

In Silico Identification of Key Genes in the Carotenoid Metabolites Biosynthesis Pathway of *Citrullus colocynthis* Using Transcriptomic Data

Pages
69-85

M. Dorafshan¹, M. Soltani Howyzeh^{2*} and V. Shariati³

1 & 2) Department of Genetics and Plant Breeding, Ahv.C., Islamic Azad University, Ahvaz, Iran.

3) Molecular Biotechnology Department, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran.

*Corresponding author : mehdisoltani@iau.ac.ir

Received date: 2024.10.15

Accepted date: 2025.01.05

Abstract

Carotenoids, as isoprenoid compounds, play vital roles in plant physiology and human health. This study aimed to identify key genes in the carotenoid biosynthesis pathway in the medicinal plant *Citrullus colocynthis* (bitter apple) using transcriptomic data. Fresh fruit tissues were collected from Andimeshk, Iran, and high-quality RNA (RIN ≥ 8) was extracted for next-generation sequencing via Illumina HiSeq2500. Raw data were processed using Trimmomatic and FastQC, followed by *de novo* transcriptome assembly with Evidential-gene in sequencing depth of 77.2X. Functional annotation was performed using the KEGG database and the SBH method. Results revealed 19 out of 48 genes in the carotenoid pathway (KO00906) were identified, representing 39.5% of the pathway's genes. Critical enzymes such as *crtB*, *PDS*, *Z-ISO*, and *LCYB*, involved in catalyzing steps from geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP) to diverse carotenoids (e.g., α -carotene, β -carotene, and abscisic acid precursors), were fully characterized. All 57 unigene sequences with identified CDS were submitted to the GenBank database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI). These findings underscore the genetic potential of *C. colocynthis* for carotenoid production, with implications for enhancing nutritional, medicinal, and stress-adaptive traits. Future studies should focus on validating gene expression under stress conditions, elucidating regulatory mechanisms, and applying genetic engineering to optimize carotenoid yields. Such advancements could drive biofortification strategies and agricultural resilience.

Keywords: Biosynthesis pathway, Carotenoids, *Citrullus colocynthis*, KEGG analysis and Transcriptome.

شناسایی رایانشی ژن‌های کلیدی در مسیر بیوسنتز متابولیت‌های کاروتنوئیدی در گیاه هندوانه ابوجهل *Citrullus*

(*colocynthis*) با استفاده از داده‌های ترنسکریپتومی

شماره صفحات

۶۹-۸۵

معصومه درافشان^۱، مهدی سلطانی حویزه^{۲*} و وحید شریعتی^۳

۱ و ۲) گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران.

۳) گروه بیوتکنولوژی مولکولی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول: mehdisoltani@iau.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۰/۱۶

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۷/۲۴

چکیده

کاروتنوئیدها به‌عنوان ترکیبات ایزوپرنوئیدی با نقش‌های حیاتی در فیزیولوژی گیاهی و سلامت انسان شناخته می‌شوند. این مطالعه با هدف شناسایی ژن‌های کلیدی در مسیر بیوسنتز کاروتنوئیدها در گیاه دارویی هندوانه ابوجهل (*Citrullus colocynthis*) و با استفاده از داده‌های ترنسکریپتومی انجام شد. نمونه‌های بافت میوه این گیاه از منطقه اندیمشک جمع‌آوری و پس از استخراج RNA با کیفیت بالا (RIN ≥ 8)، توالی‌یابی نسل جدید با پلتفرم Illumina HiSeq2500 صورت گرفت. داده‌های خام با نرم‌افزارهای Trimmomatic و FastQC پردازش شدند و یکپارچه‌سازی *de novo* ترنسکریپتوم با نرم‌افزار Evidential-gene با عمق توالی X ۷۷/۲ انجام گردید. عمق توالی‌یابی در این تحقیق آنالیز عملکردی ژن‌ها با استفاده از پایگاه داده KEGG و روش SBH شناسایی مسیرهای زیستی را امکانپذیر ساخت. نتایج نشان داد ۱۹ ژن از ۴۸ ژن مرتبط با مسیر کاروتنوئیدها (KO00906) در ترنسکریپتوم این گیاه شناسایی شدند که معادل ۳۹/۵٪ از کل ژن‌های این مسیر است. آنزیم‌های کلیدی نظیر *PDS*، *crtB*، *Z-ISO* و *LCYB* که در تبدیل جرانیل جرانیل پیروفسفات (GGPP) به کاروتنوئیدهای مختلف مانند α -کاروتن، β -کاروتن و پیش‌سازهای اسید آبسزیک نقش دارند، به‌طور کامل شناسایی شدند و ۵۷ توالی ژنی دارای ناحیه‌کننده پروتئین مشخص در بانک ژن مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI) ثبت شدند. این یافته‌ها توانمندی ژنتیکی بالای *C. colocynthis* را در تولید کاروتنوئیدها تأیید می‌کند که پیامدهای مهمی در بهبود ویژگی‌های تغذیه‌ای، دارویی و مقاومت به تنش‌های محیطی دارد. پژوهش‌های آتی باید بر تحلیل بیان ژنها تحت شرایط تنش خشکی یا شوری، شناسایی عوامل تنظیمی و به‌کارگیری فناوری‌های مهندسی ژنتیک برای افزایش بازده کاروتنوئیدها متمرکز شوند.

واژه‌های کلیدی: آنالیز KEGG، ترنسکریپتوم، کاروتنوئیدها، هندوانه ابوجهل و مسیر بیوسنتز.

مقدمه

کاروتنوئیدها دسته‌ای از ترکیبات ایزوپرنوئیدی هستند که به صورت داخلی در گیاهان، جلبک‌ها و برخی میکروارگانیسم‌ها سنتز شده و نقش‌های حیاتی در فیزیولوژی گیاهی ایفا می‌کنند. این ترکیبات در فرایندهای کلیدی مانند فتوسنتز، حفاظت نوری در برابر آسیب اکسیداتیو، و ایجاد رنگدانه‌های زرد تا قرمز در اندام‌های غیرفتوسنتزی (مانند گلبرگ‌ها و میوه‌ها) مشارکت دارند (Beltrán & Wurtzel, 2024; Sun *et al.*, 2022). افزون بر این، کاروتنوئیدها پیش‌ساز آپوکاروتنوئیدها (ترکیبات مشتق‌شده از اکسیداسیون کاروتنوئیدها، مانند رتینوئیدهای ویتامین A و هورمون ABA در گیاهان) هستند که در تنظیم رشد گیاه، انتقال سیگنال، و بهبود طعم و عطر میوه‌ها نقش داشته و خواص تغذیه‌ای-دارویی ارزشمندی ارائه می‌دهند (Liu *et al.*, 2020; Ngamwonglumlert *et al.*, 2021). از سوی دیگر، این ترکیبات برای سلامت انسان ضروری‌اند؛ چرا که پیش‌ساز ویتامین A (ضروری برای بینایی و سیستم ایمنی) بوده و با فعالیت آنتی‌اکسیدانی خود، خطر ابتلا به بیماریهای مزمن مانند سرطان، بیماریهای قلبی-عروقی و اختلالات چشمی را کاهش می‌دهند (Fernández-García, 2014; Torres-Montilla & Rodríguez-Concepcion, 2021). مطالعات اخیر همچنین نشان می‌دهند که کاروتنوئیدهای غذایی با محافظت از پوست در برابر پرتوهای مضر UV، به حفظ سلامت پوست کمک می‌کنند (Eggersdorfer & Wyss, 2018). منابع اصلی کاروتنوئیدها در رژیم غذایی انسان شامل میوه‌ها، سبزیجات (مانند هویج، گوجه‌فرنگی و اسفناج) و روغن پالم است که به دلیل غنای بتا-کاروتن، به‌ویژه در مناطق با کمبود ویتامین A اهمیت دارند (May, 1994; Simkin, 2021). با این حال، فراهمی زیستی و پایداری این ترکیبات تحت تأثیر عوامل متعددی مانند ژنتیک گیاه، شرایط محیطی (نور، دما)، روش‌های کشاورزی، فرآوری غذایی و ترکیب رژیم غذایی قرار می‌گیرد (Beltrán & Wurtzel, 2024; Torres-Montilla & Rodríguez-Concepcion, 2021). خانواده کدوئیان (Cucurbitaceae) که شامل گیاهانی مانند کدوها، خربزه‌ها، کدو تنبل و کدو حلوائی است، به دلیل خواص تغذیه‌ای و دارویی خود شناخته‌شده است. این ویژگی‌ها عمدتاً به حضور کاروتنوئیدها و سایر ترکیبات زیست‌فعال نسبت داده می‌شوند (Hussain *et al.*, 2023; Salehi *et al.*, 2021). پژوهش‌های گسترده‌ای به بررسی محتوای کاروتنوئیدها، تنوع و زیست‌فراهمی آنها در خانواده کدوئیان و همچنین فواید سلامتی‌شان پرداخته‌اند (Miljić *et al.*, 2021). (Rolnik & Olas, 2020) بسیاری از مطالعات بر شناسایی و اندازه‌گیری کاروتنوئیدها در گونه‌های مختلف کدوئیان متمرکز شده‌اند. به‌عنوان مثال، گل‌های *Cucurbita pepo* L. سرشار از پلی‌فنول‌ها و کاروتنوئیدها هستند که نشان‌دهنده پتانسیل بالای آنها در کاربردهای پوستی و سایر حوزه‌هاست (Di Lorenzo *et al.*, 2024). کدوهای تنبل (*Cucurbita maxima*) و *Cucurbita moschata* نیز منابع غنی کاروتنوئیدها محسوب می‌شوند و مطالعاتی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی *in vitro* و پروفیل ترپنوئیدهای آنها را بررسی کرده‌اند (Rolnik & Olas, 2020). گونه "Carosello leccese" با نام علمی *Cucumis melo* L. نیز در شرایط کشت تحت نور LED، پروفیل تغذیه‌ای قابل‌توجهی از خود نشان می‌دهد که حاکی از تأثیر شرایط کشت بر

