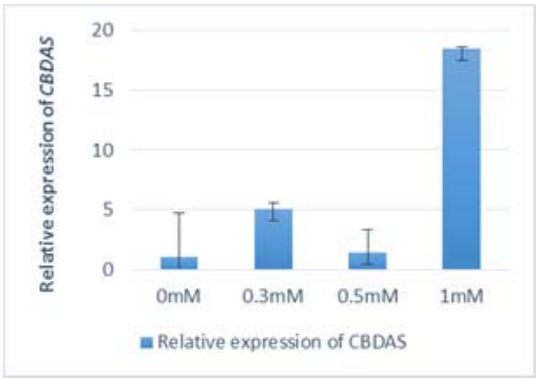
نمودار ۲: بیان نسبی ژن *PT* در سرگل شاهدانه در سطوح مختلف اسید آسکوربیک

میزان بیان نسبی ژن *OLS*: با افزایش غلظت آسکوربیک اسید میزان بیان کمی ژن *OLS* تغییر یافت. با افزایش سطح اسید آسکوربیک به سطح ۰/۳، ۰/۵ میلی مولار بیان این ژن ۶۶۱ و ۷۸۶ برابر افزایش یافت. بیشترین میزان بیان این ژن با اختلاف معنی دار در سطح یک میلی مولار مشاهده شد.



نمودار ۳: بیان نسبی ژن *OLS* در سرگل شاهدانه در سطوح مختلف اسید آسکوربیک

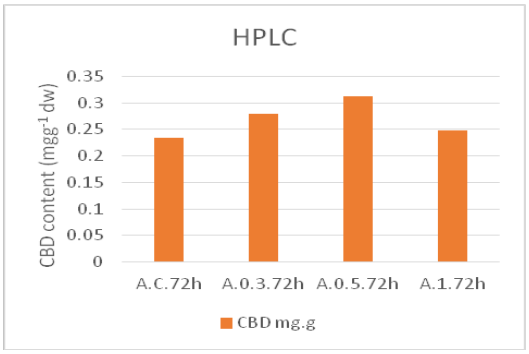
میزان بیان نسبی ژن *CBDAS*: با افزایش سطح اسید آسکوربیک به سطح ۰/۳ میلی مولار در ابتدا بیان این ژن ۵ برابر افزایش یافت و در ادامه با افزایش غلظت اسید آسکوربیک به سطح ۰/۵ میلی مولار بیان به سطح آستانه کاهش و مجدد در غلظت یک میلی مولار ۱۸/۵ برابر افزایش یافت.

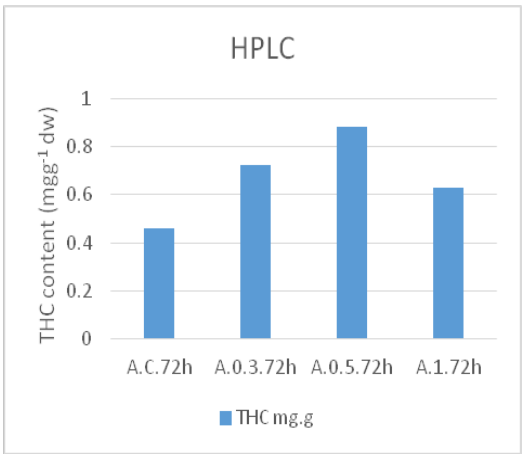


نمودار ۴: بیان نسبی ژن *CBDAS* در سرگل شاهدانه در سطوح مختلف اسید آسکوربیک

مطالعه فیتوشیمیایی و آنالیز کانابینوئیدهای THC **و** CBD **در تیمارهای اسید آسکوربیک:** با گذشت زمان، افزایش غلظت الیسیتور باعث افزایش معناداری

در میزان THC و **CBD** شد. آنالیز کانابینوئیدهای THC و CBD موید آن است که گیاه شاهدانه با گذشت زمان پاسخ مثبتی را تحت تأثیر الیسیتور غیر زیستی اسید آسکوربیک نشان می‌دهد. اگر چه تمام غلظت ها منجر به افزایش متابولیت ها شد، ولیکن بیشترین میزان **THC** و CBD در غلظت ۰/۵ میلی مولار پس از گذشت ۷۲ ساعت مشاهده شد. آسکوربیک اسید به عنوان یک آنتی اکسیدان کلیدی همواره در متابولیسم‌های گیاهی، سم زدایی، حفاظت گیاه در برابر آفتاب، سنتز و تقسیم سلولی، دفاع گیاهی، نقش بسزایی را بازی می‌کند (Conklin, 2001). همچنین مشخص شد که آسکوربیک اسید می‌تواند نقش تحریکی در تغییر مثبت الگوی بیان ژنهای مرتبط با کانابینوئیدها و میزان آن متابولیت ها داشته باشد.





