

# Análisis de iridoides y expresión de genes que codifican enzimas tempranas en la síntesis de alcaloides indol terpenoicos en *Catharanthus roseus*

## Analysis of iridoids content and expression studies of genes encoding early enzymes in the indol terpenoid biosynthesis pathway in *Catharanthus roseus*

Natalia Palacios-Rojas\*, Mark Leech\*\*

### RESUMEN

Los alcaloides indol terpenoicos (TIA) son metabolitos secundarios de importancia medicinal por sus propiedades como agentes anticancerígenos, entre otras. Sin embargo, su explotación en la industria farmacéutica se ha visto limitada, ya que la acumulación de estos compuestos en las plantas que los producen es mínima. Dichos alcaloides son biosintetizados por la vía del shikimato y de los terpenoides, los cuales proveen los precursores: secologanina y triptamina, respectivamente. La secologanina es sintetizada vía terpenoides, y estudios preliminares sugieren que es sintetizada vía del 2-C-metil-D-eritrol-4-fosfato (MEP) y no vía acetato/ácido mevalónico. Se cree que la secologanina es una de las moléculas limitantes en la biosíntesis de TIA. En el presente estudio se cuantifican y evalúan por HPLC los niveles de este compuesto y sus predecesores iridoides, ácido logánico y secologanina, en diferentes partes de la planta medicinal *Catharanthus roseus*. La distribución de estos iridoides varía según el tejido analizado, encontrándose mayor acumulación de secologanina en el segundo par de hojas de la planta. Los niveles de transcritos de las enzimas involucradas en los pasos tempranos de la vía de los iridoides fueron monitoreados también en diferentes tejidos usando la técnica transferencia de ARN, Northern blots. Adicionalmente, las plantas se elicitaron con jasmonato de metilo (MeJA), con el fin de estudiar el efecto de esta molécula en la transcripción de genes que codifican enzimas involucradas en los pasos tempranos de la vía de los iridoides. Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que la vía del MEP puede estar más activa que la vía del acetato/ácido mevalónico en tejidos aéreos jóvenes de la planta. Adicionalmente, es evidente que el MeJA afecta la biosíntesis de TIA estimulando la transcripción de diferentes genes.

**Palabras clave:** metabolismo secundario, alcaloides indol terpenoicos, jasmonato de metilo, vía del mevalonato, secologanina.

### ABSTRACT

Terpenoid indole alkaloids (TIA) are of pharmaceutical importance, however the industrial use of these compounds is very limited because its accumulation is very low in plant tissues. TIA are derived from the shikimate and terpenoid pathways, which supply secologanin and tryptamine, the indole and iridoid moieties, respectively. Secologanin is a terpenoid which is believed to be synthesised the MEP pathway rather than by the acetate/mevalonic acid pathway. Secologanin is thought to be a limiting molecule in the biosynthesis of TIAs. Levels of loganic acid, loganin and secologanin were measured by HPLC using tissue derived from different parts of *Catharanthus roseus* plants. Higher levels of secologanin were found in second pair of leaves. Transcript levels of genes encoding enzymes involved in the early steps of the iridoid pathway were also monitored by northern blots of RNA from *C. roseus* plants. The effect of the elicitor molecule methyl jasmonate in the transcription of genes was also studied. The results obtained in the present work suggest that in young aerial tissues of the plant, the MEP pathway could be more active than the acetate/mevalonic acid pathway. Moreover, there is a clear effect of MeJA in the transcription of the genes studied.

**Key words:** Secondary metabolism, terpenoid indol alkaloids, methyl jasmonate, mevalonate pathway, secologanin.

\* Ph. D. Dirección actual: Max Planck Institute for Plant physiology. Am Muehlenberg 1 14476 Golm-Alemania. Correo electrónico: soicalap@yahoo.com

\*\* Ph. D. Jefe de grupo. Molecular biotechnology unit. John Innes Center, Norwich NR4 7UH, UK.

