Sari Agriculture Sceinces and Natural Resources University

Journal of Crop Breeding Vol. 15, No 46, Summer 2023 p: 198-206

"Research Paper"

The Effect of Titanium Oxide Nanoparticles on the Gene Expression Involved in the Secondary Metabolite Production of the Medicinal Plant Periwinkle (*Catharanthus roseus*)

Mohammad Abyari

Department of Science, Farhanghiyan University, Tehran, Iran, (Corresponding author: m.abyari@cfu.ir)

Received: 14 September, 2022 Accepted: 24 January, 2023

Extended Abstract

Introduction and Objective: Medicinal plant periwinkle with the scientific name *Catharanthus roseus* is an important source of anticancer and antihypertensive alkaloids. Due to the high price of these metabolites and their small content in periwinkle plant, tissue culture techniques have been suggested to increase their production. Therefore, this study was carried out with the aim of evaluating the effect of titanium oxide nanoparticles (TiO_2) on the expression of key genes of the biosynthetic pathway of important medicinal constituents in periwinkle.

Material and Methods: Murashige and Skoog (MS) medium was used as the basic medium along with 2,4-D (1 mg/L) and BAP (0.5 mg/L) plant growth regulators for leaf cultivation, callus induction, and cell suspension production. Periwinkle suspension culture was treated with concentrations of 0, 50, and 100 mg/l TiO_2 nanoparticles at the peak of cell growth. Then, the expression of *STR*, *SGD*, *DAT*, and *PRX* genes was measured 24, 48, and 72 h after the treatment by Real-Time PCR. Tetrazolium test was also used to measure cell viability.

Results: Although there was no significant difference between the percentage of cell viability after 50 and 100 mg/L NP-TiO2 treatment; however, the passage of time (from 24/48 h to 72 h) caused a decrease in cell viability. The application of a higher concentration of nanoparticles increased the expression of the key genes involved in the biosynthetic pathway of indole alkaloids. This increase continued up to 48 h after treatment, but then reduced. The highest expressions of *STR*, *SGD*, *DAT*, and *PRX* genes were obtained by 290, 186, 193, and 287% increase, respectively, in 48 h after the treatment of 100 mg/l TiO_2 nanoparticles (as the most effective treatment with the highest percentage of cell viability).

Conclusion: in the face of TiO_2 nanoparticles, as an elicitor and stress-causing agent, the expression of the genes involved in the biosynthesis of indole alkaloids is induced to achieve defense against the stressful agent and then the expression of the genes decreases after the passage of time and reduction of stressful symptoms. In general, the concentration of 100 mg/l TiO_2 and the extraction of metabolites in 48 h after the treatment can be introduced as a promising stimulus to increase the content of indole alkaloids. According to the results, it is suggested that the exact mechanism involved in this metabolite increase be further investigated.

Keywords: Medicinal plant, Periwinkle, Secondary metabolites, Titanium oxide nanoparticles.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-12-07]

[DOI: 10.61186/jcb.15.46.198]

OPEN ACCESS
دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

"مقاله پژوهشی"

تاثیر نانوذرات اکسید تیتانیوم بر بیان ژن‌های درگیر در تولید متابولیت‌های ثانویه گیاه دارویی پریوش (*Catharanthus roseus*)

محمّد آبیاری

گروه علوم پایه، دانشگاه فرهنگیان، تهران، ایران، (نویسنده مسوول: m.abyari@cfu.ir)

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۶/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۴
صفحه: ۱۹۸ تا ۲۰۶

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: گیاه دارویی پریوش با نام علمی *Catharanthus roseus*، منبع مهم آلکالوئیدهای ضدسرطان و ضدفشار خون است. به‌دلیل قیمت بالای این متابولیت‌ها و محتوی اندک آنها در گیاه پریوش، تکنیک‌های کشت‌بافت برای افزایش تولید آنها پیشنهاد شده‌اند. بنابراین، این مطالعه با هدف ارزیابی تاثیر نانوذرات اکسید تیتانیوم (TiO_2) بر بیان ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتز ترکیبات فعال مهم دارویی در گیاه پریوش انجام شد.

مواد و روش‌ها: از محیط موراشیک و اسکوگ (MS) به‌عنوان محیط پایه درکنار دو تنظیم‌کننده رشد 2,4-D (۱ mg/L) و BAP (۰/۵ mg/L) برای کشت برگ، القاء کالوس و تولید سوسپانسیون سلولی استفاده شد.کشت سوسپانسیون پریوش در پیک رشد سلولی با غلظت‌های ۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات TiO_2 تیمار شد. در ادامه، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از تیمار، بیان ژن‌های *STR*، *SGD*، *DAT* و *PRX* با تکنیک Real-Time PCR سنجش شد. از آزمون تترازولیوم نیز جهت سنجش زنده‌مانی سلولی استفاده شد.

نتایج: هرچند تفاوت معنی‌داری مابین درصد زنده‌مانی بعد از تیمار ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات TiO_2 وجود نداشت، با اینحال، گذشت زمان (از ۲۴ و ۴۸ ساعت به ۷۲ ساعت) باعث کاهش زنده‌مانی سلولی شد. کاربرد غلظت بالاتر نانوذره TiO_2 (از ۵۰ به ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) باعث افزایش بیشتر بیان ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتز ایندول آلکالوئیدهای پریوش شد. این افزایش تا ۴۸ ساعت بعد از تیمار ادامه یافت اما بعد از آن کاهش یافت. بیشترین بیان ژن‌های *STR*، *SGD*، *DAT* و *PRX* به‌ترتیب با ۲۹۰، ۱۸۶، ۱۹۳ و ۲۸۷ درصد افزایش در ۴۸ ساعت بعد از تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذره TiO_2 (به‌عنوان موثرترین تیمار با بیشترین درصد زنده‌مانی سلولی) بدست آمدند.

نتیجه‌گیری: در مواجه با نانوذرات TiO_2، به‌عنوان یک الیسیتور و عامل تنش‌زا، ابتدا بیان ژن‌های درگیر در بیوسنتز ایندول آلکالوئیدها القاء می‌شود تا دفاع در برابر عامل تنش‌زا حاصل شود و بعد از گذشت زمان و کاهش علائم تنش‌زا (نانوذره)، متعاقبا بیان ژن‌های فوق کاهش می‌یابد. درکل، غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر TiO_2 و برداشت متابولیت‌ها در ۴۸ ساعت بعد از تیمار را می‌توان به‌عنوان محرک امیدبخش افزایش محتوی ایندول آلکالوئیدها معرفی کرد. با توجه به نتایج، پیشنهاد می‌شود که مکانیزم دقیق درگیر در این افزایش متابولیت مورد بررسی بیشتر قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: پریوش، گیاه دارویی، متابولیت‌های ثانویه، نانوذرات اکسید تیتانیوم

