تأثير الأندول أسيتك أسد و التربتوفان في أنتاج مركبي الفانكرستين والفانبلاستين من خلايا كالس نبات عين البزون Catharanthus roseous 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 roseous 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 أنتاج مركبي الفانكرستين والفانبلاستين .
تم أستخلاص مركبات القلويدات 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 الزرعي (MS 40 غم /لتر سكروز ,2ملغم /لتر نفثا لين أسيتك أسد NAA .

الكلمات المفتاحيه : نبات عين البز ون , القلويدات الآندولية , 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 اكثر النباتات الطبية اهمية في العالم ,وهو احد نباتات العائلة الدفلية Apocynacea وينتج اكثر من 200 نوع من القلويدات الاندولية , تستخدم بعضها لاغراض علاجية مثل مركبي الاجمالسين Ajmalicineوالسربنتين 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 TIAs Terpenoid indole (Alkaloids)في مختلف أجزاء النبات ومنها الأوراق والسيقان التي تعد مصدرا للقلويدات المزدوجة الصيغة الجزيئية (الفانبلاستين و الفانكرستين) وهي ذات فعالية علاجية في علاج الأمراض السرطانية [2] .
ان أستخدام مركبات الأيض الثانوي باستخدام تقنية زراعة الانسجة خارج الجسم الحي In Vitro تعتمد على نوعية الاوساط الزرعية المستخدمة, ان حث خلايا الكالس على انتاج هذه المركبات يتم باستخدام الوسط الزرعي الانتاجي او التراكمي Production media [3] .
اذ يتم نقل خلايا الكالس الى الوسط الزرعي 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) والتربتوفان (0.5 ملغم/لتر) في الوسط الزرعي التراكمي MS 40 غم /لتر سكروز لمعرفة تاثير هذا الوسط في انتاج مركبات القلويدات الاندولية الفانبلاستين والفانكرستين من خلايا الكالس لنبات عين البزون المنقول اليه من الاوساط الزرعية MS 40 غم/لتر سكروز(والحاوية على منظمات النمو , IAA, NAA 2,4-D (2ملغم/لتر) على التوالي .اجريت عملية الاستخلاص للقلويدات 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 الزرعي المخصص للنمو Growth media تحت الظروف نفسها التي ذكرها [5] , استخدم الوسط الزرعي MS 40 غم /لتر سكروز والحاوي على 2 ملغرام /لتر (2.4-D, IAA , NAA) على التوالي .

نقلت خلايا الكالس بعد 4-3 أسابيع من الوسط الزرعي المخصص للنمو الى الوسط الزرعي التراكمي Accumulation media والمستخدم لزيادة انتاج مركبات القلويدات الأندولية الفانبلاستين والفانكرستين والمكون من الوسط الزرعي MS 40 غم/ لتر سكروز والحاوي على 2 ملغم /لتر اندول اسيتك اسد و0.5 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 الزرعي التراكمي بعد ثلاثة اسابيع من نقلها الى الوسط واستخلصت بطريقة استخلاص القلويدات الاندولية وكما ذكرها [7] .

اجريت عملية التنقية الجزئية لمركبي الفانبلاستين والفانكرستين باستخدام تقنية كروماتوغرافيا العمود باستخدام عمود السليكاجيل (1x30) سم ومزيج مذيبات الميثانول وخلات الاثيل وحامض 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 الفانبلاستين والفانكرستين القياسية في الجهاز للتعرف على مساحة وارتفاع الأنموذج القياسي وزمن الاحتجاز وارتفاع الحزم وباستخدام عمود السليكاجيل نوع ODS بأبعاد (250x4.6) مل والطور المتحرك المكون من الميثانول وبفر الامونيوم فوسفيت بنسبة (60:40) قدرت العينات على طول موجي 254 نانوميتر ثم تم حقن النموذج للمستخلص الناتج من التنقية بكروماتوغرافيا العمود في جهاز HPLC ومقارنة الحزم الناتجة بحزم المحلول القياسي لمركبي الفانبلاستين و الفانكرستين الناتجة تحت الظروف نفسها , و حسب تركيز المركبين في الأنموذج من المعادلة الأتية :