**Recibido:** marzo 25 de 2004. **Aceptado:** mayo 17 de 2004.



distribución de la secologanina y sus precursores, loganina y ácido logánico en la planta. Además, la disponibilidad de cADN que codifican para las enzimas DXS, HMGR y G10H (Maldonado y Nessler, 1992; Collu, *et al.*, 2001), que catalizan las reacciones iniciales en la biosíntesis de secologanina (figura 1), nos ha permitido estudiar la expresión de dichos genes en diferentes partes de la planta de *C. roseus*. Por último, presentamos el efecto de la molécula elicitora, jasmonato de metilo (MeJA), en los niveles de estos transcritos en diferentes partes de la planta adulta.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Propagación de plantas en el invernadero.** Las semillas de *C. roseus* se germinaron en una mezcla 1:1 de compost:suelo y crecieron individualmente en macetas a 25 °C durante el día y 20 °C en la noche, con 16 horas de foto-periodo.

**Tratamiento de plantas adultas de *C. roseus* con jasmonato de metilo (MeJA).** Se sembraron individualmente semillas de *C. roseus* (L. G. Don cv. Little Delicata (J. Moles & Son, Colchester, UK) en suelo para germinación en el invernadero. En todos los experimentos se utilizaron plantas adultas de 8 semanas de edad, contando desde el día de la siembra de la semilla. Las raíces de las plantas fueron lavadas con agua cuidadosamente, con el fin de remover todo el suelo adherido. Luego, 10 plantas fueron sumergidas en 300 mL de solución 100 µM de MeJA (experimentos M24) y 10 plantas en agua sola (experimentos H24). La caja que contenía las plantas y la solución de MeJA fue puesta dentro de una caja aún más grande, la cual contenía aproximadamente 500 mL de agua; dicha caja fue sellada con parafilm y las plantas fueron incubadas por 24 h bajo las condiciones descritas.

Diferentes partes de la planta fueron colectadas independientemente: ápex y primer par de hojas, segundo par de hojas, tercer par de hojas, tallos y raíces. En experimentos control paralelos, 20 plantas fueron mantenidas en suelo. En el tiempo 0 y 24 h, las raíces de 10 plantas (10 raíces para el tiempo 0 y 10 raíces para el tiempo 24 h) fueron lavadas y colectadas. Estos experimentos fueron llamados P0 y P24.

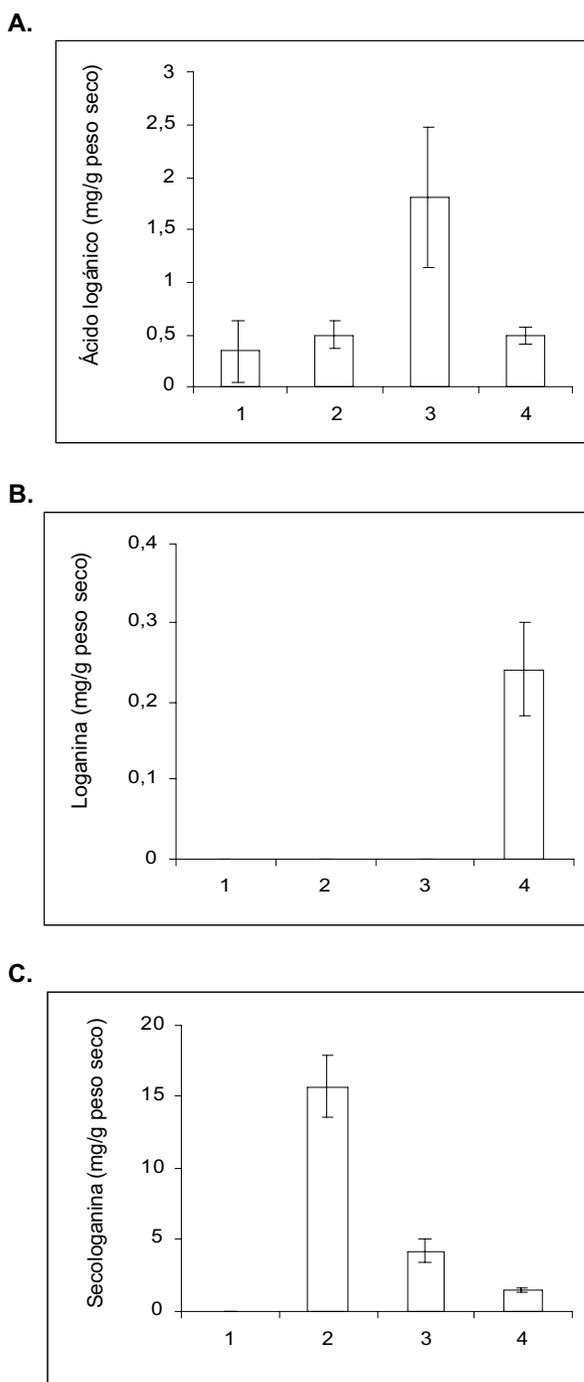
**Extracción de ARN total.** Todo el material y los reactivos utilizados para trabajo con ARN estaban libres de ARNasas. La extracción de ARN se hizo

