

## تأثير الأندول أسيتك أسد و التربتوفان في إنتاج مركبي الفانكرستين والفانبلاستين من خلايا كالس نبات عين البزون *Catharanthus roseus* في الوسط التراكمي لزراعة الأنسجة خارج الجسم الحي *In Vitro*.

صباح مهدي هادي\*

استلام البحث 1، آذار، 2009  
قبول النشر 7، تموز، 2009

### الخلاصة:

أظهرت الدراسة الحالية على نبات عين البزون *Catharanthus roseus* قابلية خلايا الكالس المنتج بوساطة تقنية زراعة الأنسجة خارج الجسم الحي و المنقول الى الوسط التراكمي MS 40 غم/لتر سكروز، 2ملغم/ أندول أسيتك أسد و 0.5 ملغم/لتر تربتوفان على إنتاج مركبي الفانكرستين والفانبلاستين . تم أستخلاص مركبات الفلويدات الأندولية ثم الكشف و التقدير الكمي لمركبي الفانكرستين والفانبلاستين بوساطة تقنية كروما توغرافيا السائل ذي الأداء العالي. بينت النتائج أن أعلى كمية لمركبي الفانكرستين والفانبلاستين كانت (12.5,4,643) جزء بالمليون /0.5 غم وزن جاف على التوالي و كانت من خلايا الكالس المنقول من الوسط الزرع (MS 40 غم /لتر سكروز، 2ملغم /لتر نفاثا لين أسيتك أسد NAA .

الكلمات المفتاحية: نبات عين البزون ، الفلويدات الأندولية ، زراعة أنسجة نباتية.

MS: Murashige and Skooge  
IAA : indolyl-3-acetic acid  
NAA: naphthalene acetic acid  
2,4-D: 2,4-dichlorophenoxy acetic acid

### المقدمة :

يعد نبات عين البزون *Catharanthus roseus* من أكثر النباتات الطبية أهمية في العالم، وهو احد نباتات العائلة الدفلية Apocynaceae وينتج اكثر من 200 نوع من الفلويدات الاندولية ، تستخدم بعضها لاغراض علاجية مثل مركبي الاجمالسين Ajmalicine والسربينتين Serpentine التي تدخل في علاج مرض ارتفاع ضغط الدم [ 1 ] ان نبات عين البزون الطبي يقوم بتصنيع مركبات الايض الثانوي ومن بينها أكثر من 120 مركب من مركبات Terpenoid indole TIAs (Alkaloids) في مختلف أجزاء النبات ومنها الأوراق والسيفان التي تعد مصدرا للفلويدات المزوجة الصيغة الجزئية (الفانبلاستين و الفانكرستين) وهي ذات فعالية علاجية في علاج الأمراض السرطانية [ 2 ] . ان استخدام مركبات الأيض الثانوي باستخدام تقنية زراعة الانسجة خارج الجسم الحي *In Vitro* تعتمد على نوعية الاوساط الزرع المستخدمة، ان حث خلايا الكالس على إنتاج هذه المركبات يتم

باستخدام الوسط الزرع الانتاجي او التراكمي Production media [ 3 ] . اذ يتم نقل خلايا الكالس الى الوسط الزرع التراكمي Accumulation media الذي يحتوي على بادئات خاصة Precursors تقوم بتحفيز انتاج مركبات الايض الثانوي [4] ان التحكم بنوعية وتركيز هذه البادئات له دور كبير في تحفيز وزيادة تكون النواتج وتراكمها في مزارع الخلايا . تم في هذه الدراسة استخدام مركبي الاندول اسيتك اسد (2ملغم/لتر) و التربتوفان (0.5 ملغم/لتر) في الوسط الزرع التراكمي MS 40 غم /لتر سكروز لمعرفة تأثير هذا الوسط في انتاج مركبات الفلويدات الاندولية الفانبلاستين والفانكرستين من خلايا الكالس لنبات عين البزون المنقول اليه من الاوساط الزرع MS 40 غم/لتر سكروز) والحوية على منظمات النمو , IAA , NAA 2,4-D (2 ملغم/لتر) على التوالي . اجريت عملية الاستخلاص للفلويدات الاندولية من خلايا الكالس ثم التنقية الجزئية لمركبي الفانبلاستين

\*معهد الهندسة الوراثية و التقنيات الأحيائية للدراسات العليا/ جامعة بغداد

والفانكرستين باستخدام كروماتوغرافيا العمود ثم التقدير الكمي للمركبين باستخدام كروماتوغرافيا السائل ذي الاداء العالي HPLC .

