ژنتیک نوین
دوره شانزدهم، شماره ۱، بهار ۱۴۰۰
صفحه ۳۲ - ۲۵

بررسی میزان رونویسی برخی ژن‌های مسیر آلکالوئید ایندول ترپنوئیدی پروانش (*Catharanthus roseus*) پس از محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک

Expression analysis of some genes involved in Terpenoid Indole Alkaloids pathway in periwinkle (*Catharanthus roseus*) following foliar application of salicylic acid

نرگس سلطانی[۱]، فرهاد نظریان فیروزآبادی*[۱]، علیرضا شافعی‌نیا[۲]، آیه‌سادات صدر[۳]، مسعود شیرعلی[٤]

۱- به‌ترتیب دانشجوی دوره دکتری، استاد، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران
۲- استادیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، اهواز، ایران
۳- استادیار، پژوهشکده آبزی پروری جنوب کشور، موسسه‌ی تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران
٤- محقق ارشد، موسسه‌ی تحقیقات کشاورزی، غذا و علوم زیستی، هیلزبرا، انگلستان و استادیار دانشگاه بلفست، بلفست، انگلستان

Soltani N[1], Nazarian-Firouzabadi F[*1], Shafeinia A[2], Sadr AS[3], Shirali M[4]

1- PhD candidate and Professor respectively, Production Engineering and Plant Genetic Department, Faculty of Agriculture, University of Lorestan, Khorramabad, Iran

2- Assistant professor, Production Engineering and Plant Genetic Department, Khuzestan Agricultural Sciences and Natural Resources University, Iran

3- Assistant professor, Aquaculture Research Center-South of Iran, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Ahvaz, Iran

4- Senior Quantitative Geneticist and Project leader, Agri-Food and Biosciences Institute, Hillsborough, UK and Assistant professor, School of Biological Sciences, Queen's University Belfast, Belfast, UK

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی:nazarian.f@lu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۹/۰۳/۰٦ - تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۹/۱۸)

چکیده

پروانش گیاه زینتی و همیشه سبز است که به واسطه‌ی دو ترکیب آلکالوئیدی مهم وین‌بلاستین و وین‌کریستین در درمان بیماری سرطان کاربرد دارد و از اهمیت بسزایی در صنعت داروسازی برخوردار است. وین‌بلاستین و وین‌کریستین در مسیر ترپنوئید ایندول آلکالوئیدی[۱] (TIAs) به میزان کم در گیاه پروانش ساخته می‌شوند. فراهم نبودن شرایط تولید این دو ماده به‌صورت شیمیایی و نیز میزان تولید پایین در گیاه سبب شده راهکارهای عملی افزایش در مقدار این دو آلکالوئید از اهمیت اقتصادی بالایی برخوردار باشد. به‌نظر می‌رسد که برخی محرک‌های رشد چون اسید سالیسیلیک به‌توانند در افزایش این ترکیبات مؤثر باشند، در واقع اسید سالیسیلیک موجب فعال شدن سیستم دفاعی گیاه می‌شود و کاربرد آن در شرایط عادی و در برخورد با تنش‌ها موجب بهبود عملکرد و افزایش محتوای کلی آلکالوئیدهای وین‌بلاستین و وین‌کریستین می‌شود. به‌همین دلیل در این پژوهش، به بررسی میزان بیان نسبی ژن‌های مسیر TIAs در هر سه مسیر ایندولی، ترپنوئیدی و آلکالوئیدی در طی محلول‌پاشی برگی اسید سالیسیلیک به‌غلظت ۰/۰۱ mM با استفاده از روش qRT-PCR پرداخته شد. نتایج این مطالعه نشان داد که محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک سبب کاهش میزان رونویسی ژن سنتزکننده‌ی کوریسمات موتاز (*Cm*) که اولین ژن در مسیر فنولیکی و در رقابت با مسیر TIAs است، شد. با این حال، این میزان کاهش از نظر آماری معنی‌دار نبود. همچنین در پژوهش حاضر میزان رونویسی ژن‌های مسیر TIAs در اثر محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. بیشترین میزان رونویسی ژن *Dat* در زمان‌های ۲٤ و ٤۸ ساعت پس از محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی

اسید سالیسیلیک
بیان نسبی ژن
پروانش
مسیر TIAs

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

[DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.1.9.7]

