تأثير اضافة 2,4-D وكلوريد الصوديوم والفنكرستين في محتوى كالس نبات عين البزون *Catharanthus roseus* L.G.Don وتشخيص بعض القلويدات بجهاز كروماتوكرافيا السائل ذي الاداء العالي HPLC

ايسر محمد سالم المعماري[1] بشار زكي قصاب باشي[1] اياد جاجان الداؤدي[2]

[1] كلية الزراعة والغابات /جامعة الموصل
[2] كلية التربية/جامعة الموصل

البحث مستل من اطروحة دكتوراه الباحث الاول

الخلاصة

زرعت اجزاء من الورقة والعقد والسلاميات لنبات عين البزون *Catharanthus roseus* L. في مختبر زراعة الانسجة النباتية التابع لقسم البستنة وهندسة الحدائق/ كلية الزراعة والغابات/جامعة الموصل 2014 على وسط MS الصلب المزود بـ 30غم/لتر سكروز و6 غم/لتر اكار باضافة تراكيز مختلفة من 2,4-D (0.0 و0.25 و0.50 و0.75 و1.0) ملغم.لتر$^{-1}$ بهدف استحداث الكالس واخذت البيانات بعد 28 يوم من الزراعة ، وتم الحصول على اعلى وزن رطب للكالس 1.749غم 1.700غم 1.732غم لكل من اجزاء الاوراق والعقد والسلاميات على التوالي من معاملة 0.75 ملغم.لتر$^{-1}$ D-2,4 ، تم زراعة اجزاء من الورقة على وسط MS المزود بتراكيز مختلفة من NaCl (0.0 و0.25 و0.50 و0.75 و1.0) ملغم.لتر$^{-1}$ مع 0.75 ملغم.لتر$^{-1}$ D- 2,4، كما اضيفت تراكيز مختلفة من الفنكرستين على وسط MS الصلب (0.0 و0.12 و0.25 و0.50) ملغم.لتر$^{-1}$ مع 0.75 ملغم/ لتر$^{-1}$، بهدف استحداث وتنمية الكالس، واخذت البيانات بعد 28 يوم من الزراعة تم تشخيص وتقدير، Vinblastine,Vincristine ,Vindoline, Ajmalicine في الكالس الناتج باستعمال كروماتوكرافيا السائل فائق الأداء (HPLC)، تشير النتائج الحصول على اعلى وزن رطب للكالس واعلى نسبة بروتين، 0.659غم ، 11.27% من معاملة 1.0ملغم.لتر$^{-1}$ NaCl مع 0.75 ملغم.لتر$^{-1}$ 2,4-D ، ان عينة مستخلص كالس معاملة 0.25 ملغم.لتر$^{-1}$ كلوريد الصوديوم مع 0.75 ملغم.لتر$^{-1}$ 2,4-D اعطت اعلى قيمة امتصاص للـVinblastine عند زمن الاحتباس (11.229) وكانت مساحتها تحت المنحني (2603302)، اما معاملة 1.0ملغم.لتر$^{-1}$ كلوريد الصوديوم مع 0.75 ملغم.لتر$^{-1}$ 2,4-D اعطت اعلى قيمة امتصاص للـVincristine عند زمن الاحتباس (18.456) وكانت مساحتها تحت المنحني (31961)، اما معاملة 0.0 ملغم.لتر$^{-1}$ كلوريد الصوديوم مع 0.75 ملغم.لتر$^{-1}$ 2,4-D اعطت اعلى قيمة امتصاص للـVindoline عند زمن الاحتباس (20.042) وكانت مساحتها تحت المنحني (38995)، اما معاملة 0.25 ملغم.لتر$^{-1}$ كلوريد الصوديوم مع 0.75 ملغم.لتر$^{-1}$ 2,4-D اعطت اعلى قيمة امتصاص للـAjmalicine عند زمن الاحتباس (31.105) وكانت مساحتها تحت المنحني (54682). كما اعطت معاملة 0.50 ملغم.لتر$^{-1}$ فنكرستين مع 0.75 ملغم.لتر$^{-1}$ 2,4-D اعلى وزن رطب واعلى نسبة بروتين، 2.324 ملغم.لتر$^{-1}$ ،14.92% على التوالي. ان عينة مستخلص كالس معاملة 0.5 ملغم.لتر$^{-1}$ فنكرستين مع 0.75ملغم.لتر$^{-1}$ 2,4-D اعطت اعلى قيمة امتصاص للـVinblastine عند زمن الاحتباس (12.537) وكانت مساحتها تحت المنحني (1491696) اما معاملة 0.25 ملغم.لتر$^{-1}$ فنكرستين مع 0.75 ملغم.لتر$^{-1}$ 2,4-D اعطت اعلى قيمة امتصاص للـVincristine عند زمن الاحتباس (18.726) وكانت مساحتها تحت المنحني (329765)، اما معاملة 0.0 ملغم.لتر$^{-1}$ فنكرستين مع 0.75 ملغم.لتر$^{-1}$ 2,4-D اعطت اعلى قيمة امتصاص للـVindoline عند زمن الاحتباس (20.042) وكانت مساحتها تحت المنحني (38995) ، اما معاملة 0.25 ملغم.لتر$^{-1}$ فنكرستين مع 0.75 ملغم.لتر$^{-1}$ 2,4-D اعطت قيمة امتصاص للـAjmalicine عند زمن الاحتباس (30.396) وكانت مساحتها تحت المنحني (104565).