**المواد وطرائق العمل:**

أنشأت خلايا الكالس لنبات عين البزون في الوسط الزراعي المخصص للنمو Growth media تحت الظروف نفسها التي ذكرها [ 5 ] ، استخدم الوسط الزراعي MS 40 غم / لتر سكروز والحاوي على 2 ملغرام / لتر ( , IAA , 2.4-D, NAA ) على التوالي .

نقلت خلايا الكالس بعد 3-4 أسابيع من الوسط الزراعي المخصص للنمو الى الوسط الزراعي التراكمي Accumulation media والمستخدم لزيادة انتاج مركبات القلويدات الأندولية الفانبلاستين والفانكرستين والمكون من الوسط الزراعي MS 40 غم/ لتر سكروز والحاوي على 2 ملغم / لتر اسيتك اسد و 0.5 ملغم / لتر تربتوفان وحضرا لوسط كما ذكره [ 6 ] حضنت الأطباق بدرجة حرارة 28 درجة مئوية واضاءة مستمرة 500 لوكس .

وزن 2 غم من خلايا الكالس المنقول الى الوسط الزراعي التراكمي بعد ثلاثة اسابيع من نقلها الى الوسط واستخلصت بطريقة استخلاص القلويدات الأندولية وكما ذكرها [ 7 ] .

اجريت عملية التنقية الجزئية لمركبي الفانبلاستين والفانكرستين باستخدام تقنية كروماتوغرافيا العمود باستخدام عمود السليكاجيل ( 1x30 ) سم ومزيج مذيبات الميثانول وخلات الاثيل وحمض الخليك بنسبة ( 0.2:5:5 ) وتمت متابعة عملية شطف العمود من خلال تحليل النازل من العمود بطريقة قياس طيف الامتصاص الالكتروني Spectrophotometer PD-303UV المجهز من شركة APEL لكل 2مل و الطول الموجي 254 نانوميتر اجري التقدير الكمي لمركبي الفانبلاستين والفانكرستين في المستخلص الناتج من التنقية الجزئية باستخدام تقنية كروماتوغرافيا السائل ذي الاداء العالي HPLC المجهز من شركة Shimadza نوع LC-6A المزود بمقياس الطيف بالأطوال الموجية المتغيرة 6A-UV spectrophotometer إذ تم حقن مركبي

### النتائج والمناقشة:

استخدم الاندول اسيتك اسد 2 ملغم / لتر والتربتو فان 0.5 ملغم / لتر في الوسط الزراعي MS 40 غم / لتر سكروز لمعرفة تأثيرهما في نمو وتطور الكالس المنقول الى هذا الوسط من الأوساط الزراعية المخصصة للنمو والحاوية على ( 2,4-D, IAA , NAA ) على التوالي ومن ثم تأثير هذا الوسط التراكمي على انتاج مركبي الفانبلاستين والفانكرستين وتراكمهما داخل خلايا الكالس ، أن أوزان الكالس الكلي على الأوساط الزراعية المخصصة للنمو والحاوية على ( 2,4-D, IAA, NAA ) كانت ( 25.2, 37.96, 48 ) غم على التوالي بعد مرور 2-3 أسابيع من الزراعة وكما مبين في الجدول رقم (1) نلاحظ الزيادة الملحوظة في نمو وتكون الكالس في الوسط الأزرق الحاوي على 2,4-D التي كانت أعلى بكثير من الوسطين الثاني والثالث ويشير الشكل (1) إلى الكالس المنقول من الوسط الزراعي MS والحاوي على 2,4-D بتركيز 2 ملغم / لتر الذي كان نمو الكالس فيه بشكل ضئيل في الوسط التراكمي وكما مبين في الجدول رقم (1) .