مقدمه

پروانش با نام علمی *Catharanthus roseus* متعلق به خانواده‌ی Apocynaceae یکی از شناخته شده‌ترین گیاهان دارویی- زینتی در علم داروسازی است (Nejat et al. 2015; Sain and Sharma 2013). مواد فنولیک و آلکالوئیدی دو ترکیب اصلی در این گیاه می‌باشند (Nejat et al. 2015) آلکالوئیدهای پروانش از اهمیت دارویی بالاتری برخوردار هستند و در اندام‌های سبز و ریشه آن وجود دارند، در این بین دو آلکالوئید وین‌بلاستین[1] و وین‌کریستین[2] موجود در برگ، دارای خاصیت ضد توموری هستند که سبب توقف میتوز در سلول‌ها و در نهایت مرگ سلول می‌شوند (Alam et al. 2017; Nejat et al. 2015; Sandeep et al. 2014). آلکالوئیدهای پروانش در مسیر آلکالوئید ایندول ترپنوئیدی (TIAs) ساخته می‌شوند این مسیر متشکل از سه مسیر ایندولی، ترپنوئیدی و آلکالوئیدی است (Sun et al. 2016). فراورده‌های حاصل از فعالیت ژن‌های مسیرهای ترپنوئیدی (سکولوگانین[3]) و ایندولی (تریپتامین[4]) در نهایت با فعالیت آنزیم استریکتوزیدین سینتاز[5] وارد مسیر سنتز آلکالوئیدها می‌شوند (Liu et al. 2016; Shukla and Khanuja 2013; Sun et al. 2016). مسیر TIAs، مسیری القاپذیر است به‌نحوی که بیان ژن‌های آن، در اثر تنش‌ها و یا کاربرد محرک‌ها تحت تأثیر قرار می‌گیرد، همچنین تغییر در بیان ژن‌های آن موجب تغییر در میزان بیان سایر ژن‌های پایین‌دستی و نیز فرآورده‌های نهایی آن‌ها می‌شود. به عنوان مثال، بیش‌بیان[6] ژن‌های کدکننده‌ی آنزیم‌هایی چون آنترانیلیت سینتاز[7] (Sun et al. 2016)، ژرانیول ۱۰- هیدروکسیلاز[8] (Pan et al. 2012) و داستیل ویندولین ٤-اُ- استیل ترنسفراز[9] (Wang et al. 2012) سبب افزایش میزان رونویسی ژن‌های پایین‌دستی و در نهایت تولید آلکالوئیدهای ارزشمند دارویی می‌شود. پایین بودن میزان سنتز و نیز مشکلات خالص‌سازی آلکالوئیدهای دارویی پروانش به‌همراه هزینه‌های بالای تولید آن‌ها، یکی از بزرگترین مشکلات پیش‌روی صنعت داروسازی در بهره‌برداری از این ترکیبات است (Carqueijeiro et al. 2013; Sun et al. 2016; Wang et al. 2012) از این‌رو شناسایی محرک‌هایی که میزان تولید این آلکالوئیدها را تحت تأثیر قرار دهد، از اهمیت بالایی برخوردار است. اسید سالیسیلیک یکی از این محرک‌هایی است که موجب القای فعالیت سیستم دفاعی گیاه در برخورد با تنش‌ها می‌شود (Idrees et al. 2011b, 2013; Kaur et al. 2017). برای مثال، محلول‌پاشی برگی اسید سالیسیلیک در پروانش، نه تنها موجب کاهش اثرات نامطلوب تنش شوری و بهبود عملکرد شد بلکه محتوای آلکالوئیدهای وین‌بلاستین و وین‌کریستین را نیز افزایش داد (Idrees et al. 2011b). همچنین بررسی اثر محلول‌پاشی برگی اسید سالیسیلیک در پروانش طی تنش آبی[10] و تنش فلز سمی نیکل منجر به نتایج مشابه در گیاهچه‌های تحت تیمار اسید سالیسیلیک شد (Idrees et al. 2011a; Idrees et al. 2013). تأثیر تیمارهای خشکی (۷ روز)، شوری (۱۵۰mM)، محلول‌پاشی اسیدسالیسیلیک (10^{-5}M) و محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک به‌همراه تیمار خشکی و شوری بر بیان ژن‌های کدکننده‌ی آنزیم‌های *Dat* و *D4h*[11] موجود در مسیر آلکالوئید ایندول ترپنوئیدی با استفاده از روش qRT- PCR بررسی شد، نتایج این مطالعه نشان داد که تیمارهای شوری، خشکی به‌همراه اسید سالیسیلیک و شوری به‌همراه اسید سالیسیلیک سبب افزایش بیان ژن‌های *D4h* و *Dat* شد (Mokhaberi et al. 2015). در مطالعه‌های انجام شده در زمینه‌ی مقایسه تأثیر محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک در مقایسه با سایر الیسیتورها (متیل جاسمونات، اسید جیبرلیک، اسید آبسزیک) مشخص شد میزان تأثیر اسید سالیسیلیک در مقدار کاتارانتین[12] و وین‌دولین (دو پیش‌ساز وین‌بلاستین و وین‌کریستین) بیشتر از سایرین بوده است (Pan et al. 2010). همچنین مقایسه میان دو الیسیتور اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک نشان داد که اسید سالیسیلیک تأثیر به مراتب بیشتری را در پی داشته‌است (Pakniyat et al. 2012).

[1] Vinblastine
[2] Vincristine
[3] Secologanin
[4] Tryptamine
[5] Strictosidine synthase (STR)
[6] Overexpression
[7] Anthranilate synthase (AS)
[8] Geraniol 10- hydroxylase (G10H)
[9] Deacetyvindoline 4-O-acetyl transferase (DAT)
[10] Water stress
[11] Desacetoxyvindolin 4-hydroxylase
[12] Catharanthine

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.1.9.7]

مسیرTIAs متشکل از سه مسیر جداگانه است و اطلاع از وضعیت بیان هر یک از ژن‌های ابتدایی یا انتهایی هر کدام از سه مسیر و مطالعه بر روی آن‌ها از اهمیت بسزایی برخوردار است. در این مسیر نیز همچون سایر مسیرهای آبشاری دیگر، افزایش یا کاهش در بیان ژن‌های بالادست، تغییر در بیان ژن‌های پایین‌دستی و تولید آلکالوئیدهای مورد نظر را به دنبال دارد به‌همین سبب در پژوهش حاضر، بیان ژن‌های هریک از سه مسیر ترپنوئیدی (*G10h* و *Sls*[1])، ایندولی (*Tdc*[2])، آلکالوئیدی (*Dat*) و نیز اولین ژن در مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها و فنیل پروپانوئیدهای گیاه پروانش (*Cm*[3])، تحت تاثیر محلول‌پاشی برگی اسید سالیسیلیک مورد مطالعه قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

