كروماتوكرافيا السائل عالي الأداء في التقدير الكمي للدايوسجنين الناتج الايضي المعزول من مزارع الكالس ، المعلقات الخلوية والجذور الشعرية في النبات الطبي الحلبة Trigonella foenum-graecum

مزاحم قاسم الملاح
وحدة التقنيات الحياتية- قسم علوم الحياة
جامعة الموصل

لمى ذنون الزبيدي
الشركة العامة لصناعة الادوية
والمستلزمات الطبية في نينوى

تاريخ الاستلام
2006/2/7

تاريخ القبول
2006/7/17

ABSTRACT

Callus cultures were obtained from stem and leaf segments of *Trigonella foenum-graecum* grown on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with combinations of Benzyl adenine (BA), Naphthaleneacetic acid (NAA). Maximum callusing 97% were obtained from stem segments grown on MS medium supplemented with a mixture of NAA 1.0 mg L^{-1} and BA 2.0 mg L^{-1}. The friable callus was reasonable for cell suspension cultures. Liquid MS and B5 media with addition of NAA, BA, 2,4-D and Kinetin were used for induction of these cultures. Maximum and steadily growth of these suspensions were found on liquid B5 medium supplemented with 2,4-D (0.2 mg L^{-1}) and Kin. (1.5 mg L^{-1}) with leaf callus. The study established also a culture of hairy roots developed from those adventitious roots induced on intact fenugreek seedlings inoculated by *Agrobacterium rhizogenes* R1601.

High performance liquid chromatography analysis confirmed the presence of diosgenin in callus at ratio 46.3%, In liquid medium of cell suspension derived from leaf callus at ratio of 50.2%, that of stem callus 24.1% . The ratio was at 21.79% of hairy root culture.

الخلاصة

نجحت الدراسة الحالية في استحداث المزارع النسيجية للنبات الطبي الحلبة *Trigonella foenum- graecum* في الحصول على مزارع كالس السيقان والأوراق باستخدام وسط MS الصلب المدعم بإضافة NAA وBA وإنشاء مزارع المعلقات الخلوية المشتقة من كالس السيقان والأوراق في وسط MS وB5 السائلين المضاف أليهما تراكيز متعددة ومتداخلة من BA، NAA ، Kin. و2,4-D . وتمكنت كذلك من إنشاء مزارع الجذور الشعرية المحولة وراثياً المتكونة من تلقيح بادرات الحلبة بالحقن المباشر ببكتريا *Agrobacterium rhizogenes* R1601 التي أظهرت قابلية نمو عالية في وسط WP السائل بنصف قوته التركيبية . وأمكن عزل مركب الدايوسجنين وتشخيصه وتقديره كمياً من المزارع النسيجية المختلفة باستخدام تقانة كروماتوكرافيا السائل عالي الأداء اذ أظهرت النتائج تباين نسبة تواجد الدايوسجنين في العينات المختلفة . وبلغت كميته في البذور والأوراق والسيقان المستأصلة من النباتات النامية في الحقل 4.0 ، 20.8 ، 6.5 مايكروغرام/غرام على التوالي في حين بلغت كميته 64 مايكروغرام/غرام في مزارع كالس السيقان. ولوحظ انخفاض في كميات الدايوسجنين المعزول من الوسط السائل المستخدم في تنمية مزارع المعلقات الخلوية بزيادة عمر المزرعة . وأظهرت النتائج تواجد الدايوسجنين في عينة الوسط السائل المستخدم لتنمية الجذور الشعرية المحولة وراثياً اذ بلغت كميته 16.9 مايكروغرام/غرام.

المقدمة

تبقى النباتات مصدراً مهماً وفريداً للمركبات الطبية التي يصعب تحضيرها مختبرياً فضلاً عن كلفتها العالية عند تصنيعها[1]. إن التقانات المختلفة من الزراعة النسيجية وفرت إمكانية الحصول على المركبات المهمة اقتصادياً ومن ضمنها المركبات الدوائية [2]. فقد أشارت بعض الدراسات إلى عزل قلويد الدايوسجنين والتايكونين من نباتات الحلبة *Trigonella polycerata* [3] ، والحصول على فيتامين C من كالس الفلفل [4] . وتمكنت دراسة أخرى من عزل أنواع من القلويدات مثل الكابسيسين الذي تفوق محتواه في مزارع كالس الفلفل الصنف الحار عن محتوى الأجزاء المشتق منها [5] واشارت العديد من الدراسات إلى إمكان الحصول على مجموعة من النواتج الايضية الثانوية من مزارع الجذور الشعرية المحولة وراثياً[6]. فقد أمكن الحصول على مركب الهايدروكسي سبامين من الجذور الشعرية في نباتات الداتوره والذي لم يكشف عنه في

الجذور الاعتيادية لهذا النبات [7] وعلى مستويات عالية من الثايوفين من الجذور الشعرية المحولة وراثياً بواسطة بكتريا الاكروبكتريا [8] .

