2- تأثير L-Tryptophan و salicylic acid في انتاج المركبات الثانوية من الكالس المستحث من اوراق نبات عين البزون *Catharanthus roseus* L.G.Don خارج الجسم الحي

Influence of L-Tryptophan and salicylic acid on secondary metabolites production from leaves induced callus of *Catharanthus roseus* L.G.Don *in vitro*

عماد حمدي جاسم سامي كريم محمد امين
مركز بحوث السوق وحماية المستهلك/ جامعة بغداد
كلية الزراعة/ جامعة بغداد
Emad H. Jassim Sami K. M. Ameen
Center for Market Research and Consumer Protection/ University of Baghdad
College of Agriculture/ University of Baghdad

المستخلص

اجريت دراسة تأثير كل من L-Tryptophan وsalicylic acid في تحفيز الكالس المستحث من اوراق نبات عين البزون في انتاج المركبات الثانوية من الكالس . استحث الكالس بعد زراعة الاوراق الحقيقية على الوسط الغذائي Murashige و (MS) Skoog والمجهز بالتركيز 0.5 ملغم/لتر 2,4-D و1 ملغم / لتر Kin وكان أفضل وسط غذائي لإدامة الكالس الوسط الغذائي MS المجهز بتركيز 0.5 ملغم / لتر من 2,4-D و1.5 ملغم / لترمن Kin. الذي اضيفت اليه مستويات مختلفة من L-Tryptophan بالتراكيز 0 , 200 , 300و 400 ملغم \ لتر و salicylic acid بالتراكيز 0.5,0, 1.0و 1.5 ملغم \ لتر وكانت كل على حده وكانت معاملة المقارنة هي إضافة 30 غم \ لتر من السكروز إلى الوسط الغذائي MS. أظهرت النتائج أن أعلى زيادة في كمية الـ Vincristine قد حصلت عند تضمين الوسط الغذائي 200 ملغم/لتر من البادئ L-Tryptophan إذ سجلت 48.66 مايكروغرام /100ملغم وزن طري من الكالس. وان اضافة 1 ملغم /لتر من salicylic acid كان الأعلى في إعطاء أعلى كمية لمركب الـ Vinblastine بلغ 50.98 مايكروغرام / 100ملغم وزن طري من الكالس. بينما كان التركيز 0.5 ملغم/لتر من salicylic acid أعطى أفضل النتائج في زيادة تركيز مركب الـ Serpentine بلغت 24.76 مايكروغرام / 100ملغم وزن طري من الكالس. وبينت النتائج إن تركيز المواد الفعالة المستخلصة من أوراق النباتات النامية بالاصص اقل بكثير من تلك التي قدرت بالكالس. فقد كان تركيز مركب Serpentine 0.059 مايكروغرام في حين بلغ 0.183 مايكروغرام من مركب Vinblastine. بينما كانت كمية مركب Vincristine 0.064 مايكروغرام.

الكلمات المفتاحية: نبات عين البزون، اندول الكلويد، L-Tryptophan، salicylic acid

Abstract

An experiment was conducted to steady the effect of L-Tryptophan and salicylic acid on callus induced on leaf explants of *Catharanthus roseus*. Callus induction was achieved by culturing true leaves of the plant on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 0.5 mg /L 2,4-D and 1mg / L Kin. The best medium to maintain callus was MS medium supplemented with 0.5 mg /L 2,4-D and 1.5 mg / L Kin. Different levels added to MS medium for each L-Tryptophan 0,200,300or400 mg /L and salicylic acid 0, 0.5,1or1.5mg /L. The medium supplemented with 30 g/ L sucrose was used as a control. Results showed the medium supplemented with 200 mg\L of L-Tryptophan gave the highest quantity of Vincristine reached 48.66 µg/100 fresh weight of callus. MS medium content at the concentration 1 mg \L of salicylic acid gave the highest level of Vinblastine recording 50.98 µg/100 fresh weight of callus. While MS medium supplemented with 0.5 mg /L of salicylic acid gave the highest level of Serpentine 24.76 µg/100 fresh weight of callus. The concentrations of active compound derived from plant leaves were much less than the concentrations produced by the callus grown *in vitro*. The concentration of Serpentine was 0.059 while Vinblastine was 0.183 and the concentration of Vincristine was 0.064.

Key Words: ***Catharanthus roseus*, Indole alkaloids, L-Tryptophan, salicylic acid**

المـقـدمة

يعد نبات عين البزون والذي يعود للعائلة الدفلية Apocynaceae من النباتات العشبية المعمرة. يتكاثر بالبذور والعقل,ألوان إزهاره تتدرج من الأبيض إلى الأحمر, يبلغ ارتفاعه 30–100 سم [1]. يحتوي على الكثير من المواد القلويدية واهمها مركبي Vinblastine, Vincristine اللذان تستخدمان في علاج مرض السرطان [2] فضلا عن مركب Serpentine الذي يستخدم لعلاج مرض ارتفاع ضغط الدم[3] ونواتج الأيض الثانوية تعد نواتج نهائية لعمليات الأيض الأولية التي تنتج من عملية التمثيل الضوئي كالكاربوهيدرات والليبيدات والبروتينات[4] . هذه المركبات لها دوراً مهماً بوصفها مواداً فعالة دوائياً وفسلجياً، و توفر الجانب الأمن من الاستخدام الطبي والعلاجي [5]. أشارت الدراسات إلى إمكانية تحفيزإنتاج المركبات الثانوية عند تعرضها للإجهاد الذي يتمثل بإضافة الحامض

