Iranian Journal of Biological Sciences.2022; 17(3):41-63

Original Article

Iranian Journal of Biological Sciences

https://zisti.iauvaramin.ac.ir

Evaluation of the growth regulators, sugars and amino acid tryptophan effect on the rate of tryptophan decarboxylase enzyme on *Vinca major L.* in tissue culture, cell suspension culture and field culture conditions

Ali Kazemzadeh Haghighi[1,], Fariba Khosravinezhad[1], Amir hossein Kazemzadeh Haghighi[2]*

1. Assistant Professor, Department of biology, faculty of biological sciences, north-tehran branches, islamic azad university, tehran, iran
2.M.Sc. graduated, College of science, University of Tehran, Tehran, Iran

place of research: Laboratory complex,north-tehran branches, islamic azad university, tehran

Article Info

Article History:
Recived 12.30.2022
Revised 02.22.2023
Accept 04.13..2023
Online 04.13..2023

KeyWords:

tryptophan decarboxylase
Vinca major
Cell suspension culture
Field culture

***Corresponding author:**
E-mail address

fkazemzadehh@gmail.com
f.khosravinejad@iau-tnb.ac.ir
a.kazemzadeh.haghighi@gmail.com

Abstract

Introduction: *Vinca major L.* One of the most important species in the genus *Vinca* of Apocyanaceae is the richest species of this genus and contains an important and special group of indole alkaloids that have a large amount of medicinal value, which are distributed in all parts of the plant. The presence of valuable alkaloids in all parts of the plant has led to the introduction of species of this genus as very important medicinal plants and their properties to be studied.
Aim: 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 metabolites Pathway with two subunits,115-118 KDa, molecular mass and dependent on pyrodoxal phosphate (B6), Km75μmole for typtophan with optimal activity at alkaline pH of 7.5 in *V.major* hypocotyl.
Materials and methods: Some of simultaneous use growth regulators KIN, BA, NAA and IAA in three concentrations (0.1, 0,5, 1,0 mg/L) as well as various treatments of sucrose, fructose and glucose in 3 concentrations (2% , 4% , 6%) and also the amino acid tryptophan in concentrations (100 and 200 mg/L) were used to measure the amount of enzyme TDC activity, which was performed in three replications as a factorial in a completely randomized farm design of Karaj Seed and Plant Breeding Research Institute
Results: In both of IAA and NAA at concentrations of 0.5 mg/L increases the amount of enzyme TDC in It has become about 10%. But in cytokines, KIN and BA at 1,0 mg/L had the greatest 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 best effect on the activity of enzyme TDC in three replications as Factorial in the form of a completely randomized design in some cases.
Conclusion: The use of suspension culture method in many cases increased the activity of TDC enzyme compared to the other two methods, but also in the field culture compared to other methods in some treatments 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 tissue culture.

Cite this article:Kazemzadeh Haghighi A.*,Khosravinezhad F., Kazemzadeh Haghighi A.H.Evaluation of the growth regulators, sugars and amino acid tryptophan effect on the rate of tryptophan decarboxylase enzyme on *Vinca major L.* in tissue culture, cell suspension culture and field culture conditions Iranian Journal of Biological Sciences. 2022; 17(3): 41-63

doi 10.30495/ZISTI.2023.1976340.1150 DOR 20.1001.1.17354226.1401.17.3.4.8
Publisher: Islamic Azad University of Varamin – Pishva branch Print ISSN: 1735-4226 Online ISSN: 1727-459X
This is an open access article under the: https://creativecommons.org/license/by-nc/4.0/

مقاله تحقیقی
دانش زیستی ایران
https://zisti.iauvaramin.ac.ir

بررسی اثر تیمارهای تنظیم کننده رشد، قند و اسید آمینه تریپتوفان بر فعالیت آنزیم تریپتوفان دکربوکسیلاز در پیچ تلگرافی برگ درشت *Vinca major L.* : مطالعه در شرایط کشت بافت، کشت سوسپانسیونی و کشت مزرعه

علی کاظم زاده حقیقی[۱*]، فریبا خسروی نژاد[۱]، امیرحسین کاظم زاده حقیقی[۲]

۱- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران

۲- کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران

محل انجام تحقیق : مجتمع آزمایشگاهی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله
ارسال ۱۴۰۱/۱۰/۰۹
بازنگری ۱۴۰۱/۱۲/۰۳
پذیرش ۱۴۰۲/۰۱/ ۲۴
نمایه ۱۴۰۲/۰۱/۲۴

کلمات کلیدی
آنزیم تریپتوفان دکربوکسیلاز
پیچ تلگرافی برگ درشت
کشت سوسپانسیون سلولی
کشت بافت
کشت مزرعه

* نویسنده مسؤل

fkazemzadehh@gmail.com
f.khosravinejad@iau-tnb.ac.ir
a.kazemzadeh.haghighi@gmail.com

چکیده

مقدمه: پیچ تلگرافی برگ درشت *Vinca major L.* یکی از گونه های مهم سرده وینکا (*Vinca*) از خانواده خرزهره (Apocyanaceae) که حاوی گروه ارزشمندی از اندول-آلکالوئیدهای است که به مقدار زیاد دارای ارزش دارویی بوده و در همه بخش هاي گیاه پراکنده اند. وجود آلکالوئیدهاي ارزشمند در تمام بخش هاي گیاه سبب شده است که گونه های این جنس به عنوان گیاهان دارویی بسیار مهم معرفي و خواص آنها بررسی شود .

هدف: این مطالعه به منظور بررسی اثر تیمارهای تنظیم کننده رشد بر فعالیت آنزیم تریپتوفان دکربوکسیلاز (TDC) که آنزیمی سیتوزولی و کلیدی در مسیر تولید متابولیت های ثانویه در گیاه پیچ تلگرافی برگ درشت است، اجرا شد.

مواد و روش ها: 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 ٦-بنزیل آمینو پیورین (BA) در غلظت های ۰/۱، ۰/۵ و ۱/۰ میلی گرم بر لیتر، تیمارهای مختلف قند شامل ساکارز، فروکتوز و گلوکز در غلظت های ۲، ٤ و ٦ درصد و همچنین اسید آمینه تریپتوفان در غلظت های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بر میزان فعالیت آنزیم TDC در سه تکرار بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی در مزرعه موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج اجرا شد.

نتایج: هورمون های IAA و NAA هر دو در غلظت ۰/۵، باعث افزایش فعالیت آنزیم TDC شدند. اما در سیتوکنین ها، KIN و BA در غلظت ۱/۰ میلی گرم بر لیتر، بیشترین اثر را داشته اند. قندهای ساکارز در غلظت ٦٪، فروکتوز و گلوکز نیز در غلظت ٤٪ بیشترین تاثیر افزایشی را بر فعالیت آنزیم TDC نشان دادند. اسید آمینه تریپتوفان در غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر بیشترین تاثیر و در غلظت ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر اثر کاهنده بر فعالیت آنزیم TDC نشان داد که این کاهش در برخی موارد در حدود ٤۵ درصد بود.

نتیجه گیری: 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 روش ها در برخی از تیمارها اثر افزایشی حتی بیشتر از کشت بافت بود. بر اساس نتایج حاصل از این آزمایش استفاده از روش کشت سوسپانسیونی و کشت مزرعه در بسیاری از موارد نسبت به کشت بافت مزیت نسبی بیشتري دارد.

شیوه آدرس‌دهی این مقاله : کاظم زاده حقیقی ع.*، خسروی نژاد ف. ، کاظم زاده حقیقی الف.ح.،بررسی اثر تیمارهای تنظیم کننده رشد، قند و اسید آمینه تریپتوفان بر فعالیت آنزیم تریپتوفان دکربوکسیلاز در پیچ تلگرافی برگ درشت *Vinca major L.* :مطالعه در شرایط کشت بافت، کشت سوسپانسیونی و کشت مزرعه. مجله دانش زیستی ایران. ۱۴۰۱ ؛ ۱۷(۳):۴۱-۶۳

DOR 20.1001.1.17354226.1401.17.3.4.8
doi 10.30495/ZISTI.2023.1976340.1150

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین - پیشوا شاپا چاپی: ۱۷۳۵-۴۲۲۶ شاپا الکترونیکی: ۲۷۱۷-۴۵۹X نویسندگان: © حق مؤلف

مقدمه:

آنزیم تریپتوفان دکربوکسیلاز که از این پس در این متن TDC نشان داده می شود، یکی از آنزیم های کلیدی در شاهراه بیوسنتز متابولیت های ثانویه از جمله ایندول آلکالوئیدها [۱] بوده که بنام مسیر سکوایریدوویید[۲] خوانده می شود. در بیوسنتز ایندول آلکالوئیدها این آنزیم سبب تبدیل تریپتوفان به تریپتامین شده، که یکی از پیش سازهای اصلی در مسیر بیوسنتزی آلکالوئیدهای مونوترپنی و دی ترپنی می باشد (۱-۳).

TDC که بیشتر در سلول های اپیدرم پیچ تلگرافی تمرکز دارد، در بیوسنتز استریکتوزیدین[۳] اولین فراورده این مسیر نقش بسیار مهمی ایفاء می کند (٤, ٥) و در ادامه منتهی به بیوسنتز آلکالوئیدهای پرارزشی می شود. تحقیقات اخیر نشان داده است که اپیدرم ساقه و برگ هاي پیچ تلگرافی برگ درشت حاوي مقادیر زیاد آنزیم است که توان بالقوه ای در بیوسنتز ایندول آلکالوئیدهای ارزشمند مثل آجمالیسین[٤] ، وینکاروبین[٥] ، سرپانتین[٦] ، تابرسونین[٧] ، ویندولین[٨] ، وین بلاستین[٩] و وین کریستین[١٠] داشته و خصوصیات دارویي، مانند آرام بخشی، کاهش دهنده فشار خون، درمان اسکیزوفرنی و در کموتراپی مورد استفاده قرار می گیرند.

در مورد آنزیم TDC باید اضافه نمود که وابسته به پیریدوکسال فسفات بوده و در پلاستیدها و سیتوپلاسم و حتی در واکوئل سلول های اپیدرمی ردیابی شده است (۵-۷). یک گروه آنزیم های عمل کننده در مراحل اولیه بیوسنتزی آنزیم جرانیول۱۰—هیدروکسیلاز (G-۱۰-H) و دیگری متیل-ترانسفراز (غیراختصاصی) است که در برگ ها و ریشه های پیچ تلگرافی و پروانش یافت شده است (۱۲).

در مسیر موالونات[۱۱] و شکیمیک اسید[۱۲] مجموعه ای از آنزیم ها بطور پی در پی ایفای نقش می کنند، ابتدا آنزیم تلفیق کننده[۱۳] ۲ مولکول موالونیک اسید را پس از خروج ۲ مولکول CO۲ به جرانیول[۱٤] (c۱۰) تبدیل، و سپس جرانیول-۱۰هیدروکسیلاز آن را به جرانیول هیدروکسید تبدیل می کند، (جرانیول با فعالیت آنزیم اکسیژناز به ٤-hydroxygeraniol تبدیل می شود)، این آنزیم از میکروزوم های دانه رست پروانش جدا شده است.

از حلقوی شدن ترکیب اخیر اسید لوگانیک تولید و سپس با یک متیل ترانسفراز غیر اختصاصی لوگانین[۱۵] شکل گرفته و با یک گسست بین کربن های ۳ و ٤ به سکولوگانین تبدیل می شود. در مسیر دوم (مسیر شیکیمیک) کوریسمیت اسید به آنترانیلیت و سپس به ایندول و تریپتوفان تبدیل شده و با فعالیت آنزیم TDC تریپتامین شکل می گیرد که دومین پیش ساز برای بیوسنتز استزیکتوزیدین بوده که آنزیم شرکت کننده در این مرحله استریکتوزیدین-سنتاز (S.S) می باشد.