ينتمي جنس الحلبة Trigonella إلى العائلة البقولية Leguminosae ويضم مايقارب70 نوعاً منها 18 نوعاً ينتشر في العراق ويعد النوع *Trigonella foenum graecum* من الأنواع المنتشرة في العراق [9] . وتتراوح أطوالها بين 20-60 سم ، جوفاء السيقان ، أوراقها ريشية مركبة ثلاثية الوريقات، ازهارها بيض مائلة الى الاصفرار ثمارها من نوع القرنة. ويعد هذا من الأنواع المهمة طبياً[10] وتحتوي بذورها على ستيرويدات السابوجنين [11]ومركب الترايكو يناللين [12] والفلافونيدات [13] التي تدخل في الصناعات الدوائية]14[. ويمتاز مسحوق بذور الحلبة برائحة متميزة ناشئة عن احتوائها علىمركب الفيورانون Furanone ومواد متطايرة اخرى[15] فضلاً عن مركب الترايكونيللين [16]. واشارت إحدى الدراسات الى نجاح عزل مركبات الترايكوناللين من مزارع المعلقات الخلوية المشتقة من كالس الحلبةواضافت كذلك ان ثلث كمية الترايكونلين اواكثر احياناًيذوب في الوسط السائل [17] . وتهدف الدراسة الحالية إلى إمكانية الحصول على الدايوسجنين أحد النواتج الايضية الثانوية من المزارع النسيجية لنبات الحلبة متمثلة بمزارع الكالس والمعلقات الخلوية المشتقة منه ومزارع الجذور الشعرية المحولة وراثياً ومقارنة محتواها من هذا المركب تواجده في النباتات البذرية.

مواد وطرائق العمل

مزارع الكالس

استخدمت قطع السيقان والأوراق المستأصلة من بادرات الحلبة المعقمة بعمر أسبوعين في تكوين مزارع الكالس في وسط murashiges skoog MS [18] الصلب المدعم بإضافة 1.0 ملغم/لتر نفثالين حامض الخليك NAA، 2.0 ملغم/لتر بنزايل ادنين BA لإنشاء مزارع الكالس من قطع السيقان في حين استخدم الوسط MS الصلب المدعم بإضافة 1.0 ملغم/لتر NAA، 3.0 ملغم/لتر BA لإنشاء مزارع الكالس من قطع الأوراق .[19]

مزارع المعلقات الخلوية

اخذ غرام واحد من كل من الكالس الهش الفتي المستحدث من السيقان والأوراق ووضع كل منهما في دورق زجاجي حجم 250 مل حاوي على 25 مل من الوسط

السائلMS المدعم بإضافة 1.0 ملغم/لتر NAA و 2.0 ملغم/لتر BA . وضعت الدوارق في الحاضـنة الهـزازة (New Brunswick Scientific, Co. Inc Edision, N.J. USA) بسرعة 150 دورة/دقيقة ودرجة حرارة 28 °م في ظروف الظلام التام مـدة 24 ساعة، رشحت المزرعة من خلال منخل بلاسـتيكي معقـم 45 µm (Manipulation Group Nott. Univ, U.K) واستقبل الراشح وأعيد إلى الحاضنة [20]. استخدم كل من الوسطين MS ، B5 [12] بأجراء الإضافات آلاتية اليهامن منظمـا ت النمـو لإنـشاء المعلقات الخلوية المشتقة من كالس السيقان والأوراق وهـي 0.2 mg\L 2,4-D + 1.5 mg\L Kin. ، 0.2 mg\L 2,4-D + 2.0 mg\L BA ، 1.0 mg\L NAA + 1.0 mg\L BA علما بان هذه الاوساط لم تستخدم جميعهامع قطع السيقان والاوراق.

- **مزارع الجذور الشعرية المحولة وراثيا**

استخدمت السلالة R1601 من بكتريا *Agrobacterium rhizogenes* الحاويـة لعلائم وراثية لمقاومة المـضادين الحيـويين $Kana.^{R+}$ و $Carb.^{R+}$ (Professor E.W. Nester, Washington Univ.,USA) في إعداد اللقاح البكتيري فـي وسـط APM [22]. لقحت بادرات الحلبة المعقمة بعمر أسبوعين النامية في وسط MS الصلب الخالي من منظمات النمو بطريقة الحقن المباشر بالبكتريا باستخدام ابرة دقيقة معقمة وغمرت نهايتهـا في اللقاح البكتيري. وخزت السيقان بعدئذ في موقع واحد معين، أعقبها غـرس البـادرات الملقحة بصورة قائمة في وسط Woody plant medium WP الـصلب بنـصف قوتـه التركيبية [23]. وحفظت العينات الملقحة في غرفة الزرع في ظروف درجة حـرارة 25 ± 2 °م وإضاءة شدتها 100 لوكس لمتابعة ظهور الجذور الشعرية.

استؤصلت الجذور الشعرية المتكونة في مواقع التلقيح عند بلوغها 1 سـم فـي الطول ووضعت على سطح 25 مل من وسط WP الصلب بنصف قوته التركيبية الحاوي على 250 مايكروغرام/مل من السيفوتاكسيم [24] وأعيد نقل الجذور مرة ثانيـة علـى الوسط نفسه مع رفع تركيز السيفوتاكسيم خلال مدة أسبوع بين نقلة وأخرى الـى حـين الحصول على مزرعة جذور شعرية خالية من البكتريا، نقلت هذه الجذوربعد ذلـك إلـى دورق زجاجي سعة 250 مل حاو ل50 مل من وسط WP السائل بنصف قوته التركيبية وحضنت الدوارق في الحاضنة الهزازه 80 دورة / دقيقة في ظروف الظلام التام ودرجة حرارة 25°م [11].