* **البحث مستل من اطروحة دكتوراه للباحث الاول**

الاميني Tryptophan البادئ الرئيسي لبناء القلويدات لنبات عين البزون [6] إلى الوسط الغذائي وعند إضافة جزيئات البادئ إلى المزارع الخلوية، تتداخل معها باتجاه مسالك التصنيع الحيوي لمركبات الايض الثانوية [7]. فقد لاحظ [8] إلى إن إضافة tryptophan إلى الوسط الغذائي لنبات عين البزون أدى الى زيادة إنتاج القلويدات الاندولية. ووجدت [9] إن إضافة tryptamine أو tryptophan لخطوط الخلايا المتحولة S1 لنفس النبات تسبب أيضا في زيادة تراكم القلويدات . و أكد[10] إن إضافة الأحماض الامينية L-arginin أو L-tryptophane أو L-glutamine أو L-cystine أو L-asparagine وبتركيز 0 ,500, 300,100 ملغم / لتر لكل منها إلى أوساط زراعة الخلايا لنبات عين البزون أدى إلى زيادة في أنتاج vinblastine و vincristine مقارنة بالأوساط غير المعاملة وكان التركيز 300 ملغم / لتر للحامض الاميني L-tryptophan الأفضل مقارنة ببقية التراكيز والأحماض الأمينية الأخرى, إذ بلغت كمية vincristine ، vinblastine (1.19 , 1.25) مرة على التوالي مقارنة بالنبات الطبيعي.

ويعتبر salicylic acid المفتاح للإشارة لظهور المركبات في المسار الحيوي كميكانيكية للنبات في الدفاع عن نفسه [11]. أوضح [12] إن معاملة نبات عين البزون بالاثلين أو abscisic acid أو salicylic acid يدفع المسار الحيوي باتجاه انتاج ajmalicine, serpentine, tabersonine، vindoline. إما [13] فقد توصلوا في نتائجهم إلى إن المعاملة بالتركيز 0.1 مايكرومول من salicylic acid في الزراعة المعلقة لنبات *Dendrobium huoshanense* أدت إلى تراكم القلويدات وقد وصلت إلى 1.6مرة مقارنة مع المعاملة المحايدة.كما استطاع الباحثان [14] من زيادة إنتاج القلويدات لنبات *Stemona sp* باضافة salicylic acid بتركيز 100mMحيث شجعت هذه المعاملة في زيادة إنتاج قلويد stemofoline و 1′,2′-didehydrostemofoline بمقدار1.61مرة و1.69مرة على التوالي اعلى من المقارنة.

المواد وطرائق العمل

استعملت بذور نبات عين البزون الصنف الأحمر ReallyRed من شركة PanAmerican Seed. زرعت البذور في طبق فليني بعد ملئه بالبيتموس و عند الإنبات وظهور من 2 -3 أزواج من الأوراق الحقيقية نقلت الشتلات إلى سنادين قطرها 15 سم مملوءة بــ1 :1 بيتموس وزميج. وتركت النباتات لتنمو بشكل طبيعي لحين أخذ عينات الأوراق النباتية الكافية لإجراء عملية التحليل.

التعقيم السطحي للبذور و زراعتها

عقمت بذور عين البزون سطحيا بالكحول الأثيلي (Ethanol) بتركيز 70% ولمدة 30 ثانية ثم نقلت إلى محلول القاصر التجاري (فاس) والحاوي على نسبة 6%من هايبوكلورات الصوديوم NaOCl بتركيز 4.5 ولمدة (15) دقيقة غسلت البذور بعدها بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات ،لضمان إزالة بقايا المادة المعقمة من البذور . [15] زرعت البذور على وسط [16] الصلب والخالي من منظمات النمو وبقوة املاح كاملة. حضنت البذور في غرفة النمو على شدة اضاءة 1000 لوكس وفترة اضاءة 16 ساعة ضوء وعلى درجة حرارة25 ± 2 م. وبعد 4 أسابيع من الزراعة تم فصل الأجزاء النباتية (Explant) المستخدمة في الدراسة.

نشوء الكالس وادامته

زرعت الاوراق الحقيقة في انابيب زراعة زجاجية (Screw Glass Tube) حجم 26مل وبابعاد 85 x 28 ملم، حاوية على وسط MS بمقدار10 ml لكل أنبوب والمجهز ب 0.5ملغم\لتر من D–2,4 و 1.0 ملغم\لتر من Kin وكان عدد المكررات عشرة وتمثل كل أنبوبة اختبار مكرر واحد . اجريت تجربة لادامة للكالس زرع فيها 150 ملغم من الكالس والمستحث من الورقة الحقيقية بالتراكيز (0، 0.25 ، 0.5 او 0.75) ملغم /لتر من الـ 2,4-D والـ Kin بالتراكيز (0 ، 0.5 ، 1 او 1.5) ملغم /لتر لمعرفة أفضل وسط لإدامة الكالس وكان الوسط المجهز ب0.5 ملغم\لتر من D–2,4 و 1.5 ملغم\لتر من Kin الافضل و الذي اعطى اعلى وزن طري وجاف للكالس.

تحفيز إنتاج المركبات الثانوية في الكالس.