۱ Indol alkaloids
۲ SecoiriDOId pathway
۳ strictosidine
٤ ajmalicine
٥ vincarubine
٦ serpentine
۷ tabersonine
۸ vindoline
۹ vinblastine
۱۰ vincristine
۱۱ mevalonate
۱۲ Shikimic acid
۱۳ codensation-enzyme
۱٤ graniol
۱٥ loganin

استریکتوزیدین اولین آلکالوئید ناپایدار ایندولی تولید شده در این مسیر بوده و معمولاً در پلاستیدها ردیابی شده و در ادامه با بیوسنتز اپی کاتنامین و استمادنین مسیر بیوسنتزی با فعالیت آنزیم های اکسیدازی متیلاسیونی و اکسینژناسیون برای بیوسنتز کاتنامین ، آجمالیسین و سپس اکسیداسیون آن در واکوئل ها و بیوسنتز سرپانتین ادامه می یابد (۸-۱۰).

در مسیر دیگر استمادنین به تابرسونین که طی ٦ مرحله آنزیمی به ویندولین تبدیل و از تلفیق آن با کاتارانتین اولین اندول آلکالوئید دی ترپنی وین بلاستین و با اکسیژناسیون آن وین کریستین بیوسنتز می شود (۳, ۱۱, ۱۲). گیاه پیچ تلگرافی برگ درشت با نام علمی*Vinca major* گیاهی علفی و چند ساله ، ساقه‌ها در بن چوبی شده که دارای دو نوع ساقه بوده، به طوری که برخی از آنها به طول ۸۰ الی۱۰۰ سانتیمتر کاملا خوابیده بر سطح زمین و برخی دیگر عمودی و به طول ۱۵ الی ۲۰ سانتیمتر مولد گل هستند.

برگ ها متقابل، فاقد دمبرگ و یا دارای دمبرگ کوتاه و جام گل از پنج گلبرگ پیوسته تشکیل شده است. رنگ گل ها آبی مایل به بنفش و بندرت سفید، گلی رنگ و یا ارغوانی تیره است و در سال دو بار در پاییز و بهار گل می دهد. خاستگاه این گیاه مناطق حاره و گرمسیر مانند جنوب هند، اندونزي، ماداگاسکار و آمریکای جنوبی بوده که امروزه کشت آن در سراسر دنیا گسترش یافته است.

پیچ تلگرافی برگ درشت منبع غني از آلکالوئیدها بوده که در همه بخش هاي گیاه پراکنده اند. محتواي آلکالوئیدهايV.major در قسمت هاي مختلف آن بسیار متفاوت است و بیشترین مقدار تجمع آلکالوئیدها در برگ و ساقه مسن و بین ۰/۲۵ تا ۱/۵۳ درصد وزن خشک اندام مي باشد (۱۳-۱٦).

وجود آلکالوئیدهاي ارزشمند در تمام بخش هاي گیاه سبب شده است که به عنوان یک گیاه دارويي بسیار مهم معرفي و خواص آن بررسی شود (۱۰, ۱۳, ۱۷). آلکالوئیدهاي وین بلاستین و وین کریستین آلکالوئیدهای مهم پیچ تلگرافی هستند که در ساقه و برگ ها ساخته و ذخیره مي شوند. هر دو این آلکالوئیدها اثر آنتي نیوپلازي (ضد تومور) داشته و بیش از ۴۰ سال است که در شیمي درماني برخي سرطان ها استفاده مي شوند (۱۲, ۱۸).

بذر پیچ تلگرافی برگ درشت همانند بذر پروانش داراي آلکالوئیدهاي دايمري وينگرامينه و متیل وینگرامینه است که به طور اختصاصي در بذر تولید و ذخیره مي شوند (۹, ۱۹, ۲۰).

برخي دیگر از آلکالوئیدها عبارتند از لئوروزین ، کاتارانتین، تتراهایدروآلستونین ، لاکتریسین ، ویندولین و ویندولیسین که در پیچ تلگرافی یافت می شوند (۲۱-۲۳). در مورد محل بیوسنتز و ذخیره سازی آلکالوئیدها، واکوئل سلول‌های گیاهی نقش اصلی را در ذخیره سازی این گروه از متابولیت‌های ثانویه نقش ایفاء می کند، همچنین، واکوئل‌ها اسیدهای آلی، قندها، سایر متابولیت‌های ثانویه، کاتیون¬های نظیر سدیم و کلسیم را نیز در خود نگهداری می کنند (۱۰, ۱۹, ۲٤, ۲۵).

با توجه به جذب آجمالیسین که حساس به مس (Cu) است، اما NaNO۳ هیچ تاثیری بر جذب آن ندارد. مطالعات نشان داده اند جذب دو مرحله ای ایندول آلکالوئیدها ناشی از متابولیسم ویژه ای نیست، بلکه تجمع و ذخیره ایندول آلکالوئیدها تنها ناشی از تله یونی آلکالوئیدها به وسیله pH پایین لومن واکوئل می‌باشد (۱۱, ۲۰). 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 (۱۰, ۱۲, ۲۳, ۲٦). در کل، با توجه به مقادیر بسیار بالای از آلکالوئید ها 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 پیچ تلگرافی در شرایط کشت بافت، کشت سلولی و کشت مزرعه انجام گرفته است.

شد و به مدت ۳ دقیقه سونیکیت گردید. سپس به مدت ۲٤ ساعت دریخچال (دمای ٤ درجه سانتیگراد) نگهداری شد و در نهایت با دور ۲۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و صاف گردید. میزان جذب

مواد و روش ها:

کشت بذر

بذر پیچ تلگرافی برگ درشت 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 غذای لازم برای ادامه رشد بافت‌ها و سلول‌ها بوده، چون نیاز غذای بافت ها 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 پیچ تلگرافی

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 کامل ضد عفونی نشده (۲۰, ۲۲)، به همین دلیل جهت حذف این آلودگی ها از محتوی کپسول آموکسی سیلین ۲۵۰ میلی گرمی و کپسول آمپی سیلین ۲۵۰ میلی گرمی در ۲۵۰ میلی لیتر آب مقطر استفاده شده، و سپس بذور به محیط کشت منتقل شدند.

ضد عفونی نمودن قطعات گیاه پیچ تلگرافی

ابتدا برگ‌ها و ساقه‌های مسن و جوان با آب و صابون شستشو و ۱۰ دقیقه در محلول ۲۰ درصد تجاری آب ژاول قرار داده شده، برگ ها و ساقه ها 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 مورد پژوهش منتقل شدند.

روش های 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 (۲۴, ۲۷).

الف) روش کشت سوسپانسیون سلولی، یک مرحله ای:

در این روش تنها از محیط کشت پایه MS استفاده شد، در ضمن واکشت‌های ۴،۲-D از محیط حذف نشد، در تمام دوره کشت سوسپانسیونی سلولدر ارلن‌های ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط بوده و ارلن‌ها روی شیکر افقی با سرعت ۱۳۰ rpm قرار داشتند (۱۲).

ب) روش کشت سوسپانسیون سلولی، دو مرحله ای:

در این روش ابتدا کال‌ها را به محیط کشت تعلیقی MS دارای تنظیم کننده رشد ۴،۲-D و کینتین هر یک با غلظت ۰/۵ میلی گرم 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 زِنک و همکاران ۱۹۹۱معرفی شده بود. محیط LS دارای ۵۰ گرم در لیتر ساکارز ۱/۱۲۵ میلی گرم در لیتر BA و ۰/۱۷۵ میلی گرم در لیتر IAA بود (۲۴).

جهت کشت سلولی از برگ‌های پیچ تلگرافی، 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 مورد پژوهش برای سنجش آلکالوئیدهای آجمالیسین، سرپانتین و آلکالوئید کل در وزن خشک گیاه، در طی ۴ دوره زمانی۱۰ روزه مورد استفاده قرار گرفتند (۲۸).

کشت مزرعه

برای این منظور ۲۷ کرت یک متر مربعی را انتخاب و در اواسط بهار مبادرت به کاشت بذرها به مقدار دو گرم در هر کرت شد و کرت ها بطور مرتب و روزانه آبیاری شدند. هورمون های اکسین و سیتوکنین در سه غلظت (۰/۰،۵/۱ و۱/۰ میلی گرم 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، تنظیم کننده رشد پاشی آغاز 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 ۱٤ روزه از گیاهان انجام شد. پس از برداشت، گیاهان در دمای معمولی اتاق (۲۵ درجه سانتیگراد) خشک شده و سپس آلکالوئیدها استخراج، و سنجش شدند (۲۷).

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 کرت های مورد تحقیق انجام گردید، پس از طی مرحله رشد گیاه، عملیات عصاره گیری انجام گردید و ترکیبات مورد نظر با استفاده از روش اسپکتروفلوئوریمتری مورد سنجش قرار گرفت (۲۹)، نتایج بین گروهی با استفاده از آزمون ANOVA و تست های تعقیبی شف درسطح احتمال ۱٪ مورد سنجش و مقایسه با هم قرار گرفت (۲۹).

روش استخراج و آماده سازی مخلوط واکنش آنزیمTDC

این متد بر اساس روش فلوئوریمتری سنجش مقدار تریپتامین در محیط کشت انجام می شود، حلال در این روش مخلوط اتیل استات با توجه به وزن ماده تر اولیه مصرف می شود. سنجش بیوسنتز تریپتامین در محیط کشت در مدت زمان ۲۰ الی ۳۰ دقیقه، در دوره های زمانی۰، ۲۰ و٤۰ روز بررسی شده است، فعالیت این آنزیم به کوآنزیم پیرودکسال فسفات (ویتامین B٦) وابسته بوده، که فعالیت غیر برگشتی و یک طرفه آنزیم را کاتالیز می کند. دراین روش افزایش فعالیت آنزیم با میزان افزایش تریپتامین در محیط نشان داده می شود، آنزیمTDC شاهراه اصلی در میانه مسیرهای بیوسنتز مواد اولیه و متابولیت های ثانویه می باشد. سرعت فعالیت آنزیم با روش ها مختلف از جمله اتورادیوگرافی وHPLC که به ترتیب دارای خطرات جانبی ناشی ازتابش پرتوهای مضر، وهزینه بسیار بالا بوده که روش اسپکتروفلوئوریمتری بسیارسریعتر، ارزانتر و به همان اندازه دقیق می باشد (۳۰).

ابتدا با فیلتر کردن نمونه‌های کشت سلول اولیه اندام های پیچ تلگرافی حدوداً دو گرم ازماده تر، جدا و با روش استخراجی (۵) آماده سازی شدند، ویا دو گرم از ماده تر کشت بافت و گیاهان کشت شده در مزرعه توزین گردید. برگ ها، ساقه های جوان و مسن پیچ تلگرافی به طور جداگانه با آب مقطر سرد دو بار شستشو و به قطعات کوچک تقسیم کرده، سپس دو گرم از وزن تر به دست آمده با دو حجم پلی وینیل الکل و پلی پیرولیدون، ۲ میلی لیتر بافر فسفات ۰/۱مولار، ۷/pH۵ حاوی ۵ میلی مول مرکاپتواتانول و ۵ میلی مول تیوره و ۱ میلی مول EDTA به مدت ۱۰ دقیقه تکان داده و سپس بمدت ۳۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰rpm سانتریفیوژ نموده، بخش شناور بعنوان منبع آنزیم تریپتوفان دکربوکسیلاز قابل استفاده می باشد.

