تأثيرالرش بالكاربوليزر في إنتاج القلويدات الأندولية من أوراق نبات عين البزون *Catharanthus roseus* L.D.Gon صنف MixPacifica

إخلاص متعب أحمد[1] **أياد عاصي عبيد[2]**
ekhlas.meteab86@yahoo.com ayad_assi@ yahoo.com

[2،1] قسم البستنة وهندسة الحدائق– كلية الزراعة – جامعة ديالى، العراق

المستخلص

أجري البحث في الظلة الخشبية العائدة إلى كلية الزرعة/ جامعة ديالى خلال الموسم الزراعي 2015 لمعرفة تأثير الرش بالكاربوليزر بالتراكيز 0 و2.5 و3.5 مل لتر$^{-1}$ في انتاج القلويدات الأندولية من نبات عين البزون. اظهرت النتائج أن الرش بالكاربوليزر بتركيز2.5 مل لتر$^{-1}$ قد أعطى أعلى معدل لمركبي Vindoline وCatharanthine بلغ 251.3 و 528.2 مايكروغرام مل$^{-1}$على التتابع، في حين سجل الرش بالتركيز 3.5 مل لتر$^{-1}$ زيادة في كمية Vincristine وVinblastine بلغت 162.34 و 734.22 مايكروغرام مل$^{-1}$ على التتابع.

الكلمات المفتاحية: نبات عين البزون، الكاربوليزر (Carbolizer)، القلويدات الاندولية.

المقدمة

يعد نبات عين البزون *Catharanthus roseus* (L.) G.Don من النباتات المهمة طبيا وهو يعود للعائلة الدفلية Apocynaceae، ويحتوي هذا النبات على الكثير من المركبات القلويدية أهمها مركبي Vincristine وVinblastine اللذان يستعملان في علاج مرض السرطان (Ferreres وآخرون، 2008، Leveque وآخرون، 1996 وVan der Heijden وآخرون، 2004).تنتج النباتات مركبات كيميائية بوساطة عمليات الأيض Metabolism تعرف بنواتج الأيض الثانوي وهي مركبات تختلف في درجة تعقيدها ولا تدخل في بناء وتكاثر ونمو الخلية النباتية، إذ تعتبر وسيلة دفاعية تنتج بعد إصابة النبات بألامراض او مهاجمتها من قبل الكائنات الحية (الشماع ، 1989). وتؤدي هذه المواد دوراً مهماً كمواد فعالة طبياً إذ يمكن استعمالها في علاج الكثير من الامراض لفاعليتها العلاجية وكونها توفر الجانب الآمن من الاستعمال البشري الطبي والعلاجي (Davuluri، 2005). إن استخدام المواد المحفزة لزيادة إنتاج القلويدات في الخلايا النباتية عند تعرضها للإجهاد الذي يتمثل بإضافة عدة محفزات او بوادئ مثل المركبات العضوية والأملاح المعدنية التي تضاف إلى الاوساط الغذائية او رشها على النبات والتي تعمل بدورها على سرعة عملية السحب والامتصاص لمنتجات تمثيل القلويدات، فضلا عن إسهامها في بناء المواد الفعالة (ابو زيد، 2006 ؛ PKaruppusamy، 2009). واشارت العديد من الدراسات إلى امكانية تحفيز انتاج المركبات الثانوية عند تعريضها للإجهاد، ويحتل نبات عين البزون أهمية طبية كبيرة لما يحتويه من مركبات ثانوية مهمة طبياً ولكن انتاجها قليل مقارنة بالحاجة الفعلية لهذه المركبات طبياً. أجريت هذه التجربة التي تهدف إلى حث أوراق النبات على زيادة إنتاج مركبات الأيض الثانوي وذلك عن طريق رش النبات بتراكيز مختلفة من الكاربوليزر والكشف كماً ونوعاً عن هذه المركبات المنتجة عن طريق تحليل الكروماتوغرافي باستعمال جهاز HPLC لعينة أوراق النبات المجففه.

