ژنتیک نوین
دوره نهم، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۳
صفحه ۱۶۰-۱۵۱

بررسی اثر اتیلن بر میزان بیان ژن‌های *T16H*، *G10H*، *DAT* و *AVLBS* در گیاه پروانش (*Catharanthus roseus*)

Evaluation of ethylene effect on expression level of *T16H, G10H, DAT* and *AVLBS* genes in *Catharanthus roseus*

میثم شعبانی*[۱]، محمد فارسی[۲]، امین میرشمسی کاخکی[۲]

۱- دانشجوی دکتری، دانشگاه محقق اردبیلی
۲- به ترتیب استاد و استادیار، دانشگاه فردوسی مشهد

Shabani M*[1], Farsi M[2], Mirshamsi Kakhki A[2]

1. PhD Student, Mohaghegh Ardabili University, Ardabil, Iran
2. Professor and Assistant Professor, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: meisha3@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۲/۶/۲۰- تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۲/۱۱)

چکیده

پروانش (*Catharanthus roseus*) یک گیاه مدل دارویی است. ریشه این گیاه محل تجمع دو آلکالوئید اجمالسین و سرپنتین است، که در درمان بیماری‌های قلبی-عروقی، از جمله فشار خون بالا استفاده می‌شود. این گیاه به خصوص به علت وجود آلکالوئیدهای وین‌بلاستین و وین‌کریستین، که در درمان سرطان به کار برده می‌شود، اهمیت زیادی پیدا کرده است. با توجه به افزایش تولید متابولیت‌های این گیاه در تیمار با اتیلن، هدف این تحقیق بررسی بیان ژن‌ها و شناخت ژن‌های موثر در این رابطه بود. بدین منظور بیان ژن‌های *T16H*، *G10H*، *DAT* و *AVLBS* پس از تیمار با اتیلن، و در بازه‌های زمانی ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با استفاده از تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در واحد زمان (qRT-PCR)، بررسی شد. بیان ژن‌ها *T16H*، *DAT* و *AVLBS* در ۶ ساعت پس از تیمار با اتیلن نسبت به شاهد افزایش و در ۱۲ ساعت کاهش یافت و پس از آن روند ثابتی پیدا کرد. همچنین ژن *G10H* با تابعیت از این الگو در ۷۲ ساعت نیز افزایش بیان داشت و از الگوی سه ژن دیگر تبعیت نکرد. با توجه به نتایج این آزمایش به نظر می‌رسد که ژن *G10H*، ژن مهمی در پاسخ به اتیلن باشد.

واژه‌های کلیدی

اتیلن
بیان ژن
پروانش
Catharanthus roseus
DNA

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.2.4.5]

مقدمه

گیاه پروانش با اسم علمی *Catharanthus roseus* (L.) G. Don یک گیاه چند ساله، متعلق به خانواده خرزهره (Apocynaceae) است (Van der Heijden et al. 2004). پروانش یک گیاه مدل دارویی است که تحقیقات زیادی بر روی آن انجام شده است. این گیاه حاوی ۱۳۰ نوع آلکالوئیدهای ایندول ترپنوئیدی (TIA[1]) است (Van der Heijden et al. 2004; El-Sayed and Verpoorte 2007a, b; Zhao and Verpoorte 2007).

ریشه این گیاه محل تجمع دو آلکالوئید اجمالسین و سرپنتین است. این آلکالوئیدها ترکیبات مهم دارویی برای درمان انواع بیماری‌های قلبی-عروقی از جمله فشار خون بالا می‌باشند (Svoboda and Blake 1975). این گیاه به علت وجود آلکالوئیدهای دایمر وین‌بلاستین و وین‌کریستین، که در برگ و اندام‌های هوایی آن تولید می‌شوند، و در شیمی درمانی انواع مختلفی از سرطان‌های خون، غده‌های لنفاوی، پستان، ریه و تخمدان به کار برده می‌شود، اهمیت زیادی پیدا کرده است (Mukherjee et al. 2001; Van der Heijden et al. 2004). این دو ماده دارای ارزش اقتصادی بسیار بالایی هستند. قیمت هر کیلوگرم وین‌بلاستین یک میلیون دلار و تولید سالانه آن ۱۲ کیلوگرم و قیمت هر کیلو گرم وین‌کریستین ۳/۵ میلیون دلار و تولید سالانه آن یک کیلوگرم است (Loyola-Vargas et al. 2007).

در حال حاضر، مواد وین‌بلاستین و وین‌کریستین به طور عمده توسط استخراج از گیاه *C. roseus* به دست می‌آیند. دلیل این امر آن است که روش‌های تمام سنتزی و نیمه سنتزی و روش‌های دیگر برای تولید این مواد در مقیاس وسیع مناسب نیستند (Atta et al. 1976; Kutney 1977). همچنین تلاش زیادی برای تولید این ترکیبات در مقیاس وسیع به وسیله کشت سوسپانسیون سلولی و ریشه‌های موئین انجام شده است. به دلیل اینکه کشت سلولی فاقد مسیر تولید وین‌دولین، (پیش ماده وین‌بلاستین و وین‌کریستین) می‌باشد، در تولید این مواد موفق نبوده‌اند (Zhao and Verpoorte 2007). وجود مقادیر بسیار کم وین‌بلاستین و وین‌کریستین که در بخش هوایی گیاه تولید می‌شود (حدود ۰/۰۰۰۵ درصد وزن خشک) و همچنین استخراج آنها از میان ترکیبات زیادی، که از لحاظ خصوصیات فیزیکی و شیمیایی بسیار به هم شبیه هستند، باعث افزایش قیمت بسیار زیاد این دو ماده شده است (Scott 1979; De Luca and Laflamme 2001).