con el reactivo Trizol (Gibco BRL) y siguiendo el protocolo propuesto por la casa comercial. Entre 100 y 500 mg peso fresco de tejido fueron macerados con nitrógeno líquido y mezclados con 1 mL de Trizol, luego las muestras fueron incubadas a temperatura ambiente por 10 min. Posteriormente se adicionaron a cada muestra 200 µL de cloroformo y se mezcló por inversión. Las muestras fueron centrifugadas a 13.000 x g por 10 min a 4 °C. El sobrenadante fue colectado y después de adicionar 500 µL de isopropanol, las muestras fueron incubadas toda la noche a 4 °C. Luego los ácidos nucleicos fueron colectados por centrifugación a 13 000 x g a 4 °C por 10 min. El precipitado fue lavado con etanol al 70% y secado al aire, para posteriormente resuspenderlo en 50 µL de agua destilada estéril que contenía 1U de ADNsa, libre de ARNsa. Las muestras se incubaron a 37 °C por 30 min, y para inactivar la enzima las muestras se incubaron 15 min a 65 °C. El volumen de cada muestra fue completado a 100 µL con agua destilada estéril y luego fueron adicionados 50 µL de LiCl. Después de incubación toda la noche a 4 °C, el ARN fue colectado por centrifugación a 10.000 x g durante 15 min a 4 °C. Después de disolver el pellet en 100 µL de agua destilada estéril, el ARN fue reprecipitado con 10 µL de acetato de sodio 3M pH 5.2 y 250 µL de etanol 100%. Luego de dos horas de incubación a -20 °C, el ARN fue colectado por centrifugación a 13.000 x g durante 15 min a 4 °C y lavado con 900 µL de etanol al 70%. Una vez precipitado y secado al vacío, el ARN fue disuelto en 30 µL de agua destilada estéril y almacenado a -80 °C.

### Electroforesis e hibridación de ácidos nucleicos.

Las muestras de ARN total (10- 15 µg) fueron mezcladas con dos volúmenes de buffer de carga (1 mL de formamida, 350 µL de formaldehído al 37%, 100 µL de buffer MOPS/EDTA 10X (acetato de sodio 50 mM, MOPS 0.2 M pH 7.0, EDTA 10 mM) y 3.5 mg de azul de bromofenol). El marcador de peso molecular de ARN fue mezclado con dos volúmenes de buffer de carga y 0.1 ng/mL de bromuro de etidio.

La igualdad en la cantidad de ARN puesto en el gel fue corroborada por tinción del gel, después de la electroforesis, con bromuro de etidio. Posteriormente el gel fue lavado dos veces con agua destilada estéril y el ARN transferido por capilaridad, toda la noche, a una membrana de nylon hybond N (Amersham) usando 2X SSC como buffer de trans-



**Figura 2.** Niveles de iridoides en tejidos de plantas de *C. roseus*: 1: Primer par de hojas; 2: segundo par de hojas; 3: tallo; 4: raíz. Los niveles de iridoides fueron determinados usando HPLC. A. Ácido logánico. B. Loganina. C. Secologanina. Los resultados son los promedios  $\pm$  error estándar, n=5 muestras de diferentes plantas.

ferencia. La membrana fue lavada una vez con 2X SSC y el ARN fijado a la membrana aplicando 1200 mJoules por 30 seg.

Los filtros fueron pre-hibridados durante 2 h en dextran sulfato al 10%, buffer SET 4X (NaCl 3M, EDTA pH 8 20 mM, Tris- HCl pH 8 0.6M, tetrasodio pirofosfato 11mM), solución Denhardt's 10X y SDS al 0.1%. Luego, la sonda radiactiva marcada por la técnica de anillamiento al azar fue adicionada y los filtros hibridados toda la noche a 65 °C. Los filtros fueron lavados dos veces con 2X SSC, 0.5% SDS y una vez con 0.1X SSC, 0.5% SDS, cada lavado fue hecho por 20 min. La membrana fue expuesta a películas de rayos X a -80 °C.