نمودار ۵ و ۶: تأثیر غلظت‌های مختلف اسید آسکوربیک در بر میزان THC و CBD در سرگل شاهدانه (۷۲ ساعت پس از اعمال تیمار)

نتیجه‌گیری کلی

بیان ژن‌ها تحت تأثیر عوامل تنظیمی بالادست و پایین‌دستی و تغییرات رونویسی و پس رونویسی است (Fraga *et al.*, 2008). پیش ماده‌های کانابینوئیدها از دو مسیر تولید می‌شوند: مسیر پلی کتید و مسیر دی اکسی زایلوز فسفات/ متیل – اریتریتول فسفات(DOXP/MEP). از مسیر پلی کتید، الیوتولیک اسید و از مسیر DOXP/MEP گرانیل دی فسفات(GPP) به دست می‌آید. هر دو توسط پرینیلاز گرانیل دی فسفات: الیوتولات گرانیل ترانسفراز(GOT) به کانابیگرولیک اسید (*CBGA*) تبدیل می‌شوند (De Backer *et al.*, 2009; De Meijer *et al.*, 1992; Flores-Sanchez and Verpoorte, 2008). در طی این مسیر ژن‌های *THCAS* و *CBDAS* نقش کلیدی دارند چرا که تبدیل پیش ماده CBGA به THCA و CBDA را کاتالیز می‌کنند. این دو آنزیم کلیدی توسط توالی دو ژن *THCA* سنتاز و *CBDA* سنتاز کد می‌شوند که در نهایت منجر به تولید دو کانابینوئید اصلی THC و CBD می‌گردند (Flores-Sanchez and Verpoorte, 2008; Sirikantaramas *et al.*, 2004). جنس *Cannabis*، دارای ترکیبات کانابینوئیدی بی‌شماری هستند. مطالعات زیادی روی ترکیبات کانابینوئیدی شاهدانه انجام گرفته است. روش‌های مختلفی برای ارزیابی شیمیایی متابولیت‌ها وجود دارد که از جمله آن‌ها می‌توان به GC، GC-FID، GC-MS، HPLC و HPLC-DAD اشاره کرد. یکی از روش‌های استفاده شده برای ارزیابی نمونه‌های شاهدانه GC می‌باشد؛ اما از آنجایی که این روش بر اساس گرم سازی نمونه و تفکیک اجزای متابولیتی در فرم گازی است، لذا فرم‌های اسیدی کانابینوئیدها به فرم خنثی دکربوکسیله می‌شوند و قادر به اندازه‌گیری فرم اسیدی

