استجابة كالس نبات عين البزون الى تراكيز مختلفة من ملح كلوريد الصوديوم وانتاج المركبين القلويدين Vincristine و Vinblastine

احسان جالي اذبيب الحجيمي **مسلم عبد علي عبد الحسين**

كلية الزراعة / جامعة الكوفة **كلية الزراعة / جامعة الكوفة**

المستخلص

نفذت التجربة في مختبر زراعة الأنسجة النباتية التابع لقسم البستنة وهندسة الحدائق/كلية الزراعة/جامعة الكوفة للمدة من 2008 - 2009 م لدراسة تأثير تعريض الكالس المستحث من الأفرع الناتجة من الزراعة النسيجية لنبات عين البزون *Catharanthus roseus* صنف rosea الى تراكيز من ملح NaCl هي (0 ، 25 ، 50 ، 75 ملي مول) لمدة أربعة أسابيع في إنتاجه لمركبي Vincristine و Vinblastine. اظهرت النتائج تباين في تاثير ملح NaCl في وزن الكالس الطري له حسب التركيز المستخدم . اذ تبين ان زيادة تركيز ملح NaCl في الوسط الغذائي ادى الى زيادة معنوية في الوزن الطري لنسيج الكالس وذلك عند التركيز 25 ملي مول ، ثم حدث انخفاض معنوي عند التراكيز 50 و 75 ملي مول. كما ظهر انخفاضاً ملحوظاً في الوزن الجاف للكالس عند اضافة التراكيز العالية من NaCl للوسط الغذائي(التركيز 75 ملي مول) الذي انتج اقل معدل للوزن الجاف ، في حين كان اعلى معدل وزن جاف له في الوسط المجهز بـ 25 ملي مول NaClان محتوى نسيج الكالس من المواد القلويدية الاندولية الكلية و مركبي Vincristine و Vinblastine اختلف باختلاف تركيز ملح NaCl المضمن في الوسط الغذائي ، إذ إن أعلى مستوى لهذه المركبات قد لوحظ في الكالس النامي في أوساط ملحية مقارنة مع الكالس النامي في وسط خالي من ملح NaCl. وقد تفوق الكالس النامي في وسط MS الحاوي على 50 ملي مول ملح NaCl بصوره معنوية في محتواه من المواد القلويدية الاندولية الكلية و مركبي Vincristine و Vinblastine فانتج 3.18 ملغم/غم وزن جاف للكالس و5.12 مايكروغرام/غم وزن جاف للكالس و6.11 مايكروغرام /غم وزن جاف للكالس ،على التتالي على معاملة المقارنة (وسط خالي من كلوريد الصوديوم) التي أعطت اقل محتوى بلغ 1.11 ملغم/غم وزن جاف للكالس و1.56 مايكروغرام/غم وزن جاف للكالس و3.76 مايكروغرام /غم وزن جاف للكالس ، على التتالي .