الكلمات المفتاحية: نباتات عين البزون ، كلوريد الصوديوم، الفنكرستين، 2,4-D

Effect of addition 2,4-D , NaCl and Vincristine on Callus content of *Catharanthus roseus* L. for Identification some alkaloids by HPLC

Aysar M. S. Almemary[1] Bashar Z. Kassab Bashi[1] Ayad Chachan Aldaoody[2]

[1] College of Agriculture & Forestry - Mosul University
[2] College of Education – Mosul Iraq

Abstract

Parts of leaf, nodes, and internodes of *Catharanthus roseus* were cultured in plant tissue culture Laboratory/ Department of Horticulture/ University of Mosul 2014 on MS medium supplemented with 30 mg.L-1sucrose , 6 mg.L^{-1}agar in addition to at 2,4-D (0.0 , 0.25 , 0.5 ,0.75, 1.0) mg.L^{-1} for callus initiation data were ,taken after 28 day from culture, highest fresh weight of callus 1.749g , 1.700g and 1.732g achieved from cultured parts of leaves, nodes, and internodes respectively on MS medium supplemented with 0.75 mg.L^{-1} 2,4-D ,Parts of leaf were cultured on MS medium supplemented with NaCl (0.0 , 0.25 , 0.5 ,0.75, 1.0) mg.L^{-1} with 0.75 mg.L^{-1} 2,4-D ,Parts of leaf were cultured on MS medium supplemented with vincristine (0.0 , 0..12,0.25 ,0.50) mg.L^{-1} with 0.75 mg.L^{-1} 2,4-D for callus initiation and growth, Vinblastine, Vincristine, Vindoline, Ajmalicine were identificated and determinated on calli using HPLC. Data refers that highest fresh weight of callus and highest protein percentage ، 0.659 g , 11.27% respectively was obtained from cultured part of leaf on MS medium supplemented with 1.0mg.L^{-1} NaCl with 0.75 mg.L^{-1} 2,4-D, treatment 0.25 mg.L^{-1} NaCl with 0.75 mg.L^{-1} 2,4-D gave highest absorption value for vinblastine at retention time 11.229 with detected area (2603302), treatment 1.0 mg.L^{-1} NaCl with 0.75 mg.L^{-1} 2,4-D gave highest absorption value for vincristine at retention time 18.456 with detected area (31961), treatment 0.0 mg.L^{-1} NaCl with 0.75 mg.L^{-1} 2,4-D gave highest absorption value for vindoline at retention time 20.042 with detected area (38995), treatment 0.25 mg.L^{-1} NaCl with 0.75 mg.L^{-1} 2,4-D gave highest absorption value for ajmalicine at retention time 31.105 with detected area (54682), treatment 0.50 mg.L^{-1} vincristine with 0.75 mg.L^{-1} 2,4-D gave highest fresh weight of callus and highest protein percentage 3.324 g , 14.92% respectively, this treatment gave highest absorption value for vincristine at retention time 12.537 with detected area (1491696), treatment 0.25 mg.L^{-1} vincristine with 0.75 mg.L^{-1} 2,4-D gave highest absorption value for vincristine at retention time 18.726 with detected area (329765), treatment 0.0 mg.L^{-1} vincristine with 0.75 mg.L^{-1} 2,4-D gave highest absorption value for vindoline at retention time 20.042 with detected area (38995), treatment 0.25 mg.L^{-1} vincristine with 0.75 mg.L^{-1} 2,4-D gave highest absorption value for ajmalicine at retention time 30.396 with detected area (104565).

Key words: *Catharanthus roseus* plants, NaCl, Vincristine, 2,4-D.