مخلوط واکنش شامل:L -تریپتوفان، تریپتامین هیدروکلراید و پیریدوکسال فسفات بوده، ابتدا محلول های استاندارد تریپتامین در غلظت های ۰/۵ الی ۱۰ میکرومول تهیه و با اسپکتروفلوریمتری در طول موج های ۲۸۰ و ۳۵۰ نانومتر به ترتیب طول موج تحریک و طول موج خاموشی لومینانس تریپتامین درحلال آب توسط دستگاه اسپکتروفلوئوریمتر مدل (Perkin-Elmer.Lsa-B۵) با فاکتور تثبیت ۱,۰۰۰ قرائت شده و نموداراستاندارد به دست آمد. درهر سنجش سه و نیم میلی لیتر از محلول استاندارد در مخزن A وارد و۰/۵۷ الی ۱۱/٤ و میکرومول محلول تریپتامین تهیه شده از آب سه بار تقطیر شده آماده، و در مخزن B ، بافر فسفات سدیم ۰/۱ مولار با pH ۸/۵ که حاوی ۵ میلی لیتر محلول ۵میلی مول بتا-مرکاپتواتانول و گلیسرول۱۰٪ بوده اضافه نموده (لازم به ذکر است بلانک فاقد تریپتامین است)، سپس مخلوط L-تریپتوفان و محلول فاز آبی تریپتامین را با غلظت‌های ۲ الی ٤۰ نانومول با ۱ میلی لیتر آب سه بار تقطیر شده و ۱ سی سی بافر فسفات سدیم ۰/۱ مولار با pH۸,۵ حاوی ۱ میلی مول تریپتوفان و ۱ میلی مول پیردوکسال فسفات، با افزودن سود ٤ نرمال pH را به ۱۱ رسانده،

سپس ۴ میلی لیتر از مخلوط بدست آمده را با ۱۰ میلی لیتر اتیل استات مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه بهم زده فاز بالای جداسازی، و برای اسپکتروفلوئوریمتری آماده شد، سپس کروماتوگراف های بدست آمده ثبت شدند (۱۰) (تمام مراحل استخراج باید درحمام یخ در دمای بین ۰ تا ۴ درجه سانتی گراد انجام شود).

تست کاتالیتیکی آنزیمTDC (۳۱)

تست کاتالیتیکی آنزیم بر اساس G-sephadex ۲۵ تیوره ثبت گردید. ۱ میلی لیتر از مخلوط آنزیم را با ۱ میلی لیتر بافر فسفات سدیم ۰/۱ مولار با pH۵ ۸ حاوی ۳/۵ میلی مول مرکاپتواتانول، ۱ میلی مول تریپتوفان، ۱ میلی مولار و ۲۰ میکروگرم از بخش هوموژن جدا شده، بمدت ۴۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد در حالت لرزش مداوم قرار داده و سرعت فعالیت آنزیم را در بازه های زمانی ۵ الی ۴۰ دقیقه، پس از اضافه نمودن ۲ میلی لیتر سود ٤ 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 فلوئورسانس توسط دستگاه اسپکتروفلوئوریمتر در طول موج های ۲۸۰ و ۳۵۰ نانومتر لومینانس تریپتامین ثبت و نمودارهای مربوطه رسم شدند (۰/٤ میکرولیتر تریپتامین با غلظت ٤ نانومول به صورت محلول در بازه های زمانی مشخص اضافه شد). اندازه گیری مقدار تریپتامین بر اساس شیب خط برگشت (رگرسیون) صورت گرفت، و رسوب به دست آمده به ٤۰ میلی لیتر سولفات آمونیوم + تیوره از ستون عبور داده و برای تعیین سرعت فعالیت آنزیم TDC در شرایط بدون نمک در غلظت های پنج درصد پلی اتیلن گلیکول استفاده شد.

نتایج :

بررسی تاثیر NAA و IAA بر روی فعالیت آنزیم TDC

بررسی نتایج حاصل از کشت اندام های مختلف پیچ تلگرافی نشان داد که بین میزان فعالیت آنزیم در این اندام‌ها اختلاف وجود دارد. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت NAA و IAA میزان فعالیت آنزیم افزایش یافته، به گونه ای که از غلظت ۰/۱ الی ۰/۵ میلی گرم بر لیتر تنظیم کننده رشد IAA به ترتیب کمترین و بیشترین و برای NAA غلظت ۰/۵ میلی گرم در لیتر بیشترین میزان فعالیت آنزیم مشاهده شد (نمودارهای ۱ و ۲). برای سیتوکنین، KIN وBA هر دو در غلظت ۱/۰ میلی گرم در لیتر در تمامی محیط های کشت افزایش میزان فعالیت آنزیم دیده شد، اما این افزایش در محیط سوسپانسیون دو مرحله ای محسوس تر بود (نمودارهای ۳ و ٤). در بررسی اثر متقابل هورمون مصرفی در اندام های مختلف بر میزان فعالیت آنزیم مشاهده شد، که استفاده از برگ مسن پیچ تلگرافی بیشترین و ساقه جوان آن کمترین تغییر در فعالیت آنزیم را در کشت بافت نشان داد. کشت سوسپانسیون دو مرحله ای عملکرد بهتری نسبت به سایر محیط ها از خود نشان داد. بررسی ها نشان داد اثر متقابل اکسین ها در این تحقیق با افزایش تعداد روز استفاده از تیمارها تا روز بیستم نسبت به شاهد افزایش سرعت فعالیت آنزیم دیده شد، اما از روز۲۰ام به بعد در هورمون های IAA و NAA با کاهش محسوس سرعت فعالیت آنزیمTDC روبرو شد، این کاهش در تیمار های سیتوکنینی دیده نشد (نمودار ۱).

بررسی تاثیر تنظیم کنندهای رشد بر روی فعالیت آنزیم TDC

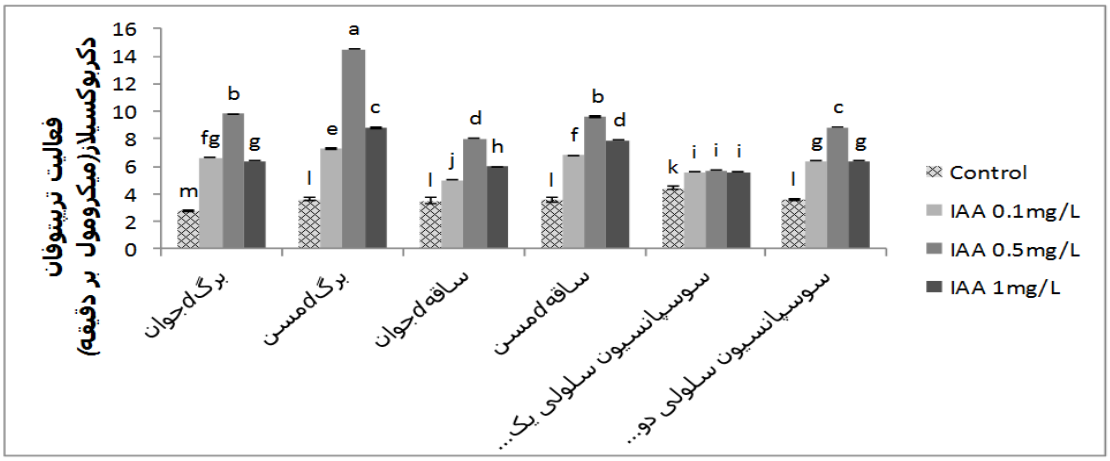
نتایج حاصل نشان داد که استفاده از روش های مختلف کشت بافت، سوسپانسیونی و مزرعه باعث تغییر سرعت فعالیت آنزیمTDC شده، به گونه ای که استفاده از کشت سوسپانسیونی همراه با استفاده از هورمون های مورد مطالعه در این تحقیق بیشترین تاثیر را نسبت به دو روش دیگر کشت برای افزایش سرعت عملکرد آنزیم TDC نشان داد. در بررسی اثر متقابل سیتوکنین ها مورد مطالعه در این تحقیق نیز مشاهده شد که با افزایش تعداد روز استفاده از روز ۲۰ الی ٤۰ روز نسبت به شاهد

افزایش سرعت عملکرد دیده شد، اما از روز بیستم به بعد در اکسین ها با کاهش محسوس سرعت فعالیت آنزیم TDC مواجه شدیم (نمودار ٤). بررسی ها نشان داد که استفاده از BA و KIN در غلظت ۱/۰ میلی گرم در لیتر بیشترین تاثیر را بر افزایش سرعت آنزیم نشان دادند (نمودارهای ۳ و ٤). در مقابل، استفاده از IAA کمترین تاثیر افزایشی بر سرعت آنزیم را نشان داد. در بررسی مناسب ترین غلظت مورد استفاده برای اکسین ها، IAA و NAA ۰/۵ میلی گرم در لیتر بود (نمودار ۵). همچنین، بررسی نتایج حاصل از تاثیر انواع تنظیم کننده های رشد و روش های مختلف کشت نشان داد که به ترتیب استفاده از کشت سوسپانسیونی و مزرعه همراه با استفاده از هورمون های مورد مطالعه در این پژوهش بیشترین تاثیر را نسبت به روش کشت بافت بر سرعت فعالیت آنزیم تریپتوفان دکربوکسیلاز نشان داده است (نمودار ۵). بررسی جدول ۱ بدست آمده از انواع کشت و اندام های متفاوت گیاه پیچ تلگرافی نشان داد برگ های مسن گیاه در کشت بافت و کشت سلولی دو مرحله ای بهترین عملکرد را در تاثیر پذیری از تنظیم کننده های رشد بر روی سرعت فعالیت آنزیم TDC نشان دادند. همچنین، نتایج حاصل از مقایسه همه گروه‌های کشت نشان داد که اختلاف معنی داری در میزان فعالیت آنزیم تحت تاثیر هورمون های گروه اکسین در کشت مزرعه نسبت به سایر گروه‌ها وجود ندارد (نمودار ۲).

جدول ۱: بررسی نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده های مربوط به تاثیر هورمون IAA بر میزان فعالیت آنزیم تریپتوفان دکربوکسیلاز (TDC) در کشت بافت و کشت سوسپانسیونی ۱ و ۲ مرحله ایی اندام های پیچ تلگرافی برگ درشت.