محتوای کاروتنوئیدها است (Palmitessa et al., 2022). میوه کیوانو (*Cucumis metuliferus*) حاوی سطوح بالایی از کاروتنوئیدهای کل است که لیکوپین در پوست آن جزء برجسته‌ای محسوب می‌شود (Simona-Mariana & Răzvan, 2024). میوه گاک (*Momordica cochinchinensis*) به‌عنوان یکی از غنی‌ترین منابع طبیعی کاروتنوئیدها، به‌ویژه لیکوپین و بتاکاروتن، شناخته می‌شود (Abdulqader et al., 2019; Thavamany et al., 2020). مطالعات تطبیقی روی گونه‌های مختلف کدو تنبل (*Cucurbita pepo*، *C. moschata* و *C. maxima*) تفاوت‌های محتوای کاروتنوئیدها را بر اساس گونه و بخش گیاهی (پوست، گوشت و دانه) نشان داده‌اند (Kim et al., 2012). هندوانه ابوجهل (*Citrullus colocynthis*)، از تیره کدوئیان، به‌دلیل ترکیبات زیست‌فعال نظیر کاروتنوئیدها، به‌عنوان یک گیاه دارویی با پتانسیل آنتی‌اکسیدانی و ضد اکسیداتیو شناخته می‌شود (Issa et al., 2000; Rashedi et al., 2014). مطالعات نشان داده‌اند که محتوای کل کاروتنوئیدها در هندوانه ابوجهل به‌طور قابل توجهی متغیر است. به‌عنوان مثال، غلظت کاروتنوئیدها در دانه‌های این گیاه حدود ۰/۹۲ میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم گزارش شده است (Igwenyi, 2014). کاروتنوئیدهای موجود در این گیاه به ظرفیت آنتی‌اکسیدانی آن کمک می‌کنند که در خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد مؤثر است. عصاره متانولی میوه هندوانه ابوجهل فعالیت آنتی‌اکسیدانی چشمگیری را نشان داده است (Kumar et al., 2008). با این حال، علیرغم شواهد موجود درباره فعالیت‌های دارویی این ترکیبات در گیاه دارویی هندوانه ابوجهل، مطالعات در مورد تنوع کاروتنوئیدها در بخش‌های مختلف گیاه (مانند برگ، ریشه و دانه) و زیست‌فراهمی آنها محدود است. همچنین، فقدان داده‌های ژنتیکی در خصوص ژن‌های مسیر بیوسنتز این متابولیت‌ها ضرورت پژوهش‌های عمیق‌تر در این خصوص را آشکار می‌سازد. مطالعه ژن‌های مرتبط با مسیر بیوسنتز کاروتنوئیدها در گیاه هندوانه ابوجهل به‌دلیل پتانسیل دارویی، درک سازوکارهای پاسخ به تنش‌های محیطی و امکان بهبود ژنتیکی محصولات مرتبط، ضروری است. شناسایی ژن‌های کلیدی این مسیر می‌تواند به تولید سویه‌های غنی‌شده با کاروتنوئیدهای خاص برای مصارف دارویی و کشف مشتقات جدید با فعالیت‌های درمانی منجر شود (Su et al., 2023; Zhou et al., 2021). همچنین، نقش کاروتنوئیدها در محافظت از گیاه در برابر تنش‌های خشکی و شدت نور بالا، فرصتی برای درک سازوکارهای مقاومت به تنش و انتقال این دانش به محصولات زراعی دیگر فراهم می‌کند (Kato et al., 2016; Othman et al., 2014). از سوی دیگر، هندوانه ابوجهل به‌عنوان عضوی از خانواده کدوئیان، شباهت ژنتیکی با محصولات مهمی مانند هندوانه (*Citrullus lanatus*)، خربزه (*Cucumis melo*) و خیار (*Cucumis sativus*) دارد. شناسایی واریانت‌های نوین ژنی و عوامل رونویسی تنظیم‌کننده مسیر بیوسنتز در این گیاه می‌تواند به بهبود محتوای کاروتنوئیدی در محصولات مرتبط و توسعه نشانگرهای مولکولی برای انتخاب اصلاحی کمک کند (Alzubaidi & Soltani Howyzeh, 2024; Sathasivam et al., 2021; Zhou et al., 2021). با این حال، پیچیدگی مسیر بیوسنتز کاروتنوئیدها، تأثیر عوامل محیطی بر تولید آنها و تفاوت‌های بین‌گونه‌ای در تنظیم این مسیر، چالش‌هایی پیشروی پژوهش‌ها هستند (Bahmankar et al., 2019; Lin et al., 2023; Othman et al., 2014). برای غلبه بر این محدودیت‌ها، استفاده از

روش‌های پیشرفته‌ای مانند تحلیل ترنسکریپتوم، ویرایش ژنی CRISPR-Cas9 و متابولومیکس جهت شناسایی ژن‌ها، تحلیل پروفیل کاروتنوئیدها و مهندسی مسیرهای زیستی پیشنهاد می‌شود (Bo et al., 2022; Hyun et al., 2012; Salehi et al., 2019). در مجموع، این نوع پژوهش‌ها نه تنها به توسعه کاربردهای دارویی و کشاورزی می‌انجامد، بلکه درک عمیقتری از سازوکارهای تکاملی و انطباقی گیاهان در محیط‌های خشک ارائه می‌دهند. لذا این پژوهش به منظور شناسایی توالی ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتز کاروتنوئیدها در گیاه دارویی هندوانه ابوجهل با استفاده از تحلیل ترنسکریپتوم جهت معرفی و ثبت توالی‌های شناسایی شده و تعیین نقش عملکردی آنها صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

برای انجام این تحقیق یک بوته‌ی گیاه دارویی هندوانه ابوجهل از منطقه‌ی اندیمشک در استان خوزستان با طول و عرض جغرافیایی $48/139^{\circ} E$ و $32/403^{\circ} N$ به صورت تصادفی انتخاب و از بافت تازه میوه آن نمونه‌گیری شد. نمونه‌های بافت میوه تازه گیاه برداشت و بلافاصله با استفاده از ازت مایع منجمد گردید و با استفاده فلاکس ازت مایع به آزمایشگاه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز منتقل شد و سپس در فریزر با دمای $-80^{\circ} C$ درجه سانتی‌گراد تا زمان استخراج RNA نگهداری شد. جهت استخراج RNA از کیت استاندارد کیژن مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. کیفیت و کمیت RNA کل استخراج شده از سه نمونه بافت میوه گیاه (هر نمونه ۳ تکرار بصورت پولد شده) به ترتیب با استفاده از ژل آگارز یک درصد و اسپکتروفوتومتر نانودراپ تعیین شد و نمونه RNA کل استخراج شده با کیفیت بالا (نسبت طول موج 260 به 280 نانومتر $1/98$ و نسبت طول موج 230 به 260 نانومتر $1/8$) برای توالی‌یابی به موسسه ژنومی پکن (BGI) واقع در کشور چین ارسال گردید. در شرکت ارائه‌دهنده خدمات توالی‌یابی پیش از تعیین توالی نمونه RNA کل استخراج شده با استفاده از دستگاه Bioanalyzer[®] 2100 Agilent خلوص و کیفیت RNA ارزیابی شد و عدد RIN (RNA integrity number) برابر $8/8$ بدست آمد، سپس با استفاده از بن‌سازه Illumina HiSeq2500 به صورت خوانش‌های دو طرفه 2×150 توالی‌یابی صورت گرفت. کیفیت اولیه خوانش‌ها با استفاده از نرم‌افزار FASTQC (نسخه 0.10.1) مشخص و توالی‌های دارای طول کوچک‌تر از 50 نوکلئوتید، نوکلئوتیدهای دارای کیفیت کوچک‌تر از 20 ، هم‌چنین آداپتورهای ایلومینا توسط نرم‌افزار Trimmomatic (نسخه 0.32) حذف گردید. سپس با استفاده از نرم‌افزار FastQC خصوصیات کتابخانه ارزیابی و کارایی پیرایش داده‌ها تایید شد و روش یکپارچه‌سازی نوپدید (*de novo assembly*) برای ساخت ترنسکریپتوم مورد استفاده قرار گرفت. به این منظور خوانش‌های دارای کیفیت بالا با استفاده از نرم‌افزار Evidential-gene یکپارچه‌سازی شدند. پس از بهینه‌سازی خوانش‌ها، K-mer استاندارد اجرا شده و برای سایر پارامترهای نرم‌افزار از تنظیمات پیش‌فرض استفاده گردید. توالی تک‌ژن‌های یکپارچه‌شده در پایگاه KAAS (<http://www.Genome.Jp/kegg/kaas>) بارگذاری شد و با استفاده از شناسه‌های اختصاصی KO مخفف KEGG Orthology تفسیر شدند. شناسه‌های اختصاصی KO موجود در نقشه‌های مسیر KEGG به منظور همبستگی