المقدمة

يعود نبات عين البزون *Catharanthus roseus* (L) G.Don والمعروف بأسم Vinca rosea الى عائلة Apocyanceae وهو نبات عشبي دائم الخضرة ذات فروع غزيرة، الازهار كبيرة والوانها عديدة ذات شكل عيني منفرد لذلك سميت بعين البزون، الثمار متجمعة بداخلها بذور لونها اسمر، وهي من النباتات القوية النمو يبلغ ارتفاع النبات(40-80) سم واحيانا يصل إلى 100 سم، يزرع في العراق لأغراض الزينة وفي احواض الزهور، يتكاثر النبات بالبذور وافضل موعد لنثر البذور في شهر مارس، ويعد احد النباتات الطبية الهامة لاحتوائه على العديد من القلويدات التي تدخل في علاج امراض القلب وضغط الدم (الشحات، 1986،2000 و الزركاني، 2003) (Gilman وHowe، 1999) كما ثبت منذ اكثر من 40 عاماً وجود مواد اخرى ذات تأثير فعال في علاج كثير من انواع الامراض السرطانية منها Vincristine وVinblastine ومركبي Ajmalicine وSerpentine التي تلعب دور في علاج مرض ارتفاع ضغط الدم Hypertension (Leveque واخرون، 1996 وVan der Heijden واخرون، 2004). وأظهرت تقانات الزراعة النسيجية في حالات كثيرة إنتاجاً عالياً من المواد الأيضية الثانوية مقارنة بالنبات الأصلي، وهذا الإنتاج يمكن أن ينظم بواسطة استخدام منظمات النمو النباتية (Umamaheswari وLalitha،2007)، وازداد الاهتمام من قبل العلماء لإنتاج مواد نباتية طبيعية عالية القيمة بتقانة الزراعة النسيجية التي يمكن أن تتغلب على العديد من المشكلات المرتبطة بإنتاج النباتات حقليا ، إذ برز دور المزارع النسيجية التي يمكن وصفها بأنها مصانع تحويل حيوي bioconversion من مركبات ذات قيمة واطئة إلى نواتج ذات قيمة عالية (Phillipson، 1990 وBhojwani وRazdan، 1996 وYong وآخرون، 2008).

يعد نسيج الكالس تجمع من خلايا برنكيمية غير متمايزة (Hartmann وآخرون، 2002) ويزداد حجم هذا الكالس ونموه وفقا لنوع منظمات النمو وكميتها الموجودة في الوسط الغذائي، وعادة يستخدم هذا النسيج في اكثار النباتات بالزراعة النسيجية من خلال تخصصه الى اعضاء بعملية يطلق عليها (Organogenesis) وذلك بزراعة هذا النسيج غير المتخصص على اوساط تحوي كلا من الاوكسينات والسايتوكينينات (الحديدي،2002 والكناني، 1987) وهناك العديد من الدراسات في مجال انشاء مزارع الكالس وتخصصه لنبات عين البزون.

تمكن Yuan واخرون (2011) الحصول على اعلى نسبة لتكوين الكالس100% من زراعة الاوراق الفلقية لنبات عين البزون على وسط MS المجهز بـ 1.0ملغم.لتر$^{-1}$ 2,4-D و1.0 ملغم.لتر$^{-1}$ NAA و0.1 ملغم.لتر$^{-1}$ TDZ. بين Vardhan واخرون (2012) ان زراعة اوراق نبات عين البزون على وسط MS المجهز بـ2.0 ملغم. لتر$^{-1}$ 2,4-D اعطى اعلى كالس بعد 6-8 يوم. وذكر Vermaوآخرون (2012) ان زراعة اجزاء من اوراق نبات عين البزون على وسط MS المجهز بـ 4.0 ملغم.لتر$^{-1}$ 2,4-D اعطت اعلى نسبة مئوية للكالس76% اما الزراعة على وسط MS المجهز بـ 1.0 ملغم.لتر$^{-1}$ BA مع 0.5 ملغم.لتر$^{-1}$ 2,4-D كونت الكالس بنسبة 78%.

