

The Effect of Tryptophan Elicitor and Drought Stress on Some Morphological Characteristics of the Medicinal Plant Periwinkle (*Catharanthus roseus* L.) and Expression Pattern of *Str* and *Tdc* Genes

Farshid Yousefi¹, Alireza Abdali Mashhadhi², Amin Lotfi³, Alireza Shafeinia^{4,*},
Saeed Jalili⁵ and Narges Soltani⁶

- 1- Ph.D. Student, Production Engineering and Plant Genetics Department, Faculty of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran
- 2- Professor, Production Engineering and Plant Genetics Department, Faculty of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran
- 3- Associate Professor, Production Engineering and Plant Genetics Department, Faculty of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran
- 4- Assistant Professor, Production Engineering and Plant Genetics Department, Faculty of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran
- 5- Assistant Professor, Department of Water Engineering, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran
- 6- Ph.D graduate, Production Engineering and Plant Genetics Department, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran

*Corresponding author ✉: shafeinia@asnrukh.ac.ir

Citation: Yousefi, F., Abdali Mashhadhi, A.R., Lotfi, A., Shafeinia, A.R., Jalili, S. and Soltani, N. (2025). The effect of elicitor tryptophan and drought stress on some morphological characteristics of the medicinal plant periwinkle (*Catharanthus roseus* L.) and the expression pattern of *Str* and *Tdc* genes. *Plant Genetic Researches*, **11(2)**: 15-28. <http://dx.doi.org/10.22034/PGR.11.2.2>

(Received: August 06, 2024; Final Revised: November 03, 2024; Accepted: November 08, 2024; Published online: March 17, 2025)

Extended abstract

Introduction

The plant periwinkle (Madagascan periwinkle) plant (*Catharanthus roseus* L.), an ornamental and medicinal herb, is indigenous to Madagascar and tropical regions. It is valued for its high phenolic compounds content as well as significant commercial medicinal alkaloids, including ajmalicine, vincristine, and vinblastine. *C. roseus* (Vinca) exhibits prominent therapeutic properties, including anti-cancer effect, antihypertensive activity, wound-healing effects, and blood-purifying potentials. It is also used to treat human skin disorders such as eczema, as well as urinary tract infections and bronchial inflammation. The cultivation of *C. roseus* is subject to various environmental stresses, particularly drought, which profoundly impacts its biochemical profiles and the production of secondary metabolites. The application of certain elicitors, notably the tryptophan amino acid, has been shown to alleviate the detrimental effects of drought stress and enhance the overall quality of agricultural products, thereby improving plant performance. Moreover, tryptophan is recognized as a precursor in the alkaloid biosynthesis pathway. Consequently, it is plausible that the combination of drought stress with foliar application of tryptophan may elevate the levels of plant metabolites, particularly vinblastine and vincristine alkaloids.



©2025 The author(s). This is an open access article distributed under [Creative Commons Attribution 4.0 International License \(CC BY 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source.

Materials and methods

This study was conducted using potted *C. roseus* plants grown in 1:1:1 ratio of farm soil, decomposed animal manure, and sand. The experiment was conducted in a 6×3 factorial experiment arranged in a completely randomized design with three replications. The treatments consisted of six tryptophan treatments (0 (control), 50, 100, 150, 200, and 250 mg/L) and three drought stress level (100%, 70%, and 40% of field capacity). The experiment was carried out in 2023 at Khuzestan University of Agricultural Sciences and Natural Resources under greenhouse conditions. Foliar sprays of tryptophan solutions were applied at two phenological stages: eight-leaf vegetative phase and floral initiation. Morphological traits such as root volume, dry weight, and length were measured. Plus, the effects of different treatment on *Str* and *Tdc* gene expression patterns were evaluated. Morphological data were analyzed using SAS software (version 9.4), while relative gene expression was quantified with REST software. The means were compared using Duncan's multiple range test at $P < 0.05$ significance level.

Results and discussion

The interaction effect of drought stress and foliar application of the tryptophan amino acid on root volume and dry weight traits was significant ($P < 0.05$); however, no significant difference was observed for root length. Results of present study demonstrated contrasting responses to drought and tryptophan treatments. Under increasing drought stress, root length significantly ($P < 0.05$) increased, while root volume and dry weight decreased significantly ($P < 0.05$) compared to controls. Tryptophan application dose-dependently enhanced all root morphological parameters, with optimal concentration, producing maximal improvements ($P < 0.05$). Relative gene expression analysis showed that the combined treatment of 250 mg/L tryptophan under severe drought stress (40% FC) significantly up-regulated *Tdc* and *Str* genes expression of *C. roseus* leaf tissues after 24 hours, followed by a decreasing trend thereafter. The lowest relative expression levels of *Tdc* and *Str* genes were recorded at 72 and 168 hours, with values of -3.69 and -1.18, respectively. Given the increased expression of *Tdc* and *Str* genes due to foliar application compared to the control treatment, it is anticipated that the end products of the TIAs pathway, including the alkaloids ajmalicine, vinblastine, and vincristine, may also increase. The coordinated increase in root morphological traits, i.e. root volume, root weight and root length as well as the upregulation of TIA pathway genes, i.e. *Tdc*, *Str* strongly suggests that foliar tryptophan application represents a viable physiological strategy to enhance vincristine and vinblastine production in *C. roseus*. This dual effect can likely be explained by increased precursor availability for alkaloid biosynthesis, and drought-stress-mediated activation of secondary metabolic pathways.

Conclusions

The findings of present study suggest that foliar application of the tryptophan amino acid, particularly at concentrations of 200 and 250 mg/L, resulted in increased root length and dry weight. Tryptophan amino acid treatment not only induced tolerance in drought-stressed plants but also improved the root system, leading to enhanced dry weight. Foliar application of tryptophan significantly upregulated main genes associated with terpenoid indole alkaloid (TIA) biosynthetic pathway, with treated plants exhibiting a higher expression level of *Tdc* and *Str* compared to controls ($P < 0.05$). This enhanced gene expression correlated with increased alkaloid production potential.

Keywords: Alkaloids, Madagascar periwinkle, Root, Vinblastine and vincristine



اثر الیستور تریپتوفان و تنش خشکی بر برخی خصوصیات مورفولوژیک گیاه دارویی پروانش

Catharanthus roseus L.) و تغییر الگوی بیان ژن‌های *Tdc* و *Str*فرشید یوسفی^۱، علیرضا ابدالی مشهدی^۲، امین لطفی جلال آبادی^۳، علیرضا شافعی‌نیا^{۴*}،سعید جلیلی^۵ و نرگس سلطانی^۶

۱- دانشجوی دکتری، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملائانی

۲- استاد، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملائانی

۳- دانشیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملائانی

۴- استادیار، استاد، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملائانی

۵- استادیار، گروه آبیاری، دانشکده مهندسی زراعی و توسعه روستایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملائانی

۶- دانش‌آموخته دکتری تخصصی، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۵/۱۶؛ تاریخ آخرین ویرایش: ۱۴۰۳/۰۸/۱۳؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۸/۱۸؛ تاریخ انتشار برخط: ۱۴۰۳/۱۲/۲۷)

