تقدير مركبات الستيرويدات Withanolides في الكالس والمعلق الخلوي لنبات *Withania somnifera* L.

مثنى محمد ابراهيم المهداوي بتول محمد علوان

الملخص

قُدرّت مركبات الستيرويدات **Steriods** في الكالس المشتق من السيقان تحت الفلقية لنبات ***Withania somnifera* L.** وفي الوسط الغذائي للمعلق الخلوي المنشأة من الكالس الهش المشتق من السيقان تحت الفلقية في وسط **MS** السائل المدعم بتداخل منظمات النمو المستخدمة في إستحثاث الكالس المكونة من **2,4-Dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D)**بتركيز **3.0** ملغم.لتر$^{-1}$ + **0.5** ملغم.لتر$^{-1}$ من **Kinetin (in)**. أظهرت بيانات الكشف عن مستويات مركبات **Withanolides** في المزارع النسيجية للكالس والوسط الغذائي للمعلقاتالخلوية عن وجودها في هذه المزارع بدلالة قراءات كروماتوكرافيا السائل العالي الكفاءة **High Performance Liquid Chromatography** بمقارنتها مع العينات القياسية.تراوحت كمية مركبات الوذونولايد **Withanolides** في كل من مزارع الكالس بين**11.23–58.06** مايكروغرام.مل$^{-1}$ وفي الوسط الغذائي للمعلق الخلوي بين**0.79– 17.62** مايكروغرام.مل$^{-1}$. وعموما اظهرت النتائج إمكان انتاج مركبات**Withanolides** في مزارع الأنسجة وبالتالي إمكان إعتماد مزارع الأنسجة بوضعه مصدراً ثابتاً ودائماً للحصول على هذه المركبات المهمة، ومن النتائج المهمة التي تم التوصل إليها في هذه الدراسة هي قابلية الخلايا على ترشيح هذه المركبات الى الوسط الغذائي، التي يمكن ان تعتمد أساساً لإنتاج هذه المركبات في المفاعلات الحيوية.

المقدمة

تُعدُّ أغلب النباتات الراقية مصدراً مهماً للحصول على النواتج الطبيعية، التي تتضمن مركبات ذات قيمة صيدلانية او كيميائية او زراعية، وقد تدخل في صناعة الأغذية أو تستخدم كمبيدات حشرية (**20**)، وما يزال إستعمال الأعشاب الطبية الدعامة الاساس تقريباً من **75– 80%** من سكان العالم في مجال الإهتمام بالصحة، بسبب قلة آثارها الجانبية فضلاً عن الاتجاهات الحديثة بالعودة الى المصادر الطبيعية (**19**).يُعدُّ نبات الاشواجندا(**ashwayandha**) ***Withania somnifera*** من النباتات الطبية المهمة التي استخدمت في الطب الهندي القديم من قبل السكان الأصليين لأكثر من **3000** سنة، وللنبات تسميات عديدة منها كرز الشتاء **Winter cherry** والجينسنغ الهندي (**10،3**)،ينتمي النبات الى العائلة الباذنجانية **Solanoaceae**. يستعمل مهدئاً للأعصاب ومنوماً ومنشطاً وفي علاج السل والروماتيزم وحالات الالتهاب وأمراض القلب ومضاد للورم ومضاد للإجهاد ومسكناً للألم وكوسيلة لمنع الحمل ومزيل للتشنج (**7**). وعلى الرغم من إن نبات الأشواجندا من النباتات التي تنمو بشكل طبيعي في بيئتها إلاَّ إنَّ إنتاجها والحصول على المركبات الفعالة منها يكون محدوداً نتيجة تأثير عوامل منها طول المدة ما بين الزراعة والحصاد، كذلك إستنفاد النبات من بيئته الطبيعية نتيجة الاستعمال الجائر مما أدى بالإتحاد الدولي للحفاظ على البيئة الى إدراج النبات ضمن القائمة الحمراء للأنواع المهددة بالانقراض (**18،17،9**). ومن أهم المركبات الثانوية الفعالة التي يحتويها هذا النبات ما تعرف بالاكتونات الستيرويدية المعروفة باسم **Withanolides**،

جزء من رسالة ماجستير للباحث الثاني.

كلية التربية للعلوم الصرفة، جامعة ديالى، ديالى، العراق.