کانابینوئیدها نیست. برخلاف این روش، HPLC امکان تعیین ترکیب اصلی کانابینوئیدهای گیاه را از طریق ارزیابی مستقیم فراهم می‌آورد (Suurkuusk, 2010). بیشترین مقدار THC در پایه‌های ماده، ارقام دارویی و در زمان سفید بودن کلاله‌ها دیده می‌شود و همچنین بیشترین مقدار CBD در پایه ماده؛ ارقام فیبری در مرحله قهوه‌ای شدن کلاله‌ها و تشکیل بذر است (Pacifico *et al*., 2008). همچنین بیشترین مقدار کانابینوئیدها در گل‌ها و برگ‌های جوان اطراف گل‌ها وجود دارد (Ohlsson *et al*., 1971). گزارشات در ارتباط با الیسیتورها و شاهدانه اندک است. در تحقیقی تأثیر الیسیتورهای زنده و غیر زنده بر روی کشت سلولی بافت‌های مختلف گیاه شاهدانه مورد بررسی قرار گرفته است. طبق گزارش‌ها میزان متابولیت‌های ثانویه در گیاهانی که تحت تنش هستند افزایش می‌یابد، همچنین الیسیتورها به وسیله فعال کردن سیستم دفاعی گیاه موجب افزایش متابولیت-های ثانویه می‌شوند (Flores-Sanchez *et al*., 2009). تیمار جیبرلیک اسید در گیاه شاهدانه بر روی دو آنزیم کلیدی، ۱-دئوکسی-دی-گزیلوز ۵-فسفات سنتاز (DXS) و ۳-هیدروکسی ۳ متیل‌گلوتاریل کوآنزیم آ ردوکتاز(HMGR) در مسیر بیوسنتز ترپنوئیدها تأثیر گذاشته درواقع فعالیت آنزیم (DXS) را کاهش داده و به موجب آن کلروفیل a و b و همچنین تمام کارتنوئیدها کاهش یافتند. آلفا توکوفرول در نمونه‌های تیمار شده با غلظت ۵۰ میلی مولار اسید جبرلیک کاهش، در صورتی که در غلظت ۱۰۰ میلی مولار افزایش یافت. همچنین این الیسیتور فعالیت آنزیم (HMGR) را افزایش داده و در نتیجه فیتواسترول‌ها افزایش یافتند. در این آزمایش میزان THC و CBD در غلظت ۵۰ میلی مولار تغییر چندانی نداشت ولی در غلظت ۱۰۰ میلی مولار افزایش نشان داد (Mansouri *et al*., 2011). امروز اگر ده گیاه برتر دارویی جهان را جستجو کنیم به جرات می‌توان گفت که شاهدانه یکی از آنها است. خواص ضدسرطانی و ضد درد این گیاه مسلم است. این گیاه که قدمتی ۱۲۰۰۰ ساله دارد همواره در طب سنتی ما پیشنهاد گردیده و از قسمت‌های مختلف این گیاه (بذر، جوانه، روغن و تمام قسمت‌های گیاه) استفاده می‌شود. گونه *sativa* این گیاه از محدود گیاهان دارویی بومی ایران بوده که متاسفانه آنگونه که درخور این گیاه بوده فعالیتی روی آن صورت نگرفته است و همواره مخدر بودن این گیاه مانع بزرگی برای انجام کارهای تحقیقاتی بر روی این گیاه بوده و محدودیت‌های بسیاری را برای محققین در این کشور به وجود آورده است. تاکنون دو داروی ارزشمند Sativex® برای بهبود بیماری MS و Merinol® در درمان سرطان برای این گیاه تولید گردیده که مورد تأیید FDA می‌باشد. امروزه برای تمام داروسازان مبرهن است که اولین گام در تولید داروهای گیاهی اندازه گیری میزان مواد مؤثره گیاه می‌باشد، در نتیجه بسیاری از داروسازان در تلاش برای افزایش این مواد مؤثره با استفاده از تکنیک‌های مختلف (دستکاری ژنتیک، استفاده از محرک‌های زیستی و غیر زیستی) می‌باشند. همواره استفاده از محرک‌ها در مقابل دستکاری ژنتیکی برای داروسازان در اولویت قرار داشته است. آسکوربیک اسید به عنوان یک الیسیتور غیر زیستی افزایش معنی داری را در دو کانابینوئید اصلی THCو CBD که همواره در تولید دارو از این دو ماده مؤثره بهره گرفته می‌شود ایجاد کرد. همچنین مطالعاتی که بر روی بیان ژن‌های این گیاه انجام گرفت افزایش معنی داری را در بیان ژن‌های

THCAS، *CBDAS*، *PT* و *OLS* نشان داد و امید بر آن است که برای تمام محققین فعال در زمینه‌ی گیاه شاهدانه کمک کننده باشد. گرایش روز افزون جوامع بشری به استفاده از داروهای دارای منشاء گیاهی سبب افزایش تقاضای مواد مؤثره گیاهان دارویی شده است. از آنجایی که هیچ گونه مطالعه جامعی بر محتوای متابولیتی شاهدانه‌های ایران انجام نگرفته است، یکی از گام‌های اساسی بررسی محتوای متابولیت های مهم آن‌ها و تأثیر الیسیتور های مختلف بر میزان این متابولیت ها می‌باشد. هدف از این پایان نامه افزایش تولید متابولیت های ثانویه در شاهدانه با استفاده از محرک‌ها که در این راستا مطالعه الگوی بیان ژن و سنجش میزان متابولیت ها انجام می‌گیرد. بطور کلی راهکارهای مختلفی برای افزایش تولید متابولیت های ثانویه در گیاهان دارویی وجود دارد که از آن جمله می‌توان به یافتن و سلکسیون ژنوتیپ های High metabolite، دستورزی مسیرهای زیستی با استفاده از ابزارهای مهندسی ژنتیک و در نهایت استفاده از الیسیتورهای زیستی و غیرزیستی اشاره نمود. در این میان بهره گیری از روش‌های ساده و سهل الوصول کاربرد الیسیتورهای ایمن و ارزان برای افزایش یک متابولیت خاص یک تیمار تجاری و ارزشمند است. در این تحقیق هدف اصلی، تأیید نقش الیسیتوری آسکوربیک اسید به عنوان یک مولکول کوچک زیستی و ارزان و ایمن در تحریک بیان ژنهای مسیر بیوسنتزی کانابینوئیدها در گیاه ارزشمند شاهدانه و متناظر با آن نقش آن در افزایش متابولیت های کلیدی THC و CBD بود.