المقدمة

يحتل نبات عين البزون *Catharanthus roseus* (L.) G. Don أهمية طبية واقتصادية كبيرة كونه مصدراً لإنتاج أكثر من 200 قلويد من القلويدات الاندولية التربينية ومشتقاتها التي من أهمها مركبي Vincristine و Vinblastine الهامين في معالجة الأورام السرطانية ، فضلاً عن قيمته بوصفه نبات زينة مزهر (Simpson ، 2006). ويعد هذا النبات المصدر التجاري الوحيد للمركبين Vincristine وVinblastine (Hernández-Domínguez وآخرون ، 2005). وبسبب أهمية النبات الصيدلانية ومحتواه الواطئ من هذه المواد والسعر المرتفع لمركباته أصبح هذا النبات محط أنظار الباحثين وأصبح احد أهم النباتات الطبية دراسةً بهدف إمكانية زيادة المواد القلويدية فيه (Zhou وآخرون ، 2009). تسعى المؤسسات العلمية البحثية ومختبرات صناعة الأدوية في العالم الى استعمال التقنيات الحديثة ومنها زراعة الأنسجة النباتية في مجال تصنيع هذه المركبات وتحويلها الى ادوية علاجية وقد أثبتت زراعة الأنسجة أنها وسيلة مفيدة وفعالة في إنتاج الكثير من المواد الطبيعية والعقاقير الطبية (Mulabagal و Tsay ، 2004). إذ تساعد في الإنتاج السريع لهذه المواد والمركبات على مدار السنة من دون التقيد بموسم الانتاج مع تقليل المساحات اللازمة للزراعة فضلاً عن النقاوة العالية للمواد المتكونة اذا ما قورنت بتلك المصنعة مع إمكانية زيادة معدل الإنتاج (Georgiev واخرون ، 2009). لقد اختبر تأثير تعريض المزارع الخلوية لنبات عين البزون لبعض الاجهادات الازموزية والملحية من اجل تشجيع إنتاج القلويدات ومنها الاجهادات الناجمة عن إضافة كلوريد الكالسيوم وكلوريد الصوديوم الى الوسط الغذائي ووجد ان هذه المواد قد حسنت من إنتاج بعض المواد القلويدية في مزارع عين البزون (Gody-Hernandez و Loyola-Vargas ، 1991). كما وجد Misra و Gupta (2006) إن استعمال الإجهاد الملحي في الوسط الغذائي للمزارع النسيجية لنبات عين البزون قد أدى إلى حصول زيادة معنوية في كمية المركبات المضادة للأورام السرطانية وخاصة مركبي Vinblastine و Vincristine. أما Zhao وآخرون (2000) فقد ذكروا ان إنتاج مادة Catharanthine في المزارع الخلوية المعلقة لنبات عين البزون قد ازدادت عند تعريض المزارع الخلوية الى صدمات اوزموزية (Osmotic shock) مثل كلوريد الكالسيوم وكلوريد الصوديوم اذ ان إضافتهما الى الوسط الغذائي قد حفز إنتاج مادتي Ajmalicine و Catharanthine وان أعلى كميةوهي 15 ملغم / لتر و 24 ملغم / لترعلى التتالي قد تم الحصول عليها

باستعمال تركيز 6 غم KCl / لتر وان هذه الكميات هي أعلى بمرتين ونصف عن معاملة المقارنة ، في حين أعطت المعاملة بكلوريد الصوديوم كمية اقل مقارنة مع استعمال كلوريد البوتاسيوم. ونظراً لأهمية مركبي Vincristine و Vinblastine في علاج الأمراض المزمنة ووجود هذين المركبين في نبات عين البزون ، اجريت هذه التجربة لدراسة تأثير تنمية الكالس في وسط غذائي مجهز بتراكيز مختلفة من ملح NaCl في كمية هذين المركبين في كالس نبات عين البزون.

المواد وطرائق العمل

نفذت التجربة في مختبر زراعة الأنسجة النباتية التابع لقسم البستنة وهندسة الحدائق – كلية الزراعة – جامعة الكوفة خلال عامي 2008 و 2009 م . أخذ وزن ثابت من الكالس مقداره (150) ملغم وزرع على الوسط الغذائي MS المضمن 0.5 ملغم/لترNAA + 2 ملغم/لتر BA (الذي عد كوسط تراكمي للقلويدات) مع إضافة مستويات مختلفة من ملح NaCl (0 ، 25 ، 50 ، 75 ملي مول) وبواقع عشرة تكرارات لكل تركيز. حضنت الزروعات في غرفة النمو عند درجة حرارة 24±2ºم وشدة إضاءة 1000 لوكس لمدة 16 ساعة إضاءة تعقبها 8 ساعات ظلام يومياً لمدة 4 أسابيع. ، أخذ الوزنين الطري والجاف للكالس ثم أجريت عملية استخلاص القلويدات وفقا لطريقة Kurz (1984) ثم قدرت كمية مركبي Vincristine و Vinblastine في مستخلص الكالس المعرض وغير المعرض للإجهاد الملحي بطريقة Nagaraja واخرون (2002) وباستعمال UV-spectrophotometer على الطولين الموجيين 430 و 440 نانوميتر لهذين المركبين ،على التتالي. وقد استعملت Vincristine Sulfate وVinblastine Sulfate كمواد قياسية في تقديرهما.نفذ البحث باستعمال التصميم العشوائي الكامل CRD (Completely Randomized Design) وحللت النتائج باستخدام البرنامج الإحصائي (SAS ، 2002) وقورنت المتوسطات حسب اختبار اقل فرق معنوي (L.S.D. Least significant Differences Test) عند مستوى احتمال 0.05.