يعد كلوريد الصوديوم ملحاً يزيد من سالبية الجهد الازموزي للخلية والذي يؤدي دوراً في زيادة عملية البناء الضوئي وبالتالي زيادة تصنيع مواد الأيض الثانوي، وإن تركيب الوسط الغذائي المزود بكلوريد الصوديوم له تأثيرات في نمو الخلايا وتراكم نواتج الأيض الثانوي، لكن العديد من هذه النواتج لا ترتبط بنمو الخلايا، وإن مصطلح Elicitation تعني معاملة الخلايا النباتية بمواد نازعة حية أو غير حية لعوامل إجهاد والتي تعد وسيلة فاعلة لتحسين إنتاج مواد الأيض الثانوي في زراعة الأنسجة النباتية وهذه الإستراتيجية تعمل على أساس أن هذا التراكم هو جزء من ردود فعل دفاعية للنباتات ضد الإصابات المرضية والإجهادات البيئية (Zhou وWu، 2006) وهناك العديد من التجارب بينت تأثير اضافة كلوريد الصوديوم أو بعض الاملاح الى وسط الزراعة في العمليات الحيوية اذ بين كل من Misawa وGoodbody (1996) وData وSrivastava (1997) وVan Der Heijden وآخرون (2004) وMisra وGupta (2006) ان اضافة كلوريد الصوديوم الى الوسط الغذائي MS للمزارع النسيجية لنبات عين البزون ادى الى حصول زيادة معنوية في كمية مركبي Vincristin وVinblastin مقارنة مع معاملة المقارنة، ووجد Osman وآخرون (2007) ان اضافة كلوريد الصوديوم بالتراكيز صفر و5.85 و8.77 ملغم.لتر$^{-1}$ الى المزارع النسيجية لنبات عين البزون وتعريض النبات الى ظروف جفاف (عدم الري) على ثلاث فترات صفر و2 و3 أسبوع ادى الى زيادة محتوى الفروع من مركب Vincristinعند التركيز 8.77 ملغم.لتر$^{-1}$، واشار الحجيمي (2010) في دراسة لانتاج مادة Vincristin وVinblastin في نبات عين البزون ان إضافة 2.925غم/لتر$^{-1}$ كلوريد الصوديوم للوسط الغذائي MS ادى إلى زيادة المادة القلويدية الاندولية ومركبي Vincristin وVinblastin في الكالس المستحدث مقارنة بمعاملة المقارنة الخالية من كلوريد الصوديوم.

عرفت في السنوات الاخيرة أهمية النباتات مصدراً للمواد الصيدلانية ويعود ذلك للعديد من العوامل من اهمها التقدم السريع في التقنات الحيوية والجزيئية حيث تم تطوير طرائق لنقل الجينات واستعمال النباتات مصدراً بديلاً في انتاج البروتينات الدوائية وبضمنها اللقاحات، الاجسام المضادة، الانزيمات، المركبات النشطة حيوياً والخالية من المسببات الفايروسية والمرضية (Sorvria واخرون، 1995) لذا تعد تقانة الزراعة النسيجية وتوليد الخلايا والاعضاء النباتية خارج الجسم الحي اداة لاغنى عنها في انتاج مواد دوائية مشتقة من النباتات وهذه الطريقة لها فوائد انتاجية كبيرة من حيث الكمية والنوعية والانتاج المسيطر عليه من دون تقيد العوامل الطبيعية مثل الموقع الجغرافي او التغيرات الموسمية او الاجهادات البيئية (Zhou وWu، 2006).

تهدف هذه الدراسة الى استحداث وتنمية الكالس من زراعة اجزاء من الاوراق أو قطع الساق الحاوية على العقدة والسلاميات لنبات عين البزون على وسط MS المزود بتراكيز مختلفة من 2,4-D وتأثير اضافة كلوريد الصوديوم والفنكرستين على كالس اوراق نبات عين البزون ومن ثم تشخيص بعض القلويدات باستخدام HPLC.