منابع

1. Ainsworth C. (2000). Boys and girls come out to play: The molecular biology of dioecious plants. Annual Botany, 86: 211-221.
2. Allsop DJ *et al*. (2015). Cannabinoid replacement therapy (CRT): Nabiximols (Sativex) as a novel treatment for cannabis withdrawal. Clin Pharmacol Ther. 2015 Jun;97(6):571-4. doi: 10.1002/cpt.109. Epub 2015 Apr 17.
3. Baker, P. B., Taylor, B. J., & Gough, T. A. (1981). The tetrahydrocannabinol and tetrahydrocannabinolic acid content of cannabis products. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 33(1), 369-372.
4. Boubakri, H., Gargouri, M., Mliki, A. et al. (2016). Vitamins for enhancing plant resistance. Planta (2016) 244:529–543.
5. Chandra, S., Lata, H., Khan, I. A., & ElSohly, M. A. (2011). Temperature response of photosynthesis in different drug and fiber varieties of Cannabis sativa L. Physiology and Molecular Biology of Plants, 17(3), 297-303.
6. De Backer, B., Debrus, B., Lebrun, P., Theunis, L., Dubois, N., Decock, L., ... & Charlier, C. (2009). Innovative development and validation of an HPLC/DAD method for the qualitative and quantitative determination of major cannabinoids in cannabis plant material. Journal of Chromatography B, 877(32), 4115-4124.
7. Fellermeier, M., Eisenreich, W., Bacher, A., & Zenk, M. H. (2001). Biosynthesis of cannabinoids. European Journal of Biochemistry, 268(6), 1596-1604.
8. Fischedick J.T., Glas R., Hazekamp A. & Verpoorte R. (2009). A qualitative and quantitative HPTLC densitometry method for the analysis of cannabinoids in Cannabis sativa L. phytochemical Analysis, 20: 421-426.
9. Flores-Sanchez, I. J., & Verpoorte, R. (2008). PKS activities and biosynthesis of cannabinoids and flavonoids in Cannabis sativa L. plants. Plant and cell physiology, 49(12), 1767-1782.
10. Flores-Sanchez, I. J., & Verpoorte, R. (2008). Secondary metabolism in cannabis. Phytochemistry reviews, 7(3), 615-639.
11. Flores-Sanchez, I. J., Peč, J., Fei, J., Choi, Y. H., Dušek, J., & Verpoorte, R. (2009). Elicitation studies in cell suspension cultures of Cannabis sativa L. Journal of biotechnology, 143(2), 157-168.