آلکالوئیدهای ایندول ترپنوئیدی از دو بخش کلی ترپنوئید و حلقه ایندولی تشکیل شده‌اند. منشا بخش ترپنوئید این نوع آلکالوئیدها، مسیر ۲- C-متیل -D اریتریتول ۴-فسفات (MEP[2]) و موالونات است، در حالی که منشا اسکلت ایندولی آنها، اسید آمینه تریپتوفان می‌باشد. تریپتوفان از کوریسمات ساخته می‌شود و منشأ کوریسمات مسیر شیکمات می‌باشد (Van der fits and Memelink 2000; Endt et al. 2002; El-Sayed and Verpoorte 2007a). دی‌متیل‌آلیل دی‌فسفات (DMAPP[3]) و ایزوپنتیل دی فسفات (IPP[4]) منشا گرفته از مسیر ۲- C-متیل -D اریتریتول ۴-فسفات و موالونات، با هم ترکیب شده و گرانیل ساخته می‌شود (Oudin et al. 2007). سپس گرانیل از طریق مسیر Iridoid به اسکولگانین تبدیل می‌شود (El-Sayed and Verpoorte 2007a). گرانیل-۱۰-هیدروکسیلاز (*G10H*[5]) آنزیم مهمی است که در هیدروکسیلاسیون، گرانیل نقش دارد و در مسیر Iridoid وجود دارد (Suttipanta et al. 2007). از ترکیب تریپتامین (ساخته شده از تریپتوفان) و اسکولگانین، توسط آنزیم استریکتوسیدین سینتاز (*STR*[6])، استریکتوسیدین ساخته می‌شود. استریکتوسیدین یک حد واسط مهم و پیش ماده بسیاری از آلکالوئیدهای ایندول ترپنوئیدی است. استریکتوسیدین در ادامه به تابرسونین و کاتارانتین تبدیل می‌شود. تابرسونین از طریق مسیر وین‌دولین به وین‌دولین تبدیل می‌شود. آنزیم‌های تابرسونین-۱۶-هیدروکسیلاز (*T16H*[7]) و استیل کوA: داستیل‌وین‌دولین-۱۷-O-استیل ترانسفراز(DAT[8]) در اولین و آخرین مرحله مسیر وین‌دولین قرار دارند. از ترکیب کاتارانتین و وین‌دولین در واکوئل توسط

[1] Terpenoid indole alkaloids

[2] 2-C-Methyl-D-Erythritol 4-Phosphate
[3] Dimethylallyl Diphosphate
[4] Isopentenyl Diphosphate
[5] Geraniol 10-Hydroxylase
[6] Strictosidine synthase
[7] Tabersonine 16-Hydroxylase
[8] Acetyl CoA : Deacetylvindoline 17-O-Acetyltransferease

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.2.4.5]

آنزیم آنهیدروویوین‌بلاستین سینتاز (*AVLBS*[1])، α-۳،′۴،′۴- آنهیدروویوین‌بلاستین ساخته می‌شود، که در ادامه به وین‌بلاستین و وین‌کریستین تبدیل می‌شود (شکل۱) (El-Sayed and Verpoorte 2007a).

به دلیل آن که متابولیت‌های ثانویه نقش دفاعی در گیاهان بر عهده دارند، مقدار آنها در اثر اعمال محرک‌ها افزایش می‌یابد. اکثر کارهای انجام شده در چند سال گذشته، در گیاه *C. roseus* بر روی تنظیم تولید آلکالوئیدها، از طریق استفاده از پیش ماده‌ها، محرک‌ها و مهندسی متابولیک متمرکز شده است (El-Sayed and Verpoorte 2007a).

در رابطه با اثر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی (PGR[2]) در تولید آلکالوئیدهای ایندول ترپنوئیدی در گیاه پروانش تحقیقات زیادی انجام شده است. این ترکیبات تولید متابولیت‌های ثانویه را در این گیاه تحت تأثیر قرار می‌دهند (Decendit et al. 1992; Pasquali et al. 1992; El-Sayed and Verpoorte 2007a, b; Zhao and Verpoorte 2007; Roytrakul and Verpoorte 2007).

اتیلن به عنوان یکی از تنظیم کننده‌های رشد گیاهی، بسیاری از فرایندهای مراحل انتهایی گیاه مثل پیری، ریزش برگ، پژمردگی گل‌ها و رسیدگی میوه را بر عهده دارد. این ماده همچنین در طی تنش‌های محیطی افزایش می‌یابد (Kafi et al. 1384). نتایج مطالعات انجام شده در خصوص کاربرد تنظیم کننده‌های رشدی نظیر اتیلن در لاین‌های سلولی گیاه پروانش باعث افزایش اجمالیسین شد (Yahia et al. 1998). اتیلن همچنین باعث افزایش تولید اجمالسین، سرپنتین، تابرسونین، کاتارانتین و وین‌دولین شد (El-Sayed and Verpoorte 2004). تجمع اجمالسین در کشت سوسپانسیون سلولی به وسیله تیمار با متیل جاسمونات و اتیلن افزایش یافت. در کشت ریشه‌های موئین پروانش، اتیلن فقط باعث القای تجمع کاتارانتین شد. در کشت بخش هوایی، اتیلن و متیل جاسمونات باعث افزایش وین‌دولین شد. تیمار متیل جاسمونات و اتیلن، باعث افزایش فعالیت آنزیم تریپتوفان دی کربوکسیلاز (*TDC*[3])، در کشت سوسپانسیون سلولی شد (Vazquez-Flota et al. 2009).