التركيز ppm = (مساحة العينة / مساحة الأنموذج القياسي) x تركيز الأنموذج القياسي

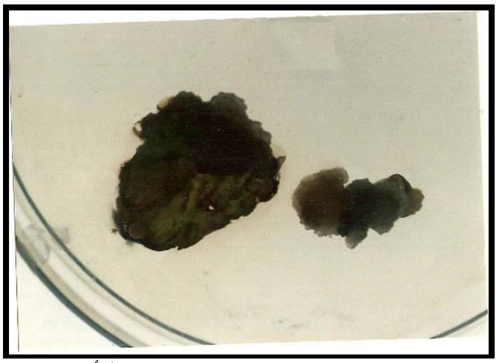
النتائج والمناقشة:

استخدم الاندول اسيتك اسد 2 ملغم / لتر والتربتوفان 0.5 ملغم / لتر في الوسط الزرعي MS 40 غم / لتر سكروز لمعرفة تاثيرهما في نمو وتطور الكالس المنقول الى هذا الوسط من الاوساط الزرعية المخصصة للنمو والحاوية على (2,4-D, IAA , NAA) على التوالي ومن ثم تاثيرهذا الوسط التراكمي على انتاج مركبي الفانبلاستين والفانكرستين وتراكمهما داخل خلايا الكالس ,أن أوزان الكالس الكلي على الأوساط الزرعية المخصصة للنمو والحاوية على (2,4-D,IAA,NAA)كانت(48,37.96,25.2) غم على التوالي بعد مرور3-2 أسابيع من الزراعة وكما مبين في الجدول رقم (1) نلاحظ الزيادة الملحوظة في نمو وتكون الكالس في الوسط ألزرعي الحاوي على 2,4-D التي كانت أعلى بكثير من الوسطين الثاني والثالث ويشير الشكل (1) إلى الكالس المنقول من الوسط الزرعي 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 الزرعيين MS والحاوية على (IAA, NAA)بتركيز 2 ملغم / لتر على التوالي فنلاحظ تطور جزء من الكالس الى نموات خضرية يصل طولها الى نحو7-5 سم وكما مبين في الشكل (2 ,3) ,

جدول (1) أوزان الكالس في الأوساط الزرعية المخصصة للنمووالاوساط التراكمية

وسط MS مخصص للنمو حاوي على 40 ملغم/لترسكروز نوع منظم النمو تركيز2 ملغم/لتر	عدد الأجزاء النباتية المزروعة من الأوراق explants	معدل وزن قطعة الكالس الواحدة / غرام	معدل وزن الكالس الكلي غرام	عدد قطع الكالس المنقولة إلى الوسط التراكمي MS 40 غم / لترسكروز و2 ملغم /لتر أندول اسيتك أسد و0.5 ملغم / لتر تربتوفان	معدل وزن قطعة الكالس الواحدة / غرام	معدل وزن الكالس الكلي غرام
سيطرة	24	0.6-0.5	12	20	0.4-0.3	8
2,4-D	32	2-1.5	48	30	1-0.8	27
IAA	52	0.8-0.6	37.96	24	0.5-0.4	12
NAA	36	0.7-0.5	25.2	32	0.5-0.4	16



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

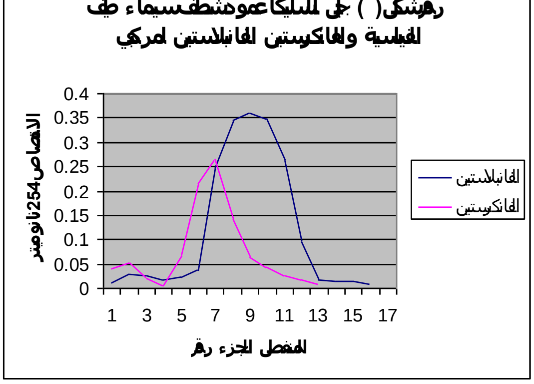
شكل (2)الكالس المنقول إلى الوسط ألزرعي التراكمي من الوسط ألزرعي MS والحاوي على IAA .

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

نتائج تجارب الاستخلاص والتنقية الجزئية لمركبي الفانبلاستين والفانكرستين من مستخلصات الكالس باستخدام تقنية كروماتوغرافيا العمود:

استخلص الكالس لكل تجربة من تجارب الطور التراكمي وحفظ المستخلص النهائي لكل تجربة في 5 مليليتر من مذيب خلات الاثيل .