المواد وطرائق البحث

نفذت هذه التجربة في مختبر زراعة الخلايا والانسجة النباتية التابع لقسم البستنة وهندسة الحدائق/ كلية الزراعة والغابات/جامعة الموصل 2014 حيث اخذت اجزاء وسطية بطول 1.0 سم من اوراق كاملة التفتح والعقد والسلاميات واجريت عليها عملية التعقيم بالماء مضافاً له مسحوق الغسيل، ثم وضعت تحت الماء الجاري في مصفاة لمدة نصف ساعة بعدها وضعت الاجزاء في محلول حامض الاسكوربيك150 ملغم.لتر$^{-1}$ وحامض السيتريك100 ملغم.لتر$^{-1}$ مع التحريك المستمر لمدة 10 دقائق، بعدها غسلت بالماء المقطر المعقم ثم نقلت الى منضدة الزراعة وعقمت بغمرها في محلول كلوريد الزئبق 1.0 غم.لتر$^{-1}$ لمدة 10 دقائق مع التحريك المستمر ثم غسلت بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات دقيقتان لكل مرة بعدها قطعت ليصبح طولها 0.5 سم وزرعت على وسط MS الصلب (Murashige وSkoog، 1962) المزود بـ 30 غم سكروز و6 غم اكار وثبت pH الوسط عند 5.7 ± 0.1 مضافا له 2,4-D بالتراكيز(0,0 ، 25,0 ، 0,50 ، 0,75 ، 1,0) ملغم.لتر$^{-1}$ بهدف استحداث وتنمية الكالس، تم اضافة كل من كلوريد الصوديوم بالتراكيز (0.0 و0.25 و0.50 و0.75 و1.0) ملغم.لتر$^{-1}$ والفنكرستين بالتراكيز (0.0 و0.12 و0.25 و0.50) ملغم.لتر$^{-1}$ مع افضل تركيز لاستحداث الكالس من2,4-D ، حضرت العينات القياسية من Vinblastineو Vindoline وAjmalicine بإذابة 0.1 غم مادة نقية في 10 مل من محلول الكلوروفورم ثم رشحت بوساطة ورق الترشيح، وحفظت العينة في الثلاجة عند درجة حرارة 4 مْ لحين بدء التشخيص، اما تحضير العينة القياسية لمركب Vincristine اذيب0.1 غم من المادة النقية في 10 مل من الميثانول واستخدمت هذه العينات بوصفها عينة مقارنة لمستخلصات عينات كالس اوراق وعقد وسلامية نبات عين البزون.حضرت المستخلصات الكحولية للكالس الناتج وفق طريقة Azimi واخرون (2008) إذ أُخذ 3.5 غم وزن رطب لكل عينة من العينات وسحقت بالهاون الخزفي ثم أضيف إليها 100 مل من الكحول الأثيلي 70%، ثم وضعت بالفرن الكهربائي عند درجة 60 مº لمدة 10 دقائق بعدها تم ترشيح العينة، لترسيب القلويدات استخدمت طريقة Renaudin، 1984 و Miura، 1987 بتبخير المذيب بجهاز المبخر الدوار (Evaporator) عند درجة 60 مº وصولا بالحجم (20-25) مل ثم اضيف له H_2SO_4 5% مع ايثر بنسبة 50:50 v/v ثم وضع المستخلص في قمع الفصل واخذت الطبقة السفلى واضيف لها NaOH 10 عياري ثم اضيف 30 مل من الكلوروفورم الى المستخلص ووضع في قمع الفصل مع الرج اخذت الطبقة السفلى والتي هي المستخلص مع الكلوروفورم، ثم حفظت العينات في الثلاجة لحين بدء عمليات الكشف والتشخيص عن مركبات الVinblastin, Vindoline, Vincristine, Ajmalicine باستخدام جهاز HPLC.تم استخدام جهاز كروماتوكرافيا السائل فائق الأداء (HPLC) من نوع Shimadzu (DGU- 20A5) المتوفر في شركة الكندي التابعة الى وزارة الصناعة والمعادن، باستخدام عمود الفصل من نوع C18-L1,250(Marke,×150mm) USA عند طول موجي 254 نانوميتر وسرعة جريان 1 مل/دقيقة، وقطر جزيئات 5 مايكروليتر عند درجة حرارة 30 مº وطور متحرك مكون من :Acetonitrile 1:1:Amonium Carbonate 7.3 pH v/v وحقن 20 مايكروليتر من العينات المراد قياسها كل عينة على حدا وقورن كل من زمن الاحتباس ومساحة المنحني لمركبات الـــ Vinblastin, Vincristine, Vindoline, Ajmalicine للعينات القياسية مع زمن الاحتباس ومساحة المنحني للمركبات في مستخلصات العينات النباتية المذكورة. تم حساب الوزن الرطب للكالس عن طريق وزن العينة المزروع فيها الجزء النباتي بعد الزراعة ومن ثم وزن العينة بعد تكون الكالس على الجزء النباتي (بعد 50 يوم) ومثل الفرق بين القراءتين وزن الكالس، قدرت النسبة المئوية للنيتروجين في العينات المجففة للكالس باستخدام جهاز مايكروكلدال Micro-kieldahl وحسب ما ورد في A.O.A.C. (2002) لحساب نسبة البروتين في المعاملات المختلفة.

