فصلنامه (علمی)

زیست شناسی تکوینی

سال پانزدهم، شماره ۲، بهار ۱۴۰۲ ص. ۷۸-۶۳

مقاله پژوهشی

بررسی اثر تیمارهای تنظیم کننده رشد، قند و اسید آمینه تریپتوفان برروی فعالیت آنزیم تریپتوفان دکربوکسیلاز در پروانش *Catharanthus roseus* (L.) G. Don در شرایط کشت بافت، کشت سوسپانسیونی و کشت مزرعه

علی کاظم زاده حقیقی[۱]، حمید سبحانیان[۲*]، غلامرضا بخشی خانیکی[۳]، محمد علی ابراهیمی[۴]

[۱] دانش آموخته دکتری، گروه زیست شناسی دانشگاه پیام نورتهران، ایران

[۲] استادیار، گروه زیست شناسی دانشگاه پیام نورتهران، ایران

[۳] استاد گروه زیست شناسی دانشگاه پیام نورتهران، ایران

[۴] استاد گروه کشاورزی دانشگاه پیام نورتهران، ایران

[*] (نویسنده مسئول مکاتبات): motif3000@yahoo.com

تاریخ دریافت: فروردین ۱۴۰۰ تاریخ پذیرش: دی ۱۴۰۰

DOI: 10.30495/JDB.2023.700350 https://dorl.net/dor/20.1001.1.2008692.1402.15.2.7.7

چکیده

پروانش *Catharanthus roseuus* مهمترین گونه در سرده وینکا (*Vinca*) ازخانواده خرزهره (*Apocyanaceae*) غنی‌ترین گونه این تیره وحاوی گروه مهم و خاصی از اندول-آلکالوئیدهای است که به مقدار زیاد دارای ارزش دارویی بوده، که در همه بخش‌های گیاه پراکنده‌اند. وجود آلکالوئیدهای ارزشمند در تمام بخش‌های گیاه سبب شده است که، گونه‌های این جنس به عنوان گیاهان دارویی بسیار مهم معرفی و خواص آنها بررسی شود .این مطالعه به منظور بررسی اثر تیمارهای تنظیم کننده رشد بر فعالیت آنزیم تریپتوفان دکربوکسیلاز(TDC) که آنزیمی سیتوزولی و کلیدی در شاهراه تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاه دارویی پروانش است اجرا شد. آزمایش در سه کشت جداگانه، شامل کشت بافت، کشت سوسپانسیونی و کشت مزرعه همراه با تاثیر استفاده هم زمان برخی تنظیم کننده‌های رشد از جمله اکسین (IAA)، نفتالین استیک اسید (NAA)، کینتین (KIN) و ۶-بنزیل آمینو پیورین (BA) در سه غلظت (۰/۱، ۰/۵، ۱/۰ میلی‌گرم در لیتر)، تیمارهای مختلف قند ساکارز، فروکتوز و گلوکز در ۳ غلظت (۲%، ۴% و ۶%) و همچنین اسید آمینه تریپتوفان در غلظت‌های (۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم درلیتر) بر میزان فعالیت آنزیم TDC در سه تکراربصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی در مزرعه موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج اجرا شد. هورمون‌های IAA و NAA به ترتیب در غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۵، باعث افزایش فعالیت آنزیم TDC شد. اما درسیتوکنین ها، KIN و BA در ۱/۰ میلی‌گرم در لیتر، بیشترین اثر را داشته اند. قندهای ساکارز در ۶%، فروکتوز و گلوکز نیز در ۴% بیشترین تاثیر افزایشی را بر فعالیت آنزیم TDC از خود نشان دادند. اسیدآمینه تریپتوفان در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر بیشترین تاثیر و در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر اثر کاهنده بر فعالیت آنزیم TDC از خود نشان داد و این کاهش در برخی موارد در حدود ۴۰ درصد بود. استفاده از روش کشت سوسپانسیونی در بسیاری از موارد نسبت به دو روش دیگر سبب افزایش بیشتر فعالیت آنزیم TDC شد، ولی در کشت مزرعه نیز نسبت به سایر روش‌ها در برخی از تیمارها اثرافزایشی حتی بیشتر از کشت بافت بوده است. براساس نتایج

حاصل از این آزمایش استفاده از روش کشت سوسپانسیونی و کشت مزرعه در بسیاری از موارد نسبت به کشت بافت مزیت نسبی بیشتری دارد.

کلیدواژه‌ها: پروانش، کشت سوسپانسیون سلولی، کشت بافت، کشت مزرعه، آنزیم تریپتوفان دکربوکسیلاز.

مقدمه

آنزیم تریپتوفان دکربوکسیلاز (TDC) یکی از آنزیم‌های کلیدی درمسیربیوسنتز متابولیت‌های ثانویه از جمله ایندول آلکالوئیدها بوده، که بنام مسیر سکوایریدوویید خوانده می‌شود. در بیوسنتز ایندول آلکالوئیدها این آنزیم سبب تبدیل تریپتوفان به تریپتامین شده، که یکی از پیش سازهای اصلی در مسیر بیوسنتزی آلکالوئیدهای منو و دی ترپنی می‌باشد [1][۲]. TDC که بیشتر در سلول‌های اپیدرم پروانش تمرکزدارد در بیوسنتز استریکتوزیدین اولین فراورده این مسیر نقش بسیار مهمی ایفا می‌کند [3][4] که در ادامه منتهی به بیوسنتز آلکالوئیدهای پرارزشی می‌شود. تحقیقات اخیر نشان داده است که اپیدرم ساقه و برگ‌های پروانش وپیچ تلگرافی برگ درشت حاوی مقادیر زیاد آنزیم است، که توان بالقوه‌ای در بیوسنتز ایندول آلکالوئیدهای ارزشمند مثل آجمالیسین، وینکاروبین، سرپانتین، تابرسونین، ویندولین، وین بلاستین و وین کریستین داشته و خصوصیات دارویی، مانند آرام بخشی، کاهش دهنده فشار خون، درمان اسکیزوفرنی و در کموتراپی مورد استفاده قرار می‌گیرند. در مورد آنزیم TDCبایداضافه نمود که وابسته به پیریدوکسال فسفات بوده و در پلاستیدها و سیتوپلاسم و حتی در واکوئل سلول‌های اپیدرمی ردیابی شده است [۵][۱]. یک گروه آنزیم‌های عمل کننده در مراحل اولیه بیوسنتزی آنزیم جرانیول ۱۰-**هیدروکسیلاز** (G-10-H) ودیگری متیل-ترانسفراز (غیراختصاصی) است، که در برگ‌ها و ریشه‌های پروانش یافت شده است [6]. در مسیر موالونات و شکیمیک اسید مجموعه‌ای از آنزیم‌ها بطور پی در پی ایفای نقش می‌کنند، ابتدا آنزیم تلفیق کننده (-codensation enzyme) ۲ مولکول موالونیک اسید را پس از خروج ۲مولکول CO_2 به جرانیول (c10) تبدیل، و سپس جرانیول-۱۰ هیدروکسیلاز آن را به جرانیول هیدروکسید تبدیل کرده، (ژرانیول با فعالیت آنزیم اکسیژناز به hydroxygeraniol-4 تبدیل می‌شود). این آنزیم از میکروزوم‌های دانه رست پروانش جداشده است. از حلقوی شدن ترکیب اخیر اسید لوگانیک تولید و سپس با یک متیل ترانسفراز غیر اختصاصی لوگانین شکل گرفته و با یک گسست بین کربن‌های ۳ و ۴ به سکولوگانین تبدیل می‌شود. در مسیر دوم (مسیرشیکیمیک) کوریسمیت اسید به آنترانیلیت و سپس به ایندول و تریپتوفان تبدیل شده و با فعالیت آنزیم TDC تریپتامین شکل می‌گیرد، که دومین پیش ساز برای بیوسنتز استزیکتوزیدین بوده، که آنزیم شرکت کننده دراین مرحله استریکتوزیدین-سنتاز (S.S) می‌باشد. استریکتوزیدین اولین آلکالوئید ناپایدار ایندولی تولید شده دراین مسیر بوده و معمولاً در پلاستیدها ردیابی شده و در ادامه با بیوسنتز اپی‌کاتنامین و استمادنین مسیر بیوسنتزی با فعالیت آنزیم‌های اکسیدازی متیلاسیونی و اکسینژناسیون برای بیوسنتز کاتنامین، آجمالیسین و سپس اکسیداسیون آن در واکوئل‌ها و بیوسنتز سرپانتین ادامه می‌یابد [۶][۱]. در مسیر دیگر استمادنین به تابرسونین که طی ۶ مرحله آنزیمی به ویندولین تبدیل شده و از تلفیق آن با کاتارانتین اولین اندول-آلکالوئید دی ترپنی وین بلاستین ساخته و با اکسیژناسیون آن وین کریستین بیوسنتز می‌شود [۷][۱].

گیاه پروانش با نام علمی *Catharanthus roseus (L) G.Don.* گیاهی دو لپه، یک ساله با برگ‌های متقابل، جام گل پیوسته بوده، که با نام‌های مختلفی مانند *Madagascar Periwinkle*، *rosea Vinca*، *Lochnera rosea* و *Vinca* شناخته شده است. منشا این گیاه مناطق حاره و گرمسیر مانند جنوب هند، اندونزی و ماداگاسکار بوده که امروزه کشت آن در سراسر دنیا گسترش یافته است. پروانش منبع غنی از آلکالوئیدها بوده که در همه بخش‌های گیاه پراکنده‌اند. محتوای آلکالوئیدهای *C.roseus* در قسمت‌های مختلف آن بسیار متفاوت است و بیشترین مقدار تجمع آلکالوئیدها در پوست ریشه و بین ۰/۱۵ تا ۱/۳۴ درصد وزن خشک اندام می‌باشد [۸]. وجود آلکالوئیدهای ارزشمند در تمام بخش‌های گیاه سبب شده است که به عنوان یک گیاه دارویی بسیار مهم معرفی و خواص آن بررسی شود [۹]. آلکالوئیدهای دایمری وین بلاستین و وین کریستین دو آلکالوئید دایمری مهم پروانش هستند که در ساقه و برگ‌ها ساخته و ذخیره

می‌شوند. هر دو این آلکالوئیدها اثر آنتی نیوپلازی (ضد تومور) داشته و بیش از ۴۰ سال است که در شیمی درمانی برخی سرطان‌ها استفاده می‌شوند [۱۰][۱۱]. بذر پروانش نیز دارای آلکالوئیدهای دایمری وینگرامینه و متیل وینگرامینه است که به طور اختصاصی دربذرتولید ساخته و ذخیره می‌شوند [۱۲][۱۱]. برخی دیگر از آلکالوئیدها نظیر، لئوروزین، کاتارانتین، تتراهایدروآلستونین، لاکنریسین، ویندولین و ویندولیسین در پیچ تلگرافی برگ درشت می‌باشند [۱۱]. در مورد محل بیوسنتز و ذخیره سازی آلکالوئیدها، واکوئل سلول‌های گیاهی نقش اصلی را در ذخیره سازی این گروه از متابولیت‌های ثانویه ایفا می‌کنند، همچنین واکوئل‌ها اسیدهای آلی، قندها، سایر متابولیت‌های ثانویه، کاتیون‌های نظیر سدیم و کلسیم را در خود نگهداری می‌کنند [۱۳][۱۴][۶].

