مقاله پژوهشی، صفحات ۳۴۵-۳۶۴
DOI:10.22034/jpr.2025.8573.3391

اثر محلول‌پاشی اسیدآمینه تریپتوفان و تنش خشکی بر تغییر الگوی بیان نسبی برخی ژن‌های موجود در مسیر ایندول– آلکالوئیدی TIAs و آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی در برگ گیاه پروانش (*Catharanthus roseus*)

فرشید یوسفی[۱]، علیرضا ابدالی[۱]، امین لطفی جلال آبادی[۱]، علیرضا شافعی‌نیا[۱]، سعید جلیلی[۲] و نرگس سلطانی*[۳]

[۱] کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان ملاثانی، خوزستان، ایران

[۲] استادیار گروه مهندسی علوم آب، دانشکده مهندسی زراعی و عمران روستایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، خوزستان،ایران

[۳] گروه مهندسی تولید و زنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، لرستان، ایران.

تاریخ دریافت:۱۴۰۳/۱۰/۰۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۱/۲۰

چکیده

پروانش یک گیاه دارویی بسیار با ارزش است زیرا تنها منبع تولید داروهای ضد سرطان وین‌بلاستین و وین‌کریستین محسوب می‌شود. سنتز پایین و قیمت بالای داروهای حاصل از گیاه پروانش، و نیز کمبود آب به‌عنوان یکی از بزرگ‌ترین عوامل محدود کننده کشاورزی، سبب شد تا در این پژوهش به تأثیر الیسیتور اسیدآمینه‌ی تریپتوفان و تنش خشکی بر تغییرات متابولیت‌های ثانویه پروانش و ژن‌های مرتبط با مسیر سنتز وین‌بلاستین و وین‌کریستین پرداخته شود. این مطالعه در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه عامل محلول‌پاشی تریپتوفان (صفر و ۲۵۰ پی‌پی‌ام) و تنش خشکی (۴۰ و ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی) و زمان (۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۱۶۸) برای ارزیابی بیان نسبی صورت پذیرفت. ارزیابی تغییرات الگوی بیان نسبی بیش‌ترین میزان بیان نسبی را برای ژن‌های *Dat* و *Prx* در هر سه حالت بترتیب در تیمار زمانی ۲۴ ساعت و ۱۶۸ ساعت نسبت به شاهد نشان داد، در ژن *Tdc* نیز تیمارهای زمانی ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از اعمال تیمار تریپتوفان و تیمار زمانی ۱۶۸ ساعت تریپتوفان- خشکی کاهش بیان نسبی و سایر سطوح تیماری افزایش بیان نسبی را نسبت به شاهد نشان دادند. از منظر فیزیولوژیک بیش‌ترین میزان وزن خشک گیاه در تیمار محلول‌پاشی تریپتوفان به‌دست آمد، همچنین تنش خشکی و تریپتوفان منجر به افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز و محتوای فنل و فلاونوئید شد، به‌گونه‌ای که بیش‌ترین میزان هریک در غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر در تنش خشکی ۴۰ درصد ظرفیت زراعی مشاهده گردید.

واژه های کلیدی: الیسیتور، مسیر آلکالوئید ایندول ترپنوئیدی، وین‌بلاستین و وین‌کریستین

* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: nargesoltani29@gmail.com

مقاله پژوهشی، صفحات ۳۴۵-۳۶۴
DOI:10.22034/jpr.2025.8573.3391

مقدمه

گیاه پروانش که با نام علمی ***Catharanthus roseus*** **(L.)** و نام انگلیسی **Periwinkle** شناخته می‌شود، گیاهی علفی، چندساله و متعلق به خانواده‌ی **Apocynaceae** می‌باشد (۵۹). پروانش سرشار از آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی، آلکالوئیدها، تانن، ساپونین و پکتین است که از دیرباز مصرف دارویی داشته است و در درمان مشکلاتی چون فشار خون، دیابت، خون‌ریزی‌های شدید، گلودرد، روماتیسم، گزش حشراتی چون زنبور کاربرد دارد (۸، ۵۹، ۶۰). پروانش یکی از گیاهانی است که به شدت مورد توجه دانشمندان است و این توجه از اواسط سال ۱۹۵۰ میلادی با شناخت ویژگی درمانی آن در بیماران مبتلا به دیابت آغاز گردید (۸، ۵۳). عصاره‌ی به‌دست آمده از برگ خشک پروانش حاوی آلکالوئیدهای بسیاری است که در این بین وین‌بلاستین و وین‌کریستین به عنوان دو آلکالوئید مطرح مورد استفاده برای مقابله با سرطان، بر اهمیت تجاری و دارویی این گیاه افزوده‌اند (۸، ۱۸). وین‌بلاستین و وین‌کریستین نقش خود را با مهار تکثیر در سلول‌های سرطانی ایفا می‌کنند، به این صورت که در طول تقسیم میتوز به توبولین موجود در رشته‌ی دوک تقسیم متصل شده و موجب مهار تقسیم‌سلولی و مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلول (آپوپتوز) می‌شوند (۵، ۳۲). سنتز این دو آلکالوئید در مسیری موسوم به مسیر آلکالوئید ایندول ترپنوئیدی (**TIAs**) اتفاق می‌افتد که تلفیقی از سه مسیر ایندول، ترپنوئید و آلکالوئید است (۵۷)، در مسیر ایندول، تریپتوفان با فعالیت آنزیم تریپتوفان دکربوکسیلاز به تریپتامین تبدیل می‌گردد، تریپتامین به عنوان فراورده‌ی پایانی این مسیر با فعالیت آنزیم استریکتوزیدین سنتتاز وارد مسیر آلکالوئیدی و تولید استریکتوزیدین می‌شود، استریکتوزیدین حاصل نیز طی فعالیت چندین آنزیم در نهایت تبدیل به ویندولین و آنهیدروسینبلاستین شده که هر دو پیش‌ساز دو آلکالوئید ارزشمند وین‌بلاستین و وین‌کریستین می‌باشند (۵۵، ۵۷). استفاده از متیل جاسمونات (۶۳) و نیز هم‌افزایی متیل جاسمونات و سیکلودکسترین (۷) افزایش بیان ژن تریپتوفان دکربوکسیلاز و فراورده‌های آلکالوئیدی مسیر مورد مطالعه را به دنبال داشت. همچنین بیش‌بیان ژن داستیل ویندولین ۴- ا- استیل ترانسفراز، علاوه بر افزایش بیان این ژن منجر به افزایش میزان آلکالوئید وین‌دولین گردید (۶۱). بر این اساس تغییر در میزان تریپتوفان به عنوان پیش‌ماده در مسیر ایندول **TIAs** و در پی آن تغییر در بیان هر یک از ژن‌های این مسیر آبشاری، می‌تواند منجر به تغییر در فراورده‌های مسیر شود. بر اساس مطالعات موجود، مسیر **TIAs**، مسیری انعطاف‌پذیر است و نکته‌ی قابل تأمل، مطرح بودن برگ‌های گیاه پروانش به عنوان تنها منبع تولید دو آلکالوئید ایندول ترپنوئیدی وین‌بلاستین و وین‌کریستین است (۳۸، ۵۶) که به سبب نبود امکان سنتز مصنوعی آلکالوئیدهای مذکور و نیز سنتز کم این دو ماده در برگ بر اهمیت آن‌ها و تلاش برای یافتن راهکارهایی در جهت افزایش سنتز آلکالوئیدها، افزوده شده است (۳۸، ۵۴، ۵۵). کاربرد الیسیتورها و محرک‌های رشدی و نیز بررسی تأثیر تنش‌های زنده و غیرزنده بر تغییر بیان ژن‌های فعال در مسیر **TIAs** و اندازه‌گیری فراورده‌های پایانی مسیر (آلکالوئیدهایی چون ویندولین، وین‌بلاستین، وین‌کریستین و آجمالایسین) همواره مورد توجه پژوهشگران بوده است (۷، ۳۰، ۴۱، ۴۲، ۵۵، ۶۳).

تریپتوفان نقش مهمی در بیوسنتز آلکالوئیدهای ایندول ترپنوئیدی (TIAs) در گیاه *Catharanthus roseus* ایفا می‌کند. این ماده به عنوان پیش‌ساز تریپتامین، یک واسطه کلیدی در مسیر TIA ، از طریق عملکرد تریپتوفان دکربوکسیلاز (TDC) عمل می‌کند (۵۸). فراهمی تریپتوفان، تغییرات متابولیک را از طریق مسیر ایندول افزایش می‌دهد و منجر به افزایش تولید

مقاله پژوهشی، صفحات ۳۴۵-۳۶۴
DOI:10.22034/jpr.2025.8573.3391

استریکتوزیدین، که یک ترکیب مرکزی در بیوسنتز TIAاست می‌شود (۶۴). نشان داده شده است که کاربرد خارجی تریپتوفان، بیان ژن‌های کلیدی بیوسنتزی مانند TDC و استریکتوزیدین سنتاز (STR)را تنظیم می‌کند و منجر به افزایش تولید آلکالوئیدهای ارزشمندی مانند وین‌بلاستین و وین‌کریستین می‌شود (۴۹). علاوه بر این، محلول پاشی تریپتوفان فعالیت آنتی‌اکسیدانی کاتالاز و پراکسداز را در گیاه پروانش بهبود می‌بخشد و از این طریق نقش آن را در افزایش متابولیسم ثانویه بیشتر پشتیبانی می‌کند (۶)بر اساس مطالعات استفاده از اسیدآمینه‌ی تریپتوفان می‌تواند افزایش رشد گیاه را به دنبال داشته باشد که با توجه به وجود چندین مسیر جایگزین برای سنتز اکسین بنظر می‌رسد که افزایش رشد اتفاق افتاده در اثر کاربرد تریپتوفان، به سبب تبدیل آن به اکسین باشد (۹، ۵۹). بررسی تأثیر کاربرد تریپتوفان و پوترسین به صورت جداگانه، منجر به افزایش رشد گیاه، رنگدانه‌های فتوسنتزی (کلروفیلa، کلروفیل b و کاروتنوئیدها)، قندهای محلول و نامحلول کل، پروتئین کل و آلکالوئید کل در برگ‌های گیاه پروانش گردید (۵۹). همچنین مشخص شده است که کاربرد برگی ال-تریپتوفان با بهبود شاخص‌هایی مانند محتوای آب نسبی، پایداری غشای سلولی و میزان کلروفیل، می‌تواند اثرات تنش خشکی را در گیاه ذرت کاهش دهد (۴۴).