النتائج والمناقشة

تأثير ملح كلوريد الصوديوم في الوزن الطري للكالس

تشير البيانات الواردة في الجدول (1) إلى ان زيادة تركيز ملح NaCl في الوسط الغذائي أدى إلى زيادة معنوية في الوزن الطري لنسيج الكالس وذلك عند التركيز 25 ملي مول ، إذ أعطت أعلى وزن مقداره (1429 ملغم) مقارنة بالوزن الناتج من الوسط الخالي من الملح ومقداره (1388 ملغم)، ثم حدث انخفاض معنوي عند التراكيز 50 و 75 ملي مول اللذان اختلفا فيما بينهما معنويا وان أعلى انخفاض معنوي في وزن الكالس الطري كان عند التركيز 75 ملي مول .

جدول(1) : تأثير تركيز ملح NaCl المضاف الى الوسط الغذائي MS في الوزن الطري لكالس نبات عين البزون بعد أربعة أسابيع من الزراعة خارج الجسم الحي.

تركيز ملح NaCl في الوسط الغذائي (mM)	الوزن الطري للكالس(ملغم)
0	1388
25	1429
50	1380
75	1330
LSD(0.05)	29.22

ان الزيادة المعنوية عند التركيز الواطيء (25 ملي مول) يعزى الى ان هذا التركيز حفز الفعاليات الحيوية اللازمة للنمو لمجابهة الاجهاد بفعل التعرض للملوحة (Levitt ، 1980) . اما انخفاض الوزن الطري للكالس النامي في وسط مجهز بتركيز اعلى(75 ملي مول NaCl) يعود الى التاثير السلبي للملوحة العالية في نمو الخلايا المعرضة للتراكيز العالية من هذا الملح .

تأثير ملح كلوريد الصوديوم في الوزن الجاف للكالس

يتبين من النتائج في الجدول (2) أن الوزن الجاف للكالس المزروع في وسط غذائي مزود بتراكيز مختلفة من ملح NaCl لمدة 4 اسابيع قد تأثر بشكل معنوي وقد تباين هذا التأثر على وفق التركيز المستعمل من الملح . فقد أظهرت النتائج انخفاضاً ملحوظاً في الوزن الجاف للكالس عند اضافة التراكيز العالية من ملح NaCl للوسط الغذائي(التركيز 75 ملي مول) الذي اعطى اقل معدل للوزن الجاف بلغ 119 ملغم ، في حين كان اعلى معدل وزن جاف للكالس النامي في الوسط المجهز بـ 25 ملي مول من ملح NaCl اذ بلغ 139 ملغم والذي اختلف معنوياً عن جميع الاوزان في المعاملات الأخرى التي لم تختلف فيما بينها في الوزن الجاف للكالس .ان انخفاض معدل الوزن الجاف للكالس النامي في اوساط تحوي تراكيز عالية من ملح NaCl قد يعود الى انخفاض معدلات نمو الخلايا في الكالس المعرض للاجهاد الملحي بانخفاض المغذيات في وسط النمو فضلا عن تقليل جاهزية العناصر الغذائية الضرورية لنمو النبات (Rains واخرون ، 1986).

جدول(2) : تأثير تركيز ملح NaCl المضاف الى الوسط الغذائي MS في الوزن الجاف لكالس نبات عين البزون بعد أربعة أسابيع من الزراعة خارج الجسم الحي.

تركيز ملح NaCl) في الوسط الغذائي (mM)	الوزن الجاف للكالس (ملغم)
0	128
25	139
50	121
75	119
LSD(0.05)	8.21

تأثير ملح كلوريد الصوديوم في كمية القلويدات الاندولية

اختلف محتوى نسيج الكالس من المواد القلويدية الاندولية باختلاف تراكيز ملح NaCl المضمنة في الوسط الغذائي الذي تم تنمية نسيج الكالس عليه مدة 4 اسابيع (جدول 3). اذ ان اعلى مستويات للمركبات

القلويدية الاندولية الكلية قد لوحظت في الكالس النامي في اوساط ملحية مقارنة مع الكالس النامي في وسط خالي من ملح NaCl. وقد تفوق الكالس النامي في وسط MS الحاوي على 50 ملي مول ملح NaCl بصوره معنوية واعطى 3.18 ملغم /غم وزن جاف على معاملة المقارنة (وسط خالي من NaCl) التي اعطت اقل محتوى من القلويدات بلغ 1.11 ملغم /غم وزن جاف . من جانب اخر لم تظهر أي فروق معنوية بين التراكيز الملحية (25 و 50 و 75 ملي مول) التي تفوقت جميعها على معاملة المقارنة في محتوى الكالس النامي عليها من القلويدات الاندولية.