**Extractos crudos de proteínas.** Las muestras (500 mg peso fresco) fueron maceradas en nitrógeno líquido y mezcladas con 0.5 mg de polivinipirrolidona (PVPP) y 500  $\mu$ L de buffer frío de extracción (buffer fosfato de sodio pH 7.2 0.2 M, DTT 2 mM, leupetina 10  $\mu$ M, disulfuro de sodio 20 mM). Luego, los extractos fueron centrifugados a 13.000 x g por 20 min a 4 °C. Con el fin de remover las sales, los extractos crudos fueron pasados a través de una columna de Sefadex G-25 equilibrada y eluida con buffer fosfato de sodio pH 7.2 que contenía DTT 2 mM a 4 °C. La concentración de proteínas fue determinada por el método de Bradford usando BSA como estándar (Palacios Rojas, 2000).

**Extracción de alcaloides e iridoides.** Diferentes órganos de la planta (hojas, tallos, raíces) fueron colocados en nitrógeno líquido y macerados hasta obtener un polvo fino, el cual se secó en frío. Diez miligramos de dicho polvo fueron mezclados con 200  $\mu$ L de ácido trifluoroacético al 0.06%, luego las mezclas fueron sonicadas por 30 min y centrifugadas a 13.000 x g por 30 min a temperatura ambiente. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo y centrifugado a 13.000 x g por 2 min a temperatura ambiente. Las muestras fueron usadas inmediatamente para análisis por HPLC.

Como estándares para el análisis por HPLC se utilizaron ácido logánico, loganina y secologanina comerciales (Extrasintese, Francia) a una concentración de 20 $\mu$ M en 0.06% ácido trifluoroacético. Los iridoides fueron separados en una columna de Novapack-phenyl usando como buffer fosfato 50 mM (pH 2.15): acetonitrilo: 2-metoxi-etanol: 92.5:2.5:5

como eluyente. El sistema estaba equipado con un detector de ultravioleta. La detección de iridoides se realizó a 240 nm.

El análisis de alcaloides (estrictosidina, ajmalicina y serpentina) por HPLC se realizó utilizando los estándares correspondientes comprados en Sigma. Para la separación de dichos compuestos se utilizó una columna LiChosphere 60 RP (Van der Heijden *et al.*, 1987). La detección de alcaloides se realizó a 280 nm.

**Ensayo de actividad de metil transferasa del ácido logánico (LAMT).** La enzima LAMT cataliza la conversión de ácido logánico a loganina. Una vez removidas las sales de los extractos protéicos, éstos se incubaron a 30 °C por 3 h con 13.5 µL de ácido logánico 40 mM, 13.5µL de DTT 80 mM y 13.5 µL de SAM (S- adenosil- L- metionina) 8 mM, en un volumen final de 135 µL. Para parar la reacción se adicionaron 50 µL de TCA 40%, luego las muestras fueron centrifugadas a 14.000 x g durante 5 min y el sobrenadante se inyectó en la columna de HPLC sistema para detección de irioides con el fin de medir la concentración de loganina (producto final de la reacción enzimática).

