

## **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** 

Assistant Professor, Department of Science, Farhanghiyan University, Tehran, Iran. E-mail address: m.abiyari@cfu.ir

---

### ***Abstract***

#### **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<sub>2</sub>) on the expression of key genes of the biosynthetic pathway of important medicinal constituents in periwinkle.

#### **Materials 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<sub>2</sub> 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-TiO<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> nanoparticles (as the most effective treatment with the highest percentage of cell viability).

### Conclusions

In the face of TiO<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> 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:** Periwinkle, Medicinal plant, Titanium oxide nanoparticles, Secondary metabolites

**Paper Type:** Research Paper.

**Citation:** Mohammad A (2023) The effect of titanium oxide nanoparticles on the gene expression involved in the secondary metabolite production of the medicinal plant periwinkle (*Catharanthus roseus*). *Agricultural Biotechnology Journal* 15 (2), 83-100.

---

*Agricultural Biotechnology Journal* 15 (2), 83-100.

DOI: 10.22103/jab.2023.20229.1430

Received: February 20, 2023.

Received in revised form: April 09, 2023.

Accepted: April 10, 2023.

Published online: June 10, 2023.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant



Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian  
Biotechnology Society.

© the authors

## تاثیر نانوذرات اکسید تیتانیوم بر بیان ژن‌های درگیر در تولید متابولیت‌های ثانویه گیاه

### دارویی پریوش (*Catharanthus roseus*)

محمد آبیاری

استادیار، گروه علوم پایه، دانشگاه فرهنگیان، تهران، ایران. ایمیل: m.abiyari@cfu.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۰۱ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۲/۰۱/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۱/۲۱

#### چکیده

**هدف:** گیاه دارویی پریوش با نام علمی *Catharanthus roseus*، منبع مهم آلکالوئیدهای ضد سرطان و ضد فشار خون است. به دلیل قیمت بالای این متابولیت‌ها و محتوی اندک آنها در گیاه پریوش، تکنیک‌های کشت بافت 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) به عنوان محیط پایه در کنار دو تنظیم‌کننده رشد 2,4-D ( $1\text{ mg/L}$ ) و BAP ( $0/5\text{ mg/L}$ ) برای کشت برگ، القاء کالوس و تولید سوسپانسیون سلولی استفاده شد. کشت سوسپانسیون پریوش در پیک ر شد 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* به ترتیب با ۲۹۰، ۱۸۶، ۱۹۳ و ۲۸۷ درصد افزایش در ۴۸ ساعت بعد از تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذره  $TiO_2$  (به عنوان موثرترین تیمار با بیشترین درصد زنده‌مانی سلولی) بدست آمدند.

**نتیجه گیری:** در مواجهه با نانوذرات  $TiO_2$ ، به عنوان یک الیسیاتور 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)، متعاقباً بیان ژن‌های فوق کاهش می‌یابد. درکل، غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر  $TiO_2$  و برداشت متابولیت‌ها در ۴۸ ساعت بعد از تیمار را می‌توان بعنوان 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.

**کلیدواژه‌ها:** پرپوش، گیاه دارویی، نانوذرات اکسید تیتانیوم، متابولیت‌های ثانویه

**نوع مقاله:** پژوهشی.

**استناد:** آبیاری محمد (۱۴۰۲) تاثیر نانوذرات اکسید تیتانیوم بر بیان ژن‌های درگیر در تولید متابولیت‌های ثانویه گیاه دارویی پرپوش (*Catharanthus roseus*). مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، ۱۵(۲)، ۱۰۰-۸۳.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.