المواد وطرائق البحث

نفذت هذه الدراسة في مختبر زراعة الانسجة النباتية التابع إلى قسم البستنة وهندسة الحدائق- كلية الزراعة – جامعة ديالى للفترة من ايار لغاية تشرين الاول 2015، فيما اجريت التحليلات المختبرية المتضمنة تقدير القلويدات في شركة الحقول البيضاء للاستشارات البيئة والهندسية/ الحارثية - بغداد،

استلام البحث: 2016/6/19
قبول النشر: 2017/2/9

واستعملت بذور نبات عين البزون صنف Pacifica Mix تم الحصول عليها من شركة إنتاج البذور الأمريكية Pan American Seed.

اختبار تأثير رش الكاربوليزر في انتاج القلويدات

تم رش المجموع الخضري لنباتات عين البزون بمادة الكاربوليزر (Carbolizer) باستخدام ثلاثة تراكيز هي 0 و 2.5 و3.5 مل لتر$^{-1}$ ولرشتين، نُفذت الرشة الأولى بتاريخ 2015/9/16 والثانية بتاريخ 2015/10/7 بعد مرور ثلاثة أسابيع من الرشة الأولى، وأضيفت مادة المحلول المنظف الزاهي بتركيز 1 مل لتر$^{-1}$ من محلول الرش كمادة ناشرة (الشيخ، 2004)، ورشت النباتات لحد البلل الكامل وذلك في الصباح الباكر، لأن الثغور الموجودة في الأوراق تكون مفتوحة، والذائبات تكون منخفضة التركيز، مما يسهل عملية امتصاص المادة المضافة من خلال الورقة (الصحاف، 1989)، أما بالنسبة لنباتات المقارنة فتم رشها بالماء المقطر المحتوي على مادة ناشرة بالتركيز نفسة، واستعملت خطوط حارسة بين الوحدات التجريبية لمنع تأثير تركيز المعاملة على المعاملات الاخرى.

الاستخلاص والتقدير الكمي والنوعي للمركبات الفعالة من اوراق نبات عين البزون

لغرض استخلاص القلويدات تم اتباع طريقة Fansong Mu وآخرون (2012)، وذلك بأخذ وزن 6 ملغم من أوراق النبات الجافة ومزجها مع 200 مليلتر من محلول الايثانول 80%، ثم اجراء عملية الاستخلاص بالحمام فوق الصوتي عند تردد 40 ميغاهيرتزاً وقدرة ادخال قصوى 250 واطاً بدرجة حرارة 45 مئوية ولمدة 30 دقيقة، وتم دمج المحاليل المستخلصة بعد كل عملية استخلاص وتجفيفها باستخدام مبخر دوار من نوع Shimadzu بدرجة حرارة 45 مئوية، وأضيف الميثانول النقي الخاص لتحليل HPLC بحجم مليلتر واحد للبقايا المستخلصة من المبخر الدوار، ثم حقن 50 مايكرولترا في عملية عزل عالية الاداء. حقن المحلول القياسي في جهاز HPLC نوع Liquid Chromatography Shimadzu لغرض تحديد زمن الاحتجاز (Retention time) وارتفاع حزمة العينة Area لكل من المحلول القياسي للمواد الفعالة الذي فصل على عمود (Column) هو من نوع Zorbax EC model XDBC-18,3 um particle size (50x4.6mmI.D). الطور المتحرك (Mobile phase) للمركبين Vincristine و Vinblastine مزيج يتكون من 14 مايكرومول محلول دارئ من الفوسفات ذو أس هيدروجيني 7.2 : acetonitrile وبنسبة 4:1 (ح/ح) وكانت سرعة الجريان (Flow rate) للجهاز 1.8 مل دقيقة$^{-1}$ وقيست القراءات على طول موجي قدره 220 نانومتراً وبدرجة حرارة 25 ْم. سجلت القراءات على الاطوال الموجبة وحسب زمن الاحتجاز للمحاليل القياسية والعينات المدروسة، وقدرت تراكيز المواد الفعالة كمياً بمقارنة مساحة حزمة المادة القياسية مع مساحة حزمة العينة تحت نفس الظروف اعتمادا على القانون الآتي:

$$\text{تركيز النموذج} = \frac{\text{مساحة النموذج}}{\text{مساحة المحلول القياسي}} \times \text{تركيز المحلول القياسي} \times \text{عدد مرات التخفيف}$$

التصميم التجريبي والتحليل الإحصائي

حللت جميع البيانات احصائيا باستعمال التصميم العشوائي الكامل CRD لتجارب ذات عامل واحد Completely Randomized Design (CRD) باستخدام البرنامج الإحصائي (SAS، 2004) وتمت مقارنة المتوسطات وفق اختبار دنكن المتعدد الحدود تحت مستوى احتمال 0.05.