با توجه به در معرض قرار گرفتن گیاهان نسبت به انواع تنش‌های غیرزنده‌ای چون، خشکی، گرما، سرما و شوری که به عنوان مشکلات جدی کشاورزی مطرح هستند، یافتن راه حل برای تعدیل اثرات تنش و البته تلاش برای افزایش متابولیت‌های گیاهان ارزشمندی چون پروانش بسیار حائز اهمیت است. در طول تنش کم‌آبی، بسیاری از ویژگی های مورفولوژیکی و فرآیندهای فیزیولوژیکی مرتبط با رشد و نمو گیاه تحت تأثیر قرار می گیرند. در واقع وقوع این تنش بیش‌تر از تأثیر بر فرایند تقسیم‌سلولی از بزرگ شدن سلول جلوگیری می‌کند و با تأثیر بر فرآیندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مختلف از جمله فتوسنتز، تنفس، جذب یون‌ها، کربوهیدرات‌ها، متابولیسم مواد مغذی و محرک‌های رشد، رشد گیاه را کاهش می‌دهد (۸، ۱۹، ۲۷). تنش خشکی یکی از تنش‌های غیرزنده است که بر رشد و نمو گیاهان دارویی تأثیر می گذارد (۱۴). علاوه بر کاهش رشد آشکار، گیاهان در برخورد با این تنش طیف وسیعی از پاسخ‌های فیزیولوژیکی را نشان می‌دهند که معمولا بر میزان تولید متابولیت‌های ثانویه‌ی آن‌ها تأثیر دارد (۱، ۲، ۶۶). به عنوان مثال تنش خشکی در گیاه کلزا (*Brassica napus*) موجب افزایش میزان ترکیبات فنولیک شد و فلاونوئیدها شد، هرچند افزایش در محتوای کل ترکیبات فنولی در شرایط تنش خشکی شدید بسیار بیش‌تر از افزایش در محتوای فلاونوئیدها بود (۴۵). با در نظر گرفتن اهمیت گیاه پروانش به عنوان تنها منبع تولید دو داروی ارزشمند سولفات وین‌بلاستین و سولفات وین‌کریستین، اطلاع از نقش مثبت اسیدآمینه تریپتوفان و پیش‌ساز بودن آن در مسیر ایندول TIAs پروانش، ضرورت مطالعه بر تنش خشکی و بررسی تأثیرات آن در زمینه‌ی مولکولی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی و البته یافتن راه حلی تجاری جهت تعدیل اثرات ناشی از این تنش، پژوهش حاضر اقدام به ارزیابی تأثیر تنش خشکی و کاربرد محلول‌پاشی تریپتوفان از نقطه نظر مولکولی و فیزیولوژیک نموده است.

مواد و روشها

کشت و اعمال تیمار

بذرهای F_1 پروانش (*Catharanthus roseus* var. Vinca) از مؤسسه کشاورزی زعیم تهیه و پس از ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم یک درصد (به مدت یک دقیقه) در سینی‌های کشت حاوی ترکیبی از کوکوپیت، پیت ماس و پرلیت کاشته شدند. گیاهچه‌ها

مقاله پژوهشی، صفحات ۳۴۵-۳۶۴
DOI:10.22034/jpr.2025.8573.3391

پس از رسیدن به مرحله چهار برگی در گلدان‌هایی به ابعاد ۳۰ سانتی‌متر ارتفاع و ۱۵ سانتی‌متر قطر، حاوی مخلوطی از خاک مزرعه، کود دامی پوسیده و ماسه (به نسبت ۱:۱:۱) کشت شدند. اعمال تیمار از مرحله هشت برگی تا ابتدای مرحله گلدهی صورت گرفت (۳۸، ۴۰، ۴۷)، با این توضیح که آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو عامل محلول‌پاشی اسیدآمینه تریپتوفان در دو سطح (صفر و ۲۵۰ پی‌پی‌ام) (۲۰، ۴۴) و تنش خشکی در دو سطح (۴۰ و ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی) است (۳۷) در گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان با شرایط نوری (آفتاب) و دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد. محلول پاشی اسیدآمینه تریپتوفان در مرحله هشت برگی انجام و ۳۰ روز بعد تکرار شد، دو روز پس از اولین محلول‌پاشی، تنش خشکی اعمال شد و به مدت یک ماه تا زمان گلدهی ادامه یافت. نمونه‌برداری از برگ‌ها برای بررسی میزان بیان نسبی در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۱۶۴ ساعت و سایر صفات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی در زمان ۱۶۸ ساعت پس از محلول‌پاشی دوم با سه تکرار بیولوژیکی برای هر تیمار، صورت پذیرفت.

ارزیابی بیان نسبی ژن‌های مورد مطالعه

استخراج RNA و سنتز cDNA

استخراج RNA کل از ۵۰ میلی‌گرم بافت پودر شده‌ی برگی از هر نمونه با استفاده از کیت "جداسازی ستونی RNA" (دنازیست آزما- Cat. No. S-1021-1) انجام و ارزیابی کمیت و کیفیت آن با دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ (Thermo Scientific NanoDrop 2000, USA) و الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ صورت گرفت. قبل از سنتز cDNA، هضم DNA احتمالی استخراج شده همراه نمونه‌ها با تیمار آنزیمی DNase I (سیناکلون- Cat. No. MO5401) در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر انجام شد. سپس سنتز cDNA با استفاده از کیت سنتز رشته اول cDNA (آناسل- Lot n: CS0025) و آغازگر oligo-dT از ۵۰۰ نانوگرم RNA، در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر صورت پذیرفت.

انجام واکنش Real time- PCR و تجزیه تحلیل داده‌ها

با استفاده از سایبرگرین High ROX (امپلی‌کون- Cat. No. A325402) و دستگاه Step One Plus Real-time PCR system (Applied Biosystems, USA) واکنش Real-time PCR با آغازگر موجود در مطالعه‌ی (۵۵، ۶۲) (جدول ۱)، در سه تکرار بیولوژیکی و سه تکرار تکنیکی انجام شد.

جدول۱- نام، توالی، دمای اتصال، شماره دسترسی و طول قطعه تکثیری آغازگرها.

نام ژن	توالی آغازگر (′3-′5)	دمای اتصال (°C)	شماره دسترسی	طول قطعه (bp)
Tdc	F: CCTGTATATGTCCCGAGTTTAG R: TCGTAGTGAGTGCCCTTAG	۶۰	X67662.1	۱۵۳
Dat	F: AGCACAAATGGAAGAGTTCG R: AGGGTTGAAACAAGCATACC	۶۰	LN809930.1	۱۵۸
Prx	F: GCAACATCTCCCAGACCACA	۶۰	KT032115.1	۱۱۷

مقاله پژوهشی، صفحات ۳۴۵-۳۶۴
DOI:10.22034/jpr.2025.8573.3391

	R: GTTCTCCCAACACTATGAGCACC			
Rsp9 (Ref. gene)	F: GAGGGCCAAAACAAACTTGA	۶۰	AJ749993.1	۱۴۵
	R: CCCTTATGTGCCTTTGCCTA			

هر محلول واکنش شامل:

- ۴۰ نانوگرم بر میکرولیتر cDNA (۸ میکرولیتر از cDNA با غلظت اولیه ۱۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر)
- ۰/۴ میکرومولار از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت
- مسترمیکس سایبرگرین (۱X)

و در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر بود. شرایط واکنش نیز شامل مرحله واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۵ °C به مدت ۱۰ دقیقه، به دنبال آن ۴۰ چرخه دربرگیرنده‌ی مرحله واسرشته‌سازی در دمای ۹۵ °C به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در ۶۰ °C به مدت ۲۰ ثانیه و گسترش در دمای ۷۲ °C به مدت ۲۰ ثانیه بود. در نهایت سطح بیان نسبی تیمارها با استفاده از چرخه‌ی آستانه (CT)و روش ΔΔCT با نرم‌افزار REST® تعیین گردید.