كُما عزل من النبات العديد من مركبات **Sitoindosides** التي هي عبارة عن **Withanolide** يحتوي جزيئة كلوكوز، وقد حظيت هذا المركب بالكثير من الاهتمام نتيجة لخصائصه العلاجية والطبية، ونظراً لانخفاض مستوى هذا المركب وتفادياً لهذه المشاكل في الإنتاج، لذا كان التوجه نحو إيجاد وسائل بديلة منها استخدام تقنية الزراعة النسيجية كوسيلة إنموذجية لإنتاج المركبات الثانوية ذات الأهمية الطبية والصيدلانية وذلك لإمكان عزلها بكميات كبيرة بسرعة وبصورة مستمرة وفي ظروف مسيطر عليها بعيداً عن قيود الظروف البيئية، وعدم تداخلها مع مركبات أخرى، كما يحصل في حال استخلاصها من النبات الكامل فضلا عن تقليل المساحة اللازمة للزراعة (**8،6**). ومن مسارات زراعة الأنسجة المستخدمة لإنتاج مركبات الايض الثانوي بشكل كبير تقنية استحثاث الكالس وانشاء الخلايا المعلقة (**15**).تمثل المعلقات الخلوية نظاماً للمزارع الخلوية التي توجد في حالة عشوائية تماماً عند زراعتها في الوسط الغذائي السائل المتحرك، تتكون من مجموعة خلايا تشتق من الكالس الهش، وتمتلك هذه الخلايا القدرة على الإنقسام والقيام بالفعاليات الأيضية المختلفة، ويفضل الكالس الهش غير المتماسك والسريع النمو في إنشاء مزارع المعلقات الخلوية لانَّ خلاياه يسهل تفككها إلى خلايا أُحادية بواسطة التحريك في الوسط الغذائي السائل (**1**)، ويعتمد نجاح هذه التقانة على كثافة الخلايا المزروعة ونوع الوسط الزراعي (**2**). وقد بذلت جهود عديدة لكشف وإنتاج المركب من خلال إستثمار مسارات هذه التقنية كاستحثاث الكالس وانشاء الخلايا المعلقة (**15**) وبالرغم من ان الدراسات المبكرة أشارت الى عدم أمكان مزارع الكالس ومزارع الخلايا المعلقة لنبات ***Withania somnifera*** من إنتاج مركب **Withanolide** (**21**) وأشار **Roja** وجماعته (**14**) إلى أنَّ هناك اثارا لمركب **Withanolide D** في مزارع الأفرع لنبات **Withania somnifera**. وفي دراسة قام بها **sharada** وجماعته (**16**) على نبات ***Withania somnifera*** بينت أمكانية أنتاج وعزل مركبات **Withanolides** (لاكتونات ستيرويدية) التي تضمنت خمسة أنواع **Withanone**و**Withaferin A** و**Withanolide A** و**Withanolide B** و **Withanolide E** والتشخيص بتقنية **HPLC**،إذ عزلت من الكالس والخلايا المعلقة المشتقة من الكالس المستحث من الأجزاء النباتية للقمة النامية للبادرات والاورق والسيقان تحت الفلقية والجذور والمرستيم القمي على وسط **MS** و**B5** المدعم بمنظمات النمو المختلفة **BA, Kin, 2,4-D, NAA, IAA** .تهدف الدراسة الحالية الى إنشاء مزارع معلقات خلوية وتقدير مركبات الوذونولايد **Withanolides** في مزارع الكالس والوسط الغذائي السائل للمعلقات الخلوية لنبات ***Withania somnifera*** للتعرف على قابلية الخلايا على ترشيح هذه المركبات الى الوسط.

المواد وطرق البحث

أجريت هذه الدراسة في مختبر زراعة الخلايا والأنسجة النباتية التابع لقسم علوم الحياة في كلية التربية للعلوم الصرفة، بجامعة ديالى للمدة من **2015/9/1** لغاية **2016/6/5**.