چکیده

برگ‌های گیاه پروانش، منبع اصلی تولید آکالوئیدهای وین‌بلاستین و وین‌کریستین هستند که در درمان سرطان کاربرد دارند. به دلیل سنتز بسیار پایین این آکالوئیدها، یافتن راهکارهایی برای افزایش میزان آن‌ها در برگ این گیاه همواره مورد توجه پژوهشگران قرار داشته است. اسیدآمین تریپتوفان یکی از پیش‌سازهای کلیدی در مسیر تولید آکالوئیدهای پروانش است. همچنین، این احتمال وجود دارد که اعمال تنش خشکی به افزایش میزان متابولیت‌های گیاه، به ویژه دو آکالوئید وین‌بلاستین و وین‌کریستین، منجر شود. در این پژوهش، تأثیر تیمار اسیدآمین تریپتوفان و تنش خشکی بر تغییر الگوی بیان دو ژن *Tdc* و *Str* و همچنین بررسی تغییرات حجم، وزن خشک و طول ریشه گیاه پروانش، به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار مورد بررسی قرار گرفتند. فاکتورهای آزمایش شامل: تنش خشکی (۱۰۰، ۷۰ و ۴۰ درصد ظرفیت زراعی) و محلول‌پاشی تریپتوفان (۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) بودند. نتایج تجزیه و تحلیل داده‌های این مطالعه نشان داد که اثر متقابل تنش خشکی و محلول‌پاشی اسیدآمین تریپتوفان بر صفات حجم و وزن خشک ریشه معنی‌دار بود، هرچند برای صفت طول ریشه چنین تأثیری مشاهده نشد. بدین ترتیب، با افزایش سطح تنش خشکی، طول ریشه افزایش یافت، در حالی که حجم و وزن خشک ریشه نسبت به شاهد کاهش نشان داد. از سوی دیگر، با افزایش سطوح تریپتوفان، حجم، وزن و طول ریشه افزایش یافتند. اعمال تیمار توأم ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر تریپتوفان و تنش خشکی شدید (۴۰ درصد) موجب افزایش بیان نسبی ژن‌های *Tdc* و *Str* در بافت برگ گیاه پروانش در تیمار زمانی ۲۴ ساعت گردید و سپس روند کاهشی نشان داد. با توجه به افزایش بیان دو ژن *Tdc* و *Str*، انتظار می‌رود که فراورده‌های پایانی مسیر آکالوئیدی ایندول تریپتوفان، از جمله آکالوئیدهای آجمالاسین، وین‌بلاستین و وین‌کریستین، افزایش یابند. با در نظر گرفتن تأثیر مثبت کاربرد تریپتوفان بر حجم، وزن و طول ریشه و همچنین افزایش بیان برخی ژن‌های مؤثر در تولید وین‌کریستین و وین‌بلاستین، به نظر می‌رسد که اعمال تیمار تریپتوفان به‌عنوان الیستور، می‌تواند راهکار مؤثری در افزایش میزان آکالوئیدها در این گیاه باشد.

واژگان کلیدی: آکالوئید، پروانش، ریشه، وین‌بلاستین، وین‌کریستین

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: shafeinia@asnrukh.ac.ir

مقدمه

گیاهان بخش مهمی از رژیم غذایی و ترکیبات دارویی مورد نیاز انسان را به خود اختصاص داده‌اند. بر اساس آمار سازمان جهانی بهداشت، بیش از ۸۰ درصد از جمعیت جهان برای درمان بیماری‌های خود به طب سنتی و گیاهان دارویی متکی هستند و با کشت این گیاهان، می‌توان امکان تولید بیش‌تر مواد گیاهی، استخراج ترکیبات ثانویه با ارزش و تولید داروها را فراهم کرد (Wang et al., 2016). گیاه پروانش با نام علمی *Catharanthus roseus* L. متعلق به خانواده Apocynaceae و راسته Gentianales است که منشأ آن مناطق حاره و گرمسیری مانند جنوب هند، اندونزی و ماداگاسکار می‌باشد (Tolambiya and Mathur, 2016). آلکالوئیدها و مواد فنولیک از جمله اصلی‌ترین ترکیبات گیاه پروانش هستند. دو آلکالوئید وین‌بلاستین (Vinblastine) و وین‌کریستین (Vincristine) گیاه پروانش را به یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی در زمینه درمان سرطان تبدیل کرده است. وین‌بلاستین و وین‌کریستین با تأثیر بر تقسیم سلولی و ممانعت از انجام آن، منجر به مرگ سلول‌های سرطانی می‌شوند. این آلکالوئیدها در مسیر آلکالوئیدی ایندول تریپنویید (Terpenoid Indole Alkaloid: TIAs) تولید می‌شوند که در واقع تلفیقی از سه مسیر جداگانه ایندول، تریپنویید و آلکالوئید است. پایین بودن میزان سنتز آلکالوئیدهای وین‌بلاستین و وین‌کریستین و القاپذیر بودن مسیر سنتز این دو، سبب شده است تا پژوهشگران به جستجوی محرک‌هایی بپردازند که در نهایت منجر به افزایش مواد مؤثره‌ی دارویی پروانش می‌شوند. در مسیر آبخاری TIAs هر گونه تغییر در میزان رونویسی ژن‌های موجود در مسیر ایندولی و تریپنوییدی می‌تواند بر فعالیت ژن‌های پایین‌دستی این دو مسیر یعنی مسیر سنتز آلکالوئیدها، نیز مؤثر باشد؛ به این ورت که افزایش در میزان رونویسی ژن‌های *Tdc* (Tryptophan Decarboxylase) و *Str* (Strictosidine synthase) درگیر در دو مسیر ایندولی و تریپنوییدی، سبب افزایش در میزان رونویسی ژن‌های پایین‌دستی و افزایش در مقدار آلکالوئیدها می‌شود (Almagro et al., 2014; Pandey et al., 2016; Sun et al., 2016). سکولوگانین

(Secologanin) که فراورده پایانی مسیر تریپنوییدی است و تریپتامین (Tryptamine) که فراورده نهایی مسیر ایندول است با فعالیت آنزیم استریکوزیدین سنتتاز محصول ژن *Str* به مسیر تولید آلکالوئیدها وارد می‌شوند. ارزیابی تغییرات الگوی بیان ژن‌های مسیر TIAs و به‌طور ویژه ژن *Str* در اثر محلول‌پاشی برخی الیستورها افزایش بیان نسبی ژن‌های مذکور (Pan et al., 2012; Sun et al., 2016) و نیز افزایش میزان دو آلکالوئید وین‌بلاستین و وین‌کریستین را به دنبال داشته است (Soltani et al., 2022). در مسیر TIAs با فعالیت آنزیم تریپتوفان دکربوکسیلاز محصول ژن *Tdc*، تبدیل تریپتوفان به تریپتامین (فراورده نهایی مسیر ایندول) صورت می‌گیرد، بررسی بیان این ژن در گیاهچه‌های پروانش تحت تأثیر متیل‌جاسمونات (MeJA) افزایش یافت و این افزایش در طول زمان روند صعودی نشان داد، به‌گونه‌ای که حداکثر میزان رونویسی ژن *Tdc* در تیمارهایی با غلظت‌های ۰/۲ و ۲ میلی‌مولار در ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار صورت گرفت (Wei, 2010). همچنین ارزیابی میزان رونویسی این ژن در کشت سلولی پروانش، تحت تیمارهای متیل‌جاسمونات، سیکلودکسترین (Cyclodextrin) و هم‌افزایی متیل‌جاسمونات و سیکلودکسترین نشان داد و مشخص شد که هم‌افزایی متیل‌جاسمونات و سیکلودکسترین نسبت به استفاده جداگانه از این دو محرک بر بیان ژن *Tdc* تأثیر بیشتری داشت و موجب افزایش رونویسی آن گردید (Almagro et al., 2014). تریپتوفان به‌عنوان محرک زیستی و پیش‌ساز تولید تریپتامین در مسیر TIAs عمل می‌کند و به‌نظر می‌رسد کاربرد آن منجر به تغییر در الگوی بیان ژن‌های مسیر تولید آلکالوئیدها گردد (Whitmer et al., 2002). کاربرد تیمار ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر تریپتوفان بر کالوس‌های پروانش و بررسی تغییرات الگوی بیان دو ژن *Str* و *Prx* طی یک هفته، افزایش بیان *Prx* را در ۷۲ ساعت پس از اعمال تیمار را نشان داد و بیان ژن *Str* در اثر اعمال تیمار افزایش یافت، هرچند روند تغییرات بیان این ژن تا ۷۲ ساعت کاهش و سپس افزایشی بود (Karami et al., 2019).