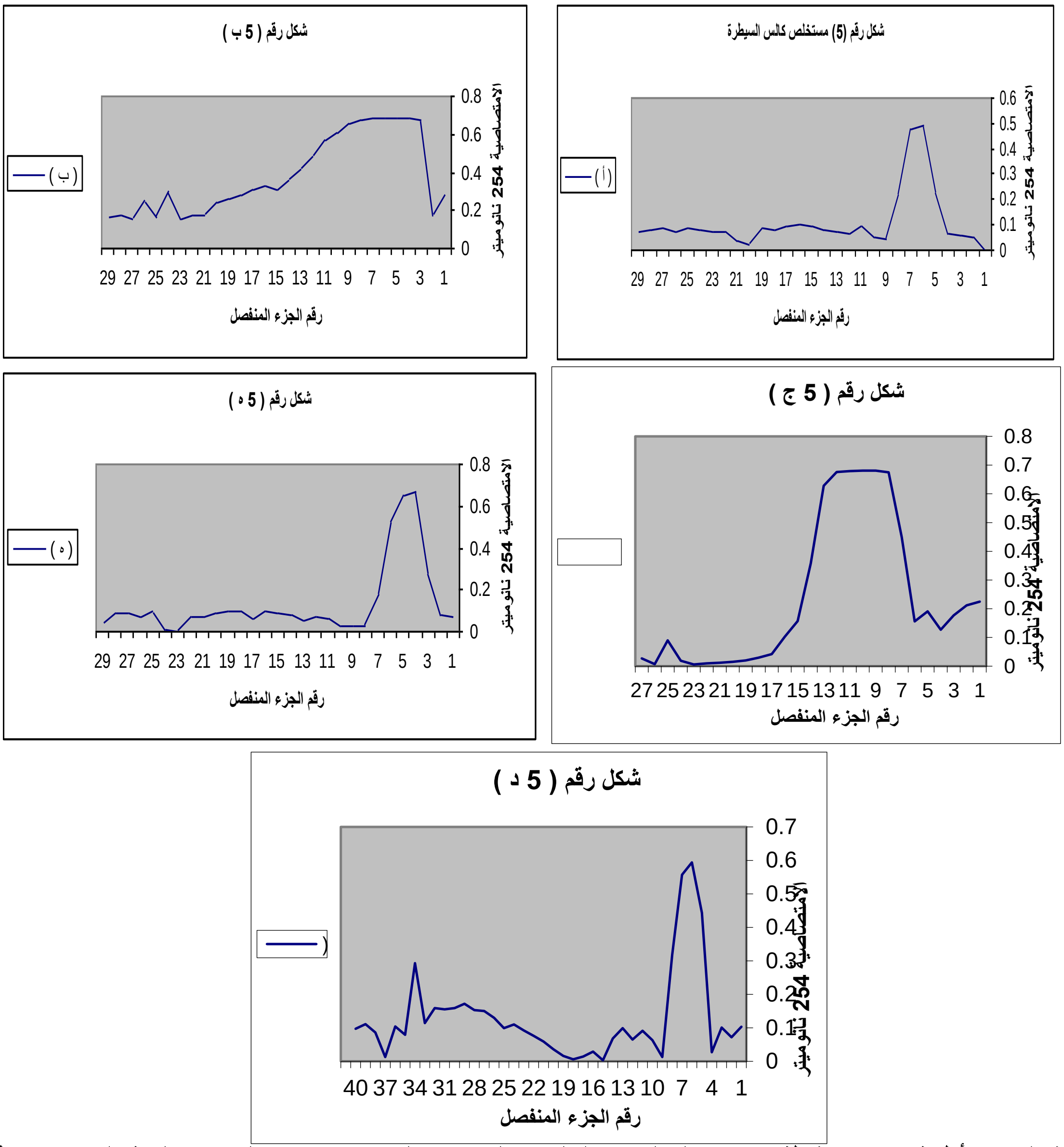
استخدم مركبي الفانبلاستين والفانكرستين القياسية في تجارب التنقية وكما ذكرها [5,7] . وكما مبين في الشكل رقم (4) .



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

بينت نتائج التنقية الجزئية للمستخلصات باستخدام عمود السليكاجيل ظهور قمم امتصاص واضحة للمستخلصات الخمسة في الاجزاء (5-8 , 3-10 , 8-13 , 3-6 , 5-8)إذ وصلت أعلى قيم طيف امتصاص لها الى (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 الفانبلاستين 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 الفانبلاستين و الفانكرستين نستدل على وجودهما في المستخلص .