المادة النباتية

نقعت البذور لمدة **24** ساعة في محلول حامض الجبرلين **GA3** بتركيز **500** ملغم.لتر$^{-1}$ لزيادة نسبة إنباتها (**12**). وعقمت سطحياً بغمر البذور في محلول هايبوكلورايت الصوديوم **NaOCl** (القاصر التجاري) بتركيز **6 %** وبنسبة **1** حجم مادة معقمة : **1** حجم ماء معقم لمدة **15** دقيقة مع الرج، ثم غسلت البذور بالماء المعقم ثلاث مرات بمعدل **5** دقائق لكل مرة لإزالة آثار المادة المعقمة (**19**) ثم جففت البذور المعقمة من الماء العالق بها بوضعها على ورق ترشيح معقم، وزرعت البذور المعقمة بوضعها في قناني زجاجية حجم **250** مل تحتوي على **20** مل من وسط(**11**). **MS** الصلب الخالي من منظمات النمو وبمعدل خمس بذور.قنينة$^{-1}$.حفظت العينات في الظلام لمدة **4** أيام وعند بدء الإنبات نقلت الى نظام الضوء والظلام المتعاقب **16** ساعة ضوء الى **8** ساعات ظلام وشدة إضاءة

2000 لوكس لحين بلوغها 3 أسابيع. فصلت بعدها السيقان تحت الفلقية Hypocotyls بطول 1.0 سم.قطعة$^{-1}$، ثم نقلت الى قنان زجاجية حجم 100 مل تحتوي على 20 مل من وسط MS المدعم بتركيز 3.0 ملغم.لتر$^{-1}$ 2,4-D + 0.5 ملغم.لتر$^{-1}$ Kin لغرض استحثاث الكالس .

إنشاء مزارع المعلقات الخلوية وتقدير كثافة الخلايا

أستخدم الكالس الهش المشتق من السيقان تحت الفلقية لأنشاء المعلقات الخلوية بنقل قطع الكالس بوزن 1 غم تقريباً إلى دوارق زجاجية سعة 250 مل تحتوي 50 مل من الوسط السائل MS المدعم بتركيز 3.0 ملغم.لتر$^{-1}$ 2,4-D + 0.5 ملغم.لتر$^{-1}$ Kin، وحضنت العينات في الحاضنة الهزازة بسرعة 150 دورة.دقيقة$^{-1}$ وبدرجة حرارة 28 مْ في ظروف ظلام تام لمدة 24 ساعة، يعقبها إمرار المزرعة المتكونة من منخل دقيق معقم حجم فتحاته 46 مايكرومتراً (plan Genet . Manipulation on Lab. Nott .U.K) لعزل الخلايا المفردة والتخلص من الكتل الخلوية المتجمعة، وأُعيد تعليق هذه الخلايا في وسط غذائي جديد مدعم بتراكيز منظمات النمو السابقة نفسها بعد السماح بركود واستقرار خلايا المعلق الخلوي داخل كابينة الزرع لمدة ساعتين والتخلص من الوسط السائل بسكبه بعناية دون فقد للخلايا الراكدة (5) وأعيدت المزرعة الى الحاضنة لغرض نمو المزرعة بالظروف السابقة نفسها.سحبت عينة بحجم 1.0 مل من مزرعة المعلقات الخلوي لتحديد كثافة الإنشاء(المرحلة الصفرية) باستخدام شريحة الهيموسايتوميتر Lab. (W. Germany)، لحساب عدد الخلايا وتزايد أعدادها مع عمر المزرعة وصولاً الى مرحلة توقف الخلايا عن الإنقسام.

تقدير محتوى المركبات الستيرويدية في المزارع النسيجية

تحضير العينات

قُدرِّت مستويات الستيرويدات في مستخلص الأنسجة التالية

أ- الكالس المستحث من السويقة تحت الفلقية النامي على وسط 3.0 ملغم.لتر$^{-1}$ 2,4-D + 0.5 ملغم.لتر$^{-1}$ Kin بعمر 30 يوماً .

ب- الوسط الغذائي السائل النامية فيه مزارع المعلقات الخلوية المنشأة من كالس هش بعمر 30 يوماً وبكثافة إنشاء بلغت 9.13×10^4 ونمت المعلقات الخلوية لحين وصول المزارع في نموها إلى مرحلة التوقف عن الإنقسام بكثافة 10.06×10^4 ،إذ حصدت الخلايا بنبذها مركزيا عند سرعة 1000 دورة.دقيقة$^{-1}$ لمدة 5 دقائق لغرض ترسيبها وسحب الوسط الغذائي الخالي من الخلايا والشوائب بعد ترشيحه للتأكد من إفراز الخلايا للمركبات الستيرويدية الى الوسط وتقدير كميتها.