در اکوسیستم‌های طبیعی و زراعی عواملی مانند عناصر غذایی، نور، رطوبت، آب و ارتفاع از سطح دریا از جمله عوامل اساسی و تعیین‌کننده در کمیت و کیفیت عملکرد

ضد عفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم یک درصد (به مدت ۱ دقیقه) در سینی‌های کشت، کاشته شدند. گیاهچه‌ها پس از رسیدن به مرحله‌ی چهار برگگی به گلدان‌هایی (ارتفاع ۳۰ و قطر ۱۵ سانتی‌متر) حاوی ترکیب خاک سبک، کود پوسیده و ماسه (به نسبت ۱:۱:۱) منتقل شدند. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و با سه تکرار انجام شد. فاکتورهای آزمایش شامل محلول‌پاشی اسید آمینه تریپتوفان (شاهد، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) (Gendy and Nosir, 2016) و تنش خشکی (۱۰۰، ۷۰ و ۴۰ درصد ظرفیت زراعی) (Munsif *et al.*, 2022) بودند. محلول‌پاشی تریپتوفان دو بار (در مرحله هشت برگگی و در ابتدای مرحله گل‌دهی که با توجه به گزارش‌های موجود بیش‌ترین میزان متابولیت‌های ثانویه در پروانش در این مرحله است) (Pan *et al.*, 2010) انجام شد. دو روز بعد از اولین محلول‌پاشی، تیمار تنش خشکی اعمال شد و به مدت یک ماه تا قبل از گل‌دهی ادامه داشت. پس از محلول‌پاشی مرحله‌ی دوم اسید آمینه تریپتوفان، نمونه‌برداری از برگ‌های سوم و چهارم در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۱۶۸ ساعت در سه تکرار زیستی (سه گیاه برای هر تیمار زمانی) و دو تکرار فنی برای ارزیابی میزان بیان نسبی ژن‌های هدف انجام شد.

اندازه‌گیری حجم، وزن خشک و طول ریشه: برای اندازه‌گیری وزن خشک ریشه، پس از اتمام آزمایش، اندام هوایی قطع شد و ریشه‌های هر گلدان به‌طور کامل و جداگانه از خاک خارج و پس از چندین بار شستشو با آب از خاک جدا شدند. سپس برای محاسبه حجم ریشه ابتدا ریشه هر گلدان در داخل استوانه مدرج با میزان آب مشخص قرار گرفت و پس از بالا آمدن سطح آب حجم ریشه بر حسب سانتی‌متر مکعب محاسبه شد. برای اندازه‌گیری وزن خشک ریشه‌ها، نمونه‌ها در درون پاکت در آون با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفتند و سپس وزن خشک نمونه‌ها با ترازوی حساس با دقت ۰/۰۰۱ اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری طول ریشه‌ها با

گیاهان هستند (Ahmadi-Nouraldin *et al.*, 2023; Alizadeh, 2006; Poshtdar *et al.*, 2016). تنش خشکی، یکی از تنش‌های محیطی است که در اغلب مراحل رشدی و همچنین بر ساختار و فعالیت گیاهان اثرات مخرب و زیان‌بار وارد می‌سازد (Khadivar *et al.*, 2023; Seyed Hassan Pour *et al.*, 2025). پاسخ گیاهان به تنش‌های محیطی در سطوح سلولی، مولکولی و مورفولوژیک متفاوت است (Revilla *et al.*, 2016). یکی از راه‌های مقابله با تنش خشکی تنظیم فشار اسمزی است که منجر به تولید ترکیبات تنظیم‌کننده فشار اسمزی شامل قندهای الکلی، آمینواسیدها، گلیسرول و سایر متابولیت‌های ثانویه می‌شود (Liang *et al.*, 2013). متابولیت‌های ثانویه تحت تأثیر تنش‌های محیطی قرار می‌گیرند (Mokhaberi *et al.*, 2004; Oksman-Caldentey and Inzé, 2013)، متابولیت‌های ثانویه ترکیبات فعال زیستی متنوعی مانند فلاونوئیدها، تریپنوئیدها، آلکالوئیدها و اسانس‌ها هستند (Pathania *et al.*, 2021) که علاوه بر کاربردهای درمانی، نقش مهمی نیز در مکانیسم‌های دفاعی گیاهان در مواجهه با تنش‌های محیطی مانند خشکی ایفا می‌کنند (Dos Santos *et al.*, 2021; Jogawat *et al.*, 2021; Yadav *et al.*, 2022). گیاه پروانش، تنها گیاهی است که می‌تواند آلکالوئیدهای وین کریستین و وین بلاستین را تولید کند. با توجه به پایین بودن میزان سنتز و درصد کلی این آلکالوئیدهای با ارزش و همچنین پیچیده بودن مسیر سنتز آن‌ها، ساخت دارو از این گیاه با چالش مواجه شده است (Sun *et al.*, 2016). به این دلیل، پژوهش حاضر به بررسی تأثیر تیمار اسید آمینه تریپتوفان و اعمال تنش خشکی بر تولید این آلکالوئیدها و بیان ژن‌های مهم درگیر در مسیر سنتز آنها در گیاه پروانش می‌پردازد.

مواد و روش‌ها

کشت و اعمال تیمار: این آزمایش در سال ۱۴۰۲ در آزمایشگاه‌ها و گلخانه‌های دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان اجرا شد. بذره‌های نسل F₁ گیاه پروانش وینکا (Vinca) از مؤسسه کشاورزی زعیم، تهیه و پس از

استفاده از خط‌کش با دقت یک میلی‌متر انجام شد (Selahvarzi *et al.*, 2007).