ترنسکریپتوم با مسیرهای زیستی با استفاده از روش Single-directional Best Hit (SBH) اجرا گردید. تحلیل آنتولوژی ژنی با استفاده از پایگاه WEGO (<http://wego.genomics.org.cn>) انجام گردید.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از همردیفی تک‌ژن‌های یکپارچه شده هندوانه ابوجهل (۵۵۳۱۱ تک‌ژن) در مسیرهای بوسنتزی KEGG با استفاده از اسید آمینه‌های ترجمه شده با اجرای بلاست ایکس علیه پایگاه داده KEGG نشان داد که تعداد تعداد ۱۷,۳۵۹ تک‌ژن در ۱۳۴ مسیر بوسنتزی در پایگاه داده KEGG شناسایی شدند که از میان آنها مسیر بیوسنتزی متابولیسم ترپنوئیدها و پلی‌کتیدها که از مسیرهای مهم متابولیت‌های ثانویه گیاه می‌باشد با مجموع ۳۴۹ تک‌ژن قرار داشت (جدول ۱). این مسیر شامل مسیرهای فرعی بیوسنتز اسکلت ترپنوئید (KO00900)، بیوسنتز منوترپنوئیدها (KO00902)، بیوسنتز سزکوی‌ترین و تری‌ترپنوئید (KO00909)، بیوسنتز دی‌ترپنوئیدها (KO00904) و بیوسنتز کارتنوئیدها (KO00906) به ترتیب با تعداد ۱۰۱، ۲۳، ۵۵، ۴۱ و ۶۲ تک‌ژن شناسایی شده از تحلیل ترنسکریپتوم گیاه دارویی هندوانه ابوجهل علیه پایگاه KEGG بود (جدول ۱).

جدول ۱- اطلاعات مربوط به ژن‌های شناسایی شده مسیرهای بیوسنتزی ترپنوئیدها و پلی‌کتیدها در ترنسکریپتوم گیاه دارویی هندوانه ابوجهل.

Table 1. Data on identified genes in the biosynthetic pathways of terpenoids and polyketides in the transcriptome of the medicinal plant *Citrullus colocynthis*.

تعداد تک ژن‌ها به ازای هر ژن شناسایی شده در مسیر	تعداد تک ژن‌ها برای هر مسیر KEGG	درصد ژن‌های شناسایی شده در هر مسیر KEGG	تعداد ژن‌های شناسایی شده در هر مسیر KEGG	تعداد ژن‌ها در هر مسیر KEGG	شماره رفرنس مسیر KEGG (KO)	مسیرهای بیوسنتزی ترپنوئیدها و پلی‌کتیدها در پایگاه KEGG
Number of unigenes per identified gene in map	Number of unigenes for each KEGG Pathway	Percent of identified genes in each KEGG Pathway	Number of identified genes in KEGG Pathway	Number of genes in each KEGG pathway	Reference KEGG pathway number (Ko)	Biosynthetic pathways of terpenoids and polyketides in the KEGG database
3.4	101	50	29	58	900	بیوسنتز اسکلت ترپنوئید Terpenoid backbone biosynthesis
7.6	23	8.3	3	36	902	بیوسنتز منوترپنوئیدها Monoterpenoid biosynthesis
6.8	55	10.9	8	73	909	بیوسنتز سزکوی‌ترین و تری‌ترپنوئید Sesquiterpenoid and triterpenoid biosynthesis
5.8	41	10.6	7	66	904	بیوسنتز دی‌ترپنوئیدها Diterpenoid biosynthesis
3.2	62	39.5	19	48	906	بیوسنتز کارتنوئیدها Carotenoid biosynthesis

در مسیر بیوسنتز کارتنوئیدها (KO00906) در پایگاه KEGG تعداد ۴۸ ژن وجود دارد که در این تحقیق تعداد ۱۹ ژن از آنها معادل ۳۹/۵ درصد از کل مسیر در ترنسکریپتوم گیاه هندوانه ابوجهل در این تحقیق شناسایی گردید (جدول ۱). برای هر ژن مسیر بطور متوسط بیش از یک تک‌ژن در تحلیل ترنسکریپتوم گیاه هندوانه ابوجهل شناسایی گردید. در مسیر بیوسنتز کارتنوئیدها در این تحقیق به ازای هر ژن مسیر بطور متوسط تعداد ۳/۲ تک‌ژن وجود داشت (جدول ۱). آنزیم‌های شناسایی