مقدمه

پریوش با نام علمی *Catharanthus roseus* یک گیاه دارویی مهم متعلق به خانواده Apocynaceae می‌باشد که مجموعه متنوعی از ترکیبات فعال زیستی را در اندام‌های خود تولید می‌کند. تاکنون، حدود ۱۲۰ نوع آلکالوئید از این گیاه استخراج شده که مقدار آنها در پیکر رویشی گیاه تنها به ۰/۲ تا ۱ درصد می‌رسد (۸). ساقه‌ها و برگ‌های پریوش منبع مهم آلکالوئیدهای وین‌کریستین و وین‌بلاستین می‌باشند که جزء داروهای ضدسرطان به شمار می‌آیند. علاوه بر اینها، آلکالوئیدهای آجمالیسین و سرپنتین در ریشه‌های گیاه نیز تجمع می‌یابند که داروهای ضد فشارخون تلقی می‌شوند (۱۱). در مسیر بیوسنتز ایندول آلکالوئیدها، آنزیم استریکتوسیدین سینتاز (STR) سبب تبدیل تریپتامین و سکولوگانین به استریکتوسیدین می‌شود که پیش‌ساز تولید ایندول آلکالوئیدهاست. مسیر بیوسنتز تمام آلکالوئیدها تا تولید استریکتوسیدین مشترک است و از این لحظه، مسیر در گونه‌های گیاهی تولیدکننده آلکالوئیدها منشعب می‌شود. درادامه، آنزیم SGD قرار دارد که سبب تبدیل استریکتوسیدین به استریکتوسیدین آگلیکوزید می‌شود. آنزیم PRX نیز به نوبه خود وین‌دولین و کاتارانتین را به آنهیدرو-وین‌بلاستین تبدیل می‌کند که پیش‌ساز وین‌کریستین است. ترکیب وین‌دولین نیز توسط آنزیم DAT تولید می‌شود (۱۳). در کل، به خاطر قیمت بالای این متابولیت‌ها و محتوی اندک آنها در گیاه پریوش، تکنیک‌های کشت‌بافت جهت افزایش تولید آلکالوئیدهای پریوش مورد توجه قرار گرفته اند (۱۱).

تکنیک‌های کشت اندام، بافت و سلول گیاهی تبدیل به ابزار با ارزشی در تحقیقات متابولیت‌های ثانویه گیاهی شده‌اند. محققان با استفاده از این تکنیک‌ها سعی بر آن دارند تا شواهد بیشتری در رابطه با چگونگی بیوسنتز متابولیت‌ها و مکانیسم تنظیمی آنها به‌دست آورند و بدین‌ترتیب بتوانند تولید متابولیت‌های ثانویه با ارزش را در گیاهان دارویی افزایش بدهند (۲۴). در این بین، فنون کشت‌بافت از جمله سوسپانسیون سلولی و کاربرد الیسیتورها راه‌حلی مناسب برای تولید انبوه متابولیت‌های ثانویه است. تاکنون، الیسیتورهای زیستی (مثل قارچ، باکتری و غیره) و غیرزیستی (مثل اشعه فرابنفش، ترکیب شیمیایی، و غیره) متنوعی به‌منظور افزایش تولید ایندول-آلکالوئیدها در سوسپانسیون سلولی گیاه دارویی پریوش مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (۲۳). با این حال، شناسایی الیسیتورهای کارآمدتر می‌تواند راه را برای افزایش تولید ترکیباتی مهمی همچون وین‌کریستین، وین‌بلاستین، آجمالیسین و سرپنتین تسهیل نماید.

الیستیورهای مبتنی بر نانوذرات، از جمله نانوذرات اکسید تیتانیوم (TiO_2)، در کشت بافت مورد توجه قرار گرفته‌اند. به‌طور کلی، پاسخ گیاه به نانوذرات بر مبنای نوع گونه، مرحلهٔ رویشی، سن و ماهیت نانوذرات متفاوت می‌باشد؛ با اینحال، تاثیر مثبت بعضی نانوذرات ازجمله TiO_2 در گیاهان اثبات شده است

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-12-07]

[DOI: 10.61186/jcb.15.46.198]

(۲۲). نانوذرات TiO_2 سبب افزایش جذب نیترات (۲۶)، تسریع تبدیل مواد غیرآلی به مواد آلی (۱۵)، بهبود جذب نور و فعالیت آنزیم روبیسکو (۱۴) و فرایندهای کلیدی سلولی دیگر می‌شوند. در مطالعه‌ای، Aghaei و همکاران (۲۰۲۱) تاثیر محلول پاشی نانوذرات TiO_2 (۰، ۱۰، ۲۰، ۴۰، و ۸۰ میلی‌گرم در لیتر) بر پاسخ بیوشیمیایی و محتوی اسانس گیاه زنیان را تحت شوری مطالعه کردند. نتایج آنها نشان داد که محلول پاشی نانوذرات TiO_2 با غلظت ۲۰ و ۴۰ میلی گرم بر لیتر سبب بهبود عملکرد اسانس (۷/۶ درصد) و محتوی اسانس (۳/۴ درصد) در مقایسه با شاهد شد (۲). هرچند سازوکار تاثیر نانوذرات TiO_2 بر گیاهان نامعلوم است؛ با اینحال، به نظر می‌رسد که این ماده سبب تحریک فرایندهای کلیدی همچون سامانه آنتی‌اکسیدانت و حذف رادیکال‌های آزاد می‌شود و از این طریق انرژی و ماده لازم برای بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه را حفظ می‌کند (۶).

با توجه به یافته‌های علمی، هنوز اطلاعاتی درباره تاثیر نانوذرات TiO_2 بر بیان ژن‌های مسیر بیوسنتز ایندول آلکالوئیدها در دسترس نیست. بنابراین، این مطالعه با هدف بررسی تاثیر نانوذرات TiO_2 بر بیان ژن‌های *STR*، *SGD*، *DAT* و *PRX* در گیاه دارویی پریوش انجام شد.

مواد و روش‌ها

نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم (TiO2)

در این آزمایش، از نانوذرات TiO_2با میانگین اندازه ذرات ۲۵ نانومتر (شرکت سیگما) استفاده شد. برای تهیه سوسپانسیون نانوذرات در غلظت‌های ۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر از آب دیونیزه استفاده شد. برای پراکنده‌سازی سوسپانسیون نیز از سونیکاسیون (160W, 35KHz) به مدت ۳۰ دقیقه بهره گرفته شد. جهت ممانعت از تراکم مجدد ذرات، سوسپانسیون نانوذره تا زمان استفاده روی همزن مغناطیسی نگهداری شد. مشخصات نانوذرات TiO_2 در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱- مشخصات نانوذرات TiO_2

Table 1. Characterization of TiO_2 nanoparticles

نانوذرات TiO_2 TiO_2 NPs	مساحت سطحی (m^2g^{-1}) surface area (m^2g^{-1})	حجم تخلخل کل (cm^3g^{-1}) Total pore volume (cm^3g^{-1})	خلوص Purity	متوسط اندازه (nm) medium size (mm)
پودر سفید white powder	22	0.33	99.9%	25

ریزنمونه و سوسپانسیون سلولی

ریزنمونه‌های برگی برای تهیه کالوس تهیه شده و سپس ضدعفونی شدند. از محیط موراشیک و اسکوگ (MS) به‌عنوان محیط پایه درکنار دو تنظیم‌کننده‌های رشد 2,4-D (۱ mg/L) و BAP (۰/۵ mg/L) برای کشت برگ، القاء کالوس و تولید سوسپانسیون سلولی استفاده شد. جهت تهیه سوسپانسیون، ۲ گرم از کالوس تردد در یک ارلن ۵۰۰ میلی‌لیتری (حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت) روی شیکر انکوباتور با شدت ۱۲۰ دور در دقیقه، دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و تاریکی قرار گرفت (۲۸).