استخلاص وفصل الستيرويدات

أُجرَيت عملية الاستخلاص والتشخيص والتقدير حسب الطريقة الموصوفة من قبل Chauraiya وجماعته(4)بسحق 1 غم من النسيج الطري للكالس باستعمال النتروجين السائل واخذ المسحوق النهائي لعينة الكالس و10مل من عينة الوسط الغذائي السائل، واستخلصت كل عينة بالرج باستخدام صفيحة هزازة لمدة 24 ساعة وبدرجة حراة الغرفة في 20 مل من ميثانول مخفف بالماء المقطر بنسبة 25 : 75(حجم:حجم)، رشح المستخلص من خلال إمراره خلال طبقة من ورق الترشيح (Whatman No.1) لفصل المستخلص عن بقايا العينة، أُعيد استخلاص الراسب مرتين في 20 مل من الميثانول لكل مرة ولمدة 4 ساعات لكل مرة، ثم جمعت الرواشح مع بعضها ونقلت المستخلصات إلى قمع فصل حجم 250 مل وفصلت باستخدام 60 مل من الهكسان Hexane لمدة خمس دقائق،

أهمل الهكسان في حين تم تنقية المستخلص الميثانولي بإضافة 60 مل من الكلوروفورم، اخذ مستخلص الكلوروفورم وركز الى مسحوق جاف بتيار من النتروجين السائل. تم وزن 10 ملغم من المسحوق واذيب في1 مل من الميثانول، ثم رشح المستخلص بمرشحات حجم 25 مايكرومل قبل حقن العينات في وحدة الحقن لجهاز HPLC.

التشخيص والتقدير الكمي للستيرويدات بتقنية كروماتوكرافي السائل عالي الأداء HPLC

أُجريت عملية الفصل والتشخيص للمركبات الستيرويدية المستخلصة من العينات المنتخبة باستعمال جهاز كروماتوغرافيا السائل ذي الأداء العالي(HPLC) لما تتميز به هذه التقنية من كفاءة ودقة عاليتين في إجراء التقدير الكمي والنوعي للمركبات المراد تشخيصها من حساب مساحة المنحنيات وارتفاعها وتحديد تركيز هذه المركبات بعملية واحدة. قدرت تراكيز الستيرويدات كمياً بمقارنة مساحة المادة القياسية مع مساحة حزمة الأنموذج اعتمادا على القانون التالي :

$$\text{تركيز الإنموذج مايكروغرام.مل}^{-1} = \frac{\text{مساحة عينة المركب}}{\text{مساحة الإنموذج القياسي}} \times \text{تركيز الإنموذج القياسي} \times \text{عدد مرات التخفيف}$$

أجريت عملية التشخيص باستعمال جهازHPLC نوع (UFLC SHMADZU Japan) المزود بمضختين ترددية نوع (Shimadzu SPD-10 AVP) ومعالج البيانات نوع C-R6A بعمود فصل column معدني ذي المواصفات

- الطور الثابت..... (gravity column) نوع C-18
- بابعاد 1.D mm 4.6 × 100
- حجم الدقائق 3 مايكرومتر

وأجريت عملية التشخيص وفق الظروف المبينة في (جدول1)(4).

جدول1: ظروف تشخيص النماذج ا القياسية من الستيرويدات والمركبات المفصولة من العينات المنتخبة.

الظروف	
الطور المتحرك(v:v)	0.1% حامض الخليك في ماء مزال الايونات:ميثانول
سرعة جريان الطور المتحرك	1.4 مل/ دقيقة
حجم العينة المحقونة	20 مايكروليتر
درجة حرارة الفصل	35 مْ
نوع الكاشف	الأشعة فوق البنفسجية (UV)عند الطول ألموجي 277 نانوميتر

النتائج والمناقشة

التشخيص والتقدير الكمي لمركبات الوذانولايدات لنبات *W. somnifera* في الكالس المشتق من السيقان تحت الفلقية والوسط الغذائي لمزارع المعلق الخلوي.