پروانش سه ماه پس از جوانه زدن شروع به گلدهی می‌کند، که جهت استفاده تجاری جمع‌آوری می‌شود. از طرفی تیمار با اتیلن در طول دوره گلدهی باعث افزایش معنی‌داری در کاتارانتین، وین‌دولین و وین‌بلاستین، می‌شود (Pan et al. 2010). مکانیسم مولکولی تنظیم پیش ماده‌های ترپنی مسیر TIA، توسط اتیلن در طول مراحل مختلف رشدی گیاه هنوز ناشناخته مانده است (Hedhili et al. 2007). با توجه به نتایج فوق، گزارشی در رابطه با اثر اتیلن بر روی میزان بیان ژن‌ها در مرحله گلدهی وجود ندارد، لذا این تحقیق به منظور بررسی اثرات اتیلن بر میزان بیان چهار ژن *T16H*، *G10H*، *DAT* و *AVLBS* مسیر بیوسنتزی آلکالوئیدهای ایندول ترپنوئیدی در گیاه پروانش در مرحله گلدهی، با استفاده از تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در واحد زمان (qRT-PCR) انجام شد.

مواد و روش‌ها

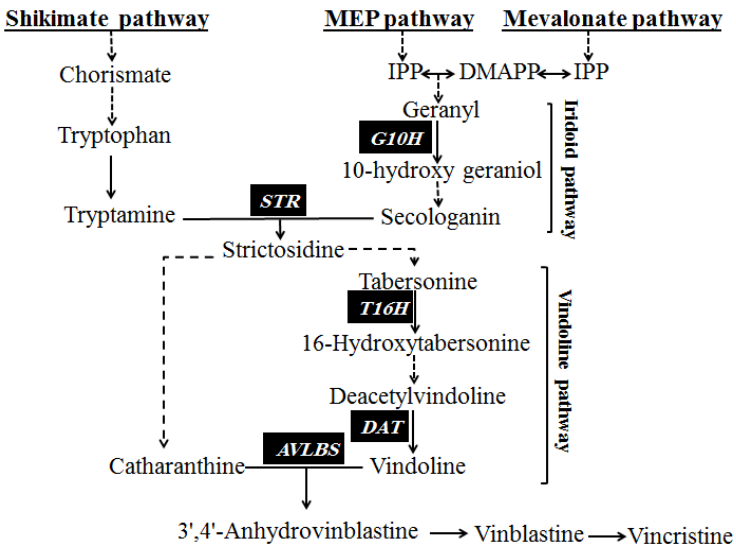
کاشت و تیمار گیاه پروانش با اتیلن

بذور F1 گیاه پروانش، واریته Vinca Pacifica × P. Burgundy از کمپانی Pan American Seed خریداری شد. بذور بر روی کاغذ صافی مرطوب در پتری دیش جوانه زده و سپس بذور جوانه زده به داخل لیوان یک‌بار مصرف حاوی ماسه، منتقل شد. گیاهان در شرایط گلخانه در دمای حدود ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد رشد کردند. از کود NPK ۲۰-۲۰-۲۰، حاوی عناصر میکرو برای تغذیه آنها استفاده شد.

جهت تیمار با اتیلن، ابتدا اتفن (به اتیلن شکسته می‌شود) (Sigma-Aldrich) در اتانول حل و سپس استوک یک مولار از آن تهیه شد. برای تیمار گیاهان، محلول یک مولار با آب رقیق، و غلظت ۰/۵ میلی‌مولار از آن تهیه شد. تیمار با اتفن سه ماه پس از کاشت و در مرحله‌ای که گیاه به گل رفته بود و غلاف‌ها تشکیل شده بودند، با اسپری بر روی تمام برگ‌های گیاه انجام شد. سپس در زمان‌های ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار، از بافت برگ گیاهان تیمار شده در هر زمان و شاهد آن در همان زمان، با سه تکرار، نمونه برداری انجام شد.

[1] Anhydrovinblastine synthase
[2] Plant growth regulator
[3] Tryptophan decarboxylase

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.2.4.5]



شکل۱- مسیر بیوسنتزی آلکالوئیدهای ایندول ترپنوئیدی در گیاه پروانش (ترسیم شده توسط نویسنده مسئول، بر اساس منابع ذکر شده). فلش‌های ممتد واکنش یک مرحله‌ای و فلش‌های منقطع واکنش چند مرحله‌ای.

استخراج RNA و ساخت cDNA

استخراج RNA کل به روش CTAB، با اندکی تغییرات، انجام شد (Gambino et al. 2008). به منظور به دست آوردن RNA خالص و عاری از DNA، RNAهای استخراج شده با استفاده از آنزیم DNase 1 شرکت Fermentas، طبق دستورالعمل شرکت سازنده تیمار شد. ساخت cDNA، با استفاده از الیگو dT شرکت Fermentas و کیت *AccuPower*® RT-PCR PreMix شرکت Bioneer، مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد.

انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در واحد زمان

توالی آغازگر ژن‌ها *DAT*، *G10H*، *T16H* بر اساس تحقیق Murata and De Luca (2005) ساخته شدند. طراحی آغازگر برای ژن‌ها *CrEF1α*، *AVLBS* توسط نرم‌افزار Primer Premier 3.0، از روی mRNA این ژن‌ها، انجام شد (جدول۱).