منحنی رشد و اعمال الیسیتور نانوذره

پیک رشد سلولی بدین گونه تعیین شد که هر ۳ روز یک‌بار تا یک ماه نمونه‌برداری انجام شد و سپس مقدار وزن‌تر و خشک سلول‌ها سنجش شد (۲۸). پس از حصول پیک رشد سلولی، نانوذره‌های TiO_2 در غلظت ۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر به محیط کشت افزوده شدند. در ادامه، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار، محتوی هر ارلن با صافی فیلتر و سپس وزن نمونه‌ها یادداشت شد. نمونه‌ها در فویل آلومینیومی پیچیده و در ازت مایع قرار گرفتند تا زمان استخراج RNA در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد محفوظ بمانند.

استخراج RNA و ساخت cDNA

محتوی RNA سلولی از طریق کیت RNX-PLUS و مطابق دستور شرکت شرکت سیناژن استخراج شد. کیفیت RNA استخراجی توسط الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد و غلظت آن توسط نانودراپ تعیین شد. از آنزیم DNaseI جهت حذف آلودگی ژنومی استفاده شد. در ادامه، cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA (سیناژن) ساخته شد. واکنش PCR با آغازگر 18S rRNA برای اطمینان از صحت سنتز cDNA انجام شد. بعد از الکتروفورز نمونه‌ها روی ژل آگارز ۱/۵ درصد (w/v)، کیفیت سنتز cDNA با مستندساز ژل تأیید شد.

واکنش Real-Time PCR

از اطلاعات ژنی NCBI و نرم‌افزار Primer3 برای طراحی آغازگرهای مربوط به ژن‌های *STR*، *SGD*، *DAT* و *PRX* استفاده گردید (جدول ۲). سه نمونه RNA از هر تکرار بیولوژیکی باهم ادغام گردیدند تا خزانه RT-PCR را تشکیل دهند. برای هر خزانه نیز سه تکرار تکنیکی لحاظ شد و از میانگین آنها برای برآورد فراوانی نسبی رونوشت‌ها استفاده شد. واکنش RT-PCR شامل ۳ میکرولیتر SYBR Green (5X)، ۲ میکرولیتر cDNA (1 µg/µl)، ۱ میکرولیتر Primer F (10 pmol/µl)، ۱ میکرولیتر Primer R (10 pmol/µl) و ۱۵ میکرولیتر ddH_2O بود که بعد از رقیق‌سازی به ۱۰۰ میکرولیتر، از ۵ میکرولیتر آن بعنوان الگو برای اجرای واکنش استفاده گردید. جهت اندازه‌گیری بیان ژن‌ها از 18s-rRNA به‌عنوان کنترل داخلی یا ژن مرجع استفاده شد. مقدار CT هر نمونه برای هر کدام از ژن‌ها به وسیله نرم‌افزار Line Gene K تعیین شد. تغییرات کمی بین نمونه‌ها به کمک رویکرد کمی‌سازی نسبی ΔΔCT تعیین شد (۱۸).

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-12-07]
[DOI: 10.61186/jcb.15.46.198]

جدول ۲- آغازگرهای مورد استفاده برای سنجش بیان ژن‌های کلیدی بیوسنتز ایندول آلکالوئیدها
Table 2. The primers used to measure the expression of key genes involved in the biosynthesis of indole alkaloids

طول قطعه (جفت باز) Fragment length (bp)	توالی آغازگر Primer sequence	نام ژن و آغازگر Gene and primer names
219	F:5'TCGGATAGTGAAGTATTGGCTA3' R: 5'GGTGGTGGAAGTGGTATAAC3'	*STR*
200	F: 5'GATGCTATTGATGATGGT3' R: 5'TTGCTTCTTGACTAACTC3'	*SGD*
192	F: 5'GGCAGTGAAGATACTACAG3' R: 5'GGAATCAGAAACCAATAACG3'	*DAT*
182	F: 5'GCTCTGACATACTTGCTCTC3' R: 5'ATTCTTGGTTGCGAGTGA3'	*PRX1*
102	F: 5'GCAACAAACCCCGACTTCTG 3' R: 5'TGCGATCCGTCGAGTTATCA3'	*18S rRNA*

زنده‌مانی سلولی

از آزمون تترازولیوم جهت سنجش زنده‌مانی سلولی استفاده شد. در این آزمون، غلظت ۵ میلی‌گرم بر لیتر تترازولیوم بکار رفت. جهت تعیین زنده‌مانی سلولی، ۰/۷۵ میلی‌لیتر از کشت سوسپانسیون با ۱/۵ میلی‌لیتر از محلول تترازولیوم مخلوط شده و به مدت یک شبانه‌روز روی شیکر قرار گرفت. در ادامه، چند قطره از محیط کشت مایع حاوی سلول‌های گیاه روی لام قرار گرفت و با بزرگنمایی ۷۵۰ در میکروسکوپ‌نوری ارزیابی شد. سلول‌های قرمز رنگ شمارش شدند و نسبت سلول‌های زنده به مرده تعیین شد.

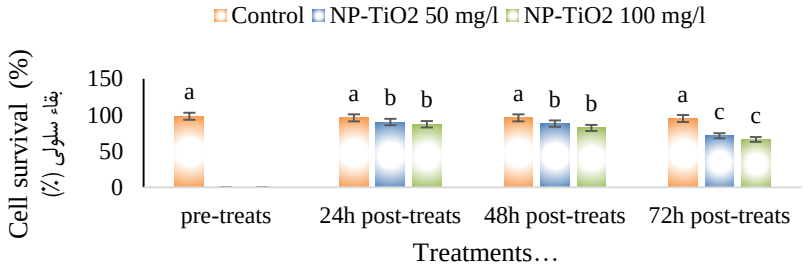
تجزیه و تحلیل آماری

این مطالعه در قالب آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کامل تصادفی با سه تکرار در آزمایشگاه انجام شد. در نرم افزار SAS (نسخه ۹,۴)، از آیتم تجزیه واریانس (ANOVA) به‌منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها و از روش LSD (حداقل تفاوت معنی دار) برای مقایسه میانگین استفاده گردید. نمودارها نیز با استفاده از Office Excelترسیم شدند.

نتایج و بحث

با توجه به گزارشات علمی، هنوز اطلاعاتی درباره اثر نانوذرات TiO_2 بر بیان ژن‌های مسیر بیوسنتز ایندول آلکالوئیدها در دسترس نیست. لذا، این مطالعه با هدف بررسی تاثیر نانوذرات TiO_2 بر بیان ژن‌های *STR*، *SGD*، *DAT* و *PRX* در گیاه دارویی پریوش انجام شد.