استخراج RNA، سنتز cDNA و ارزیابی بیان ژن‌های مورد مطالعه: پس از معنی‌دار شدن اثر اصلی تریپتوفان بر پارامترهای فیزیولوژیک گیاه پروانش، مقایسه میانگین تیمارهای آزمایش نشان داد که غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر اثر معنی‌داری نسبت به سایر سطوح بر پارامترهای فیزیولوژیک هم‌چون طول، حجم و وزن خشک ریشه داشت. از طرف دیگر پارامترهای مذکور تحت تأثیر تیمارهای رطوبتی ۴۰ و ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی به شکل معنی‌داری تغییر کردند، با این توضیح و به جهت کاهش حجم کار تنها در سطوح صفر و ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر از اسید آمینه تریپتوفان و نیز رژیم رطوبتی ۴۰ و ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی اقدام به نمونه‌برداری برای بیان نسبی ژن‌ها شد.

نمونه‌برداری از برگ‌های تیمار شده با فاکتورهای آزمایش برای استخراج RNA کل با استفاده از شیوه‌نامه شرکت سازنده (کیت شرکت دنایست آسیا با شماره دسترسی S-1021-1) صورت گرفت. تعیین کیفیت و کمیت نمونه‌های استخراج شده با استفاده از ژل (یک درصد)-الکتروفورز و دستگاه نانودراپ انجام شد. 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 با استفاده از آغازگر الیگو dT اولین رشته‌ی cDNA بر اساس شیوه‌نامه

شرکت سازنده (Anacell) با شماره دسترسی Lot n: CS0025 در حجم ۲۰ μL ساخته شد. واکنش Real time qRT-PCR با آغازگرهای مربوط به ژن‌های *Str*، *Tdc* و *Rsp9* (به‌عنوان ژن مرجع) (جدول ۱) (Soltani *et al.*, 2020) و مسترمیکس سایبرگرین (Ampliqon) با شماره دسترسی A325402 در حجم نهایی ۲۰ μL با شرایط دمایی-زمانی شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه و ۴۰ چرخه شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه در سه تکرار زیستی و دو تکرار فنی صورت گرفت.

داده‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزار REST و روش فافل و همکاران (Pfaffl *et al.*, 2002) تجزیه و تحلیل شدند و میزان بیان نسبی ژن‌ها محاسبه گردید. تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS (نسخه ۹/۴)، رسم نمودار با بهره‌گیری از نرم‌افزار Excel و مقایسه میانگین با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد صورت گرفت.

نتایج و بحث

اثر متقابل تنش خشکی و محلول‌پاشی اسیدآمینه تریپتوفان بر روی صفات حجم و وزن خشک ریشه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد، این در حالی بود که تأثیر تیمارهای مذکور بر صفت طول ریشه غیرمعنی‌دار بود. نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر ساده تنش خشکی و اسیدآمینه تریپتوفان در تمامی صفات در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۲).

جدول ۱- نام، توالی و دمای اتصال آغازگرها، شماره دسترسی و طول قطعه‌ی تکثیری شده در واکنش PCR

Table 1. The name, annealing temperature, primer sequences, accession numbers and amplicon size of PCR products				
نام آغازگر	توالی آغازگر (۳' → ۵')	شماره دسترسی	دمای اتصال (سانتی‌گراد)	طول قطعه تکثیری (جفت‌باز)
Primer name	Primer sequence (5' - 3')	Accession number	Annealing temperature (°C)	Amplicon (bp)
<i>Tdc</i>	F: CCTGTATATGTCCCGAGTTTAG	X67662.1	60	153
	R: TCGTAGTGAGTGCCCTTAG			
<i>Str</i>	F: CGCCTACGCATCTCCCTTCT	AJ250008.1	60	110
	R: TGTCCTCCACACAATGGTCT			
<i>Rsp9</i>	F: GAGGGCCAAAACAACCTTGA	AJ749993.1	60	145
	R: CCCTTATGTGCCTTTGCCTA			

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس تأثیر تیمار تنش خشکی و اسید آمینه تریپتوفان بر شاخص‌های ریشه پروانش وینکا
Table 2. The results of analysis of variance of the effect of drought stress and tryptophan amino acid treatments on *Catharanthus roseus* (Vinca) roots.

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی d.f	میانگین مربعات Means of squares		
		طول ریشه Root length	حجم ریشه Root volume	وزن خشک ریشه Root dry weight
خشکی Drought (D)	2	172**	11.04**	0.229**
تریپتوفان Tryptophan (T)	5	69.9*	3.71**	0.028**
خشکی × تریپتوفان D × T	10	1.18 ^{ns}	0.975**	0.0022**
خطا Error	36	1.41	0.29	0.0006
ضریب تغییرات (درصد) CV (%)	-	4.35	15.97	4.72

^{ns}, ** و * : به ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد.

^{ns}, ** and * : Non-significant and significant at 1 % and 5 % probability levels, respectively.

تریپتوفان (در نمونه شاهد) و افزایش سطح تنش خشکی (در سطح ۴۰ درصد ظرفیت زراعی)، وزن خشک ریشه کاهش یافت، به طوری که کم‌ترین وزن خشک ریشه با میانگین ۰/۳۹ گرم به ثبت رسید (شکل ۲).

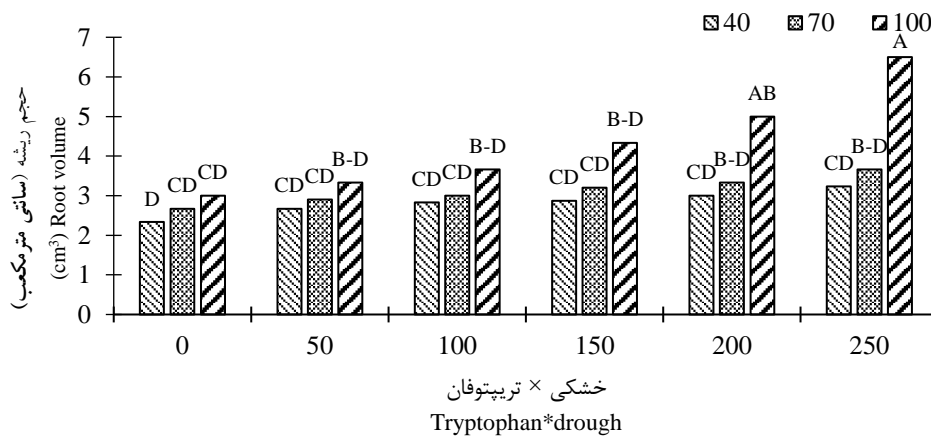
طول ریشه: نتایج مقایسه میانگین‌ها داده‌ها نشان داد که افزایش سطح تنش خشکی موجب افزایش طول ریشه در گیاه پروانش شد، به طوری که بیش‌ترین طول ریشه به میزان ۳۰/۲۸ سانتی‌متر در سطح ۴۰ درصد ظرفیت زراعی و کم‌ترین طول ریشه به میزان ۲۴/۱۱ سانتی‌متر در سطح ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی (شاهد) به دست آمد (شکل ۳- الف). همین‌طور بیش‌ترین طول ریشه در تیمار اسید آمینه تریپتوفان با غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر به میزان ۳۲/۱۴ سانتی‌متر و کم‌ترین طول ریشه در غلظت صفر اسید آمینه تریپتوفان (شاهد) به میزان ۲۴/۱۲ سانتی‌متر به دست آمد (شکل ۳- ب).