جذب آجمالیسین اگرچه حساس به مس(Cu) است اما $NaNO_3$ هیچ تاثیری بر جذب آن ندارد. مطالعات نشان دادند جذب دو مرحله‌ای ایندول آلکالوئیدها ناشی از متابولیسم ویژه‌ای نیست بلکه تجمع و ذخیره ایندول آلکالوئیدها تنها ناشی از تله یونی آلکالوئیدها به وسیله pH پایین لومن واکوئل می‌باشد [۹][۱۰]. به نظر می‌رسد که جذب ویندولین به انرژی نیاز دارد، ولی احتمالاً تجمع آجمالیسین ناشی از ایجاد کمپلکس با ترکیبات آلی و فنلی است. ذخایر فرعی دیگر نظیر تابرسونین به وسیله انتشار ساده از عرض تونوپلاست عبور می‌کنند [۱۵][۱۴][۱۱]. در کل، با توجه به مقادیر بسیار بالای از آلکالوئیدها و به دلیل اهمیت این ترکیبات از نظر دارویی این مطالعه با هدف بررسی اثر تیمارهای تنظیم کننده رشد، بر فعالیت آنزیم تریپتوفان دکربوکسیلاز TDC گیاه پروانش در شرایط کشت بافت، کشت سلولی و کشت مزرعه انجام گرفته است.

مواد و روش‌ها

بذر پروانش از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج بخش بیوتکنولوژی تهیه شد. برای مطالعات کشت بافت و کشت سلول محیط‌های کشت غذای خاص مورد استفاده قرار گرفت. این محیط‌ها دارای مواد غذایی لازم برای ادامه رشد بافت‌ها و سلول‌ها بوده، چون نیاز غذایی بافت‌ها و اندام‌های گونه‌های مختلف گیاهی با یکدیگر متفاوت است، در این پژوهش از محیط‌های کشت مختلف استفاده شد. در ضمن محیط‌های کشت مختلف دارای مقادیر متفاوتی از ترکیبات معدنی و ترکیبات آلی است.

کشت بافت پروانش

ابتدا برای ضد عفونی نمودن، بذور پروانش ۱۵ دقیقه در اتانول ۷۰ درصد و ۳۰ دقیقه در محلول هیپوکلریت کلسیم- سدیم ۲۰ درصد و سه بار با آب مقطر شستشو شدند، بذرها به دلیل تعدد شیارهای سطحی پوسته دانه بطور کامل ضد عفونی نشده [۱۶][۹]، به همین دلیل جهت جلوگیری از آلودگی‌های میکروبی از محتوی کپسول آموکسی سیلین ۲۵۰ میلی‌گرمی و کپسول آمپی سیلین ۲۵۰ میلی گرمی در ۲۵۰ میلی لیتر آب مقطر استفاده شد، و سپس بذور به محیط کشت منتقل شدند.

ضد عفونی نمودن قطعات گیاه پروانش

ابتدا برگ‌هاو ساقه‌های مسن و جوان با آب و صابون شستشو و ۱۰ دقیقه در محلول ۲۰ درصد تجاری آب ژاول قرار گرفتند. برگ‌ها و ساقه‌ها سه بار با آب مقطر ضد عفونی شستشو شدند، سپس قطعات را در محلول کلرید جیوه ۰/۱۵درصد به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده، و در آخرین مرحله سه بار با آب مقطر ضد عفونی شستشو شدند. تفکیک قطعات برگ و ساقه پس از ضد عفونی کردن انجام شد. این قطعات به محیط کشت پایه مختلف با غلظت‌های متفاوت تنظیم کننده‌های رشد منتقل شدند [۱۶].

روش‌های کشت سلول و بافت:

برای کشت سوسپانسیونی از محیط‌های پایه MS و LS بدون آگار و برای کشت بافت از محیط پایه B5 استفاده شد [۹][۱۴][۱۷].

الف) روش کشت سوسپانسیون سلولی، یک مرحله‌ای:

در این روش تنها از محیط کشت پایه MS استفاده شد و در ضمن واکشت‌های ۴،۲-D از محیط حذف نشد. در تمام دوره کشت سوسپانسیونی سلول در ارلن‌های ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط بوده و ارلن‌ها روی شیکر افقی با سرعت rpm ۱۳۰ قرار داشتند [۱۷][۱۸].

ب) روش کشت سوسپانسیون سلولی، دو مرحله‌ای: در این روش ابتدا کال‌ها را به محیط کشت تعلیقی MS دارای تنظیم کننده رشد D-۴،۲ و کینتین هر یک با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر منتقل نموده و پس از یک ماه ۱۰ میلی لیتراز سلول‌های جدا شده را به ۹۰ میلی لیتر محیط کشت تولید آلکالوئید انتقال داده شدند. محیط تولید الکالوئید توسط zenk و همکارانش ۱۹۸۴معرفی شده بود. محیط LS دارای ۵۰گرم در لیتر ساکارز، ۱/۱۲۵ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۱۷۵ میلی‌گرم در لیتر IAA بود [۶][۹][۱۶].

جهت کشت سلولی از برگ‌های پروانش، کال‌های ۳۰ روزه تهیه و پس از۲۰ روز نگهداری در محیط‌های MS بدون آگار و فاقد تنظیم کننده رشد، قند و تریپتوفان، به عنوان محیط شاهد رشد یافته، و سپس با افزودن تنظیم کننده‌های رشد ذکر شده در پژوهش برای سنجش آلکالوئیدهای آجمالیسین، سرپانتین و آلکالوئید کل در وزن خشک گیاه، در طی ۴ دوره زمانی۱۰ روزه مورد استفاده قرار گرفتند [۱۹][۱۸][۶].

کشت مزرعه: برای این منظور ۲۷ کرت یک مترمربعی را انتخاب و در اواسط بهار مبادرت به کاشت بذرها به مقدار دوگرم در هر کرت شد و کرت‌ها بطور مرتب و روزانه آبیاری شدند. . هورمون‌های اکسین و سیتوکنین در سه غلظت (۰/۵/۱، ۰/۰ و۱/۰ میلی‌گرم در لیتر) استفاده شدند. گیاهان در سه تکرار بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی در مزرعه موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج درسال ۱۳۹۸ اجرا شد. پس از دو برگی شدن گیاهان، تیمار تنظیم کننده رشد با پاشیدن آنها انجام شد، به این ترتیب که برای هر کرت معین حدود ۲۰ میلی لیتر از محلول مورد آزمایش روی گیاه اسپری شد. دو برداشت پس از یک ماه تنظیم کننده رشد پاشی انجام شد. برداشت اول در هفته دوم و برداشت دوم در شروع مرحله گلدهی و سپس ۲ نمونه برداری نیز پس از گلدهی با فواصل زمانی ۱۴ روزه از گیاهان انجام شد. پس از برداشت، گیاهان در دمای معمولی اتاق ($۲۵^{o}C$) خشک شده و سپس آلکالوئیدها استخراج، و سنجش شدند [۲۰][۲۱][10].

روش اجرای آزمایش

به منظور بررسی تاثیر تنظیم کننده‌های رشد مورد مطالعه در این تحقیق بر میزان ترکیبات مورد نظر، ابتدا تیمارها به طور دقیق در کرت‌های مورد تحقیق اعمال شد. پس از طی مرحله رشد گیاه، عملیات عصاره گیری انجام شد و ترکیبات مورد نظر با استفاده از روش اسپکتروفلوئوریمتری مورد سنجش قرار گرفت [۲۲][۲۳][۲۴].

روش استخراج و آماده سازی مخلوط واکنش آنزیمTDC

اساس روش بر سنجش فلوئوریمتری مقدار تریپتامین استوار است. حلال در این روش مخلوط اتیل استات با توجه به وزن ماده تر اولیه مصرف می‌شود. سنجش مقدار تریپتامین در مخلوط واکنش در مدت زمان ۲۰ الی ۳۰ دقیقه از شروع واکنش انجام شد. فعالیت این آنزیم به کوآنزیم پیرودکسال فسفات (ویتامین B6) وابسته بوده، که فعالیت غیر برگشتی و یک طرفه آنزیم را کاتالیز می‌کند. دراین روش افزایش فعالیت آنزیم با افزایش میزان تریپتامین در مخلوط واکنش نشان داده می‌شود. سرعت فعالیت آنزیم با روش‌های مختلف از جمله اتورادیوگرافی وHPLC که به ترتیب دارای خطرات جانبی ناشی ازتابش پرتوهای مضر، وهزینه بسیار بالا بوده اندازه‌گیری می‌شود، اما روش اسپکتروفلوئوریمتری بسیارسریع‌تر، ارزانتر و به همان اندازه دقیق می‌باشد [۲۵][۲۲].

ابتدا با فیلتر کردن نمونه‌های کشت اولیه سلول یا اندام‌های پروانش حدوداً دوگرم ازماده تر، جدا و با روش استخراجی [۲۶][۲۵] آماده سازی شدند. برگ ها، ساقه‌های جوان و مسن از پروانش و پیچ تلگرافی به طور جداگانه با آب مقطر سرد دو بار شستشو و به قطعات کوچک تقسیم کرده، سپس دوگرم از وزن تر به دست آمده با دو حجم پلی وینیل الکل و پلی پیرولیدون، ۲ میلی لیتر بافر فسفات ۰/۱مولار، ۷/۵pH حاوی۵ میلی مول مرکاپتواتانول و۵ میلی مول تیواوره و ۱ میلی مولار EDTA به مدت ۱۰ دقیقه تکان داده و سپس بمدت ۳۰ دقیقه درrpm ۱۰۰۰۰سانتریفیوژ نموده، بخش روشناور بعنوان منبع آنزیم تریپتوفان دکربوکسیلاز استفاده شد[۲۷][۲۲].