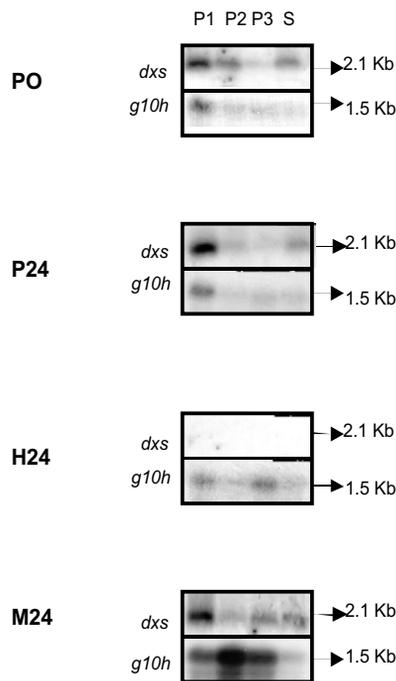
**RESULTADOS**

**Niveles de iridoides en plantas de *C. roseus*.** Se utilizaron diferentes partes de plantas de *C. roseus* de 8 semanas para determinar en ellas los niveles de iridoides. El ácido logánico fue detectado en todas las partes analizadas (figura 2a), pero los mayores niveles fueron encontrados en el tallo (0.050±0.13 mg/g peso seco). A pesar de la presencia de ácido logánico, no se detectó ninguna actividad de LAMT en los extractos preparados. La loganina fue detectada en raíces (figura 2b) pero los niveles fueron mucho más bajos que los niveles de ácido logánico detectados en el mismo tejido (0.24 ± 0.06 y 0.493 ± 0.08 mg/g peso seco, respectivamente). La secologanina fue detectada en todos los tejidos analizados sin incluir el primer par de hojas. Los mayores niveles de dicho compuesto se encontraron en el segundo par de hojas (15.7 ± 2.16 mg/g peso seco) (figura 2c).

**Efecto del jasmonato de metilo en los niveles de transcriptos de genes que codifican enzimas tempranas en la biosíntesis de precursores terpenoides.** Plantas de 8 semanas fueron tratadas con MeJA a 100 µM durante 24 h. Diferentes partes de la planta fueron colectadas para extracción de ARN y posterior

detección de niveles de *hmgr*, *dxs* y *g10h*. En ninguna de las partes de la planta analizadas se detectaron transcriptos de *hmgr* por hibridación. Por el contrario, experimentos preliminares usando RT-PCR (transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa), mostraron amplificados en el primer y segundo par de hojas (datos no mostrados). Lo anterior sugiere una baja expresión de *hmgr* en los tejidos analizados inclusive después de tratamiento con MeJA.

Por otro lado, no se detectaron transcriptos de *dxs* en raíces en ninguno de los experimentos. Los niveles de dichos transcriptos fueron mayores en el primer par de hojas comparado con los transcriptos encontrados en el segundo par de hojas. El tratamiento de las plantas con MeJA por 24h no tuvo ningún efecto en los niveles de transcriptos de *dxs* (figura 3).



**Figura 3.** Análisis de Northern de plantas de *C. roseus* con *dxs* and *g10h*. Las plantas fueron tratadas con MeJA por 24 h. El primer par de hojas y apex (P1), segundo par de hojas (P2), tercer par de hojas (P3) y tallo (S) fueron colectados después del tratamiento. PO: plantas no colocadas en el sistema experimental y colectadas el día del experimento; P24: plantas no colocadas en el sistema experimental y colectadas 24 h después; H24: tejidos de plantas tratadas con agua durante 24 h bajo las mismas condiciones que las plantas tratadas con MeJA; M24: tejidos de plantas tratadas con MeJA durante 24 h. La cantidad igual de ARN en el gel fue examinada con tinción de bromuro de etidio antes de la transferencia a la membrana.

No se detectaron transcriptos para *g10h* en raíces. Se detectaron bajos niveles de transcriptos de *g10h* en plantas P0, P24 y H24. El MeJA incrementó los niveles de transcriptos de *g10h* en primer, segundo y tercer par de hojas (figura 3).

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Varios estudios han demostrado que la regulación de las enzimas involucradas en la biosíntesis de TIA es específica de célula, tejido, órgano, estado de desarrollo y condiciones medio-ambientales (Verpoorte *et al.*, 1998). Además, estudios recientes usando hibridación *in situ* e inmunolocalización han demostrado la ubicación celular específica de transcriptos y proteínas de algunas de las enzimas de dicha vía metabólica (St-Pierre *et al.*, 1999). Estudios detallados de la expresión génica se han concentrado en la vía indólica en los primeros pasos de la biosíntesis de TIA (*tdc* y *str*) o en los últimos pasos de la biosíntesis de vindolina (*d4h* y *dat*) (ver figura 1). La disponibilidad de cADN que codifican para DXS, HMGR y G10H, proteínas que catalizan las primeras reacciones en la biosíntesis de secologanina, facilitó los estudios de expresión de los genes correspondientes en plantas adultas de *C. roseus*. Adicionalmente se detectaron los niveles de precursores de secologanina en plantas adultas de *C. roseus*.