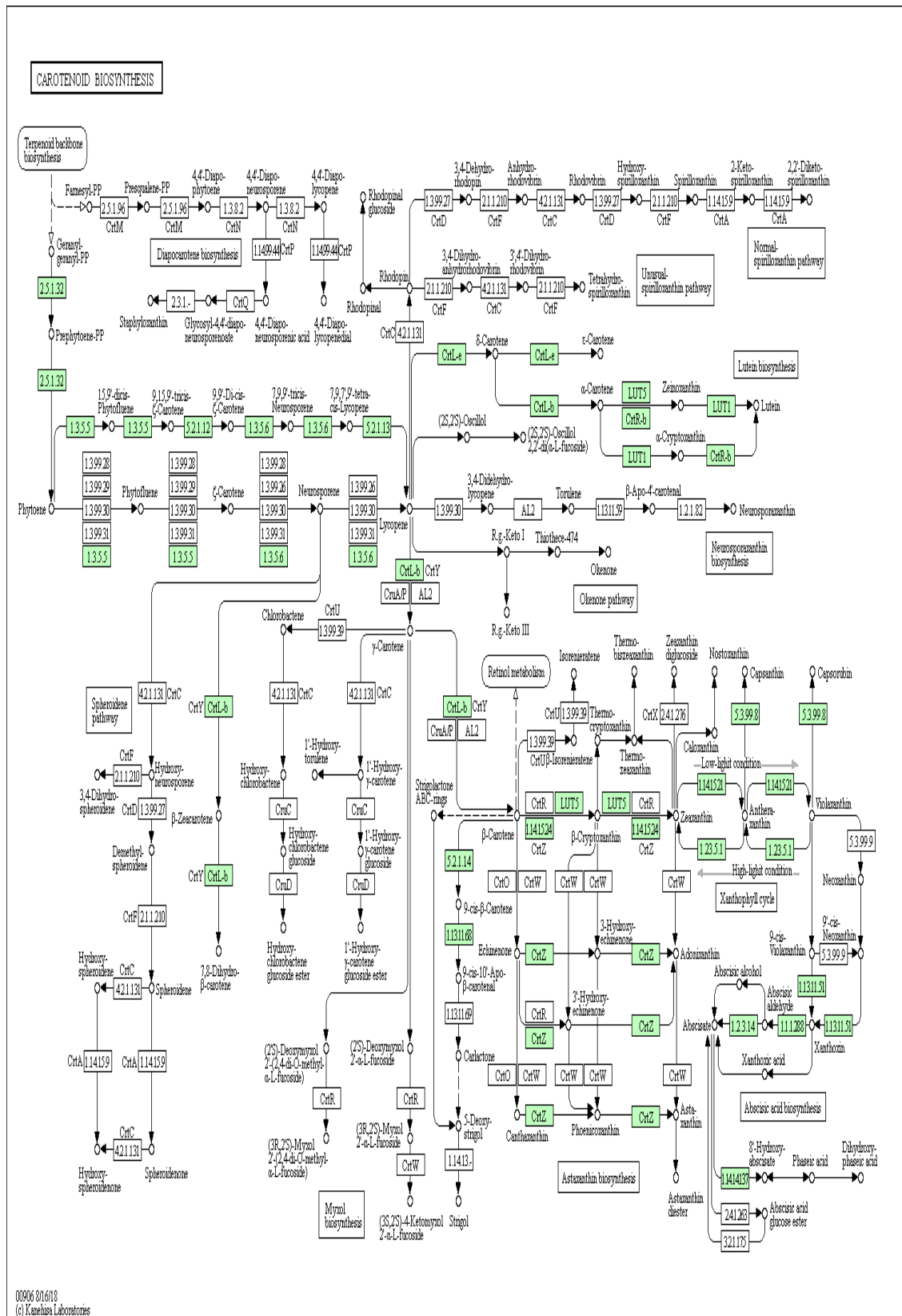
شده درگیر در مسیر بیوسنتز کاروتنوئیدها در تحلیل ترنسکریپتوم گیاه هندوانه ابوجهل عبارت بودند از: ۱۵-سیس فیتوئن سینتاز (*crtB*)، ۱۵-سیس فیتوئن دساتوراز (*PDS/crtP*)، زتا-کاروتن ایزومراز (*Z-ISO*)، زتا-کاروتن دساتوراز (*ZDS/crtQ*)، پلی کوپن ایزومراز (*crtISO/crtH*)، لیکوپین اپسیلون سیکلاز (*LCYE/crtL2*)، لیکوپین بتا سیکلاز (*LCYB/crtL1/crtY*)، بتا کاروتن ۳-هیدروکسیلاز (*crtZ*)، بتا-رینگ هیدروکسیلاز (*LUT5/CYP97A3*)، کاروتن اپسیلون مونواکسیژناز (*LUT1/CYP97C1*)، زئاکسانتین اپوکسیداز (*ZEP/ABA1*)، ویولاکسانتین دی‌اپوکسیداز (*VDE/NPQ1*)، کاپسانتین یا کاپسوروبین سینتاز (*CCSI*)، ۹-سیس-اپوکسی کاروتنوئید دی‌اکسیژناز (*NCED*)، اکسان توکسین دی‌هیدروژناز (*ABA2*)، آبسیزیک‌آلدئید اکسیداز (*AAO3*)، آبسیزیک اسید ۸-هیدروکسیلاز (*CYP707A*)، بتا-کاروتن ایزومراز (*DWARF27*) و ۹-سیس-بتا-کاروتن ۹، ۱۰-کلیوینگ دی‌اکسیژناز (*CCD7*) که در جدول ۲ به‌همراه سایر اطلاعات بدست آمده از جمله شماره آنزیم، نام کامل و نام اختصاری آنزیم، تعداد تک‌ژن برای هر آنزیم و شناسه K آنزیم در پایگاه KEGG نشان داده شده است. علاوه بر این نقشه ژنهای شناسایی شده مسیر کاروتنوئیدها در تحلیل ترنسکریپتوم گیاه هندوانه ابوجهل در شکل ۱ نشان داده شده است. این شکل بخوبی نشان می‌دهد که تمام ژن‌های موجود در مسیر بیوسنتز انواع کاروتنوئیدها از جمله آلفا کارتن، بتاکارتن، گاما کارتن، لیکوپن، گزانتین و آبسیزیت (*Abcisate*) که پیش‌ماده بیوسنتز آبسیزیک اسید می‌باشد، شناسایی شده‌اند و در شکل با رنگ سبز مشخص شده‌اند. همه این کاروتنوئیدها از پیش ساز آنها که جرانیل-جرانیل پی فسفات (*GGPP*) که خود محصول نهایی مسیر بیوسنتزی قبلی بنام مسیر بیوسنتز اسکلت ترپنوئید است شناسایی شده‌اند. در مطالعه قبلی از مولفین تمام ژن‌های مسیر بیوسنتز اسکلت ترپنوئید در گیاه هندوانه ابوجهل شناسایی شده است (*Dorafshan et al., 2019*). در این مسیر ۲۹ ژن از ۵۸ ژن مسیر (۵۰ درصد) شناسایی شد که تعداد ۱۰۱ تک‌ژن در ترنسکریپتوم هندوانه ابوجهل را به خود اختصاص می‌داد و به ازای هر ژن مسیر ۳/۴ تک‌ژن وجود داشت (جدول ۱). جدول ۳ مشخصات تک‌ژن‌های شناسایی شده در مسیر بیوسنتز کاروتنوئیدها در گیاه هندوانه ابوجهل را ارائه می‌دهد. براساس این جدول، ۶۲ تک‌ژن مرتبط به ۱۹ ژن کلیدی در این مسیر شناسایی شدند. از میان این تک‌ژن‌ها تنها ۵۷ مورد دارای ناحیه کدکننده پروتئین (*CDS*) قابل شناسایی بودند. طول تک‌ژن‌ها بین ۲۲۷ تا ۲۹۸۲ جفت باز متغیر بود و نواحی کدکننده پروتئین (*CDS*) در اکثر موارد به‌صورت کامل (*complete*) تعیین شدند (جدول ۳). برای مثال، ژن *crtB* با شناسه ۳۳۴۲۵ دارای *CDS* کامل در موقعیت ۴۸-۱۲۰۵ و طول ۱۴۰۳ جفت باز بود، درحالی‌که برخی ژن‌ها مانند *crtZ* (شناسه ۱۰۷۰۸۸۹) با طول ۱۵۰۹ جفت باز، محدوده *CDS* کوتاهتری (۳۰۸-۱۰۴۵) را نشان دادند. همچنین، در مواردی نظیر شناسه ۸۶۸۳۷، ناحیه *CDS* بصورت جزئی (ناقص) شناسایی شد. این داده‌ها تنوع ساختاری و عملکردی ژنهای این مسیر را برجسته می‌کند و پایه‌ای برای مطالعات آینده در زمینه بیان ژن، تنظیم آنزیمی و مهندسی متابولیک کاروتنوئیدها فراهم می‌سازد. جدول ۳ مشخصات تک‌ژن‌های شناسایی شده در مسیر بیوسنتز کاروتنوئیدها در گیاه هندوانه ابوجهل را ارائه می‌دهد. براساس این جدول، ۶۲ تک‌ژن مرتبط به ۱۹ ژن کلیدی در این مسیر

شناسایی شدند. از میان این تک‌ژن‌ها تنها ۵۷ مورد دارای ناحیه کدکننده پروتئین (CDS) قابل شناسایی بودند. طول تک‌ژن‌ها بین ۲۲۷ تا ۲۹۸۲ جفت باز متغیر بود و نواحی کدکننده پروتئین (CDS) در اکثر موارد به صورت کامل (complete) تعیین شدند (جدول ۳). برای مثال، ژن *crtB* با شناسه ۳۳۴۲۵ دارای CDS کامل در موقعیت ۴۸-۱۲۰۵ و طول ۱۴۰۳ جفت باز بود، درحالی‌که برخی ژن‌ها مانند *crtZ* (شناسه ۱۰۷۰۸۸۹) با طول ۱۵۰۹ جفت باز، محدوده CDS کوتاه‌تری (۳۰۸-۱۰۴۵) را نشان دادند. همچنین، در مواردی نظیر شناسه ۸۶۸۳۷، ناحیه CDS بصورت جزئی (ناقص) شناسایی شد. این داده‌ها تنوع ساختاری و عملکردی ژنهای این مسیر را برجسته می‌کند و پایه‌ای برای مطالعات آینده در زمینه بیان ژن، تنظیم آنزیمی و مهندسی متابولیک کارتنوئیدها فراهم می‌سازد. نتایج تحلیل آنتولوژی ژنی (GO) با استفاده از پایگاه WEGO (شکل ۲) نشان داد که ژن‌های مرتبط با مسیر بیوسنتز کارتنوئیدها در گیاه هندوانه ابوجهل در سه دسته اصلی اجزای سلولی، عملکرد مولکولی و فرایند بیولوژیکی دسته‌بندی شدند. در بخش اجزای سلولی، بیشترین فراوانی ژن‌ها مربوط به زیرگروه‌های «اندامک» (۶۲٪) و «سلول» (۳۷٪) بود که نشان‌دهنده تمرکز این ژن‌ها در ساختارهای درون سلولی و اجزای غشایی است. در دسته عملکرد مولکولی، زیرگروه‌های «فعالیت کاتالیتیک» و «اتصال» (به ترتیب ۶۲٪ و ۳۷٪) غالب بودند که حاکی از نقش کلیدی آنزیم‌ها و برهمکنش‌های مولکولی در سنتز کارتنوئیدهاست. در دسته فرایند بیولوژیکی، فرآیندهای «متابولیک» و «تنظیم بیولوژیکی» سهم بالایی داشتند که تأکید می‌کنند این مسیر به شدت تحت کنترل فرآیندهای متابولیک و مکانیسم‌های تنظیمی است (شکل ۲). این الگوها با نقش کارتنوئیدها در محافظت از سلول در برابر استرس‌ها و مشارکت در رنگدانه‌سازی هم‌سو است. نتایج به دست آمده، درک جامعی از سازوکارهای مولکولی و سلولی دخیل در بیوسنتز کارتنوئیدها در این گیاه دارویی ارائه می‌دهد.