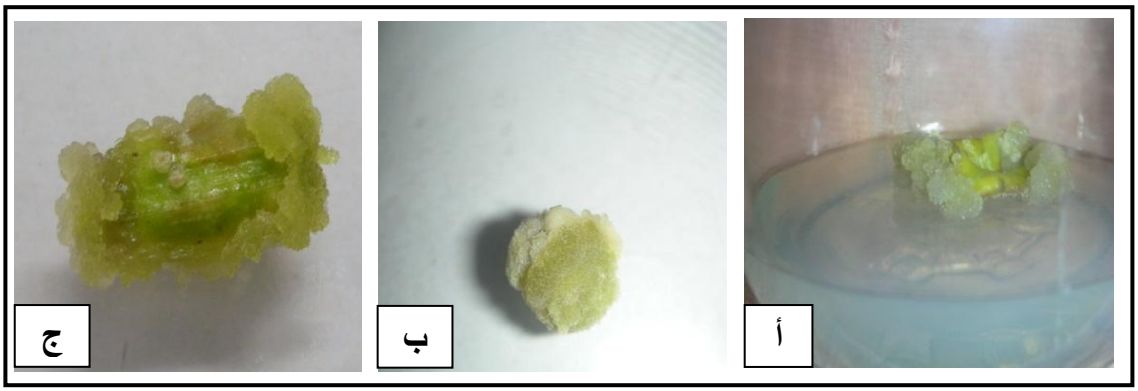
النتائج والمناقشة

يبين الجدول (1) والشكل (1) ان الأجزاء النباتية المختلفة كونت كالس ، وتم الحصول على أعلى وزن رطب للكالس من معاملة 0.75 ملغم.لتر$^{-1}$ 2,4-D اذ كانت 1.749غم من أجزاء الأوراق وهذه بدورها تفوقت معنويا على معاملة المقارنة وعلى هذا الاساس تم اعتمادها كمصدر للكالس ولبيان تأثير اضافة المواد المدروسة على محتوى الكالس للمواد الفعالة، تفسر عملية استحداث الكالس على القطعة النباتية على أساس أن القطعة النباتية تمر بتغيرات معينة عند استحداث الكالس مثل التغير في الحجم والتركيب، فضلاً عن الزيادة في بعض العمليات البنائية المهمة مثل بناء البروتين والحوامض النووية ففي مرحلة التحفيز تحدث تغيرات مهمة وأساسية في الخلايا لتعدها لعملية الانقسام، وتحدث فيها العمليات البنائية مثل بناء البروتين وانقسام الحامض النووي DNA، ومدة انجاز هذه المرحلة يعتمد بصورة رئيسة على عدة عوامل منها نوع النسيج للقطعة النباتية، الوسط الغذائي، الظروف البيئية، يتبع هذه المرحلة تغير متتابع في الفعاليات الحيوية لهذه الخلايا تنتهي بانقسامها، وتكوين كتلة من خلايا الكالس تغطي معظم أجزاء القطعة النباتية، كما يعد 2,4-D أحد الاوكسينات المهمة التي تلعب دوراً هاماً في استحداث الكالس على القطع النباتية من خلال انقسام واستطالة الخلايا وتكوين نسيج الكالس (محمد وعمر 1990).

الجدول (1): تأثير اضافة 2,4-D في استحداث الكالس من زراعة اجزاء نباتية مختلفة لنبات عين البزون *Catharanthus roseus* على وسط MS الصلب بعد 28 يوم من الزراعة.

2,4-D ملغم.لتر$^{-1}$	وزن الكالس (غم)		
	جزء من ورقة	عقد	سلامية
0.0	0.589 ج	0.465 ج	0.515 ج
0.25	1.271 ب	1.032 ب	1.246 ب
0.50	1.448 أ ب	1.300 ب	1.364 ب
0.75	1.749 أ	1.700 أ	1.732 أ
1.0	1.196 ب	1.147 ب	1.176 ب

*** الأرقام ذات الأحرف المتشابهة ضمن العمود الواحد لا تختلف معنوياً فيما بينها حسب اختبار دنكن متعدد الحدود تحت مستوى احتمال 5٪.**



الشكل (1): استحداث كالس نبات عين البزون *Catharanthus roseus* من زراعتها على وسط MS الصلب المزود بـ0.75 ملغم.لتر$^{-1}$ 2,4-D أ: ورقة ب: عقدة ج: سلامية بعد 28 يوم من الزراعة.

يبين الجدول (2) الحصول على اعلى وزن رطب للكالس 0.659 غم من زراعة اجزاء الورقة على وسط MS المزود 1.0ملغم.لتر$^{-1}$ NaCl مضافاً له 0.75 ملغم.لتر$^{-1}$ 2,4-D الشكل (2- أ) وهذه بدورها تفوقت معنويا على اغلب المعاملات عدا معاملة 0.75 ملغم.لتر$^{-1}$ NaCl مع 0.75 ملغم.لتر$^{-1}$ 2,4-D كما يبين الجدول ان معاملة 1.0ملغم.لتر$^{-1}$ NaCl مع 0.75 ملغم.لتر$^{-1}$ 2,4-D كونت اعلى نسبة بروتين 11.27٪، وقد تفسر هذه النتائج على اساس ان NaCl يؤدي دوراً في زيادة سالبية الجهد الازموزي للخلية والتي تؤثر على امتصاص العناصر الغذائية التي لها علاقة في بناء مواد الايض الثانوي، اذ يعتبر NaCl احد عوامل الاجهاد التي تعد احد الوسائل الفعالة لتحسين انتاج مواد الايض الثانوي وهذه الاستراتيجية تعمل على اساس ان التراكم هو جزء من ردود فعل دفاعية للنبات ضد اجهادات البيئة (Zhou وWu، 2006).

الجدول (2): تأثير كلوريد الصوديوم في استحداث ونمو كالس نبات عين البزون *Catharanthus roseus* من زراعة اجزاء من الورقة على وسط MS المزود بـ0.75 ملغم.لتر$^{-1}$ 2,4-D بعد 50 يوم من الزراعة.