© the authors

## مقدمه

پرپوش 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 (Kumar et al. 2022). ساقه‌ها و برگ‌های پرپوش منبع مهم آلکالوئیدهای وین کریستین 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 (Liu et al. 2021). 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. در ادامه، 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 وین کریستین است. ترکیب وین‌دولین نیز توسط آنزیم DAT تولید می‌شود (Mistry et al. 2022). در کل، به خاطر قیمت بالای این متابولیت‌ها و محتوی اندک آنها در گیاه پرپوش، تکنیک‌های کشت‌بافت جهت افزایش تولید آلکالوئیدهای پرپوش مورد توجه قرار گرفته اند (Liu et al. 2021). 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 به دست آورند و بدین ترتیب بتوانند تولید متابولیت‌های ثانویه با ارزش را در گیاهان دارویی افزایش بدهند (Twaij et al. 2022). در این بین، فنون کشت‌بافت از جمله سوپانسیون سلولی و کاربرد ایستورها راه‌حلی مناسب برای تولید انبوه متابولیت‌های ثانویه است. تاکنون، ایستورهای زیستی (مثل قارچ، باکتری و غیره) و غیرزیستی (مثل اشعه فرابنفش، ترکیب شیمیایی، و غیره) متنوعی به منظور افزایش تولید ایندول آلکالوئیدها در سوپانسیون سلولی گیاه دارویی پرپوش مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (Perveen et al. 2022). با این حال، شناسایی ایستورهای کارآمدتر می‌تواند راه را برای افزایش تولید ترکیباتی مهمی همچون وین کریستین، وین بلاستین، آجمالیسین و سرپنتین تسهیل نماید. ایستورهای مبتنی بر نانوذرات، از جمله نانوذرات اکسید تیتانیوم ( $TiO_2$ )، در کشت بافت مورد توجه قرار گرفته‌اند. به طور کلی، پاسخ گیاه به نانوذرات بر مبنای نوع گونه، مرحله رویشی، سن و ماهیت نانوذرات متفاوت می‌باشد؛ با اینحال، تاثیر مثبت بعضی نانوذرات از جمله  $TiO_2$  در گیاهان اثبات شده است (Sheikhalipour et al. 2022). نانوذرات  $TiO_2$  سبب افزایش جذب نیترات (Yang et al. 2006)، تسریع تبدیل مواد غیرآلی به مواد آلی (Nair et al. 2010)، بهبود جذب نور و فعالیت آنزیم روبیسکو و فرایندهای کلیدی سلولی دیگر می‌شوند. در مطالعه‌ای، Aghaei et al. 2021 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 میلی‌گرم بر لیتر سبب بهبود عملکرد اسانس (۷/۶ در صد) و محتوی اسانس (۳/۴ در صد) در مقایسه با شاهد شد. 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 (Hong et al. 2005). 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 پرپوش انجام شد.

## مواد و روش‌ها

**نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم ( $TiO_2$ ):** در این آزمایش، از نانوذرات  $TiO_2$  با میانگین اندازه ذرات ۲۵ نانومتر (شرکت سیگما) استفاده شد. برای تهیه سوپانسیون نانوذرات در غلظت‌های ۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر از آب دیونیزه استفاده شد. برای پراکنده سازی سوپانسیون نیز از سونیکا سیون (160W, 35KHZ) به مدت ۳۰ دقیقه بهره گرفته شد. جهت ممانعت از تراکم

مجدد ذرات، سو سپانسیون 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

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

**ریزنمونه و سو سپانسیون سلولی:** ریزنمونه‌های برگ برای تهیه کالوس تهیه شده و سپس ضدعفونی شدند. از محیط

موراشیک و اسکوک (MS) به عنوان محیط پایه در کنار دو تنظیم کننده‌های رشد 2,4-D ( $1 mg/L$ ) و BAP ( $0.5 mg/L$ ) برای کشت برگ، القاء کالوس و تولید سو سپانسیون سلولی استفاده شد. جهت تهیه سو سپانسیون، 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 (Zhao et al. 2001).

**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 وزن تر و خشک سلول‌ها سنجش شد (Zhao et al. 2001). 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<sub>2</sub>O 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  $\Delta\Delta CT$  تعیین شد (Pfaffl 2001).

## 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 (base pair)	توالی آغازگر Primer sequence	نام ژن و آغازگر Gene and primer names
219	F: 5'TCGGATAGTGAAGTATTGGCTA3' R: 5'GGTGGTGGAAAGTGGTATAAC3'	<i>STR</i>
200	F: 5'GATGCTATTGATGATGGT3' R: 5'TTGCTTCTTGACTAACTC3'	<i>SGD</i>
192	F: 5'GGCAGTGAAGATACTACAG3' R: 5'GGAATCAGAAACCAATAACG3'	<i>DAT</i>
182	F: 5'GCTCTGACATACTTGCTCTC3' R: 5'ATTCTTGGTTGCGAGTGA3'	<i>PRX1</i>
102	F: 5'GCAACAAACCCCGACTTCTG 3' R: 5'TGCGATCCGTCGAGTTATCA3'	<i>18S rRNA</i>

**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 میکروسکوپ نوری 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 آیتیم تجزیه واریانس (ANOVA) به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها و از روش LSD (حداقل تفاوت معنی دار) برای مقایسه میانگین استفاده گردید. نمودارها نیز با استفاده از Office Excel ترسیم شدند.