أظهرت النتائج (جدول 2) احتواء كل من مزارع الكالس والوسط الغذائي لمزارع المعلقات الخلوية على مركب 1,27-hydroxywithanolides بدلالة زمن إحتباس المركب البالغ 1.34 دقيقة الذي يقترب من زمن إحتباس المركب في العينة القياسية البالغ 1.48دقيقة (شكل1:A)، وسجل المركب اعلى القيم لمحتواه في أنسجة الكالس (شكل1:B) والوسط الغذائي للمعلقات الخلوية (شكل1:C) فقد بلغت قيمه 58.06 و 17.62 مايكروغرام.مل$^{-1}$ على التوالي بالمقارنة مع مركبات الوذونولايد Withanolides الاخرى التي تم الكشف عنها. وشخص مركب

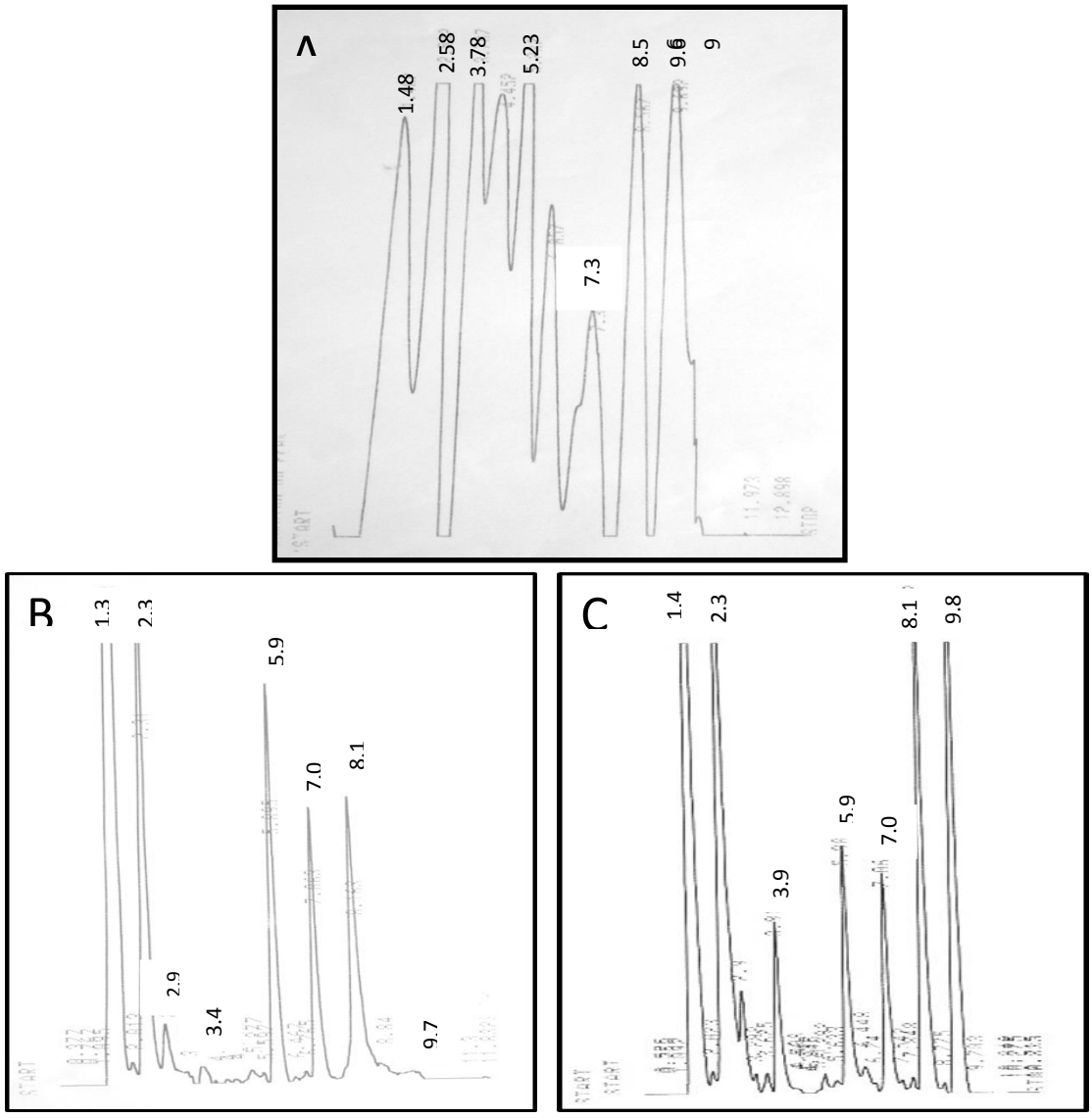
2,17-hydroxywithanolides A إعتماداً على زمن احتباسه المسجل البالغ **2.26** دقيقة بالمقارنة مع زمن إحتباس المركب في العينة القياسية البالغ **2.58** دقيقة، وبلغ محتواه في أنسجة الكالس والوسط الغذائي للمعلقات الخلوية **31.06** و **4.58** مايكروغرام.مل$^{-1}$ على التوالي. وشخص مركب**17-hydroxy 27 deoxy withaferin** في أنسجة الكالس فقط ولم يظهر له أي أثر في الوسط الغذائي للمعلقات الخلوية بدلالة زمن إحتباسه البالغ **3.85** دقيقة بالمقارنة مع زمن احتباسه في العينة القياسية البالغ **3.78** دقيقة، وبلغ محتواه في أنسجة الكالس **11.23** مايكروغرام.مل$^{-1}$. واشارت نتائج التشخيص وجود مركب **Withanolide D** بدلالة مقاربة زمن إحتباس المركب في العينات المقاسة مع العينة القياسية، وبلغ كميته في أنسجة الكالس والوسط الغذائي القيمتين **13.49** و**3.73** مايكروغرام.مل$^{-1}$ على التوالي.في حين بلغ محتوى انسجة الكالس والوسط الغذائي **14.057** و**3.29** مايكروغرام.مل$^{-1}$ على التوالي من مركب **27-hydroxy withanolide D**. واقترب زمن إحتباس مركب **Withanolide A** البالغ **8.10** دقيقة من زمن إحتباس المركب في العينة القياسية البالغ **8.56** دقيقة معلناً وجوده في أنسجة الكالس والوسط الغذائي وبلغت كميتيهما **30.84** و**4.82** مايكروغرام.مل$^{-1}$ على التوالي. وظهر وجود مركب **Withanone** في العينات المدروسة بدلالة زمن إحتباسه المسجل بالمقارنة بالعينة القياسية، وبلغ محتوى أنسجة الكالس والوسط الغذائي للمعلقات الخلوية منه **23.39** و**0.79** مايكروغرام.مل$^{-1}$ على التوالي.