أما الكالس المنقول من الوسطين الزراعيين MS والحاوية على ( IAA , NAA ) بتركيز 2 ملغم / لتر على التوالي فنلاحظ تطور جزء من الكالس الى نموات خضرية يصل طولها الى نحو 5-7 سم وكما مبين في الشكل (2 ، 3) ،

جدول (1) أوزان الكالس في الأوساط الزراعية المخصصة للنمو والأوساط التراكمية

معدل وزن الكالس الكلي غرام	معدل وزن قطعة الكالس الواحدة / غرام	عدد قطع الكالس المنقولة الى الوسط التراكمي MS 40 غم / لتر سكروز و 2 ملغم / لتر أندول اسيتك أسد و 0.5 ملغم / لتر تربتوفان	معدل وزن الكالس الكلي غرام	معدل وزن قطعة الكالس الواحدة / غرام	عدد الأجزاء النباتية المزروعة من الأوراق explants	وسط MS مخصص للنمو حاوي على 40 ملغم/لتر سكروز نوع منظم النمو تركيز 2 ملغم/لتر
8	0.4-0.3	20	12	0.6-0.5	24	سيطرة
27	1-0.8	30	48	2-1.5	32	2,4-D
12	0.5-0.4	24	37.96	0.8-0.6	52	IAA
16	0.5-0.4	32	25.2	0.7-0.5	36	NAA



شكل (2) الكالس المنقول إلى الوسط أزرعي التراكمي من الوسط أزرعي MS والحاوي على IAA .



شكل (1) الكالس المنقول إلى الوسط أزرعي التراكمي من الوسط أزرعي MS و الحاوي على 2,4-D .

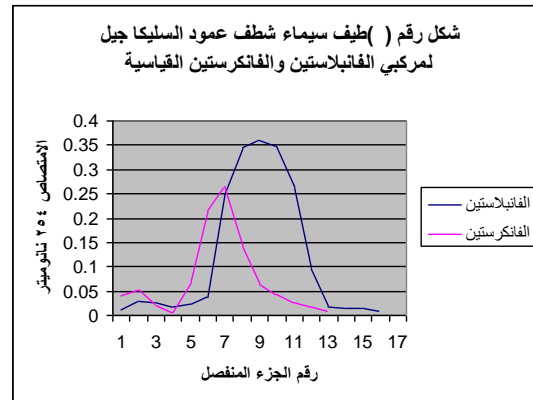


شكل (3) الكالس المنقول إلى الوسط أزرعي التراكمي من الوسط أزرعي MS والحاوي على NAA .