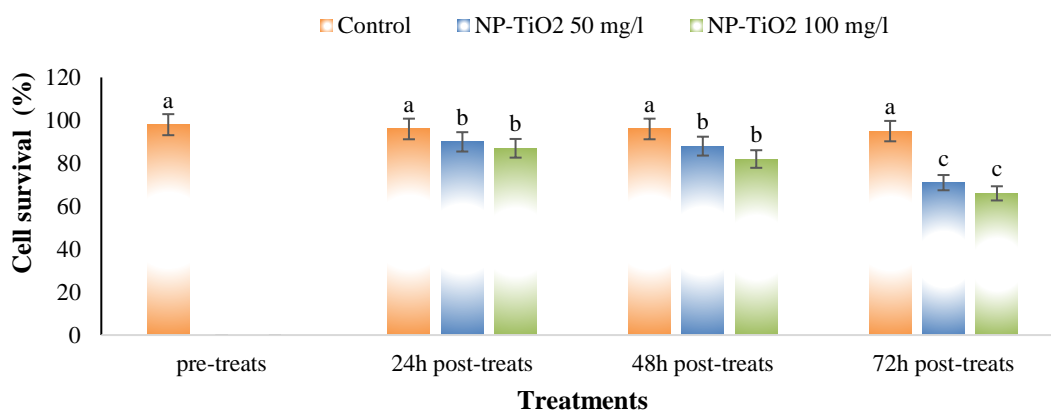
## نتایج و بحث

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 پرپوش انجام شد. مطالعه در صد زنده‌مانی سلول‌ها نشان داد که با افزایش غلظت نانوذره، در صد 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 ساعت 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. نتایج آزمایشات گذشته نشان داده است که رونویسی ژن‌های بیوسنتزی، مهم‌ترین مرحله تنظیمی در فرآیندهای پیچیده‌ای است که منجر به تجمع ایندول آلکالوئیدها در سوسپانسیون سلولی پرپوش می‌شوند (Dutta et al. 2015). بنابراین، مطالعه بیان ژن‌های *STR*، *SGD*، *DAT* و *PRX* می‌تواند رویکردی به مراتب سریعتر، کم‌هزینه‌تر و قابل‌اعتماد برای سنجش پاسخ متابولیکی پرپوش به الی‌سیتورها و عوامل تنش‌زا باشد. نتایج ما گویای این موضوع بود که اثر تیمار نانوذره بر بیان ژن‌های مورد مطالعه معنی‌دار بود (جدول ۳).

**بیان ژن *PRX*** ژن *PRX* رمزکننده یک پراکسیداز است که نقش مهمی در در دایمریزاسیون منوترپنوئید ایندول 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* القاء شده با الی‌سیتور با گذشت زمان توسط محققان دیگر نیز گزارش داده شده است؛ برای مثال، Almagro et al. (2014) مشاهده کردند که الی‌سیتور میکروبی باعث افزایش و کاهش بیان ژن *PRX* طی زمان در پرپوش می‌شود. 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 تیوردوک سین در پرپوش



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.

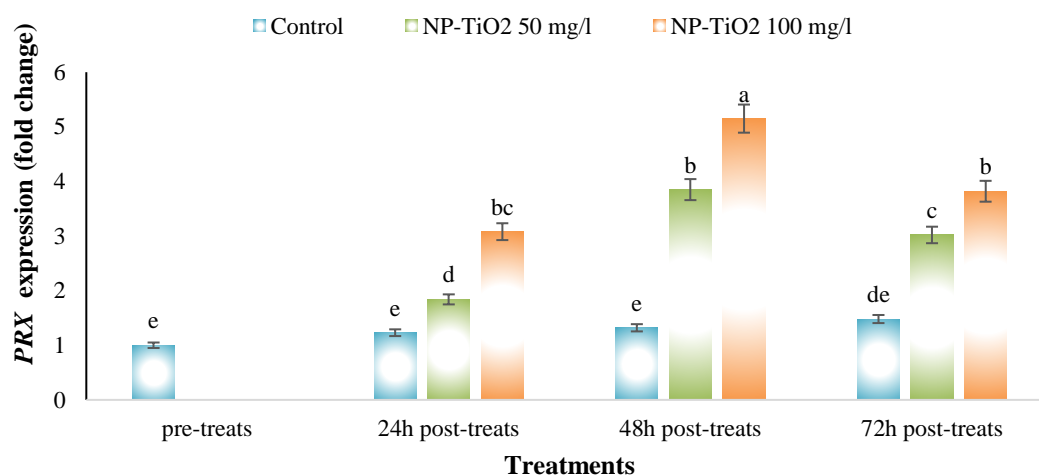


شکل ۱. درصد زنده‌مانی سلول‌های پرپوشی تحت تیمار نانوذره  $TiO_2$ . حروف مشترک گویای عدم اختلاف معنی‌دار مابین تیمارها بر اساس آزمون LSD است. اختصارات: pre-treats: قبل از اعمال تیمارها؛ 24h post-treats، ۲۴ ساعت بعد از اعمال تیمارها؛ 48h post-treats، ۴۸ ساعت بعد از اعمال تیمارها؛ 72h post-treats، ۷۲ ساعت بعد از اعمال تیمارها؛ Co کنترل؛ NP-TiO2 50 to 100 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<sub>2</sub>, 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 پرپوش تحت تیمار البیسیتور توسط پژوهشگران دیگر نیز نشان داده شده است. برای مثال، یافته‌های Liu et al. 2010