NaCl ملغم.لتر$^{-1}$	0.0	0.25	0.50	0.75	1.0
الوزن الرطب للكالس (غم)	0.324 د	0.414 ج	0.521 ب	0.596 أ ب	0.659 أ
نسبة البروتين (٪)	7.46 د	8.67 ج د	9.86 ب ج	10.14 ب	11.27 أ

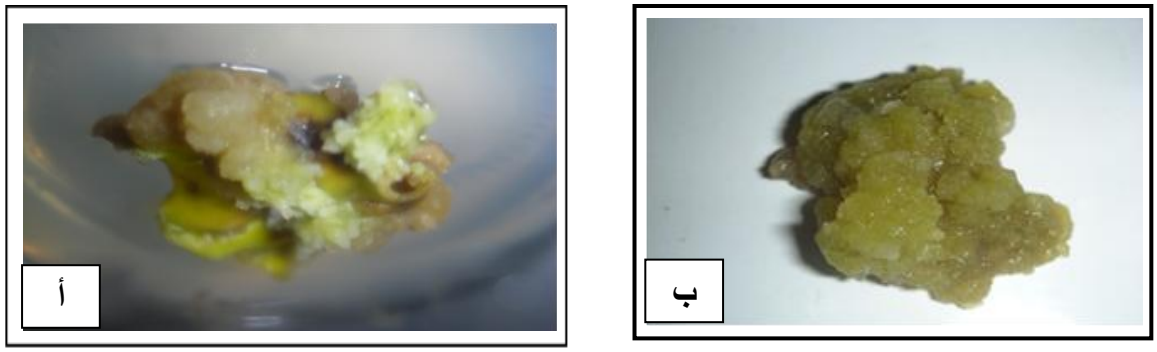
*** الأرقام ذات الأحرف المتشابهة ضمن العمود الواحد لا تختلف معنوياً فيما بينها حسب اختبار دنكن متعدد الحدود تحت مستوى احتمال 5٪.**

يبين الجدول (3) تأثير تراكيز مختلفة من الـVincristine في استحداث ونمو الكالس الناتج من زراعة اجزاء الورقة على وسط MS المزود بتراكيز مختلفة من Vincristine مع 0.75 ملغم.لتر$^{-1}$ 2,4-D ، يلاحظ ان زيادة تركيز Vinc تؤدي الى زيادة في كمية الكالس المتكون، وتم الحصول على اعلى وزن رطب للكالس 2.324 غم من زراعة اجزاء الورقة على وسط MS المزود 0.5 ملغم.لتر$^{-1}$ Vinc مضافاً له 0.75 ملغم.لتر$^{-1}$ 2,4-D الشكل (2- ب) وهذه بدورها تفوقت على جميع المعاملات عدا معاملة 0.25 ملغم.لتر$^{-1}$ Vinc مع 0.75 ملغم.لتر$^{-1}$2,4-D كما ان نفس المعاملة السابقة الذكر كونت اعلى نسبة مئوية للبروتين 14.92٪، وقد تفسر هذه النتائج على اساس ان عملية تصنيع Vincristine للاجزاء النباتية تحتاج الى طاقة وانزيمات ومركبات بادئة لتخليق Vincristine وبما انه تم اضافة Vincristine خارجيا ربما استخدم النبات المواد اللازمة لتخليق Vincristine في عمليات البناء الحيوي الأخرى وانعكس ذلك على نمو الكالس المستحدث او ربما قد تكون مادة الـVincristine سلكت سلوك منظم نمو وزادت كمية الكالس المتكون. (دلالي، باسل كامل 1994).

الجدول (3): تأثير الفنكرستين في استحداث ونمو كالس نبات عين البزون *Catharanthus roseus* من زراعة اجزاء من الورقة على وسط MS المزود بـ0.75 ملغم.لتر$^{-1}$ 2,4-D بعد 60 يوم من الزراعة.

Vinc (ملغم.لتر$^{-1}$)	0.0	0.12	0.25	0.50
الوزن الرطب للكالس (غم)	0.324 ج	1.524 ب	2.148 أ	2.324 أ
نسبة البروتين ٪	7.46 ج	12.25 ب	14.87 أ	14.92 أ

*** الأرقام ذات الأحرف المتشابهة ضمن العمود الواحد لا تختلف معنوياً فيما بينها حسب اختبار دنكن متعدد الحدود تحت مستوى احتمال 5٪.**