مخلوط واکنش شامل:L -تریپتوفان، تریپتامین هیدروکلراید و پیریدوکسال فسفات بود. ابتدا محلول‌های استاندارد تریپتامین در غلظت‌های ۰/۵ الی ۱۰ میکرومول تهیه و با اسپکتروفلوریمتری در طول موج‌های ۲۸۰ و ۳۵۰ نانومتر به ترتیب طول موج تحریکλ_{Ex} و طول موج خاموشی λ_{Em} لومینانس تریپتامین درحلال آب توسط دستگاه اسپکتروفلوئوریمتر مدل (Perkin-Elmer.Lsa-B5) با فاکتور تثبیت ۱/۰۰۰ قرائت شده و نمودار

استاندارد به دست آمد. درهر سنجش سه و نیم میلی‌لیتر از محلول استاندارد در مخزن A وارد و۰/۵۷ الی ۱۱/۴ و میکرومول محلول تریپتامین تهیه شده از آب سه بار تقطیر شده آماده، و در مخزن B ، بافر فسفات سدیم ۰/۱ مولار با, ۸/۵pH، که حاوی ۵ میلی لیتر محلول ۵میلی مول **بتا-مرکاپتواتانول** و گلیسرول۱۰% بود اضافه شد (لازم به ذکر است بلانک فاقد تریپتامین است). سپس مخلوط L-تریپتوفان و محلول فاز آبی تریپتامین را با غلظت‌های ۲ الی ۴۰ نانومول با ۱ میلی لیترآب سه بار تقطیر شده و۱ سی سی بافر فسفات سدیم یک دهم مولار با pH ۸/۵ که حاوی ۱ میلی مول تریپتوفان و ۱ میلی مول پیردوکسال فسفات، با افزودن سود ۴ نرمال به pH معادل ۱۱ رسانده و سپس۴ میلی لیترازمخلوط بدست آمده را با ۱۰ میلی لیتر اتیل استات مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه بهم زده تا فاز بالای جداسازی و برای اسپکتروفلوئوریمتری آماده شد. (تمام مراحل استخراج باید درحمام یخ در دمای بین ۰ تا ۴ درجه سانتی گراد انجام شود) [۲۸][۲۹][۲۴].

تست کاتالیتیکی آنزیم TDC [۲۴]

تست کاتالیتیکی آنزیم بر اساس۲۵ G-sephadex تیواوره ثبت گردید.۱ میلی لیتر از مخلوط آنزیم را با ۱ میلی لیتر بافر فسفات سدیم ۰/۱ مولار با ۸/۵pH حاوی ۳/۵ میلی مول مرکاپتواتانول، ۱ میلی مول تریپتوفان، ۱ میلی مولار و ۲۰ میکروگرم از بخش هموژن جدا شده بمدت ۴۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد درحالت لرزش مداوم قرارداده و سرعت فعالیت آنزیم را در بازه‌های زمانی۵ الی ۴۰ دقیقه پس از اضافه نمودن ۲ میلی لیتر سود ۴ نرمال اندازه گیری و نتایج ثبت شد. سپس pH نمونه را با افزودن سود به ۱۱ رسانده، نمونه را با ۳/۵ میلی لیتر اتیل استات مخلوط، فاز اتیل استات را برای سنجش فلوئورسانس توسط دستگاه اسپکتروفلوئوریمتر درطول موج‌های ۲۸۰ و ۳۵۰ نانومتر لومینانس تریپتامین ثبت ونمودارهای مربوطه رسم شدند. (۰/۴ میکرولیتر تریپتامین با غلظت ۴ نانومول به صورت محلول در بازه‌های زمانی مشخص اضافه شد). اندازه گیری مقدار تریپتامین بر **اساس شیب** خط برگشت (رگرسیون) صورت گرفت، و رسوب به دست آمده به ۴۰میلی لیتر سولفات آمونیوم + تیواوره از ستون عبور داده و برای تعیین سرعت فعالیت آنزیم TDC در شرایط بدون نمک درغلظت‌های پنج درصد پلی‌اتیلن گلیکول استفاده شد. نتایج بین گروهی با استفاده از آزمون ANOVA و تست‌های تعقیبی شف درسطح احتمال ۱٪ مورد سنجش و مقایسه با هم قرار گرفت [۳۰][۳۱][۳۲][۲۴].

نتایج

بررسی نتایج حاصل از کشت اندام‌های مختلف پروانش نشان داد که بین میزان فعالیت آنزیم در این اندام‌ها اختلاف وجود دارد. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت NAA و IAA از میزان فعالیت آنزیم کاسته شد، به گونه‌ای که در غلظت‌های ۰/۱ و ۱ میلی‌گرم در لیتر تنظیم کننده رشدIAA به ترتیب بیشترین و کمترین و برای NAA غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بیشترین میزان فعالیت آنزیم مشاهده شد (نمودار ۱ و۲). در سیتوکنین، KIN وBA هردو در غلظت ۱/۰ میلی‌گرم در لیتر در تمامی محیط‌های کشت افزایش میزان فعالیت آنزیم دیده شد، اما این افزایش در محیط سوسپانسیون دومرحله‌ای محسوس تر بود (نمودار ۳ و ۴). در بررسی اثر متقابل هورمون مصرفی در اندام‌های مختلف بر میزان فعالیت آنزیم مشاهده شد، که استفاده از برگ مسن پروانش بیشترین و استفاده از ساقه جوان کمترین تغییر در فعالیت آنزیم را ازخود در کشت بافت نشان داد. کشت سوسپانسیون دو مرحله‌ای عملکرد بهتری نسبت به سایر محیط‌ها از خود نشان داد. بررسی‌ها نشان داد اثر متقابل اکسین‌ها در این تحقیق با افزایش تعداد روز **استفاده از تیمارها تا** روزبیستم نسبت به شاهد افزایش سرعت فعالیت آنزیم دیده شد، اما از روز۲۰ام به بعد در هورمون‌های IAA و NAA با کاهش محسوس سرعت فعالیت آنزیمTDC روبرو شد، این کاهش در تیمارهای سیتوکنینی دیده نشد.(نمودار ۱)

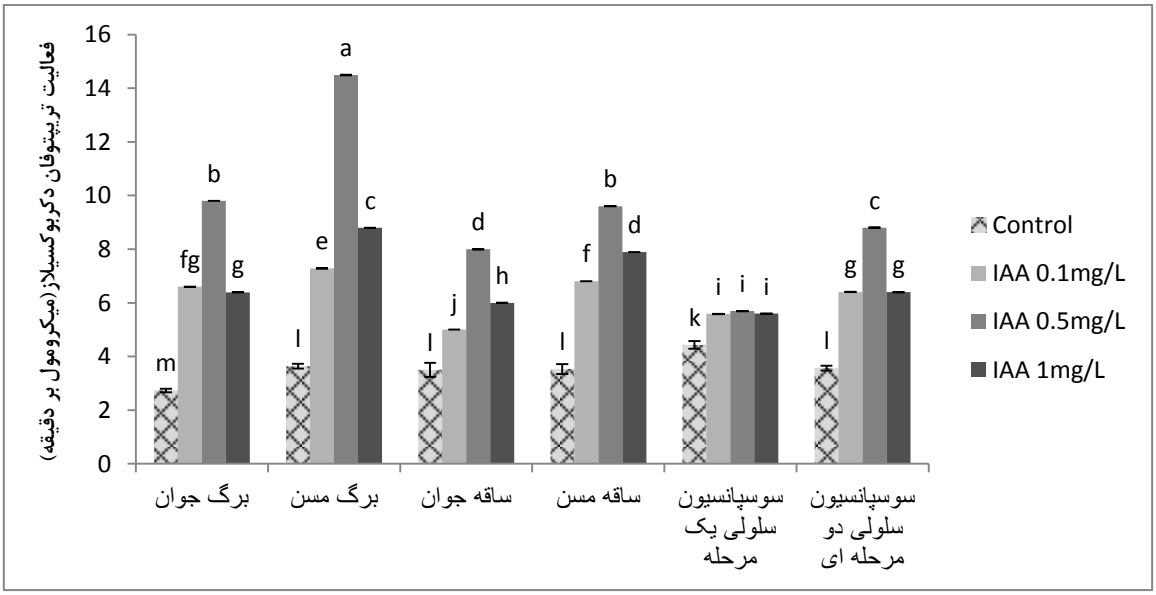
بررسی تاثیر تنظیم کنندهای رشد بر روی فعالیت آنزیم TDC **در گیاه پروانش**: نتایج حاصل نشان داد که استفاده از روش‌های مختلف کشت بافت، سوسپانسیونی و مزرعه باعث تغییر در سرعت فعالیت آنزیم TDC شده، به‌گونه‌ای که استفاده از کشت سوسپانسیونی همراه با استفاده از هورمون‌های مورد مطالعه در این تحقیق بیشترین تاثیر را نسبت به دو روش دیگر کشت از خود برای افزایش سرعت عملکرد آنزیم TDC نشان داد. در بررسی اثر متقابل سیتوکنین‌ها مورد مطالعه در این تحقیق

نیز مشاهده شد که با افزایش تعداد روز استفاده از روز ۲۰ الی ۴۰ روز نسبت به شاهد افزایش سرعت عملکرد دیده شد، **اما** از روز بیستم به بعد در اکسین‌ها با کاهش محسوس سرعت فعالیت آنزیم TDC مواجه شدیم (نمودار ۴). بررسی‌ها نشان داد که استفاده از BA **و** KIN درغلظت ۱/۰ میلی‌گرم در لیتربیشترین تاثیر را بر افزایش سرعت آنزیم از خود نشان دادند (نمودار ۴) (نمودار ۳)، در مقابل استفاده از IAA کمترین تاثیر افزایشی بر سرعت آنزیم را از خود نشان داد. در بررسی مناسب‌ترین غلظت مورد استفاده برای اکسین‌ها، IAA **و** NAA به ترتیب **۰/۱ و ۰/۵** میلی‌گرم در لیتر بود (نمودار ۵). همچنین بررسی نتایج حاصل از تاثیر انواع تنظیم کننده‌های رشد و روش‌های مختلف کشت نشان داد که به ترتیب استفاده از کشت سوسپانسیونی و مزرعه همراه با استفاده از هورمون‌های مورد مطالعه در این پژوهش بیشترین تاثیر را نسبت به روش کشت بافت از خود بر سرعت فعالیت آنزیم تریپتوفان دکربوکسیلاز نشان داده است (نمودار ۵). بررسی جداول بدست آمده از انواع کشت و اندام‌های متفاوت گیاه پروانش نشان داد که، برگ‌های مسن پروانش در کشت بافت و کشت سلولی دو مرحله‌ای بهترین عملکرد را در تاثیر پذیری از تنظیم کننده‌های رشد بر روی سرعت فعالیت آنزیم TDC از خود نشان دادند. همچنین نتایج حاصل از مقایسه همه گروه‌های کشت نشان داد که اختلاف معنی داری در میزان فعالیت آنزیم تحت تاثیر هورمون‌های گروه اکسین در کشت مزرعه نسبت به سایر گروه‌ها وجود ندارد (نمودار ۲).