شكل (5)أطياف سيماء شطف عمود السليكا جيل لمستخلصات كالس نبات عين البزون 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 ألزرعي MS 40 غم/ لتر سكروز 2, ملغم /لترIAA , 0.5 ملغم / لتر تربتوفان.

نتائج التقدير الكمي لمركبي الفانبلاستين والفانكرستين للطور التراكمي باستخدام تقنية HPLC

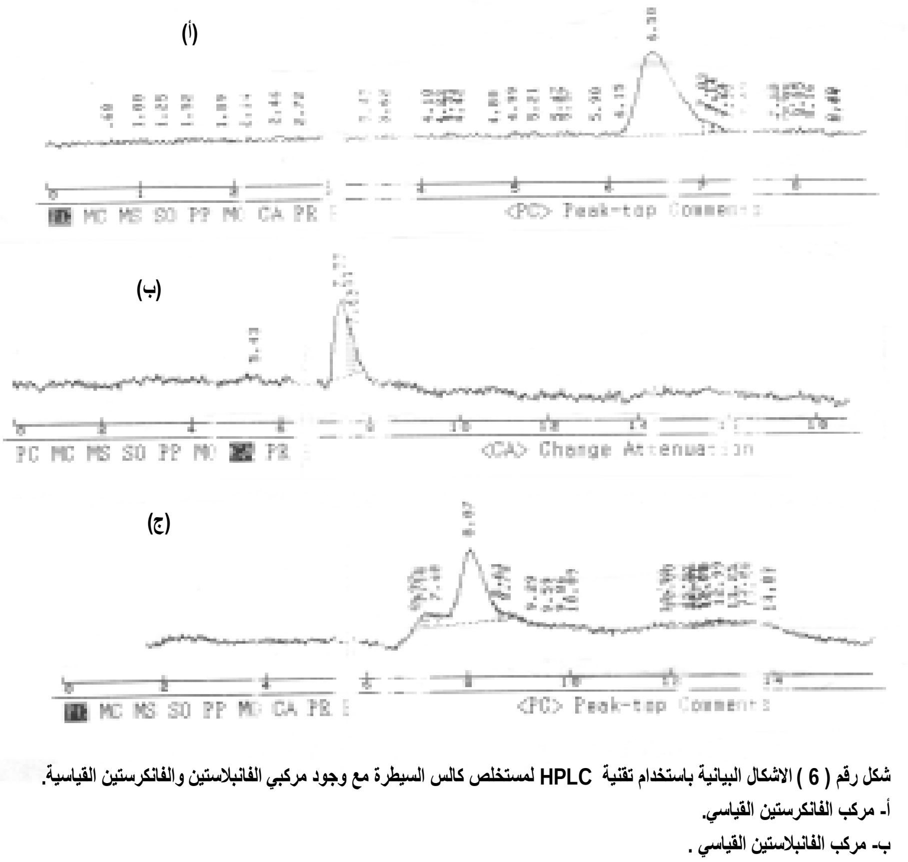
تبين النتائج ان استخدام الاندول اسيتك اسد 2 ملغم / لتر والتربتوفان 0.5 ملغم / لتر في الوسط الزرعي التراكمي ادى الى انتاج وتراكم مركبي الفانبلاستين والفانكرستين في خلايا الكالس المنقولة من الاوساط الزرعية المخصصة للنمو وكما مبين في الجدول رقم (2) .

جدول (2)تركيز مركبي الفانبلاستين 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/لترتربتوفان باستخدام تقنية HPLC .

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

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 الزرعي المخصص للنمو MS و الحاوي على NAA 2ملغم/لتر وهي (12.5،4.643) جزء بالمليون/0.5 وزن جاف وكما مبين في الشكل رقم (7 د).

وهذا يتطابق مع ما توصل إليه[8] الذي ذكر أن النموات المتفرعة من كالس نبات عين البزون لها القابلية على أنتاج مركبات القلويدات الأندولية ،وذكر[9] أن النموات المتكونة من كالس نبات عين البزون لها القدرة على أنتاج 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 الزرعي MS والحاوي على NAA كما مبين في الشكل (7 ج) كما لم يتم الحصول على 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 بأنتاج 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 الزرعي فقد ذكر[11] أن أضافة التربتوفان الى الوسط الزرعي يقلل من حث خلايا الكالس على أنتاج مركبات TIAs.أما [3] فقد توصل الى أن أضافة مركب التربتوفان في الوسط الزرعي يكون غير فعال في أنتاج أو زيادة المحتوى القلويدي في خلايا الكالس.