Se detectó loganina en las raíces de *C. roseus* pero en muy bajos niveles comparado con secologanina y ácido logánico. Parece ser que la loganina no se acumula en la planta y que, por el contrario, es rápidamente convertida en secologanina. Otra alternativa podría ser que la ruta principal de la biosíntesis de secologanina es la conversión de ácido logánico a ácido secologánico y posteriormente a secologanina. Experimentos realizados en suspensiones celulares de *C. roseus* en presencia de ácido logánico apoyan la hipótesis anterior, dado que no se detectó ni loganina ni secologanina pero sí estrictosidina, el producto de reacción entre secologanina y triptamina (Palacios Rojas, 2000). Además, se detectaron trazas de ácido logánico en suspensiones celulares.

Tanto loganina como secologanina son compuestos que pueden actuar en contra de depredadores (Rimpler, 1991). Si éste es realmente el caso, la distribución de loganina y secologanina en plantas de *C. roseus* sugiere que la loganina provee protección en el sistema radicular mientras la secologanina provee protección en las partes aéreas de la planta, especialmente en hojas jóvenes.

Estudios anteriores han demostrado que en plantas de *C. roseus* cada órgano acumula un espectro característico de alcaloides (Sotomayor *et al.*, 1997). Aunque *dxs*, *hmgr* y *g10h* codifican enzimas involucradas en pasos tempranos de la vía biosintética de TIA, su expresión, inducción por MeJA y posible correlación con los niveles de iridooides pueden aportar al entendimiento de dicha vía metabólica en diferentes tejidos. Dentro de los resultados obtenidos en este estudio se encontró mayor expresión de *dxs* en ápex y primer par de hojas, comparado con otras partes de las plantas. El hecho de no detectar transcriptos de *hmgr* en el análisis de Northern sugiere que la vía de MEP puede estar más activa que la vía del acetato/MVA en tejidos aéreos jóvenes de la planta.

Por otro lado, MeJA no tuvo ningún efecto en la expresión ni de *dxs* ni de *hmgr*, pero indujo fuertemente los niveles de transcriptos de *g10h* en los primeros tres pares de hojas. Análisis de los niveles de transcriptos de *tdc* y *str1* en plantas de 8 semanas tratadas con MeJA mostraron patrones similares de inducción como los observados para *g10h* en las partes aéreas de la planta (Burtin y Palacios-Rojas, datos no publicados). Uniendo todos los hechos, los datos sugieren una regulación coordinada de *g10h*, *tdc* y *str* por MeJA en planta, como ha sido reportado en líneas celulares de *C. roseus* (Collu *et al.*, 2001). Estudios han demostrado que MeJA incrementa los niveles de TIA en plántulas de *C. roseus* en desarrollo (Aerts *et al.* 1994) y de los datos presentados anteriormente se podría decir que el MeJA ejerce su efecto en la biosíntesis de TIA estimulando la transcripción de diferentes genes de una manera coordinada. Hibridaciones *in situ* e inmunolocalizaciones han mostrado la expresión de enzimas de la biosíntesis de TIA en hojas jóvenes con una disminución en hojas maduras (St-Pierre *et al.*, 1999). Todo lo anterior sugiere que la biosíntesis de precursores iridooides ocurre en las partes aéreas de la planta, y no en las raíces, como lo sugirieron Wink y Roberts (1998). Sin embargo, se necesitan más datos experimentales en relación con la actividad de G10H y los niveles de TIA en diferentes partes de la planta. Es necesario también determinar el efecto de MeJA en la actividad de G10H y los niveles de iridooides.