محاسبه عملکرد کل

برداشت محصول در ابتدایی فاز گلدهی انجام شد. به این منظور سطحی معادل یک متر مربع از کف برداشت و توزین شد. پس از جدا کردن برگ و ساقه، خشک کردن نمونه‌ها در آون (۷۰ °C) به مدت ۴۸ ساعت انجام و وزن خشک کل، وزن خشک برگ و ساقه با ترازوی (دقت ۰/۰۰۱ بر حسب گرم) اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز

آماده‌سازی عصاره

مقدار ۰/۲ گرم از نمونه گیاهی، ۰/۰۲ گرم PVP و ۲ میلی‌لیتر از بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی‌مولار با pH=۷ در درون هاون چینی قرار داده شد و تا زمان خروج تا شیره آن و ایجاد عصاره همگن هم‌زده شد. مخلوط یک‌دست شده به میکروتیوب منتقل و به مدت ۲۵ دقیقه در دمای ۴ °C با ۱۵۰۰۰ هزار دور، سانتریفیوژ گردید. فاز شفاف جدا و در فریزر ۸۰- °C نگه‌داری شد (۴۳). کلیه مراحل اجرا بر روی یخ صورت گرفت.

اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز

اندازه‌گیری آنزیم از طریق اضافه نمودن ۱۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی به ۲ میلی‌لیتر محلول (بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰میلی‌مولار با pH=۷، آب مقطر دو بار تقطیر، پراکسید هیدروژن ۷۰ میلی‌مولار محلول در فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار و گوئیکول ۱۰ میلی‌مولار در آب مقطر دو بار تقطیر) افزوده شد، در ادامه فعالیت آنزیم پراکسیداز در مدت زمان ۱۲۰ ثانیه و طول موج ۴۷۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (SPEKOL مدل Analytikjena 2000) بررسی گردید (۱۲). روند صحیح منحنی آنزیم پراکسید در طول موج ۴۷۰ نانومتر به‌صورت سیر صعودی است.

اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم کاتالاز

برای اندازه‌گیری آنزیم کاتالاز، میزان ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم (با غلظت ۲۵ میلی‌مولار و pH=۶/۸)، ۰/۵ میلی‌لیتر H_2O_2 (با غلظت ۱۰ میلی‌مولار) و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی با یکدیگر ترکیب و پس از همگن شدن محلول، خوانش در طول موج ۲۴۰ نانومتر

مقاله پژوهشی، صفحات ۳۴۵-۳۶۴
DOI:10.22034/jpr.2025.8573.3391

صورت پذیرفت (۱۱). تجزیه H_2O_2 در اثر فعالیت آنزیم کاتالاز، با کاهش جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر مواجه و عدد آن به ازای هر میکروگرم پروتئین در عصاره آنزیمی بیان شد.

اندازه‌گیری میزان فنل کل

میزان فنل کل با روش رنگ سنجی فولین- سیوکالتیو[1] با استفاده از گالیک اسید به عنوان استاندارد اندازه‌گیری شد. عصاره با ۱ گرم وزن خشک برگ در اتانول خالص ۹۶٪ استخراج شد و به ۰/۱ میلی‌لیتر از عصاره گیاهی یا محلول‌های استاندارد (غلظت‌های ml^{-1} mg ۱۰۰- ۰ گالیک اسید در آب مقطر)، ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۱ میلی‌لیتر معرف فولین- سیوکالتیو رقیق (۱:۱۰ v/v) اضافه گردید. پس از ۵ دقیقه، ۲ میلی‌لیتر از محلول ۷/۵ درصد کربنات سدیم، به محلول افزوده و به مدت ۹۰ دقیقه در دمای اتاق نگه‌داری شد، سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۶۰ نانومتر تعیین گردید. در پایان مقدار فنل کل نیز روی منحنی استاندارد بر حسب میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک محاسبه شد (۳۴).

اندازه‌گیری میزان فلاونوئید کل

میزان فلاونوئید کل به روش رنگ‌سنجی آلومینیوم کلراید با استفاده از کوئرستین به عنوان استاندارد اندازه‌گیری شد. میزان ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول عصاره (به همان روش مورد استفاده برای سنجش فنول کل برگ) با ۱۵۰ میکرولیتر متانول ۹۵٪، ۱۰۰ میکرولیتر آلومینیوم کلراید ۱۰٪، ۱۰۰ میکرولیتر استات پتاسیم یک مولار و ۲۸۰ میکرولیتر آب مقطر مخلوط گردید. بعد از نگه‌داری نمونه‌ها در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه، جذب مخلوط در طول موج ۴۱۵ نانومتر خوانده شد. از کوئرستین به‌منظور رسم منحنی استاندارد استفاده شد و نتایج بر حسب میلی‌گرم کوئرستین در هر گرم برگ خشک بیان شد. با قرار دادن مقدار جذب عصاره در معادله خطی مربوط به منحنی استاندارد، مقدار فلاونوئید کل موجود در برگ را محاسبه و در نهایت داده‌ها بر اساس معادل میلی‌گرم کوئرستین بر گرم برگ بیان شدند (۱۳).

اندازه‌گیری آلکالوئید وین کریستین

برای بررسی محتوای آلکالوئید وین‌کریستین، برگ گیاه پروانش در سایه خشک شد. سپس به ۰/۵ گرم بافت پودر شده، میزان ۲ میلی‌لیتر N- هگزان افزوده شد و پس از تبخیر، ۱۰ میلی‌لیتر حلال استخراج (محلول متانول: آب به نسبت ۸۰ به ۲۰) در سه نوبت (۲۴ ساعت) اضافه شد. pH محلول به ۳/۵ رسانده و سه مرتبه با کلروفرم شستشو داده شد، فاز آبی برداشته و pH آن به ۸/۵ رسید. پس از سه مرتبه شستشو با کلروفرم، فاز کلروفرمی برداشته و خشک گردید (۵۱، ۵۲). به رسوب خشک شده ۱ میلی‌لیتر متانول افزوده و با کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) آنالیز گردید.

کروماتوگرافی با استفاده از ستون Eurospher II 100-5 C18 with precolumn (Column 250* 4.6 m mm) و دتکتور UV (مدل K-2600) با دستگاه HPLC (مدل WellChrom شرکت KNAUER) در طول موج ۲۵۴ ηm و دمای ستون ۳۵ $^{\circ}C$ صورت گرفت. فاز متحرک مورد استفاده متانول: دی آمونیوم دی هیدروژن فسفات[2] (۵ mM) با ترکیب درصد ۷۱ :۲۹ (pH =۷/۳) و سرعت جریان ۱ mL/min بود (۲۲).

تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS (نسخه ۹/۴) و روش آماری استاندار ANOVA، رسم نمودار با بهره‌گیری از نرم افزار Excel و مقایسه میانگین با آزمون دانکن در سطح احتمال خطای ۵ درصد صورت گرفت.

[2]- $(NH_4)_2HPO_4$

[3]- Folin- ciocaltue

مقاله پژوهشی، صفحات ۳۴۵-۳۶۴
DOI:10.22034/jpr.2025.8573.3391

نتایج

مطالعه‌ی حاضر به بررسی گیاه پروانش تحت تأثیر تنش خشکی و محلول‌پاشی اسیدآمینه‌ی تریپتوفان از منظر فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و مولکولی پرداخت که در ادامه به تفصیل شرح داده شده است.

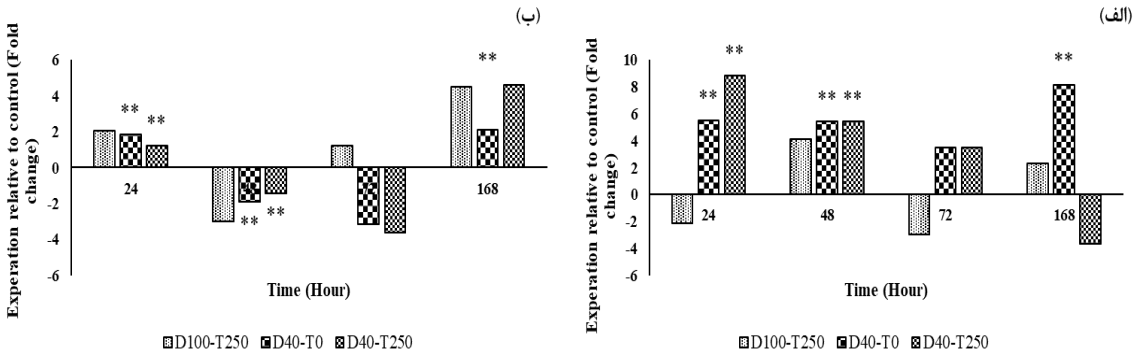
ارزیابی بیان‌نسبی ژن‌های مورد مطالعه

ژن‌های مورد مطالعه (Tryptophan decarboxylase، Deacetylvindoline-4-O-acetyltransferase و Peroxidase) دو مسیر ایندول و آلکالوئید را در مسیر TIAs در برمی‌گیرند که تغییرات الگوی بیان نسبی آن‌ها در اثر تنش خشکی شدید به تنهایی و همراه با محلول‌پاشی تریپتوفان ارزیابی شد.

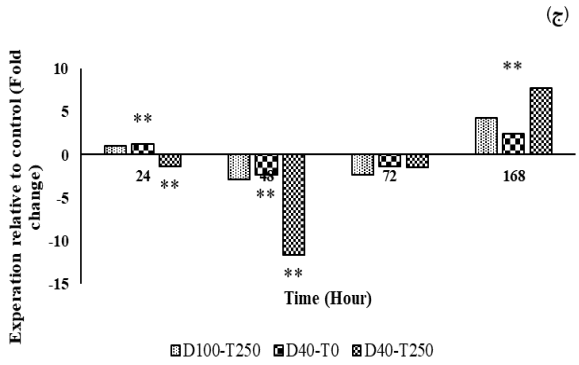
بررسی تغییرات بیانی ژن تریپتوفان دکربوکسیلاز (*Tdc*) به عنوان ژنی کلیدی در مسیر ایندولی TIAs، برای تیمار زمانی ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از اعمال تیمار تریپتوفان و تیمار زمانی ۱۶۸ ساعت تریپتوفان- خشکی کاهش بیان نسبی را نسبت به شاهد نشان داد و سایر سطوح تیماری با افزایش بیان نسبی مواجه شدند (شکل ۱- الف). بیش‌ترین عدد بیان برای این ژن در تیمار تریپتوفان- خشکی در زمان ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار با عدد ۸/۸۲ و در تیمار زمانی ۱۶۸ ساعت پس از تنش خشکی با عدد بیان ۸/۱۱ محاسبه گردید.