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



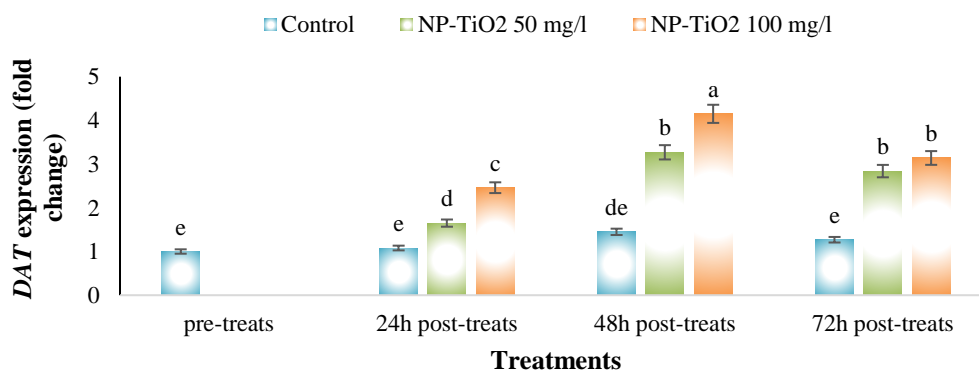
**شکل ۲.** بیان ژن *PRX* در سلول‌های پریش تحت تیمار نانوذره  $TiO_2$ . حروف مشترک گویای عدم اختلاف معنی‌دار مابین تیمارها بر اساس آزمون LSD است. اختصارات: pre-treats: قبل از اعمال تیمارها؛ 24h post-treats، ۲۴ ساعت بعد از اعمال تیمارها؛ 48h post-treats، ۴۸ ساعت بعد از اعمال تیمارها؛ 72h post-treats، ۷۲ ساعت بعد از اعمال تیمارها؛ Co کنترل؛ NP-TiO<sub>2</sub> 50 to 100 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<sub>2</sub>, 50 and 100 mg/l  $TiO_2$  nanoparticle treatment

جدول ۳. تجزیه واریانس بیان ژن‌های مورد مطالعه تحت تیمار  $TiO_2$  در زمان‌های متفاوتTable 3. Variance analysis of the expression of studied genes under NP- $TiO_2$  treatment at different times

میانگین مربعات Mean squared				درجه آزادی DF	منبع تغییرات SOV
بیان ژن <i>PRX</i> <i>PRX</i> expression	بیان ژن <i>SGD</i> <i>SGD</i> expression	بیان ژن <i>DAT</i> <i>DAT</i> expression	بیان ژن <i>STR</i> <i>STR</i> expression		
465.76**	567.75*	746.32*	849.34*	2	زمان
546.34*	366.57**	575.43**	687.25*	2	غلظت
354.75**	454.76**	365.65**	575.25*	4	زمان × غلظت
19.54	26.54	31.46	42.16	18	Time*con.
10.4	7.36	8.7	13.14	-	خطا
					CV %

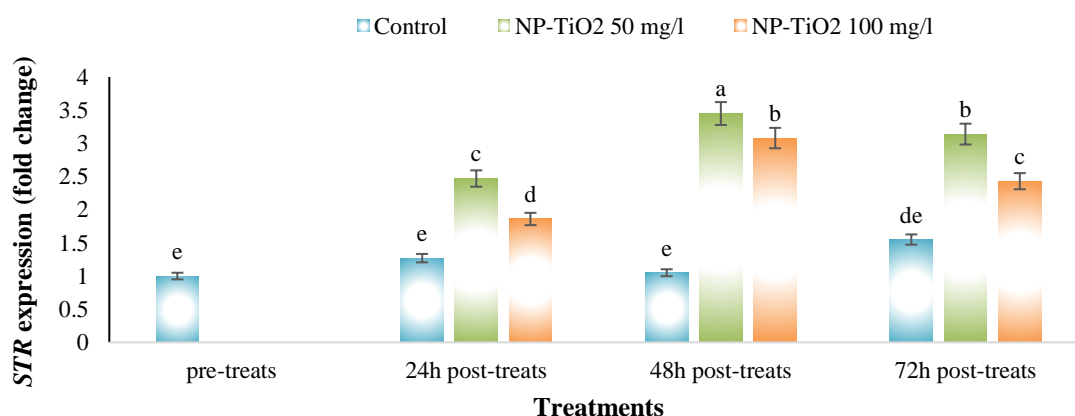
علامت \* و \*\* به ترتیب گویای معنی‌داری در سطح ۱ و ۵ درصد است.