جدول**2**: المحتوى الكمي لمركبات **Withanolides** في كالس السيقان تحت الفلقية والوسط الغذائي السائل لمزارع المعلقات الخلوية لنبات ***W. Somnifera***.

نوع المركب	زمن احتباس المركب في العينة القياسية (دقيقة)	زمن احتباس المركب في المزارع النسيجية (دقيقة)		المحتوى الكمي للمركب في المزارع النسيجية (مايكروغرام.مل$^{-1}$)	
		مزارع الكالس	الوسط الغذائي للمعلق الخلوي	مزارع الكالس	الوسط الغذائي للمعلق الخلوي
1,27-hydroxywithanolides	**1.48**	**1.34**	**1.34**	**58.06**	**17.62**
2,17-hydroxywithanolides A	**2.58**	**2.26**	**2.26**	**31.06**	**4.58**
17-hydroxy 27deoxy withaferin	**3.78**	**3.85**	**–**	**11.23**	**–**
Withanolide D	**5.23**	**5.85**	**5.85**	**13.49**	**3.73**
27-hydroxy withanolide D	**7.36**	**7.01**	**7.01**	**14.057**	**3.29**
Withanolide A	**8.56**	**8.10**	**8.10**	**30.84**	**4.82**
Withanone	**9.69**	**9.01**	**9.01**	**23.39**	**0.79**