الترحيل الكهربائي للكشف عن الاكروبين

أخذ 100 ملغم من الجذور الشعرية وسحقت في 100 مـايكروليتر 0.1 عيـاري حامض HCl في انبوبة ابندروف . نبذت العينات مركزيا 6000 دورة/دقيقة / 20 دقيقة (Hettich EBA 3S) . وحمل 10 مايكروليتر من راشح كل عينة و 2 مايكروليتر من عينـة الاكـروبين القياسـي (Dr. Y. Dessaux, CNRS, France) علـى ورق الكروماتوكرافيا 20 × 20 سم^2 (Whatman No. 3) . وضعت الورقة في حوض جهـاز الترحيـل الكهربـائي (Esselte Studium, S-11285 Stookhelm, Electrophoresis Sweden) بوجود 100مل من المحلـول المتكـون مـن حـامض الفورميك: حامض الخليك: الماء (80:15:5 حجم : حجم : حجم) وتمرير تيار كهربـائي بفولتية تراوحت 300-400 فولت مدة ساعة واحدة . رفعت الورقة وجففت في الهـواء وصبغت بمحلول نترات الفضة وبعد جفافها لمدة 30 دقيقـة غمـرت فـي محلـول 2% Methanolic NaOH لإظهار البقع وبعد جفافهـا غمـرت ثانيـة فـي محلـول 5% ثايوكبريتات الصوديوم وغسلها بالماء الجاري لمدة 30 دقيقة وتركت لتجف فـي الهـواء [25].

التقدير الكمي للدايوسجنين المعزول من المزارع النسيجية بواسطة كروماتوغرافيا السائل العالي الكفاءة (HPLC)

اخذ غرام واحد من المزرعة النسيجية وأضيف إليها 30 مـل مـن 4 عيـاري حامض الكبريتيك المخففH2SO4 4N في 70% من كحول Isopropanol وتركـت المزرعة فيه مدة ثلاث ساعات . رشح المستخلص من خلال ورقة الترشيح (Whatman No. 1). نقل الراشح إلى قمع الفصل حجم 250 مـل وفـصل الدايوسـجنين باسـتخدام Hexane (60 مل × 3) لمدة خمس دقائق/ مرة وغسلت هذه المستخلصات الثلاث مـن الهكسان ثلاث مرات بمحلول 5% هيدروكسيد البوتاسيوم KOH (180 مل / مرة) أعقبها غسلها بالماء المقطر(180 مل / مرة) . بعدئذ مرر المستخلص الكلي خلال قمع تـستقر في أعلاه طبقة من القطن تستند إليها طبقة من مسحوق Na2SO4 لسحب الماء المتبقـي في المستخلص ، وركز الراشح بالمبخر الدوار [25] . وقدرت كمية الدايوسـجنين [26] في مستخلصات عينات الكالس والمعلقات الخلوية والجـذور الـشعرية المحولـة وراثيـاً والبذور والسيقان والأوراق المـستأصلة مـن النباتـات الناميـة فـي الحقـل باعتمـاد كروماتوغرافيا السائل العالي الكفاءة HPLC . وبلغ حجم عينة الحقـن 20 مـايكروليتر وطول عمود الفصل 125 ملم، قطره الداخلي 4.0 ملم وحجم الجزيئات 5 مايكروميتر .

وتكون الطور المتحرك من Acetonitril : Chloroform : Hexane 30 مـل : 10 مل : 40 مل وبسرعة جريان 1.0 مل/ دقيقة وطول موجي 254 نانوميتر.الطور الثابت يتكون من مادة Nuceosil 100-SC18 .

النتائج

تكوين مزارع الكالس

أظهرت النتائج سهولة تكوين مزارع الكالس الهش ذي اللون الأخضر مـن قطـع السيقان والأوراق المستأصلة من بادارت الحلبة المعقمة في وسط MS الـصلب المـدعم بإضافة 1.0 ملغم/لتر NAA ، 2.0 ملغم/لتر BA إضافة إلى عينة المقارنـة المتمثلـة باستخدام وسط MS خالي من منظمات النمو (الجدول 1).

الجدول 1.

تكوين مزارع كالس سيقان وأوراق الحلبة في وسط MS الصلب المدعم بإضافة 1.0 ملغم/لتر NAA ، 2.0 ملغم/لتر BA

العينة النباتية	تكوين مزارع الكالس (%)
الأوراق	80.7
*(مقارنتها)	0.0
السيقان	97
*(مقارنتها)	0.0

* المقارنة استخدام وسط MS خالي من منظمات النمو.

إنشاء مزارع المعلقات الخلوية

أظهرت نتائج إنشاء المعلقات الخلوية من كالس السيقان والأوراق في وسط MS, B5 السائلة المدعمة بمستويات مشتركة متداخلة مـن NAA، 2,4-D مـع BA ، Kin. تفوق وسط B5 المدعم بإضافة 1.0 ملغم/لتـر NAA ، 2.0 ملغـم/لتـر BA ، حيـث امتازت المزرعة الخلوية المشتقة من كالس السيقان بنمو مثالي للخلايا وسـلوكها نمطـاً واضحاً في انقساماتها (الشكل1-A) وهذا يؤكد ملائمة الوسط B5 لنمو خلايـا المعلـق الخلوي قياساً بأوساط B5 الأخرى التي بدت اقل تشجيعاً لنموها . وعند اسـتبدال وسـط B5 بالوسط MS مع الحفاظ على نفس منظمات النمو ومستوياتها المضافة تبين أن الوسط

المدعم بإضافة 1.0 ملغم/لتر NAA و2.0 ملغم/لتر BA اظهر هذا الوسط تفوقاً (الشكل B-1) عن بقية أوساط MS حيث لم تشجع انقسامات مزارع المعلقات الخلوية المشتقة من كالس السيقان وأبدت أنماط شاذة في بلو غها الطور الاسي .