اخذ وزن ثابت من الكالس 150 ملغم وزرع على الوسط MS والمجهز بتركيز 0.5 ملغم / لتر من 2,4-D و1.5 ملغم / لترمن Kin مع إضافة مستويات مختلفة وفي تجارب مستقلة لكل مـــــــــن L- Tryptophan 0 , 200 , 300 , 400 ملغم \ لتر وحامض السالسيلك بالتراكيز 1.0,0.5,0 ,1.5 ملغم \ لتر وكانت معاملة المقارنة هي إضافة 30 غم \ لتر من السكروز إلى الوسط MS.كان عدد المكررات عشرة لكل تركيز. حضنت الزروعات ولكافة المعاملات في الظلام على درجة حرارة 25 ±2 م وبعد خمسة أسابيع أجريت لها عملية استخلاص المواد الفعالة.

الاستخلاص والتقدير الكمي والنوعي للمادة الفعالة من الكالس

تم اخذ 100 ملغم وزن طري من عينة الكالس وجفدت لمدة 8 ساعات, ثم سحق بهاون, المادة المسحوقة استخلصت باستخدام 2مل من الكحول المثيلي لمدة 60 دقيقة في حمام مائي و بدرجة حرارة الغرفة. نقل المستخلص إلى جهاز الطرد المركزي Centrifuged عند 1500 دورة ولمدة 5 دقائق وبدرجة حرارة الغرفة. استخلص الرائق من خلال مرشح نوع PTFE قطره0.45 مايكروميتر في قنينة زجاجية مظللة ل HPLC, بعد ذلك حقن20μL مايكرولتر في جهاز HPLC تبعا لظروف الفصل المثالية [17]. حقن كل من المحلول القياسي والعينة في جهاز HPLC نوع Shimadzu 10AV-LC لغرض تحديد زمن الاحتجاز Retention time وارتفاع حزمة العينة Area لكل من المحلول القياسي للمواد الفعالة ولعينة الكالس حقن المستخلص في عمود من نوعD.50x4.6mmI وطورمتحرك mobilephase للمركبات Vinblastine, vincristine, Serpentine خليط يتكون من5مايكرومول محلول دارئ الفوسفات ذا Acetonitrile:pH6.0 وبنسبة 80:20 V/V وكانت سرعة جريان الجهاز 1مل / دقيقة وقيست القراءات على طول موجي قدره nm210 وبدرجة حرارة 25 م°.اما عينة الأوراق الحقيقية للنبات النامي في السندانة اخذ 100ملغم وزن طري من الأوراق لتقدير المادة الفعالة وهو نفس وزن العينة للكالس فلم يؤشر الجهاز اية قيمة للمركبات المدروسة ويعود السبب في ذلك إلى انخفاض كمياتها بالنبات الطبيعي وعند الزيادة التدريجية لوزن العينة لحين الوصول إلى وزن 7غم وزن طري بدا الجهاز بتسجيل كمية ونوع المواد الفعالة.تم حساب تركيز كل عينة حسب المعادلة الآتية :-

مساحة النموذج
تركيز النموذج = ---------------------------- × تركيز المحلول القياسي × عدد مرات التخفيف
مساحة المحلول القياسي

علما إن تركيز المحلول القياسي =25 مايكروغرام/ مل , عدد مرات التخفيف = 1

التصميم والتحليل لإحصائي

استخدم التصميم التام التعشية (CRD) وقورنت المتوسطات باستعمال اقل فرق معنوي L.S.D لبيان الفروق الإحصائية بين المعاملات وعلى مستوى احتمال 0.05 [18].

النتائج والمناقشة

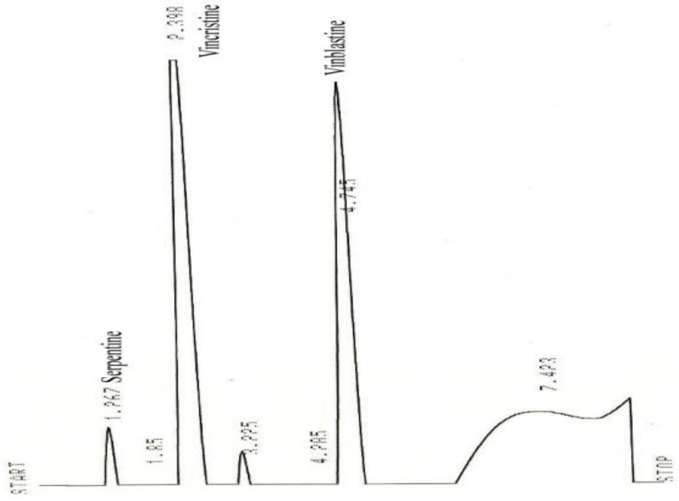
تأثير L-Tryptophan في إنتاج المركبات الثانوية من الكالس

يلاحظ من نتائج جدول (1) إن هنالك فروقا معنوية في تركيز المركبات الثانوية المدروسة عند إضافة تراكيز مختلفة من البادئ L-Tryptophan إلى الوسط الغذائي. ان اعلي كمية لمركب الـ Serpentine قد حصلت عند إضافة التركيز 200ملغم/لتر من البادئ وبلغت 22.26 مايكروغرام / 100ملغم وزن طري كالس بينما أعطت معاملة المقارنة اقل قيمة من الـ Serpentine بلغت 5.98 مايكروغرام /100ملغم.