ارزیابی بیان ژن‌های مورد مطالعه: ارزیابی تغییرات الگوی بیان نسبی ژن‌های *Tdc* و *Str* در بافت برگ گیاه پروانش نشان داد که در اثر اعمال تیمار ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر تریپتوفان، بیان نسبی ژن *Tdc* در طی زمان‌های ۴۸ ساعت و ۱۶۸ ساعت پس از محلول‌پاشی افزایش یافت (شکل ۴- الف). همچنین تغییرات بیان نسبی ژن *Str* در این تیمار،

حجم و وزن خشک ریشه: با توجه به جدول تجزیه واریانس داده‌ها، برهم‌کنش تنش خشکی با اسید آمینه تریپتوفان بر حجم ریشه نیز اثر معنی‌داری در سطح یک درصد داشت (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که با افزایش غلظت اسید آمینه تریپتوفان، حجم ریشه افزایش یافت، به طوری که با کاربرد ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر تریپتوفان در سطح رطوبتی ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی، بیش‌ترین حجم ریشه (۶/۵ سانتی‌متر مکعب) به دست آمد. همچنین مشاهده شد که با کاهش غلظت تریپتوفان (در نمونه شاهد) و افزایش سطح تنش خشکی (در سطح ۴۰ درصد ظرفیت زراعی)، حجم ریشه کاهش یافت، به طوری که کم‌ترین حجم ریشه به میزان ۲/۳۳ سانتی‌متر مکعب به ثبت رسید (شکل ۱). همچنین جدول تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد، که برهم‌کنش تنش خشکی با اسید آمینه تریپتوفان بر وزن خشک ریشه نیز اثر معنی‌داری در سطح یک درصد داشت (جدول ۲). علاوه بر این، نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که با افزایش غلظت اسید آمینه تریپتوفان، وزن خشک ریشه افزایش یافت، به طوری که با کاربرد ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر تریپتوفان در سطح رطوبتی ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی بیش‌ترین وزن خشک ریشه (۰/۸۰۱ گرم) به دست آمد. همچنین مشاهده شد که با کاهش غلظت

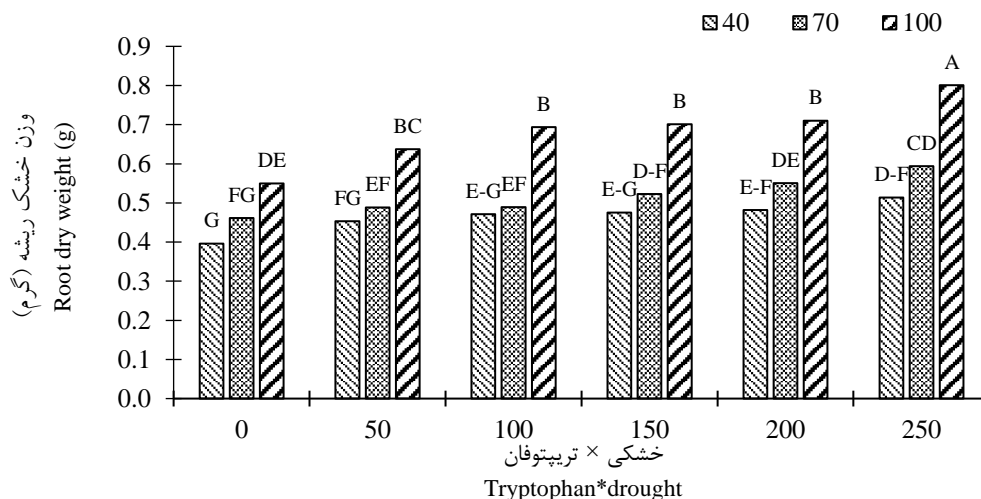
به گونه‌ای که بیش‌ترین میزان بیان در هر دو ژن در تیمار زمانی ۱۶۸ ساعت پس از اعمال تنش حاصل شد (شکل ۴ الف و ب). اعمال تیمار توأم ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر تریپتوفان و تنش خشکی ۴۰ درصد، سبب افزایش بیان نسبی ژن‌های *Str* و *Tdc* در بافت برگ گیاه پروانش در تیمار زمانی ۲۴ ساعت گردید و سپس روند کاهشی به خود گرفت، به نحوی که کم‌ترین میزان بیان نسبی ژن‌های *Str* و *Tdc* به ترتیب در ۷۲ ساعت و ۱۶۸ ساعت با عدد بیان ۳/۶۹- و ۱/۱۸- ثبت شد (شکل ۴ الف و ب).

مشابه تغییرات مشاهده شده در ژن *Tdc* بود به گونه‌ای که کم‌ترین بیان نسبی در تیمارهای ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از محلول‌پاشی و بیش‌ترین میزان بیان در تیمار زمانی ۴۸ ساعت پس از محلول‌پاشی به دست آمد (شکل ۴-ب). بررسی تغییرات بیان نسبی ژن‌های مورد مطالعه در بافت برگ گیاه پروانش، در اثر تنش خشکی ۴۰ درصد ظرفیت زراعی افزایش بیان نسبی هر دو ژن *Str* و *Tdc* نشان داد و افزایش مشاهده شده در طول زمان روند صعوی به خود گرفت،



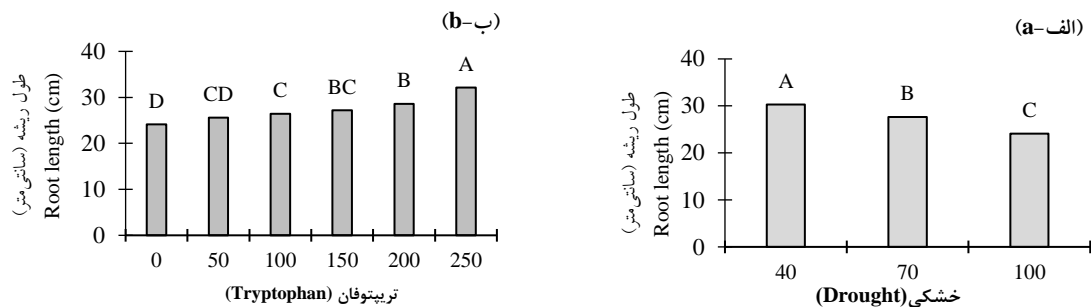
شکل ۱- اثر متقابل تنش خشکی × اسید آمینه تریپتوفان بر صفت حجم ریشه پروانش. ستون‌های دارای حروف مشابه از نظر آماری در سطح معنی‌دار ۵ درصد برای آزمون دانکن تفاوت معنی‌داری ندارند.

Figure 1. The interaction effect of drought stress × tryptophan amino acid treatment on root volume in *Catharanthus roseus* (Vinca). Columns sharing the same alphabetic letters present no statistically significant differences ($P < 0.05$), based on Duncan's test.