از مسیر آلکالوئیدی TIAs، روند تغییرات بیان نسبی دو ژن Deacetylvindoline-4-O-acetyltransferase (*Dat*) و Peroxidase (*Prx*) به عنوان ژن‌های پایانی مسیر مورد ارزیابی قرار گرفتند. در نگاهی کلی بررسی روند تغییرات ژن *Dat* افزایش بیان نسبی را در هر سه حالت (تنش خشکی، تیمار محلول‌پاشی تریپتوفان و اثر متقابل محلول‌پاشی تریپتوفان با تنش خشکی) برای تیمار زمانی ۲۴ ساعت، کاهش بیان نسبی را در تیمارهای زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت و مجدد افزایش بیان نسبی را در تیمار زمانی ۱۶۸ ساعت نشان داد (شکل ۱- ب) و بیش‌ترین اعداد بیان ۴/۵ و ۴/۶۲ بترتیب مربوط به تیمارهای مربوط به تریپتوفان و تریپتوفان- خشکی در زمان ۱۶۸ ساعت پس از اعمال تیمار بود. کم‌ترین عدد بیان نسبی نیز به تیمار تریپتوفان- خشکی در زمان ۷۲ ساعت، تنش خشکی ۷۲ ساعت و تیمار تریپتوفان در زمان ۴۸ ساعت بترتیب با عدد بیان ۳/۶۱-، ۳/۱۷- و ۲/۹۹- تعلق داشت.

در ارزیابی بیان نسبی ژن *Prx* بیش‌ترین افزایش بیان در تیمار زمانی ۱۶۸ ساعت برای هر سه حالت، نسبت به تیمار شاهد مشاهده شد (شکل ۱- ج). تیمار تریپتوفان- خشکی و تیمار تریپتوفان بترتیب با عدد بیان ۷/۷۶ و ۴/۲۳ در ۱۶۸ ساعت پس از اعمال تیمار بیش‌ترین میزان بیان نسبی و تیمار تریپتوفان- خشکی (۱۱/۶۵-) در ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار، کم‌ترین بیان نسبی را نشان داد.



مقاله پژوهشی، صفحات ۳۴۵-۳۶۴
DOI:10.22034/jpr.2025.8573.3391



شکل ۱- نمودار مربوط به بررسی بیان نسبی ژن‌ها الف: *Tdc*، ب: *Dat* و ج:*Prx*. D100- T250، D40- T0 و D40- T250 بترتیب مربوط به تیمار بدون تنش خشکی (۱۰۰٪ ظرفیت زراعی)- تریپتوفان ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر ، تنش خشکی شدید (۴۰٪ خشکی)- بدون تریپتوفان و تنش خشکی شدید (۴۰٪ خشکی)- تریپتوفان ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر. ns ،* و ** بترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال خطای ۵ و ۱ درصد.

بررسی عملکرد کل و آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی

تجزیه واریانس داده‌های گلخانه‌ای نشان داد که اثر متقابل تنش خشکی با اسیدآمینه تریپتوفان در صفات وزن خشک، آنزیم پراکسیداز و فلاونوئید در سطح احتمال خطای ۵ درصد و آنزیم کاتالاز و فنل در سطح یک درصد معنی‌دار شد. (جدول ۲).

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس تأثیر تیمار تنش خشکی و تریپتوفان بر شاخص‌های فیزیولوژیک گیاه پروانش.

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات					
		وزن خشک	کاتالاز	پراکسیداز	فنل	فلاونوئید	وین‌کریستین
خشکی	۱	۳۰۰/۴**	۰/۰۲۶**	۰/۰۲۸**	۲۰۵/۸**	۶**	۰/۰۵۵**
تریپتوفان	۱	۱۷۴/۳**	۰/۰۱۱۷**	۰/۰۰۵**	۱۶۰/۶**	۶/۰۵**	۰/۵۸**
خشکی × تریپتوفان	۱	۱۸/۹*	۰/۰۰۱۹**	۰/۰۰۰۱*	۳۴/۶**	۰/۰۸۱*	۰/۰۰۳۸*
خطا	۸	۱/۸۴	۰/۰۰۰۰۷	۰/۰۰۰۰۱	۱/۴۷	۰/۰۱	۰/۰۰۰۵
ضریب تغییرات (درصد)	–	۱۲/۴۳	۱۰/۳۷	۳/۶	۵/۸۶	۴/۲۷	۴/۱۸

ns، ** و * بترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال خطای ۱ و ۵ درصد.

وزن خشک

نتایج مقایسه میانگین نشان داد که افزایش غلظت تریپتوفان و رطوبت خاک تأثیر مثبت و معنی‌داری ($p \leq ۰/۰۵$) بر وزن خشک بوته گیاه دارویی دارد. با افزایش غلظت اسیدآمینه تریپتوفان، وزن خشک بوته افزایش یافت، با کاربرد ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر تریپتوفان در سطح رطوبتی ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی بیش‌ترین وزن خشک بوته به میزان ۲۱ گرم به‌دست آمد. مشاهده شد با کاهش غلظت تریپتوفان صفر (شاهد) و افزایش سطح تنش خشکی در سطح ۴۰ درصد ظرفیت زراعی،

مقاله پژوهشی، صفحات ۳۴۵-۳۶۴
DOI:10.22034/jpr.2025.8573.3391

وزن خشک بوته کاهش یافت بطوریکه کم‌ترین وزن خشک با میانگین ۳/۳۷ گرم به ثبت رسید (شکل ۲- الف).

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

روند تغییرات فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نشان داد که اسیدآمینه تریپتوفان توأم با تنش خشکی به طور معنی‌داری ($p \leq ۰/۰۱$) موجب افزایش فعالیت آنزیم-های کاتالاز و پراکسیداز شد. نتایج مقایسه میانگین نشان داد، در تیمار تنش خشکی در سطح ۴۰ درصد ظرفیت زراعی همراه با اسیدآمینه تریپتوفان با غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر بیشترین فعالیت آنزیم پراکسیداز به میزان ۰/۱۵ واحد استاندارد در میلی‌گرم پروتئین به ثبت رسید. کم‌ترین میزان فعالیت این آنزیم نیز از غلظت صفر تریپتوفان (شاهد) در سطح رطوبتی ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی به مقدار ۰/۰۲ واحد استاندارد در میلی‌گرم پروتئین به‌دست آمد (شکل ۲- ب). کاربرد تریپتوفان در غلظت‌های بالا موجب بهبود فعالیت آنزیم کاتالاز شد. در غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر تریپتوفان همراه با تنش خشکی در سطح ۴۰ درصد ظرفیت زراعی فعالیت آنزیم کاتالاز ۰/۱۷ واحد استاندارد در میلی‌گرم پروتئین بود. کم‌ترین میزان فعالیت این آنزیم نیز از غلظت صفر (شاهد) و بدون تنش خشکی ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی به میزان ۰/۰۱۸ واحد استاندارد در میلی‌گرم پروتئین به‌دست آمد (شکل ۲- ج).