في حين إن زيادة تركيز البادئ عن معاملة المقارنة أدى إلى زيادة تدريجية في كميات مركب الـ Vinblastine في الكالس وكان التركيز العالي من البادئ 400 ملغم/لتر الأكثر تأثيرا في تحفيز الكالس على إنتاج هذا المركب إذ بلغت 50.65 مايكروغرام /100ملغم وزن طري كالس والتي اختلفت معنويا عن بقية التراكيز .كما إن المقارنة أدت إلى اعطاء اقل كمية من مركب الـ Vinblastine إذ بلغت 37.73 مايكروغرام /100ملغم وزن طري كالس, كما يبين الجدول نفسه حصول زيادة معنوية في الـ Vincristine وأن أعلى أستجابة حدثت عند التركيز 200 ملغم /لترمن البادئ المضافة للوسط، إذ بلغت 48.66 مايكروغرام /100ملغم وزن طري كالس. قلت الاستجابة بزيادة تركيز البادئ إلى 400 ملغم /لتر اذ سجلت اقل استجابة بلغت 32.24مايكروغرام/100ملغم وزن طري كالس اشكال (D,C,B, A -1).

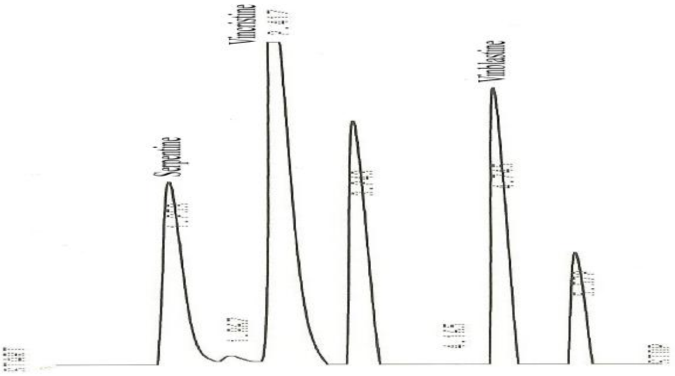
جدول (1): تأثير L-Tryptohane في إنتاج المركبات الثانوية (مايكروغرام /100ملغم وزن طري) من كالس نبات عين البزون المزروع في الوسط MS بعد خمسة أسابيع من الزراعة.

Vincristine	Vinblastine	Serpentine	تراكيز L-Tryptophan ملغم/لتر
35.22	37.73	5.98	0
48.66	38.65	22.26	200
38.04	41.68	12.46	300
32.24	50.65	20.65	400
* 3.57	* 2.94	* 3.78	L.S.D. 0.05



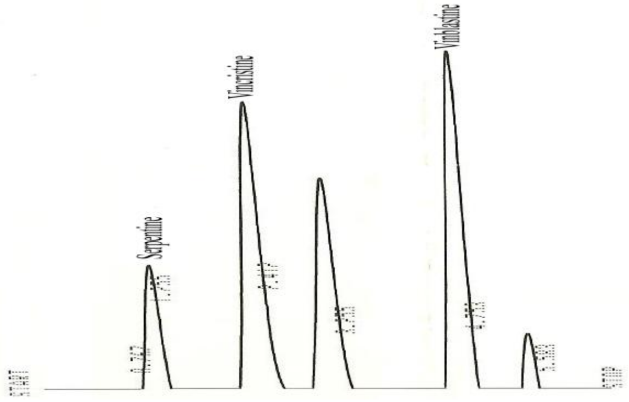
شكل (A-1): معاملة المقارنة الخالية من المحفزات لإنتاج المركبات الثانوية من الكالس

المساحة	زمن الاحتجاز/ دقيقة	المركب
11002	1.267	Serpentine
46407	2.398	Vincristine
36753	4.745	Vinblastine



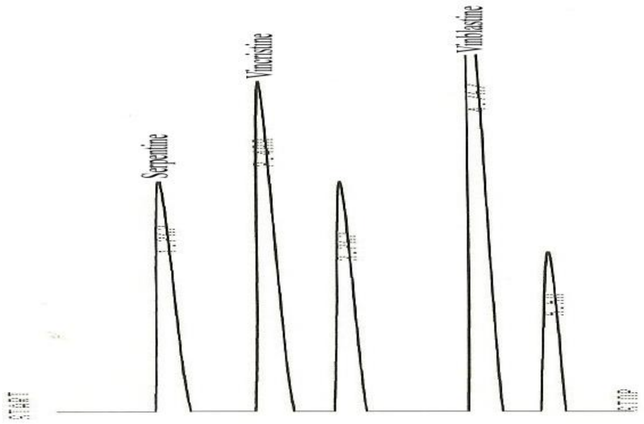
شكل (B-1): تأثير L-Tryptophan بالتركيز200ملغم\لتر في إنتاج المركبات الثانوية من نسيج الكالس

المركب	زمن الاحتجاز / دقيقة	المساحة
Serpentine	1.253	40940
Vincristine	2.417	64108
Vinblastine	4.745	37642



شكل (C-1): تأثير L-Tryptophan بالتركيز300ملغم\لتر في إنتاج المركبات الثانوية من نسيج الكالس

المركب	زمن الاحتجاز / دقيقة	المساحة
Serpentine	1.255	22923
Vincristine	2.412	50117
Vinblastine	4.753	40594



شكل (D-1) تأثير L-Tryptophan بالتركيز 400 ملغم\لتر في إنتاج المركبات الثانوية من نسيج الكالس