جدول ۲- آنزیم‌های درگیر در بیوسنتز کارتنوئید در ترنسکرپتوم اندام‌های میوه هندوانه ابوجهل بر اساس نتایج پایگاه KEEG.

Table 2- Enzymes identified in carotenoid biosynthesis in *Citrullus colocynthis* fruit tissues via KEGG transcriptome analysis.

عدد EC EC Number	نام آنزیم Enzyme Name	شناسه تک‌ژن هندوانه ابوجهل Unigene codes of <i>Citrullus colocynthis</i>	شناسه K K number
[EC:2.5.1.32]	crtB; 15-cis-phytoene synthase	33425, 822840, 909493, 936367, 1093190, 1093188	K02291
[EC:1.3.5.5]	PDS, crtP; 15-cis-phytoene desaturase	33876, 59643, 1277208	K02293
[EC:5.2.1.12]	Z-ISO; zeta-carotene isomerase	16813	K15744
[EC:1.3.5.6]	ZDS, crtQ; zeta-carotene desaturase	83987, 104933	K00514
[EC:5.2.1.13]	crtISO, crtH; polycopene isomerase	190468, 1176338	K09835
[EC:5.5.1.18]	lcyE, crtL2; lycopene epsilon-cyclase	18848	K06444
[EC:5.5.1.19]	lcyB, crtL1, crtY; lycopene beta-cyclase	507869	K06443
[EC:1.14.15.24]	crtZ; beta-carotene 3-hydroxylase	116801, 116802, 502452, 1070887, 1070889, 1081934	K15746
[EC:1.14.-.-]	LUT5, CYP97A3; beta-ring hydroxylase	509148, 998327, 1079808, 1346960, 1346966	K15747
[EC:1.14.99.45]	LUT1, CYP97C1; carotene epsilon-monooxygenase	913429, 114934, 1257294	K09837
[EC:1.14.15.21]	ZEP, ABA1; zeaxanthin epoxidase	1104	K09838
[EC:1.23.5.1]	VDE, NPQ1; violaxanthin de-epoxidase	96827, 219108	K09839
[EC:5.3.99.8]	CCS1; capsanthin/capsorubin synthase	2246, 1135950	K14593
[EC:1.13.11.51]	NCED; 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase	47080, 121196, 507814, 825616, 1005908, 1267427	K09840
[EC:1.1.1.288]	ABA2; xanthoxin dehydrogenase	498500, 1252094	K09841
[EC:1.2.3.14]	AAO3; abscisic-aldehyde oxidase	10256, 10258, 108646, 1234184	K09842
[EC:1.14.14.137]	CYP707A; (+)-abscisic acid 8'-hydroxylase	8819, 22835, 24000, 38035, 981067, 121361, 1010240, 1107569, 1133232, 1229464, 1259875, 1310069	K09843
[EC:5.2.1.14]	DWARF27; beta-carotene isomerase	78420, 1036004	K17911
[EC:1.13.11.68]	CCD7; 9-cis-beta-carotene 9',10'-cleaving dioxygenase	86837	K17912



شکل ۱. آنالیز مسیر KEGG نمایان گر ژن‌های درگیر در بیوسنتز کاروتنوئید. مستطیل‌های سبز آزمون‌های موجود در ترنسکرپتوم میوه هندوانه ابوجهل را نشان می‌دهد.

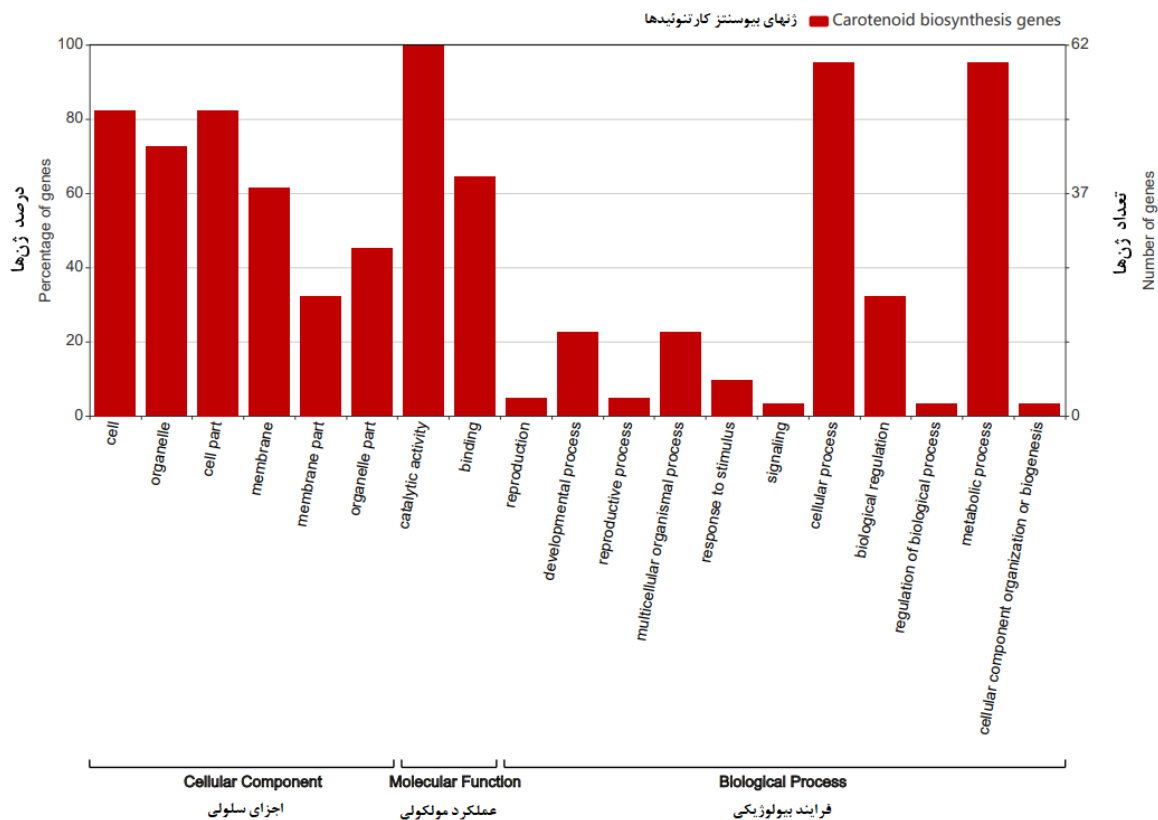
Figure 1. KEGG pathway analysis highlighting genes involved in carotenoid biosynthesis. Green rectangles indicate enzymes identified in the fruit transcriptome of *Citrullus colocynthis*.

جدول ۳- مشخصات و ویژگی‌های تک‌ژن‌های شناسایی شده برای ژن‌های مسیر بیوسنتز کارتنوئیدها در گیاه هندوانه ابوچهل

Table 3- Characteristics and Features of Identified Unigenes in the Carotenoid Biosynthesis Pathway of *Citrullus colocynthis*