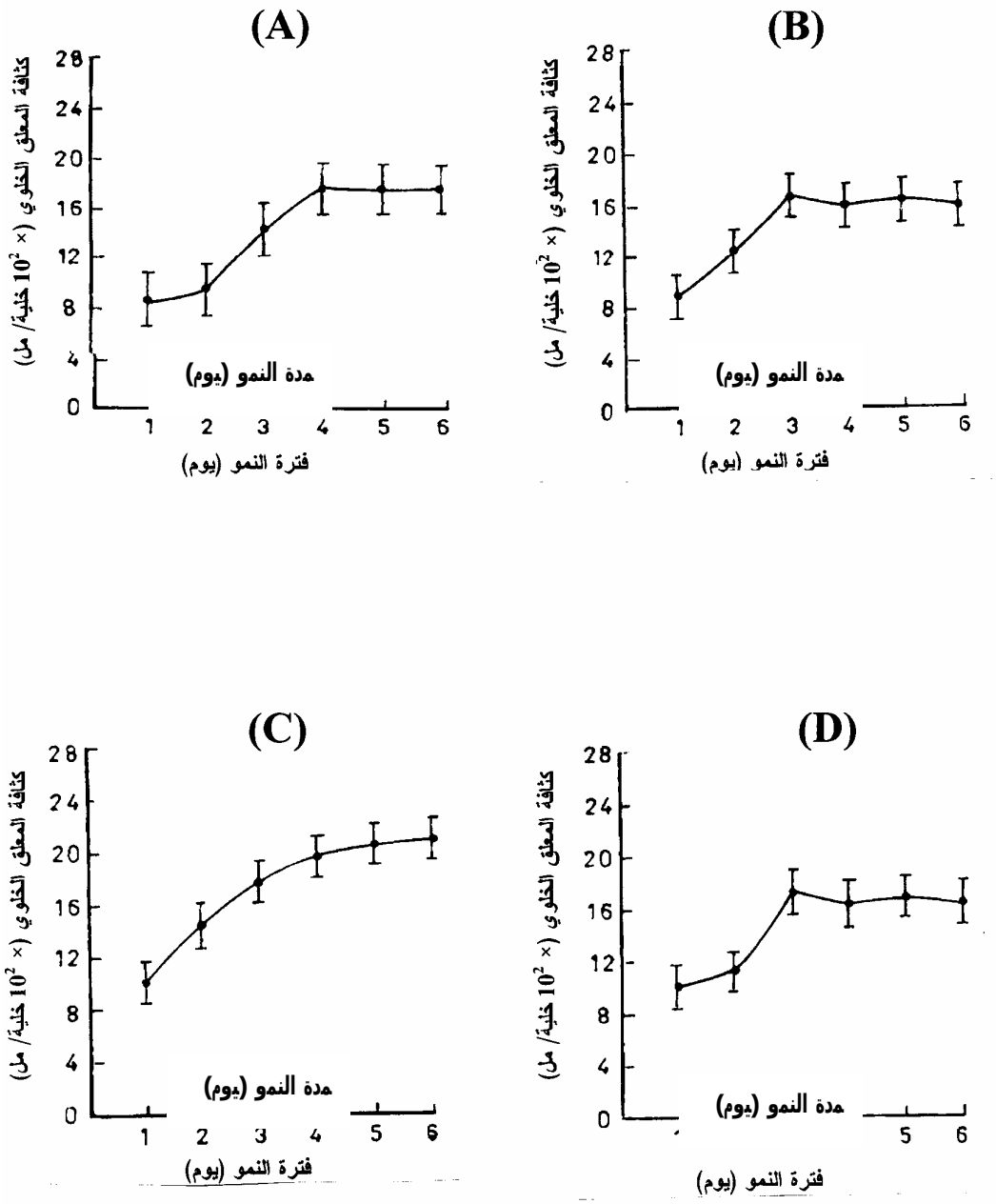
كما أظهرت النتائج أن وسط B5 السائل المدعم بإضافة 0.2 ملغم/لتر 2,4-D مـع 1.5 ملغم/لتر .Kin قد اظهر تشجيعا لانقسام خلايا المعلق الخلوي المشتقة مـن كـالس السيقان (الشكل C-1) في حين لم تظهر ذلك بقية الأوساط ، وعند اسـتبدال الوسـط B5 بالوسط MS فان الوسط المدعم بإضافة 1.0 ملغم/لتر NAA وبوجود 2.0 ملغـم/لتـر BA قد أظهرت خلاياه سلوكاً مشابهاً لسلوك خلايا المزارع المشتقة من كـالس الـسيقان (الشكل D-1) في حين لم تشجع بقية الإضافات المختلفة من منظمات النمو في وسط MS السائل انقسامات خلايا المزارع المشتقة من كالس الأوراق. أديمت مزرعة المعلق الخلوي المشتقة من كالس السيقان في وسط B5 المضاف إليـه 1.0 ملغـم/لتـر NAA و 2.0 ملغم/لتر BA ومزرعة المعلق الخلوي المشتقة من كالس الأوراق في وسط B5 المضاف إليه 0.2 ملغم/لتر 2,4-D و 1.5 ملغم/لتر .Kin لغرض استخدامها في الكـشف عـن وجود الدايوسجنين فيها.