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
نوع بافت	۵	۲۴/۰۱**
IAA	۳	۱۷۸/۹۱**
نوع بافت * IAA	۱۵	۷/۵۸**
خطا	۴۸	۰/۰۱۵

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

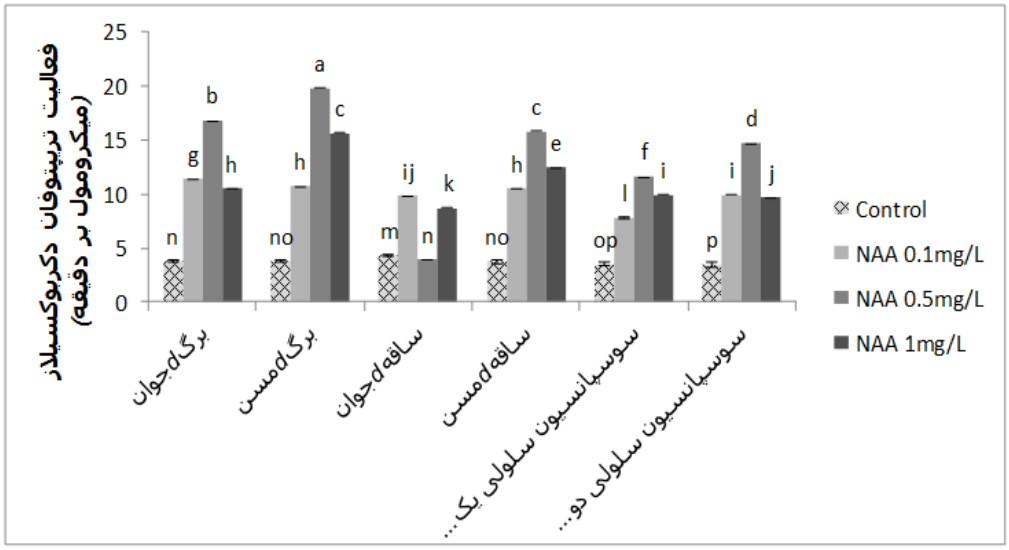


نمودار ۱: مقایسه نتایج حاصل از تاثیر هورمون IAAبر میزان فعالیت آنزیم تریپتوفان دکربوکسیلاز(TDC) در کشت بافت و کشت سلولی ۱ و ۲ مرحله ایی اندام های پیچ تلگرافی برگ درشت

جـدول ۲ - بررسـی نتایـج حاصـل از تجزیـه واریانـس داده هـای مربـوط بـه تاثیـر هورمـون NAA بـر میـزان فعالیـت آنزیـم تریپتوفـان دکربوکسـیلاز(TDC) در کشـت بافـت و کشـت سوسپانسـیونی ۱ و ۲ مرحلـه ایـی انـدام هـای پیـچ تلگرافـی بـرگ درشـت

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
نوع بافت	۵	۴۹/۴۴**
NAA	۳	۳۲۳/۲**
نوع بافت * NAA	۱۵	۲۱/۹۲**
خطا	۴۸	۰/۰۱۵

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

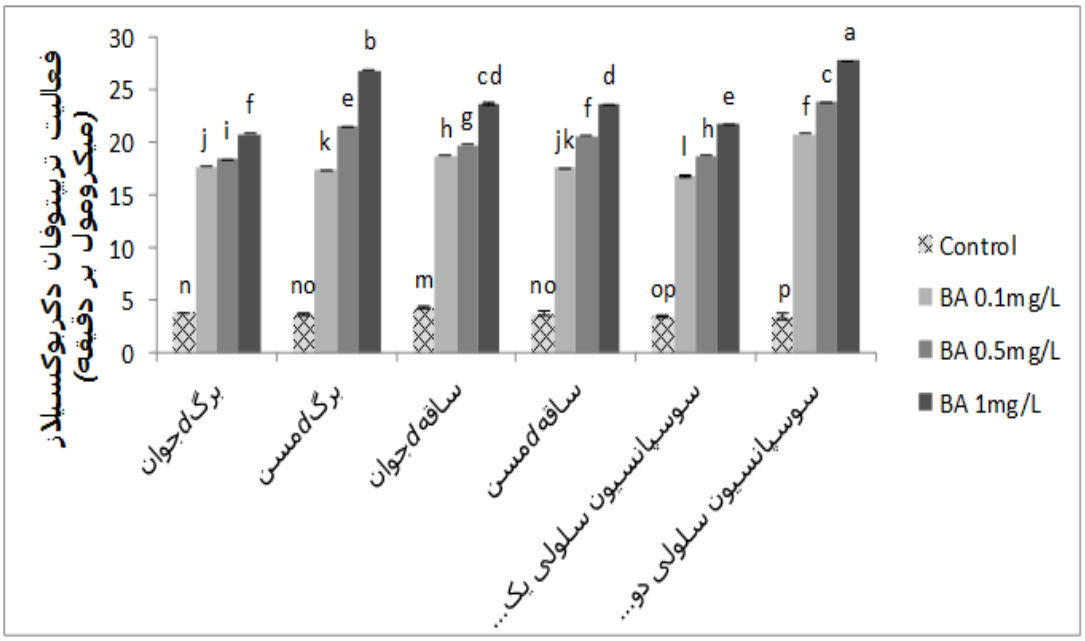


نمـودار ۲: مقایسـه نتایـج حاصـل از تاثیـر هورمـون NAA بـر میـزان فعالیـت آنزیـم تریپتوفـان دکربوکسـیلاز(TDC) در کشـت بافـت و کشـت سـلولی ۱ و ۲ مرحلـه ایـی انـدام هـای پیـچ تلگرافـی بـرگ درشـت.

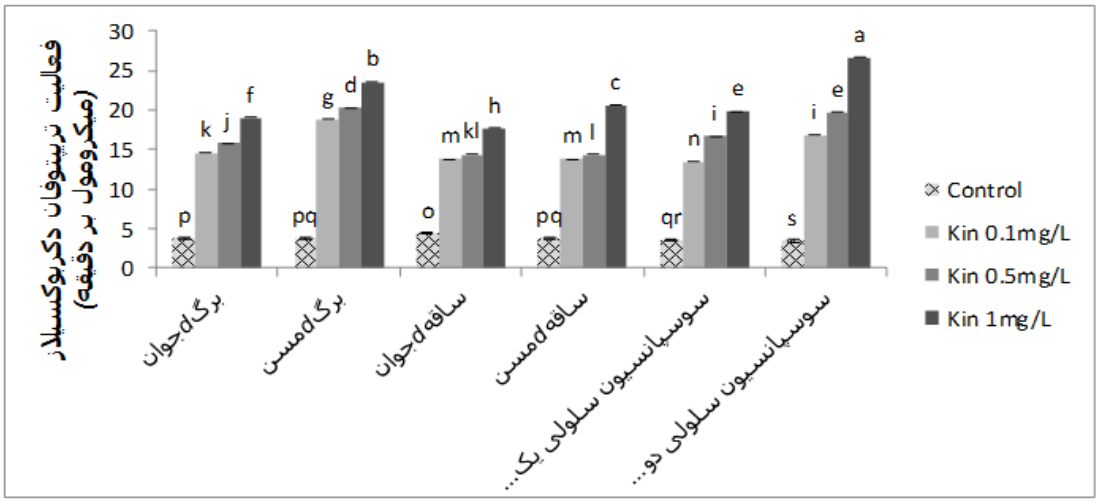
جـدول ۳ - بررسـی نتایـج حاصـل از تجزیـه واریانـس داده هـای مربـوط بـه تاثیـر هورمـون BA بـر میـزان فعالیـت آنزیـم تریپتوفـان دکربوکسـیلاز(TDC) در کشـت بافـت و کشـت سوسپانسـیونی ۱ و ۲ مرحلـه ایـی انـدام هـای پیـچ تلگرافـی بـرگ درشـت

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
نوع بافت	۵	۲۴/۹۱**
BA	۳	۱۴۳۱/۵۴**
نوع بافت * BA	۱۵	۵/۶۲**
خطا	۴۸	۰/۰۱۶

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



نمودار ۳: مقایسه نتایج حاصل از تاثیر هورمون BAبر میزان فعالیت آنزیم تریپتوفان دکربوکسیلاز(TDC) در کشت بافت و کشت سلولی ۱ و ۲ مرحله ایی اندام های پیچ تلگرافی برگ درشت



نمودار ٤: مقایسه نتایج حاصل از تاثیر هورمون KINبر میزان فعالیت آنزیم تریپتوفان دکربوکسیلاز(TDC) در کشت بافت و کشت سلولی ۱ و ۲ مرحله ایی اندام های پیچ تلگرافی برگ درشت

جدول ٤: بررسی نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده های مربوط به تاثیر هورمون KIN بر میزان فعالیت آنزیم تریپتوفان دکربوکسیلاز(TDC) در کشت بافت و کشت سوسپانسیونی ۱ و ۲ مرحله ایی اندام های پیچ تلگرافی برگ درشت

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
نوع بافت	۵	۴۰/۷۷**
Kin	۳	۹۹۵/۹۴**
نوع بافت * Kin	۱۵	۸/۵۸**
خطا	۴۸	۰/۰۱۶

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

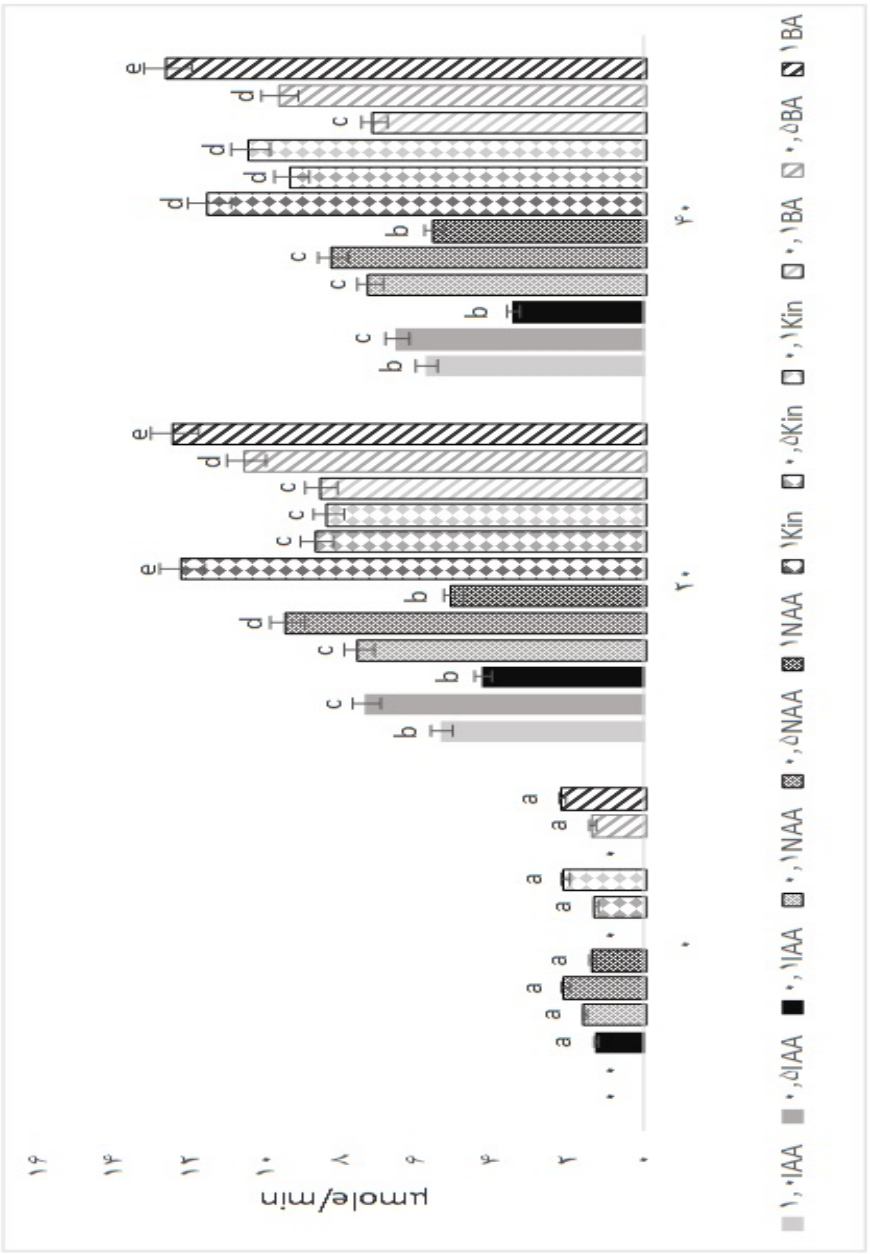
بررسی تاثیر قندها بر روی فعالیت آنزیم TDC در گیاه پیچ تلگرافی برگ درشت

در بررسی اثر قند ساکارز در غلظت های مختلف نتایج بدست آمده نشان داد که غلظت ٦٪ قند ساکارز بیشترین اثر افزایشی در فعالیت (TDC) در محیط کشت سلولی دو مرحله ای داشته، (جدول و نمودار ٦) و همچنین کمترین اثر قند ساکارز در تمامی غلظت ها در کشت بافت برگ های جوان پیچ تلگرافی بود. همچنین مقایسه آنالیز واریانس نتایج بدست آمده از غلظت های مختلف قندهای گلوکز و فروکتوز نشان داد به ترتیب قندهای گلوکز (جدول و نمودار ۷) و فروکتوز (جدول و نمودار ۸) در غلظت ٤٪ در محیط کشت سلولی دومرحله ای بیشترین تاثیر را بر روی فعالیت آنزیم داشته است. همچنین برگ مسن پیچ تلگرافی بیشترین افزایش فعالیت آنزیمTDC در هر دو مدل کشت بافت و سوسپانسیونی را نشان داده است. در استفاده از تیمارهای قند نتایج نشان داد که استفاده از غلظت ٦٪ قند ساکارز و ٤٪ قندهای گلوکز و فروکتوز بیشترین تاثیر بر افزایش فعالیت آنزیم در همه نمونه های گیاهی و انواع کشت بافت و سلول از خود نشان داد. همچنین در بررسی اثر متقابل قند مورد استفاده در اندام های مختلف بر میزان فعالیت آنزیم مشاهده شد، که استفاده از کشت بافت برگ مسن بیشترین و کشت بافت ساقه جوان پیچ تلگرافی کمترین تاثیر را بر سرعت فعالیت آنزیم دارد. همچنین کشت سوسپانسیونی دو مرحله ای نتایج بهتری از خود نشان داد (جدول٦ و نمودار ۷).