نام ژن	نام	شناسه تک	طول تک	حدود ناحیه	نوع	نام ژن	نام	شناسه تک	طول تک	حدود ناحیه	نوع
Gene name	اختصاری	ژن	ژن	CDS	CDS	Gene name	اختصاری	ژن	ژن	CDS	CDS
	ژن	Unigene	Unigene	CDS region	CDS type		ژن	Unigene	Unigene	CDS region	CDS type
	Gene symbol	code	length				Gene symbol	code	length		
15-cis-phytoene synthase	<i>crtB</i> ,	33425	1403	48-1205	complete	violaxanthin	<i>VDE</i> ,	96827	1859	233-1687	complete
	<i>PYS</i>	822840	1512	175-1205	complete	de-epoxidase	<i>NPQ1</i>	219108	1632	909-1460	complete
		909493	1324	83-1249	complete	capsanthin/ca	<i>CCSI</i>	1135950	1691	79-1533	complete
		936367	227	N.I.*	N.I.	psorubin		2246	1691	79-1533	complete
		109319	392	N.I.	N.I.	synthase					
15-cis-phytoene desaturase		109318	1854	506-1660	complete	9-cis-	<i>NCED</i>	47080	1491	291-1490	complete
	<i>PDS</i> ,	33876	1484	531-899	complete	epoxycaroten					
	<i>crtP</i>	59643	2544	508-2256	complete	oid					
		127720	571	N.I.	N.I.	dioxygenase		121196	2093	59-1792	complete
		8						507814	1962	132-1940	complete
zeta-carotene isomerase	<i>Z-ISO</i>	16813	1468	204-1316	complete			825616	1971	111-1907	complete
								1267427	2619	450-2474	complete
zeta-carotene desaturase	<i>ZDS</i> ,	104933	2271	377-2107	complete			1005908	2002	178-1701	complete
	<i>crtQ</i>	83987	1155	313-867	complete	xanthoxin	<i>ABA2</i>	1252094	1039	119-979	complete
polycopene isomerase	<i>crtIS</i>	117633	2982	687-2759	complete	dehydrogenas		498500	907	35-877	complete
	<i>O</i> ,	8				e					
lycopene epsilon-cyclase	<i>crtH</i>	190468	2928	687-2687	complete	abscisic-	<i>AAO3</i>	10256	4927	175-4290	complete
	<i>lcyE</i> ,	18848	2074	204-1316	complete	aldehyde					
lycopene beta-cyclase	<i>crtL2</i>					oxidase		10258	4921	175-4284	complete
	<i>lcyB</i> ,	507869	1974	78-1592	complete			108646	5477	4222-4851	complete
beta-carotene 3-hydroxylase	<i>crtLI</i> ,							1234184	6325	431-4291	complete
	<i>crtY</i>										
	<i>crtZ</i>	107088	1311	308-1258	complete	(+)-abscisic	<i>CYP70</i>	22835	1721	61-1473	complete
		108193	1176	110-997	complete	acid 8'-	<i>7A</i>				
		116801	1066	110-979	complete	hydroxylase		38035	1609	140-1573	complete
		116802	1331	110-532	complete			981067	1506	44-1429	complete
		502452	1198	219-1169	complete			1010240	1712	12-1436	complete
beta-ring hydroxylase		107088	1509	308-1045	complete			1107569	1196	N.I.	N.I.
	<i>LUT5</i> ,	509148	2382	124-2016	complete			1133232	1565	75-1487	complete
	<i>CYP9</i>	998327	2750	268-2031	complete						
	<i>7A3</i>	107980	1960	268-1602	complete			8819	1796	62-1432	complete
		134696	2253	268-1953	complete			24000	1171	81-1049	complete
		134696	529	N.I.	N.I.			121361	1549	125-1273	complete
carotene epsilon-monoxygenase		6						1229464	1870	122-1411	complete
	<i>LUT1</i> ,	913429	1892	57-1733	complete			1259875	1504	152-1441	complete
	<i>CYP9</i>	114934	1789	77-1456	complete	beta-carotene	<i>DWAR</i>	1310069	1773	122-1447	complete
zeaxanthin epoxidase	<i>7C1</i>	125729	1779	77-1603	complete	isomerase	<i>F27</i>	1036004	535	131-535	partial
		4						78420	535	131-535	partial
	<i>ZEP</i> ,	1104	2724	438-2435	complete	9-cis-beta-	<i>CCD7</i>	86837	422	57-422	partial
	<i>ABA1</i>					carotene					
						9',10'-					
						cleaving					
						dioxygenase					

N.I.* : شناسایی نشده



شکل ۲- نمودار دسته بندی کارکردی ژن‌های شناسایی شده مسیر بیوسنتز کاروتنوئیدها در گیاه دارویی هندوانه ابوجهل.

Figure 2. Functional annotation classification of identified genes in carotenoid biosynthesis pathway in *Citrullus colocynthis* medicinal plant.

بیوسنتز کاروتنوئیدها در گیاهان شامل مسیری پیچیده با مشارکت آنزیم‌های متعدد است که نقش‌های حیاتی ایفا می‌کنند. کاروتنوئیدها، ایزوپرنوئیدهای ضروری مسئول رنگ‌های زرد، نارنجی و قرمز در گیاهان، جلبک‌ها، قارچ‌ها و باکتری‌ها هستند (Rosas-Saavedra & Stange, 2016). این ترکیبات در فرآیندهای فتوسنتز، حفاظت نوری، سنتز فیتوهورمون‌ها و پیش‌ساز آپوکاروتنوئیدها نقش دارند (Beltrán & Wurtzel, 2024; Nisar *et al.*, 2015). شناخت آنزیم‌های این مسیر برای درک فیزیولوژی گیاهی و کاربردهای بیوتکنولوژیکی ضروری است (Maoka, 2020). مسیر بیوسنتز کاروتنوئیدها شامل مراحل آنزیمی متعددی است که هر کدام توسط آنزیم‌های اختصاصی کاتالیز می‌شوند. از آنزیم‌های کلیدی میتوان به فیتوئن سنتاز (*PSY*) اشاره کرد که اولین گام اختصاصی را با تبدیل جرانیل جرانیل پیروفسفات (*GGPP*) به فیتوئن کاتالیز می‌کند (Busch *et al.*, 2002). فعالیت این آنزیم به‌عنوان نقطه تنظیمی اصلی، محتوای کلی کاروتنوئیدها را در گیاهان تعیین می‌کند (Thakuri *et al.*, 2024). ژن *PSY* در گونه‌هایی مانند گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum*) و گیاه زعفران (*Crocus sativus*) شناسایی شده است (Isaacson *et al.*, 2004; Thakuri *et al.*, 2024). در گیاه زعفران ژن *CsPSY2* نقش مهمی در تنظیم

بیوسنتز آپوکاروتنوئیدها بازی می‌کند (Thakuri et al., 2024). آنزیم‌های دیگری مانند فیتوئن دساتوراز (*PDS*) و-کآ کاروتن دساتوراز (*ZDS*) با ایجاد پیوندهای دوگانه، فیتوئن را به لیکوپین تبدیل می‌کنند. همچنین، لیکوپین سیکلاز (*LCY*) با حلقه‌ای کردن لیکوپین، α -کاروتن و β -کاروتن را تولید می‌کند (Livingstone & Anderson, 2009; Thakuri et al., 2024). آنزیم‌های بعدی مانند β -کاروتن هیدروکسیلاز (*BCH*) و زاگزانتین اپوکسیداز (*ZEP*) در تولید زاگزانتین و ویولاکسانتین نقش دارند (Thakuri et al., 2024). کاروتنوئید کلیونینگ دی‌اکسیژنازها (*CCDs*) نیز با شکستن کاروتنوئیدها، آپوکاروتنوئیدهایی مانند اسید آبسزیک (*ABA*) را سنتز می‌کنند که در پاسخ به تنش‌ها نقش دارند (Sreekumar et al., 2022). تنظیم این مسیر تحت تأثیر مکانیسم‌های رونویسی، پس از رونویسی و پس از ترجمه است (Nègre et al., 2019; Sathasivam et al., 2021). عواملی مانند نور، مرحله رشدی و تنش‌های محیطی می‌توانند بر بیان و فعالیت آنزیم‌ها اثر بگذارند (Misawa et al., 2021; Sun et al., 2020). نور با فعال کردن گیرنده‌های نوری، توسعه کلروپلاست و سنتز کاروتنوئیدها را تحریک می‌کند (Sun et al., 2020). تنش‌هایی مانند شوری، خشکی و دما نیز انباشت کاروتنوئیدها را تغییر می‌دهند (Izadpanah et al., 2024; Sreekumar et al., 2022). فیتوهورمون‌هایی مانند اسید آبسزیک (*ABA*) و استریگولاکتون‌ها (*strigolactones*) که خود از مشتقات کاروتنوئیدها هستند، نیز در تنظیم این مسیر دخیل‌اند (Nisar et al., 2021; Sathasivam et al., 2021). خانواده کدوئیان یا همان Cucurbitaceae (شامل خربزه، خیار و هندوانه) از کاروتنوئیدها برای رنگ‌دهی میوه‌ها و تولید پیش‌سازهای هورمونی استفاده می‌کند (Sreekumar et al., 2022). تنوع ژنتیکی درون گونه‌های کدوئیان برای برنامه‌های اصلاحی با هدف بهبود محتوای کاروتنوئیدها و سایر صفات مطلوب، حیاتی است. در گذشته با استفاده از مقایسه ژنوم هندوانه معمولی و گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum*) برای شناسایی تنظیم‌کننده‌های مسیر کاروتنوئیدی میوه رسیده هندوانه تحقیقاتی انجام گردید (Grassi et al., 2013). در مطالعه دیگر تحقیقات بر روی میوه رسیده‌ی کدو خاردار (*Momordica cochinchinensis*) که به نام گاک (*Gac*) معروف است و سرشار از کاروتنوئید مانند بتاکاروتن و لیکوپین می‌باشد، انجام گردید. این گیاه یک منبع خوب برای مهندسی متابولیک کاروتنوئید است، تمامی آنزیم‌های موجود در مسیرهای بیوسنتز اسکلت ترپنوئید و بیوسنتز کاروتنوئید آن شناسایی شده‌اند. از تجزیه و تحلیل رابطه بین ژن‌های بیوسنتز احتمالی کاروتنوئید و تغییرات میزان کاروتنوئید در طی رسیدن میوه، آنالیز بیان ژن بر روی سه مرحله مختلف رسیدن میوه آن (*Aril*) صورت گرفت. این مطالعه نشان داد که سنتز آنزیم‌های فیتوئن، ۱۵-سیس-فیتوئن دساتوراز، زتا-کاروتن دساتوراز، کاروتنوئید ایزومراز و لیکوپین اپسیلون سایکلاز، ممکن است عامل کلیدی برای کنترل محتوای کاروتنوئید در طی رسیدن میوه باشند (Hyun et al., 2012). گیاه هندوانه ابوجهل (حنظل)، عضوی از این خانواده، به دلیل خواص دارویی و سازگاری با محیط‌های خشک شناخته شده است (Alzubaidi & Soltani Howyzeh, 2024; El-Absy, 2022). اگرچه تاکنون مطالعه‌ای مستقیم بر آنزیم‌های بیوسنتز کاروتنوئید در هندوانه ابوجهل انجام نشده، اما با توجه به شباهت‌های خانوادگی، احتمالاً