الحصول على مزارع الجذور الشعرية المحولة وراثياً

أظهرت النتائج أن تلقيح بادرات الحلبة بعمر أسبوعين بالناقل الطبيعـي بكتريـا *Agrobacterium rhizogenes* أدى إلي تشجيع تكوينها للجذور الشعرية فـي مواقـع التلقيح (الجدول 2) .

وقد استطاعت الجذور الشعرية المستأصلة من مناطق نشوئها في تكـوين مـزارع كثيفة منها في وسط WP السائل بنصف قوته التركيبية.

وأكدت نتائج الترحيل الكهربائي لعينات مزارع الجذور الشعرية إيجابيتهـا لهـذا الاختبار متمثلاً بتكون بقع سوداء على ورقة الكروماتوكرافيا بدلالة بقع الاكروبين القياسي مما يدل على أن هذه الجذور محولة وراثياً. وبعد التأكد من خلو هذه المزارع من البكتريا اديمت على نحو دوري لغرض استخدامها في عزل ستروبد الدايوسجنين.



الشكل 1: نمو مزارع المعلقات الخلوية المشتقة مـن كـالس سـيقان وأوراق الحلبـة الناميـة في أوساط MS و B5 السائلة. (A)مزرعة المعلق الخلوي المشتقة من كالس سيقان الحلبة النامية في وسط B5 + 1.0 ملغم/لتر NAA + 2.0 ملغـم/لتـر BA. (B) مزرعة المعلق الخلوي المشتقة من كالس سيقان الحلبة النامية في وسط MS + 1.0 ملغم/لتر NAA + 2.0 ملغم/لتر BA. (C) مزرعة المعلق الخلوي المـشتقة مـن كالس أوراق الحلبة النامية في وسط B5 + 0.2 ملغم/لتر 2,4-D + 1.5 ملغم/لتـر Kin. (D) مزرعة المعلق الخلوي المشتقة من كالس أوراق الحلبة النامية في وسط MS + 1.0 ملغم/لتر NAA + 2.0 ملغم/لتر BA.

الجدول 2

استجابة بادرات الحلبة *Trigonella foenum-graecum* وتكوينها الجذور الشعرية عند تلقيحها ببكتريا *A.rhizogenes* R1601

العينة النباتية	عدد البادرات الملقحة	عدد البادرات المستجيبة	تكون الجذور الشعرية (%)
بادرات غير ملقحة(مقارنة)	50	0	0
بادرات ملقحة	239	53	22.2

العزل والتقدير الكمي للدايوسجنين في المزارع النسيجية بواسطة كروماتوكرافيا السائل عالي الكفاءة (HPLC)

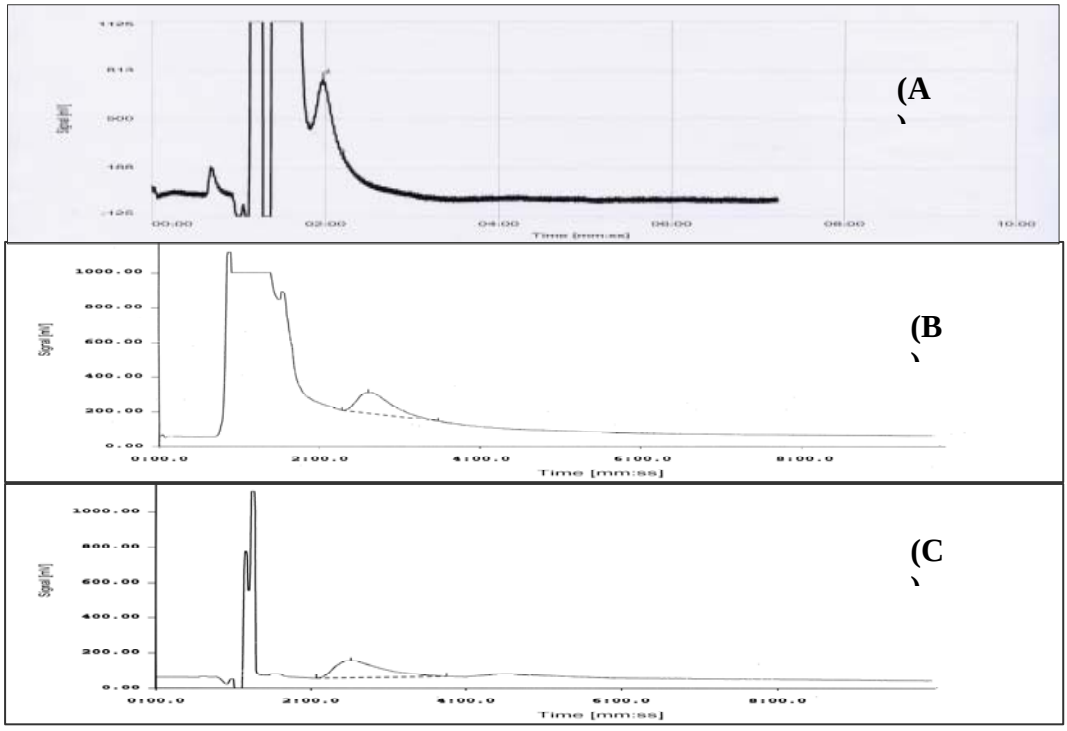
أظهرت النتائج أن زمن الاحتباس في مزارع كالس الاسيقان بلغت 2:15 (الشكل B-2) وكذلك في الوسط السائل لمزارع المعلقات الخلوية في يومها الرابع والمشتقة من كالس الاوراق (الشكلC-2) مقارنة بعينة الدايوسجنين القياس (الشكل A-2). وقد سجلت اعلى كمية للدايوسجنين المعزول من مزارع كالس الاوراق (الجدول 3) وتشير النتائج ان الوسط السائل للمزارع الخلوية المشتقة من كالس الاوراق احتوت على كمية مماثلة من الدايوسجنين خاصة في اليوم الاول من عمر المزرعة. هذه البيانات توضح ان كالس الاوراق والمعلقات المشتقة منه تناظر محتوى الدايوسجنين في الاوراق الناتجة من النباتات البذرية. في حين ان محتوى مزارع الجذور الشعرية كان واطئاً وهذه النتائج توضح ان المركب يصنع في الجذور كما هو معروف ولكنه ينقل الى الاوراق.