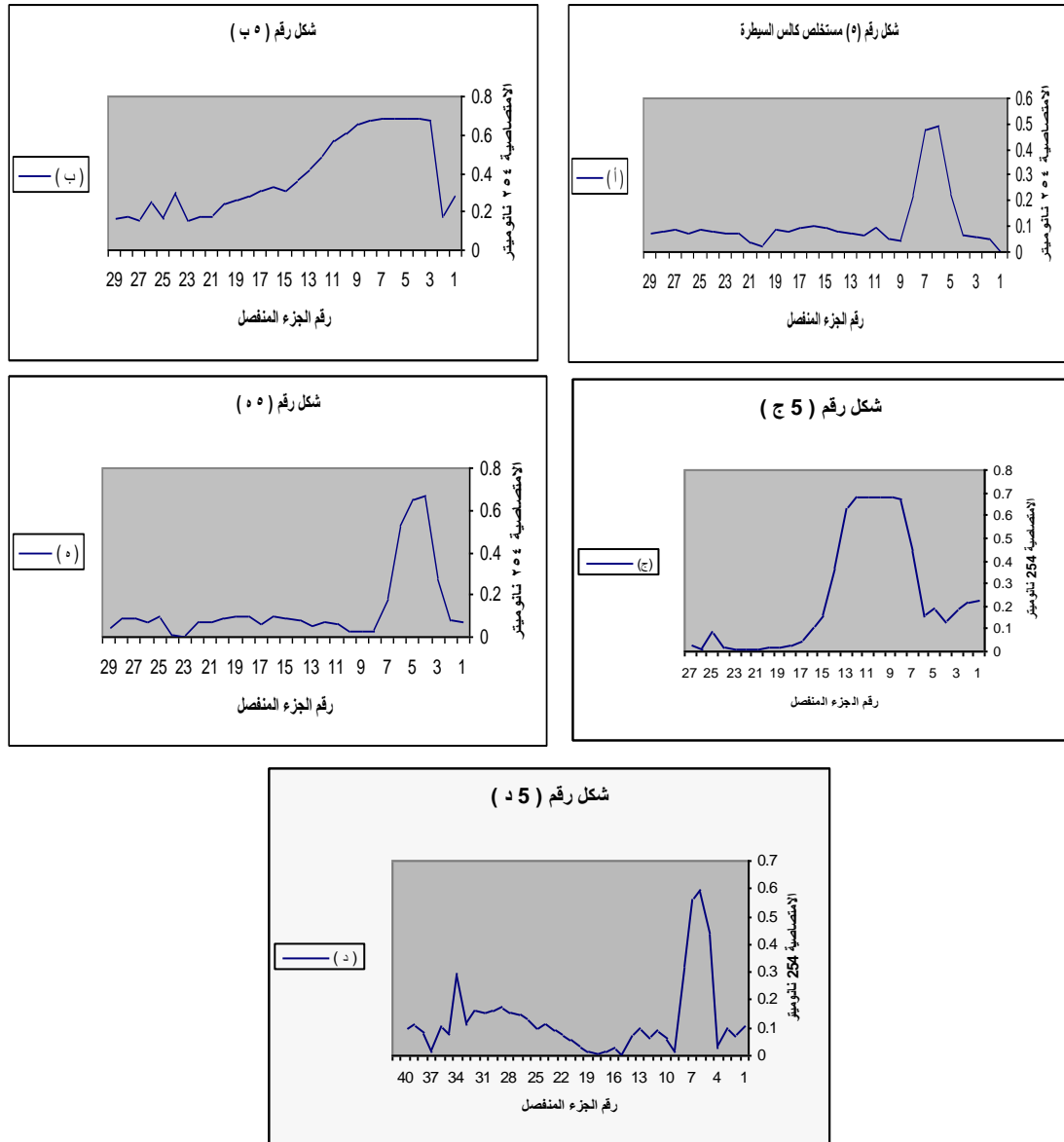
بينت نتائج التنقية الجزئية للمستخلصات باستخدام عمود السليكا جيل ظهور قمم امتصاص واضحة للمستخلصات الخمسة في الاجزاء ( 8-5 ، 3-10 ، 8-13 ، 3-6 ، 5-8 ) إذ وصلت أعلى قيم طيف امتصاص لها على (0.594,0.666,0.681,0.686,0.493) وعلى التوالي وكما مبينة في الشكل (5 أ-ه) وبعد مقارنة القمم الناتجة بقمم المحلول القياسي لمركبي الفانيلاستين والفانكرستين نستدل على وجود المركبين في مستخلصات الكالس وقد بين الشكل رقم ( 5 ، أ، د، ه) إن قمة طيف الامتصاص للمستخلص الاول والرابع والخامس كانت ذات قمة حادة ومتشابهة وقد احتوى المستخلص الخامس على قمم صغيرة تدل على وجود مركبات قلويدية اخرى في المستخلص .

اما في المستخلص الثاني فيبين الشكل (5ب) وجود قمة واسعة مع ظهور قمم صغيرة ومتعددة اما المستخلص الثالث الشكل (5ج) فقد ظهرت فيه قمتان واحدة صغيرة والاخرى كبيرة وبمقارنتها مع الشكل رقم 4 لمركب الفانيلاستين و الفانكرستين نستدل على وجودهما في المستخلص .

نتائج تجارب الاستخلاص والتنقية الجزئية لمركبي الفانيلاستين والفانكرستين من مستخلصات الكالس باستخدام تقنية كروماتوغرافيا العمود: استخلص الكالس لكل تجربة من تجارب الطور التراكمي وحفظ المستخلص النهائي لكل تجربة في 5 مليلتر من مذيب خلات الايثيل . استخدم مركبي الفانيلاستين والفانكرستين القياسية في تجارب التنقية وكما ذكرها [ 5,7] . وكما مبين في الشكل رقم (4) .



شكل (4) طيف سيماء شطف عمود السليكا جيل لمركبي الفانيلاستين والفانكرستين القياسية



شكل (5) أطياف سيماء شطف عمود السليكا جيل لمستخلصات كالس نبات عين البز ون المنقول من وسط النمو MS الحاوي على أ- كالس السيطرة ب- 2,4-D ج- IAA د- NAA ه- NAA (مستخلص البادرات) إلى الوسط التراكمي المكون من الوسط الزراعي MS 40 غم/ لتر سكروز، 2 ملغم/لتر IAA ، 0.5 ملغم / لتر تربتوفان.

التراكمي أدى إلى إنتاج وتراكم مركبي الفانيلاستين والفانكرستين في خلايا الكالس المنقولة من الأوساط الزراعية المخصصة للنمو وكما مبين في الجدول رقم (2) .