واکنش اصلی واکنش زنجیره ای پلیمراز در واحد زمان بر اساس برنامه بهینه شده، در ۴۰ چرخه، در دستگاه Applied Biosystems, 7300 Real time PCR system، با استفاده از کیت Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) شرکت Fermentas، مطابق جدول‌های ۲ و ۳ انجام شد.

تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در واحد زمان (qRT-PCR)، توسط نرم‌افزار REST-Version 2 انجام شد. برای هر زمان از نمونه تیمار شده، شاهد جداگانه‌ای از همان زمان در نظر گرفته شد و داده‌ها به صورت جفت شده مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. اختلاف معنی‌داری بین نمونه‌ها در دو سطح یک درصد و پنج درصد بررسی شد.

نتایج و بحث

در این آزمایش به منظور نرمال سازی داده‌ها، از ژن فاکتور طویل سازی (*CrEF1α*) به عنوان ژن خانه‌دار استفاده شد. این ژن به دلیل فعالیت نسخه‌برداری پایدارش مورد استفاده قرار گرفت.

اثرات تیمار با اتفن بر روی میزان بیان ژن *G10H*، در شکل۲ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که ۶ ساعت پس از تیمار، بیان این ژن نسبت به شاهد ۳/۸ برابر افزایش یافت. ۱۲ ساعت بعد از تیمار، بیان این ژن کاهش و به ۰/۶ میزان شاهد رسید. در ۲۴ ساعت بیان این ژن، افزایش ۱/۲ را نسبت به شاهد نشان داد. ۴۸ ساعت پس از تیمار میزان بیان کاهش ۰/۶ را، نسبت به شاهد نشان داد. در نهایت در ۷۲ ساعت بعد از تیمار این ژن افزایش ۸/۲ را نشان داد. همان‌طور که در شکل۲ مشاهده می‌شود، تنها در دو زمان ۶ و ۷۲ ساعت پس از تیمار، افزایش بیان با نمونه شاهد اختلاف معنی‌داری را به ترتیب در سطح یک درصد و پنج درصد نشان داد. بیشترین مقدار بیان مربوط به ۷۲ ساعت با میزان افزایش ۸/۲ برابری در مقایسه با شاهد بود. روند تغییرات

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.2.4.5]

جدول۱- لیست آغازگرهای استفاده شده جهت بررسی بیان ژن

نام ژن و آغازگر	توالی آغازگر	طول قطعه (جفت باز)	Accession Number
CrEF1α آغازگر رفت	5'- TGGGTTTGAGGGAGACAACA-3'	۱۸۴	EU007436
CrEF1α آغازگر برگشت	5'- AACACGACCAACAGGGACAGT-3'		
DAT آغازگر رفت	5'- GTGCGTATCCGTTGGTTTCT-3'	۱۷۰	DQ778074
DAT آغازگر برگشت	5'-CGAACTCAATTCCATCGTCA-3'		
T16H آغازگر رفت	5'-GCTTCATCCACCAGTTCCAT-3'	۲۴۲	FJ647194
T16H آغازگر برگشت	5'- CCGGACATATCCTTCTTCCA-3'		
AVLBS آغازگر رفت	5'-GCGTGCATAGTAGATGTGGG-3'	۲۱۸	AM236087
AVLBS آغازگر برگشت	5'-GAAATTCTTGGTTGCGAGTG-3'		
G10H آغازگر رفت	5'- GGTAGCCTCACGATGGAGAA-3'	۲۴۸	AJ251269
G10H آغازگر برگشت	5'-CCTTGGCAGAATCCGAATAA-3'		

جدول۲- غلظت و حجم بهینه‌شده اجزای واکنش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در واحد زمان بر روی نمونه‌های cDNA

نام ماده	مقدار (میکرو لیتر)
Master Mix (2x)	۱۲/۵
آب عاری از Nuclease	۱۰/۷
آغازگر رفت (۱۰ پیکو مول)	۰/۴
آغازگر برگشت (۱۰ پیکو مول)	۰/۴
cDNA	۱
حجم کل	۲۵

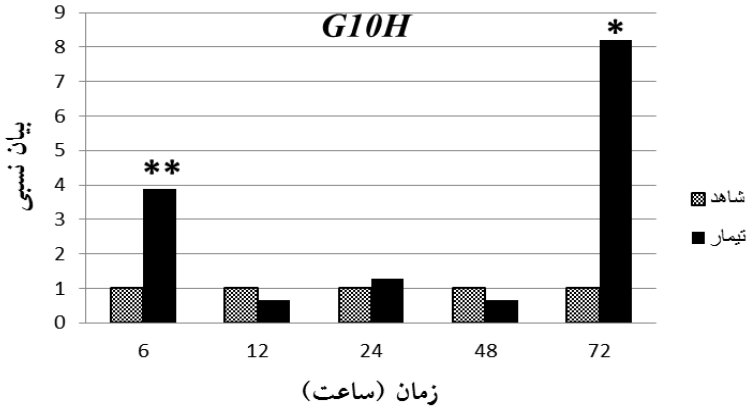
جدول ۳- چرخه دمایی بهینه شده واکنش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در واحد زمان

مرحله	دما (درجه سانتی‌گراد)	زمان
واسرشت اولیه	۹۵	۱۰ دقیقه
واسرشت ثانویه	۹۵	۱۵ ثانیه
اتصال	۶۰	۲۰ "
بسط	۷۲	۳۰ "