مطالعه درصد زنده‌مانی سلول‌ها نشان داد که با افزایش غلظت نانوذره، درصد سلول‌های زنده به طور غیرمعنی‌داری کاهش می‌یابد. بنابراین، می‌توان گفت از حیث این ویژگی، اختلافی مابین دو غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذره TiO_2 وجود ندارد. با این حال، درصد سلول‌های زنده با گذشت زمان به طور معنی‌داری کاهش یافت؛ هرچند اختلافی مابین ۲۴ و ۴۸ بعد از تیمار وجود نداشت اما اختلاف این دو زمان با ۷۲ ساعت بعد از تیمار معنی‌دار بود (شکل ۱). بنابراین، درصد زنده‌مانی سلول‌ها ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از تیمار مطلوب بود.



شکل ۱- درصد زنده‌مانی سلول‌های پریوش تحت تیمار نانوذره TiO_2. حروف مشترک گویای عدم اختلاف معنی‌دار مابین تیمارها بر اساس آزمون LSD است. اختصارات: pre-treats، قبل از اعمال تیمارها؛ 24h post-treats، ۲۴ ساعت بعد از اعمال تیمارها؛ 48h post-treats، ۴۸ ساعت بعد از اعمال تیمارها؛ 72h post-treats، ۷۲ ساعت بعد از اعمال تیمارها؛ Co کنترل؛ NP-TiO2 50 to100 mg/l، تیمار نانوذرات اکسید تیتانیوم ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر

Figure 1. Cell survival percentage in different time periods and concentrations of TiO_2 nanoparticles. The same letters indicate no significant difference at the 5% probability level in the LSD test. Abbreviations: pre-treats; before applying treatments; 24h post-treats, 24 hours after applying treatments; 48h post-treats, 48 hours after applying treatments; 72h post-treats, 72 hours after applying treatments; Co control; NP-TiO_2, 50 and 100 mg/l TiO_2 nanoparticle treatment

نتایج آزمایشات گذشته نشان داده است که رونویسی ژن‌های بیوسنتزی، مهم‌ترین مرحله تنظیمی در فرآیندهای پیچیده‌ای است که منجر به تجمع ایندول‌آلکالوئیدها در سوسپانسیون سلولی پریوش می‌شوند (۴). بنابراین، مطالعه بیان ژن‌های *STR*، *SGD*، *DAT* و *PRX* می‌تواند رویکردی به مراتب سریعتر، کم‌هزینه‌تر و قابل‌اعتماد برای سنجش پاسخ متابولیکی پریوش به الیسیتورها و عوامل تنش‌زا باشد. نتایج ما گویای این موضوع بود که اثر تیمار نانوذره بر بیان ژن‌های موردمطالعه معنی‌دار بود (جدول ۳).

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-12-07]
[DOI: 10.61186/jcb.15.46.198]

جدول ۳- تجزیه واریانس بیان ژن‌های موردمطالعه تحت تیمار TiO_2 در زمان‌های متفاوت

Table 3. Variance analysis of the expression of studied genes under NP-TiO_2 treatment at different times

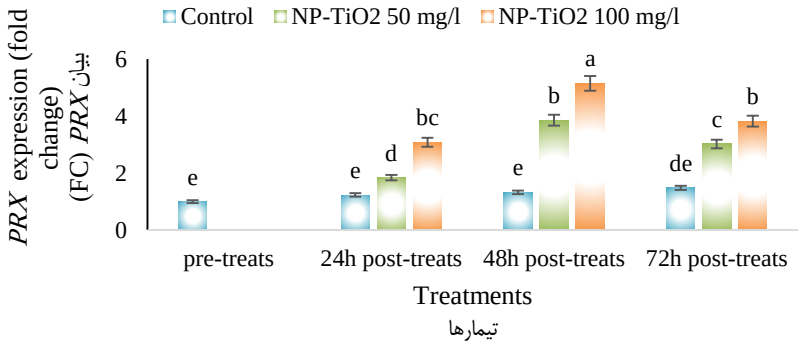
منبع تغییرات Source of variance	درجه آزادی Degree of freedom	میانگین مربعات mean square (MS)			
		بیان ژن *STR* *STR* gene expression	بیان ژن *DAT* *DAT* gene expression	بیان ژن *SGD* *SGD* gene expression	بیان ژن *PRX* *PRX* gene expression
زمان time	2	849.34**	746.32*	567.75*	465.76**
غلظت concentration	2	687.25*	575.43**	366.75**	546.32*
زمان × غلظت time × concentration	4	575.25**	365.65**	454.32**	354.75**
خطا error	18	42.16	31.46	26.54	19.54
CV %	–	13.14	8.7	7.36	10.4

علامت * و ** به‌ترتیب گویای معنی‌داری در سطح ۱ و ۵ درصد است.

* and ** indicate significant at 0.05 and 0.01 probability levels, respectively

بیان ژن *PRX*

ژن *PRX* رمزکننده یک پراکسیداز است که نقش مهمی در در دایمریزاسیون منوترپنوئیدایندول آلکالوئیدها و تولید وین‌بلاستین و وین‌کریستین دارد. ردیابی بیان ژن *PRX* تحت تیمار نانوذره TiO_2 نشان داد که سطح بیان ژن *PRX* تا ۴۸ ساعت بعد از تیمار، به شکل معنی‌داری افزایش یافت. اما بعد از گذشت ۷۲ ساعت از تیمار، بیان ژن *PRX* روند کاهشی را در پیش گرفت. با افزایش غلظت نانوذره، بیان ژن *PRX* به طور معنی‌داری افزایش یافت بطوریکه سطح رونوشت این ژن با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر در ۴۸ ساعت بعد از تیمار، حدود ۲۹۰ و ۱۹۲ درصد بیشتر از شاهد بود (شکل ۲). روندهای افزایش و کاهشی بیان ژن *PRX* القاءشده با الیستور با گذشت زمان توسط محققان دیگر نیز گزارش داده شده است؛ برای مثال، Almagro و همکاران (۲۰۱۴) مشاهده کردند که الیسیتور میکروبی باعث افزایش و کاهش بیان ژن *PRX* طی زمان در پریوش می‌شود (۳). به نظر می‌رسد که افزایش بیان *PRX* بعد از تیمار نانوذره مرتبط با تماس بیشتر اندامک‌های میتوکندری و کلروپلاست با اکسیژن است. به عبارتی دقیق‌تر، از آنجا که این ژن گاهی بعنوان جایگزین ژن *TRX* یا تیوردوکسین در پریوش عمل می‌نماید، لذا تماس اندامک‌های سلولی با اکسیژن آزاد منجر به افزایش سطح رونوشت *PRX* می‌شود که البته با گذشت زمان، بیان آن روند کاهشی را در پیش می‌گیرد.