**شکل ۳.** بیان ژن *DAT* در سلول‌های پرپوش 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- $TiO_2$  50 to 100 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 سکولوگائین از مسیر سکواپریدوئید، استریکتوسیدین را سنتز می‌نماید که اولین ایندول آلکالوئید و پیش‌ساز کلیدی ترینوئید ایندول آلکالوئیدهای دیگر پریش 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 به طوری که 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 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 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 et al. 2017 نشان دادند که بیان ژن‌های TDC، STR و SGD با تیمار پریش با الیسیتور قارچی نخست افزایش و سپس کاهش یافت (Roseus et al. 2017).

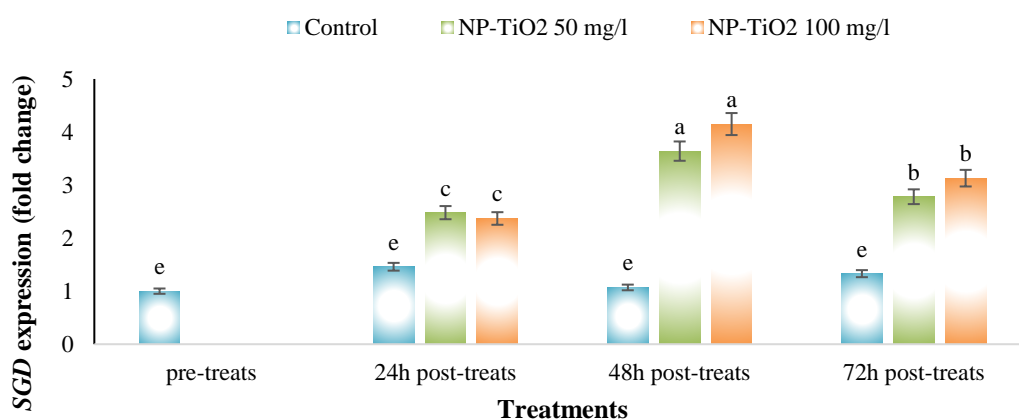


**شکل ۴.** بیان ژن STR در سلول‌های پریش تحت تیمار نانوذره  $TiO_2$ . حروف مشترک گویای عدم اختلاف معنی‌دار مابین تیمارها بر اساس آزمون LSD است. اختصارات: pre-treats، قبل از اعمال تیمارها؛ 24h post-treats، ۲۴ ساعت بعد از اعمال تیمارها؛ 48h post-treats، ۴۸ ساعت بعد از اعمال تیمارها؛ 72h post-treats، ۷۲ ساعت بعد از اعمال تیمارها؛ Co کنترل؛ NP-TiO<sub>2</sub> 50 to 100 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<sub>2</sub>, 50 and 100 mg/l  $TiO_2$  nanoparticle treatment

افزایش بیان ژن *STR* در مواجهه با الیوسیتور نانوذره  $TiO_2$  می‌تواند ناشی از این مسئله باشد که نانوذره  $TiO_2$  سبب القاء واکنش فوق حساسیت (Pan et al. 2016) و تحریک مسیر جاسمونیک اسید (Wei, 2010) می‌شود که آنها نیز به نوبه خود سبب القاء بیان ژن *STR* می‌شوند. علاوه بر این، Sibérial et al. 2014 نیز نشان دادند که ژن *STR* تحت اثر سیگنال‌هایی مانند جاسمونات و اکسین در سوسپانسیون سلولی گیاه دارویی پرپوش قرار دارد.

**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 پرپوش 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).



**شکل ۵.** بیان ژن *SGD* در سلول‌های پرپوش 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-TiO<sub>2</sub> 50 to 100 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<sub>2</sub>, 50 and 100 mg/l  $TiO_2$  nanoparticle treatment