بذرهای گیاه پروانش از شرکت Pan American خریداری، کشت و در گلدان‌های با ابعاد ۱۰ cm قطر و ۱۰ cm ارتفاع نگهداری شدند. گلدان‌های حاوی گیاهچه‌های پروانش در اتاقک رشد در شرایط دمایی ۲۵ °C، ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی (Carqueijeiro et al. 2013) ($\mu mol\ m^{-2}s^{-1}$) و ۷۰ درصد رطوبت نگه‌داری شدند. محلول‌پاشی ۰/۰۱ mM اسید سالیسیلیک در مرحله‌ی گلدهی گیاهچه‌های پروانش (Nejat et al. 2015) در قالب طرح آزمایشی کاملاً تصادفی صورت گرفت و نمونه‌برداری از برگ سوم و چهارم گیاهچه‌ها (Roepke et al. 2010) در زمان‌های صفر، ۱۲، ۱۸، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از پاشش در سه تکرار بیولوژیک (سه گیاه پروانش هر یک در گلدان‌های جداگانه برای هر تیمار زمانی) انجام شد.

استخراج RNAی کل از برگ‌های هر تیمار بر اساس دستورکار شرکت سازنده (کیت شرکت NEB به شماره T2010S) انجام شد. تعیین کمیت و کیفیت RNA استخراجی به‌وسیله‌ی دستگاه نانودراپ و الکتروفورز ژل آگارز یک درصد صورت گرفت. ساخت اولین رشته‌ی cDNA با استفاده از کیت ساخت cDNA (شرکت NEB به شماره E6300S) از ۵۰۰ ng RNA بر اساس دستورکار شرکت سازنده و استفاده از آغازگر الیگو dt در حجم نهایی ۲۰ µL انجام شد و cDNA ساخته شده برای انجام آزمایش‌های بعدی در فریزر ۲۰°C- نگه‌داری شد.

طراحی آغازگرهای مربوط به ژن‌های کدکننده‌ی آنزیم‌های G10H، SLS، TDC، DAT و RSP9[4] (به‌عنوان ژن مرجع[5]) با استفاده از نرم‌افزارهای oligo و Primer 3 plus صورت گرفت (جدول ۱). همچنین برای بررسی بیان ژن کدکننده‌ی *Cm* از آغازگر طراحی شده توسط Sun et al. (2016) استفاده شد.

[1] Secologanin synthase
[2] Tryptophan decarboxylase
[3] Chorismate mutase
[4] RSP9 40S ribosomal protein S9
[5] Reference gene

جدول ۱- نام، توالی و دمای اتصال آغازگرهای مورد استفاده برای واکنش qRT- PCR به‌همراه طول قطعه محصول PCR

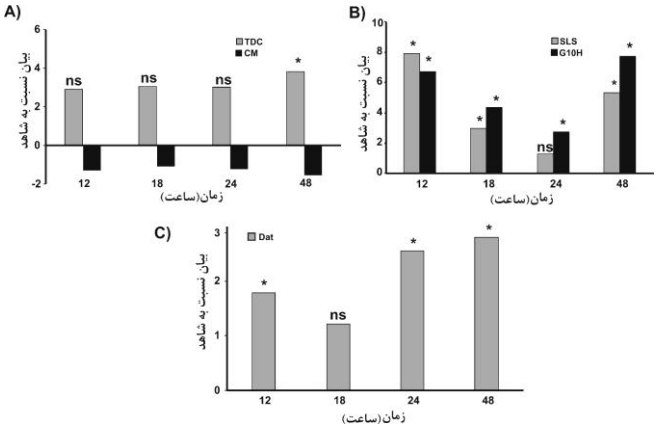
نام آغازگر	توالی آغازگر	شماره دسترسی	دمای اتصال (°C)	طول قطعه (bp)
Cm	F: GGGTGATGCCTTTAACCAAA R: GCGACATTGTATCGTGAAGC	FD419102.1	۶۰	۱۵۹
Dat	F: AGCACAAATGGAAGAGTTCG R: AGGGTTGAAACAAGCATACC	LN809930.1	۶۰	۱۵۸
Sls	F: CACGAGGACACAAAGTTAGG R: TTGTTCTTGGTGGCATTGG	KF415117.1	۶۰	۱۶۱
Tdc	F: CCTGTATATGTCCCGAGTTTAG R: TCGTAGTGAGTGCCCTTAG	X67662.1	۶۰	۱۵۳
G10h	F: TTATTCGGATTCTGCCAAGG R: TCCCCAAAGTGAATCGTCAT	KF561461.1	۶۰	۱۴۷
Rsp9	F: GAGGGCCAAAACAAACTTGA R: CCCTTATGTGCCTTTGCCTA	AJ749993.1	۶۰	۱۴۵

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.1.9.7]

برای بهینه‌سازی بهترین شرایط دمای اتصال[1] آغازگرها، واکنش PCR[2] با شیب دمایی ۵۴°C تا ۶۲ برای هر یک از پنج آغازگر به‌صورت جداگانه انجام گرفت. پس از بهینه‌سازی، واکنش qRT-PCR با استفاده از کیت سایبرگرین (شرکت NEB به شماره M3003S) در سه تکرار بیولوژیک و سه تکرار تکنیکی صورت پذیرفت. در نهایت آنالیز داده‌های qRT-PCR با بهره‌گیری از نرم‌افزار REST® و با استفاده از روش لیواک (Livak and Schmittgen 2001) و فرمول ΔΔCT صورت گرفت. میزان بیان با توجه به بیان ژن مرجع به صورت نسبی محاسبه شد.