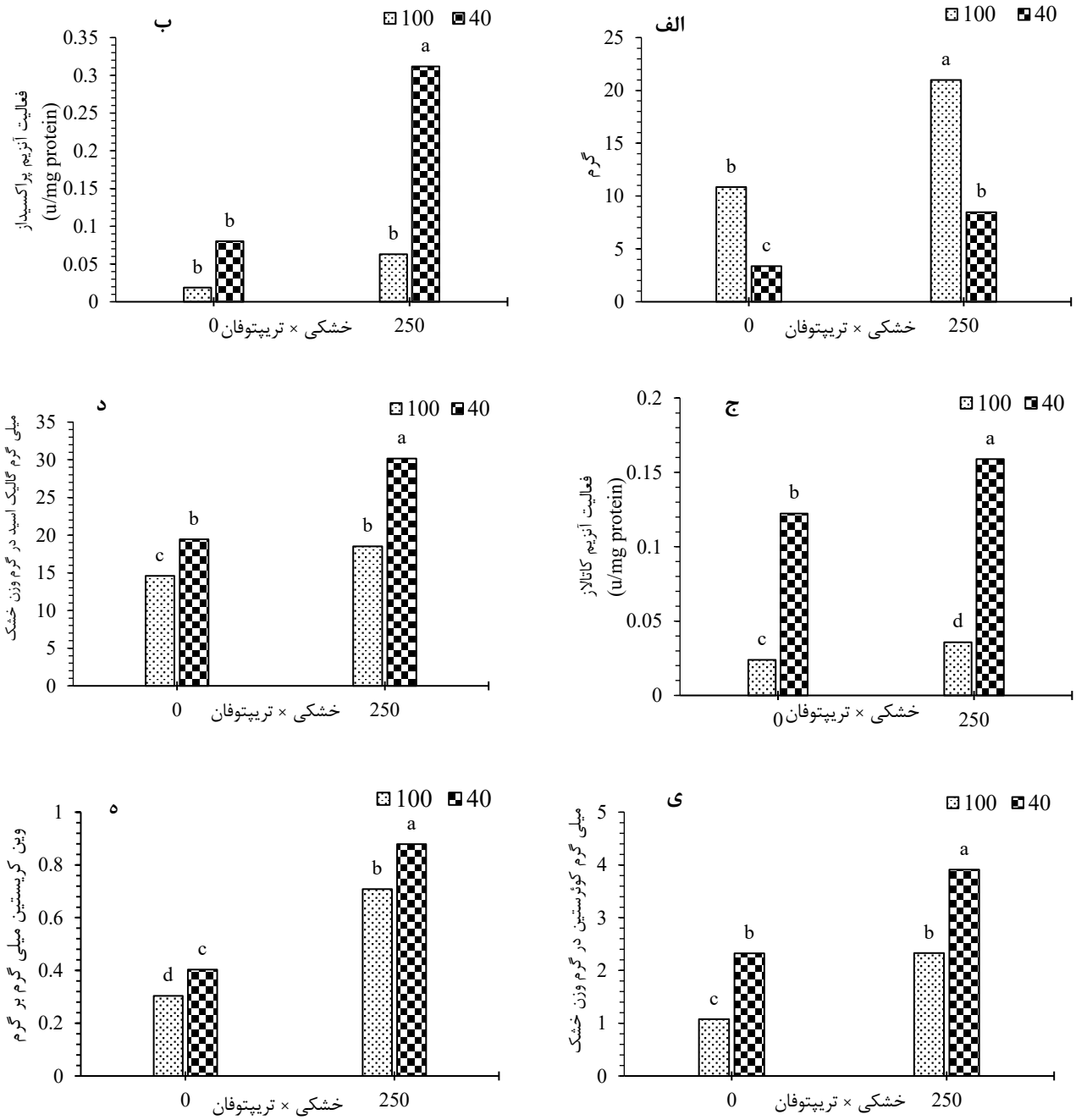
فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

تنش خشکی و اسیدآمینه تریپتوفان به طور معنی‌داری بر محتوای فنل ($p \leq ۰/۰۱$) و فلاونوئید ($p \leq ۰/۰۵$) را در گیاه پروانش افزایش داد. به طوری که بیش‌ترین محتوای فنل و فلاونوئید (بترتیب ۳۰/۱۷ میلی‌گرم کالیک اسید و ۳/۹ میلی‌گرم گوئرستین)، از غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر در تنش خشکی ۴۰ درصد ظرفیت زراعی به دست آمد. کم‌ترین میزان فعالیت این آنزیم‌های غیر آنتی اکسیدانی نیز از تیمار بدون محلول‌پاشی تریپتوفان و بدون تنش خشکی (۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی) به میزان (بترتیب ۱۴/۵۷ میلی-گرم کالیک اسید و ۱/۰۷ میلی‌گرم گوئرستین) به‌دست آمد (شکل ۲- د، ی).

میزان آلکالوئید وین‌کریستین

نتایج نشان می‌دهد که تنش خشکی و تریپتوفان به طور معنی‌داری ($p \leq ۰/۰۵$) میزان وین‌کریستین را افزایش می‌دهند. که نشان دهنده تأثیر مثبت این عوامل بر متابولیسم ثانویه گیاه است. بیشترین مقدار وین‌کریستین (۰/۸۷ میلی‌گرم بر گرم) در شرایط تنش خشکی ۴۰ درصد ظرفیت زراعی و غلظت ۲۵۰ میلی-گرم بر لیتر تریپتوفان مشاهده شده است. این نتیجه نشان می‌دهد که ترکیب این دو عامل می‌تواند بهینه-ترین شرایط را برای تولید وین‌کریستین فراهم کند. کمترین مقدار وین‌کریستین (۰/۳ میلی‌گرم بر گرم) در تیمار شاهد (بدون تنش خشکی و بدون تریپتوفان) ثبت شده است. این نتیجه تأیید می‌کند که عدم وجود تنش و تریپتوفان، تولید این آلکالوئید دارویی و با ارزش را کاهش می‌دهد (شکل ۲-ه).

مقاله پژوهشی، صفحات ۳۴۵-۳۶۴
DOI:10.22034/jpr.2025.8573.3391



شکل۲- مقایسه میانگین واکنش تیمار تنش خشکی با غلظت اسید آمینه تریپتوفان ا از نظر صفات وزن خشک (الف)، آنزیم پراکسیداز (ب)، کاتالاز (ج)، فنل (د)، فلاونوئید (ی) و وین‌کریستین (ه). ستون‌های دارای حروف مشابه از نظر آماری در سطح احتمال خطای ۵ درصد برای آزمون دانکن تفاوت معنی‌داری ندارند.

مقاله پژوهشی، صفحات ۳۴۵-۳۶۴
DOI:10.22034/jpr.2025.8573.3391

بحث و نتیجه گیری

تریپتوفان تحمل گیاهان تحت تنش خشکی را از طریق مکانیسم‌های مختلف فیزیولوژیکی افزایش می‌دهد. این اسیدآمینه، پیش ساز برخی فیتوهورمون‌های است و با تنظیم پاسخ گیاهان به شرایط کمبود آب، به بهبود رشد و کارایی فتوسنتزی کمک می‌کند. استفاده از تریپتوفان باعث افزایش تولید اسید آبسیزیک (ABA) می‌شود که با بستن روزنه‌ها به گیاهان کمک می‌کند تا از دست دادن آب را مدیریت کنند. همچنین سنتز اسید ایندول-۳-استیک (IAA) و اسید جیبرلیک را تقویت می‌کند و از رشد گیاه تحت تنش خشکی پشتیبانی می‌کند (۶۵).

در مطالعه‌ی ما محلول‌پاشی برگ‌های گیاه پروانش با اسیدآمینه تریپتوفان، بیش‌ترین وزن خشک را موجب شد. همچنین کاربرد این اسیدآمینه توانست اثرات ناشی از تنش خشکی را تعدیل کند و باعث افزایش در وزن خشک گیاهان تحت تیمار تنش خشکی شد. بررسی تأثیر کاربرد این اسیدآمینه در بیان نسبی ژن‌های *Dat* و *Prx* در تیمار تریپتوفان و تریپتوفان- خشکی (۴۰٪) منجر به افزایش ژن‌های مسیر گردید و برای ژن *Tdc* تنش خشکی و تریپتوفان- خشکی (۴۰٪) بیش‌ترین تأثیر مثبت را نشان داد. از سوی دیگر کاربرد تریپتوفان در تنش خشکی منجر به افزایش آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی (کاتالاز، پراکسیداز، فنل و فلاونوئید) گردید، بر این اساس چنین بنظر می‌رسد که کاربرد محلول‌پاشی تریپتوفان علاوه بر تأثیر مثبت بر عملکرد، توانسته با تأثیر مثبت بر میزان کاتالاز، پراکسیداز، فنل و فلاونوئید منجر به تعدیل اثرات تنش شود. این نتیجه با نتایج بسیاری از مطالعات در زمینه‌ی تنش خشکی و استفاده از محرک‌های رشدی، هم‌سو است به‌گونه‌ای که گزارش شده است که محلول‌پاشی گیاه پروانش با اسید آمینه ال- آرژنین در اثر تنش خشکی افزایش معنی‌دار را در صفاتی چون حجم آب مصرفی، کارایی مصرف آب و عملکرد گیاه به‌دنبال داشته‌است و بیش‌ترین عملکرد گیاه در تیمار ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی و ال-آرژنین ۳ میلی‌مولار به‌دست آمد (۳). علاوه بر تأثیر مثبت اسید آمینه ال- آرژنین در تنش خشکی، کاربرد اسیدآمینه تریپتوفان نیز افزایش محتوای نسبی آب، پتانسیل اسمزی و سطح کلروفیل در گیاهان تحت تنش خشکی به همراه داشت (۴۴). بر اساس پژوهش‌های ارایه شده استفاده از تریپتوفان با فعال کردن فرایند سنتز کربوهیدرات‌ها و هورمون‌هایی چون اکسین با افزایش در رشد ریشه و فرایند جذب عناصر در نهایت منجر به افزایش شاخص‌های رشدی گیاه در شرایط تنش‌های غیرزنده از جمله تنش خشکی می‌شود (۴، ۵۹). همچنین استفاده از این اسیدآمینه با تأثیر مثبت بر فعالیت آنزیم آنتی اکسیدانی و افزایش میزان آن‌ها، از اثرات منفی تنش اکسیداتیو سلول کاسته و به سازگاری گیاه و تعدیل اثرات تنش خشکی می‌افزاید (۴۶). به‌طور معمول در اثر تنش خشکی، گونه‌های فعال اکسیژن[3](ROS) در سلول نسبت به حالت عادی افزایش می‌یابند (۳۳، ۶۷) با توجه به افزایش میزان آنتی‌کسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی (کاتالاز، پراکسیداز، فنل و فلاونوئید) در مطالعه‌ی ما در اثر کاربرد تریپتوفان این احتمال وجود دارد که محلول‌پاشی تریپتوفان با تأثیر مثبت بر میزان آنتی‌کسیدان‌ها و نقش این ترکیبات در افزایش سیستم دفاعی گیاه با حذف رادیکال‌های آزاد ایجاد شده در اثر تنش، افزایش در وزن خشک را سبب شده باشد. در پژوهش‌های ایدریس و همکاران بررسی تغییرات آنتی‌اکسیدان‌های مورد نظر در اثر تنش‌هایی چون خشکی، شوری، فلزات سمی استفاده از الیسیتور در نهایت توانست با افزایش در کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز در گیاه پروانش، افزایش وزن

[3]- Reactive oxygen species

مقاله پژوهشی، صفحات ۳۴۵-۳۶۴
DOI:10.22034/jpr.2025.8573.3391

خشک و تعدیل اثرات ناشی از تنش را به دنبال داشته باشد (۲۳، ۲۴، ۲۵).