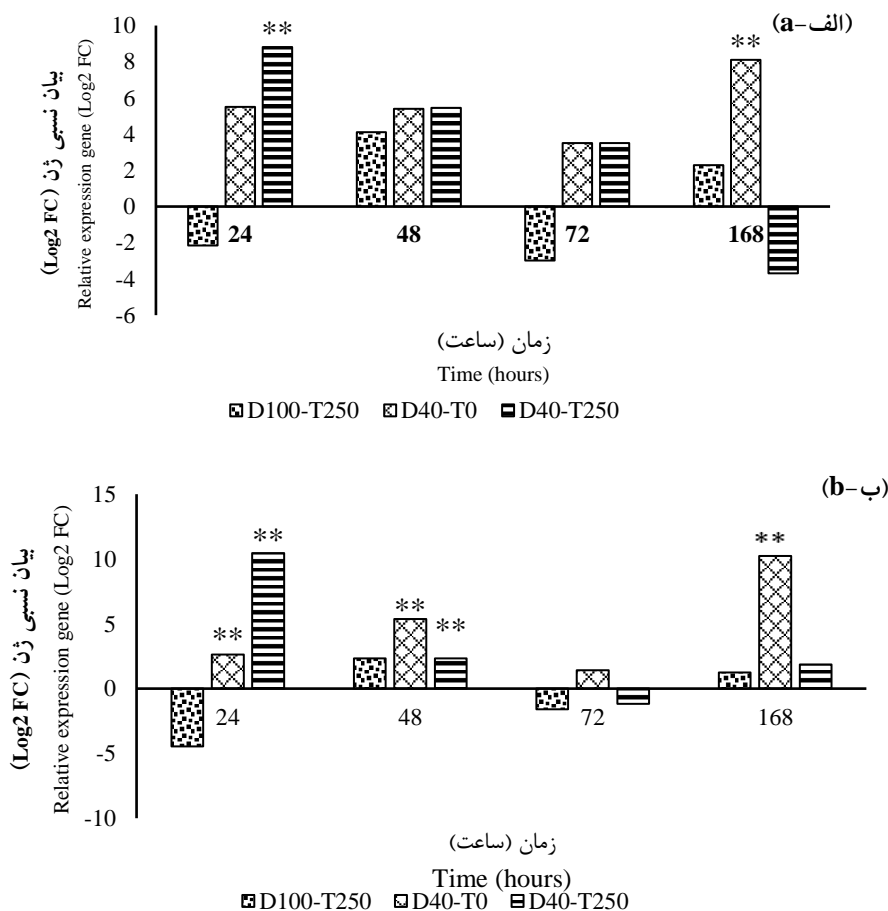
شکل ۲- اثر متقابل تنش خشکی × اسید آمینه تریپتوفان بر صفت وزن خشک ریشه پروانش. ستون‌های دارای حروف مشابه از نظر آماری در سطح معنی‌دار ۵ درصد برای آزمون دانکن تفاوت معنی‌داری ندارند.

Figure 2. The interaction effect of drought stress × tryptophan amino acid treatment on root dry weight of *Catharanthus roseus* (Vinca). Columns sharing the same alphabetic letters present no statistically significant differences ($P < 0.05$), based on Duncan's test.



شکل ۳- اثر اصلی تنش خشکی (الف) و اسید آمینه تریپتوفان (ب) بر صفت طول ریشه پروانش. ستون‌های دارای حروف مشابه از نظر آماری در سطح معنی‌دار ۵ درصد برای آزمون دانکن تفاوت معنی‌داری ندارند.

Figure 3. The main effect of drought stress (a) and the amino acid tryptophan (b) on root length of *Catharanthus roseus* (Vinca). Columns sharing the same alphabetic letters present no statistically significant differences ($P < 0.05$), based on Duncan's test.



شکل ۴- نمودار تغییرات بیان نسبی ژن‌های *Tdc* و *Str* در طول زمان (الف *Tdc* و ب *Str*). D100.T250, D40.T0, و D40.T250 به ترتیب تیمار توأم ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر تریپتوفان و خشکی ۱۰۰٪ ظرفیت زراعی، تیمار توأم صفر میلی‌گرم بر لیتر تریپتوفان و خشکی ۴۰٪ ظرفیت زراعی و تیمار توأم ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر تریپتوفان و خشکی ۴۰٪ ظرفیت زراعی. * و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد.

Figure 4. A diagram showing changes in relative expression of *Tdc* and *Str* genes over time (a *Tdc* and b *Str*). D100.T250, D40.T0, and D40.T250 correspond to combined treatment of 250 mg/L of tryptophan amino acid and 100% field capacity, combined treatment of 0 mg/L of tryptophan amino acid and 40% field capacity, and combined treatment of 250 mg/L of tryptophan amino acid and 40% field capacity. * and **, Significant at the 5% and 1% probability level, respectively

داشت. در این آزمایش محلول پاشی اسید آمینه تریپتوفان تا حدود زیادی باعث افزایش کمی تمامی صفات (طول، حجم و وزن خشک ریشه) گردید. زمانی که گیاه با تنش خشکی مواجه می‌گردد، تریپتوفان می‌تواند هم به‌عنوان جایگزین در سنتز اکسین و هم به‌عنوان منبع کربن و انرژی عمل کند و در نهایت می‌تواند در رشد گیاه مؤثر باشد. کاربرد اسید آمینه تریپتوفان، با افزایش رونویسی mRNA تا ۲/۵ برابر، فعال‌سازی فرآیند سنتز کربوهیدرات‌ها و هورمون‌های مؤثر در رشد زایشی و رویشی به‌ویژه اکسین، افزایش پروتئین و افزایش جذب و انتقال عناصر در گیاهان را موجب شود و همچنین سبب افزایش شاخص‌های کمی و کیفی گیاه دارویی در شرایط تنش‌های محیط به‌ویژه تنش خشکی می‌گردد (Abou Dahab and Abd El-Aziz, 2006). بر اساس پژوهش‌های انجام شده، با افزایش غلظت تریپتوفان در گیاه پروانش، وزن تر، خشک و طول بوته افزایش یافت (Talaat et al., 2005) و افزایش غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر افزایش رشد در گیاهان *Antirrhinum majus* را نشان داد (Abou Dahab and Abd El-Aziz, 2006).

تریپتوفان اسید آمینه‌ای است که در مسیر ایندولی TIAس به‌عنوان پیش‌ساز تریپتامین و آلکالوئیدهای ایندول تریپنولید به شمار می‌آید؛ از این رو استفاده از آن به‌عنوان محرک خارجی می‌تواند مسیر سنتزی یاد شده را تحت تأثیر قرار دهد (Kordrostami et al., 2019). تنش‌ها از جمله تنش خشکی بر رشد، نمو و تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی مؤثر هستند (Idrees et al., 2013; Jaleel et al., 2007; Mokhaberi et al., 2013)، بر این اساس، انتظار می‌رود که کاربرد تریپتوفان و تنش خشکی به‌صورت تنها و توأم، بر سنتز متابولیت‌های ثانویه پروانش، به‌ویژه دو آلکالوئید وین‌بلاستین و وین‌کریستین اثر مثبت داشته باشد در مسیر سنتز آلکالوئیدها، بسیاری از ژن‌ها فعالیت دارند که تغییر در میزان بیان هر یک می‌تواند موجب تغییر در فرآوردی پایانی یا همان آلکالوئیدهای گیاه پروانش گردد (Khataee et al., 2019; Pan et al., 2012; Sun et al., 2016).