نتایج

نتایج بررسی میزان بیان نسبی برای ژن‌های مورد مطالعه نشان داد که میزان رونویسی ژن کدکننده‌ی *Cm* در تیمار محلول‌پاشی در مقایسه با شاهد، کاهش یافت (شکل ۱- الف) هرچند روند کاهش بیان در طول زمان معنی‌دار نبود. بررسی میزان رونویسی ژن کدکننده‌ی *Tdc* تحت تأثیر تیمار در طی زمان افزایش یافت (شکل ۱- الف). شیب تغییرات تا ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار تدریجی و آهسته بود و بالاترین سطح بیان نسبت به شاهد در تیمار ۴۸ ساعت مشاهده شد. همچنین میزان رونویسی ژن کدکننده‌ی *G10h* در اثر اعمال تیمار افزایش یافت (شکل ۱- ب)، هرچند روند این افزایش از ۱۲ ساعت به ۲۴ آهسته بود ولی در ۴۸ ساعت به حداکثر رسید. تغییرات میزان رونویسی ژن *Sls* الگوی یکسانی با تغییرات ژن کدکننده‌ی *G10h* نشان داد (شکل ۱- ب) به طوری که ۱۲ ساعت پس از اعمال تیمار افزایش معنی‌دار مشاهده شد. بررسی میزان رونویسی ژن کدکننده‌ی *Dat* در اثر محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک در طی زمان، افزایش نشان داد (شکل ۱- ج) و این افزایش در همه‌ی تیمارهای زمانی معنی‌دار بود. هرچند مقدار افزایش در میزان رونویسی تیمار زمانی ۱۸ ساعت نسبت به تیمار زمانی ۱۲ ساعت کمتر و غیرمعنی‌دار بود و بیشترین افزایش بیان این ژن در تیمار زمانی ۴۸ ساعت مشاهده شد.



شکل ۱- تأثیر محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک بر بیان ژن‌های کدکننده‌ی (الف) کوریسمات موتاز (*Cm*) و تریپتوفان دکربوکسیلاز (*Tdc*)، (ب) سکولوگانین سنتاز (*Sls*) و ژرانیول ۱۰- هیدروکسیلاز (*G10h*) و (ج) داستیل ویندولین ۴- اُ- استیل ترنسفراز (*Dat*) در طی زمان.

بحث

اسید سالیسیلیک تنظیم‌کننده‌ای درونی با نقش پیام‌رسانی در سلول است که در بسیاری از فرآیندهای طبیعی گیاه و در پاسخ به تنش‌های زنده و غیرزنده از طریق فعال کردن سیستم دفاعی گیاه مؤثر می‌باشد (Idrees et al. 2011b, 2013). این پیام‌رسان سبب بیان ژن‌های مرتبط با آنتی‌اکسیدان‌ها و نیز انباشت ترکیباتی چون فنول‌ها، آلکالوئیدها و ترپنوئیدها می‌شود (Idrees et al. 2011b). به‌کارگیری تیمار اسید سالیسیلیک در غلظت‌های پایین علاوه بر افزایش معنی‌دار و تجمع آلکالوئیدهای ارزشمند دارویی چون کاتارانتین، وین‌بلاستین و وین‌کریستین (Kaur et al. 2017; Pan et al. 2010) موجب کاهش اثرات مضر ناشی از تنش‌هایی چون شوری (Idrees et al. 2011b; Mokhaberi et al. 2015)، فلزات سنگین (Idrees et al. 2013)، خشکی (Mokhaberi et al. 2015) و سرما (Khandan-Mirkohi et al. 2017) نیز می‌شود. در مسیر سنتز آلکالوئیدها (مسیر TIAs) بسیاری از ژن‌ها فعالیت دارند که تغییر در میزان رونویسی هر یک می‌تواند موجب تغییر در فرآورده‌ی پایانی یا همان آلکالوئیدهای گیاه پروانش شود (Khataee et al. 2019; Pan et al. 2012; Sun et al. 2016). آنزیم کوریسمات موتاز (CM) به عنوان اولین ژن در مسیر ایندولی برای استفاده از پیش‌ماده‌ی کوریسمات با آنترانیلیت

[1] Annealing
[2] Polymerase Chain Reaction

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.1.9.7]

سینتاز (AS) رقابت دارند و نتیجه‌ی این رقابت مشخص می‌کند که کوریسمات وارد مسیر ایندولی و TIAs شود یا در مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها و فنیل پروپانوئیدها فعالیت کند (Mustafa and Verpoorte 2007; Sun et al. 2016) چنانچه کوریسمات در اثر فعالیت آنزیم کوریسمات موتاز وارد مسیر سنتز فلاونوئیدها و فنیل پروپانوئیدها شود، مسیر واکنش به جای تولید آلکالوئیدهای ایندول ترپنوئیدی مورد نظر، به سمت سنتز فنیل‌آلانین، تیروزین و در نهایت ترکیبات فلاونوئیدی و فنیل پروپانوئیدها منحرف می‌شود (Mustafa and Verpoorte 2007) در حالی‌که در صورت فعالیت آنزیم آنترانیلیت سینتاز، مسیر ایندولی TIAs فعال شده و همچون سایر مسیرهای آبشاری بر فعالیت ژن‌های پایین‌دستی خود و ساخت آلکالوئیدهای این مسیر تأثیر خواهد گذاشت (Mustafa and Verpoorte 2007; Shukla and Khanuja 2013; Sun et al. 2016). در مطالعه‌ای که بر روی ریشه‌های مویین تراریخت پروانش با بیش‌بیان ژن آنترانیلیت سنتاز تحت پروموتر القایی صورت گرفت، مشخص شد که میزان رونویسی ژن کدکننده‌ی *Cm* در نتیجه‌ی القای پروموتر و بیان آنترانیلیت سنتاز، افزایش می‌یابد، اما این افزایش در همه‌ی تیمارهای زمانی (۱۲، ۲٤، ٤۸ ساعت) غیرمعنی‌دار بود (Sun et al. 2016)، در پژوهش حاضر نیز تغییرات در سطح رونویسی ژن کدکننده‌ی *Cm* غیرمعنی‌دار و همسو با نتایج مطالعه‌ی پیشین بود. همچنین در مطالعه‌ی حاضر میزان بیان ژن کدکننده‌ی *Tdc* که ژن انتهایی در مسیر رقیب با ژن کدکننده‌ی *Cm* است، پس از اعمال تیمار و در طول زمان افزایش یافت از این‌رو به‌نظر می‌رسد که افزایش در بیان آنزیم TDC منجر به استفاده از پیش‌ماده‌ی کوریسمات شده است که موجب شده تا به مسیر ساخت ترکیبات فنولیکی پیش‌ماده‌ی کمتری برسد و به سبب در اختیار داشتن پیش‌ماده‌ی کوریسمات موتاز کمتر، بیان ژن *Cm* در مقایسه با شاهد کاهش یابد.