از مکانیسم‌های مشابهی با گونه‌هایی مانند هندوانه (*Citrullus lanatus*) استفاده می‌کند (Cheng *et al.*, 2022; Prothro *et al.*, 2013). شناسایی ژن‌های کلویینگ دی‌اکسیژناز (*CCD*) در خانواده Cucurbitaceae نقطه شروعی برای درک تولید آپوکاروتنوئیدها در هندوانه ابوجهل است (Cheng *et al.*, 2022). با توجه به اینکه در این تحقیق تمام ژن‌های مسیر بیوسنتز کارتنوئیدها در گیاه هندوانه ابوجهل شناسایی شده است، پژوهش‌های آینده باید بر شناسایی عوامل تنظیمی این ژن‌ها، تحلیل بیان آنها و بررسی پاسخ به تنش‌ها در هندوانه ابوجهل متمرکز شوند. دستکاری مسیر بیوسنتز کارتنوئیدها می‌تواند به بهبود ویژگی‌های تغذیه‌ای و دارویی این گیاه و درک سازگاری آن با محیط‌های خشک کمک کند.

نتیجه گیری

این مطالعه با استفاده از تحلیل ترنسکریپتومی، ژن‌های کلیدی درگیر در مسیر بیوسنتز کارتنوئیدها در گیاه دارویی هندوانه ابوجهل را شناسایی کرد. در مجموع، ۱۹ ژن از ۴۸ ژن مرتبط با مسیر کارتنوئیدی پایگاه KEGG (KO00906) تشخیص داده شدند. آنزیم‌های حیاتی مانند *Z-ISO*، *PDS*، *crbB* و *LCYB* که نقش محوری در کاتالیز مراحل مختلف تبدیل جرانیل‌جرانیل پیروفسفات (GGPP) به کارتنوئیدهای متنوعی مانند آلفا-کاروتن، بتا-کاروتن و پیش‌سازهای اسید آبسزیک دارند، شناسایی شدند. یافته‌ها توانایی ژنتیکی بالای *C. colocynthis* را در تولید کارتنوئیدها نشان می‌دهد که برای ویژگی‌های تغذیه‌ای، دارویی و سازگاری با تنش‌های محیطی این گیاه حیاتی است. پژوهش‌های آینده باید بر تأیید بیان این ژن‌ها تحت شرایط تنش، کشف مکانیسم‌های تنظیمی و بهره‌گیری از مهندسی ژنتیک برای افزایش محتوای کارتنوئیدها متمرکز شوند. همچنین استفاده از تکرارهای بیولوژیکی (نمونه‌های مستقل از چندین بوته) و یا با منشا جغرافیایی مختلف در پژوهش‌های آینده جهت شناسایی ایزوفرم‌های ژنی یا SNP می‌تواند کمک شایانی به بررسی تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های بومی این گیاه باشد. چنین تلاش‌هایی می‌تواند به پیشبرد راهبردهای غنی‌سازی زیستی، بهبود مقاومت محصولات کشاورزی و توسعه کاربردهای نوین در حوزه‌های دارویی و کشاورزی بیانجامد.

دسترسی به داده‌ها

تمامی ۵۷ توالی ژنی شناسایی شده در این تحقیق در بانک ژن NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ثبت شدند و با کدهای دسترسی PV467641 تا PV467697 قابل دسترسی است.

منابع

- Abdulqader, A., Ali, F., Ismail, A., & Esa, N. M. (2019). Antioxidant compounds and capacities of Gac (*Momordica cochinchinensis* Spreng) fruits. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 9(4), 158-167.
- Alzubaidi, Z., & Soltani Howyzeh, M. (2024). Identifying Microsatellite Molecular Markers Using Transcriptome Data Mining in the Medicinal Plant *Citrullus colocynthis* L. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 32(1), 111-128.

Bahmankar, M., Mortazavian, S. M. M., Tohidfar, M., Noori, S. A. S., Darbandi, A. I., & Al-fekaiki, D. F. (2019). Chemotypes and morpho-physiological characters affecting essential oil yield in Iranian cumin landraces. *Industrial Crops and Products*, 128, 256-269.

Beltrán, J., & Wurtzel, E. T. (2024). Carotenoids: resources, knowledge, and emerging tools to advance apocarotenoid research. *Plant Science*, 112298.

Bo, S., Ni, X., Guo, J., Liu, Z., Wang, X., Sheng, Y., . . . Yang, J. (2022). Carotenoid biosynthesis: Genome-wide profiling, pathway identification in *Rhodotorula glutinis* X-20, and high-level production. *Frontiers in Nutrition*, 9, 918240.

Busch, M., Seuter, A., & Hain, R. (2002). Functional analysis of the early steps of carotenoid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiology*, 128(2), 439-453.

Cheng, D., Wang, Z., Li, S., Zhao, J., Wei, C., & Zhang, Y. (2022). Genome-wide identification of CCD gene family in six Cucurbitaceae species and its expression profiles in melon. *Genes*, 13(2), 262.

Di Lorenzo, R., Castaldo, L., Sessa, R., Ricci, L., Vardaro, E., Izzo, L., . . . Laneri, S. (2024). Chemical Profile and Promising Applications of *Cucurbita pepo* L. Flowers. *Antioxidants*, 13(12), 1476.

Dorafshan, M., Soltani Howyzeh, M., & Shariati, V. (2019). Identification of terpenoid backbone biosynthetic pathway genes in fruit of *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad. medical plant by RNA sequencing. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, 35(4), 691-702. doi:10.22092/ijmapr.2019.125294.2510

Eggersdorfer, M., & Wyss, A. (2018). Carotenoids in human nutrition and health. *Archives of biochemistry and biophysics*, 652, 18-26.

El-Absy, K. M. (2022). Effect of different habitats conditions on *Citrullus colocynthis*(L.) schrad. Growing naturally in Egypt and Kingdom of Saudi Arabia. *J. Adv. Biol. Biotechnol*, 25(2), 8-29.

Fernández-García, E. (2014). Skin protection against UV light by dietary antioxidants. *Food & Function*, 5(9), 1994-2003.

Grassi, S., Piro, G., Lee, J. M., Zheng, Y., Fei, Z., & Dalessandro, G. (2013). Comparative genomics reveals candidate carotenoid pathway regulators of ripening watermelon fruit. *BMC genomics*, 14. doi:10.1186/1471-2164-14-781

Hussain, A., Akram, S., Siddique, T., Yaqub, S., Fatima, H., Arif, M. R., . . . Shehzad, A. (2023). Exploration of two Cucurbitaceae fruit (muskmelon and watermelon) seeds for presence of phytochemicals, and antioxidant and antimicrobial activities. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 11(s1), 2493-2498.

Hyun, T. K., Rim, Y., Jang, H.-J., Kim, C. H., Park, J., Kumar, R., . . . Nguyen-Quoc, B. (2012). De novo transcriptome sequencing of *Momordica cochinchinensis* to identify genes involved in the carotenoid biosynthesis. *Plant molecular biology*, 79, 413-427.

Hyun, T. K., Rim, Y., Jang, H.-J., Kim, C. H., Park, J., Kumar, R., . . . Kim, J.-Y. (2012). De novo transcriptome sequencing of *Momordica cochinchinensis* to identify genes involved in the carotenoid biosynthesis. *Plant Molecular Biology*, 79(4), 413-427. doi:10.1007/s11103-012-9919-9

Igwenyi, I. (2014). Phytochemical analysis and vitamin composition of *Irvingia gabonensis* and *Citrullus colocynthis*. *IOSR-JPBS*, 9(3), 37-40.

Isaacson, T., Ohad, I., Beyer, P., & Hirschberg, J. (2004). Analysis in vitro of the enzyme CRTISO establishes a poly-cis-carotenoid biosynthesis pathway in plants. *Plant Physiology*, 136(4), 4246-4255.