جدول(3) : تأثير تركيز ملح NaCl المضاف الى الوسط الغذائي MS في محتوى كالس نبات عين البزون من القلويدات الاندولية (ملغم/غم وزن جاف) بعد أربعة أسابيع من الزراعة خارج الجسم الحي.

تركيز ملح NaCl في الوسط الغذائي (mM)	القلويدات الاندولية الكلية (ملغم/غم وزن جاف للكالس)	الفنكرستين (مايكروغرام/غم وزن جاف للكالس)	الفنبلاستين (مايكروغرام/غم وزن جاف للكالس)
0	1.11	1.56	3.76
25	3.12	3.02	5.77
50	3.18	5.12	6.11
75	2.99	4.55	3.95
LSD(0.05)	1.01	2.01	2.03

كما يشير الجدول الى ان تعريض كالس نبات عين البزون للاجهاد الملحي بتنميته في وسط غذائي مجهز بتراكيز مختلفة من ملح NaCl لمدة أربعة أسابيع ً قد أدى الى حصول زيادة معنوية في محتوى الكالس من الـ Vincristine فيه ، إذ سبب التركيزين 50 و 75ملي مول ملح NaCl أعلى كمية بلغت 5.12 و 4.55 مايكروغرام / غم وزن جاف مقارنة بمعاملة المقارنة التي اعطت 1.56 مايكروغرام / غم وزن جاف ومعاملة التركيز الملحي 25 ملي مول ، ولم يختلف محتوى الكالس من الـ Vincristine في التركيزين الملحيين اعلاه معنويا بعضهما عن البعض الأخر.ويلاحظ من الجدول (3) وجود تأثير معنوي في محتوى الكالس من الـ Vinblastine عند زيادة تركيز NaCl في وسط تنمية الكالس اذ أعطى التركيز الملحي 50 ملي مول أعلى محتوى للـ Vinblastine بلغ 6.11 مايكروغرام/غم وزن جاف مقارنة بالتركيز(0 ملي مول ملح NaCl) والذي أعطى اقل محتوى بلغ 3.76 مايكروغرام/غم وزن جاف في حين لم تختلفت التراكيز الملحية فيما بينها معنوياً في اعطاء محتوى من Vinblastine. ان هذه النتائج تتفق مع ما اوردتة الدراسات من حيث ان زيادة في انتاج وتراكم المركبات الثانوية و القلويدات احداها بفعل تعرض النباتات او خلاياها الى الاجهاد الملحي قد وجدت في الكثير من الدراسات في نباتات عديدة منها نباتات الداتورا (الحاتمي ، 2006) و نباتات عين البزون (Zhao واخرون ، 2000 و Misra و Gupta ،2006) ، . كما وجد Jaleel و آخرون (2008) ان

محتوى افرع نبات عين البزون من القلويدات قد ارتفع عند تعريض النباتات الى تراكيز 50 و 100 ملي مول من ملح NaCl متفقا مع ماجاء به Osman واخرون ، (2007). ان زيادة المركبات القلويديةالاندولية بوجود الاملاح ربما يعود الى التدخل او التاثير في زيادة محتوى هذه الخلايا من بعض المركبات البادئة للقلويدات الاندولية التي تساهم في زيادة التخليق الحيوي لهذه المركبات ويجري ذلك كوسيلة لمواجهة الايونات الملحية الزائدة مثل زيادة الاحماض الامينية و الاحماض العضوية التي تكون كخزين للنتروجين الذي يساهم في زيادة التخليق الحيوي للمركبات القلويدية في ظروف الشد الملحي(Sato واخرون ، 1999). يستنتج من التجربة امكانية استعمال الاجهاد الملحي وبتراكيز منخفضة من ملح NaCl في زيادة انتاج كالس نبات عين البزون المستحدث نسيجيا خارج الجسم الحي من قلويديVincristine و Vinblastine

المصادر

1- الحاتمي ،كريم طالب خشان (2006) دراسة مقارنه لإنتاج قلويدات التروبين داخل وخارج الجسم الحي في نوعي الداتوره Lin *Datura metel* وMill *Datura innoxia* ،أطروحة دكتوراه ، كلية العلوم جامعة بابل

2- 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): 809-23.

3- Gody-Hernandez, G. and V.M., Loyola-Vargas (1991). Effect of fungal homogenates, enzyme inhibitors and osmotic stress on alkaloid content of *Catharanthus roseus* cell suspension cultures. Plant Cell Rep., 10: 537-540.