بررسی تاثیر اسید آمینه تریپتوفان بر روی فعالیت آنزیم TDC در گیاه پیچ تلگرافی

بررسی و مقایسه آنالیز واریانس در غلظت های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم درلیتر اسید آمینه تریپتوفان نشان داد که غلظت ۱۰۰ میلی گرم 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 اندام های کشت شده و در تمامی محیط های کشت گیاه مشاهده شد. روند افزایشی بویژه در محیط کشت سوسپانسیون سلولی دو مرحله ای (در سطح ۱٪ آماری) افزایش بیشتری نسبت به سایر محیط های کشت پیچ تلگرافی را نشان داد. همچنین مقایسه نتایج مشخص نمود که غلظت ۲۰۰ میلی گرم 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 اندام های متفاوت گیاه پیچ تلگرافی نشان داد که، برگ های مسن در کشت بافت و کشت سلولی دو مرحله ای 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 پیچ تلگرافی مشاهده شد که بیشترین وکمترین تاثیر پذیری از تیمارها در میزان فعالیت

آنزیم به ترتیب در برگ های مسن و ساقه جوان نسبت به سایر اندام های پیچ تلگرافی مشاهده شد. در تمامی مدل های کشت افزایش غلظت تریپتوفان باعث کاهش تا ۴۵درصد فعالیت آنزیم در گروه های 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.

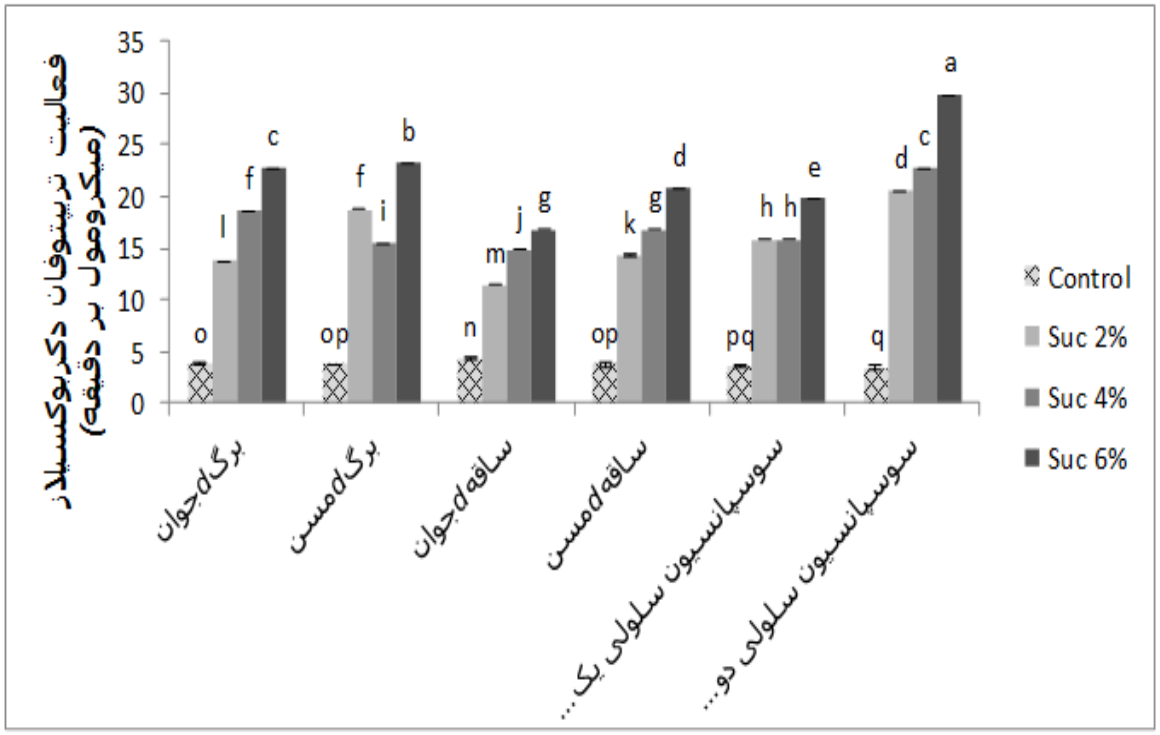


نمودار ۵: مقایسه نتایج حاصل از تاثیر انواع تنظیم کننده های رشد بر سرعت فعالیت آنزیم تریپتوفان دکربوکسیلاز TDC گیاه پیچ تلگرافی برگ درشت در کشت بافت، کشت سوسپانسیونی و کشت مزرعه

جدول ٦: بررسی نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده های مربوط به تاثیرقند ساکارز بر میزان فعالیت آنزیم تریپتوفان دکربوکسیلاز(TDC) در کشت بافت و کشت سوسپانسیونی ۱ و ۲ مرحله ایی اندام های پیچ تلگرافی برگ درشت

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
نوع بافت	۵	۷۱/۲**
SUC	۳	۱۱۰۳/۷۲**
نوع بافت * SUC	۱۵	۱۵/۶۸**
خطا	۴۸	۰/۰۱۶

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

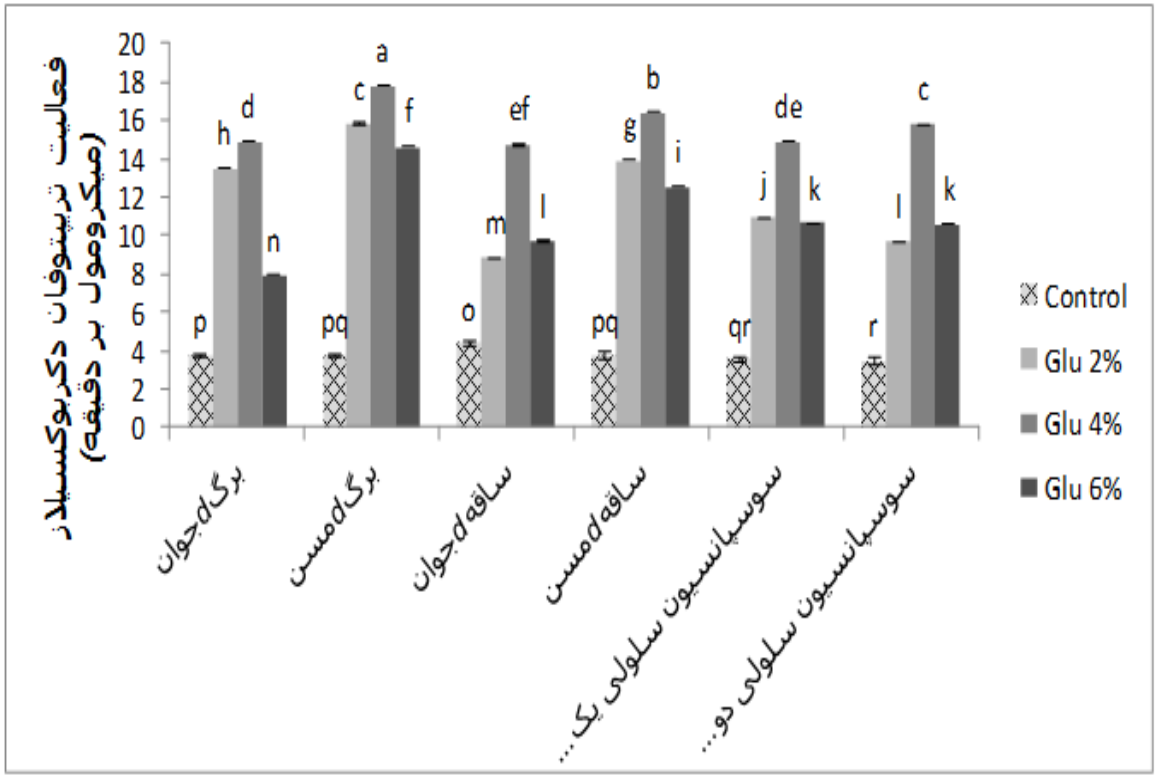


نمودار ٦: مقایسه نتایج حاصل از تاثیرقند ساکارز بر میزان فعالیت آنزیم تریپتوفان دکربوکسیلاز(TDC) در کشت بافت و کشت سلولی ۱ و ۲ مرحله ایی اندام های پیچ تلگرافی برگ درشت

جدول ۷: بررسی نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده های مربوط به تاثیرقند گلوکز بر میزان فعالیت آنزیم تریپتوفان دکربوکسیلاز(TDC) در کشت بافت و کشت سوسپانسیونی ۱ و ۲ مرحله ایی اندام های پیچ تلگرافی برگ درشت

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
نوع بافت	۵	۲۲/۶۶**
Glu	۳	۴۵۳/۶۴**
نوع بافت * Glu	۱۵	۶/۷۸**
خطا	۴۸	۰/۰۱۵