الجدول 3

كروماتوكرافيا السائل العالي الكفاءة في تحديد نسب وجود وكمية مركب الدايوسجنين المعزول من النباتات البذرية ، مزارع الكالس والمعلقات الخلوية، مزارع الجذور الشعرية المحولة وراثياً في النبات الطبي الحلبة.

العينة النباتية		زمن الاحتباس (دقيقة)	كمية الدايوسجنين (ملغم/ غم)
المقارنة	**الداوسسجنين القياسي**	1:58	
النباتات البذرية	البذور	1:59	0.0042
	الاوراق	1:57	0.0208
	السيقان	1:57	0.0065
مزارع الكالس	كالس الاوراق	2:15	0.064
	كالس السيقان	2:17	0.0295
الوسط السائل لمزارع المعلقات الخلوية المشتقة من كالس الاوراق	اليوم الاول	2:05	0.0487
	اليوم الثاني	2:05	0.0451
	اليوم الثالث	2:05	0.0226
	اليوم الرابع	2:22	0.0185
	اليوم الخامس	2:21	0.0122
	اليوم السدس	0.0	0.0
الوسط السائل لمزارع المعلقات الخلوية المشتقة من كالس السيقان	اليوم الاول	1:58	0.0106
	اليوم الثاني	1:52	0.0025
	اليوم الثالث	____	____
	اليوم الرابع	1:52	0.0062
	اليوم الخامس	____	____
	اليوم السدس	1:55	0.0023
مزارع الجذور الشعرية المحولة وراثياً	وسط نمو الجذور الشعرية	1:57	0.0169

(-) لم تختبر



الشكل 2

المنحنيات القياسية لعينات الدايوسجنين في جهاز HPLC. (A)عينة الدايوسجنين القياسي،(B)عينة كالس الأوراق،(C)عينة مزارع المعلقات الخلوية المشتقة من كالس الأوراق(اليوم الأول من عمرالمزرعة).

المناقشة

تناولت العديد من الدراسات التقدير الكمي لعدد من المركبات التي تحتويها نباتات الحلبة فقد تمكن Taylorوجماعته [28] من عزل الستيرويدات الصابونية من بذور الحلبة والأجزاء الهوائية لبادراتها وكان المركب الرئيس ضمن هذه الستيرويدات المعزولة هو مركب الدايوسجنين . وتمكنت دراسة أخرى من التعرف الى محتوى الدايوسجنين في بذور ثلاثة أصناف مختلفة من نباتات الحلبة باستخدام تقنية كروماتوغرافياالغازGlcوظهر تباين في محتوى الدايوسجنين في هذه الأصناف الثلاثة مما يؤيد دور الصنف النباتي في هذه الحالة ، فقد كان محتوى بذور الحلبة للصنف ZT – 5 من مركب الدايوسجنين عاليا حيث بلغت نسبة تواجده 0.75 % دراسة أخرى إلى تأثير منظمات النمو المضافة في الوسط الغذائي في تنظيم عمليات بناء وتراكم مركب الدايوسجنين من نباتات الحلبة وأكدت الدراسة عينها إن استخدام الأوكسين IAA و GA أظهر تأثيرا مشجعا في زيادة تركيز مركب الدايوسجنين في نباتات الحلبة بعمر 30 يوما ويفسر هذا التأثير دور هذه المنظمات