جدول ۱: بررسی نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های مربوط به تاثیر هورمون IAA بر میزان فعالیت آنزیم تریپتوفان دکربوکسیلاز (TDC) در اندام‌های پروانش کشت بافت و کشت سوسپانسیونی ۱ و ۲ مرحله‌ای

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
نوع بافت	۵	۱۵/۸۸**
IAA	۳	۱۰۳/۰۱**
نوع بافت *IAA	۱۵	۵/۶۶**
خطا	۴۸	۰/۰۱۸

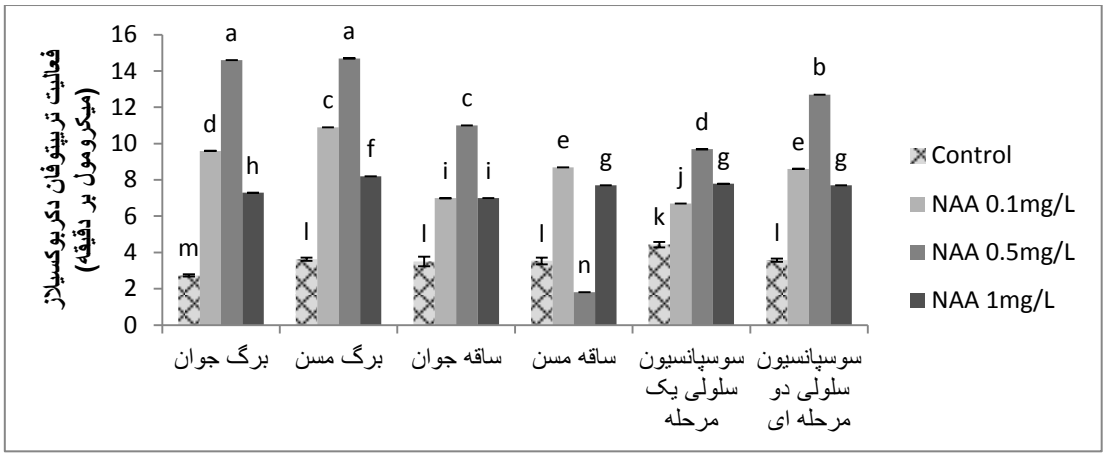
***معنی داری در طح ۰/۰۵ **معنی داری در سطح ۰/۰۱**



نمودار ۱: مقایسه نتایج حاصل از تاثیر هورمون IAA بر میزان فعالیت آنزیم تریپتوفان دکربوکسیلاز (TDC) در اندام‌های پروانش کشت بافت و کشت سلولی ۱ و ۲ مرحله‌ای.

جدول ۲: بررسی نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های مربوط به تاثیر هورمون NAA بر میزان فعالیت آنزیم تریپتوفان دکربوکسیلاز (TDC) در اندام‌های پروانش کشت بافت و کشت سوسپانسیونی ۱ و ۲ مرحله‌ای

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
نوع بافت	۵	۲۲/۵۶**
NAA	۳	۱۶۲/۷۷**
نوع بافت *NAA	۱۵	۱۸/۴۹**
خطا	۴۸	۰/۰۱۸

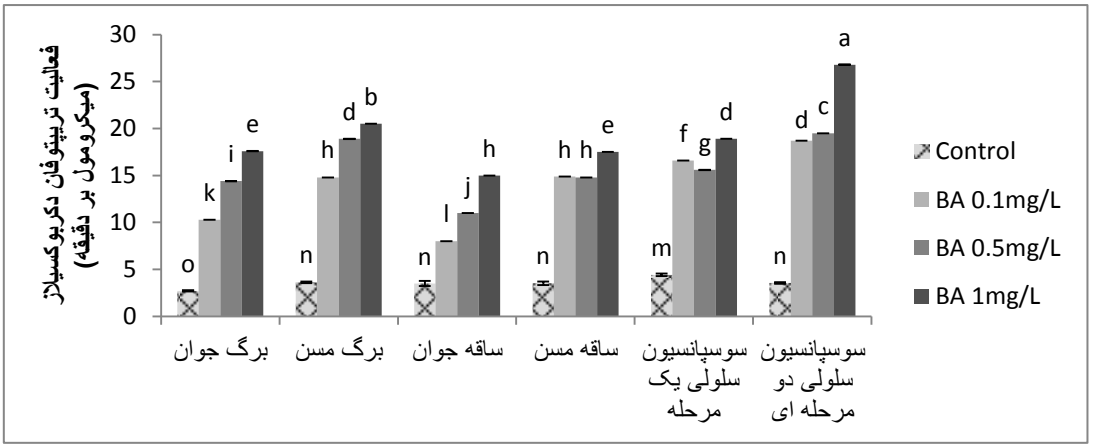


نمودار ۲: مقایسه نتایج حاصل از تاثیر هورمون NAA بر میزان فعالیت آنزیم تریپتوفان دکربوکسیلاز (TDC) در اندام‌های پروانش کشت بافت و کشت سلولی ۱ و ۲ مرحله‌ای.

جدول ۳: بررسی نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های مربوط به تاثیر هورمون BA بر میزان فعالیت آنزیم تریپتوفان دکربوکسیلاز (TDC) در اندام‌های پروانش کشت بافت و کشت سوسپانسیونی ۱ و ۲ مرحله‌ای

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
نوع بافت	۵	۸۶/۸۵**
BA	۳	۸۲۶/۲۱**
نوع بافت *BA	۱۵	۱۳/۶۱**
خطا	۴۸	۰/۰۱۸

*معنی داری در سطح ۰/۰۵ **معنی داری در سطح ۰/۰۱

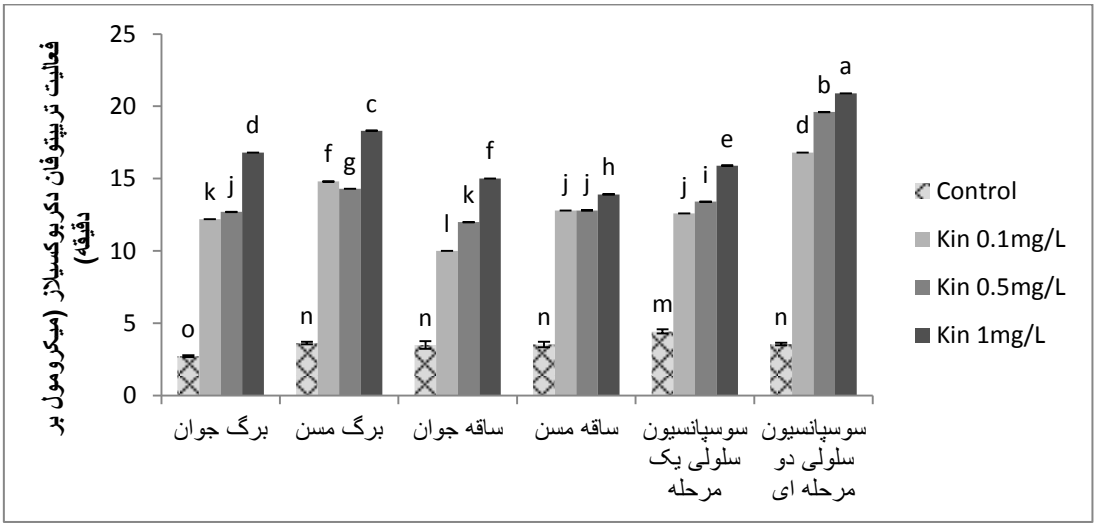


نمودار۳: مقایسه نتایج حاصل از تاثیر هورمون BA بر میزان فعالیت آنزیم تریپتوفان دکربوکسیلاز (TDC) در اندام‌های پروانش کشت بافت و کشت سلولی ۱ و ۲ مرحله‌ای.

جدول ۴: بررسی نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های مربوط به تاثیر هورمون KIN بر میزان فعالیت آنزیم تریپتوفان دکربوکسیلاز (TDC) در اندام‌های پروانش کشت بافت و کشت سوسپانسیونی ۱ و ۲ مرحله ای

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
نوع بافت	۵	۴۰/۵۳**
Kin	۳	۶۰۱/۰۳**
نوع بافت *Kin	۱۵	۶/۲۸**
خطا	۴۸	۰/۰۱۸

*معنی داری در سطح ۰/۰۵ **معنی داری در سطح ۰/۰۱

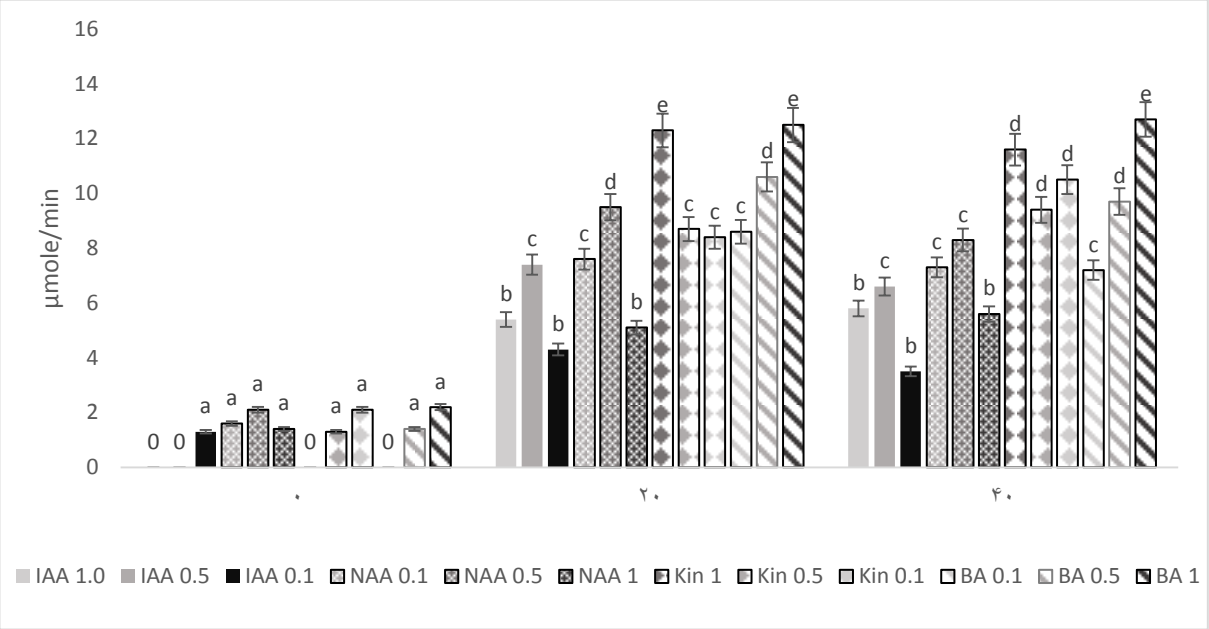


نمودار ۴: مقایسه نتایج حاصل از تاثیر هورمون KIN بر میزان فعالیت آنزیم تریپتوفان دکربوکسیلاز (TDC) در اندام‌های پروانش کشت بافت و کشت سلولی ۱ و ۲ مرحله‌ای.