روند افزایشی و کاهش سطح رونوشت ژن *SGD* توسط Akhtar et al. 2017 نیز گزارش شده است بطوریکه آنها نشان دادند که در روز سوم پس از تیمار گیاه پرپوش با الی سیستور فارچی، بیان *SGD* به حدود ۴ برابر شاهد رسید در حالی که در بازه‌های زمانی بعدی کاهش یافت. با عنایت به چنین مشاهداتی، بنظر می‌رسد که افزایش سطح رونوشت ژن *SGD* بعد از تیمار الیسیستور مربوط به پاسخ دفاعی و مسیرهای پیام‌رسانی هورمونی باشد (Zhang et al. 2014). مشاهدات ما از تغییر بیان ژن‌های *STR*، *SGD*، *DAT* و *PRX* در مواجهه با نانوذره  $TiO_2$  در گیاه دارویی پرپوش 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  $TiO_2$  (به عنوان موثرترین تیمار با بیشترین درصد زنده‌مانی سلولی) به ترتیب 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 پرپوش به تیمار نانوذره  $TiO_2$  نسبت داد. به نظر می‌رسد که تیمار نانوذره  $TiO_2$  با القاء سیستم دفاعی پرپوش منجر به افزایش بیان ژن‌های دخیل در بیوسنتز ایندول آلکالوئید (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 پرپوش پی‌برد. در این راستا، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مثل اتیلن و ترکیبات محرک مثل جاسمونات به عنوان نقاط تاثیرگذاری الیسیستورها در گیاه پرپوش شناخته شده‌اند (Papon et al. 2015؛ Mezginezhad et al. 2019؛ Srivastava et al. 2014). در نتیجه، به نظر می‌رسد که تیمار نانوذره  $TiO_2$  از طریق بکارگیری جاسمونات و اتیلن سبب افزایش بیان ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز ایندول آلکالوئید می‌شود. هم‌اکنون با نتایج ما در خصوص تاثیرگذاری الیسیستور نانوذره  $TiO_2$  بر ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه پرپوش، یافته‌های مشابه با گیاهان و متابولیت‌های ثانویه مختلف نشان داده است که نانوذرات  $TiO_2$  از پتانسیل بالایی در تولید متابولیت‌های ثانویه با ارزش در گیاهان دارویی برخوردار هستند. برای مثال، Karimzadeh et al. 2019 اثر نانوذرات تیتانیوم (صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) بر بیان ژن‌های سینامیل‌الکل دهیدروژناز (CAD) و فنیل‌آلانین آمونیا لیاز (PAL) در محیط کشت سلولی کتان (*Linum usitatissimum*) را بررسی کردند. نتایج آنها نشان داد که نانوذره تیتانیوم باعث افزایش بیان *CAD* در غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر شد. Kazemi et al. 2022 اثر زمان کاربرد نانوذرات تیتانیوم (۰، ۲۰، ۴۰ میلی‌گرم در لیتر) بر صفات بیوشیمیایی مرزه (*Satureja hortensis*) را ارزیابی نمودند. بر اساس نتایج، ۴۸ ساعت پس از تیمار، تیمار نانوذره تیتانیوم باعث افزایش فلاونوئید شد. Fabriki-Ourang et al. 2019 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 دی‌هیدروبنزوفنانتربیدین اکسیداز (DBOX) را در مامیران کبیر (*Chelidonium majus L*) مطالعه کردند. غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر  $TiO_2$  به ترتیب منجر به افزایش ۶۳، ۶۶، ۵۰ 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 محلول پاشی سبب بیشینه بیان در هر چهار ژن شدند. Mazarie et al. 2019 نیز تأثیر محلول پاشی نانوذرات  $TiO_2$  (۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر) بر صفات فیزیولوژیکی مریم گلی (*Salvia officinalis*) را کاوش نمودند. با افزایش غلظت نانو  $TiO_2$  (۱۰۰ میلی گرم در لیتر)، محتوی اسانس روند افزایشی نسبت به شاهد به خود گرفت. تمام این گزارشات بر دستاورد ما تحت عنوان " شناخت پتانسیل مثبت نانوذرات  $TiO_2$  در افزایش متابولیت‌های ثانویه پرپوش " تاکید دارند ( Talebi et al. 2022).

**نتیجه گیری:** اهمیت ترکیبات وین کریستین، وین بلاستین، آجمالیسین و سرپنتین در گیاه پرپوش و رابطه مستقیم بیان ژن‌های *STR*، *SGD*، *DAT* و *PRX* با سطح این آلکالوئیدها، ما را بر آن داشت تا تأثیر الیه سیاتور  $TiO_2$  را بر بیان ژن‌های فوق مطالعه نماییم. غلظت بالاتر  $TiO_2$  نانوذره باعث افزایش بیشتر بیان ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتز ایندول آلکالوئیدهای پرپوش 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 میلی گرم در لیتر  $TiO_2$  و در ۴۸ ساعت بعد از تیمار بدست آمد. بنابراین، غلظت ۱۰۰ میلی گرم در لیتر  $TiO_2$  و برداشت متابولیت‌ها در ۴۸ ساعت بعد از تیمار را می توان بعنوان شرایط بهینه تولید ایندول آلکالوئیدها توصیه کرد.