ان وجود مركبات **Withanolides** في مزارع أنسجة الكالس والوسط الغذائي للمعلقات الخلوية يشير الى ان الخلايا يمكنها ان ترشح مركبات **Withanolides** الى الوسط السائل لمزارع المعلقات الخلوية لنبات ***Withania somnifera*** (**15**).وتتفق هذه النتيجة مع ما أشار إليه **Sharda** وجماعته (**16**) الذين تمكنوا من عزل مركبات **Withanolides** من مزارع الكالس والخلايا المعلقة المشتقة من الكالس المستحث من الأجزاء النباتية للقمة النامية للبادرات والاورق والسيقان تحت الفلقية والجذور والمرستيم القمي لنبات ***Withania somnifera***، وذكر **Sabir** وجماعته (**15**).من امكان إستثمار مسارات تقنية الزراعة النسيجية كاستحثاث الكالس وإنشاء الخلايا المعلقة في إنتاج مركبات **Withanolides** بالرغم من ان الدراسات المبكرة (**21**). أشارت الى عدم أمكان مزارع الكالس ومزارع الخلايا المعلقة لنبات ***Withania somnifera***من إنتاج مركب **Withanolide**. ان تراكم مركبات الأيض الثانوي كان اعلى في الكالس مقارنة بمحتوى الوسط النامية فيه المعلقات الخلوية، وإنَّ هذا التباين في محتوى أنسجة الكالس

والمعلق الخلوي من مركبات **Withanolides** قد يعزى الى تأثير منظمات النمو في نمو ونمط تمييز خلايا المزرعة من جانب وإلى تأثيرها في مستوى النواتج الأيضية الثانوية فيها من جانب اخر، إذ لا تتفاعل منظمات النمو مع المركبات الوسطية لتفاعلات مسار البناء الحيوي وانما تحدث تغييراً في المحتويات السايتوبلازمية برفع أو خفض مستويات النواتج المتكونة (**13**). أو إلى قلة ترشيح الخلايا لهذه المركبات الى الوسط، ولكن بالمقابل وعلى مستوى الإنتاج التجاري لا يمكن للكالس أنْ ينتج على نطاق واسع بينما يمكن تنمية معلقات الخلايا بشكل دائم في المفاعل الحيوي.



شكل1: منحنيات مركبات **Withanolides** (**A**) للعينة القياسية (**B**) لمزارع الكالس (**C**) الوسط الغذائي السائل لمزارع المعلقات الخلوية بواسطة تقنية **HPLC** .

أظهرت النتائج امكان انتاج مركبات **Withanolides** في مزارع الأنسجة في الدراسة الحالية (أنسجة الكالس والوسط الغذائي السائل للمعلقات الخلوية)، وهذا يفتح الباب إلى امكان إعتماد مزارع الانسجة مصدراً دائماً للحصول على هذه المركبات المهمة،كما أشارت نتائج التشخيص الى تفوق مزارع الكالس في محتواها من مركبات **Withanolides** على الوسط الغذائي للمعلقات الخلوية، ومن النتائج المهمة التي تم التوصل إليها في هذه الدراسة

هي قابلية الخلايا على ترشيح هذه المركبات الى الوسط الغذائي، التي يمكن ان تعتمد كأساس لإنتاج هذه المركبات في المفاعلات الحيوية.

المصادر

1- الجواري، سهلة محمد زيدان شعيب (2004). الزراعة المرافقة للمعلقات الخلوية المشتقة من كالس السيقان مع بلازميدات Ri في الحصول على نباتات الباقلاء *Vicia faba* L. المحولة وراثيا .اطروحة دكتوراه ، كلية التربية ، جامعة الموصل .

2- رشيد، جميلة هزاع وجدان سالم قاسم (2006). دور المعاملة الحرارية في تحضير الانقسام الخلوي وتكوين الكالس من زراعة المعلقات الخلوية لنباتات زهرة الشمس *Helianthus annuus* في قطرات الاكار المتعددة. مجلة زراعة الرافدين، 24(2).

3- **Adhikari, S.R. and B. Pant (2013). Induction and proliferation of *in vitro* mass of callus of *Withania somnifera* (L.) Dunal. Research in Plant Sciences, 1(3): 58-61.**

5- **Dixon, R.A. (1985). Plant Cell Cultures. A Practical Approach. IRL Press, Oxford,UK.**

6- **Georgiev, M. I.; J. Weber and A. Maciuk (2009). Bioprocessing of plant cell culture for mass production of targeted compounds. Appl. Microbiol. Biotechnol., 83(5):809-823.**

7- **Kannan ,T.; M. S. Sownthariya and S. Anbazhakan (2014). *In vitro* mass propagation of *Withania somnifera* Dunal using seaweed extract International Letters of Natural Sciences,19: 8-14.**