بررسی تاثیر قندها بر روی فعالیت آنزیم TDC در گیاه پروانش: در بررسی اثر قند ساکارز در غلظت‌های مختلف نتایج بدست آمده نشان داد که غلظت ۶% قند ساکارز بیشترین اثر افزایشی در فعالیت (TDC) در محیط کشت سلولی دو مرحله‌ای داشته، (جدول و نمودار ۶) و همچنین کمترین اثر قند ساکارز در تمامی غلظت‌ها در کشت بافت برگ‌های جوان پروانش بود. همچنین مقایسه آنالیز واریانس نتایج بدست آمده از غلظت‌های مختلف قندهای گلوکز و فروکتوز نشان داد به ترتیب قندهای گلوکز (جدول و نمودار ۷) و فروکتوز (جدول و نمودار ۸) در غلظت ۴% در محیط کشت سلولی دومرحله‌ای بیشترین تاثیر را بر روی فعالیت آنزیم داشته است. همچنین برگ مسن پروانش بیشترین افزایش فعالیت آنزیم TDC در هر دو مدل کشت بافت و سوسپانسیونی را نشان داده است. در استفاده از تیمارهای قند نتایج نشان داد که استفاده از غلظت ۶% قند ساکارز و ۴% قندهای گلوکز و فروکتوز بیشترین تاثیر بر افزایش فعالیت آنزیم در همه نمونه‌های گیاهی و انواع کشت بافت و سلول از خود نشان داد. همچنین در بررسی اثر متقابل قند مورد استفاده در اندام‌های مختلف بر میزان فعالیت آنزیم مشاهده شد، که استفاده از کشت بافت برگ مسن بیشترین و کشت بافت ساقه جوان پروانش کمترین تاثیر را بر سرعت فعالیت آنزیم دارد. همچنین کشت سوسپانسیونی دو مرحله‌ای نتایج بهتری از خود نشان داد (جدول و نمودار ۷).

بررسی تاثیر اسید آمینه تریپتوفان بر روی فعالیت آنزیم TDC در گیاه پروانش: بررسی و مقایسه آنالیز واریانس در غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم درلیتر اسید آمینه تریپتوفان نشان داد که غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اسید آمینه تریپتوفان اثر افزایشی معنی دار در سطح ۱% بر روی فعالیت آنزیم تریپتوفان دکربوکسیلاز TDC نشان داده، که این روند در تمامی اندام‌های

کشت شده و در تمامی محیط‌های کشت پروانش مشاهده شد. روند افزایشی بویژه در محیط کشت سوسپانسیون سلولی دو مرحله‌ای (در سطح ۱% آماری) افزایش بیشتری نسبت به سایر محیط‌های کشت پروانش را نشان داد. همچنین مقایسه نتایج مشخص نمود که غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اثری بسیار کمتر و حتی کاهنده در فعالیت آنزیم داشته است (جدول و نمودار ۹). بررسی جداول بدست آمده از انواع کشت و اندام‌های متفاوت گیاه پروانش نشان داد که، برگ‌های مسن پروانش در کشت بافت و کشت سلولی دو مرحله‌ای بهترین عملکرد را در تاثیر تغییرات غلظت اسید آمینه تریپتوفان بر روی سرعت فعالیت آنزیم TDC از خود نشان داد. همچنین در بررسی میانگین نتایج حاصل از بررسی تاثیر اسید آمینه تریپتوفان بر میزان فعالیت آنزیم در نوع اندام گیاه پروانش مشاهده شد که بیشترین و کمترین تاثیر پذیری از تیمارها در میزان فعالیت آنزیم به ترتیب در برگ‌های مسن و ساقه جوان پروانش نسبت به سایر اندام‌های پروانش مشاهده شد. در تمامی مدل‌های کشت افزایش غلظت تریپتوفان باعث کاهش تا ۴۰% فعالیت آنزیم در گروه‌های دریافت کننده اسید آمینه شده است. همچنین افزایش غلظت تریپتوفان سبب کاهش فعالیت آنزیم شده، وکشت سوسپانسیون سلولی بیشترین تاثیر پذیری را ازخود نشان داده است.

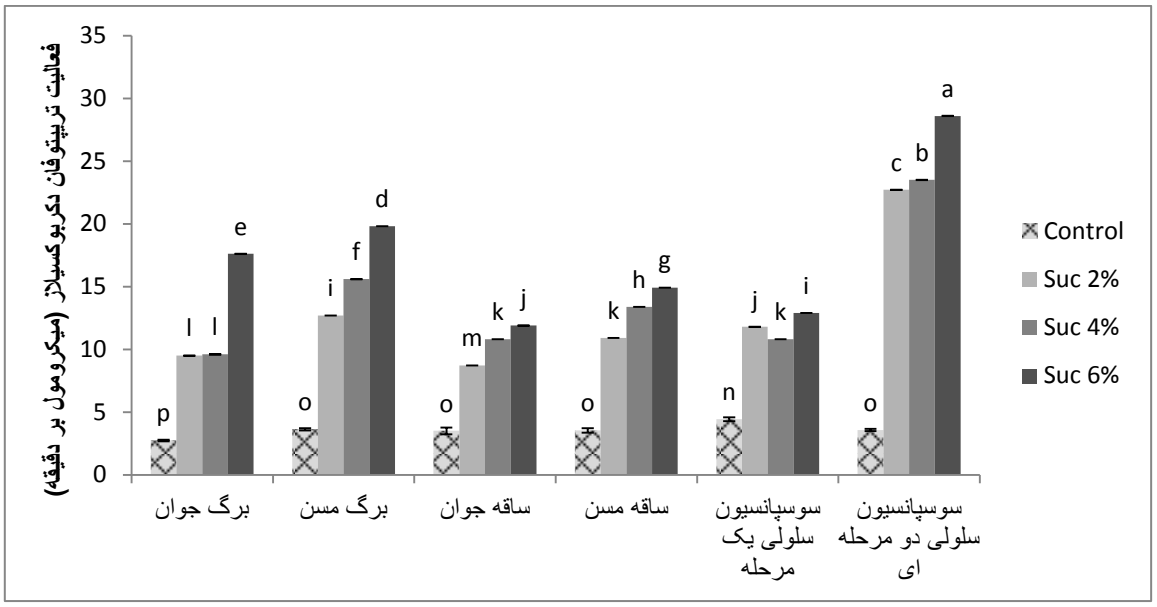


نمودار ۵: مقایسه نتایج حاصل از تاثیر انواع تنظیم کننده‌های رشد بر سرعت فعالیت آنزیم تریپتوفان دکربوکسیلاز TDC گیاه پروانش در کشت بافت، کشت سوسپانسیونی و کشت مزرعه.

جدول ۶: بررسی نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های مربوط به تاثیر قند ساکارز بر میزان فعالیت آنزیم تریپتوفان دکربوکسیلاز (TDC) در اندام‌های پروانش کشت بافت و کشت سوسپانسیونی ۱ و ۲ مرحله‌ای

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
نوع بافت	۵	۱۹۱/۰۶**
SUC	۳	۶۴۱/۸**
نوع بافت *SUC	۱۵	۲۶/۸۲**
خطا	۴۸	۰/۰۱۸

*معنی داری در سطح ۰/۰۵ **معنی داری در سطح ۰/۰۱

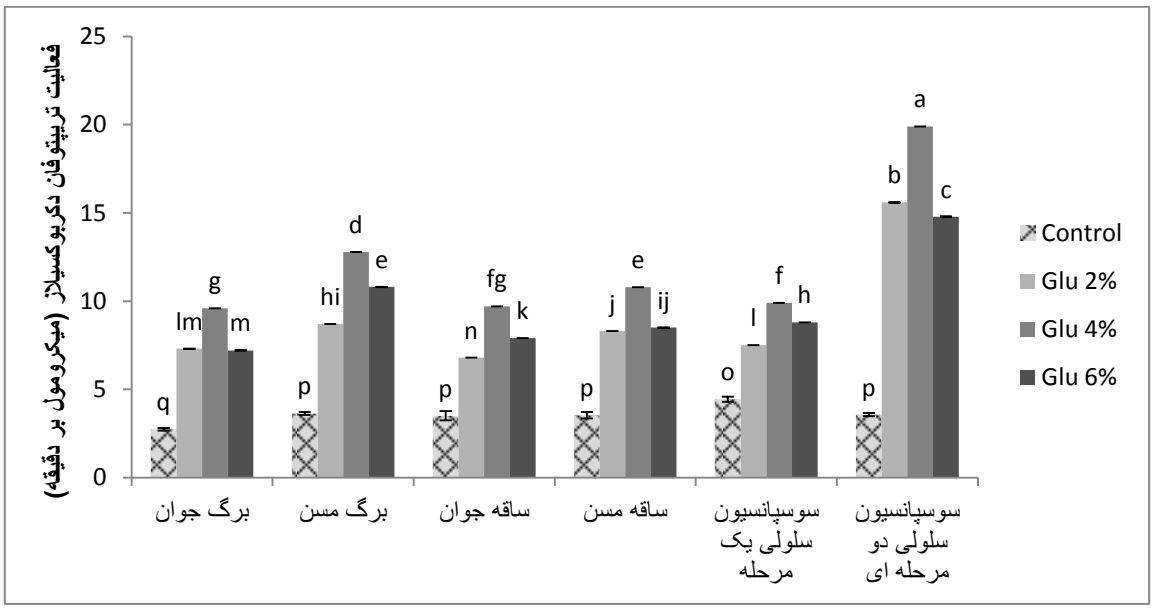


نمودار ۶: مقایسه نتایج حاصل از تاثیر قند ساکارز بر میزان فعالیت آنزیم تریپتوفان دکربوکسیلاز (TDC) در اندام‌های پروانش در کشت بافت و کشت سلولی ۱ و ۲ مرحله‌ای.

جدول ۷: بررسی نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های مربوط به تاثیر قند گلوکز بر میزان فعالیت آنزیم تریپتوفان دکربوکسیلاز (TDC) در اندام‌های پروانش کشت بافت و کشت سوسپانسیونی ۱ و ۲ مرحله‌ای

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
نوع بافت	۵	۷۵/۶۹**
Glu	۳	۲۳۳/۹۲**
نوع بافت *Glu	۱۵	۹/۵۸**
خطا	۴۸	۰/۰۱۸

*معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ **معنی داری در سطح ۰/۰۱

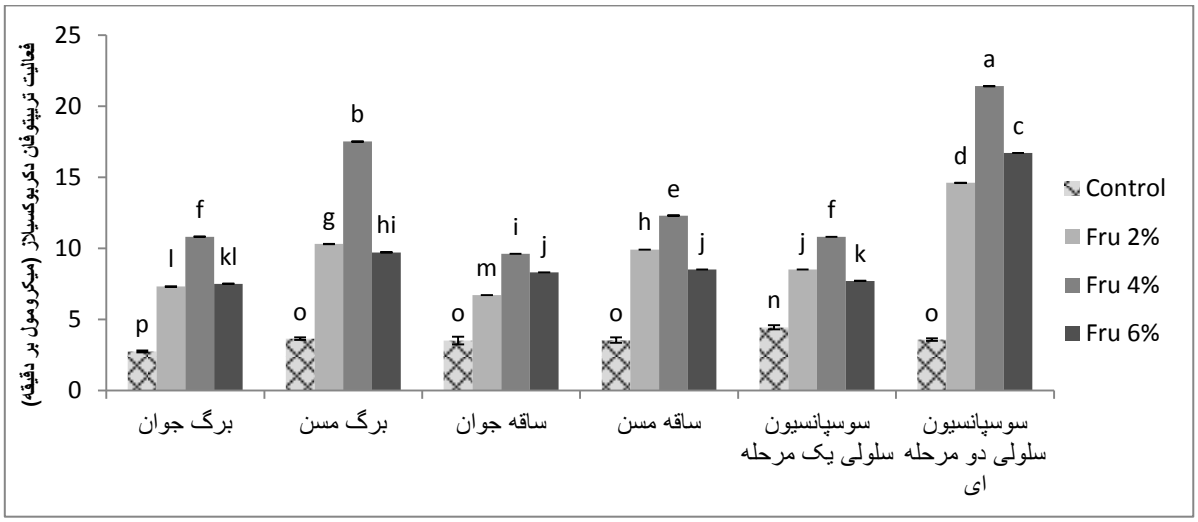


نمودار ۷: مقایسه نتایج حاصل از تاثیر قند گلوکز بر میزان فعالیت آنزیم تریپتوفان دکربوکسیلاز (TDC) در اندام‌های پروانش کشت بافت و کشت سلولی ۱ و ۲ مرحله‌ای.