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

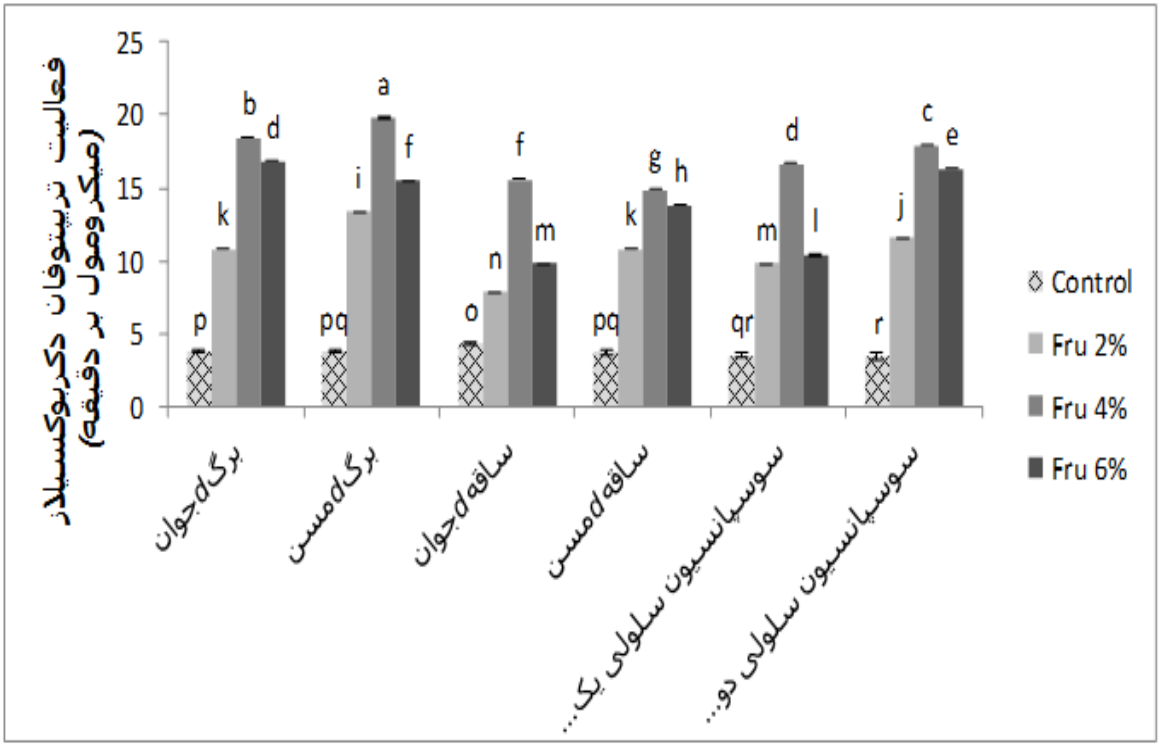


نمودار ۷: مقایسه نتایج حاصل از تاثیرقند گلوکز بر میزان فعالیت آنزیم تریپتوفان دکربوکسیلاز(TDC) در کشت بافت و کشت سلولی ۱ و ۲ مرحله ایی اندام های پیچ تلگرافی برگ درشت

جدول ۸: بررسی نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده های مربوط به تاثیرقند فروکتوز بر میزان فعالیت آنزیم تریپتوفان دکربوکسیلاز(TDC) در کشت بافت و کشت سوسپانسیونی ۱ و ۲ مرحله ایی اندام های پیچ تلگرافی برگ درشت

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
نوع بافت	۵	۲۵/۹۷**
Fru	۳	۵۸۹/۰۶**
نوع بافت * Fru	۱۵	۷/۳۳**
خطا	۴۸	۰/۰۱۶

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

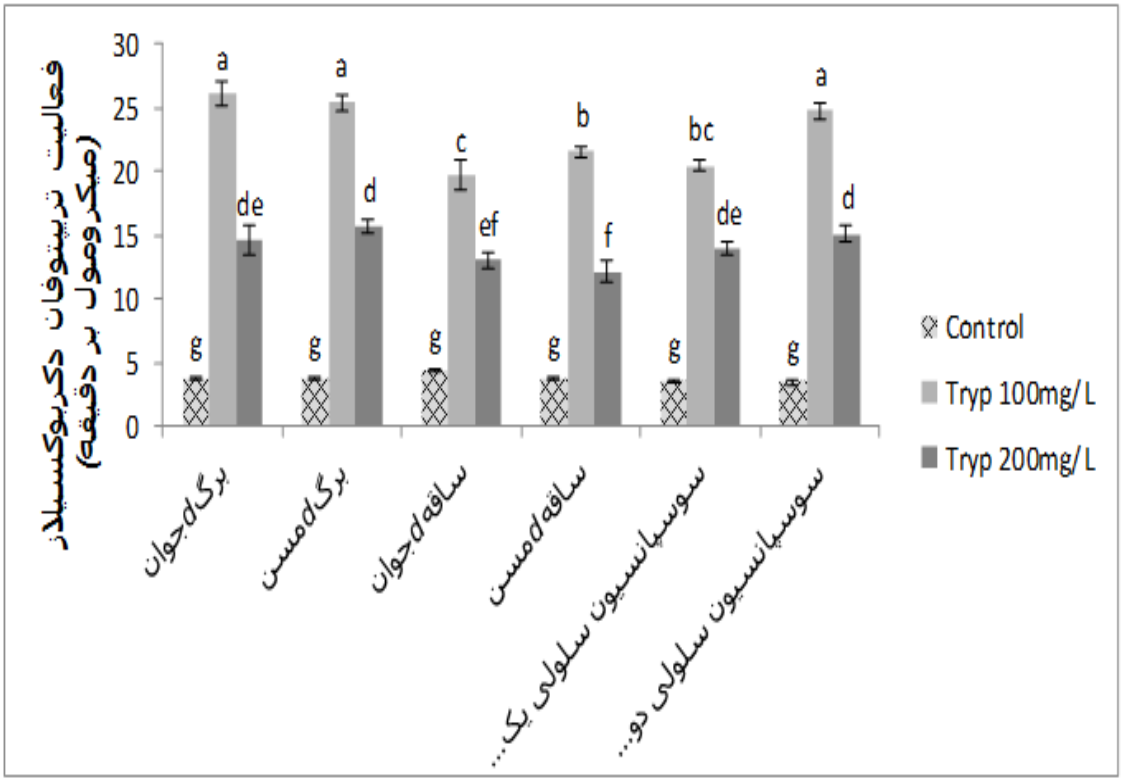


نمودار ۸: مقایسه نتایج حاصل از تاثیرقند فروکتوز بر میزان فعالیت آنزیم تریپتوفان دکربوکسیلاز(TDC) در کشت بافت و کشت سلولی ۱ و ۲ مرحله ایی اندام های پیچ تلگرافی برگ درشت

جدول ۹: بررسی نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده های مربوط به تاثیر اسید آمینه تریپتوفان بر میزان فعالیت آنزیم تریپتوفان دکربوکسیلاز(TDC) در کشت بافت و کشت سوسپانسیونی ۱ و ۲ مرحله ایی اندام های پیچ تلگرافی برگ درشت

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
نوع بافت	۵	۱۳/۸**
Tryp	۲	۱۶۶۶/۴۶**
نوع بافت * Tryp	۱۰	۷/۳۰**
خطا	۳۶	۱/۳۳

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



نمودار ۹: مقایسه نتایج حاصل از تاثیراسید آمینه تریپتوفان بر میزان فعالیت آنزیم تریپتوفان دکربوکسیلاز(TDC) در کشت بافت و کشت سلولی ۱ و ۲ مرحله ایی اندام های پیچ تلگرافی برگ درشت

بحث :

به طور کلی می توان بیان نمود که اقدامات زیادي در مورد تولید آلکالوئیدها با استفاده از کشت هاي سوسپانسیون سلولي صورت پذیرفته و در مواردي نیز با کمك الیسیتورها و سایر استراتژیها موفقیت هایي حاصل شده است، ولي کمتر به مسیرها و شاهراه های متابولیسمی پرداخته شده و به طور کلي براي ترکیبات فیتوشیمیایي مختلف مانند آجمالیسین، سرپانتین، هیوسیامین، اسکوپولامین، وین بلاستین و وین کریستین برخلاف آجمالیسین و سرپانتین نتایج خوبي در کشت سلول دیده نشده است (۱۷, ۳۲). درمورد تنظیم کننده های رشد، اکسین ها بازدارنده بیوسنتز آلکالوئیدها درکشت تعلیقی هستند (۱۶, ۳۳) هورمون های IAA و NAA بیوسنتز بسیاری از متابولیت های ثانویه را در کشت تعلیقی کاهش می‌دهند (۳۴, ۳۵). ویژگی های متفاوت تونوپلاست برای جذب متابولیت های ثانویه مختلف توسط Deus & Zenk (۲۳) گزارش شده است که فاکتور مهمی در تنظیم شدت جذب و ترشح است، ولی با این وجود چگونگی دخالت اکسین ها در ترشح و جذب بتدریج شناخته شده است (۲۳).

سیتوکنین ها بویژه KIN و BA نقش مهمی را در واکنش های فیزیولوژیکی سلول های گیاهی بازی می کنند، به عنوان مثال در تنظیم نقش سلولی و کنترل ریخت زایی و جنین زایی شرکت دارند (۳۶) همچنین آزمایش های متعددی تاثیر آنها را بر تولید متابولیت های ثانویه نظیر بتاسیانین ها، آنتوسیانین‌ها (۳۷) ایندول آلکالوئیدها (۲) اثبات کرده اند. براساس فرضیه، جریان کلسیم از غشای پلاسمایی برای تجمع آلکالوئیدها ضروری است. Ellioth و El-syeid (۳۸و۴۲)نشان دادند تنظیم متابولیسم ثانویه توسط سیتوکینین ها با عبور کلسیم ارتباط دارد. Merilon و همکاران (۳۹و۴۰) با استفاده از: ۱) مسدودکننده‌های ورود کلسیم نظیر (نفی دی پین)nifedipine و ۲) بازدارنده های 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 می کنند (۴۰) و ٤) یون کبالت (Co^{+2}) که بازدارنده عبور کلسیم می‌باشد، ارتباط عبور کلسیم و جلوگیری از جایگاه های فعال آنزیم TDC که توسط سیتوکینین ها برای استقرار تریپتوفان محافظت می شود را اشغال می کند . مطالعات نشان داد که این بازدارنده ها می توانند اثر افزایش دهنده سیتوکنین ها در سرعت فعالیت آنزیم TDC را خنثی کنند (۱۰). نتایج نشان می دهد با کاهش سطح فعالیت آنزیم تریپتوفان دکربوکسیلاز مسیرهای واکنش بعدی نیز بویژه آنزیم استریکتوزیدین سنتآز (S.S) تا حد زیادی دستخوش کندی و بازدارندگی در سطح ماده اولیه آنزیم می شود، که نهایتا منتهی به کاهش سطح آلکالوئیدها می گردد (۴۱). Dong و همکاران (۴۲) 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 می شود. در آزمایش هایی که به وسیله ای Dong و همکاران (۴۳) روی پروانش و پیچ تلگرافی انجام گرفت شدت مصرف ساکارز بسیار بیشتر از مونوساکارید ها بوده است، که نشان می‌دهد جذب ساکارز توسط سلول ها به هر دو روش انجام می گیرد. وقتی که گلوکز و فروکتوز مورد استفاده قرار گیرند شدت رشد و تولید زی‌توده کم شده، اما سرعت فعالیت آنزیم TDC افزایشی هماهنگ با بیوسنتز کاتارانتین (در حدود ۲ برابر) از خود نشان داد. ظاهراً علت افزایش تولید ناشی از اسمزیته بیشتر (در واحد وزن) مونوساکاریدها در مقایسه با ساکارز نیست. اگرچه تولید آلکالوئیدها در محیط دارای مونوساکاریدها بیشتر می‌شود، اما مقدار زی توده تولید شده بسیار کاهش می یابد، اما تعداد ایدیوبلاست ها که جایگاه اصلی آنزیم TDC افزایش داشته و به همین دلیل در کشت تارهای کشنده در سیستم کشت تعلیقی دو مرحله ای نسبت به کشت یک مرحله‌ای سلول های مورد نظر بطور محسوسی افزایش یافتند و همچنین سلول های که در محیط دارای فروکتوز و گلوکز کشت شدند، نیز توانستند در کشت دو مرحله ای تعداد بالای ایدیوبلاست ها را حفظ نموده و محیط های حاوی کشت سلولی تارهای کشنده متفاوت با کشت یک مرحله ای در محیط