النتائج والمناقشة

تأثير رش النبات بالكاربوليزر في إنتاج القلويدات من أوراق نبات عين البزون

يتضح من الجدول 1 والأشكال 1 و2 و3 وجود فروق معنوية عند معاملة الرش بالكاربوليزرعلى نباتات المقارنة، إذ أعطت معاملة الرش بالكاربوليزر بتركيز 2.5 مل لتر$^{-1}$ أعلى كمية لمركب Vindoline بلغت 251.35 مايكروغرام مل$^{-1}$ وزن جاف والتي لم تختلف معنوياً عن معاملة 3.5 مل لتر$^{-1}$ في كمية المركب إذ بلغت 151.35 مايكروغرام مل$^{-1}$ وزن جاف، في حين بلغت اقل كمية لمركب Vindoline لمعاملة المقارنة 24.37 مايكروغرام مل$^{-1}$ وزن جاف.

يتضح من الجدول نفسه أن أعلى كمية لمركب Catharanthine قد حصلت عند رش النباتات بالكاربوليزر بتركيز 2.5 مل لتر$^{-1}$ إذ بلغت قيمة المركب 528.2 مايكروغرام مل$^{-1}$ وزن جاف، وسجلت معاملة الرش بالكاربوليزر بتركيز3.5 مل لتر$^{-1}$ كميه من Catharanthine بلغت 511.3 مايكروغرام مل$^{-1}$ وزن جاف، في حين كانت معاملة المقارنة 44.9 مايكروغرام مل$^{-1}$ وزن جاف.

إن أعلى استجابة حدثت لزيادة مركب Vincristineعند تركيز 3.5 مل لتر$^{-1}$ من الكاربوليزر فبلغت كمية هذا المركب 162.34 مايكروغرام مل$^{-1}$ وزن جاف والتي لم تختلف معنوياً عن معاملة الرش بتركيز 2.5 مل لتر$^{-1}$ التي أعطت كمية بلغت 109.41 مايكروغرام مل$^{-1}$ وزن جاف، واقل قيمة للمركب كانت في معاملة المقارنة 44.9 مايكروغرام مل$^{-1}$ وزن جاف. سجلت معاملة الرش بالكاربوليزر فروقاً معنويةً في زيادة انتاج مركب Vinblastine إذ أعطى تركيز 3.5 مل لتر$^{-1}$ أعلى قيمة Vinblastine بلغت 734.22 مايكروغرام مل$^{-1}$ وزن جاف والتي اختلفت معنوياً عن التركيز 2.5 مل لتر$^{-1}$ إذ بلغت القيمة 350.58 مايكروغرام مل$^{-1}$ وزن جاف، في حين أقل قيمة حصلت في معاملة المقارنة 73.47 مايكروغرام مل$^{-1}$ وزن جاف.