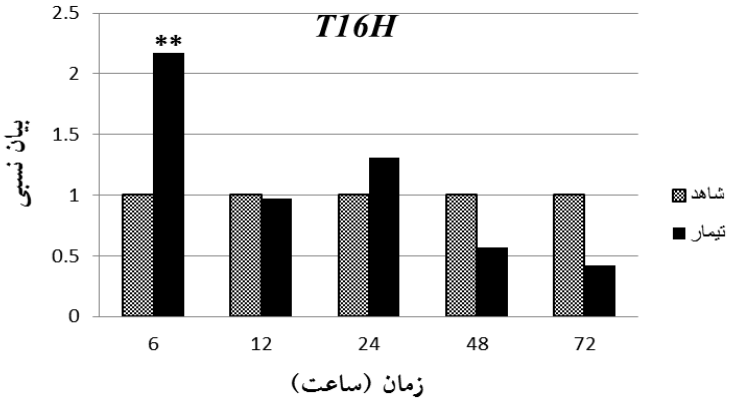
همان‌گونه که در شکل مشخص است، ابتدا افزایش بیان در ۶ ساعت و سپس کاهش بیان در ۱۲ ساعت و این روند تا ۴۸ ساعت ادامه داشت. در زمان ۷۲ ساعت پس از تیمار روند بیان، با افزایش ناگهانی روبه رو شد.

مطابق شکل ۳ در ۶ ساعت پس از تیمار بیان ژن *T16H* افزایش ۲/۱ را نسبت به شاهد نشان داد. در ۱۲ ساعت میزان بیان این ژن، کاهش و به ۰/۹۷ شاهد رسید. در ۲۴ ساعت پس از تیمار، میزان بیان، افزایش ۱/۳ برابری را نشان داد. در ۴۸ ساعت پس از تیمار، بیان این ژن کاهش و به نصف میزان شاهد رسید. در ۷۲ ساعت مجدداً میزان بیان، کاهش ۰/۴ را نسبت به شاهد نشان داد. با توجه به شکل۳ مشخص می‌شود که تنها در زمان ۶ ساعت پس از تیمار اتفن ژن *T16H* افزایش معنی داری را نسبت به شاهد در سطح یک درصد نشان داده است و در سایر زمان‌ها تغییرات بیان این ژن معنی‌داری نبود. نتیجه روند تغییرات بدین شکل بود که، در ۶ ساعت افزایش بیان و در ۱۲ ساعت بیان کاهش یافت. در سایر زمان‌ها روند بیان تقریبا ثابت و با تغییرات اندکی، همراه بود.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.2.4.5]



شکل۲- بیان نسبی ژن *G10H* تحت تیمار با اتفن در زمان‌های مختلف. * و ** به ترتیب اختلاف معنی‌دار در سطوح پنج و یک درصد.

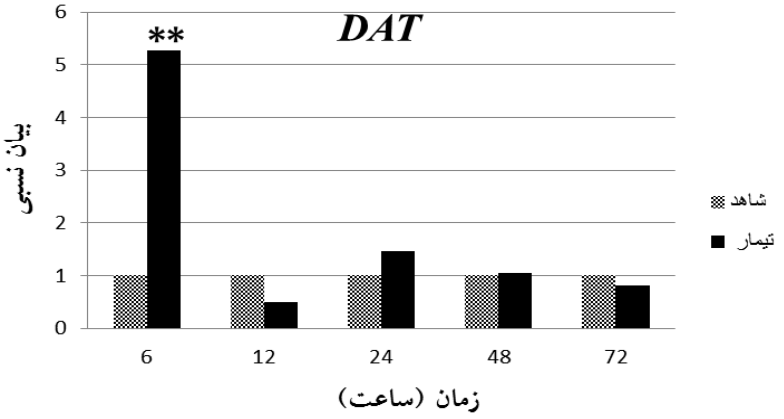


شکل ۳- بیان نسبی ژن *T16H* تحت تیمار با اتفن در زمان‌های مختلف. ** سطح معنی‌داری یک درصد.

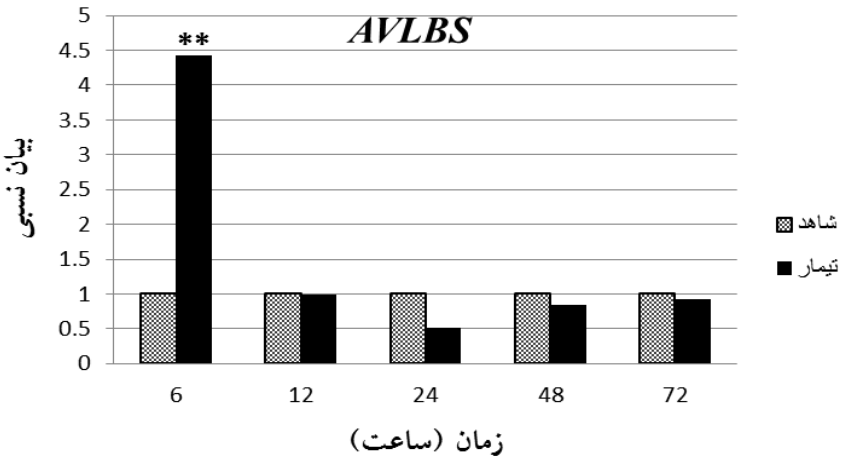
مطابق شکل۴، بیان ژن *DAT* در ۶ ساعت پس از تیمار ۵/۲ برابر شاهد می‌باشد. پس از ۱۲ ساعت میزان بیان این ژن، به نصف شاهد رسید. در ۲۴ ساعت بعد از تیمار، میزان بیان در مقایسه با شاهد افزایش ۱/۴ را نشان داد. در ۴۸ ساعت میزان بیان این ژن افزایش ۱/۰۵ را نسبت به شاهد نشان داد. در زمان ۷۲ ساعت سطح بیان این ژن کاهش و به ۰/۸ شاهد خود رسید. مطابق شکل ۴ بیشترین میزان بیان در ۶ ساعت، و کمترین میزان بیان مربوط به ۱۲ ساعت پس از تیمار بود. در بین زمان‌های مختلف، تنها در ۶ ساعت، بیان ژن DAT در نمونه تیمار شده نسبت به شاهد اختلاف معنی داری را در سطح یک درصد نشان داد و در سایر زمان‌ها اختلاف معنی‌داری بین نمونه شاهد و تیمار شده مشاهده نشد. همان‌طور که در شکل ۴ دیده می‌شود روند تغییرات این‌گونه بود که در ۶ ساعت میزان بیان افزایش و سپس در ۱۲ ساعت بیان، کاهش یافت و در سایر زمان‌ها تقریبا از روند ثابتی پیروی کرد.