شکل ۲- بیان ژن *PRX* در سلول‌های پریوش تحت تیمار نانوذره TiO_2. حروف مشترک گویای عدم اختلاف معنی‌دار مابین تیمارها بر اساس آزمون LSD است. اختصارات: pre-treats، قبل از اعمال تیمارها؛ 24h post-treats، ۲۴ ساعت بعد از اعمال تیمارها؛ 48h post-treats، ۴۸ ساعت بعد از اعمال تیمارها؛ 72h post-treats، ۷۲ ساعت بعد از اعمال تیمارها؛ Co کنترل؛ NP-TiO2 50 to100 mg/l، تیمار نانوذرات اکسید تیتانیوم ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر

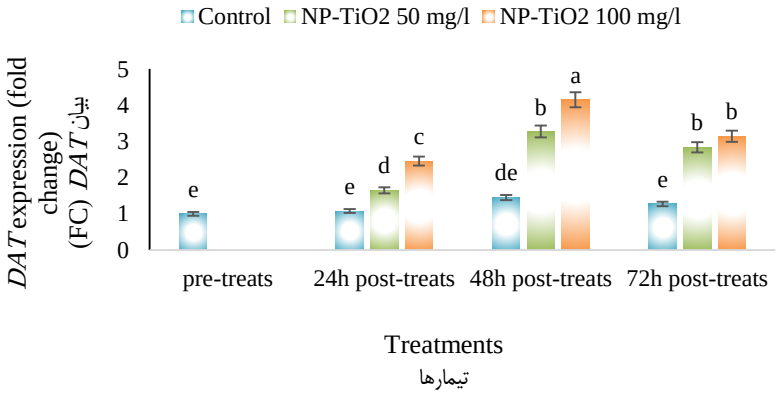
Figure 2. *PRX* gene expression in periwinkle cells treated with TiO_2 nanoparticles. The same letters indicate no significant difference at the 5% probability level in the LSD test. Abbreviations: pre-treats; before applying treatments; 24h post-treats, 24 hours after applying treatments; 48h post-treats, 48 hours after applying treatments; 72h post-treats, 72 hours after applying treatments; Co control; NP-TiO_2, 50 and 100 mg/l TiO_2 nanoparticle treatment

بیان ژن *DAT*

آنزیم DAT، وین‌دولین را تولید می‌کند که در ترکیب با کاتارانتین، آنهیدرو-وین‌بلاستین (پیش‌ساز وین‌کریستین) را تبدیل می‌نماید. ردیابی بیان ژن *DAT* تحت تیمار نانوذره TiO_2 نشان داد که سطح رونوشت این ژن طی گذشت زمان از یک روند افزایشی تبعیت می‌کند؛ بیشترین بیان این ژن با گذشت ۴۸ ساعت از تیمار مشاهده شد. با افزایش غلظت نانوذره، بیان ژن *DAT* به طور معنی‌داری افزایش یافت بطوری‌که سطح رونوشت این ژن با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر در ۴۸ ساعت بعد از تیمار، حدود ۱۸۶ و ۱۲۵ درصد بیشتر از شاهد بود (شکل ۳). روند افزایشی و کاهشی بیان ژن *DAT*با گذشت زمان در گیاه پریوش تحت تیمار الیسیتور توسط پژوهشگران دیگر نیز نشان داده شده است. برای مثال، یافته‌های Liu و همکاران (۲۰۱۰) نشان داد که بیان این ژن بر اثر تیمار با اتیلن در ۶ ساعت بعد از تیمار حدود پنج برابر تیمار کنترل شد درحالیکه پس از گذشت ۱۲ ساعت، سطح بیان

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-12-07]
[DOI: 10.61186/jcb.15.46.198]

آن به نصف تیمار کنترل کاهش یافت (۱۰). این مشاهدات با نتایج ما در رابطه با ژن *DAT* توافق داشت. با توجه به اینکه جاسمونات به‌عنوان یک پیک ثانویه سبب افزایش سطح رونوشت ژن‌های مرتبط به پاسخ دفاعی (مثل ژن‌های *SGD*، *TDC*، *DAT*، *CPR* و *DXS* درگیر در بیوسنتز ایندول آلکالوئیدها) می‌شود، لذا به نظر می‌رسد که تیمار نانوذره TiO_2 با تاثیرگذاری بر مسیر جاسمونات می‌تواند بیان ژن‌های درگیر در بیوسنتز آلکالوئیدهای پریوش را القاء نماید.



شکل ۳- بیان ژن *DAT* در سلول‌های پریوش تحت تیمار نانوذره TiO_2. حروف مشترک گویای عدم اختلاف معنی‌دار مابین تیمارها بر اساس آزمون LSD است. اختصارات: pre-treats، قبل از اعمال تیمارها؛ 24h post-treats، ۲۴ ساعت بعد از اعمال تیمارها؛ 48h post-treats، ۴۸ ساعت بعد از اعمال تیمارها؛ 72h post-treats، ۷۲ ساعت بعد از اعمال تیمارها؛ Co کنترل؛ NP-TiO2 50 to100 mg/l، تیمار نانوذرات اکسید تیتانیوم ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر

Figure 3. *DAT* gene expression in periwinkle cells treated with TiO_2 nanoparticles. The same letters indicate no significant difference at the 5% probability level in the LSD test. Abbreviations: pre-treats; before applying treatments; 24h post-treats, 24 hours after applying treatments; 48h post-treats, 48 hours after applying treatments; 72h post-treats, 72 hours after applying treatments; Co control; NP-TiO_2, 50 and 100 mg/l TiO_2 nanoparticle treatment