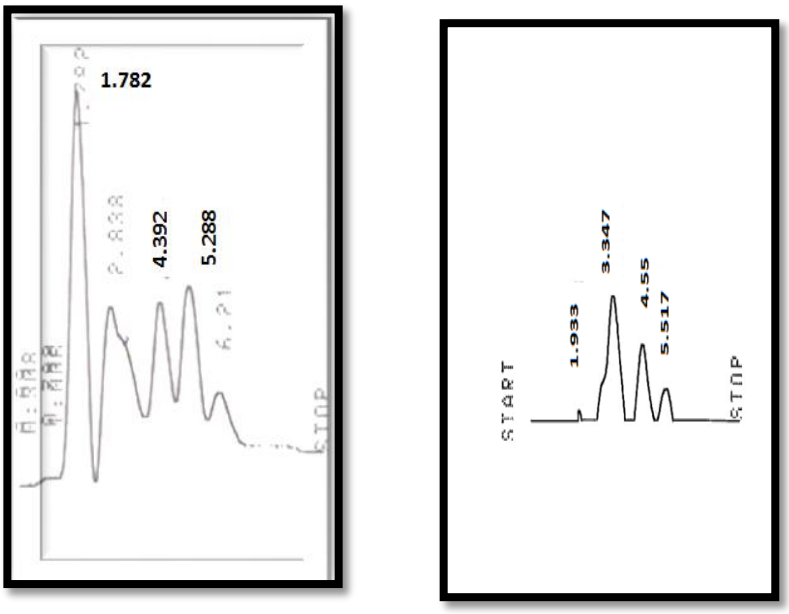
الجدول 1. تأثير رش الكاربوليزرفي إنتاج المركبات الثانوية (مايكروغرام مل$^{-1}$ وزن جاف) من أوراق نبات عين البزون *Catharanthus roseus*

الكاربوليزر Carbolizer مل لتر$^{-1}$	المركبات الثانوية							
	Vindoline		Catharanthine		Vincristine		Vinblastine	
	المتوسط	العكرر ثا	المتوسط	العكرر ثا	المتوسط	العكرر ثا	المتوسط	العكرر ثا
0	24.37 a	33.475	44.9 A	0	19.90 b	14.747	73.47 c	27.789
		15.270		89.709		25.059		119.154
2.5	251.35 a	358.957	528.2 A	811.308	109.41 a	79.668	350.58b	296.628
		143.742		246.386		139.149		404.537
3.5	151.35 a	151.573	511.3 A	464.984	162.34 a	155.592	734.22 a	732.290
		151.136		557.529		169.080		736.158

-الاحرف المتشابهة لا تختلف معنوياً بحسب اختبار دنكن 0.05

إن نمو النبات وتطوره نتيجة عملية الاغناء بغاز ثنائي اوكسيد الكاربون كان نتيجة للأهمية التي يتميز بها هذا الغاز في أيض النبات وتأخذه النباتات من الجو الخارجي ويختزل بصورة كاربون، وهذا لا يمثل فقط عملية اكتساب النبات للطاقة لكنها تؤدي إلى تجهيز النبات بالهياكل الكربونية للجزيئات العضوية والتي تعتبر الدعامة التركيبية للنبات بشكل عام اذ يتم تمثيل الكربون والهيدروجين والاوكسجين

إلى جزيئات عضوية عن طريق عملية البناء الضوئي (Marschner، 2002)، واكد Poorter وPerez-Soba (2002) ان الاغناء بغاز ثنائي اوكسيد الكاربون بشكل عام يمتلك تأثيرات فسلجيه مهمه أحدها هو زيادة في معدل التمثيل الضوئي للأوراق بسبب زيادة تركيز هذا الغاز عند مواقع وجود الانزيم الذي يعمل على تثبيت هذا الغاز، والاخر هو ان التراكيز المرتفعة من غاز ثنائي اوكسيد الكاربون تتسبب في غلق الثغور بشكل جزئي الامر الذي يقلل من فقدان الماء عن طريق النتح، فضلاً عن حدوث تغيرات فسلجية مهمة تحت ظروف الاغناء بغاز ثنائي اوكسيد الكاربون ومنها انخفاض معدل التنفس ومن ثم فإن التركيب الكيميائي للنبات والتركيب التشريحي والمورفولوجي للورقة سوف يتغير.