دارای تعداد ایدیوبلاست های 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 دکربوکسیلاز TDC، مشخص شده که در تیمارهای بالای غلظت تریپتوفان به دلیل تداخل مسیرهای بیوسنتزی اکسین IAA که معمولا از ۳ مسیر انجام می شود، Sangwan و Kumar (۳۱ و ۳۵) نشان دادند که غلظت های بالاتر از۱۰۰ میلی گرم در لیتر تریپتوفان در محیط های کشت تعلیقی توسط یک دکربوکسیلاسیون اکسیژناسیون دو مرحله ای و مونواکسیژناسیون دنیتریلاسیون (transaminase-mono oxygenase) اسید آمینه تریپتوفان به ایندول استیک اسید تبدیل می‌شود (٤٤) که خود این ماده در محیط های کشت مورد نظر باعث پایین آمدن راندمان بیوسنتز ایندول آلکالوئیدها در سلول های کشت برگ مسن پروانش و پیچ تلگرافی شده، و از این طریق پس از ۵ الی ۱۰ روز از آغاز تیمار تا حد زیادی از فعالیت آنزیم TDC در مسیر بیوسنتزی تریپتامین کاسته می شود (۷). پژوهش های انجام شده نشان داد آنزیم TDC یکی از مهمترین آنزیم ها در بین مسیرهای مواد اولیه وثانویه است، Neo و Berlin۱۹۸٤ (۷) که اولین بار آنزیم TDC را استخراج نمودند، جایگاه واکوئلی برای آن مشخص کرده، اما تحقیقات نشان داد که TDC یک آنزیم سیتوزولی با جرم مولکولی ۱۱۵ کیلودالتون دارای دو زیرواحد بوده که کوآنزیم پیرودوکسال فسفات برای فعالیت آن لازم و ضروری است (٢٤). در مورد تاثیر غلظت اسید آمینه تریپتوفان بر روی فعالیت آنزیم تریپتوفان دکربوکسیلاز TDC، نتایج با پژوهش Kazemzadeh و همکاران(۱۰) در پروانش مشخص همخوانی داشته و مشخص نمودند که در تیمارهای بالای غلظت تریپتوفان به دلیل تداخل مسیرهای بیوسنتزی اکسین (IAA) که معمولا از ۳ مسیر انجام می شود، بر کاهش فعالیت آنزیم تاثیرگذار داشته، همچنین Sangwan و Kumar (۳۱) نشان دادند که غلظت های بالاتر از۱۰۰ میلی گرم در لیتر تریپتوفان در محیط های کشت تعلیقی توسط یک دکربوکسیلاسیون و اکسیژناسیون دو مرحله ایی و سپس دنیتریلاسیون(transaminase-monoOxygenase) اسید آمینه تریپتوفان به ایندول استیک اسید تبدیل می شود، که خود این ماده در محیط های کشت مورد نظر باعث پایین آمدن راندمان بیوسنتز ایندول آلکالوئیدها در سلول های کشت برگ مسن پروانش و پیچ تلگرافی شده (۱۰)، واز این طریق پس از ۵ الی ۱۰ روز از آغاز تیمار تا حد زیادی از فعالیت آنزیم TDC در مسیر بیوسنتزی تریپتامین کاسته می شود (۲۷). همچنین Kazemzadeh و همکاران (۱۰ و ۱۱) نشان دادند که افزایش سطح سیتوکنین ها به دلیل فعال سازی مسیر های وابسته به کالمودولین سبب افزایش فعالیت آنزیم TDC شده که در تمامی موارد با نتیجه بدست آمده از پژوهش اخیر همخوانی دارد(٦). افزایش سطح اکسین برای سلول های کشت بافت ساقه پیچ تلگرافی به دلیل فعال نمودن رفتارهای تقسیمی در سلول های کالوس را به سمت افزایش تعداد سوق داده ولذا میل به بیوسنتز آلکالوئیدها بویژه آلکالوئیدهای اندولی در این کال ها کاهش می یابد (۳). نتایج نشان میدهد با کاهش سطح فعالیت آنزیم تریپتوفان دکربوکسیلاز مسیرهای واکنش بعدی نیز تا حد زیادی دستخوش کندی و بازدارندگی در سطح ماده اولیه آنزیم می شوند، که نهایتا منتهی به کاهش سطح بیوسنتز آلکالوئیدها می گردد (۲۵). از آنجایی که ویندولین یکی از پیش سازهای اندول آلکالویید دیمری وین بلاستین و وین کریستین می باشد دو ترکیب اخیر نیز در کشت سلولی یافتن شده‌اند ولی اگر به محیط کشت ویندولین و کاتارانتین افزوده شود سلول‌ها قادر به سنتز آلکالوئید های دیمری می باشند (۱). 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 هورمون های IAA و NAA اثر کاهنده این هورمون ها را بر آنزیم TDC مشخص کند (٤١).

این کاهش فعالیت آنزیم با افزودن ساکارز، گلوکز و فروکتوز به محیط کشت برگ های لپه ای پروانش و پیچ تلگرافی (۱۰) با برداشتن اثر بازدارندگی اکسین ها در کاهش ترجمه از mRNA برطرف می شود (٤٠). همچنین در پژوهشی مشابه توانستند اثر بازدارندگی اکسین ها بر ترجمه mRNA، با افزودن مقادیر ۰/۵ و ۱/۰ میلی

گـرم در لیتر سـیتوکنین هـا را افزایـش دهنـد (۳۸)، که همخوانی با نتایج بدسـت آمـده از این پژوهش را نشـان می دهد. نوردهي كشت هـاي گيـاهي اغلـب منجر بـه افـزايش تجمـع تركيبات ثانويه مي شود به ويژه هنگـامي كـه ايـن تركيبـات در اندام هاي هوايي گياهان توليد مي شوند. هـر چنـد كـه بيوسـنتز آلكالوئيدهاي تروپاني به ريـشه محدود شـده است، بـاز هـم گزارش هايي مبني بر اثرات مثبت نوردهي بر كشـت هـاي ريـشه و افزايش ايـن آلكالوئيدها وجود دارد (۱۸). بسـياري از اجزاي محيط كشـت از عوامل مهـم در رشـد و توليـد متابوليت هاي ثانويه مي باشـند. قندها عـلاوه بر منبع كـربن به عنوان تركيبـات ايجاد سـيگنال در توليد اينـدول آلكالوئيدهاي در كشـت هاي ريشـه عمل مي كننـد. هگزوكيناز و كلـسيم نيـز در انتقال سيگنال نقش دارند. مـسير سـيگنالي قند بـا تـأثيرات تنظيم كننده رشـد هاي گياهـي و نور برهم كنـش دارد. در حالي كـه اكسـين در حضور سـاكارز تأثير بازدارندگي بـر روي ژن pmt (PhosphoethanolamineN-methyltransferase) و اثـر افزاينده بـر فعليت ژن tdc از طريق افزايـش ترجمـه mRNA و بيوسـنتز آنزيم TDC دارد، كـه در تركيـب با سـوربيتول نقش مثبـت در توليد انـدول آلكالوئيدهاي پيچ تلگرافي نشـان داده اسـت (۳۲). در تحقيق Pavlovو همكاران گزارش شده كـه تـأثير منبع نيـتروژن و تنظيم كننده‌هاي رشـد مختلفـي مانند IAA و NAA در توليد آلكالوئيدها بيشـتر وابسـته به گونه بـوده و نقـش آن ها هنـوز كاملا مشـخص نبوده و احتمالاً در ناپايـداري mRNA و جلوگيـري از ترجمه آن اسـت (۷). Garittive و همـكاران (۲۶) و همچنيـن Yamazaki (۴۵)، پس از بررسـي تنظيم كننده‌هاي رشد مختلف بـر كـشت هـاي ريـشه مـوين H.muticus گـزارش نمودند كه كشت هاي ريشـه موين، غلظت هـاي ۰/۰۱ الی ۰/۰۵ ميكرومول اكسـين را در محيط كشـت به راحتي تحمل نمـوده و روي رشـد آن ها تأثير چنداني نداشته اسـت، اما تجمع آلكالوئيد در آنهـا نـسبت به ريشه هاي رشد يافته در شرايط عـادي از تنظيـم كننده رشـد به نصـف كاهش يافته اسـت، كه نشـان می دهد توليد آلكالوئيدها در كشـت بافت بسـتگی زيادی بـه تركيب محيط‌كشـت دارد (۲۴). اثـر فاكتورهای مختلـف مثـل منابع تغذيـه‌ای، تنظيـم كننده‌های رشـد و شرايط رشـد مختلـف بر توليـد تروپـان آلكالوئيدها در كشـت بافت مطالعه شـده است(۳۰). مشـخص شده است كـه انـواع و غلظت‌های مختلـف تنظيم كننده‌های رشـد مثل اكسـين‌ها و سـيتوكينين‌ها آثار مختلفی بر رشـد گياه و توليـد متابوليت‌هـای ثانويـه دارند. كشـت كالوس‌های برگـی گيـاه Datura stramonium توسـط Al-syeid و همكاران (۳۰)، افزايش رشـد و محتـوای آلكالوئيدی را در حضور غلظـت ۱ ميلی‌گرم در ليـتر NAA،Kin، ۲،۴D- و BA بـه تنهای يا به صورت متقابل نشـان داد. نقش مسـتقيمی برای اكسـين‌ها و سيتوكينين‌ها در مسـير متابوليسـمی تروپان آلكالوئيدها گزارش نشـده اسـت، ولی نتايـج مطالعات، وجود نقشـی غيرمسـتقيم را برای ايـن تنظيم كننده رشـدها ياد می‌كند. Kazemzadeh و همكاران نشـان دادنـد كه در حضور BA با افزايـش غلظتNAA ، افزايـش محتـوای آلكالوئيد-كل نسـبت به شـاهد مشاهده شده اسـت (۱۰).

نتیجه گیری :

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 می گردد. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که استفاده از روش-های مختلف کشت باعث تغییر در میزان فعالیت آنزیم می گردد، و این تغییرات در سطح احتمال ۵ درصد معنی دار است، نتایج نشان داد که به ترتیب استفاده از روش کشت در مزرعه و کشت سوسپانسیونی به نسبت کشت بافت پیچ تلگرافی، باعث افزایش سطح فعالیت آنزیم می گردد. در بررسی اثر متقابل غلظت ها نیز مشخص گردید که در همه تنظیم کننده رشد-ها 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 می گردید، همچنین قند ساکارز در غلظت ٦٪ و فروکتوز و گلوکز در ٤٪ و اسید آمینه تریپتوفان در غلظت ۱۰۰ میلی گرم 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 در مزرعه در بسیاری از موارد نسبت به دو گروه دیگر مزیت نسبتا مناسب تری را از خود نشان می دهد

تقدیر و تشکر :

در پایان از زحمات و همکاری مرکز تحقیقات اصلاح بذر و نهال کرج، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال و آزمایشگاه تحقیقاتی فیزیولوژی-بیوشیمی گیاهی دانشگاه تهران به ترتیب در اختیار گذاشتن مکان، دستگاه های مورد نیاز و داده پردازی برای این پژوهش کمال تشکر و قدردانی را بعمل آورده، از همکاری پرسنل مربوطه نیز کمال تشکر را داریم.