نتائج التقدير الكمي لمركبي الفانيلاستين والفانكرستين للطور التراكمي باستخدام تقنية HPLC تبين النتائج ان استخدام الاندول اسيتك اسد 2 ملغم / لتر والتربتوفان 0.5 ملغم / لتر في الوسط الزراعي

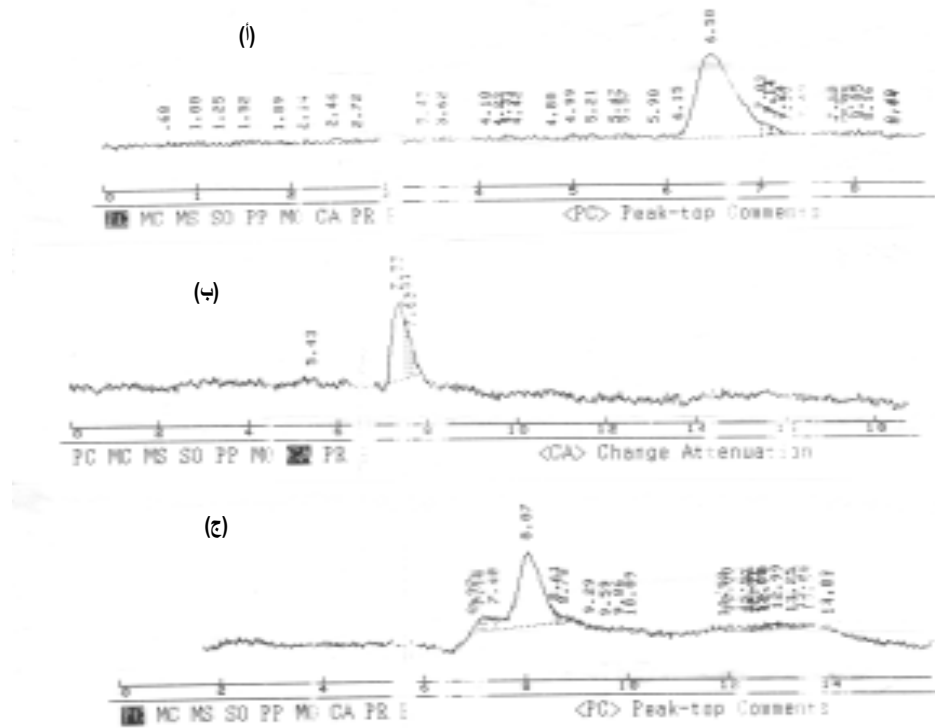
جدول (2) تركيز مركبي الفانيلاستين و الفانكرستين في مستخلصات الكالس المنقول إلى الطور التراكمي MS 40 غم/ لتر سكروز و الحاوي على 2 ملغم /لتر أندول اسيتك أسد و0.5 ملغم/لتر تربتوفان باستخدام تقنية HPLC .

مستخلص البادرات النامية من الكالس المنقول من وسط النمو MS والحوي على NAA	مستخلص الكالس المنقول من وسط النمو MS والحوي على NAA	مستخلص الكالس المنقول من وسط النمو MS والحوي على IAA	مستخلص الكالس المنقول من وسط النمو MS والحوي على 2,4-D	مستخلص كالس السيطرة control	نوع المركب القلويدي جزء بالمليون/0.5 وزن جاف من خلايا الكالس
4.643	Trac	0.94	1.369	Trac	مركب الفانيلاستين
12.5	Trac	0.22	1.107	0.23	مركب الفانكرستين

أي قيمة محسوبة لمركب الفانبلاستين في مستخلص كالس السيطرة كما مبين في الشكل (6 ج) وهذا يتوافق مع ما توصل اليه [10] الذي ذكر أن النموات المتكونة من كالس نبات عين البزون تقوم بإنتاج مركب الفانبلاستين أكثر من خلايا الكالس ، أما قيم مركبي الفانبلاستين والفانكرستين في مستخلصات الكالس المنقولة من الأوساط الزرعية MS والحاوية على 2,4-D,IAA والمبينة في الشكل رقم (7 ا-ب) فكانت أقل بكثير من تراكيزها في مستخلص البادرات النامية من الكالس وكما مبين في الجدول رقم (1)، وقد يعود السبب الى وجود مركب التربتوفان في الوسط الزرعى فقد ذكر [ 11 ] أن إضافة التربتوفان الى الوسط الزرعى يقلل من حث خلايا الكالس على إنتاج مركبات TIAs. أما [ 3 ] فقد توصل الى أن إضافة مركب التربتوفان في الوسط الزرعى يكون غير فعال في إنتاج أو زيادة المحتوى القلويدي في خلايا الكالس.