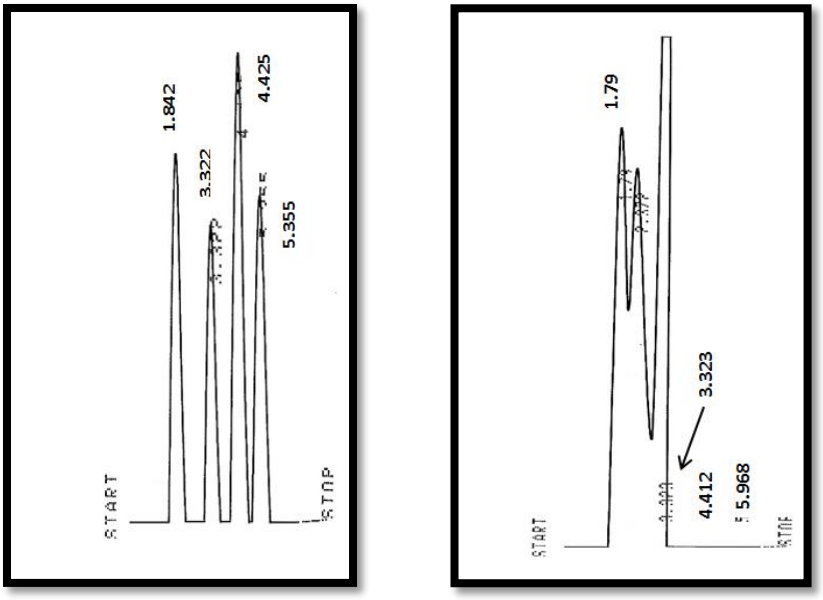


(المكرر الثاني) **(المكرر الاول)**

الشكل 1. منحنيات القلويدات المفصولة من أوراق نبات عين البزون صنف MixPacifica

الجدول 2. المساحة وزمن الاحتجاز للمركبات الثانوية لأوراق نبات عين البزون صنف MixPacifica في جهاز HPLC

Seq	Compound	Retention Time minute المكررات		Area المكررات		Concentration ml^{-1} µg المكررات		Dilution Factor المكررات	
		الاول	الثاني	الاول	الثاني	الاول	الثاني	الاول	الثاني
1	Vindoline	1.933	1.782	23111	50661	25 µg ml^{-1} each		6	5
2	Catharanthine	3.347	_	73282	_				
3	Vincristine	4.55	4.392	45947	27037				
4	Vinblastine	5.517	5.288	61899	12464				

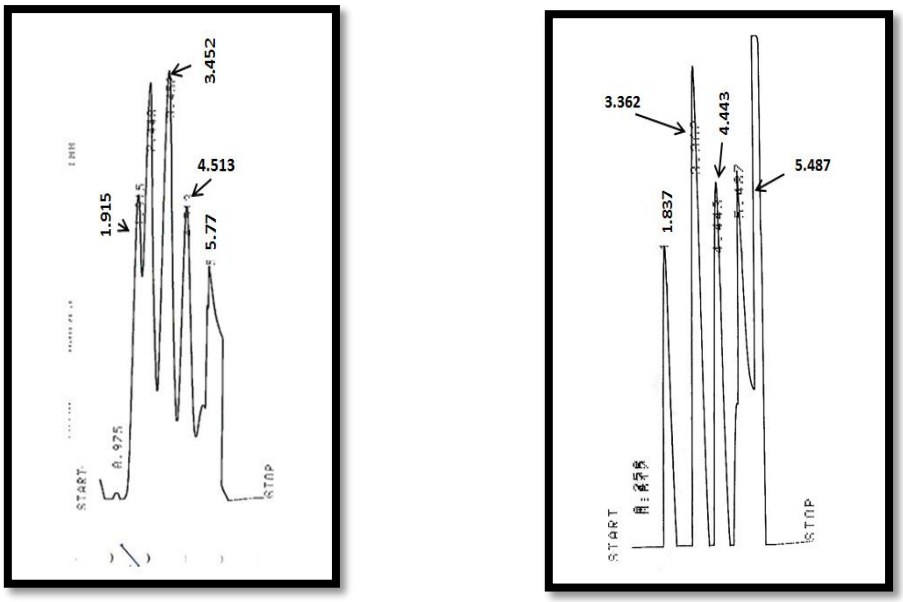


(المكرر الاول) (المكرر الثاني)

الشكل 2. منحنيات القلويدات المفصولة من أوراق نبات عين البزون صنف MixPacifica والمعاملة بالـCarbolizer بتركيز 2.5 مل لتر$^{-1}$