في تحفيز نمو النبات مما يترتب عنه زيادة البناء الحيـوي لهـذا المركـب [30] . كمـا أوضحت إحدى الدراسات أن توزيع مركب الدايوسجنين في أعضاء النبات وتغايره خلال نمو وتطور أعضاء نباتات الحلبة الناتجة من معاملة بذورها بمركب بنزايل امينوبيـورين benzylaminopurine (BAP) أن أعلى كمية لهذا المركب كان في الأوراق الفتيـة حيث بلغت كميته 20 ملغم / غم وزن جاف ، أعقبه وجوده في السيقان والبذور وأخيـراً جذور النباتات [31] . لقد أظهرت نتائج هذه الدراسة احتواء كالس الحلبة النامي في وسط MS المدعم بالمنظمات BA و NAA على مركب الدايوسجنين وكانت كميته فيه أكثـر من كميته في الأوراق وهذا يفسر ملائمة هذه المزارع للحصول على هذا المركب خاصة وأن خلاياها من النوع البرنكيمي التي هي خلايا منقسمة ومتضاعفة وتقـوم فـي إحـدى وظائفها بالخزن . وقد أشارت العديد من الدراسات إلى تواجد هذا المركب فـي أنـسجة الكالس فقد أظهرت نتائج إحداها أن استخدام وسط MS بوجود 5 ملغم/لتـر Kin أظهـر زيادة ملحوظة في مركب الدايوسجنين في مزارع الكالس لنبات الحلبة [32]. وأشار بعض الباحثين [33] الحصول على الدايوسجنين من ثلاثة مزارع لكالس نباتات الحلبـة شـملت كالس الأوراق والسيقان والجذور المستحدث في أوساط مختلفة وتبين أن أعلـى مـستوى للدايوسجنين قد لوحظ في كالس الأوراق اذ بلغت كميته 2.2 ملغم / غـم وزن جـاف . وأكدت دراسة أخرى أن كمية الدايوسجنين والتايكوجنين Tigogenin المعزولة من أحـد أنواع نباتات الحلبة *Trigonella polycerate* كانت متناسبة مع نمو مـزارع الكـالس وبلغ أعلى مستوى للدايوسجنين والتايكوجنين في مزرعة الكالس بعمر 8 أسـابيع [31] . وقد يعزى تفوق كمية مركب الدايوسجنين في مزارع كالس الأوراق عن كميته في كالس السيقان وتفوق كمية المركب في مزارع الكالس عن كميته فـي أوراق وسـيقان نباتـات الحلبة إلى نوع المنظمات المستخدمة في تدعيم الوسط أو إلى عمر المزرعة أو الى كليهما كما أشارت الدراسات المذكورة سابقا .

عزل مركب الدايوسجنين في الدراسة الحالية وقدرت كمياته في الوسـط الـسائل لمزارع المعلقات الخلوية المشتقة من كالس الأوراق وكالس السيقان اذ لوحظ زيادة كميـة هذا المركب في الوسط السائل لمزرعة المعلق الخلوي المشتقة من كـالس الأوراق فـي اليوم الأول مقارنة مع الأيام الأخرى من عمر المزرعة . وقد تفوقت هذه الكمية عن كمية الدايوسجنين في اليوم الأول من مزرعة المعلق الخلوي المشتقة من كالس السيقان . وقـد يعزى ذلك إلى نوع الوسط المستخدم في تنمية مزارع المعلقات الخلويـة فـي الدراسـة الحالية . فقد بينت إحدى الدراسات بأن المزارع المعلقة لنبات الحلبة والنامية في أوسـاط مدعمة بتراكيز مختلفة من الكولـستيرول Cholesterol أنتجـت تراكيـز عاليـة مـن

الستيرويدات ومن ضمنها الدايوسجنين مقارنة مع الأوساط الخالية منه [34] ، كما قد يعزى ذلك إلى عمر المزرعة ونوع منظمات النمو المستخدمة حيث فقد ذكرت دراسة أخرى أن عمر المزرعة وطبيعة وتركيز الأوكسينات والسايتوكانينات تؤثر على نمو وملحوظ على النمو ومستوى الستيرويدات في مزارع المعلقات الخلوية لنباتات الحلبة [35]. إن إمكان عزل مركب الدايوسجنين من الوسط السائل لمزرعة المعلقات الخلوية في الدراسة الحالية يؤكد طرح هذا المركب من قبل خلايا مزرعة المعلق الخلوي إلى الوسط السائل. وقد أكدت إحدى الدراسات التي تناولت عزل الترايكونيلين Trigonelline من مزارع المعلقات الخلوية لنباتات الحلبة أن أكثر من ثلث كمية الترايكونيلين المنتج يذوب في الوسط السائل للمزرعة وأشارت الدراسة كذلك إلى انتقال هذا المركب من موقع بنائه في الخلية إلى الوسط [17].

إن نجاح الدراسة الحالية في عزل الدايوسجنين من الوسط السائل لمزرعة الجذور الشعرية المحولة وراثيا وتواجده بكمية أكبر من كميته في مزرعة المعلق الخلوي المشتقة من كالس السيقان وبكمية اقل من كميته في كالس الأوراق وفي مزرعة المعلق الخلوي المشتق من كالس الأوراق يؤكد إنتاج الجذور الشعرية لهذا المركب وطرحه إلى الوسط السائل للمزرعة. وقد يعزى عدم تميز الوسط السائل لمزرعة الجذور الشعرية في محتواها من مركب الدايوسجنين إلى قلة طرح الجذور الشعرية المحولة وراثيا لهذا المركب إلى الوسط السائل أو ربما إلى طبيعة الوسط المستخدم في تنمية مزارع الجذور الشعرية. وبينت إحدى الدراسات أن الوسط WP السائل بنصف قوته التركيبية المدعم بالسكروز 1% كان وسطاً مثالياً للحصول على الدايوسجنين وقد يعزى ذلك إلى ظروف تنمية المزارع اذ أظهرت الدراسة نفسها حصول زيادة محتوى الدايوسجنين في المزرعة مع نقصان حامضية المزرعة pH وأن تعزيز الوسط بمركب Chitosan أدى إلى زيادة كمية الدايوسجنين المنتجة في المزرعة بثلاثة أضعاف عن المزرعة غير ال اليها هذا المركب [23] . كما أشارت إحدى الدراسات التي تناولت تنمية الجذور الشعرية في مخمرات دوارة حصول نمو عال للجذور مع تكوين كمية محدودة من الدايوسجنين ، واخيراً تبقى مزارع الجذور الشعرية المحولة وراثيا عموماً أكثر سهولة في الاستحداث والتنمية مقارنة مع مزارع المعلقات الخلوية [11].