**سپاسگزاری:** از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه فرهنگیان تهران به خاطر همکاری در اجرای پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌شود.

## منابع

عموآقایی ریحانه، مجیدی مینا (۱۴۰۰) تأثیر محلول پاشی نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بر پاسخهای بیوشیمیایی، رشد، عملکرد و میزان اسانس گیاه زنیان (*Carum copticum*) تحت تنش شوری. روابط خاک و گیاه، ۱۲(۳)، ۳۳-۵۱.

فابریکی اورنگ صدیقه، درگاهی صالحه، پورابوقداره علیرضا (۱۳۹۷) اثرات نانومحرک دی اکسید تیتانیوم بر الگوی بیان ژن‌های مسیر بیوسنتز سنگوئینارین در مامیران کبیر (*Chelidonium majus*). فصلنامه علمی ژنتیک نوین، ۱۳ (۴)، ۵۲۳-۵۱۳.

کریمزاده فاطمه، حداد رحیم، گروسی قاسمعلی (۱۳۹۸) تأثیر نانوذرات روی و تیتانیوم بر بیان ژن‌های فنیل آلانین آمونیباز (*PAL*) و سینامیل الکل دهیدروژناز (*CAD*) در کشت سلولی گیاه کتان (*Linum usitatissimum*). فصلنامه علمی ژنتیک نوین، ۱۴ (۲)، ۱۷۷-۱۷۱.

مزارعی ایوب، موسوی نیک سید محسن، قنبری احمد، فهمیده لیلا (۱۳۹۸) تأثیر محلول پاشی غلظت‌های مختلف اسید جاسمونیک و نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم بر برخی صفات فیزیولوژیکی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی مریم گلی (*Salvia officinalis* L). نشریه زیست‌شناسی گیاهی ایران، ۱۱، ۲۲-۱.

## References

- Akhtar SJ, Ahmad A (2017) Molecular network of monoterpene indole alkaloids (MIAs) signaling in plants with reference to *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. In Stress Signaling in Plants. Genom Proteom Perspect 2, 37-67.
- Aghaei R, Majidi M (2021) Effect of foliar spraying of titanium dioxide nanoparticles on biochemical responses, growth, yield and essential oil content of *carum copticum* under salinity stress. J Soil Plant Interact 12(3), 33-51 (In Persian).
- Almagro L, Gutierrez J, Pedreño MA, Sottomayor M (2014) Synergistic and additive influence of cyclodextrins and methyl jasmonate on the expression of the terpenoid indole alkaloid pathway genes and metabolites in *Catharanthus roseus* cell cultures. Plant Cell Tissue Organ Cult 119(3), 543-551.
- Dutta A, Batra J, Pandey-Rai S, Singh HD (2015) Expression of terpenoid indole alkaloid biosynthetic pathway genes corresponds to accumulation of related alkaloids in *Catharanthus roseus* (L.). Planta 220(3), 376-383.
- Fabriki-Ourang S, Darghazi S, Pour-Aboughadareh A (2019) The effects of titanium dioxide nano-elicitor on the expression profile of sanguinarin biosynthesis pathway genes in greater celandine (*Chelidonium majus* L.). Mod Genet J (MGJ) 13(4), 513-523 (In Persian).
- Hong F, Zhou J, Liu C, Yang F, Wu C, Zheng L, Yang P (2005) Effects of Nano TiO<sub>2</sub> on photochemical reaction of chloroplasts of Spinach Biol Trace Elem Res 105, 269-279.
- Karimzadeh F, Haddad R, Garoosi G (2019) The effects of nano-ZnO and nano-TiO<sub>2</sub> on expression of Phenylalanine ammonia lyase (PAL) and Cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) genes in cell culture of *Linum usitatissimum* L. Mod Genet J (MGJ) 14(2), 171-177 (In Persian).
- Kumar S, Singh B, Singh R (2022) *Catharanthus roseus* (L.) G. Don: A review of its ethnobotany, phytochemistry, ethnopharmacology and toxicities. J Ethnopharmacol 284, 114647.
- Kazemi B, Ranjbar M, Rezayatmand Z, Ahadi AM (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.). J Plant Proc and Func 11 (48), 315-337
- Liu Y, Zhao D, Zu YT, Jiang Y, et al. (2010) Effects of low light on terpenoid indole alkaloid accumulation and related biosynthetic pathway gene expression in leaves of *Catharanthus roseus* seedlings. Bot Stud 52, 191-196.
- Liu Y, Patra B, Singh SK, Paul P, Zhou Y, Li Y, Wang Y, Pattanaik S, Yuan L (2021) Terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*: effects and prospects of environmental factors in metabolic engineering. Biotechnol Lett 43(11), 2085-2103.