الجدول 3. المساحة وزمن الاحتجاز لـ Carbolizer بتركيز 2.5 مل لتر$^{-1}$ لإنتاج المركبات الثانوية من أوراق نبات عين البزون صنف MixPacifica في جهاز HPLC

seq	Compound	Retention Time minute المكررات		Area المكررات		Concentration µg ml^{-1} المكررات		Dilution Factor المكررات	
		الاول	الثاني	الاول	الثاني	الاول	الثاني	الاول	الثاني
1	Vindoline	1.79	1.842	217300	87016	25 µg ml^{-1} each		15	
2	Catharanthine	3.323	3.322	265100	80508				
3	Vincristine	4.412	4.425	58428	10205				
4	Vinblastine	5.968	5.355	61638	84061				

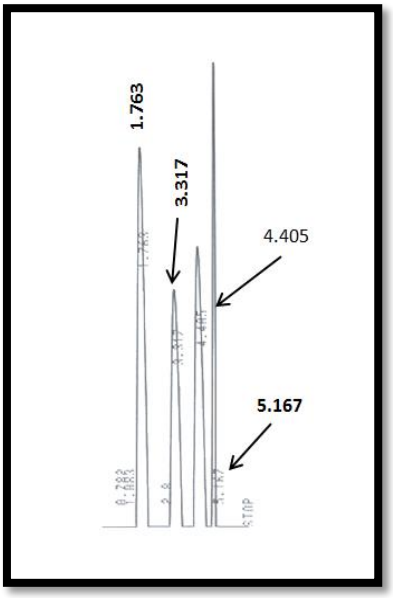


(المكرر الاول) **(المكرر الثاني)**

الشكل 3. منحنيات القلويدات المفصولة من أوراق نبات عين البزون صنف Mix Pacifica والمعاملة Carbolizer بتركيز 3.5 مل لتر$^{-1}$

الجدول 4. المساحة وزمن الاحتجاز لـ Carbolizer بالتركيز 3.5 مل لتر$^{-1}$ لإنتاج المركبات الثانوية من أوراق نبات عين البزون صنف Mix Pacifica في جهاز HPLC

seq	Compound	Retention Time minute المكررات		Area المكررات		Concentration µg ml^{-1} المكررات		Dilution Factor المكررات	
		الاول	الثاني	الاول	الثاني	الاول	الثاني	الاول	الثاني
1	Vindoline	1.837	1.915	91757	68619	25 µg ml^{-1} each		15	20
2	Catharanthine	3.362	3.452	151936	136632				
3	Vincristine	4.443	4.513	114110	93002				
4	Vinblastine	5.487	5.77	152167	114728				

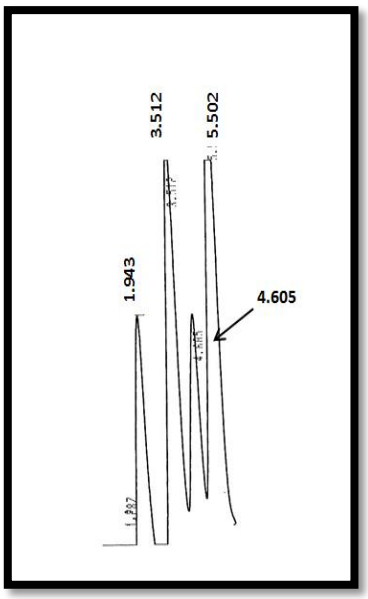


Peak table of standard

الشكل 4. المنحنى القياسي في إنتاج المركبات الثانوية من الأوراق

الجدول 5. المساحة وزمن الاحتجاز لإنتاج المركبات الثانوية من الأوراق المستخدمة في التجربة في جهاز HPLC

Seq	Compound	Retention Time minute	Area	Concentration µg/ml	Dilution Factor
1	Vindoline	1.763	227012		
2	Catharanthine	3.317	245067		
3	Vincristine	4.405	275023		
4	Vinblastine	5.167	155847		



Peak table of standard

الشكل 5. المنحنى القياسي في إنتاج المركبات الثانوية من الاوراق

الجدول 6. المساحة وزمن الاحتجاز لإنتاج المركبات الثانوية من الأوراق المستخدمة في التجربة في جهاز HPLC

Seq	Compound	Retention Time minute	Area	Concentration µg ml^{-1}	Dilution Factor
1	Vindoline	1.943	110189		
2	Catharanthine	3.512	176.014		
3	Vincristine	4.605	87010		
4	Vinblastine	5.502	184942		

المصادر

ابو زيد، الشحات نصر. 2006. فسيولوجيا وكيمياء القلويدات في النباتات الطبية وأهميتها الدوائية والعلاجية. دار الكتب العلمية للنشر والتوزيع. القاهرة.