8- **Karuppusamy, S.(2009). A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. Journal of Medicinal plants Research, 3: 1222-1239.**

9- **Kavidra, N. T.; C. S. Neelesh; T. Vaibhav and D. Brahma (2000). Micropropagation of *Centella asiatica* (L.) a valuable medicinal herb. Plant Cell Tissue Org. Cult., 62:175-179.**

10- **Mirjalili, M. H. ; E. Moyano ; M. Bonfill ; R. M. C. Cusido and J. Palazon (2009). Steroidal lactones from *Withania somnifera* , an ancient plant for novel medicine. Molecules,14: 2373-2393.**

11- **Murashige, T. and F. Skoog (1962).A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol., 15: 473-497.**

12- **Niyaz, A. and E. N. Siddiqui (2014).Seed germination of *Withania somnifera* (L.) Dunal. European. J. of Medicinal Plants, 4(8): 920-926.**

13- **Ramawat, K.G. (2008).Plant Biotechnology. Printed in india.PP: 1-265.**

14- **Roja, G.; M. R. Heble and A. T. Sipahimalani (1991). Tissue cultures of Withania somnifera: morphogenesis and Withanolide synthesis. Phtotherapy Research, 5:185-7.**

15- **Sabir, F.; N. S. Sangwan; N. D. Chaurasiya; L. N. Misra and R. S. Sangwan (2008). *In vito* Withanolide production by *Withania somnifera* L. cultures. Z. Naturforsch, 63:409-412.**

16- **Sharada, M.; A. Ahuja; K. A. Suri ; S. P. Vij; R. K. Khajuria; V. Verma and A. Kumar (2007).Withanolide production by in vitro cultures of Withania somnifera and its association with differentiation. Biologia Plantarum., 51:161-164.**

17- Siddique, N. A.; M. A. Bari; M. M. Pervin; N. Nahar and L. A. Banu (2005).Screening of Endangered medicinal plants species by questionnaire survey in barind Tract in Bangladesh. Pakistan Jornual Biological Sciences, 8(12):1783-1793.

18- Supe, U.; F. Dhote and M. G. Roymon (2006). *In vitro* plant regeneration of *Withania somnifera*. Plant Tiss. Cult. Biotech., 16:111-115.

19- Udayakumar, R.; C.W. Choi; K.T. Kim; S. Kasthurirengan; T.S. Mariashibu; J. J. S. Rayan and A. Ganapathi (2013). *In vitro* plant regeneration from epicotyl explant of *Withania somnifera* L. . Journal of Medicinal Plants Research, 7(1): 43-52.

20- Vanisree , M.; C. Lee; S. Lo; S. M. Nalawade; C.Y. Lin and H. S. Tsay (2004). Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. Bot. Bull. Acad . Sinc .,45: 1-22.

21- Yu, P. L. C.; M. M. El-Olemy and S. J. Stohs (1974). A phytochemical investigation of Withania somnifera tissue cultues. Lloydia, 37(4): 593-597.

ESTIMATE STERIODS WITHANOLIDE COMPOUNDS IN CALLUS CULTURES AND CELL SUSPENSION OF *Withania somnifera* L. PLANT.

M. M. I. Al-Mahdawe **B. M. Alwan**

ABSTRACT

Steroids compound were estimated in callus derived from hypocotyle of *withania somnifera* L. and in the nutritional medium for cell suspension formed from the friable callus derived from the hypocotyl explants in the liquid MS medium supplemented with growth regulators used for the callus induction which is composed from 3.0 mg.L^{-1} 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) + 0.5 mg.L^{-1} Kinetin (Kin). Detection data of the levels of Withanolides showed their presence in these cultures in terms of readings using High performance Liquid chromatography compared with standard samples. The concentrations of Withanolides in callus cultures and in culture media of cellular suspension were 11.23 – 58.06 and 0.79-17.62 µg/ml^{-1} respectively. In general the results showed that the possibility of production Withanolides compounds in tissue cultures and thus the possibility of adoption tissue cultures as a constant lasting and pure source of these important compounds. One of the important result that has been achieved in this study was the ability of cells to secrete these compounds to the culture media, which can adopt as abases for the production of these compounds in the bioreactors.

Part of M.Sc. Thesis the second author
College of Education pure sciences, Diyala Univ., Diyala. Iraq.