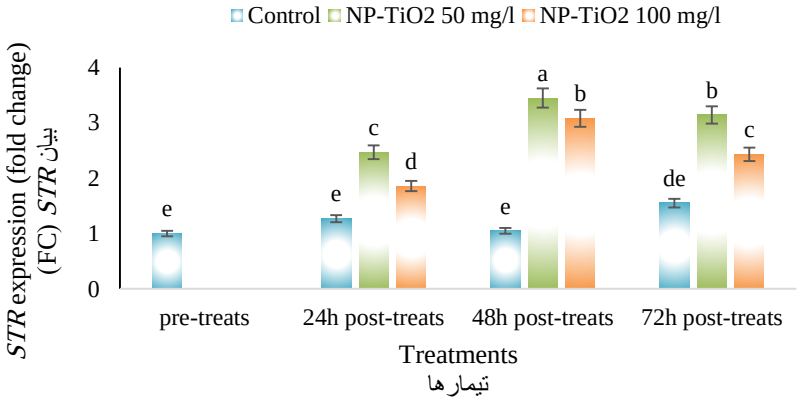
بیان ژن *STR*

آنزیم STR، از ترکیب تریپتامین از مسیر شیکیمات و سکولوگانین از مسیر سکوایریدوئید، استریکتوسیدین را سنتز می‌نماید که اولین ایندول‌آلکالوئید و پیش‌ساز کلیدی ترپنوئید ایندول‌آلکالوئیدهای دیگر پریوش می‌باشد. ردیابی بیان ژن *STR* تحت تیمار نانوذره TiO_2 نشان داد که سطح بیان ژن *STR* با گذشت زمان افزایش و سپس کاهش یافت به‌طوری‌که ۴۸ ساعت بعد از تیمار نانوذره TiO_2، سطح رونوشت این ژن افزایش معنی‌داری نسبت به کنترل داشت. اما بعد از ۷۲ ساعت از تیمار، بیان آن روند کاهشی را در پیش گرفت. با افزایش غلظت نانوذره، بیان ژن *STR* به‌طور معنی‌داری افزایش یافت بطوریکه سطح رونوشت این ژن با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر در ۴۸ ساعت بعد از تیمار، حدود ۱۹۳ و ۲۲۸ درصد بیشتر از شاهد بود (شکل ۴). روند افزایش و کاهشی بیان ژن *STR* با الیسیتورها و تنش‌زاهای دیگر نیز مستند شده است. برای مثال، Roseus و همکاران (۲۰۱۷) نشان دادند که بیان ژن‌های *TDC*، *STR* و *SGD* با تیمار پریوش با الیسیتور قارچی نخست افزایش و سپس کاهش یافت (۱۹). افزایش بیان ژن *STR* در مواجه با الیسیتور نانوذره TiO_2 می‌تواند ناشی از این مسئله باشد که نانوذره TiO_2 سبب القاء واکنش فوق حساسیت (۱۶) و تحریک مسیر جاسمونیک اسید (Wei, 2010) می‌شود که آنها نیز به نوبه خود سبب القاء بیان ژن *STR* می‌شوند. علاوه بر این، Sibéril و همکاران (۲۰۱۴) نیز نشان دادند که ژن *STR* تحت اثر سیگنال‌هایی مانند جاسمونات و اکسین در سوسپانسیون سلولی گیاه دارویی پریوش قرار دارد (۲۰).

بیان ژن SGD

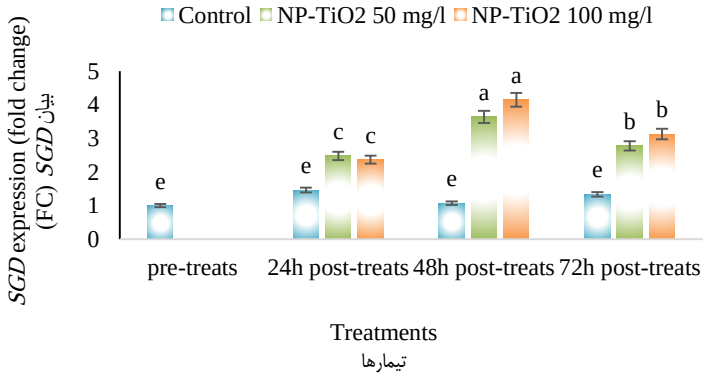
ژن *SGD*، آنزیم استریکتوسیدین بتا-گلیکوزیداز را کد می‌نماید که تبدیل استریکتوسیدین به ایندول آلکالوئیدها را در شاخه‌های جانبی کاتالیز می‌کند. ردیابی بیان ژن *SGD* تحت تیمار نانوذره TiO_2 در گیاه پریوش آشکار ساخت که سطح رونوشت ژن *SGD* با گذشت زمان در حال افزایش است. به نحوی که ۴۸ ساعت پس از تیمار، بیان این ژن به بیشینه مقدار خود رسید. بعد از این زمان، بیان ژن *SGD* روند کاهشی را در پیش گرفت. با افزایش غلظت نانوذره، بیان ژن *STR* به طور معنی‌داری افزایش یافت بطوریکه سطح رونوشت این ژن با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر در ۴۸ ساعت بعد از تیمار، حدود ۲۸۷ و ۲۴۰ درصد بیشتر از شاهد بود (شکل ۵). روند افزایشی و کاهشی سطح رونوشت ژن *SGD* توسط Akhtar و همکاران (۲۰۱۷) نیز گزارش شده است بطوریکه آنها نشان دادند که در روز سوم پس از تیمار گیاه پریوش با الیسیتور قارچی، بیان *SGD* به حدود ۴ برابر شاهد رسید درحالیکه در بازه‌های زمانی بعدی کاهش یافت (۱). با عنایت به چنین مشاهداتی، بنظر می‌رسد که افزایش سطح رونوشت ژن *SGD* بعد از تیمار الیسیتور مربوط به پاسخ دفاعی و مسیرهای پیام‌رسانی هورمونی باشد (۲۷).

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-12-07]
[DOI: 10.61186/jcb.15.46.198]



شکل ۴- بیان ژن *STR* در سلول‌های پریوش تحت تیمار نانوذره TiO_2. حروف مشترک گویای عدم اختلاف معنی‌دار مابین تیمارها بر اساس آزمون LSD است. اختصارات: pre-treats، قبل از اعمال تیمارها؛ 24h post-treats، ۲۴ ساعت بعد از اعمال تیمارها؛ 48h post-treats، ۴۸ ساعت بعد از اعمال تیمارها؛ 72h post-treats، ۷۲ ساعت بعد از اعمال تیمارها؛ Co کنترل؛ NP-TiO2 50 to100 mg/l، تیمار نانوذرات اکسید تیتانیوم ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر

Figure 4. *STR* gene expression in periwinkle cells treated with TiO_2 nanoparticles. The same letters indicate no significant difference at the 5% probability level in the LSD test. Abbreviations: pre-treats; before applying treatments; 24h post-treats, 24 hours after applying treatments; 48h post-treats, 48 hours after applying treatments; 72h post-treats, 72 hours after applying treatments; Co control; NP-TiO_2, 50 and 100 mg/l TiO_2 nanoparticle treatment



شکل ۵- بیان ژن *SGD* در سلول‌های پریوش تحت تیمار نانوذره TiO_2. حروف مشترک گویای عدم اختلاف معنی‌دار مابین تیمارها بر اساس آزمون LSD است. اختصارات: pre-treats، قبل از اعمال تیمارها؛ 24h post-treats، ۲۴ ساعت بعد از اعمال تیمارها؛ 48h post-treats، ۴۸ ساعت بعد از اعمال تیمارها؛ 72h post-treats، ۷۲ ساعت بعد از اعمال تیمارها؛ Co کنترل؛ NP-TiO2 50 to100 mg/l، تیمار نانوذرات اکسید تیتانیوم ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر

Figure 5. *SGD* gene expression in periwinkle cells treated with TiO_2 nanoparticles. The same letters indicate no significant difference at the 5% probability level in the LSD test. Abbreviations: pre-treats; before applying treatments; 24h post-treats, 24 hours after applying treatments; 48h post-treats, 48 hours after applying treatments; 72h post-treats, 72 hours after applying treatments; Co control; NP-TiO_2, 50 and 100 mg/l TiO_2 nanoparticle treatment