اثرات تیمار با اتفن بر روی میزان بیان ژن *AVLBS*، در شکل ۵ نشان داده شده است. در ۶ ساعت پس از تیمار سطح بیان این ژن در گروه تیمار شده، افزایش ۴/۴ برابری نسبت به گروه شاهد را نشان داد. در ۱۲ ساعت پس از تیمار میزان بیان، در نمونه تیمار شده، کاهش و به ۰/۹۹۶ میزان شاهد رسید. ۲۴ ساعت پس از نمونه‌برداری میزان بیان، به نصف مقدار شاهد خود کاهش پیدا کرد. در زمان ۴۸ ساعت پس از نمونه‌برداری میزان بیان *AVLBS*، ۰/۸ مقدار شاهد خود بود. در ۷۲ ساعت سطح بیان تقریبا با شاهد برابر بود.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.2.4.5]



شکل۴- بیان نسبی ژن *DAT* تحت تیمار با اتفن در زمان‌های مختلف. ** سطح معنی‌داری یک درصد.



شکل۵- بیان نسبی ژن *AVLBS* تحت تیمار با اتفن در زمان‌های مختلف. ** سطح معنی‌داری یک درصد.

بیشترین و کمترین میزان نسبی بیان به ترتیب، مربوط به ۶ و ۲۴ ساعت بود. از بین زمان‌های مذکور مشابه سایر ژن‌ها، تنها در ۶ ساعت پس از تیمار اتفن، اختلاف معنی‌داری بین نمونه شاهد و تیمار شده در سطح یک درصد مشاهده شد. روند تغییرات بیان این ژن، در زمان‌های مختلف مشابه به دو ژن *T16H*، *DAT* بود. مطالعات اخیر نشان داده که اتیلن و زآتین اثر سینرژیستی قوی در فعال‌سازی سطح بیان ژن *G10H* داشتند (Papon et al. 2005) نتایج این تحقیق هم مشخص کرد که ژن *G10H* در دو زمان ۶ و ۷۲ ساعت در تیمار با اتیلن دارای افزایش معنی‌داری نسبت به گیاه شاهد بوده است که نشان می‌دهد که این ژن یکی از ژن‌ها پاسخ‌دهنده به اتیلن می‌باشد.

El-Sayed and Verpoorte (2004) گزارش کردند که فعالیت پراکسیدازهای بازی در پروانش در تیمار با اتیلن افزایش پیدا می‌کند. آنهیدروویین‌بلاستین سینتاز جزء دسته پراکسیدازهای بازی است. همچنین با بلاست توالی آمینو اسیدی ژن *CrPrx1* (ژن کد کننده آنزیم آنهیدروویین‌بلاستین سینتاز)، مشخص شده است که توالی آمینو اسیدی این ژن، بیشترین شباهت را به پراکسیدازهای *Nicotiana tabacum*، *Lycopersicum esculentum* و پراکسیداز

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.2.4.5]

بازی *Vigna angularis* (توسط اتیلن القا می‌شود)، را دارد (Costa et al. 2008). نتایج این تحقیق هم نشان‌دهنده این بود (شکل۵) که تیمار با اتیلن باعث افزایش سطح بیان ژن *AVLBS* در ۶ ساعت شد.

همان‌طور که روند تغییرات بیان ژن‌ها *G10H*، *T16H*، *DAT* و *AVLBS* نشان داد، ابتدا افزایش سطح بیان در ۶ ساعت اتفاق افتاد. پس از آن در ۱۲ ساعت بیان آنها کاهش یافت به جز ژن *G10H* که در ۷۲ ساعت هم افزایش بیان داشت، سایر ژن‌ها از ۱۲ ساعت به بعد از روند ثابتی پیروی کردند. Pauw et al. (2004) دریافتند که تحریک به وسیله عصاره مخمر در پروانش باعث افزایش بیان همزمان فاکتورهای رونویسی، *ORCA* (فعال‌کننده) و *ZCT* (مهارکننده)، می‌شود. همچنین نتایج تحقیقات Suttipanta (2011) مشخص کرد که افزایش بیان فاکتور رونویسی *CrWRKY2* (که در پاسخ به متیل جاسمونات افزایش بیان داشت)، در کشت ریشه‌های موئین گیاه پروانش باعث افزایش سطح نسخه‌برداری، فاکتور رونویسی فعال کننده (*ORCA3*)، و مهارکننده (*ZCT*) می‌شود. القای همزمان فاکتورهای رونویسی فعال کننده و مهار کننده ممکن است، جهت تغییر خاموش و روشن شدن بیان ژن‌ها در پاسخ به محرک‌ها ضروری باشد (Pauw et al. 2004). با توجه به نتایج این احتمال وجود دارد که، تیمار با اتیلن باعث القای همزمان فاکتورهای رونویسی فعال کننده و مهار کننده می‌شود و سپس به طریقی که مکانیسم آن ناشناخته است، در ابتدا فعال کننده‌ها باعث افزایش بیان همزمان ژن‌ها در ۶ ساعت می‌شوند. سپس نوبت به مهار کننده‌ها می‌رسد که سطح بیان ژن‌ها را در ۱۲ ساعت پس از تیمار کاهش داده و باعث بازگشت مسیر بیوسنتزی به حالت تعادل شوند.