در این پژوهش اثر محلول پاشی تریپتوفان به‌صورت جداگانه و توأم با تنش خشکی بر برخی صفات رشدی (وزن، حجم و طول ریشه) و میزان بیان دو ژن مهم در مسیر بیوسنتزی TIAس (ژن *Tdc* از مسیر ایندولی و ژن *Str* از مسیر آلکالوئیدی) در برگ‌های گیاه پروانش، یک ماه پس از اعمال تیمار تنش خشکی مورد ارزیابی قرار گرفت. تنش خشکی یکی از عوامل تنش‌زای محیطی است که تأثیر قابل‌توجهی بر رشد، بهره‌وری و اثربخشی درمانی گیاهان دارویی دارد. گیاهان دارویی برای کاهش اثرات نامطلوب تنش خشکی از راهکارهای تخصصی استفاده می‌کنند، آن‌ها در شرایط کمبود آب نرخ فتوسنتز را برای بهینه‌سازی استفاده از انرژی تنظیم می‌کنند. همچنین، گیاهان جهت سازگاری با شرایط تنش و افزایش جذب آب، مبادرت به کاهش سطح برگ، افزایش حجم ریشه می‌کنند (Kordrostami et al., 2019). در مطالعه حاضر، تنش خشکی وزن خشک و حجم ریشه را نسبت به گیاه شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش داد، اما سبب افزایش رشد طولی ریشه شد. رشد طولی ریشه تحت تأثیر تنش خشکی در گیاه پروانش (Jaleel et al., 2007) و آفتابگردان (Manivannan et al., 2007; Tahir et al., 2002) گزارش گردیده است. پژوهش‌گران دریافتند که حفظ رشد ریشه در شرایط کمبود آب در خاک، نتیجه افزایش اسید آبسزیک در ریشه برای ممانعت از تولید اتیلن است که در واقع بازدارنده رشد ریشه در شرایط تنش خشکی است (Zheng et al., 2006). همچنین در شرایط تنش خشکی ثابت شده است که پیش‌سازهای بیوسنتز اسید آبسزیک در ریشه از طریق کاتابولیسم اسید آبسزیک در اندام‌های هوایی به‌منظور حفظ رشد ریشه تولید می‌شوند (Ren et al., 2007). در مطالعه‌ای که به بررسی اثر تنش خشکی و استفاده از دو باکتری تعویق‌کننده رشد پرداخت شد، مشخص گردید که در اثر تنش، طول ریشه افزایش و وزن و حجم آن کاهش می‌یابد؛ هرچند استفاده از تیمارهای باکتریایی قادر به تعدیل اثرات ناشی از تنش خشکی گردید (Ahmadzadeh et al., 2021) که با نتایج حاصل از پژوهش حاضر مطابقت

این ژن گردید و استفاده از محرک رشدی چون متیل‌جاسمونات توانست اثر منفی کاهش بیان را تعدیل کرده و موجب گردید چنین بردداشت شود که کاربرد هورمون گیاهی متیل‌جاسمونات قادر است اثر افزایشی بر میزان بیان نسبی ژن *Prx1* و آلکالوئیدهای گیاه پروانش داشته باشد (Karami et al., 2016). بر این اساس چنین به نظر می‌رسد که نتایج حاصل از پژوهش فعلی با سایر گزارش‌های ارائه شده هم‌سو باشد. در مسیر آبشاری TIAs همچون مسیرهای آبشاری دیگر، تغییر در بیان ژن‌های بالادست در نهایت منجر به تغییر در بیان ژن‌های پایین دست می‌شود. از این‌رو، هر گونه تغییر در میزان بیان ژن‌های بالادست مسیر مانند ژن‌های *Tdc* و *Str*، تغییر در ژن‌های پایین دست (که فعالیت‌شان ساخت وین‌بلاستین و وین‌کریستین را سبب می‌گردد) را به دنبال خواهد داشت (Khataee et al., 2019; Pandey et al., 2016; Soltani et al., 2022).

به‌طور کلی نتایج پژوهش حاضر نشان داد که اسیدآمینوی تریپتوفان علاوه بر تعدیل اثرات تنش خشکی می‌تواند موجب افزایش طول و وزن خشک ریشه گردد و علاوه بر ایجاد تحمل در گیاهان تحت تنش خشکی، با بهبود سیستم ریشه‌ای، افزایش وزن خشک و تغییر الگوی بیان ژن‌های کلیدی در نهایت موجب عملکرد اقتصادی گیاه شده است.

سپاسگزاری

از اساتید و کارشناسان محترم 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 می‌گردد.

این‌رو، بررسی تغییرات بیان ژن‌های مسیر TIAs و اندازه‌گیری مقادیر آلکالوئیدهای وین‌بلاستین و وین‌کریستین در اثر اعمال تیمار مذکور دارای اهمیت است. آنزیم تریپتوفان دکربوکسیلاز تبدیل تریپتوفان به تریپتامین را برعهده دارد و فعالیت آنزیم استریکوزیدین سنتتاز این ماده را وارد مسیر ساخت آلکالوئیدهای ارزشمند دارویی پروانش می‌کند. بررسی تغییرات بیان نسبی این ژن‌ها در شرایط اعمال تیمارهای هورمونی چون متیل‌جاسمونات، اسیدسالیسیلیک، سیکلودکسترین در شرایط عادی گیاه، ریشه‌های مویین و یا کشت سلولی در نهایت افزایش بیان و فراورده‌های پایانی چون وین‌دولین، وین‌بلاستین و وین‌کریستین را به دنبال داشت (Pandey et al., 2016; Soltani et al., 2022; Sun et al., 2010; Wei, 2016) که مشخص می‌کند مسیر TIAs مسیری القاپذیر است که با تحریک افزایش بیان ژن‌های آن، افزایش فراورده پایانی را نیز موجب خواهد شد. علاوه بر محرک‌های رشدی استفاده از تنش‌های غیرزیستی مانند تنش خشکی به نیز موجب تغییر الگوی بیان ژن‌های این مسیر می‌گردد؛ به‌عنوان مثال مخابری و همکاران (Mokhabri et al., 2013) بیان داشتند که تنش خشکی موجب افزایش ۵/۲۸ برابری بیان نسبی ژن *Str* در بوته‌های تحت تنش نسبت به بوته‌های شاهد شده است و این تنش قادر است سرعت بیان ژن *Str* را افزایش بخشد که در نهایت افزایش فرورده‌های پایانی این مسیر از جمله وین‌بلاستین، وین‌کریستین و آجمالاسین را سبب می‌گردد (Mokhabri et al., 2013). همچنین بررسی تغییرات بیان در کشت کالوس پروانش در اثر تنش خشکی و متیل‌جاسمونات افزایش بیان نسبی ژن *Prx1* را در تیمار مانی ۷۲ ساعت را نشان داد، اما به مرور زمان موجب کاهش بیان

References

- 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.
- Ahmadi-Nouraldin, F., Afrouz, M., Tseng, T.M.P., Poshtdar, A. and Coudret, C. (2023). Green synthesis of hyperbranched spermine-coated Fe₃O₄ nanoparticles and their effect on corn seedlings under copper oxide stress. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, **11**: 12888-12907.