Issa Abed Abdel-Hassan, I. A. A.-H., Jamal Ahmed Abdel-Barry, J. A. A.-B., & Sarah Tariq Mohammeda, S. T. M. (2000). The hypoglycaemic and antihyperglycaemic effect of *Citrullus colocynthis* fruit aqueous extract in normal and alloxan diabetic rabbits.

- Izadpanah, F., Frede, K., Soltani, F., & Baldermann, S.** (2024). Comparison of carotenoid, chlorophyll concentrations and their biosynthetic transcript levels in different coloured cauliflower. *Horticultural Plant Journal*, 10(3), 743-754.
- Kato, S., Takaichi, S., Ishikawa, T., Asahina, M., Takahashi, S., & Shinomura, T.** (2016). Identification and functional analysis of the geranylgeranyl pyrophosphate synthase gene (*crtE*) and phytoene synthase gene (*crtB*) for carotenoid biosynthesis in *Euglena gracilis*. *BMC Plant Biology*, 16, 1-12.
- Kim, M. Y., Kim, E. J., Kim, Y.-N., Choi, C., & Lee, B.-H.** (2012). Comparison of the chemical compositions and nutritive values of various pumpkin (Cucurbitaceae) species and parts. *Nutrition research and practice*, 6(1), 21-27.
- Kumar, S., Kumar, D., Saroha, K., Singh, N., & Vashishta, B.** (2008). Antioxidant and free radical scavenging potential of *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad. methanolic fruit extract. *Acta Pharmaceutica*, 58(2), 215-220.
- Lin, Z., He, Z., Ye, D., Deng, H., Lin, L., Wang, J., . . . Liang, D.** (2023). Genome-wide identification of the AcMADS-box family and functional validation of AcMADS32 involved in carotenoid biosynthesis in *Actinidia*. *Frontiers in plant science*, 14, 1159942.
- Liu, C., Hu, B., Cheng, Y., Guo, Y., Yao, W., & Qian, H.** (2021). Carotenoids from fungi and microalgae: A review on their recent production, extraction, and developments. *Bioresource Technology*, 337, 125398.
- Livingstone, K., & Anderson, S.** (2009). Patterns of variation in the evolution of carotenoid biosynthetic pathway enzymes of higher plants. *Journal of Heredity*, 100(6), 754-761.
- Maoka, T.** (2020). Carotenoids as natural functional pigments. *Journal of natural medicines*, 74(1), 1-16.
- May, C. Y.** (1994). Palm oil carotenoids. *Food and nutrition bulletin*, 15(2), 1-8.
- Miljić, M., Rocchetti, G., Krstić, S., Mišan, A., Brdar-Jokanović, M., Marcheggiani, F., . . . Damiani, E.** (2021). Comparative in vitro antioxidant capacity and terpenoid profiling of pumpkin fruit pulps from a Serbian *Cucurbita maxima* and *Cucurbita moschata* breeding collection. *Antioxidants*, 10(10), 1580.
- Misawa, N., Takemura, M., & Maoka, T.** (2021). Carotenoid biosynthesis in animals: case of arthropods. *Carotenoids: Biosynthetic and Biofunctional Approaches*, 217-220.
- Nègre, D., Aite, M., Belcour, A., Frioux, C., Brillet-Guéguen, L., Liu, X., . . . Leblanc, C.** (2019). Genome-scale metabolic networks shed light on the carotenoid biosynthesis pathway in the brown algae *Saccharina japonica* and *Cladosiphon okamuranus*. *Antioxidants*, 8(11), 564.
- Ngamwonglumlert, L., Devahastin, S., Chiewchan, N., & Raghavan, V.** (2020). Plant carotenoids evolution during cultivation, postharvest storage, and food processing: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(4), 1561-1604.
- Nisar, N., Li, L., Lu, S., Khin, N. C., & Pogson, B. J.** (2015). Carotenoid metabolism in plants. *Molecular plant*, 8(1), 68-82.
- Othman, R., Zaifuddin, F. A. M., & Hassan, N. M.** (2014). Carotenoid biosynthesis regulatory mechanisms in plants. *Journal of oleo science*, 63(8), 753-760.
- Palmitessa, O. D., Durante, M., Somma, A., Mita, G., D'Imperio, M., Serio, F., & Santamaria, P.** (2022). Nutraceutical Profile of "Carosello" (*Cucumis melo* L.) Grown in an Out-of-Season Cycle under LEDs. *Antioxidants*, 11(4), 777.
- Prothro, J., Abdel-Haleem, H., Bachlava, E., White, V., Knapp, S., & McGregor, C.** (2013). Quantitative trait loci associated with sex expression in an inter-subspecific watermelon population. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 138(2), 125-130.

Rashedi, H., Amiri, H., & Gharezi, A. (2014). Antioxidant properties and Flavonoids-Phenolic content of *Citrullus colocynthis* (L.) schrad growing in Khuzestan, Iran. *Hormozgan Medical Journal*, 20(1), -.

Rolnik, A., & Olas, B. (2020). Vegetables from the Cucurbitaceae family and their products: Positive effect on human health. *Nutrition*, 78, 110788.

Rosas-Saavedra, C., & Stange, C. (2016). Biosynthesis of carotenoids in plants: enzymes and color. *Carotenoids in nature: biosynthesis, regulation and function*, 35-69.

Salehi, B., Quispe, C., Sharifi-Rad, J., Giri, L., Suyal, R., Jugran, A. K., . . . Bobiş, O. (2021). Antioxidant potential of family Cucurbitaceae with special emphasis on *Cucurbita* genus: a key to alleviate oxidative stress-mediated disorders. *Phytotherapy research*, 35(7), 3533-3557.

Salehi, M., Naghavi, M. R., & Bahmankar, M. (2019). A review of *Ferula* species: Biochemical characteristics, pharmaceutical and industrial applications, and suggestions for biotechnologists. *Industrial Crops and Products*, 139, 111511.

Sathasivam, R., Bong, S. J., Park, C. H., Kim, J. H., Kim, J. K., & Park, S. U. (2021). Identification, characterization, and expression analysis of carotenoid biosynthesis genes and carotenoid accumulation in watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.). *ACS omega*, 7(1), 430-442.

Sathasivam, R., Radhakrishnan, R., Kim, J. K., & Park, S. U. (2021). An update on biosynthesis and regulation of carotenoids in plants. *South African Journal of Botany*, 140, 290-302.

Simkin, A. J. (2021). Carotenoids and apocarotenoids in planta: Their role in plant development, contribution to the flavour and aroma of fruits and flowers, and their nutraceutical benefits. *Plants*, 10(11), 2321.

Simona-Mariana, M., & Răzvan, P. D. (2024). QUANTITATIVE ANALYSIS OF NUTRITIONAL AND BIOACTIVE COMPOUNDS IN FRUITS OF KIWANO (*CUCUMIS METULIFERUS* E. MEY) TEMPUS CULTIVAR. *Analele Universitatii din Craiova. Seria Biologie, Horticultura, Tehnologia Prelucrării Produselor Agricole, Ingineria Mediului*, 29.

Sreekumar, J., Muhammed Sadiq, P., Raju, S., & Mukherjee, A. (2022). In silico analysis of carotenoid biosynthesis pathway in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Journal of Genetics*, 101(1), 2.

Su, B., Deng, M.-R., & Zhu, H. (2023). Advances in the discovery and engineering of gene targets for carotenoid biosynthesis in recombinant strains. *Biomolecules*, 13(12), 1747.

Sun, T., Rao, S., Zhou, X., & Li, L. (2022). Plant carotenoids: recent advances and future perspectives. *Molecular Horticulture*, 2(1), 3.

Sun, T., Tadmor, Y., & Li, L. (2020). Pathways for carotenoid biosynthesis, degradation, and storage. *Plant and food carotenoids: methods and protocols*, 3-23.

Thakuri, M. H., Chettry, U., Pathak, J., & Chrungoo, N. K. (2024). Integration of apocarotenoid and transcriptome profiles of developing stigmas of saffron (*Crocus sativus* L.) reveals a multifaceted control involving PSY2, OR-a, PIF1 and HY5 genes in regulation of apocarotenoid biosynthesis. *South African Journal of Botany*, 167, 467-475.

Thavamany, P. J., Chew, H. L., Sreeramanan, S., Chew, B. L., & Ong, M.-T. (2020). 'Momordica cochinchinensis' Spreng (Gac fruit): An abundant source of nutrient, phytochemicals and its pharmacological activities. *Australian Journal of Crop Science*, 14(12), 1844-1854.

Torres-Montilla, S., & Rodriguez-Concepcion, M. (2021). Making extra room for carotenoids in plant cells: New opportunities for biofortification. *Progress in Lipid Research*, 84, 101128.

Zhou, W., Zhao, S., Xu, M., Niu, Y., Nasier, M., Fan, G., . . . Liao, K. (2021). Identification of key genes controlling carotenoid metabolism during apricot fruit development by integrating metabolic phenotypes and gene expression profiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(32), 9472-9483.