تریپتوفان دکربوکسیلاز (*Tdc*) ژن کدکننده‌ی آنزیم پایانی در مسیر ایندولی TIAs و تبدیل‌کننده‌ی تریپتوفان به تریپتامین است، تریپتامین حاصل با فعالیت آنزیم STR وارد مسیر آلکالوئیدی TIAs می‌شود (Mokhaberi et al. 2015; Shukla and Khanuja 2013). همان‌گونه که اشاره شد تریپتوفان دکربوکسیلاز و آنترانیلیت سنتاز هر دو در مسیر ایندولی TIAs قرار دارند، بیش‌بیان ژن آنترانیلیت سنتاز در ریشه‌های مویین پروانش تحت تأثیر پروموتر القایی نشان داد که در اثر القای بیان ژن آنترانیلیت سنتاز و افزایش در میزان رونویسی آن، افزایش در میزان رونویسی ژن *Tdc* که ژن پایین‌دستی در این مسیر است نیز اتفاق می‌افتد، به‌نحوی که بیشترین میزان رونویسی ژن *Tdc* در ۱۲ ساعت پس از القای بیان آنترانیلیت سنتاز بود. سپس بیان روند نزولی در پیش گرفت هرچند شیب کاهش بسیار کم و تقریبا ثابت بود (Sun et al. 2016). همچنین بررسی میزان رونویسی ژن *Tdc* در کشت سلولی[1] پروانش تحت تیمارهای متیل جاسمونات[2]، سیکلودکسترین[3] و هم‌افزایی متیل جاسمونات و سیکلودکسترین نشان داد که تیمارهای یاد شده بر بیان این ژن مؤثر هستند و هم‌افزایی متیل جاسمونات و سیکلودکسترین نسبت به استفاده‌ی تنها از این دو محرک بر بیان ژن کدکننده‌ی *Tdc* تأثیر بیشتری دارد و افزایش رونویسی آن را سبب می‌شود، به‌علاوه اعمال تیمار مذکور موجب افزایش رونویسی ژن‌های مسیر ترپنوئیدی TIAs (ژن‌های کدکننده‌ی *G10h* و *Sls*) و نیز افزایش آلکالوئیدهای آجمالایسین و کاتارانتین شد (Almagro et al. 2014). خانواده‌ی فاکتور رونویسی WRKY علاوه بر نقش مهم در کنترل تحمل گیاه به تنش‌های زنده و غیرزنده، نقشی پررنگ در تنظیم مسیر بیوسنتزی TIAs در پروانش دارند، مطالعه‌ی تغییرات بیان برخی ژن‌های این مسیر در اثر کاربرد تیمار متیل‌جاسمونات در پروانش نشان داد که از خانواده‌ی ٤۸ عضوی فاکتور رونویسی WRKY، ۱۲ عضو در مسیر پاسخ جاسمونات فعال هستند به‌علاوه‌ی اینکه بیان ژن‌های مسیر TIAs را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهند (Schluttenhofer et al. 2014). به گونه‌ای که بیان ژن *G10h* در مقایسه با شاهد در طول ٤ ساعت پس از اعمال تیمار روند کاهشی معنی‌دار نشان داد، این در حالی است که بیان ژن *Tdc* ثابت و روند بیان ژن *Str* افزایش معنی‌دار داشت. در پژوهش حاضر میزان رونویسی ژن کدکننده‌ی *Tdc* در اثر کاربرد اسید سالیسیلیک افزایش یافت و این افزایش در طی زمان روند صعودی نشان داد (شکل ۱). افزایش در میزان رونویسی این ژن

[1] Cell culture
[2] methyl jasmonate
[3] Cyclodextrins

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.1.9.7]