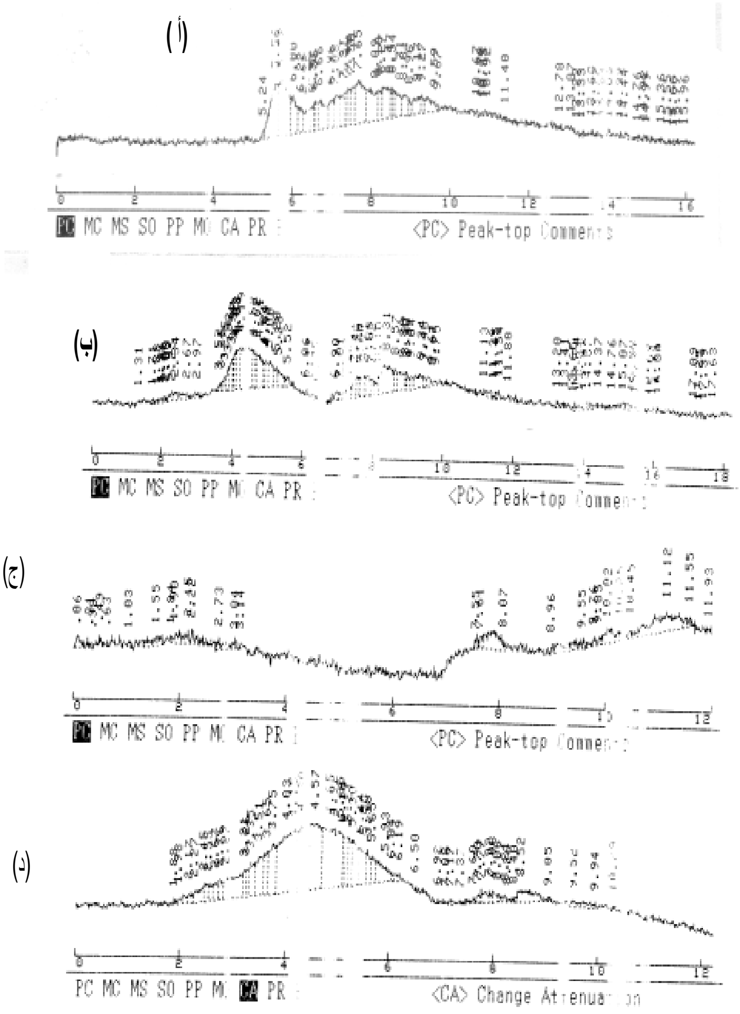


شكل رقم (6) الاشكال البيانية باستخدام تقنية HPLC لمستخلص كالس السيطرة مع وجود مركبي الفانبلاستين والفانكرستين القياسية.

أ- مركب الفانكرستين القياسي.

ب- مركب الفانبلاستين القياسي .

ج- مستخلص كالس السيطرة .



شكل رقم (7) الاشكال البيانية باستخدام تقنية HPLC لمستخلصات الكالس في طور التراكم في الوسط الزرعي MS 40غم /لتر سكروز, 2ملغم /لتر IAA, 0.5 ملغم/لتر تربتوفان.

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:

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 Gene, Applied Biochemistry and Biotechnology .97,135-145.
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 roseous, 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 Vinblastine in multiplr shoot culture of Catharanthus roseous 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 accumnlation and tryptophan decarboxylase activity in Catharanthus roseous cells cultured in three different media, Plant Cell Reports 5;23-26.
4. Kurz,W.G.W., Aerman and Constabel F. 1997.Biotechnology in Agraculture Marcel Dekker Pube.,N.Y.,A.Aerman,ed.pp 1-42.
5. Mohammed, A.S., Hadi S.M., Saour K.Y., 2000.Ppoduction of vinblastine compound from callus cells of Catharanthus roseous, Iraqi Journal of Yeterinary Sciences, 13.(2), 79-109.
6. Constabel, F.and Tyler R.T. 1994.Plant Cell and TissueCulture, Indra K.Vasil and Trevor A. Thorpe, pp271-289 .
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 Vinblastine and Vincristine of Catharanthus roseous 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 roseous 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 Vinblastine and Vincristine compounds.

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

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