## AGRADECIMIENTOS

Natalia Palacios Rojas fue apoyada económicamente por una beca doctoral del Instituto Colombiano de Ciencia y Tecnología Francisco José de Caldas

(Colciencias). El centro de investigación John Innes en Norwich, Inglaterra, apoyó económicamente la realización del presente trabajo.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aerts, J.; De Carolis, E.; De Luca, V.; Baumann, T. 1994. Methyl jasmonate vapor increases the developmentally controlled synthesis of alkaloids in *Catharanthus* and *Cinchona* seedlings. *Plant J.* 5:635-643.
- Collu, G.; Unver, N.; Peltenburg, A.; Van der Heijden, R.; Verpoorte, R.; Memelink, J. 2001. Geraniol 10-hydroxylase, a cytochrome P450 enzyme involved in terpenoid indole alkaloid biosynthesis. *FEBS letters.* 508:215-220.
- Contin, A.; Van der Heijden, R.; Lefeber, A.; Verpoorte, R. 1998. The iridoid glucoside secologanin is derived from the novel triose phosphate/pyruvate pathway in a *Catharanthus roseus* cell culture. *FEBS Letters.* 434:413-416.
- Eichinger, D.; Bacher, A.; Zenk, M.; Eisenreich, W. 1999. Analysis of metabolic pathways via quantitative prediction of isotope labelling patterns: a retrobiosynthetic <sup>13</sup>C NMR study on the monoterpene loganin. *Phytochemistry.* 51:223-236.
- Harborne, J. B. 1982. The plant and its biochemical adaptation to the environment. In: *Introduction to ecological biochemistry* (Harborne, J. B., ed.), London: Academic Press, p. 278.
- Kutchan, T. 1995. Alkaloid biosynthesis: the basis for metabolic engineering of medicinal plants. *The Plant Cell.* 7:1059-1070.
- Lichtenthaler, H.; Rohmer, M.; Schwender, J. 1997. Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants. *Physiol. Plant.* 101:643-652.
- Lichtenthaler, H.; Rohmer, M.; Schwender, J. 1997. Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants. *Physiol. Plant.* 101:643-652.
- Maldonado, I. B.; Nessler, C. 1992. Nucleotide sequence of a cDNA encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A reductase from *Catharanthus roseus*. *Plant Physiology.* 100:1613-1614.
- Moreno, P.; Heijden, R.; Verpoorte, R. 1993. Effect of terpenoid precursor feeding and elicitation on formation of indole alkaloids in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Reports.* 12:702-705.
- Moreno, P.; Van der Heijden, R.; Verpoorte, R. 1995. Cell and tissue cultures of *Catharanthus roseus*: a literature survey, (II. Updating from 1988 to 1993). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 42:1-25.
- Palacios Rojas, N. 2000. Metabolismo secundario en plantas: screening molecular de la biodiversidad en flora y estudios de rutas biosintéticas en *Lonicera tatarica* y *Catharanthus roseus*. Tesis doctoral, University of East Anglia- John Innes Center, Norwich, UK.
- Rimpler, H. 1991. Sequestration of iridoids by insects. In *Ecological chemistry and biochemistry of plant terpenoids*, J. B. Harborne, F. A. Tomas-Barberan (eds.) Oxford: Oxford Science Publications, pp. 314-330.
- Sotomayor, M.; Ros Barcelo, A. 1997. What can we learn from alpha-3',4'- anhydrovinblastine synthase? *Recent. Res. Devel. Phytochem.* 1:225-233.
- St-Pierre, B.; Vásquez-Flota, F. A.; De Luca, V. 1999. Multicellular compartmentation of *Catharanthus roseus* alkaloid biosynthesis predicts intercellular translocation of a pathway intermediate. *Plant Cell* 11, 887-900.
- Van der Heijden, R.; Lamping, P.; Out, P.; Wijnsma, R.; Verpoorte, R. 1987. High-performance liquid chromatographic determination of indole alkaloids in suspension culture of *Tabernaemontana divaricata*. *Journal of Chromatography.* 396:287-295.
- Verpoorte, R.; Heijden, R.; Memelink, J. 1998. Plant biotechnology and the production of alkaloids: prospects of metabolic engineering. In *The Alkaloids. Chemistry and Biology*, G. Cordell (ed.). San Diego, California: Academic Press, pp. 453-499.
- Walton, N.; Rhodes, M.; Michael, A.; Parr, A. 1999. Characterisation and control of plant secondary metabolism. In *Chemicals from plants*, Walton and D. Brown (eds.), London: Imperial College Press, pp. 27-90.
- Wink, M.; Roberts, M. 1998. Compartmentation of alkaloid synthesis, transport and storage. In *Alkaloids: Biochemistry, ecology, and medicinal applications*, M. Roberts and M. Wink (eds.). New York: Plenum Press, pp. 239-261.