مشاهدات ما از تغییر بیان ژن‌های *STR*، *SGD*، *DAT* و *PRX* در مواجه با نانوذره TiO_2 در گیاه دارویی پریوش نشان داد که بیان این ژن‌های کلیدی توسط تیمار نانوذره TiO_2 القاء شد به نحوی که سطح رونوشت آنها ۴۸ ساعت بعد از تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذره TiO_2 (به‌عنوان موثرترین تیمار با بیشترین درصد زنده‌مانی سلولی) به‌ترتیب حدود ۲۹۰، ۱۸۶، ۱۹۳ و ۲۸۷ درصد نسبت به شاهد افزایش یافت. با گذشت زمان، الگوی بیان متفاوتی برای این ژن‌ها مشاهده شد که عامل آن را می‌توان به پاسخ مختلف ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز آلکالوئیدهای پریوش به تیمار نانوذره TiO_2 نسبت داد. به نظر می‌رسد که تیمار نانوذره TiO_2 با القاء سیستم دفاعی پریوش منجر به افزایش بیان ژن‌های دخیل در بیوسنتز ایندول‌آلکالوئید (بعنوان ترکیبات محافظ برای گیاه) می‌شود. با نگاهی دقیق‌تر به تحقیقات گذشته می‌توان به مکانسیم اثرگذاری نانوذره TiO_2 بر بیان ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز آلکالوئیدهای پریوش پی‌برد. در این راستا، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مثل اتیلن و ترکیبات محرک مثل جاسمونات به‌عنوان نقاط تاثیرگذاری الیسیتورها در گیاه پریوش شناخته شده اند (۱۷، ۲۱، ۲۵، ۲۹). درنتیجه، به نظر می‌رسد که تیمار نانوذره TiO_2 از طریق بکارگیری جاسمونات و اتیلن سبب افزایش بیان ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز ایندول‌آلکالوئید می‌شود. همراستا با نتایج ما در خصوص تاثیرگذاری الیسیتور نانوذره

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-12-07]
[DOI: 10.61186/jcb.15.46.198]

TiO_2 بر ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه پریوش، یافته‌های مشابه با گیاهان و متابولیت‌های ثانویه مختلف نشان داده است که نانوذرات TiO_2 از پتانسیل بالایی در تولید متابولیت‌های ثانویه باارزش در گیاهان دارویی برخوردار هستند. برای مثال، Karimzadeh و همکاران (۲۰۱۹) اثر نانوذرات تیتانیوم (صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) بر بیان ژن‌های سینامیل الکل دهیدروژناز (CAD) و فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) در محیط کشت سلولی کتان (*Linum usitatisimum*) را بررسی کردند (۷). نتایج آنها نشان داد که نانو ذره تیتانیوم باعث افزایش بیان *CAD* در غلظت ۱۵۰ میلی-گرم بر لیتر شد. Kazemi و همکاران (۲۰۲۲) اثر زمان کاربرد نانوذرات تیتانیوم (۰، ۲۰، ۴۰ میلی‌گرم در لیتر) بر صفات بیوشیمیایی مرزه (*Satureja hortensis*) را ارزیابی نمودند (۹). بر اساس نتایج، ۴۸ ساعت پس از تیمار، تیمار نانوذره تیتانیوم باعث افزایش فلاونوئید شد. Fabriki-Ourang و همکاران (۲۰۱۹) تاثیر نانومحرک TiO_2 بر الگوی بیان ژن‌های مسیر بیوسنتز سنگوئینارین یعنی بربرین بریدج (BBE)، شیلانتیفولین سنتتاز (CFS)، استیلوپین سنتتاز (STS)، تتراهیدروپروتوبربرین متیل ترانسفراز (TNMT)، پروتوپین هیدروکسیلاز (P6H) و دی هیدروبنزوفنانتریدین اکسیداز (DBOX) را در مامیران کبیر (*Chelidonium majus* L) مطالعه کردند (۵). غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر TiO_2 به‌ترتیب منجر به افزایش ۶۳، ۶۶، ۵۰۰ و ۹۱ درصدی در بیان ژن *STS*، *P6H*، *BBE* و *MSH* نسبت به شاهد شد. زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت نسبت به ۷۲ ساعت پس از محلول‌پاشی سبب بیشینه بیان در هر چهار ژن شدند. Mazarie و همکاران (۲۰۱۹) نیز تأثیر محلولپاشی نانوذرات TiO_2 (۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) بر صفات فیزیولوژیکی مریم گلی (*Salvia officinalis*) را کاوش نمودند. با افزایش غلظت نانو TiO_2 (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر)، محتوی اسانس روند افزایشی نسبت به شاهد به خود گرفت (۱۲). تمام این گزارشات بر دستاورد ما تحت عنوان " شناخت پتانسیل مثبت نانوذرات TiO_2 در افزایش متابولیت‌های ثانویه پریوش" تاکید دارند (۳۰).

نتیجه‌گیری کلی

اهمیت ترکیبات وین‌کریستین، وین‌بلاستین، آجمالیسین و سرپنتین در گیاه پریوش و رابطه مستقیم بیان ژن‌های *STR*، *SGD*، *DAT* و *PRX* با سطح این آلکالوئیدها، ما را بر آن داشت تا تاثیر الیسیتور TiO_2 را بر بیان ژن‌های فوق مطالعه نماییم. غلظت بالاتر TiO_2 نانوذره باعث افزایش بیشتر بیان ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتز ایندول آلکالوئیدهای پریوش شد. این افزایش تا ۴۸ ساعت بعد از تیمار ادامه یافت اما بعد از آن کاهش یافت. بیشترین بیان ژن‌های *STR*، *SGD*، *DAT* و *PRX* در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر TiO_2 و در ۴۸ ساعت بعد از تیمار بدست آمد. بنابراین، غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر TiO_2 و برداشت متابولیت‌ها در ۴۸ ساعت بعد از تیمار را می‌توان به‌عنوان شرایط بهینه تولید ایندول آلکالوئیدها توصیه کرد.

منابع

1. Akhtar, S., J. Ahmad and A. Ahmad. 2017. Molecular network of monoterpene indole alkaloids (MIAs) signaling in plants with reference *to Catharanthus roseus* (L.) G. Don. In Stress Signaling in Plants: Genomics and Proteomics Perspective, 2: 37-67.
2. Aghaei, R. and M. Majidi. 2021. Effect of foliar spraying of titanium dioxide nanoparticles on biochemical responses, growth, yield and essential oil content of *carum copticum* under salinity stress, https://civilica.com/doc/1361261 (In Persian).
3. Almagro, L., J. Gutierrez, M.A. Pedreño and M. Sottomayor. 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(3): 543-551.
4. Dutta, A., J. Batra, S. Pandey-Rai and H.D. Singh. 2015. Expression of terpenoid indole alkaloid biosynthetic pathway genes corresponds to accumulation of related alkaloids in *Catharanthus roseus* (L.), Planta, 220(3): 376-383.
5. Fabriki-Ourang, S., S. Darghahi and A. Pour-Aboughadareh. 2019. The effects of titanium dioxide nano-elicitor on the expression profile of sanguinarin biosynthesis pathway genes in greater celandine (*Chelidonium majus* L.), Modern Genetics Journal (MGJ), 13(4): 513-523.
6. Hong, F., J. Zhou, C. Liu, F. Yang, C. Wu, L. Zheng and P. Yang. 2005. Effects of Nano TiO_2 on photochemical reaction of chloroplasts of Spinach, Journal Biological Trace Element Research, 105: 269-279.
7. Karimzadeh, F., R. Haddad and G. Garoosi. 2019. The effects of nano-ZnO and nano-TiO2 on expression of Phenylalanine ammonia lyase (PAL) and Cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) genes in cell culture of *Linum usitatissimum* L. Modern Genetics Journal (MGJ), 14(2): 171-177.
8. Kumar, S., B. Singh and R. Singh. 2022. *Catharanthus roseus* (L.) G. Don: A review of its ethnobotany, phytochemistry, ethnopharmacology and toxicities, Journal of Ethnopharmacology, 284:114647.
9. Kazemi, B., M. Ranjbar, Z. Rezayatmand and A.M. Ahadi. 2022. Examination of the Effect of Application Time of Titanium and Methyl Jasmonate Nanoparticles on Physiological, Growth, and Biochemical Characteristics of Savory Daenesis (*Satureja hortensis* L), Journal of Plant Process and Function, 11(48): 315-337