المصادر

1. Dixon,R.A. Plant Cell Culture, A Practical Approach. IRL Press. Oxford. U.K. (1985).
2. Purohit, S. S. Agricultural Biotechnology. Agro Botanica, J.N. Vyas Naggrr, Bikaner, India (1999).
3. Kamal, R. and Yavada, R. Indian Drugs. 29:360-361 (1992).
4. الملاح، مزاحم قاسم واليوزبكي، غادة شرف الدين يحيى. مجلة التربية والعلم 4: 46-59 (2002).
5. اليوزبكي، غادة شرف الدين يحيى. رسالة ماجستير ، كلية التربيـة، جامعـة الموصـل (1998).
6. Giri, A. and Narasu, M. L. Biotechnol. Adv. 18: 1-22 (2000).
7. Shimomura, K.; Sauerwein, M.and Ishimaru, K. Phytochem. 30: 2275-2278 (1991).
8. Mukundan, U. and Hjortso, M. A. Plant Cell Repts. 9: 627-630 (1991).
9. الزبيدي، زهير نجيب، بابان، هدى عبد الكريم وفليح، فارس كاظم. دليل العلاج بالاعشاب الطبية العراقية. شركة آب للطباعة الفنية المحدودة، بغداد (1996).
10. الموسوي ، علي حسين عيسى. علم تصنيف النباتات. مطبعة جامعة بغـداد ، بغـداد - العراق (1987).
11. Christen, P. Trigonella species: In vitro culture and production of secondary metabolites. Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 51 Medicinal and Aromatic Plants XII (ed. By T. Nagata and Y. Ebizuka) Springer- Verlag Berlin Heidelbreg (2002).
12. British Herbal Pharmacopecia (cited in : AL- Hakemi 2002) (1983).
13. Newall, C. A.; Anderson, L. A. and Phillipson, J. D. Herbal Medicines, A Guide for Health-Care Professionals. London, The Pharmacential Press, U. K. (1996).
14. Bhalsing, S.R. and Maheshwari, V.L., J. Sci. Indust. Res. 57:703-708 (1998).
15. Girardon, P.; Bissiere, J. M.; Baccou, J.C. and Sauvaire, Y. Planta Medica.27: 533-534 (1985).
16. AL-Hakemi, A. A. N. M. Sc. Thesis. College of Pharmacy. Univ. of Baghdad (2002).

17. Radwan, S. S. and Kokate, C. K. Planta 147: 340-344 (1980).

18. Murashige, T and Skoog, F. Physiol. Plant.15: 473-497 (1962).

19. احمد، جاسم محمد ياسين. رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة الموصل (2000).

20. Morris, P. and Fowler, M. W. Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 1: 15-24 (1981).

21. Gamborg, O. L.; Miller, R. A. and Ojima, K. Exp. Cell Res. 50: 151-158 (1968).

22. Morgan, A. J.; Cox, P. N.; Turner, D. A.; Peel, E.; Davey, M. R.; Gartland, K. M. A. and Mulligan, B. J. Plant Sci. 49: 37-49 (1987).

23. Merkli, A.; Christen, P. and Kapetanidis, I. Plant Cell Repts. 16: 632-636 (1997).

24. AL-Mallah, M. K. and Cocking, E. C. Dirasat Natural and Engineering. Sci. 24: 521-527 (1997).

25. Tepfer, D. A. and Tempe, J. Acad. Sci. Paris. Ser. III 292: 212-218 (1981).

26. Sauvaire, Y. and Baccou, J. C. Lloydia. 41: 247-256. (Cited in: Ortuno et. al.,1998) (1978).

27. Nachtman, F.; Spitzy, H.; and Frei, R. W., J. Chromato. 122: 293-303 (1976).

28. Taylor, W. G.; Zaman, M. S.; Mir, Z.; Mir, P. S.; Acharya, S. N.; Mears, G. J. and Elder J. L. J. Agricult. Food Chemi. 45: 753-759 (1997).

29. Taylor, W.G.; Elder, J.L.; Chang, P.R. and Richards, K.W. J. Agricult. Food Chem. 48: 5206- 5210 (2000).

30. Ortuno, A.; Oncina, R.; Botia, J. M. and Del Rio, J. A. Food Chem. 65: 227-232 (1999).

31. Ortuno, A.; Oncina, R.; Botia, J. M. and Del Rio, J. A. Food Chem. 1: 51-54 (1998).

32. Singh, NN.; Kokate, CK. and Tipnis, HP. Plant Cell Repts.2: 119-121(1981).

33. Oncina, R.; Bortia, J. M.; Del Rio, J. A. and OrtuñoA. Food Chem. 70: 489-492(2000).

34. Khanna, P.; Jain. S. C. and Bansal, R. J. Exp. Biol. 13: 211-213 (1975).

35. Brain, K. R. and Lockwood, G. B. Phytochem. 15: 1651-1654(1976).