أن أعلى قيمة لمركبي الفانبلاستين والفانكرستين بالمقارنة مع قيم المركبين القياسية والتي يمثلها الشكل رقم (6) كانت في مستخلص البادرات النامية من الكالس المنقول من الوسط الزرعى المخصص للنمو MS و الحاوي على NAA 2ملغم/لتر وهي (4.643،12.5) جزء بالمليون/0.5 وزن جاف وكما مبين في الشكل رقم (7د).

وهذا يتطابق مع ما توصل إليه [ 8 ] الذي ذكر أن النموات المتفرعة من كالس نبات عين البزون لها القابلية على إنتاج مركبات القلويدات الأندولية، وذكر [9] أن النموات المتكونة من كالس نبات عين البزون لها القدرة على إنتاج مركب الفندولين (Vindoline) وهو من أهم المحفزات precursors لتكوين مركبي الفانبلاستين والفانكرستين، في حين لم يتم الحصول على أي قيمة محسوبة لهذين المركبين في خلايا الكالس المنقولة الى الوسط الزرعى MS والحاوي على NAA كما مبين في الشكل (7 ج) كما لم يتم الحصول على

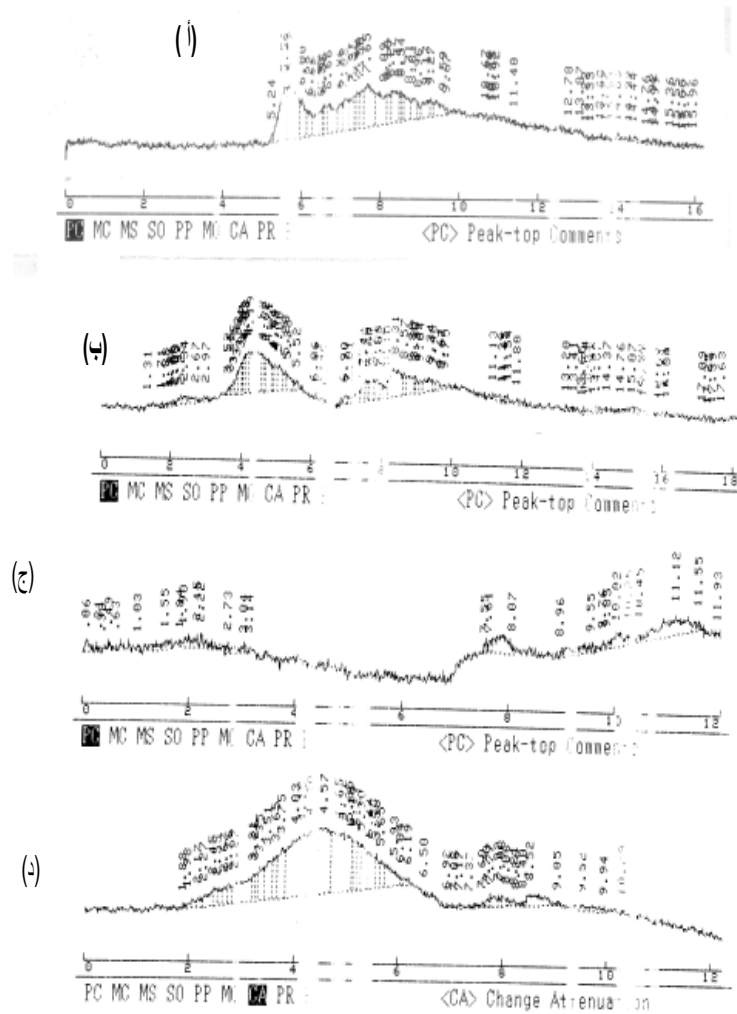


شكل رقم ( 6 ) الاشكال البيانية باستخدام تقنية HPLC لمستخلص كالس السيطرة مع وجود مركبي الفانبلاستين والفانكرستين القياسية.

أ- مركب الفانكرستين القياسي.

ب- مركب الفانبلاستين القياسي .

ج- مستخلص كالس السيطرة .