ترکیبات فنولیک و فلاونوئیدها آنتی اکسیدان‌های غیرآنزیمی حیاتی هستند که نقش مهمی در کاهش اثرات تنش‌های غیرزنده، به ویژه تنش خشکی در گیاهان ایفا می‌کنند. این ترکیبات از طریق مسیر فنیل پروپانوئید که تحت شرایط تنش فعال می‌شود، سنتز می‌شوند و منجر به افزایش تولید فنولیک‌ها می‌شود که به خنثی کردن ROS و جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدها کمک می‌کنند (۳۱). در توضیح این مطلب باید بیان داشت که در شرایط تنش خشکی، فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز افزایش می‌یابد که منجر به افزایش تولید ترکیبات فنولی و فلاونوئیدها می‌شود و در گیاهانی چون پامچال (۲۶)، شوید (۳۵)، سیاهدانه (۱۰، ۲۹)، گیاهان همیشه بهار (۳۹)، روزماری (۱۷) و مریم گلی (۱۶) به حضور این آنزیم و نقش آن اشاره شده است. استفاده از اسیدآمینه‌های فنیل آلانین و تریپتوفان به عنوان تنظیم‌کننده اسمزی و پیام‌رسان اصلی در شرایط تنش، با افزایش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز و از طریق افزایش رونویسی mRNA خاص آن، منجر به بیوسنتز و تجمع ترکیبات فنولی می‌شود که به کاهش اثرات منفی تنش در گیاهان کمک می‌کند.

در پژوهش حاضر علاوه بر بررسی تغییرات مربوط به مقدار متابولیت‌های آنتی‌اکسیدانی، تغییرات مرتبط با مقدار آلکالوئیدهای موجود در برگ‌های پروانش در سطح رونویسی (بیان نسبی ژن‌ها) و نیز مقدار آلکالوئید وین‌بلاستین مورد ارزیابی قرار گرفت. در نگاهی کلی و صرف نظر از اندک تفاوت‌های بیان در برخی تیمارهای زمانی، بیان هر سه ژن در ۲۴ ساعت و ۱۶۸ ساعت در مقایسه با تیمار شاهد با افزایش مواجه شده است. با در نظر گرفتن نقش ژن‌های مسیر بر میزان فراورده پایانی (آلکالوئیدهای وین‌بلاستین و وین‌کریستین)، مشاهده افزایش بیان در هر یک از ژن‌ها قادر خواهد بود افزایش بیان ژن‌های پایین‌دست و به طبع افزایش در میزان فراورده‌های مسیر را موجب شود که با تغییرات وین‌کریستین مطالعه‌ی حاضر هم‌راستا می‌باشد و نتایج پژوهش ما سوای از نوع الیسیتور یا تنش به کار رفته، با نتایج بسیاری از مطالعات مرتبط با مسیر TIAs هم‌سو است (۲۸، ۳۰، ۴۲، ۵۷). ژن کدکننده‌ی آنزیم پایانی در مسیر ایندولی TIAs و تبدیل‌کننده‌ی تریپتوفان به تریپتامین، تریپتوفان دکربوکسیلاز (*Tdc*) است و فراورده‌ی این مسیر با فعالیت آنزیم STR وارد مسیر الکالوئیدی TIAs می‌گردد (۳۶، ۵۰). میزان رونویسی ژن *Tdc* در گیاهچه‌های پروانش تحت تاثیر متیل جاسمونات (MeJA) افزایش یافت و این افزایش در طول زمان روند صعودی نشان داد به این ترتیب که حداکثر میزان رونویسی ژن *Tdc* در تیمارهای غلظتی ۰/۲ و ۲ میلی‌مولار در ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار صورت گرفت (۶۳). با در نظر گرفتن وضعیت قرارگیری ژن‌ها در مسیر آبشاری TIAs تغییر در میزان رونویسی هر کدام از ژن‌های بالادستی می‌تواند تغییر در میزان رونویسی ژن‌های پایین دستی را نیز به دنبال داشته باشد. بر اساس گزارش‌های موجود افزایش در میزان رونویسی ژن *Tdc* و در واقع افزایش فراورده‌های مسیر ایندولی TIAs، می‌تواند افزایش در میزان آلکالوئیدهای سنتز شده در مسیر پایین دستی را نیز موجب گردد (۷، ۴۲، ۵۷). در مسیر ساخت ویندولین، ژن‌های *Dat* و *Prx* از ژن‌های پایانی در مسیر آلکالوئیدی TIAs هستند که داستیل ویندولین را به ویندولین تبدیل می‌کنند (۵۰، ۵۷)، بر اساس گزارش‌های موجود افزایش در بیان این ژن منجر به تجمع ویندولین و آلکالوئیدهای تجاری وین-کریستین و وین‌بلاستین می‌گردد (۳۰، ۶۱). بیش‌بیان ژن *Dat* در پروانش توسط وانگ و همکاران (۲۰۱۲) و انجام آنالیزهای qRT- PCR، افزایش بیان ژن *Dat* را در همه‌ی گیاهان تراریخته نشان داد، این نتیجه با تجمع ویندولین در گیاهان مورد تحقیق هم‌خوانی

مقاله پژوهشی، صفحات ۳۴۵-۳۶۴
DOI:10.22034/jpr.2025.8573.3391

نشان داد که تأیید کننده‌ی این مطلب است که افزایش میزان رونویسی این ژن بر تولید ویندولین مؤثر است (۶۱). بررسی تاثیر متیل جاسمونات و پوترسین[4] بر بیان ژن *Dat*، *Str* و *Prx* و میزان آلکالوئیدهای وین‌کریستین و وین‌بلاستین نشان داد که تیمارهای ذکر شده موجب افزایش میزان رونویسی ژن *Dat* و افزایش این دو آلکالوئید شدند (۳۰). در این مطالعه مشخص شد که آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز، همراه با ترکیبات فنولیک و فلاونوئید، بر مسیرهای بیوسنتز آلکالوئیدهای ایندول تأثیر می‌گذارند و بر تولید آلکالوئیدهای وین‌بلاستین و وین‌کریستین موثر هستند. نقش آنزیم‌ها و متابولیت‌های ثانویه در بیوسنتز آلکالوئید و پاسخ گیاهانی چون پروانش نسبت به تنش‌های محیطی، مورد تایید است. به گونه‌ای که همتی و همکاران (۲۰۲۱) نیز بیان داشتند که آنزیم‌هایی مانند کاتالاز و پراکسیداز و متابولیت‌های ثانویه‌ای مانند ترکیبات فنولیک و فلاونوئید، به طور قابل توجهی بر مسیرهای بیوسنتزی آلکالوئیدهای ایندول (وین‌بلاستین و وین‌کریستین) تأثیر دارند. این ترکیبات به عنوان تنظیم کننده‌های کلیدی عمل می‌کنند و متابولیسم ثانویه را در پاسخ به تنش اکسیداتیو و چالش‌های محیطی تنظیم می‌کنند (۱). آنزیم پراکسیداز موجود در گیاه پروانش که با نام CRPRX1 شناخته می‌شود نقش مهمی در بیوسنتز آلکالوئیدهای ضد سرطان وین‌بلاستین و وین‌کریستین در این گیاه ایفا می‌کند. CRPRX1 اتصال پیش‌سازهای مونومری کاتارانتین و ویندولین را برای تشکیل α-3',4'-anhydrovinblastine که یک مرحله کلیدی در تولید آلکالوئیدها است را کاتالیز می‌کند (۱۵، ۲۱). این آنزیم واکوئلی، پراکسیداز اصلی در برگ‌های پروانش است و توسط یک ژن تک نسخه‌ای کدگذاری می‌شود (۱۵). جایگاه واکوئلی CRPRX1 با استفاده از پروتئین‌های همجوشی GFPتایید شد که با محل زیر سلولی پیش‌سازها و محصولات آلکالوئیدی مطابقت دارد. نقش این آنزیم در بیوسنتز آلکالوئیدها، پتانسیل آن را به عنوان هدفی برای افزایش سطح آلکالوئید در گیاهان نشان می‌دهد (۱۵). بیش‌بیان دو ژن *Tdc* و *Str* در گیاهچه‌های تراریخت پروانش بترتیب منجر به افزایش ۳۸ و ۶۵ برابری بیان نسب نسبت به شاهد شد، اندازه‌گیری میزان آلکالوئید کل، افزایش دو برابری را نشان داد. این تغییرات بیان منجر به افزایش نه برابر در ویندولین و کاتارانتین و افزایش پنج برابری میزان تولید وین‌بلاستین گردید (۴۸).

با توجه به نتایج به‌دست آمده از مطالعه‌ی حاضر چنین به‌نظر می‌رسد که استفاده از محلول‌پاشی تریپتوفان در گیاه پروانش علاوه بر تعدیل اثرات ناشی از تنش خشکی، با داشتن تأثیر مثبت بر عملکرد وزن خشک گیاه و بیان ژن‌های مسیر TIAs بر میزان آلکالوئیدهای ارزشمند حاصل از این گیاه و تناژ مزرعه افزوده است و تیماری است توصیه شونده در مقابله با مشکلات کشاورزی در شرایط کم‌آبی در کشت گیاه پروانش.