4- Hernández-Domínguez, E.; F. Campos-Tomayo; M. Carrillo-Pech and F. Vázquez-Flota. (2005). *Catharanthus roseus* shoot cultures for the production of monoterpenoid indole alkaloids. Methods in Molecular Biology, 318: 349-355.

5- Jaleel, C. A. ; B. Sankar ; R. Sridharan, and R. Panneerselvam (2008) Soil Salinity Alters Growth, Chlorophyll Content, and Secondary Metabolite Accumulation in *Catharanthus roseus*. Turk. J. Biol., 32 : 79-83

6- Kurz,W.G.W.(1984). Isolation and analysis of alkaloids. In I.K.Vasil (ed.) : Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants.pp.644-650.Academic Press, Inc.

7- Levitt, J. (1980) *Responses of Plants to Environmental Stresses. II* . pp. 365-488 . Academic Press , NewYork

8- Misra,N. and A.K. Gupta (2006) .Effect of salinity and different nitrogen sources on the activity of antioxidant enzymes and indole alkaloid content in *Cathatanthus roseus* seedlings. J. Plant Physiol., 136:11-18.

9- Mulabagal, V. and H.-S. Tsay (2004) Plant Cell Cultures - An Alternative and Efficient Source for the Production of Biologically Important Secondary Metabolites. Int. J. Appl. Sci. Eng., 2(1) 29-48

10- Nagaraja, P., : R.A., Vasantha, and H.S.,Yathirajan (2002). Sensitive Methods for the Spectrophotometric Determination of Antineoplastic Compounds. Ars Pharmaceutica, 43(3-4) 121-133,

11- Osman, M.E.H. : S.S. Elfeky : K. Abo El-Soud and A.M. Hasan (2007).Response of *Catharanthus roseus* shoots to salinity and drought in relation to Vincristine alkaloid content. Asian J. Plant Sci., 6(8) 1223-1228.

12- Rains, D.W. ; S.S., Croughan and T.P., Croughan (1986) Isolation and characterization of mutant cell lines and plants : salt tolerance. In: Vasil, K. (ed.) Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Vol.3 , pp. 537-547. Academic Press, Inc., NewYork

13- SAS (2002). Statistics Users Guide for personal computer, SAS Institute Inc., Cary, N.C. USA.

14- Sato,F.: H.,Takashi : H., Akira, : T., Ken-ichi : C., Kum-Boo : M.,Takashi ; F., Hidek and Y., Yasyuki (1999) Metabolic engeneering of plant alkaloid biosynthesis . Natl.Acad.Sci. USA.10 : 367-372

15- Simpson, M.G. (2006). Plant systematics. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.

16- Zhao, J.; W.H., Zhu ; Q., Hu and Y.Q., Guo (2000). Improvement of indole alkaloid production in *Catharanthus roseus* cell cultures by osmotic shock. Biotechnology Letters, 22(15): 1227-1231.

17- Zhou, M.L.; J.R., Shao and Y.X., Tang (2009). Production and metabolic engineering of terpenoid indole alkaloids in cell cultures of medicinal plant *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (Madagascar periwinkle). Biotechnol. Appl. Biochem., 52(4): 313-23.

Effect of NaCl on Callus growth of *Catharanthus roseus* and its vincristine and vinblastine alkaloids content.

Abstract

An experiment was conducted at Plant Tissue Culture Laboratory / Horticulture Department / Agriculture College / Kufa University during 2008-2009 to study the effects of NaCl at concentrations (0, 25 , 50 or 75 mM) concentrations on *Catharanthus roseus* cv. rosea callus growth initiated from *in vitro* multiple shoots, and its total indole alkaloids, vincristine and vinblastine contents.

Results showed significant differences in content of callus in total indole alkaloids, vincristine and vinblastine cultured at different NaCl salt concentrations in MS medium. NaCl treatments gave a significant increase in these parameters as compared with the control (with out NaCl). The highest amount of total indole alkaloids, vincristine and vinblastine (3.18 mg / gm callus dry weight, 5.12 µg / gm callus dry weight and 6.11 µg / gm callus dry weight) respectively was found in the callus cultured in MS medium that supplied with 50 mM NaCl as compared with the lowest values(1.11mg/ gm callus dry weight , 1.56µg/ gm callus dry weight and 3.76µg / gm callus dry weight) in the control.