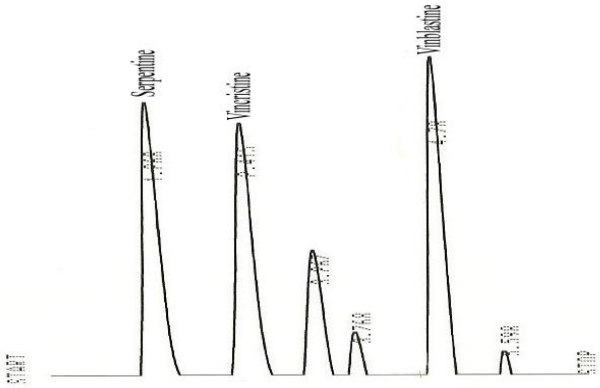
المركب	زمن الاحتجاز / دقيقة	المساحة
Serpentine	1.262	37979
Vincristine	2.408	42475
Vinblastine	4.767	49338

تأثير salicylic acid في إنتاج المركبات الثانوية من الكالس

يلاحظ من نتائج جدول (2) حصول فروقات معنوية بين تراكيز المركبات الثانوية الناتجة من الكالس قد حصلت عند اضافة حامض السالسيلك الى الوسط الغذائي ، ان أعلى قيمة للـ Serpentine بلغت 24.76 مايكروغرام / 100ملغم وزن طري كالس عند المعاملة 0.5 ملغم / لتر من حامض السالسيلك وكان اقل تركيز لهذا المركب 5.98 مايكروغرام / 100ملغم وزن طري كالس عند معاملة المقارنة. كما أظهرت نتائج التحليلات إن تضمين حامض السالسيلك للوسط وبالتراكيز العالية ادى الى زيادة انتاج مركب الـ Vinblastine وان افضل زيادة حصلت عند إضافة 1 ملغم/لترمن حامض السالسيلك إذ بلغت 50.98 مايكروغرام / 100ملغم وزن طري كالس والذي اختلف معنويا عن بقية التراكيز باستثناء التركيز 1.5 ملغم/لترالذي سجل 48.42 مايكروغرام / 100ملغم وزن طري كالس وانخفضت قيمة هذا المركب إلى 33.81 مايكروغرام / 100ملغم وزن طري عند المعاملة 0.5 ملغم/لتر. وتشير نتائج الجدول نفسه تفوق معاملة المقارنة في أعطاء أعلى قيمة للـ Vincristine بلغت 35.22 مايكروغرام / 100ملغم وزن طري والتي اختلفت معنويا عن بقية التراكيز كما في اشكال (C,B,A-2).

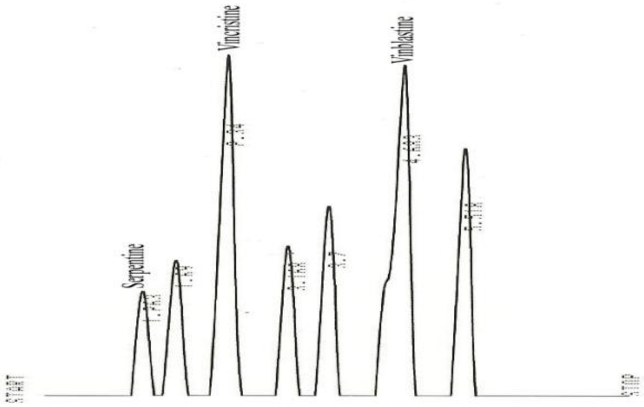
جدول (2): تأثير salicylic acid في إنتاج المركبات الثانوية (مايكروغرام / 100ملغم وزن طري) من كالس نبات عين البزون المزروع في الوسط MS بعد خمسة أسابيع من الزراعة

Vincristine	Vinblastine	Serpentine	تراكيز ملغم/لتر Salicylic acid
35.22	37.73	5.98	0
28.42	33.81	24.76	0.5
30.70	50.98	9.08	1
24.66	48.42	15.26	1.5
* 2.20	* 4.13	* 4.14	L.S.D. 0.05



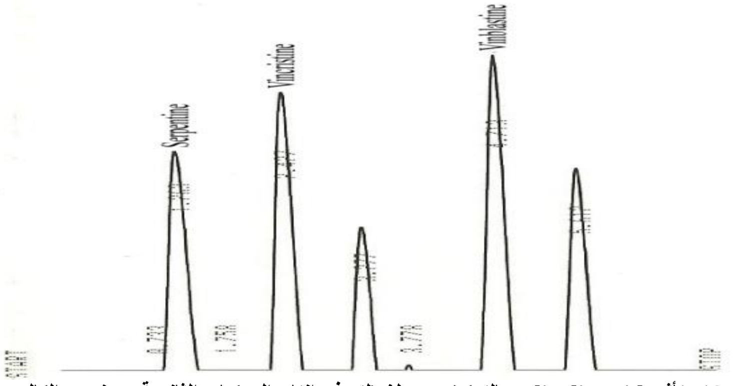
شكل (A-2): تأثيرsalicylic acid بالتركيز 0.5 ملغم\لتر في إنتاج المركبات الثانوية من نسيج الكالس

المساحة	زمن الاحتجاز / دقيقة	المركب
45542	1.268	Serpentine
37441	2.415	Vincristine
32928	4.78	Vinblastine



شكل (B-2): تأثير salicylic acid بالتركيز 1 ملغم\لتر في إنتاج المركبات الثانوية من نسيج الكالس