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-12-07]
[DOI: 10.61186/jcb.15.46.198]

10. Liu, Y., D. Zhao, YT. Zu and Y. Jiang. 2010. Effects of low light on terpenoid indole alkaloid accumulation and related biosynthetic pathway gene expression in leaves of *Catharanthus roseus* seedlings, Botanical Studies, 52: 191-196.
11. Liu, Y., B. Patra, SK. Singh, P. Paul, Y. Zhou, Y. Li, Y. Wang, S. Pattanaik and L. Yuan. 2021. Terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*: effects and prospects of environmental factors in metabolic engineering, Biotechnology Letters, 43(11): 2085-2103.
12. Mazarie, A., S. Mousavi-nik, A. Ghanbari and L. Fahmideh. 2019. Effect of different spraying concentrations of jasmonic acid and titanium dioxide nanoparticles on some physiological traits and antioxidant system activity of Sage (*Salvia officinalis* L), Iranian Journal of Plant Biology, 11(1): 1-22.
13. Mistry, V., S. Darji, P. Tiwari and A. Sharma. 2022. Engineering *Catharanthus roseus* monoterpenoid indole alkaloid pathway in yeast, Applied Microbiology and Biotechnology, 106(7): 2337-2347.
14. Mingyu, S., F. Hong, C. Liu, X. Wu, X. Liu and L. Chen. 2007. Effects of nano-anatase TiO_2 on absorption, distribution of light and photo reduction activities of chloroplast membrane of spinach, Biological Trace Element Research, 118: 120-130.
15. Nair, R., S.H. Varghese, B.G. Nair, T. Maekawa, Y. Yoshida and D.S. Kumar. 2010. Nanoparticulate material delivery to plants, Plant Science, 179: 154-163.
16. Pan, Q., N. R. Mustafa, K. Tang, Y. H. Choi and R. Verpoorte. 2016. Monoterpenoid indole alkaloids biosynthesis and its regulation in *Catharanthus roseus*: a literature review from genes to metabolites, Phytochemistry Reviews, 15(2): 221-250.
17. Papon, N., J. Bremer, A. Vansiri, F. Andreu, M. Rideau and J. Crèche. 2015. Cytokinin and ethylene control indole alkaloid production at the level of the MEP/terpenoid pathway in *Catharanthus roseus* suspension cells, Planta Medica, 71: 572-574.
18. Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in Real-Time RT–PCR, Nucleic acids research, 29(9): e45-e45.
19. Roseus, S.M., M, Farsi and K.A. Mirshamsi. 2017. Evaluation of ethylene effect on expression level of *T16H*, *G10H*, *DAT* and *AVLBS* genes in *Catharanthus*, Scientific Information Database, 9(2): 151-160.
20. Sibéril, Y., S. Benhamron, J. Memelink, N. Giglioli-Guivarc'h, M. Thiersault, B. Boisson and P. Gantet. 2014. *Catharanthus roseus* G-box binding factors 1 and 2 act as repressors of strictosidine synthase gene expression in cell cultures, Plant Molecular Biology, 45(4): 477-488.
21. Srivastava, S., R. Pandey, S. Kumar and C.S. Nautiyal. 2014. Correspondence between flowers and leaves in terpenoid indole alkaloid metabolism of the phytoplasma-infected *Catharanthus roseus* plants, Protoplasma, 251(6): 1307-1320.
22. Sheikhalipour, M., G. Gohari and B. Esmaielpour. 2022. Melatonin and TiO2 NPs application-induced changes in growth, photosynthesis, antioxidant enzymes activities and secondary metabolites in Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) under drought stress conditions, Journal Plant Growth Regulation, https://doi.org/10.1007/s00344-022-10679-1.
23-Perveen, S., N. Safdar, A. Yasmin and Y. Bibi. 2022. DAT and PRX1 gene expression modulates vincristine production in *Catharanthus roseus* L. propagates using Cu, Fe and Zn nano structures, Plant Science, 320: 111264.
24. Twaij, B.M. and M.N. Hasan. 2022. Bioactive Secondary Metabolites from Plant Sources: Types, Synthesis, and Their Therapeutic Uses, International Journal of Plant Biology, 13: 4-14.
25. Wei, S. 2010. Methyl jasmonic acid induced expression pattern of terpenoid indole alkaloid pathway genes in *Catharanthus roseus* seedlings, Plant Growth Regulation, 61(3): 243-251.
26. Yang, F., F. Hong, W. You, C. Liu, F. Gao, C. Wu, P. Yang. 2006. Influence of nanoanatase TiO_2 on the nitrogen metabolism of growing spinach, Biological Trace Element Research 110(2): 179-190.
27. Zhang, L., G.A.I. Qing-Hui, Z.U. Yuan-Gang, Y.A.N.G. Lei, M.A. Yu-Liang and L.I.U Yang. 2014. Simultaneous quantitative determination of five alkaloids in *Catharanthus roseus* by HPLC-ESI-MS/MS, Chinese journal of natural medicines, 12: 786-793
28. Zhao, J., WH. Zhu, Q. Hu and XW HE. 2001. Enhanced indole alkaloid production in suspension compact callus clusters of *Catharanthus roseus*: impacts of plant growth regulators and sucrose, Plant Growth Regulation. 33(1): 33-41.
29. Mezginezhad, Z., M. Ghaderi, Z. Alizde and A. Izanloo. 2019. Effect of iron oxide and zinc oxide nanoparticles of on callus viability of seedless barberry, Journal of Crop Breeding, 11(30): 198-205 (In Persian).
30. Talebi, F., V. Akbarpour and V. Chalavi. 2022. Effect of methanol and titanium dioxide nanoparticles on phytochemical properties of artichoke (*Cynara scolymus* L.), Journal of Crop Breeding, 14(43): 84-94 (In Persian).

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-12-07]

[DOI: 10.61186/jcb.15.46.198]