الشماع، علي عبد الحسين. 1989. العقاقير وكيمياء النباتات الطبية. دار الكتب للطباعة والنشر. الموصل. جمهورية العراق.

الصحاف، فاضل حسين. 1989. تغذية النبات التطبيقي. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. العراق. 259 صفحة.

الشيخ، ورقاء محمد شريف. 2004. تأثير عدد الريات والرش بمستخلص الكجرات في نمو وحاصل نبات الماش. رسالة ماجستير. كلية العلوم. جامعة بابل. العراق.

Davuluri, G. R., T. A.,Van and P. D., Fraser. 2005. Fruit specific RNAi-mediated suppression of DETI enhances carotenoid and flavonoid content in tomatoes. *Nature Biotechnology*. 23(7): 890-895.

Ferreres, F. D. M. Pereira. P. C. Valent. P. B. Andrade. R. M. Seabra and M. S. mayor. 2008. New Phenolic Compounds and Antioxidant Potential of *Catharanthus roseus*. J. Agric. Food Chem. American Chemical Society, 56 (21): 9967–9974.

Fansong Mu, Liuqing Yang, Wei Wang, Luo. Meng, Fu. Yujie, Xiaorui Guo and Zu. Yuangany. 2012. Negative–Pressure Cavitation Extraction of Four Main Vinca Alkaloids from Catharanthus roseus Leaves., Molecules (17): 8742-8752.

Karuppusamy, S. 2009. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, *organ and cell Culture. J. Med. P. Res.,* 3: 1222-1239.

Leveque, D.; J.Wihlm and F. Jehl. 1996. Pharmacology of Catharanthus alkaloids. Bull. Cancer, 83:176-186.

Marschner, H. 2002. Mineral Nutrition of higher Plants, 2nd ed. London, UK: Academic Press.

Poorter, H. and M. Perez-Soba. 2002. Plant growth at elevated CO_2, the Earth System, biological dimensions of global environmental change. 2, 489 – 496.

SAS. 2004. SAS/STAT Users Guide for personal computer, SAS Institute Inc, Cary, N.C. USA.

Van der Heijden, R.; D. I. Jacobs; W. Snoeijer; D. Hallard and R. Verport 2004. The Catharanthus alkaloids: Pharmacognosy and biotechnology. Curr. Med. Chem., 11(5): 607-628.

EFFECT OF SPRAY WITH CARBOLIZER ON THE PRODUCTION OF INDOLE ALKALOIDS INDUCTION FROM LEAVES *Catharanthus roseus* L. D.GON CLASS MIXPACIFICA

Ekhlas Meteab Ahmed [1] ekhlas.meteab86@yahoo.com

AyadAssi Obaid [2] ayad_assi@yahoo.com

[1,2] Dept. of Horticulture and landscaping, College of Agriculture-University of Diyala-Iraq

ABSTRACT

The experiment was conducted in the lath house - College of Agriculture-University of Diyala during 2015 growth season to explain the effect of spraying with Carbolizer at concentration of 0, 2.5 and 3.5 ml l^{-1} on the indole alkaloids production. The results showed that spraying plants with Carbolizer at concentration of 2.5 ml l^{-1} gave highest contents of Vindoline and Catharanthine (251.35 and 528.2 µg ml^{-1} respectively), while spraying with Carbolizer concentration of 3.5 ml l^{-1} gave the highest quantity of Vincristine and Vinblastine (162.34 and 734.229 mg ml^{-1} respectively).

Key words: *Catharanthus roseus*, Carbolizer, Indole alkaloids.