جدول ۸: بررسی نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های مربوط به تاثیر قند فروکتوز بر میزان فعالیت آنزیم تریپتوفان دکربوکسیلاز (TDC) در اندام‌های پروانش کشت بافت و کشت سوسپانسیونی ۱ و ۲ مرحله‌ای

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
نوع بافت	۵	۸۶/۹۷**
Fru	۳	۳۱۶/۰۶**
نوع بافت *Fru	۱۵	۱۳/۴۹**
خطا	۴۸	۰/۰۱۸

*معنی داری در سطح ۰/۰۵ **معنی داری در سطح ۰/۰۱

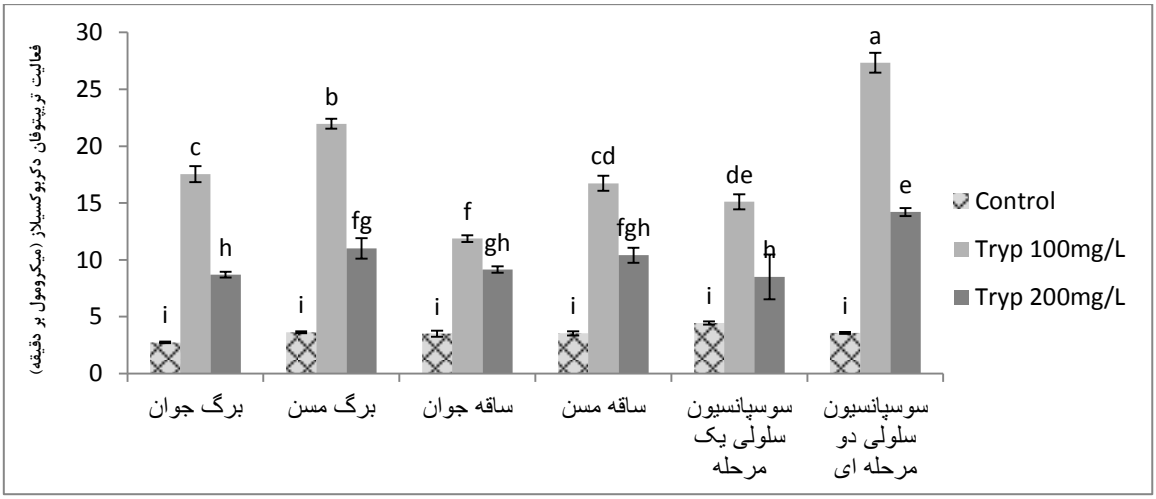


نمودار ۸: مقایسه نتایج حاصل از تاثیر قند فروکتوز بر میزان فعالیت آنزیم تریپتوفان دکربوکسیلاز (TDC) در اندام‌های پروانش کشت بافت و کشت سلولی ۱ و ۲ مرحله‌ای.

جدول ۹: بررسی نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های مربوط به تاثیر اسید آمینه تریپتوفان بر میزان فعالیت آنزیم تریپتوفان دکربوکسیلاز (TDC) در اندام‌های پروانش کشت بافت و کشت سوسپانسیونی ۱ و ۲ مرحله‌ای

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
نوع بافت	۵	۵۵/۰۳**
Tryp	۲	۹۹۵/۸۱**
نوع بافت *Tryp	۱۰	۲۴/۶۶**
خطا	۳۶	۱/۳۲

*معنی داری در سطح ۰/۰۵ **معنی داری در سطح ۰/۰۱



نمودار ۹: مقایسه نتایج حاصل از تاثیر اسید آمینه تریپتوفان بر میزان فعالیت آنزیم تریپتوفان دکربوکسیلاز (TDC) در اندام‌های پروانش کشت بافت و کشت سلولی ۱ و ۲ مرحله‌ای.

بحث

به طور کلی می‌توان بیان نمود که اقدامات زیادی در مورد تولید آلکالوئیدها با استفاده از کشت‌های سوسپانسیون سلولی صورت پذیرفته و در مواردی نیز با کمک الیسیتورها و سایر استراتژی‌ها موفقیت‌هایی حاصل شده است، ولی کمتر به مسیرها و شاهراه‌های متابولیسمی پرداخته شده و به طور کلی برای ترکیبات فیتوشیمیایی مختلف مانند آجمالیسین، سرپانتین، هیوسیامین، اسکوپولامین، وین بلاستین و وین کریستین برخلاف آجمالیسین و سرپانتین نتایج خوبی در کشت سلول دیده نشده است [۳۳] [۳۴]. **درمورد** تنظیم کننده‌های رشد، اکسین‌ها بازدارنده بیوسنتز آلکالوئیدها درکشت تعلیقی هستند [۳۵][۳۶]. هورمون‌های IAA و NAA بیوسنتز بسیاری از متابولیت‌های ثانویه را در کشت تعلیقی کاهش می‌دهند [۳۷][۳۸][۳۹]. ویژگی‌های متفاوت تونوپلاست برای جذب متابولیت‌های ثانویه مختلف توسط (zenk & Deus ۱۹۸۶) گزارش شده است. که فاکتور مهمی در تنظیم شدت جذب و ترشح است، ولی با این وجود چگونگی دخالت اکسین‌ها در ترشح و جذب بتدریج شناخته شده است [۱۶]. سیتوکنین‌ها بویژه KIN وBA نقش مهمی را در واکنش‌های فیزیولوژیکی سلول‌های گیاهی بازی می‌کنند، به عنوان مثال در تنظیم نقش سلولی و کنترل ریخت زایی و جنین زایی شرکت دارند [۲۸]. همچنین آزمایش‌های متعددی تاثیر آنها را برتولید متابولیت‌های ثانویه نظیربتاسیانین‌ها [۳۷][۳۳][۲۵]، آنتوسیانین‌ها [۴۰][۳۵][۱۳] ایندول آلکالوئیدها [۳۴][۳۰] اثبات کرده‌اند. براساس فرضیه، جریان کلسیم از غشای پلاسمایی برای تجمع آلکالوئیدها ضروری است. (Eliot 1986) نشان داد تنظیم متابولیسم ثانویه توسط سیتوکینین‌ها با عبور کلسیم ارتباط دارد. (Merillon et al.,۱۹۹۲,۲۰۱۳) با استفاده از: ۱)- مسدودکننده‌های ورود کلسیم نظیر (نفی دی پین) nifedipine و ۲)- بازدارنده‌های رقابتی کالمودولین که در ضمن مسدود کننده‌های عبور کلسیم نیز هستند مثل (فلوناری زین) flunarizine و (پی مو زید) pimozide و ۳)- یون Cu^{+2} که راه عبور کلسیم را از طریق اشغال جایگاه اتصال کلسیم در سطح خارجی و غشاء پلاسمای مسدود می‌کنند[۳۲][۳۳]. و ۴)- یون کبالت (Co^{+2}) **که** بازدارنده عبور کلسیم می‌باشد، ارتباط عبور کلسیم و جلوگیری از جایگاه‌های فعال آنزیمTDC که توسط سیتوکینین‌ها برای استقرار تریپتوفان محافظت می‌شود را اشغال نموده. مطالعات نشان داد که این بازدارنده‌ها می‌تواند اثر افزایش دهنده سیتوکنین‌ها در سرعت فعالیت آنزیم TDC را خنثی کنند [۳۵] [۳۷]. همچنین افزایش سطح سیتوکنین‌ها سبب افزایش سرعت نسخه برداری mRNA آنزیم شده و سرعت فعالیت آن را افزایش می‌دهد (pasquali et al., 2010)، **۲**- افزایش سطح سیتوکنین برای سلول‌های کشت بافت ساقه پروانش به دلیل غیرفعال نمودن رفتارهای تقسیمی درسلول‌های کالوس، تمایل سلول‌ها را ازطریق فعال سازی مسیرهای متابولیت‌های ثانویه را افزایش می‌دهد.**۳**- همچنین باعث فعال سازی جریان درون واکوئلی کلسیم در حضور کینتین می‌گردد [۴۱][۴۲][۳۴][۲۲].

۴- ازطریق کاهش فعالیت PIN (پروتئین‌های ترابری غشاء) که در شارش بیرونی اکسین نقش دارند [۳۳]. نتایج نشان می‌دهد با کاهش سطح فعالیت آنزیم تریپتوفان دکربوکسیلاز مسیرهای واکنش بعدی نیزبویژه آنزیم استریکتوزیدین سنتآز (S.S) تا حد زیادی دستخوش کندی و بازدارندگی در سطح ماده اولیه آنزیم می‌شود، که نهایتا منتهی به کاهش سطح آلکالوئیدها می‌گردد [۴۳][۳۲][۳۵][۳۷].(Dong et al.,2011) **نقش** ساکارز، گلوکز و فروکتوز را به عنوان منابع کربن در محیط کشت بررسی کردند. مکانیسم جذب ساکارز به دو روش هیدرولیزی و غیر هیدرولیزی صورت می‌گیرد. در حالت اول تبدیل به فروکتوز و گلوکز شده و بعداً جذب این دو قند صورت می‌گیرد، و در حالت دوم ساکارز به طور مستقیم جذب سلول می‌شود [۲]. در آزمایش‌هایی که به وسیله ای (Dong۲۰۱۳) انجام گرفته شدت مصرف ساکارز بسیار بیشتر ازمنو ساکاریدها بوده است، که نشان می‌دهد جذب ساکارز توسط سلول‌ها به هر دو روش انجام می‌گیرد [۳۱]. وقتی که گلوکز و فروکتوز مورد استفاده قرار گیرند شدت رشد و تولید زی توده کم شده اما سرعت فعالیت آنزیم TDCافزایشی هماهنگ با بیوسنتز کاتارانتین (در حدود۲ برابر) از خود نشان داد [۳۱]. ظاهراً علت افزایش تولید ناشی از اسمزیته بیشتر (در واحد وزن) منوساکاریدها در مقایسه با ساکارز **نیست**. اگرچه تولید آلکالوئیدها در محیط دارای منوساکاریدها بیشتر می‌شود، اما مقدار زی توده تولید شده بسیار کاهش می‌یابد، اما تعداد ایدیوبلاست‌ها که جایگاه اصلی آنزیم TDC افزایش داشته و به همین دلیل در کشت تارهای کشنده درسیستم کشت