در طی زمان و نیز تأثیر تغییرات میزان رونویسی ژن‌های بالادست بر ژن‌های پایین‌دست مسیر آبشاری TIAs و تجمع آلکالوئیدهای سنتز شده توسط آن‌ها نکته‌ی مشترک و تأمل برانگیز میان تیمارها و الیسیتورهای مختلف است (Almagro et al. 2014; Pandey et al. 2016; Sun et al. 2016). پس از بررسی بیان ژن‌های مسیر ایندولی، بیان ژن ابتدایی در مسیر ترپنوئیدی (*G10h*) و ژن پایانی این مسیر (*Sls*) بررسی شد، با این توضیح که ژرانیول ۱۰- هیدروکسیلاز (*G10h*) ژرانیول[1] را به ۱۰- هیدروکسی‌ژرانیول[2] تبدیل می‌کند، این پیش ماده طی چندین فرایند و فعالیت چندین آنزیم در نهایت به‌وسیله‌ی آنزیم SLS به سکولوگانین[3] تبدیل می‌شود و در ادامه با فعالیت آنزیم استریکتوزیدین سینتاز (STR) وارد مسیر ساخت آلکالوئیدها می‌شود (Liu et al. 2016; Sun et al. 2016). تغییر در سطح رونوشت ژن *G10h* بر مسیر آلکالوئیدی و سنتز آلکالوئیدهای تجاری پروانش مؤثر است، به گونه‌ای که بیش بیان ژن *G10h* و ORCA3[4] (فاکتور رونویسی مرتبط با این ژن) منجر به افزایش میزان رونویسی ژن‌های موجود در مسیر TIAs از جمله *G10h*، *Tdc*، *As*، *Str* و *D4h* و نیز افزایش در تجمع آلکالوئیدهایی چون استریکتوزیدین[5]، ویندولین، کاتارانتین، آجمالایسین[6] و وین‌بلاستین در گیاهان تراریخته شد (Pan et al. 2012). بررسی بیان ژن *G10h* در ریشه و برگ‌های گیاهچه‌های پروانش در اثر اعمال تیمار اسید سالیسیلیک، افزایش میزان رونویسی این ژن را در هر دو بافت نشان داد (Pakniyat et al. 2012). میزان رونویسی ژن *G10h* در گیاهچه‌های پروانش تحت تیمار متیل جاسمونات افزایش یافت، به گونه‌ای که روند افزایش رونوشت در ٦ و ١٢ ساعت پس از اعمال تیمار به حداکثر میزان خود رسید و سپس سیر نزولی یافت (Wei 2010). نکته حائز اهمیت در گزارش‌های بیان شده تأثیر محرک‌ها و الیسیتورها بر افزایش میزان رونویسی *G10h* (Pandey et al. 2016; Wei 2010) و روند صعودی میزان رونویسی آن در طی زمان است که با نتایج حاصل از پژوهش حاضر مطابقت داشت و گویای این مطلب است که افزایش در بیان ژن‌های مسیر ترپنوئیدی بر میزان رونویسی ژن‌ها و محصولات پایانی مسیر TIAs مؤثر است (Pan et al. 2012; Pandey et al. 2016; Sun et al. 2016).

سکولوگانین سنتاز (SLS) آنزیم پایانی در مسیر ترپنوئیدی TIAs است و تبدیل لوگانین به سکولوگانین را برعهده دارد، سکولوگانین حاصل از فعالیت آنزیم SLS همچون تریپتامین حاصل از فعالیت آنزیم TDC در مسیر ایندولی، با فعالیت آنزیم STR وارد مسیر سنتز آلکالوئیدها یا در واقع مسیر آلکالوئیدی TIAs می‌شود (Almagro et al. 2014; de Bernonville et al. 2015; Shukla and Khanuja 2013). میزان رونویسی ژن کدکننده‌ی *Sls* در کشت سلولی پروانش در اثر تیمارهای سیکلودکسترین و هم‌افزایی متیل جاسمونات و سیکلودکسترین افزایش معنی دار نسبت به شاهد نشان داد و حداکثر میزان رونویسی آن در روزهای اول و پنجم بود، روند مشاهده شده برای میزان بیان ژن کدکننده‌ی *Sls* تحت تیمار هم‌افزایی متیل جاسمونات و سیکلودکسترین مشابه روند حاصل از میزان بیان ژن کدکننده‌ی *G10h* بود، همچنین به‌کارگیری تیمار هم‌افزایی متیل جاسمونات و سیکلودکسترین افزایش در مقدار آلکالوئیدهای آجمالایسین و کاتارانتین را به دنبال داشت (Almagro et al. 2014). در مطالعه‌ی Pandey et al. (2016) در اثر هم‌زیستی دو اندوفیت قارچی با گیاهچه‌های پروانش میزان رونویسی ژن‌های کدکننده‌ی *G10h*، *Tdc*، *Str*، *D4h* و *Dat* افزایش یافت اما هم‌زیستی حاصل بر میزان رونویسی ژن کدکننده‌ی *Sls* مؤثر نبود و بیان این ژن در گیاهچه‌های شاهد و گیاهچه‌های تحت تیمار به یک میزان گزارش شد. در مسیر آبشاری TIAs هر گونه تغییر در میزان رونویسی ژن‌های موجود در مسیر ایندولی و ترپنوئیدی می‌تواند بر فعالیت ژن‌های پایین‌دستی این دو مسیر که در واقع مسیر سنتز آلکالوئیدها است، مؤثر باشد، در نتیجه افزایش در میزان رونویسی ژن‌های این دو مسیر می‌تواند افزایش در میزان رونویسی ژن‌های پایین‌دستی و افزایش در مقدار آلکالوئیدهای سنتز شده را به دنبال داشته باشد (Almagro et al. 2014; Pandey et al. 2016; Sun et al. 2016). میزان رونویسی ژن

[1] Geraniol
[2] 10- hydroxygeraniol
[3] Secologanin
[4] Octadecanoid-derivative Responsive Catharanthus AP2-domain
[5] Strictosidine
[6] Ajmalicine

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.1.9.7]

کدکننده‌ی *Sls* در پژوهش حاضر در اثر اعمال تیمار محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک افزایش نشان داد، افزایش مشاهده شده در میزان رونویسی این ژن در مطالعه‌ی (2014) .Almagro et al و یا عدم تغییر در میزان رونویسی آن در مطالعه‌ی (2016) .Pandey et al می‌تواند ناشی از تفاوت اعمال تیمارهای مورد استفاده در این آزمایش‌ها باشد.