ژن‌ها *T16H*، *DAT* و *AVLBS* از روند بیان مشابهی در تیمار با اتفن پیروی کردند. اما ژن *G10H*، در ۷۲ ساعت پس از تیمار با افزایش بیان ناگهانی، روبه رو شد. به نظر می‌رسد در مقایسه با توالی شناخته شده در پیشبر ژن‌های مسیر بیوسنتزی آلکالوئیدهای ایندول ترپنوئیدی مانند *TDC* و *STR*، برخی عناصر همسوساز که در پیشبر ژن *G10H* وجود دارند، منحصر به فرد عمل می‌کنند. این اجزا شامل جعبه W، توالی شناسایی شونده توسط عوامل رونویسی MYB، جعبه AT و جعبه P است. وجود این عناصر همسو ساز جدید حاکی از آن است که پیشبر ژن *G10H* ممکن است به وسیله آبشار نسخه‌برداری متفاوتی تنظیم شود (Suttipanta et al. 2007).

نتایج تحقیق Pan et al. (2010) نشان داد که تیمار با اتفن منجر به افزایش معنی‌دار میزان تولید وین بلاستین و پیش‌ماده‌های آن یعنی وین دولین و کاتارانتین، در ۲۴ ساعت پس از تیمار در مرحله گلدهی می‌شود. نتایج این تحقیق نشان داد که ژن‌های *G10H*، *T16H*، *DAT* و *AVLBS* در ۶ ساعت پس از تیمار با اتفن افزایش بیان داشتند. اینگونه به نظر می‌رسد که با افزایش بیان این ژن‌ها در ۶ ساعت مدتی زمان لازم است تا این ژن‌ها بتوانند اثر خود را بر روی تولید متابولیت بگذارند و تولید آنها را افزایش دهند. البته الگوی کلی تغییرات در تولید متابولیت‌ها در نتایج Pan et al. (2010) اینگونه بود که در ۲۴ ساعت میزان تولید متابولیت‌ها افزایش‌یافت و در ۴۸ ساعت با کاهش روبرو شد و در ۷۲ ساعت پس از تیمار میزان تولید متابولیت گفته شده مجددا افزایش پیدا کرد. با توجه به الگوی بیان ژن‌ها، احتمالا ژن *G10H* در افزایش تولید متابولیت ها در ۷۲ ساعت نقش دارد و ژن‌های *T16H*، *DAT* و *AVLBS* در آن نقشی ندارند.

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که اتیلن اثر خود را از طریق ژن‌ها *G10H*، *T16H*، *DAT* و *AVLBS* بر روی مسیر بیوسنتزی آلکالوئیدهای ایندول ترپنوئیدی در گیاه پروانش می‌گذارد. روند بیان سه ژن *T16H*، *DAT* و *AVLBS* مشابه بود، ولی ژن *G10H* از روند بیان متفاوتی پیروی کرد. در بین این ژن‌ها *G10H*، در دو زمان شش و هفتاد دو ساعت افزایش بیان داشت. به نظر می‌رسد این ژن بیشتر تحت‌تاثیر اتیلن قرار می‌گیرد.

تقدیر و تشکر

با تشکر از آقایان محمد زارع، محمد خلیلی، سیدرضا هاشمی، محسن علی‌پور، محمدحسن جعفری و کلیه کسانی که در این کار با ما همکاری داشتند.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.2.4.5]

منابع

Atta UR, Basha A, Ghazala M (1976) Synthetic studies towards anti leukaemic alkaloids, VII- the partial synthesis of vinblastine and vincristine. Tetrahedron Letters 17: 2351-2354.

Costa MMR, Hilliou F, Duarte P, Pereira LG, Almeida I, Leech M, Memelink J, Barcelo AR, Sottomayor M (2008) Molecular Cloning and Characterization of a Vacuolar Class III Peroxidase Involved in the Metabolism of Anticancer Alkaloids in *Catharanthus roseus*. Plant Physiology 146:403-417.

De Luca V, Laflamme P (2001) The expanding universe of alkaloid biosynthesis. Current Opinion in Plant Biology 4:225-233.

Decendit A, Liu D, Ouelhazi L, Doireau P, Merillon JM, Rideau M (1992) Cytokini enhanced accumulation of indole alkaloids in *Catharanthus roseus* cell cultures: the factors affecting the cytokinin response. Plant Cell Reports 11:400-403.

El-Sayed M, Verpoorte R (2004) Growth, metabolic profiling and enzymes activities of *Catharanthus roseus* seedlings treated with plant growth regulators. Plant Growth Regulation 44:53-58.