شكل رقم (7) الأشكال البيانية باستخدام تقنية HPLC لمستخلصات الكالس في طور التراكم في الوسط الزراعي MS 40غم /لتر سكروز، 2ملغم /لتر IAA، 0.5ملغم/لتر تريبتوفان.  
 أ-مستخلص الكالس المنقول من وسط النمو الحاوي على 2,4-D .  
 ب- مستخلص الكالس المنقول من وسط النمو الحاوي على IAA .  
 ج- مستخلص الكالس المنقول من وسط النمو الحاوي على NAA .  
 د-مستخلص البادرات المنقولة من وسط النمو الحاوي على NAA .

#### المصادر:

- Gene, Applied Biochemistry and Biotechnology .97,135-145.
1. Talavera, T.A.,Chappell G., Lozoya-Gloria E., Loyla-Vargas V.M., 2002. Overexpression in *Catharanthus roseus* Hairy Roots of a Truncated Hamster 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Reductase
2. Liu, D.,Jin H.,Chen Y.,Cui L.,Ren W., Gong Y., andTang K. 2007.Terpenoid Indole Alkaloids Biosynthesis and Metabolic Engineering in *Catharanthus roseus*

- compound (vincristine) in the callus cells of *Ain AL-Bazone* paint *Catharanthus roseus*, *Journal of Biotechnology Research*, 2 1:35-53.
8. Constabel, F., Laprairie P., Kurz W.G. and Kutney J.P. 1982. Alkaloids production in *Catharanthus roseus* cell cultures, *Plant Cell Reports*, 1:139-142.
  9. Endo, T.G. A. and Misawa M. 1987. Alkaloids production in root and shoot cultures of *Catharanthus roseus*, *Planta Medica*, 53, 479-482.
  10. Miura, Y., Hirata K., Kurano N., Miyamoto K. and Uchida K. 1988. Formation of Vincristine in multiple shoot culture of *Catharanthus roseus* *Planta Medica*, 54, 18-20 .
  11. Whitmer, S., Heijden R.V. and Verpoorte R. 2002. Effect of precursor feeding on alkaloids accumulation by a tryptophan decarboxylase over-expressing transgenic cell line T22 of *Catharanthus roseus*, *Journal of Biotechnology* , 96(2), 193-203.
  - Journal of Integrative Plant Biology , 49(7):961-974 .
  3. Merillon, J.M., Doireau P., Guillot A., Chenienx J.C. and Rideau M. 1986. Indole alkaloids accumulation and tryptophan decarboxylase activity in *Catharanthus roseus* cells cultured in three different media, *Plant Cell Reports* 5;23-26.
  4. Kurz, W.G.W., Aerman and Constabel F. 1997. *Biotechnology in Agriculture* Marcel Dekker Publ., N.Y., A. Aerman, ed. pp 1-42.
  5. Mohammed, A.S., Hadi S.M., Saour K.Y., 2000. Production of vincristine compound from callus cells of *Catharanthus roseus*, *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, 13.(2), 79-109.
  6. Constabel, F. and Tyler R.T. 1994. *Plant Cell and Tissue Culture*, Indra K. Vasil and Trevor A. Thorpe, pp 271-289 .
  7. Saour, K.Y., Hadi S.M., Mohammed A.S., 2000. Extraction, purification and quantitative determination of indole alkaloids

## **Influence of Indole acetic acid and Tryptophan on production of Vincristine and Vincristine of *Catharanthus roseus* callus cells in the accumulation media of In Vitro tissue culture**

*Sabah Mehdi Hadi\**

\*The Institute of Genetic Engineering & Biotechnology / university of Baghdad

### **Abstract:**

This study on the plant of *Ain -AL Bason* *Catharanthus roseus* showed the ability of callus cells that is produced by In Vitro culture technique and transformed to the accumulated media (MS 40gm/L sucrose , 2gm/L IAA Indole acetic acid , 0.5gm/L Tryptophan) to produce Vincristine and Vincristine compounds.

Extraction, purification and quantitative determination of Vincristine and Vincristine compounds using High performance liquid chromatography technique (HPLC) were carried out.

The results showed that the highest concentration of Vincristine and Vincristine compounds were ( 4.653, 12.5 ) ppm / 0.5 dry Weight respectively from transformed callus cells from MS 40 gm / L sucrose , 2 gm / L NAA Naphthaline acetic acid .