المساحة	زمن الاحتجاز / دقيقة	المركب
16695	1.263	Serpentine
40445	2.34	Vincristine
49658	4.683	Vinblastine



شكل (C-2): تأثير salicylic acid بالتركيز1.5 ملغم\لتر في إنتاج المركبات الثانوية من نسيج الكالس

المركب	زمن الاحتجاز/ دقيقة	المساحة
Serpentine	1.263	28064
Vincristine	2.427	32486
Vinblastine	4.713	47160

تشير نتائج الجدولين السابقين (2,1) إلى ارتفاع محتوى المركبات القلويدية المنتجة في نسيج الكالس عند إضافة المركبين التربتوفان و حامض السالسيلك. اذ يلاحظ من جدول (1) أن هناك زيادة معنوية في كمية مركبات Vincristine, Vinblastine,Serpentine قد حصلت عند تضمين الوسط الغذائي بتراكيز من البادئ L-Tryptophan , وقد يعزى سبب ذلك إلى كونه البادئ التخليقي للقلويدات الاندولية المدروسة فالبادئ هي جزيئات تدخل مباشرة في البناء الحيوي للمركبات الثانوية [19] ويحفز البادئ إنتاج مركبات الايض الثانوي غالبا إما بواسطة زيادة الكميات المحددة للبادئ التخليقي أو تحفيز إنزيمات البناء الحيوي أو كليهما [20]. هذا يتفق مع ما توصل إليه كل من [8 ، 9، 10]. إلا إن عند زيادة تركيز البادئ إلى 400 ملغم/لتر أدى إلى قلة في إنتاج قلويد Vincristine كما مبين في جدول (1) وقد يعزى هذا إلى إن زيادة تركيز البادئ في الوسط الغذائي تسبب شدا" على النسيج النباتي وهذا ما أكده [21] في إن زيادة تركيز الحامض الاميني في الوسط الغذائي سبب سمية مما يؤدي إلى تلفها ومن ثم انخفاض في فعالية الإنزيمات المسؤولة عن تخليق مركبات الايض الثانوي[22].

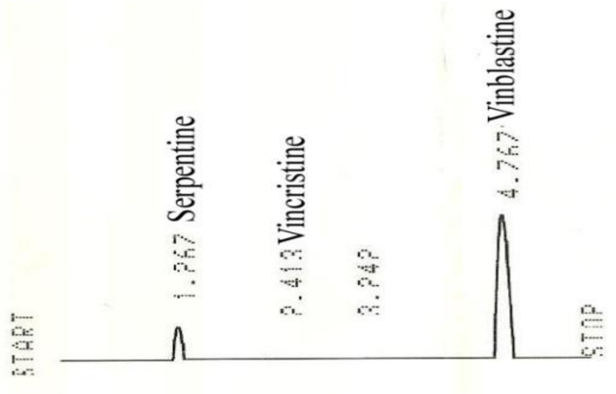
كما أظهرت النتائج إن تضمين حامض السالسيلك للوسط الغذائي وبالتراكيز الموضحة في جدول (2) زادت من كميات مركبي Vinblastine ,Serpentine المنتجة من قبل الكالس وقد يعود السبب في ذلك إلى إن يعد Salicylic acid احد منظمات النمو النباتية ويعتبر كمفتاح لظهور المركبات في المسار الحيوي [11] من خلال تأثيره على إنزيم Tryptophan (Tdc) decarboxylase [23] إذ يقوم هذا الإنزيم بتحويل المركب الأميني التربتوفان L-Tryptohan وهو البادئ الرئيسي لبناء القلويدات في نبات عين البزون الى قلويد تربتامين Tryptamine [24] وبالتالي يعمل Salicylic acid على تحفيز التفاعلات ضمن المسار الحيوي بإيجاد المركبات البادئة الوسطية مثل تربتامين الضرورية مسببا زيادة في تراكم القلويدات. وتتفق هذه النتائج مع [12] وما توصل إليه [13] إن المعاملة بالتركيز0.1mM من salicylic acid في الزراعة المعلقة لنبات Dendrobium huoshanense ادى إلى تراكم القلويدات وممكن إن تصل إلى 1.6مرة مقارنة مع المعاملة المحايدة وتتفق مع [14] لنبات Stemona sp بعد اضافة salicylic acid بتركيز100 مايكرومول. ومن جانب أخر يشير جدول (2) إلى انخفاض في مركب Vincristine عند زيادة تركيز حامض السالسيلك وقد يعود السبب في ذلك الانخفاض إلى إن زيادة تركيز المواد المحفزة المضافة للوسط الغذائي عن التركيز المثالي مما ادى الى تغيرات في العلاقات المائية للخلايا وسبب في زيادة الأجهاد المسلط على الخلايا [25] مما قد سبب في انخفاض فعالية الأنزيمات المسؤولة عن تخليق الأيض الثانوي [22]. ويؤدي ذلك ربما إلى إيقاف البناء الحيوي عند إي مرحلة مما يؤثر في تكوين وتراكم المركبات البادئة الوسطية وتراكم النواتج الثانوية في المسار الحيوي [19].