El-Sayed M, Verpoorte R (2007a) *Catharanthus* terpenoid indole alkaloids: biosynthesis and regulation. Phytochemistry Reviews 6:277-305.

El-Sayed M, Verpoorte R (2007b) Influence of growth retardants on serpentine accumulation in *Cathranthus roseus* cell suspensions cultures. American Journal of Plant Physiology 2:373-377.

Endt DV, Kijne JW, Memelink J (2002) Transcription factors controlling plant secondary metabolism: what regulates the regulators? Phytochemistry 61:107-114.

Gambino G, Perrone I, Gribaudo I (2008) A Rapid and Effective Method for RNA Extraction from Different Tissues of Grapevine and Other Woody Plants. Phytochemical Analysis 19: 520-525.

Hedhili S, Courdavault V, Giglioli-Guivarch N, Gantet P (2007) Regulation of the terpene moiety biosynthesis of *Catharanthus roseus* terpene indole alkaloids. Phytochemistry Reviews 6:341-351.

Kafi M, Kamkar B, Sharifi H, Goldani M (1384) Plant physiology. Mashhad ACECR Press, Mashhad, Iran. (In Farsi)

Kutney JP (1977) Studies on the total synthesis of bisindole alkaloids in the vinblastine-vincristine series. Lloydia 40: 107-126.

Loyola-Vargas VML, Rosa M, Avalos G, KuCauich R (2007) *Catharanthus* biosynthetic enzymes: the road ahead. Phytochemistry Reviews 6:307-339.

Mukherjee AK, Basu S, Sarkar N, Ghosh AC (2001) Advances in cancer therapy with plant based natural products. Current Medicinal Chemistry 8:1467-1486.

Murata J, De Luca V (2005) Localization of tabersonine 16-hydroxylase and 16-OH tabersonine-16-O-methyltransferaseto leaf epidermal cells defines them as a major site of precursor biosynthesis in the vindoline pathway in *Catharanthus roseus*. Plant Journal 44:581-594.

Oudin A, Courtois M, Rideau M, Clastre M (2007) The iridoid pathway in *Catharanthus roseus* alkaloid Biosynthesis. Phytochemistry Reviews 6:259-276.

Pan Q, Chen Y, Wang Q, Yuan F, Xing SH, Tian Y, Zhao J, Sun X, Tang K (2010) Effect of plant growth regulators on the biosynthesis of vinblastine, vindoline and catharanthine in *Catharanthus roseus*. Plant Growth Regulation 60:133-141.

Papon N, Bremer J, Vansiri A, Andreu F, Rideau M, Creche J (2005) Cytokinin and ethylene control indole alkaloid production at the level of the MEP/terpenoid pathways in *Catharanthus roseus* suspension cells. Planta Medica 71:572-574.

Pasquali G, Goddijn OJM, de-Wall A, Verpoorte R, Schilperoort RA, Hoge JHC, Memelink, J (1992) Coordinated regulation of two indole alkaloid biosynthetic genes from *Catharanthus roseus* by auxin and elicitors. Plant Molecular Biology 18:1121-1131.

Pauw B, Hilliou FAO, Martin VS, Chatel G, Wolf CJF, Champion A, Pre M, Duijn BV, Kijne JW, van der Fits L, Memelink J (2004) Zinc Finger Proteins Act as Transcriptional Repressors of Alkaloid Biosynthesis Genes in *Catharanthus roseus*. Journal of Biological Chemistry 279: 52940-52948.

Roytrakul S, Verpoorte R (2007) Role of vacuolar transporter proteins in plant secondary metabolism: *Catharanthus roseus* cell culture. Phytochemistry Reviews 6:383-396.

Scott A (1979) Biosynthesis of indole alkaloids. Accounts of Chemical Research 3:151.

Suttipanta N (2011) Characterzation of G10H Promoter and Isolation of WRKY Transcription factors Involved In *Catharanthus* Terpenoid Indole Alkaloid Biosynthesis Pathway. Dissertation, University of Kentucky, USA.

Suttipanta N, Pattanaik S, Gunjan S, Xie CH, Littleton J, Yuan L (2007) Promoter analysis of the *Catharanthus roseus* geraniol 10-hydroxylase gene involved in terpenoid indole alkaloid biosynthesis. Biochimica et Biophysica Acta 1769: 139-148.

Svoboda GH, Blake DA (1975) The phytochemistry and pharmacology of *Catharanthus roseus* (L) G. Don. In: Taylor WI, Farnsworth NR, eds. The catharanthus alkaloids. New York, NY: Marcel Dekker. 45-83.

Van der Fits L, Memelink J (2000) ORCA3, a jasmonate responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism. Science 289:295-297.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.2.4.5]

alkaloid accumulation in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus* by two distinct mechanisms. Plant Science 133:9-15.

Zhao J, Verpoorte R (2007) Manipulating indole alkaloid production by *Catharanthus roseus* cell cultures in bioreactors: from biochemical processing to metabolic engineering. Phytochemistry Reviews 6:435-457.

Van der Heijden R, Jacobs DI, Snoeijer W (2004) The *Catharanthus* alkaloids: Pharmacognosy and biotechnology. Current Medicinal Chemistry 11:1241-1253.

Vazquez-Flota F, Hernandez-Domınguez E, Miranda-Ham MDL, Monforte M (2009) A differential response to chemical elicitors in *Catharanthus roseus* in vitro cultures. Biotechnology Letters 31:591-595.

Yahia A, Kevers C, Gaspar T, Chenieux J, Rideau M, Creche J (1998) Cytokinins and ethylene stimulate indole

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.2.4.5]