- Ahmadzadeh, M., Keshtkar, A.H., Moslemkhani, C. and Ahmadzadeh, M.** (2021). Evaluation of water deficit stress and plant growth-promoting rhizobacteria effect on some of morphological traits and expression level of Tdc and Str at the root of *Catharanthus roseus*. *Plant research (Biology of Iran)*, **34**: 560-575 (In Persian).
- Alizadeh, A.** (2006). *A SWOT Analysis of the Development of Health Technology Assessment in Iran. The Relationship Between Water, Soil and plants*. Astan Quds Razavi Publications. Mashhad, IR (In Persian).
- 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 *C. atharanthus roseus* cell cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, **119**: 543-551.
- Dos Santos, T.B., Ribas, A.F., De Souza, S.G.H., Budzinski, I.G.F. and Domingues, D.S.** (2022). Physiological responses to drought, salinity, and heat stress in plants: a review. *Stresses*, **2**: 113-135.
- 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 Journal of Agriculture Research*, **5**: 701-708.
- 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.
- Jaleel, C.A., Manivannan, P., Sankar, B., Kishorekumar, A., Gopi, R., Somasundaram, R. and Panneerselvam, R.** (2007). Water deficit stress mitigation by calcium chloride in *Catharanthus roseus*: Effects on oxidative stress, proline metabolism and indole alkaloid accumulation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **60**: 110-116.
- Jogawat, A., Yadav, B., Chhaya, Lakra, N., Singh, A.K. and Narayan, O.P.** (2021). Crosstalk between phytohormones and secondary metabolites in the drought stress tolerance of crop plants: a review. *Physiologia Plantarum*, **172**: 1106-1132.
- Karami, M., Mahmoudniamimand, M., Malekzadeh, K. and Dehjipour, M.** (2016). Effect of drought stress and methyl jasmonate on the expression of Str and Prx1 genes of vinblastine and vincristine biosynthetic pathway in *Catharanthus roseus* callus culture. *International Conference on Agricultural Sciences, Medicinal Plants and Traditional Medicine*, Mashhad, Iran (In Persian).
- Karami, M., Mahmoudniamimand, M., Malekzadeh, K. and Dehjipour, M.** (2019). The effect of adding tryptophan precursor on the expression of Str and Prx1 genes effective in the synthesis of some alkaloids in *Catharanthus roseus* plant. *The 10th National Conference on Medicinal Plants and Sustainable Agriculture*, Hamadan, Iran (In Persian).
- Khadivar, R., Ismaili, A., Sohrabi, S.S. and Torabi Podeh, H.** (2023) Identification and functional prediction of long non-coding RNAs responsive to drought stress in *Lens culinaris* L. *Plant Genetic Researches*, **9(2)**: 55-70 (In Persian).
- 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.
- Kordrostami, M., Rabiei, B. and Ebadi, A.A.** (2019) Oxidative Stress in Plants: Production, Metabolism, and Biological Roles of Reactive Oxygen Species. In: Pessaraki, M., Ed., *Handbook of Plant and Crop Stress*, pp. 85-92. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Liang, X., Zhang, L., Natarajan, S.K. and Becker, D.F.** (2013). Proline mechanisms of stress survival. *Antioxidants & Redox signaling*, **19**: 998-1011.
- Manivannan, P., Jaleel, C.A., Sankar, B., Kishorekumar, A., Somasundaram, R., Lakshmanan, G.A. and Panneerselvam, R.** (2007). Growth, biochemical modifications and proline metabolism in *Helianthus annuus* L. as induced by drought stress. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, **59**: 141-149.
- 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.
- Mokhabri, A., Ahmadi, J. and Mahakhari, S.** (2013). The effect of drought stress on the expression of the effective STR gene in the pathway of vinblastine and vincristine synthesis in *Catharanthus roseus*. *The First International Congress and the 13th Iranian Genetics Congress*, Tehran, Iran (In Persian).
- 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.
- Oksman-Caldentey, K.M. and Inzé, D.** (2004). Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends in Plant Science*, **9**: 433-440.

- 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.
- 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. *PLoS One*, **7**: e43038.
- 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.
- Pathania, D., Sharma, M., Kumar, S., Thakur, P., Torino, E., Janas, D. and Thakur, S.** (2021). Essential oil derived biosynthesis of metallic nano-particles: Implementations above essence. *Sustainable Materials and Technologies*, **30**: e00352.
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W. and Dempfle, L.** (2002). Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, **30**: e36-e36.
- Poshtdar, A., Abdali Mashhadi, A., Moradi, F., Siadat, S.A. and Bakhshandeh, A.** (2016). Effects of different sources of nitrogen fertilizer and applied rates on essential oil content and composition of peppermints. *Journal of Medicinal Herbs*, **7**: 51-57 (In Persian).
- Ren, H., Gao, Z., Chen, L., Wei, K., Liu, J., Fan, Y., Davies, W.J., Jia, W. and Zhang, J.** (2007). Dynamic analysis of ABA accumulation in relation to the rate of ABA catabolism in maize tissues under water deficit. *Journal of Experimental Botany*, **58**: 211-219.
- Revilla, P., Fernández, V., Álvarez-Iglesias, L., Medina, E.T. and Cervero, J.** (2016). Leaf physico-chemical and physiological properties of maize (*Zea mays* L.) populations from different origins. *Plant Physiology and Biochemistry*, **107**: 319-325.
- Selahvarzi, Y., Tehranifar, A. and Gazanchian, A.** (2007). Physiomorphological changes under drought stress and rewatering in endemic and exotic turfgrasses. *Journal of Horticultural Sciences and Techniques of Iran*, **9**: 193-204 (In Persian).
- Seyed Hassan Pour, S.M., NejadSadeghi, L., Shobbar, Z.S. and Kahrizi, D.** (2023) Identification and investigation of WRKY gene family in camelina plant (*Camelina sativa*) and identification of the most important gene members involved in drought stress. *Plant Genetic Researches*, **10(2)**: 63-78 (In Persian).
- 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.
- 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.
- 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.
- Tahir, M.H.N., Imran, M. and Hussain, M.K.** (2002). Evaluation of sunflower (*Helianthus annuus* L.) inbred lines for drought tolerance. *International Journal of Agriculture and Biology*, **3**: 398-400.
- 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.
- Tolambiya, P. and Mathur, S.** (2016). A study on potential phytopharmaceuticals assets in *Catharanthus roseus* L.(Alba). *International Journal of Life Science Biotechnology and Pharma Research*, **5**: 1-6.
- Wang, X., Zhang, A., Zhou, X., Liu, Q., Nan, Y., Guan, Y., Kong, L., Han, Y., Sun, H. and Yan, G.** (2016). An integrated chinmedomics strategy for discovery of effective constituents from traditional herbal medicine. *Scientific Reports*, **6**: 18997.
- 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.
- Whitmer, S., van der Heijden, R. and Verpoorte, R.** (2002). Effect of precursor feeding on alkaloid accumulation by a tryptophan decarboxylase over-expressing transgenic cell line T22 of *Catharanthus roseus*. *Journal of Biotechnology*, **96**: 193-203.
- Yadav, B., Jogawat, A., Rahman, M.S. and Narayan, O.P.** (2021). Secondary metabolites in the drought stress tolerance of crop plants: A review. *Gene Reports*, **23**: 101040.

Zheng, J., Zhao, J., Zhang, J., Fu, J., Gou, M., Dong, Z., Hou, W., Huang, Q. and Wang, G. (2006). Comparative expression profiles of maize genes from a water stress-specific cDNA macroarray in response to high-salinity, cold or abscisic acid. *Plant Science*, **170**: 1125-1132.