داستیل ویندولین ٤-اُ- استیل ترنسفراز (*Dat*) از ژن‌های پایانی در مسیر آلکالوئیدی TIAs است که داستیل‌ویندولین را به ویندولین تبدیل می‌کند (Liu et al. 2016; Shukla and Khanuja 2013)، بر اساس گزارش‌های موجود افزایش در بیان این ژن منجر به تجمع ویندولین و آلکالوئیدهای تجاری وین‌کریستین و وین‌بلاستین می‌شود (Khataee et al. 2019; Wang et al. 2012). وانگ و همکاران بیش‌بیانی ژن *Dat* را مورد مطالعه قرار دادند، آنالیزهای qRT- PCR این پژوهش افزایش بیان ژن *Dat* را در همه‌ی گیاهان تراریخت نشان داد. این نتیجه با تجمع ویندولین در گیاهان مورد تحقیق هم‌خوانی نشان داد که تأیید کننده‌ی است بر ارتباط میان میزان رونویسی این ژن بر تولید ویندولین (Wang et al. 2012). همچنین مطالعه‌ی متابولیت و میزان رونویسی ژن *Dat* در ریشه‌های مویین پروانش بیش‌بیان شده با ژن *Dat*، افزایش در بیان این ژن و نیز مقدار ویندولین را نشان داد (Magnotta et al. 2007). بررسی تأثیر متیل جاسمونات و پوترسین[1] بر بیان ژن *Dat* و میزان آلکالوئیدهای وین‌کریستین و وین بلاستین نشان داد که تیمارهای ذکر شده موجب افزایش میزان رونویسی ژن *Dat* و افزایش این دو آلکالوئید می‌شود (Khataee et al. 2019)، همچنین افزودن اسید سالیسیلیک بر محیط کشت گیاهچه‌های کشت بافتی پروانش موجب افزایش میزان رونویسی ژن *Dat* شد و این افزایش در طول زمان روند صعودی داشت (Pakniyat et al. 2012). در پژوهشی دیگر محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک بر گیاهچه‌های تحت تیمارهای خشکی و شوری پروانش منجر به افزایش میزان رونویسی ژن‌های *Dat* و *D4h* شد (Mokhaberi et al. 2015). بر اساس مطالعات صورت گرفته افزایش در میزان رونویسی ژن *Dat* به عنوان یکی از ژن‌های پایانی سنتزکننده‌ی آلکالوئیدهای برگی، موجب افزایش میزان وین‌دولین، وین‌کریستین و وینبلاستین می‌شود (Khataee et al. 2019; Wang et al. 2012) و کاربرد الیسیتورهایی از جمله اسید سالیسیلیک موجب افزایش بیان این ژن می‌شود (Mokhaberi et al. 2015) که نتایج حاصل از پژوهش حاضر را تأیید می‌کنند. در زمان فعال شدن سیستم دفاعی در گیاه پروانش مسیر TIAs فعال شده و به دنبال آن، افزایش در آلکالوئیدهای وین‌بلاستین و وین‌کریستین که فراورده‌های پایانی این مسیر هستند اتفاق می‌افتد. کاربرد محرک اسید سالیسیلیک در فعال شدن سیستم دفاعی گیاه نقش به‌سزایی دارد. در پژوهش حاضر محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک افزایش در میزان رونویسی ژن‌های *Tdc*، *G10h*، *Sls* و *Dat* را به دنبال داشت (شکل ۱)، این گونه به‌نظر می‌رسد که افزایش یا کاهش در بیان ژن‌های بالادستی همچون سایر مسیرهای آبشاری دیگر موجب تغییر در فراورده‌ی پایانی می‌شود. بر اساس گزارش‌های موجود افزایش در بیان ژن‌های مسیر TIAs، به‌خصوص ژن‌های پایانی مسیر و از جمله *Dat* در نهایت منجر به افزایش در مقدار سنتز آلکالوئیدهای وین‌بلاستین و وین‌کریستین به‌عنوان فرآورده‌های پایانی مسیر مورد بحث می‌شود. با این حال، برای اطمینان از این موضوع، لازم است میزان این آلکالوئیدها هماهنگ با نتایج بیان ژن سنجیده شوند.

[1] Putrescine

منابع

Alam MM, Naeem M, Khan MMA, Uddin M (2017) Vincristine and vinblastine anticancer catharanthus alkaloids: Pharmacological applications and strategies for yield improvement. In *Catharanthus roseus*. Springer Cham 277-307.

Almagro L, Gutierrez J, Pedreño MA, Sottomayor M (2014) Synergistic and additive influence of cyclodextrins and methyl jasmonate on the expression of the terpenoid indole alkaloid pathway genes and metabolites in *Catharanthus roseus* cell cultures. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 119: 543-551.

Carqueijeiro I, Noronha H, Duarte P, Gerós, H, Sottomayor M (2013) Vacuolar transport of the medicinal alkaloids from *Catharanthus roseus* is mediated by a proton-driven antiport. Plant physiology 162: 1486-1496.

de Bernonville TD, Foureau E, Parage C, Lanoue A, Clastre M, Londono MA, Oudin A, Houillé B, Papon N, Besseau S (2015) Characterization of a second secologanin synthase isoform producing both secologanin and

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.1.9.7]

secoxyloganin allows enhanced de novo assembly of a *Catharanthus roseus* transcriptome. BMC genomics 16: 619.

Idrees M, Khan MMA, Naeem M, Aftab T, Hashmi N, Alam M (2011a) Modulation of defence responses by improving photosynthetic activity, antioxidative metabolism, and vincristine and vinblastine accumulation in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don through salicylic acid under water stress. Russian agricultural sciences 37: 474-482.