تعلیقی دو مرحله‌ای نسبت به کشت یک مرحله‌ای سلول‌های مورد نظر بطور محسوسی افزایش یافتند. و همچنین سلول‌های که در محیط دارای فروکتوز و گلوکز کشت شدند، نیز توانستند در کشت دو مرحله‌ای تعداد بالای ایدیوبلاست‌ها را حفظ نموده و محیط‌های حاوی کشت سلولی تارهای کشنده متفاوت با کشت یک مرحله‌ای در محیط دارای تعداد ایدیوبلاست‌های کمتری را تولید نموده لذا میزان آنزیم TDC، **به** همراه بیوسنتز کاتارانتین به نصف کاهش یافت [۲۷]. در مورد تاثیر غلظت اسید آمینه تریپتوفان بر روی فعالیت آنزیم تریپتوفان دکربوکسیلازTDC، مشخص شده که در تیمارهای بالای غلظت تریپتوفان به دلیل تداخل مسیرهای بیوسنتزی اکسینIAA که معمولا از ۳ مسیر انجام می‌شود، (Sangwan & Kumar 1998, 2012) نشان دادند که غلظت‌های بالاتر از۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر تریپتوفان درمحیط‌های کشت تعلیقی توسط یک دکربوکسیلاسیون اکسیژناسیون دو مرحله‌ای و مونواکسیژناسیون دنیتریلاسیون (transaminase-mono oxygenase) اسید آمینه تریپتوفان به ایندول استیک اسید تبدیل می‌شود [22]، که خود این ماده در محیط‌های کشت مورد نظرباعث پاین آمدن راندمان بیوسنتز ایندول آلکالوئیدها در سلول‌های کشت برگ مسن پروانش شده، واز این طریق پس از ۵ الی ۱۰ روز از آغاز تیمار تا حد زیادی از فعالیت آنزیم TDC در مسیر بیوسنتزی تریپتامین کاسته می‌شود [۴۴][۳۹]. پژوهش‌های انجام شده نشان داد که، آنزیم TDC یکی از مهمترین آنزیم‌ها در بین مسیرهای مواد اولیه وثانویه است، (Noe & Berlin۱۹۸۴) که اولین بار آنزیم TDC را استخراج نمودند جایگاه واکوئلی برای آن مشخص کرده [۴۱]، اما تحقیقات نشان داد که TDC یک آنزیم سیتوزلی با جرم مولکولی ۱۱۵ کیلودالتون دارای دو زیرواحد بوده که کوآنزیم پیرودوکسال فسفات برای فعالیت آن لازم و ضروری است [۱۳][۱۶][۱۷]. همچنین این محققین توانستند ژن*tdc* را از DNA کلون شده محور زیر لپه پروانش استخراج نموده، با مطالعات بعدی جایگاه آن را تعیین کنند. سپس با مشخص کردن mRNA کد کننده آنزیم را استخراج و تحت تاثیر هورمون‌های IAA وNAA اثر کاهنده این هورمون‌ها را بر آنزیم TDC مشخص کند [۳۸][۴۰]. این کاهش فعالیت آنزیم با افزودن ساکارز، گلوکز و فروکتوز به محیط کشت برگ‌های لپه‌ای پروانش با برداشتن اثر بازدارندگی اکسین‌ها در کاهش ترجمه از mRNA برطرف می‌شود. همچنین در پژوهشی مشابه توانستند اثر بازدارندگی اکسین‌ها بر ترجمه mRNA، با افزودن مقادیر ۰/۵ و ۱/۰ میلی‌گرم در لیتر سیتوکنین‌ها را افزایش دهند [۲۸][۳۳]، که همخوانی با نتایج بدست آمده از این پژوهش را نشان می‌دهد. نوردهی کشت‌های گیاهی اغلب منجر به افزایش تجمع ترکیبات ثانویه می‌شود به ویژه هنگامی که این ترکیبات در اندامهای هوایی گیاهان تولید می‌شوند. هر چند که بیوسنتز آلکالوئیدهای تروپانی به ریشه محدود شده است، باز هم گزارش‌هایی مبنی بر اثرات مثبت نوردهی بر کشت‌های ریشه و افزایش این آلکالوئیدها وجود دارد [۲۴][۳۳]. بسیاری از اجزای محیط کشت از عوامل مهم در رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه می‌باشند. قندها علاوه بر منبع کربن به عنوان ترکیبات ایجاد سیگنال در تولید ایندول آلکالوئیدهای در کشت‌های ریشه عمل می‌کنند. هگزوکیناز و کلسیم نیز در انتقال سیگنال نقش دارند. مسیر سیگنالی قند با تأثیرات تنظیم کننده رشدهای گیاهی و نور برهم کنش دارد. در حالی که اکسین در حضور ساکارز تأثیر بازدارندگی بر روی ژن *pmt* (PhosphoethanolamineN-methyltransferase) و اثر افزاینده بر فعلیت ژن *tdc* از طریق افزایش ترجمه mRNA و بیوسنتز آنزیم TDC دارد، که در ترکیب با سوربیتول نقش مثبت در تولید اندول آلکالوئیدها نشان داده است [۴۵][۲۳][۱۶]. در تحقیق (Pavlov et al., 2009) گزارش شده که تأثیر منبع نیتروژن و تنظیم کننده‌های رشد مختلفی مانند IAA و NAA در تولید آلکالوئیدها بیشتر وابسته به گونه بوده و نقش آن‌ها هنوز کاملا مشخص نبوده و احتمالاً در ناپایداری mRNA و جلوگیری از ترجمه آن است [۱][۳۱][۳۵]. (Gritothe et al., 2007, 2012) پس از بررسی تنظیم کننده‌های رشد مختلف بر کشت‌های ریشه مویین *Hyosyamus muticus* گزارش نمودند که کشت‌های ریشه مویین، غلظت‌های ۰/۰۱الی ۰/۰۵ میکرومول اکسین را در محیط کشت به راحتی تحمل نموده و روی رشد آن‌ها تأثیر چندانی نداشته است[۴۳]، اما تجمع آلکالوئید در آنها نسبت به ریشه‌های رشد یافته در شرایط عادی از تنظیم کننده رشد به نصف کاهش یافته است، که نشان می‌دهد تولید آلکالوئیدها در کشت بافت بستگی زیادی به ترکیب محیط‌کشت دارد [۳۲]. اثر فاکتورهای مختلف مثل منابع

تغذیه‌ای، تنظیم کننده‌های رشد و شرایط رشد مختلف بر تولید تروپان آلکالوئیدها در کشت بافت مطالعه شده است [۴۳][۴]. مشخص شده است که انواع و غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد مثل اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها آثار مختلفی بر رشد گیاه و تولید متابولیت‌های ثانویه دارند. کشت کالوس‌های برگی گیاه *Datura stramonium* توسط (EL-Bahr et al., 1989)، افزایش رشد و محتوای آلکالوئیدی را در حضور غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر ۲،۴-D، NAA، Kin و BA به تنهای یا به صورت متقابل نشان داد. نقش مستقیمی برای اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها در مسیر متابولیسمی تروپان آلکالوئیدها گزارش نشده است، ولی نتایج مطالعات، وجود نقشی غیرمستقیم را برای این تنظیم کننده رشدها تاید می‌کند. در این پژوهش نیز در حضور BA با افزایش غلظت تنظیم کننده رشد NAA افزایش محتوای آلکالوئید-کل نسبت به شاهد مشاهده شد[۱۹].

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که استفاده از کشت سوسپانسیونی وکشت مزرعه باعث ایجاد گیاهانی با مقادیر بالایی از ذخیره آنزیم TDC نسبت به گروه کشت بافت می‌گردد. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که استفاده از روش‌های مختلف کشت باعث تغییر در میزان فعالیت آنزیم می‌گردد، و این تغییرات در سطح احتمال ۵ درصد معنی دار است، نتایج نشان داد که استفاده از روش کشت سوسپانسیونی به نسبت سایر روش‌های کشت گیاه پروانش، باعث افزایش سطح فعالیت آنزیم می‌گردد. در بررسی اثر متقابل غلظت‌ها نیز مشخص گردید که در همه تنظیم کننده رشدها به جز تنظیم کننده رشد IAA با افزایش غلظت مصرفی، میزان فعالیت آنزیم نیز با افزایش معنی داری مواجه شد. این در حالی بود که استفاده از تنظیم کننده رشد IAA باعث کاهش فعالیت آنزیم مورد مطالعه می‌گردید، همچنین قند ساکارز در غلظت ۶% و فروکتوز و گلوکز در ۴% و اسید آمینه تریپتوفان در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر بیشترین تاثیر را بر فعالیت آنزیم TDC داشته اند. بررسی تاثیر نوع محیط کشت و تاثیر استفاده همزمان استفاده از تنظیم کننده‌های رشد مورد مطالعه در این تحقیق نیز نشان داد که استفاده از روش کشت سوسپانسیونی در بسیاری از موارد نسبت به دو گروه دیگر مزیت نسبتا مناسب‌تری را از خود نشان می‌دهد.

منابع

[1] Don L. Discovery and Recognition of The Secoiridoide Pathway of *catharanthus roseus*. Wageningen University, Wageningen, NL. 2014; 133-148.

[2] Dong L, Miettinen K, Goedbloed M, Verstappen F W A, Voster S, A Jongsma M.A., et al. Characterization of two geraniol synthases from *Valeriana officinalis* and *Lippia dulcis*: similar activity but difference in subcellular localization. Metabolic Engineering. 2013; 20:198-221.

[3] Giuseppe T. CNR · Biology and Technologies of Photosyntetic Micro-Organisms Research Uni,Almeria university,With permission of Fundacíon CAJAMAR, Spain. Rare Earth Elements and Algae: Physiological Effects, Biorefinery and Recycling. Italian National Research Council. 2015; 2:187-212.

[4] Merillon J M, Chenieux J M, Rideau M. Cine,tique de crossance,evolution du me,tabolisme glucido-azote et accumulation alcaloidiquue dans une suspension cellulaire de chatharanthus roseus. Plant research Medica. 2013; 4:169-176.

[5] Blom T J M, Sierra M, Vanvliet T B, Franke-Vanoijk M E I, Dekoning P, Van Iren F, et al. Uptake and accumulayion of ajmalicine into isolated vacuoles of cultured cells of Catharanthus roseus (L.)G.Don and its conversion into serpentine. Planta. 2011; 183:170-177.

[6] Khashan K T, Tikki K A. Biochemical and physiological changes of callus growth and lycopene pigment production from tomato (lycopersicon esculentum mill.) under drought stress. International Journal of Innovative Science & Technology. 2019; 3:7-21.