- Mazarie A, Mousavi-nik S, Ghanbari A, fahmideh L (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). IJPB 11(1), 1-22 (In Persian).
- Mistry V, Darji S, Tiwari P, Sharma A (2022) Engineering *Catharanthus roseus* monoterpene indole alkaloid pathway in yeast. Appl Microbiol Biotechnol 106(7), 2337-2347.
- Mingyu S, Hong F, Liu C, Wu X, Liu X, Chen L (2007) Effects of nano-anatase TiO<sub>2</sub> on absorption, distribution of light and photo reduction activities of chloroplast membrane of spinach. Biol Trace Elem Res 118, 120-130.
- Nair R, Varghese SH, Nair BG, Maekawa T, Yoshida Y, Kumar DS (2010) Nanoparticulate material delivery to plants. Plant Science 179, 154-163.
- Pan Q, Mustafa NR, Tang K, Choi YH, Verpoorte R (2016) Monoterpene indole alkaloids biosynthesis and its regulation in *Catharanthus roseus*: a literature review from genes to metabolites. Phytochem Rev 15(2), 221-250.
- Papon N, Bremer J, Vansiri A, Andreu F, Rideau M, Crèche J (2015) Cytokinin and ethylene control indole alkaloid production at the level of the MEP/terpene pathway in *Catharanthus roseus* suspension cells. Planta Medica 71, 572-574.
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in Real-Time RT-PCR. Nucleic acids Res 9(9), e45-e45.
- Roseus S M, Farsi M, Mirshamsi KA (2017) Evaluation of ethylene effect on expression level of *T16H*, *G10H*, *DAT* and *AVLBS* genes in *Catharanthus*. Biology 9(2), 151-160.
- Sibénil Y, Benhamron S, Memelink J, Giglioli-Guivarc'h N, Thiersault M, Boisson B, Gantet P (2014) *Catharanthus roseus* G-box binding factors 1 and 2 act as repressors of strictosidine synthase gene expression in cell cultures. Plant Mol Biol 45(4), 477-488.
- Srivastava S, Pandey R, Kumar S, Nautiyal CS (2014) Correspondence between flowers and leaves in terpene indole alkaloid metabolism of the phytoplasma-infected *Catharanthus roseus* plants. Protoplasma 251(6), 1307-1320.
- Sheikhalipour M, Gohari G, Esmailpour B, et al. (2022) Melatonin and TiO<sub>2</sub> NPs application-induced changes in growth, photosynthesis, antioxidant enzymes activities and secondary metabolites in Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) under drought stress conditions. Plant Growth Regul <https://doi.org/10.1007/s00344-022-10679-1>.
- Perveen S, Safdar N, Yasmin A, Bibi Y (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.

- Twaij BM, Hasan MN (2022) Bioactive Secondary Metabolites from Plant Sources: Types, Synthesis, and Their Therapeutic Uses. *Int J Plant Biol* 13, 4-14.
- Wei S (2010) Methyl jasmonic acid induced expression pattern of terpenoid indole alkaloid pathway genes in *Catharanthus roseus* seedlings. *Plant Growth Regul* 61 (3), 243-251.
- Yang F, Hong F, You W, Liu C, Gao F, Wu C, Yang P (2006) Influence of nanoanatase TiO<sub>2</sub> on the nitrogen metabolism of growing spinach. *Biol Trace Elem Res* 110(2), 179-190.
- Zhang L, Qing-Hui GA, Yuan-Gang ZU, Lei YAN, Yu-Liang MA, Yang, LIU (2014) Simultaneous quantitative determination of five alkaloids in *Catharanthus roseus* by HPLC-ESI-MS/MS. *CJNM* 12, 786-793
- Zhao J, Zhu WH, Hu Q, HE XW (2001) Enhanced indole alkaloid production in suspension compact callus clusters of *Catharanthus roseus*: impacts of plant growth regulators and sucrose. *Plant Growth Regul* 33(1), 33-41.
- Mezginzhad Z, Ghaderi M, Alizde Z, Izanloo A (2019) Effect of iron oxide and zinc oxide nanoparticles of on callus viability of seedless barberry. *J Crop Breed* 11 (30), 198-205.
- Talebi F, Akbarpour V, Chalavi V (2022) Effect of methanol and titanium dioxide nanoparticles on phytochemical properties of artichoke (*Cynara scolymus* L.). *J Crop Breed* 14 (43),84-94.