تقدير المركبات الثانوية في أوراق نبات عين البزون

يبين جدول (3) أنواع وكميات المواد الفعالة في الأوراق للنبات النامي في الأصص إذ لم يسجل جهاز HPLC المواد الفعالة المدروسة إلا عند اخذ وزن 7غم طري من الأوراق وقد يعود السبب في ذلك إلى انخفاض كميتها بالنبات الطبيعي إذ ينتج النبات المركبات الثانوية وخاصة القلويدات بتراكيز واطئة جدا تبلغ 0.0005 % [26] كما يبين نفس الجدول نسبة كميات المواد الثانوية عند تحويلها إلى وزن 100 ملغم المعتمد لتحليل الكالس. ويستنتج من مقارنة أنواع وكميات المواد الفعالة المدروسة في النباتات المزروعة في الأصص عند وزن 100 ملغم من أوراق مع تلك التي تم الحصول عليها من 100ملغم كالس والخالي من إضافة إي محفزات سواء أكانت التربتوفان أو حامض السالسيلك للكالس المستحث من أوراق النبات المزروعة خارج الجسم الحي تفوق الكالس على نبات عين البزون المزروع بالأصص. ويبين شكل (3) كمية المواد الفعالة المستخلصة من أوراق نبات عين البزون.

جدول (3): إنتاج المركبات الثانوية والمقدرة من الأوراق الحقيقية لنبات عين البزون المزروع في الأصص

وزن العينة الطري	Serpentine مايكروغرام	Vinblastine مايكروغرام	Vincristine مايكروغرام
7 غم أوراق	4.13	12.79	4.46
100 ملغم أوراق	0.059	0.183	0.064
100ملغم كالس بدون محفزات مقارنة	5.98	7.73	35.22



شكل (3): زمن الاحتجاز للمركبات الثانوية في أوراق نبات عين البزون النامي في الأصص.

المركب	زمن الاحتجاز/دقيقة	المساحة
Serpentine	1.267	7596
Vincristine	2.413	5873
Vinblastine	4.767	12460

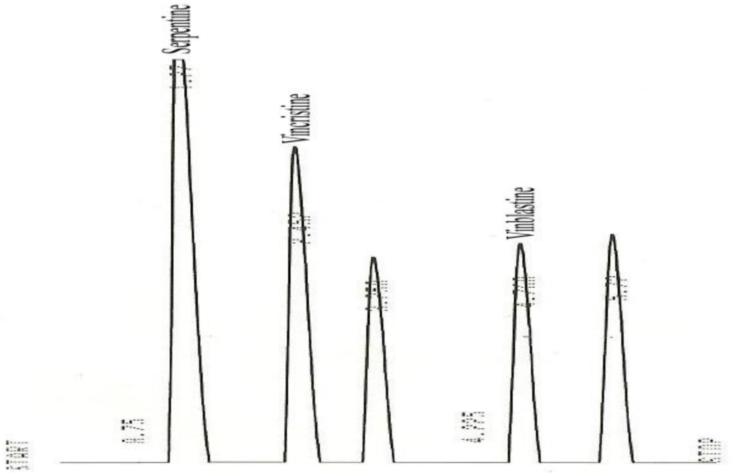
إما في حالة مقارنة أنواع وكميات المواد الفعالة المدروسة في النباتات المزروعة في الأصص عند وزن 100 ملغم من أوراق النبات النامي بالأصص مع التراكيز المختلفة للمحفزين المضافة إلى الكالس النامي في الوسط الغذائي.

يستنتج الأتي:

إن مركب الـ Serpentine كان تركيزه في الأوراق 0.059 مايكروغرام / 100ملغم وزن طري جدول (3) وشكل (3)، بينما بلغ تركيزه 24.76 مايكروغرام /100ملغم وزن طري من الكالس المزروع في الوسط MS المضاف إليه 0.5 ملغم\لتر من salicylic acid جدول (2) و شكل (A-2) اي بزيادة مقدارها 419.66 مرة.

و يبين جدول (2) وشكل (B -2) كمية مركب الـ Vinblastine المستخلصة من الكالس في أفضل معاملة للكالس المزروع في الوسط MS المضاف إليه 1 ملغم/لتر من salicylic acid بلغت 50.98 مايكروغرام /100ملغم وزن طري في حين كان تركيزه في أوراق النبات المزروعة في السندانة بلغ 0.183 مايكروغرام / 100ملغم وزن طري من الأوراق جدول (3) شكل (3) إي بزيادة مقدارها 278.57 مرة.

واتضح من التحليل بجهاز الـ HPLC أن هناك أعلى زيادة في كمية الـ Vincristine قد حصلت عند تضمين الوسط الغذائي بتركيز 200 ملغم/لتر من البادئ L-Tryptophane إذ سجلت 48.66 مايكروغرام /100ملغم وزن طري من الكالس جدول (1) وشكل1-B) مقارنة بنبات عين البزون النامي بالسندانة بلغ 0.064 مايكروغرام /100ملغم وزن طري من الأوراق جدول (3) وشكل (3) اي بزيادة مقدارها 760.31مرة.