sativa L. Trichomes during Flowering Period Using 1H NMR-Based Metabolomics and Real-Time PCR. Planta Med 2016; 82(13): 1217-1223.
22. Ohlsson, A., Abou-Chaar, C. I., Agurell, S., Nilsson, I. M., Olofsson, K., & Sandberg, F. (1971). Cannabinoid constituents of male and female Cannabis sativa. UN Bulletin on Narcotics, 23, 29-32.
23. Omid Beigi, R. (1996). Producing and Processing of Medicinal Plant. Tarahan Nashr Publication.
24. Oreste Arrigoni*, Mario C. De Tullio. (2000). The role of ascorbic acid in cell metabolism: between gene-directed functions and unpredictable chemical reactions. J. Plant Physiol. 157.481-488 (2000).
25. P. L. CONKLIN & C. BARTH. (2004). Ascorbic acid, a familiar small molecule intertwined in the response of plants to ozone, pathogens, and the onset of senescence. Plant, Cell and Environment (2004) 27, 959–970.
26. P. L. CONKLIN. (2001). Recent advances in the role and biosynthesis of ascorbic acid in plants. Plant, Cell and Environment (2001) 24, 383–394.
27. Pacifico, D., Miselli, F., Carboni, A., Moschella, A., & Mandolino, G. (2008). Time course of cannabinoid accumulation and chemotype development during the growth of Cannabis sativa L. Euphytica, 160(2), 231-240.
28. Raharjo, T. J., & Verpoorte, R. (2004). Methods for the analysis of cannabinoids in biological materials: a review. Phytochemical Analysis, 15(2), 79-94.
29. Roger G. Pertwee. (2014). Handbook of cannabis. Oxford university press. P3
30. Salentijn M.L., Zhang Q., Amaducci S., Yang M. & Trindade L.M (2014). New developments in fiber hemp (Cannabis sativa L.) breeding. Published by Elsevier B.V.
31. Shoyama, Y., Yagi, M., Nishioka, I., & Yamauchi, T. (1975). Biosynthesis of cannabinoid acids. Phytochemistry, 14(10), 2189-2192.
32. Sirikantaramas, S., Morimoto, S., Shoyama, Y., Ishikawa, Y., Wada, Y., Shoyama, Y., & Taura, F. (2004). The Gene Controlling Marijuana Psychoactivity MOLECULAR CLONING AND
12. Fraga, D., Meulia, T., & Fenster, S. (2008). Real-time PCR. Current protocols essential laboratory techniques, 10-3.
13. Gagne, S. J., Stout, J. M., Liu, E., Boubakir, Z., Clark, S. M., & Page, J. E. (2012). Identification of olivetolic acid cyclase from Cannabis sativa reveals a unique catalytic route to plant polyketides. Proceedings of the National Academy of Sciences, 109(31), 12811-12816.
14. Govindaraju, S., & Arulselvi, P. I. (2016). Effect of cytokinin combined elicitors (l-phenylalanine, salicylic acid and chitosan) on in vitro propagation, secondary metabolites and molecular characterization of medicinal herb–Coleus aromaticus Benth (L). Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences.
15. Hemant Lata, Suman Chandra, Ikhlas A. Khan, Mahmoud A. ElSohly. (2016). In Vitro Propagation of *Cannabis sativa* L. and Evaluation of Regenerated Plants for Genetic Fidelity and Cannabinoids Content for Quality Assurance. Protocols for In Vitro Cultures and Secondary Metabolite Analysis of Aromatic and Medicinal Plants, Second Edition, 275-288.
16. Kent O. Burkeya,b,* and Gwendolyn Easonc. (2002). Ozone tolerance in snap bean is associated with elevated ascorbic acid in the leaf apoplast. PHYSIOLOGIA PLANTARUM 114: 387–394. 2002.
17. Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. methods, 25(4), 402-408.
18. Mansouri, H., & Asrar, Z. (2012). Effects of abscisic acid on content and biosynthesis of terpenoids in Cannabis sativa at vegetative stage. Biologia plantarum, 56(1), 153-156.
19. Mansouri, H., Asrar, Z., & Amarowicz, R. (2011). The response of terpenoids to exogenous gibberellic acid in Cannabis sativa L. at vegetative stage. Acta Physiologiae Plantarum, 33(4), 1085-1091. Chicago
20. Morimoto, S., Komatsu, K., Taura, F., Shoyama, Y., 1998. Purification and characterization of cannabichromenic acid synthase from Cannabis sativa. Phytochemistry 49, 1525–1529.
21. Nizar Happyana, Oliver Kayser. (2016). Monitoring Metabolite Profiles of Cannabis

HETEROLOGOUS EXPRESSION OF Δ1-TETRAHYDROCANNABINOLIC ACID SYNTHASE FROM CANNABIS SATIVA L. Journal of Biological Chemistry, 279(38), 39767-39774.

33. Stout, J. M., Boubakir, Z., Ambrose, S. J., Purves, R. W., & Page, J. E. (2012). The hexanoyl-CoA precursor for cannabinoid biosynthesis is formed by an acyl-activating enzyme in Cannabis sativa trichomes. The Plant Journal, 71(3), 353-365.
34. Suurkuusk, G. (2010). Validation of the gas chromatographic method for THC, CBD and CBN determination (Doctoral dissertation, Master Thesis, University of Tartu, Faculty of Science and Technology Institute of Chemistry, Estonia).
35. Taqi Ahmed Khan1, Mohd Mazid2*, Firoz Mohammad2. (2011). Role of ascorbic acid against pathogenesis in plants. Journal of Stress Physiology & Biochemistry, Vol. 7 No. 3 2011, pp. 222-234 ISSN 1997-0838.
36. Taura, F., Morimoto, S., Shoyama, Y., 1996. Purification and characterization of cannabidiolic-acid synthase from Cannabis sativa L. Biochemical analysis of a novel enzyme that catalyzes the oxidocyclization of cannabigerolic acid to cannabidiolic acid. J. Biol. Chem. 271, 17411–17416.
37. Taura, F., Tanaka, S., Taguchi, C., Fukamizu, T., Tanaka, H., Shoyama, Y., & Morimoto, S. (2009). Characterization of olivetol synthase, a polyketide synthase putatively involved in cannabinoid biosynthetic pathway. FEBS letters, 583(12), 2061-2066.
38. Fazzalaro et al. (2014) Nature Watch: Cannabis is one of the world's oldest cultivated plants.
39. http://buffalonews.com/2014/06/08/nature-watch-cannabis-is-one-of-the-worlds-oldest-cultivated-plants/. Published Sun, Jun 8, 2014.