Idrees M, Naeem M, Aftab T, Khan MMA (2011b) Salicylic acid mitigates salinity stress by improving antioxidant defence system and enhances vincristine and vinblastine alkaloids production in periwinkle [*Catharanthus roseus* (L.) G. Don]. Acta Physiologiae Plantarum 33: 987-999.

Idrees M, Naeem M, Aftab T, Khan MMA (2013) Salicylic acid restrains nickel toxicity, improves antioxidant defence system and enhances the production of anticancer alkaloids in *Catharanthus roseus* (L.). Journal of Hazardous Materials 252: 367-374.

Kaur J, Singh A, Pathak T, Kumar K (2017) Role of PGRs in Anticancer Alkaloids (Vincristine and Vinblastine) Production. In *Catharanthus roseus*. Springer, Cham 309-319.

Khandan Mirkohi A, Khalili Halbi M, Salami SA, Lesani H (2017) Improving Effects of Mild Cold Stress and Salicylic acid on Growth and Physiology of Periwinkle (*Catharanthus roseus* Don.). International Journal of Horticultural Science and Technology 4: 67-78.

Khataee E, Karimi F, Razavi K (2019) Alkaloids production and antioxidant properties in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. shoots and study of alkaloid biosynthesis-related gene expression levels in response to methyl jasmonate and putrescine treatments as eco-friendly elicitors. Biologia Futura 70: 38-46.

Liu J, Cai J, Wang R, Yang S (2016) Transcriptional Regulation and Transport of Terpenoid Indole Alkaloid in *Catharanthus roseus*: Exploration of New Research Directions. International journal of molecular sciences 18: 53.

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. methods 25: 402-408.

Magnotta M, Murata J, Chen J, De Luca V (2007) Expression of deacetylvindoline-4-O-acetyltransferase in *Catharanthus roseus* hairy roots. Phytochemistry 68: 1922-1931.

Mokhaberi A, Ahmadi J, Mafakheri S (2015) The expression profile of D4H and DAT genes in *Catharanthus roseus* in response to drought, salinity and salicylic acid. Iranian Journal of Genetics and Plant Breeding 2: 38-46.

Mustafa NR, Verpoorte R (2007) Phenolic compounds in *Catharanthus roseus*. Phytochemistry Reviews 6: 243-258.

Nejat N, Valdiani A, Cahill D, Tan YH, Maziah M, Abiri R (2015) Ornamental exterior versus therapeutic interior of Madagascar Periwinkle (*Catharanthus roseus*): the two faces of a versatile herb. The Scientific World Journal 20.

Pakniyat A, Talebi M, Yamchi A (2012) Measuring Gene Expression Change for Producing of Medicinal Alkaloids in Periwinkle (*Catharanthus roseus*) in Response to Phyto-hormones by Real Time PCR. 12h Iranian Genetics congress. Tehran. Iranian Genetics Society.

Pan Q, Chen Y, Wang Q, Yuan F, Xing S, 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.

Pan Q, Wang Q, Yuan F, Xing S, Zhao J, Choi YH, Verpoorte R, Tian Y, Wang G, Tang K (2012) Overexpression of ORCA3 and G10H in *Catharanthus roseus* plants regulated alkaloid biosynthesis and metabolism revealed by NMR-metabolomics. PloS one 7: e43038.

Pandey SS, Singh S, Babu CV, Shanker K, Srivastava N, Shukla AK, Kalra A (2016) Fungal endophytes of *Catharanthus roseus* enhance vindoline content by modulating structural and regulatory genes related to terpenoid indole alkaloid biosynthesis. Scientific reports 6: 26583.

Roepke J, Salim V, Wu M, Thamm AM, Murata J, Ploss K, Boland W, De Luca V (2010) Vinca drug components accumulate exclusively in leaf exudates of Madagascar periwinkle. Proceedings of the National Academy of Sciences 107: 15287-15292.

Sain M, Sharma V (2013) *Catharanthus roseus* (An anti-cancerous drug yielding plant). A Review of Potential Therapeutic Properties. International journal of pure and applied bioscience 1: 139-142.

Sandeep P, Jagjit K, Raman K, Kuldeep K (2014) *Catharanthus roseus*: A medicinal plant with potent anti-tumor properties. International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy 5: 5.

Schluttenhofer C, Pattanaik S, Patra B, Yuan L (2014) Analyses of *Catharanthus roseus* and Arabidopsis thaliana WRKY transcription factors reveal involvement in jasmonate signaling. BMC genomics 15: 502.

Shukla AK, Khanuja SP (2013) *Catharanthus roseus*: The metabolome that represents a unique reservoir of medicinally important alkaloids under precise genomic regulation. In "OMICS Applications in Crop Science" 345-404. CRC Press.

Sun J, Manmathan H, Sun C, Peebles CA (2016) Examining the transcriptional response of overexpressing anthranilate synthase in the hairy roots of an important medicinal plant *Catharanthus roseus* by RNA-seq. BMC plant biology 16: 108.

Wang Q, Xing S, Pan Q, Yuan F, Zhao J, Tian Y, Chen Y, Wang G, Tang K (2012) Development of efficient *Catharanthus roseus* regeneration and transformation system using Agrobacterium tumefaciens and hypocotyls as explants. BMC biotechnology 12: 34.

Wei S. (2010). Methyl jasmonic acid induced expression pattern of terpenoid indole alkaloid pathway genes in *Catharanthus roseus* seedlings. Plant growth regulation 61: 243-251.

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

[DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.1.9.7]