Standard Peaks منحنى المحلول القياسي

المركب	زمن الاحتجاز/ دقيقة	المساحة
Serpentine	1.270	45980
Vincristine	2.452	32938
Vinblastine	4.768	24351

المصادر

1. Aslam, J., Sheba, H. K., Zahid, H. S., Zohra, F., Mehpara, M., AMukthar. (2010). *Catharanthus roseus* Don. L an Important Drug it's applications and production, Pharmacie Globale. (IJCP). 4: 12.
2. Ferreres, F., Pereira, D.M., Valent, P.C., Andrade, P.B., Seabra, R.M. and Mayor, M.S. (2008). New Phenolic Compounds and Antioxidant Potential of *Catharanthus roseus*. J. Agric. Food Chem. American Chemical Society. 56 (21): 9967–9974.
3. Jennifer, L.G. (2004). Increasing alkaloid production from *Catharanthus roseus* suspensions throughmethyl jasmonate elicitation. The official J. of ISPE. 24(4):6.
4. Taiz and Zeiger, E. (2006). Plant Physiology. Sinaure Assciates, Inc. Publishers. Sunderland.
5. Davuluri, G.R.; Tuinen ,A. V. and Fraser, P.D. (2005). Fruit- specific RNAi – mediated suppression of DET1 enhances carotenoid and flavonoid content in tomatoes. Nature Biotechnology. 23 (7): 890- 895.
6. Gang Guo, Z., Liu, Y., Zhen Gong, M., Chen, W., Yuan Li, W. (2012). Regulation of vinblastine biosynthesis in cell cultures suspension of catharanthus *roseus* PlantCell Tiss OrganCult. DOI10.1007/ s11240-012-0213-y Springer Science +Business MediaB.V.
7. Ramawat, K. G. (2004). Plant biotechnology. printed in india. pp:1-265.
8. Morgan, J. and Shanks, J. (2000). Determination of metabolic rate- limitation by precursor feeding in *C. roseus* hairy root cultures. J. of biotechnology. 79(2): 137-145.
9. Serap, W., Robert, H. and Robert,V. (2002). Effect of precursor feeding on alkaloid accumulation by a strictosidine synthase over-expressing transgenic cell line S1 of Catharanthus roseus. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 69: 85-93.
10. Taha, H.S., El-Bahr, M.K. and Seif-El-Nasr, M.M. (2009). *In vitro* studies on Egyptian *Catharanthus roseus* (L.) G.Don. Manipulation of some amino acids as precursors for enhanced of indole alkaloids production in suspension cultures. Australian J. of Basic and Applied Sciences. 3(4): 3137-3144.
11. Durner, J., Shah, J. and Klessig, D. F. (1997). Salicylic acid and disease resistance in plant. Trends Plant Sci. 2: 1360–1385.
12. Zhou, M. L., Shao, J. R. and Tang, Y. X. (2009). Production and metabolic engineering of terpenoid indole alkaloids in cell cultures of the medicinal plant *Catharanthus roseus* L. G. Don. (Madagascar periwinkle) Biotechnol. Appl. Biochem. Rev. 52: 313–323.
13. Huang, B. H., S. L., Zhang, Q., Cai, S. H. and Lin, Y. (2010). Effects of SNP, PA and SA on cell growth and physiological activitiesof suspension-cultured protocorn-like bodies of *Dendrobium huoshanense* C., Plant Physiology Communications. 46: 423-426.
14. Chaichana, N. and Dheeranupattana, S. (2012). Effects of Methyl Jasmonate and salicylic acid on alkaloid production from *in vitro* culture of *Stemona* sp. J. International of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics. 2: 3.

15. جاسم, نورا جبر . (2011). انتاج بعض قلويدات التروبان من كالس نبات البلادونا . *Atropa belladonna* L خارج الجسم الحي *In vitro* رساله ماجستير قسم البستنة – كلية الزراعة – جامعة بغداد.

16. Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15: 473-497.
17. Tikhomtroff, C. and Jolicoeur, M. (2002). Screening of *Catharanthus roseus* secondary metabolite by HPLC. J. Chromatography. 955:87-93.

18. الساهوكي، مدحت ووهيب ، كريمة احمد . (1990). تطبيقات في تصميم وتحليل التجارب . وزاره التعليم العالي والبحث العلمي العراق.

19. Ramawat, K.G. (2008). Plant Biotechnology. SChand and Company LTD, Ram Nagar, New Delhi. India. pp:24-40.
20. Demain, A.L. (1998). Induction of microbial secondary metabolism. Intern. Microbiol. 1:259-264.
21. Kumpaisal, R.T.H. and Yamada,Y. (1988). Selection and characterization of S-(2- aminoethyl)-L- Cycteine assistant Whaet Cultures. J. plant physiol. 133:608-614.

22. عبد القادر، فيصل وعبد اللطيف، فهيمة وشوقي، أحمد وأبو طبيخ، عباس والخطيب، غسان. (1982) علم فسيولوجيا النبات. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. العراق.

23. Pasquali, G. (1994). Regulation of the terpenoidindole alkaloid biosynthetic gene strictosidinesynthase from *Catharanthus roseus*. Ph.D thesis, Leiden University.
24. Lee-Parsons, C.W. and Royce, A.J. (2006). Precursor limitations in methyl jasmonate - induced *Catharanthus roseus* cell cultures. Plant Cell Rep. 25: 607-612

25. الشحات, نصر ابو زيد. (2006). فسيولوجيا وكيمياء القلويدات في النباتات الطبية واهميتها الدوائية والعلاجية, دار الكتب العلمية للنشر والتوزيع, القاهرة.

26. Ebrahimzadeh, H., Ataei-Azimi,A., Noori-Daloi, M. (1996). The distribution of indole alkaloids in different organs of *Catharanthus roseus* L G. Don. *Vinca rosea* L, Daru, J. Sch. Pharm. 6(1&2): 11-24 .