نتیجه گیری

استفاده از محلول‌پاشی اسیدآمینه‌ی تریپتوفان قادر به تعدیل اثرات ناشی از تنش خشکی در گیاه دارویی-تجاری پروانش گردید، بررسی تغییرات آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی (کاتالاز، پراکسیداز، فنل و فلاونوئید) در شرایط تنش خشکی و محلول‌پاشی تریپتوفان، افزایش را نشان داد که با توجه به نقش آن‌ها در متحمل شدن گیاه، قابل توجیح خواهد بود. بعلاوه ارزیابی الگوی بیان نسبی ژن‌های مسیر تولید آلکالوئیدهای با ارزش وین‌بلاستین و وین‌کریستین نیز حاکی از تأثیر مثبت تیمار مورد مطالعه بوده است.

[4] Putrescine

مقاله پژوهشی، صفحات ۳۴۵-۳۶۴
DOI:10.22034/jpr.2025.8573.3391

سپاسگزاری

از اساتید و کارشناسان محترم دانشکده کشاورزی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان و کادر آزمایشگاه مرکزی دانشگاه که در تأمین امکانات و راهنمایی‌های لازم در انجام این پژوهش همکاری نموده‌اند، تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

۱- جمالی‌دوست، منصور.، صالحی، امین.، فرجی، هوشنگ.، بلوچی، حمیدرضا. و رستم‌پور، پروین. ۱۴۰۳. پاسخ فیزیولوژیک، عملکردی و جذب عناصر گیاه دارویی زنیان (*Carum copticum* L.) به تنش خشکی در شرایط تغذیع با کودهای آلی و زیستی. پژوهش‌های گیاهی (زیست‌شناسی ایران). ۳۷(۳): ۲۷۵-۲۹۱.

۲- خوشحال‌سرمست، مصطفی.، وضیعی، شهرزاد.، خرمی‌مقدم، مینا. و قاسم‌نژاد، عظیم. ۱۴۰۳. پاسخ‌های بیوشیمیایی و روزنه‌ای به تنش‌های مختلف غیرزیستی در گل رز چینی (*Rosa chinensis* "Old Blush"). پژوهش‌های گیاهی (زیست‌شناسی ایران). ۳۷(۳): ۳۶۰-۳۴۴.

3. Abbaspour Esfeden, M., Kalateh Jari, S. and Fatehi, F. (2019). The Effect of Salicylic Acid and L-arginine on Morpho-physiological Properties and Leaf Nutrients of *Catharanthus roseus* under Drought Stress *Journal of Horticultural Science*. 33: 432-417.
4. Abou Dahab, T. and Abd El-Aziz, N. G. (2006). Physiological effect of diphenylamin and tryptophan on the growth and chemical constituents of Philodendron erubescens plants. *World Journal of Agricultural Sciences*. 2: 75-81.
5. Alam, M. M., Naeem, M., Khan, M. M. A. and Uddin, M. (2017). Vincristine and vinblastine anticancer catharanthus alkaloids: Pharmacological applications and strategies for yield improvement. *Catharanthus roseus*: current research and future prospects. 277-307.
6. Alaraidh, I. A. (2020). Exogenous application of salicylic acid, indoleacetic acid and tryptophan protects growth, chlorophyll synthesis and antioxidant activities and gene expression in *Catharanthus roseus*. Pak. J. Bot. 52: 893-900.
7. Almagro, L., Gutierrez, J., Pedreño, M. A. and 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 (PCTOC). 119: 543-551.
8. Amirjani, M. R. (2013). Effects of drought stress on the alkaloid contents and growth parameters of *Catharanthus roseus*. *J Agric Biol Sci*. 8: 745-750.
9. Attoa, G., Wahba, H. and Frahat, A. (2002). Effect of some amino acids and sulphur fertilizers on growth and chemical composition of Iberis amara L. plant. 17-37.
10. Bourgou, S., Kchouk, M., Bellila, A. and Marzouk, B. (2009). Effect of

DOI:10.22034/jpr.2025.8573.3391

salinity on phenolic composition and biological activity of *Nigella sativa.* Paper presented at the International Symposium on Medicinal and Aromatic Plants-SIPAM2009 853.

11. Cakmak, I. and Horst, W. J. (1991). Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (Glycine max). Physiologia plantarum. 83: 463-468.

12. Chance, B. and Maehly, A. (1955). [136] Assay of catalases and peroxidases. 2: 775-764.

13. Chang, C.-C., Yang, M.-H., Wen, H.-M. and Chern, J.-C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of food and drug analysis*. 10.

14. Choudhary, S., Zehra, A., Mukarram, M., Naeem, M., Khan, M. M. A., Hakeem, K. R. and Aftab, T. (2021). An insight into the role of plant growth regulators in stimulating abiotic stress tolerance in some medicinally important plants. Plant Growth Regulators: Signalling under Stress Conditions. 75-100.

15. Costa, M. M. R., Hilliou, F., Duarte, P., Pereira, L. G., Almeida, I., Leech, M., Memelink, J., Barceló, A. R. and 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.

16. Dong, J., Wan, G. and Liang, Z. (2010). Accumulation of salicylic acid-induced phenolic compounds and raised activities of secondary metabolic and antioxidative enzymes in Salvia miltiorrhiza cell culture. *Journal of biotechnology*. 148: 99-104.

17. El-Esawi, M. A., Elansary, H. O., El-Shanhorey, N. A., Abdel-Hamid, A. M., Ali, H. M. and Elshikh, M. S. 2017. Salicylic acid-regulated antioxidant mechanisms and gene expression enhance rosemary performance under saline conditions. Frontiers in physiology. 8: 716.

18. El-Sheikh, N. H., Farouk, S., Mohamed, Z. and Arafa, A. (2019). Growth, as well as Leaf and Stem Anatomy in Periwinkle Plant as Affected by Certain Biotic and Abiotic Elicitors. *Journal of Plant Production*. 10: 283-291.

19. Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D. and Basra, S. M. (2009). Plant drought stress: effects, mechanisms and management. Sustainable agriculture. 153-188.

20. Gendy, A. S. and Nosir, W. S. (2016). Improving productivity and chemical constituents of Roselle plant (*Hibiscus sabdariffa* L.) as affected by phenylalanine, L-tryptophan and peptone acids foliar application. Middle East J. Agric. 5: 701-708.

21. Hilliou, F., Costa, M., Almeida, I., Cardoso, I., Leech, M., Ros Barcelo, A. and Sottomayor, M. (2002). Cloning of a peroxidase enzyme involved in the biosynthesis of pharmaceutically active terpenoid indole alkaloids in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Paper presented at the Proceedings of the VI International Plant Peroxidase Symposium. (pp. 152-158).

DOI:10.22034/jpr.2025.8573.3391

University of Murcia & University of A Coruña.

22. Hisiger, S. and Jolicoeur, M. (2007). Analysis of *Catharanthus roseus* alkaloids by HPLC. Phytochemistry Reviews. 6: 207-234.

23. Idrees, M., Naeem, M., Aftab, T. and Khan, M. M. A. (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.

24. Idrees, M., Naeem, M., Aftab, T., Khan, M. M. A. and Moinuddin, F. (2011). 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.

25. Idrees, M., Khan, M. M. A., Naeem, M., Aftab, T., Hashmi, N., Alam, M. and Moinuddin. (2011). 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.

26. Jaafar, H. Z., Ibrahim, M. H. and Fakri, N. F. M. (2012). Impact of soil field water capacity on secondary metabolites, phenylalanine ammonia-lyase (PAL), maliondialdehyde (MDA) and photosynthetic responses of Malaysian Kacip Fatimah (*Labisia pumila* Benth). Molecules. 17: 7305-7322.

27. Jaleel, C. A., Gopi, R., Sankar, B., Gomathinayagam, M. and Panneerselvam, R. (2008). Differential responses in water use efficiency in two varieties of *Catharanthus roseus* under drought stress. Comptes Rendus Biologies. 331: 42-47.

28. Jalili, S. (2021). Applied Soil Physics in Irrigation and Drainage. Khuzestan Agricultural Sciences and Natural Resources University Press (In persian). 1: 404.

29. Kabiri, R., Nasibi, F. and Farahbakhsh, H. (2014). Effect of Exogenous Salicylic Acid on Some Physiological Parameters and Alleviation of Drought Stress in Nigella sativa Plant under Hydroponic Culture. Plant Protection Science. 50.

30. Khataee, E., Karimi, F. and 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.

31. Ksouri, R., Megdiche, W., Debez, A., Falleh, H., Grignon, C. and Abdelly, C. (2007). Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte Cakile maritima. *Plant Physiology and Biochemistry*. 45: 244-249.

32. Levêque, D. and Jehl, F. (2007). Molecular pharmacokinetics of *catharanthus* (vinca) alkaloids. The

مقاله پژوهشی، صفحات ۳۴۵-۳۶۴
DOI:10.22034/jpr.2025.8573.3391

Journal of Clinical Pharmacology. 47: 579-588.

33. Mathé, C., Barre, A., Jourda, C. and Dunand, C. (2010). Evolution and expression of class III peroxidases. Archives of Biochemistry and Biophysics. 500: 58-65.

34. Meda, A., Lamien, C. E., Romito, M., Millogo, J. and Nacoulma, O. G. (2005). Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. Food chemistry. 91: 571-577.