تعارض منافع :

نویسندگان اعلام می کنند که هیچ گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

References

1. De Luca V, Marineau C, Brisson N. Molecular cloning and analysis of cDNA encoding a plant tryptophan decarboxylase: comparison with animal dopa decarboxylases. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1989;86(8):2582-6. **DOI: 10.1073/pnas.86.8.2582.**

2. Thakore D, Srivastava AK, Sinha AK. Mass production of Ajmalicine by bioreactor cultivation of hairy roots of Catharanthus roseus. Biochemical Engineering Journal. 2017;119:84-91.**DOI : 10.1016/j.bej.2016.12.010.**

3. O'Connor SE, Maresh JJ. Chemistry and biology of monoterpene indole alkaloid biosynthesis. Natural product reports. 2006;23(4):532-47. **DOI: DOI.org/10.1039/B512615K.**

4. Ferreres F, Pereira DM, Valentão P, Oliveira JM, Faria J, Gaspar L, et al. Simple and reproducible HPLC–DAD–ESI-MS/MS analysis of alkaloids in Catharanthus roseus roots. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. 2010;51(1):65-9. **DOI: 10.1016/j.jpba.2009.08.005.**

5. Hisiger S, Jolicoeur M. Analysis of Catharanthus roseus alkaloids by HPLC. Phytochemistry Reviews. 2007;6(2):207-34. **DOI: 10.1007/s11101-006-9036-y.**

6. Georgiev MI, Pavlov AI, Bley T. Hairy root type plant in vitro systems as sources of bioactive substances. Applied microbiology and biotechnology. 2007;74(6):1175-85. **DOI: 10.1007/s00253-007-0856-5.**

7. Pavlov A, Berkov S, Weber J, Bley T. Hyoscyamine biosynthesis in Datura stramonium hairy root in vitro systems with different ploidy levels. Applied biochemistry and biotechnology. 2009;157(2):210-25. **DOI: 10.1007/s12010-008-8264-6.**

8. Aslam J, Khan SH, Siddiqui ZH, Fatima Z, Maqsood M, Bhat MA, et al. Catharanthus roseus (L.) G. Don. An important drug: it's applications and production. Pharmacie Globale (IJCP). 2010;4(12):1-16. **DOI: 10.1007/s12010-008-8264-6.**

9. Siddiqui ZH, Mujib A, Ahmad MM, Ali A. Fungal elicitors: A potent approach for enhancing secondary metabolites in cultured cells. Fungal biochemistry and biotechnology Lap Lambert Academic Publishing AG & CO KG, Saarbrücken. 2010:88-104. **DOI: 10.1371/journal.pone.0236191.**

10. Haghighi K, Ali M. Evaluation of the hormonal treatments effect on biosynthesis of endol alkaloids in tissue culture, suspension culture and field culture. Developmental Biology. 2021;13(1):1-16. **DOI: 10.30495/JDB.2021.680719.**

11. De Bruyn A, Verzele M, Dejonghe J-P, Rao KB, Collard M-P, Trouet A, et al. Modification of Catharanthus roseus alkaloids: a lactone derived from 17-deacetylvinblastine. Planta medica. 1989;55(04):364-6. **DOI: 10.1055/s-2006-962029.**

12. De Luca V, Balsevich J, Kurz W. Acetyl coenzyme A: deacetylvindoline O-acetyltransferase, a novel enzyme from Catharanthus. Journal of plant physiology. 1985;121(5):417-28. **DOI: 10.1007/BF00270066.**

13. Aerts RJ, Alarco A-M, De Luca V. Auxins induce tryptophan decarboxylase activity in radicles of Catharanthus seedlings. Plant physiology. 1992;100(2):1014-9. **DOI: 0.1104/pp.100.2.1014.**

14. Akhgari A, Laakso I, Seppänen-Laakso T, Yrjönen T, Vuorela H, Oksman-Caldentey K-M, et al. Analysis of indole alkaloids from Rhazya stricta hairy roots by ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry. Molecules. 2015;20(12):22621-34. **DOI: org/10.3390/molecules201219873.**

15. Akhgari A, Laakso I, Seppänen-Laakso T, Yrjönen T, Vuorela H, Oksman-Caldentey K-M, et al., editors. Terpenoid indole alkaloids in hairy roots of Rhazya stricta (Apocynaceae). Nordic Natural Product Chemistry Conference; 2013. **DOI: 10.3390/molecules201219873.**

16. Goddijn OJ, de Kam RJ, Zanetti A, Schilperoort RA, Hoge JHC. Auxin rapidly down-regulates transcription of the tryptophan decarboxylase gene from Catharanthus roseus. Plant molecular biology. 1992;18(6):1113-20. **DOI: 10.1007/BF00047714.**

17. Dehghan E, Ebadi M, Naghdi Badi H, Shahriari F, Azizi M, Asghari G. Review on new techniques in tropane alkaloids production. Journal of Medicinal Plants. 2010;9(33):149-64. **DOI: 20.1001.1.2717204.2010.9.33.18.4.**

18. Bulgakov VP. Functions of rol genes in plant secondary metabolism. Biotechnology advances. 2008;26(4):318-24. **DOI: 10.1016/j.biotechadv.2008.03.001.**

19. Arthur CL, Pawliszyn J. Solid phase microextraction with thermal desorption using

fused silica optical fibers. Analytical chemistry. 1990;62(19):2145-8. **DOI: org/10.1021/ac00218a019.**

20. Blom T, Sierra M, Van Vliet T, Franke-van Dijk M, De Koning P, Van Iren F, et al. Uptake and accumulation of ajmalicine into isolated vacuoles of cultured cells of Catharanthus roseus (L.) G. Don. and its conversion into serpentine. Planta. 1991;183(2):170-7. **DOI: 1007.BF00197785.**

21. Das A, Sarkar S, Bhattacharyya S, Gantait S. Biotechnological advancements in Catharanthus roseus (L.) G. Don. Applied microbiology and biotechnology. 2020;104(11):4811-35. **DOI: 10.1007/s00253-020-10592-1.**

22. DeLuca V, Kurz WG. Monoterpene indole alkaloids (Catharanthus alkaloids). Phytochemicals in Plant Cell Cultures: Elsevier; 1988. p. 385-401. **DOI: 978-0-12-715005-5.**

23. Deus-Neumann B, Zenk M. A highly selective alkaloid uptake system in vacuoles of higher plants. Planta. 1984;162(3):250-60. **DOI: 10.1007/BF00397447.**

24. Cibotti MC, Freier C, Andrieux J, Plat M, Cosson L, Bohuon C. Monoclonal antibodies to bis-indole alkaloids of Catharanthus roseus and their use in enzyme-linked immuno-sorbent-assays. Phytochemistry. 1990;29(7):2109-14. **DOI: 10.1016/0031-9422(90)83016-t.**

25. DeLuca V, Balsevich J, Tyler R, Kurz W. Characterization of a novel N-methyltransferase (NMT) from Catharanthus roseus plants. Plant cell reports. 1987;6(6):458-61. **DOI: 10.1007/BF00272782.**

26. Rothe G, Dräger B. Tropane alkaloids—metabolic response to carbohydrate signal in root cultures of Atropa belladonna. Plant science. 2002;163(5):979-85. **DOI: 10.1016/S0168-9452(02)00247-9.**

27. Dong L, Liu Y, Wei J. Cloning of critical gene fragments in saikosaponin biosynthesis and associated sequence analysis. World Sci Technol Mod Tradit Chin Med. 2008;10(5):56-60. **DOI: 10.3389/fgene.2020.583245.**

28. Dong L, Miettinen K, Goedbloed M, Verstappen FW, Voster A, Jongsma MA, et al. Characterization of two geraniol synthases from Valeriana officinalis and Lippia dulcis: similar activity but difference in subcellular localization. Metabolic engineering. 2013;20:198-211. **DOI: 10.1016/j.ymben.2013.09.002.**

29. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiol plant. 1962;15:473-97. **DOI: j.1399-3054.1962.tb08052.**

30. Dhooghe L, Mesia K, Kohtala E, Tona L, Pieters L, Vlietinck A, et al. Development and validation of an HPLC-method for the determination of alkaloids in the stem bark extract of Nauclea pobeguinii. Talanta. 2008;76(2):462-8. **DOI: 10.1016/j.talanta.2008.03.036.**

31. Sangwan RS, Mishra S, Kumar S. Direct Fluorometry of phase-extracted tryptamine-based fast quantitative assay ofl-tryptophan decarboxylase fromCatharanthus roseusLeaf. Analytical biochemistry. 1998;255(1):39-46. **DOI: 10.1006/abio.1997.2377.**

32. Akhgari A, Laakso I, Seppänen-Laakso T, Yrjönen T, Vuorela H, Oksman-Caldentey KM, et al. Determination of terpenoid indole alkaloids in hairy roots of Rhazya stricta (Apocynaceae) by GC-MS. Phytochemical Analysis. 2015;26(5):331-8. **DOI: org/10.1002/pca.2567.**

33. Toivonen L, Balsevich J, Kurz W. Indole alkaloid production by hairy root cultures of Catharanthus roseus. Plant cell, tissue and organ culture. 1989;18(1):79-93. **DOI: 10.1007/BF00033467.**

34. Memelink J, Verpoorte R, Kijne JW. ORCAnization of jasmonate-responsive gene expression in alkaloid metabolism. Trends in plant science. 2001;6(5):212-9. **DOI: 10.1016/s1360-1385(01)01924-0.**

35. Su Ww. Bioprocessing technology for plant cell suspension cultures. Applied Biochemistry and Biotechnology. 1995;50:189-230. **DOI: FEC3869109A4C2D.**

36. Carnier J, Morol G. Influence des condition de culture des tissue de vinca rosea L. sur la production d, ahkaloides totax. physiol. veg, vol. 10. 2012. **DOI: 81060af5c49d39615fd7fc.**

37. Vir R, Kumar V. Role of plant tissue culture in improvement of horticultural crops. Annals of Horticulture. 2021;14(1):1-6. **DOI: org/10.5958/0976-4623.2021.00001.3.**

38. Goddijn OJ, Pennings EJ, van der

Helm P, Schilperoort RA, Verpoorte R, Hoge JHC. Overexpression of a tryptophan decarboxylase cDNA inCatharanthus roseus crown gall calluses results in increased tryptamine levels but not in increased terpenoid indole alkaloid production. Transgenic research. 1995;4(5):315-23.**DOI: 10.1007/BF01972528.**

39. Kareem TK, Karrar AT. biochemical and physiological changes of callus growth and lycopene pigment production from tomato (Lycopersicon esculentum Mill.) under drought stress. Himalayan Journal of Health Sciences. 2018:7-21. **DOI: http://www.hjhs.co.in/index.php/hjhs/article/view/9.**

40. Merillon J, Chenieux J, Rideau M. Cinétique de croissance, évolution du métabolisme glucido-azoté et accumulation alcaloidique dans une suspension cellulaire de Catharanthus roseus. Planta medica. 1983;47(03):169-76. **DOI: 10.1016/s0140-6736(79)91108-5.**

41. Kumar S, Singh B, Singh R. Catharanthus roseus (L.) G. Don: A review of its ethnobotany, phytochemistry, ethnopharmacology and toxicities. Journal of Ethnopharmacology. 2022;284:114647. **DOI: 0.1016/j.jep.2021.114647.**

42. 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 chinense. Molecular biology reports. 2011;38(8):5017-23. **DOI: 10.1007/s11033-010-0648-3.**

43. Dong L. Discovery and reconstitution of the secoiriDOld pathway of Catharanthus roseus: Wageningen University and Research; 2014. **DOI: 20152051774.**

44. Pennings EJ, Groen BW, Duine JA, Verpoorte R. Tryptophan decarboxylase from Catharanthus roseus is a pyridoxoquinoprotein. FEBS letters. 1989;255(1):97-100. **DOI: org/10.1093/pcp/pcg051.**

45. Yamazaki Y, Sudo H, Yamazaki M, Aimi N, Saito K. Camptothecin biosynthetic genes in hairy roots of Ophiorrhiza pumila: cloning, characterization and differential expression in tissues and by stress compounds. Plant and Cell Physiology. 2003;44(4):395-403. **DOI: org/10.1093/pcp/pcg051**