[7] DeLuca V, Balsevich J, Tyler R T, Kurz W G W. Characterization of a novel N-methyltransferase (NMT) from Catharanthus roseus. Plant Cell Rep. 1987; 6:458–461.

[8] Ahmad S A, Khan A, Mujib A, Sharma M P, et al. *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. an important drug: it's applications and production. Pharm. Globale (IJCP). 2010; 4 (12): 1-16.

[9] Aerts R J, Alarco A M, Luca V D. Auxin induce tryptophan decarboxylase activity in radicles of *Catharanthus roseus* seedling.Plant Physiol. 1992; 100: 1014-1019.

[10] Ahmad M M, Siddiqui Z H, Mujib A, Ahmad M M, Ali A. Fungal elicitors: A potent approach for enhancing secondary metabolites in cultured cells. Fungal biochemistry and biotechnology. L. Lambert Academic Pub. AG & CO. KG, Saarbrücken. 2010 oct.

[11] Barz W, Reinhard E, Zenk M H. Proceedings of the First International Congress on Medicinal Plant Research. Section B. Conference at the University of Munich, Germany. 1967 Sep.

[12] Artur C L, Pawliszyn J. Solid phase microextraction with thermal: Desorption using fused silica optical fibers. Anal. Chem. 1990;62: 2145-2148.

[13] Bensddek L, Gillet F, Saucedo J E, Fliniaux M A. The effect of nitrate ammonium concentration on growth and alkaloid accumulation of Atropa belladonna hairy roots. J. of Biotechnol. 2009; 85: 935 - 50.

[14] Bruyn A, Verzele M, Dejonghe J P, Rao K S P B, Collard M P, Trouet A, et al. Modiffication of Catharanthus roseus alkaloids: A Lacton derived from deacetylvinblastine. Planta Medica. 2008; 55:364-366.

[15] Bulgakov P, Functions of rol-genes in plant secondary metabolism. Biotechnology advances. 2008; 23 (4): 318 - 24.

[16] Deus-Neumann, Zenk B M H**.** A Highly selective alkaloid uptake system in vacuoles of higher plants. Planta. 1984; 162:250-260.

[17] Carnier J, Morol G. Influence des condition de culture des tissue de *vinca rosea L*. sur la production d, ahkaloides totax. physiol.veg. 2012; 10(4):617-625.

[18] Deluca V , Balsevich J, Tyler R T, Kurz W G W. Characterization of a novel N-methyltransferase (NMT) from cathranthus roseus plants. Plant cell Reports. 2007; 6:458-461.

[19] De Luca V, Marineau C, Brisson N. Molecular cloning and analysis of cDNA encoding a plant tryptophan decarboxylase: comparison with animal DOPA decarboxylase. Proc Natl Acad Sci USA. 1989; 86:2582–2586.

[20] El-Sayed M, Verpoorte R. Catharanthus terpenoid indole alkaloids: biosynthesis and regulation. Phytochem Rev. 2007; 6: 277–305.

[21] Georgiv M, Pavlov A, Bley T. Hairy root type plant in vitro systems as sources of bioactive substances. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1993; 79:1157-1185.

[22] Rajender S S, Sanjay M, Sushil K. Direct Fluorometry of Phase-Extracted Tryptamine-BasedFast Quantitative Assay of L-Tryptophan Decarboxylase from *Catharanthus roseus* Leaf Analytical Biochemistry. 1998; 255:39–46.

[23] Yamamada Y. Selection of cell lines for high yields of secondary metabolites. In cell culture and somatic cell genetics of plants. Edited by I.K.Vasil. 2014; 1.

[24] Memelink J, Verpoorte R, Kijne J W. ORCAnisation of jasmonate-responsive gene expression in alkaloid metabolism. Trends Plant Sci. 2001; 6:212–219.

[25] Morris P, Scragg A H, Smart N J, Stafford A A.Secodary product formation by cell suspension cultures. In plant cell culture, practical approach. Edited by Dixon,R.A. 1987.

[26] Pennings E J, Groen B, Duine J A, Verpoorte R. Tryptophan decarboxylase from Catharanthus roseus is a pyridoxo-quinoprotein. FEBS Lett. 1989; 255:97–100.

[27] Pedersen, L G, Ostenfeld M S, Hansen M H, Nylandsted J, Jaattela M. Vincristine induces dramatic lysosomal changes and sensitizes cancer cells to lysosome-destabilizing siramesine. Canc. Res. 2007; 67 (5): 2217-2225.

[28] Poulsen C, Verpoorte R. Roles of chorismate mutase, isochorismate synthase and anthranilate synthase in plants. Phytochemistry. 1991; 30:377–386.

[29] Dong L, Wei J, Liu Y, Yang C. Advances in studies on spatial-specific distributions of secondary metabolites and related enzymes in plants. Chinese herb.med. 2009; 40:153-155.

[30] Dong L, Liu Y, Wei J. Cloning of critical gene fragments in saikosaponin biosynthesis and associated sequence analysis. World science and technology: modernization of traditional Chinese medicine and material medica. 2008; 10: 56-60.

[31] Dong L, Sui C, Liu Y, Yang Y, Wei J, Yang Y. Validation and application of reference genes for quantitative gene expression analyses in various tissues of *Bupleurum Chinese*. Molecular biology reports. 2011; 38: 5017-5023.

[32] Deluca V,.Balsevich J, Kurz W G W. Acetyl coenzyme-A:deacetylvindoline-O-acetyltransferase, a novel enzyme from catharanthus rosuse. J.Plant. physiol. 2005; 121:417-428.

[33] Conan M, Frier C, Andreeux J, Plat M, Cosson L, Bohan C. Monoclonal antibodies to bis-indole alkaloids of *Catharanthus roseus* and their use in enzyme-linked immune sorbent assay. Phytochemistry. 2010; 29(7):2109-2114.

[34] Deluca V. Kurz W G W. Monoterpene indole alkaloids *Catharanthus rosus* in cell culture and somatic cell genetics of plant. vol.5 edited by F.Constable, I.Vasil. 2008.

[35] Pavlov S, Berkov J, Weber T. Hyoscyamine Biosynthesis in Datura stramonium Hairy Root in Vitro Systems with Different Ploidy Levels. Appl Biochem Biotechnol. 2009; 157 (2): 210 - 225.

[36] Dhara T, KumarSrivastava A, KrishnaSinha A. Mass production of Ajmalicine by bioreactor cultivation of hairy roots of *Catharanthus roseus*. Biochem..Eng.J. 2017; 119:84-91.

[37] Flores H, Dai Y, Cuello J, Maldonado M, Loyola I. Green roots: Photosynthesis and photo autotrophy in an underground plant organ. Plant Physiol. 1993; 101: 363 - 71.

[38] Pasquali G, Goddijn O J M, De Waal A, Verpoorte R, Schilperoort R A, Hoge JHC, et al. Coordinated regulation of two indole alkaloid biosynthesis genes from Catharanthus roseus by auxin and elicitors. Plant Mol Biol. 1992; 18:1121–113.

[39] Hisiger S, Jolicoeur M. Analysis of *Catharanthus roseus* alkaloids by HPLC. Phytochem. Rev. 2007; 6: 207–234.

[40] Goddijn O J M, Pennings E J M, Van Der Helm P, Verpoorte R, Hoge J H C. Overexpression of a tryptophan decarboxylase cDNA in Catharanthus roseus crown gall calluses results in increased tryptamine levels but not in increased terpenoid indole alkaloid production. Transgenic Res. 1995; 4:315–323.

[41] Noe W, Berlin J.Tryptophan decarboxylase from Catharanthus roseus cell suspension cultures: purification, molecular and kinetic data of the homogenous protein. Plant Mol Biol. 1984; 3:281–288.

[42] Pasquali G. Regulation of the terpenoid indole alkaloid biosynthetic gene strictosidine synthase from Catharanthus roseus. PhD thesis. Leiden University. 1994.

[43] Gritothe G, Drager B. Tropane alkaloids metabolic response to carbohydrate signal in root cultures of Atropa belladonna. Plant Sci. 2012; 163: 979 - 985.

[44] Goddijn O J M, De Kam R J, Zanetti A, Schilperoort R A, Hoge J H C. Auxin rapidly down-regulates transcription of the tryptophan decarboxylase gene from Catharanthus roseus. Plant Mol Biol. 1992; 18:113–120.

[45] Murashige T, Skooge F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiol. plantarum. 2002; 15:473-497.

Evaluation of the growth regulators, sugars and amino acid tryptophan effect on the rate of tryptophan decarboxylase enzyme on *Catharanthus roseus* (L.) G.Don. in tissue culture, cell suspension culture and field culture conditions

Kazemzadeh Haghighi A.[1], Sobhanian H.[2*], Bakhshi Khaniki G. R.[3], Ebrahimi M. A.[4]

[1] phD Graduate Student, Department of Biology, Payame Noor University
[2] Assistant professor, Department of Biology, Payame Noor University
[3] professor, Department of Biology, Payame Noor University
[4] professor, Department of Agriculture, Payame Noor University

* (Corresponding author): motif3000@yahoo.com

DOI: 10.30495/JDB.2023.700350 https://dorl.net/dor/20.1001.1.2008692.1402.15.2.7.7

Received: April 2021 Accepted: December.2021

Abstract

Catharanthus roseus The most important species from *Apocyanaceae* contains an important and special group of indole alkaloids with a great medicinal value, which are distributed in all organs of the plant. The presence of valuable alkaloids in all organs of the plant has led to the introduction of this species as very important medicinal plants and their properties to be studied. This study was performed to investigate the effect of growth regulatory treatments on the activity of *tryptophan decarboxylase* (TDC) which is a cytosolic enzyme and a key enzyme in the secondary metabolite biosynthesis The effects of some growth regulators such as KIN, BA, NAA and IAA in three concentrations (0.1, 0.5, 1.0 mg/L) as well as various sugar treatments like sucrose, fructose and glucose in 3 concentrations (2% , 4% , 6%) and also the amino acid tryptophan (at concentrations 100 and 200 mg/L, were investigated on TDC enzyme activity. The experimant was performed in three replications as a factorial in a completely randomized design in *Karaj Seed and Plant Breeding Research Institute*. in the applied IAA and NAA at concentrations of 0.1 and 0.5 mg/L respectively, increased the activity of TDC by about 10%. But cytokinins, KIN and BA at 1,0 mg/L had the greatest promotion effect of about 40%. Sugars such as Sucrose in concentrations 6%, fructose and glucose in 4% and amino acid tryptophan in concentration 100 mg/l had the maximal effects on the activity of TDC enzyme. The use of suspension culture method in many cases increased TDC enzyme activity as compared to the other two methods, but in the field experiment also some treatments compared to other methods had an additive effect even more than tissue culture. According to the results of this experiment, the use of suspension culture and field culture in many cases showed a comparative advantage over the tissue culture in promoting TDC activity.

Keywords: *Cell suspension culture, tissue culture, Field culture, tryptophan decarboxylase*.