35. Mehr, Z., Khajeh, H., Bahabadi, S. and Sabbagh, S. (2012). Changes on proline, phenolic compounds and activity of antioxidant enzymes in *Anethum graveolens* L. under salt stress.

36. Mokhaberi, A., Ahmadi, J. and Mafakheri, S. (2013). 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.

37. Munsif, F., Shah, T., Arif, M., Jehangir, M., Afridi, M. Z., Ahmad, I., Jan, B. L. and Alansi, S. (2022). Combined effect of salicylic acid and potassium mitigates drought stress through the modulation of physio-biochemical attributes and key antioxidants in wheat. Saudi *Journal of Biological Sciences*. 29: 103294.

38. Nejat, N., Valdiani, A., Cahill, D., Tan, Y.-H., Maziah, M. and Abiri, R. (2015). Ornamental exterior versus therapeutic interior of Madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus*): the two faces of a versatile herb. *The Scientific World Journal*. (1), 982412.

39. Pacheco, A. C., Cabral, C. S., Fermino, E. S. and Aleman, C. C. (2013). Salicylic acid-induced changes to growth, flowering and flavonoids production in marigold plants. *J. med. Plants res*. 7: 3158-3163.

40. Pan, Q., Chen, Y., Wang, Q., Yuan, F., Xing, S., Tian, Y., Zhao, J., Sun, X. and 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.

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

42. Pandey, S. S., Singh, S., Babu, C. V., Shanker, K., Srivastava, N., Shukla, A. K. and 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.

43. Ponce, A., Del Valle, C. and Roura, S. (2004). Natural essential oils as reducing agents of peroxidase activity in leafy vegetables. LWT-*Food Science and Technology*. 37: 199-204.

44. Rao, S., Qayyum, A., Razzaq, A., Ahmad, M., Mahmood, I. and Sher, A. (2012). Role of foliar application of

DOI:10.22034/jpr.2025.8573.3391

salicylic acid and L-tryptophan in drought tolerance of maize.

45. Rezayian, M., Niknam, V. and Ebrahimzadeh, H. (2018). Differential responses of phenolic compounds of Brassica napus under drought stress. Plant Physiology. 8: 2417-2425.

46. Sadak, M. S. and Ramadan, A. a. E.-M. (2021). Impact of melatonin and tryptophan on water stress tolerance in white lupine (*Lupinus termis* L.). *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 27: 469-481.

47. Schmelzer, G. H. and Gurib-Fakim, A., (2008). Plant Resources of Tropical Africa: Medicinal Plants. PROTA Foundation. In. Leiden.

48. Sharma, A., Verma, P., Mathur, A. and Mathur, A. K. (2018). Overexpression of tryptophan decarboxylase and strictosidine synthase enhanced terpenoid indole alkaloid pathway activity and antineoplastic vinblastine biosynthesis in *Catharanthus roseus*. Protoplasma. 255: 1281-1294.

49. Sharma, A., Mathur, A. K., Ganpathy, J., Joshi, B. and Patel, P. (2019). Effect of abiotic elicitation and pathway precursors feeding over terpenoid indole alkaloids production in multiple shoot and callus cultures of Catharanthus roseus. Biologia. 74: 543-553.

50. Shukla, A. K. and Khanuja, S. P. (2013). *Catharanthus roseus*: the metabolome that represents a unique reservoir of medicinally important alkaloids under precise genomic regulation. OMICS Applications in Crop Science (ed D. Barh). 325-384.

51. Siddiqui, M. J. A., Ismail, Z. and Saidan, N. H. (2011). Simultaneous determination of secondary metabolites from Vinca rosea plant extractives by reverse phase high performance liquid chromatography. Pharmacognosy Magazine. 7: 92.

52. Singh, D., Maithy, A., Verma, R., Gupta, M. and Kumar, S. (2000). Simultaneous determination of Catharanthus alkaloids using reversed phase high performance liquid chromatography.

53. Singh, S. N., Vats, P., Suri, S., Shyam, R., Kumria, M., Ranganathan, S. and Sridharan, K. (2001). Effect of an antidiabetic extract of *Catharanthus roseus* on enzymic activities in streptozotocin induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 76: 269-277.

54. Soltani, N., Nazarian-Firouzabadi, F., Shafeinia, A., Sadr, A. S. and Shirali, M. (2020). The expression of Terpenoid Indole Alkaloid (TIAs) pathway genes in *Catharanthus roseus* in response to salicylic acid treatment. *Molecular Biology Reports*. 47: 7009-7016.

55. Soltani, N., Firouzabadi, F. N., Shafeinia, A., Shirali, M. and Sadr, A. S. (2022). De Novo transcriptome assembly and differential expression analysis of *catharanthus roseus* in response to salicylic acid. *Scientific Reports*. 12: 17803.

56. Soltani N, Nazarian Firouzabadi F, Shafeinia A, Sadr a S and M., S. (2021). Expression analysis of some genes involved in Terpenoid Indole Alkaloids pathway in periwinkle (*Catharanthus roseus*) following

DOI:10.22034/jpr.2025.8573.3391

foliar application of salicylic acid. *Iranian Genetics Society*. 16: 32-25.

57. Sun, J., Manmathan, H., Sun, C. and Peebles, C. A. (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: 1-14.

58. Suttipanta, N., Pattanaik, S., Kulshrestha, M., Patra, B., Singh, S. K. and Yuan, L. (2011). The Transcription Factor CrWRKY1 Positively Regulates the Terpenoid Indole Alkaloid Biosynthesis in *Catharanthus roseus* Plant Physiology. 157: 2081-2093.

59. Talaat, I. M., Bekheta, M. and Mahgoub, M. H. (2005). Physiological response of periwinkle plants (*Catharanthus roseus* L.) to tryptophan and putrescine. International *Journal of Agriculture and Biology*. 7: 210-213.

60. Walts, L. (2004). The herbal encyclopedia, a practical guide to the many uses of herbs. I Universe. Inc, Lincoln.

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

62. Wang, X., Pan, Y.-J., Chang, B.-W., Hu, Y.-B., Guo, X.-R. and Tang, Z.-H. (2016). Ethylene-induced vinblastine accumulation is related to activated expression of downstream TIA pathway genes in *Catharanthus roseus*. BioMed research international.

63. 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.

64. Whitmer, S., Canel, C., Hallard, D., GonçAlves, C. and Verpoorte, R. (1998). Influence of Precursor Availability on Alkaloid Accumulation by Transgenic Cell Line of *Catharanthus roseus* L. Plant Physiology. 116: 853-857.

65. Yasmin, H., Nosheen, A., Naz, R., Bano, A. and Keyani, R. (2017). L-tryptophan-assisted PGPR-mediated induction of drought tolerance in maize (*Zea mays* L.). *Journal of Plant Interactions*. 12: 567-578.

66. Yeshi, K., Crayn, D., Ritmejerytė, E. and Wangchuk, P. (2022). Plant secondary metabolites produced in response to abiotic stresses has potential application in pharmaceutical product development. Molecules. 27: 313.

67. Zheng, Y.-Q., Liu, J.-X., Wang, J.-N. and Xu, L. (2007). Effects of crocin on reperfusion-induced oxidative/nitrative injury to cerebral microvessels after global cerebral ischemia. Brain research. 1138: 86-94.

مجله پژوهش‌های گیاهی(مجله زیست شناسی ایران)
جلد۳۹، شماره۳، ۱۴۰۵
مقاله پژوهشی، صفحات ۳۴۵-۳۶۴
DOI:10.22034/jpr.2025.8573.3391

The effect of foliar application of the amino acid tryptophan and drought stress on the altered relative expression patterns of certain genes in the indole-alkaloid TIAs pathway, as well as enzymatic and non-enzymatic antioxidants in the leaves of the periwinkle plant (*Catharanthus roseus*)

Farshid Yousefi[1], Alireza Abdali Mashhadhi[1], Amin Lotfi Jalalabadi[1], Alireza Shafeinia[1], Saeed Jalili[2], Narges Soltani*[3]

[1.] Faculty of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.

[2.] Department of water engineering, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.

[3.] Department of Production Engineering and Plant Genetics, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Lorestan University, Khoramabad, Lorestan, Iran.

*** Corresponding Author Email: nargesoltani29@gmail.com**

Abstract

Periwinkle is a highly valuable medicinal herb as it is the only source for the production of the anticancer drugs vinblastine and vincristine. The low synthesis and high cost of the drugs derived from the Periwinkle, along with water scarcity as one of the biggest limiting factors in agriculture, led to this research focusing on the effects of the amino acid tryptophan and drought stress on the changes in secondary metabolites of Periwinkle and the genes associated with the synthesis pathways of vinblastine and vincristine. This study was conducted in a completely randomized design with three factors: tryptophan spraying (0 and 250 ppm), drought stress (40 and 100% field capacity), and time (24, 48, 72, and 168 hours) for evaluating relative expression. The assessment of changes in expression pattern showed the highest relative expression for the *Dat* and *Prx* genes in all three conditions at 24 hours and 168 hours compared to the control. The *Tdc* gene, the 24 and 72-hour treatments after applying tryptophan and the 168-hour tryptophan-drought treatment showed down-regulated in relative expression, while other treatment levels showed an increase in relative expression compared to the control. From a physiological perspective, the highest dry weight of the plant was obtained in the tryptophan spraying treatment. Additionally, drought stress and tryptophan led to an increase in the activity of catalase and peroxidase, as well as the content of phenols and flavonoids, with the highest levels of each observed at concentration of 250 ppm under 40% drought stress of FC.

Key words: Elicitor, indole terpenoid alkaloid pathway, vinblastine and vincristine.