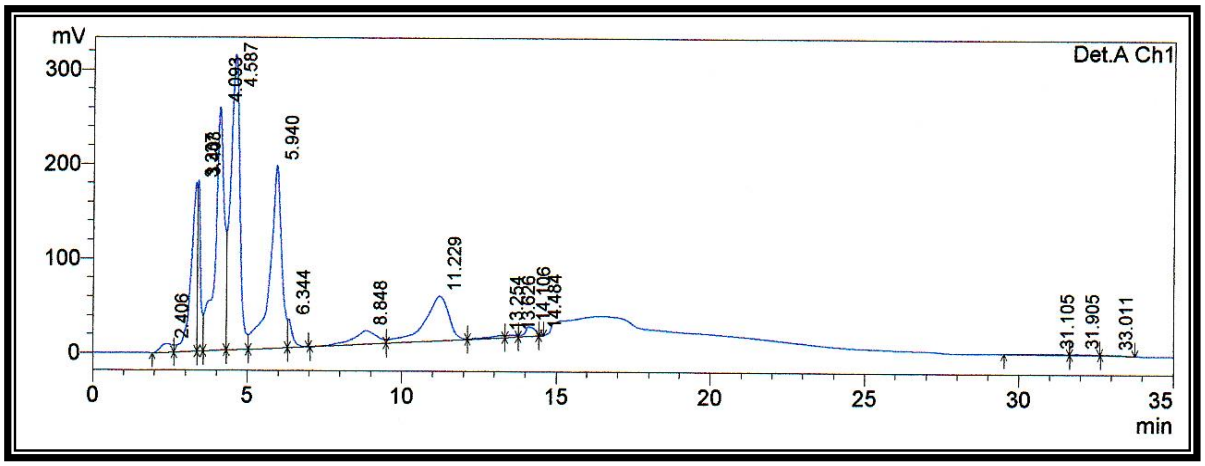


الشكل (2) أ: الكالس المتكون من زراعة اجزاء ورقة نبات عين البزون *Catharanthus roseus* على وسط MS المجهز بـ1.0 ملغم.لتر$^{-1}$ NaCl مع 0.75 ملغم.لتر$^{-1}$ 2,4-D ب: على وسط MS المجهز بـ 0.5 ملغم.لتر$^{-1}$ Vincristine مع 0.75 ملغم.لتر$^{-1}$ 2,4-D

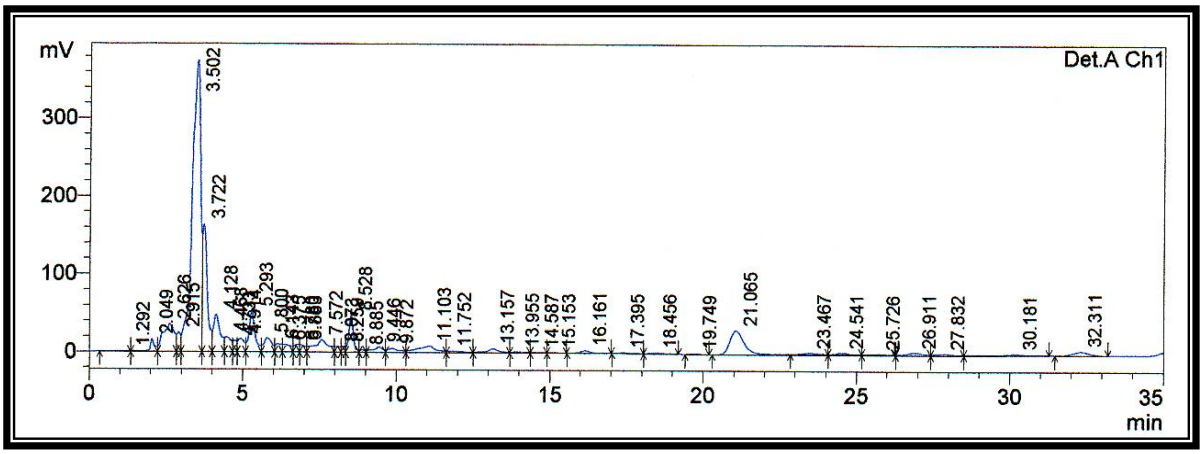
يبين الجدول (4) زمن الاحتباس والمساحة تحت المنحني لمركبات Vinblastine وVindoline وVincristine وAjmalicine في عينات مستخلصات كالس اوراق نبات عين البزون *Catharanthus roseus* النامي على وسط MS المجهز بتراكيز مختلفة من كلوريد الصوديوم مع 0.75 ملغم.لتر$^{-1}$ 2,4-D اذ يتضح ان عينة مستخلص كالس معاملة 0.25 ملغم.لتر$^{-1}$ كلوريد الصوديوم مع 0.75 ملغم.لتر$^{-1}$ 2,4-D اعطت اعلى قيمة امتصاص للـVinblastine عند زمن الاحتباس (11.229) وكانت مساحتها تحت المنحني (2603302) الشكل (4)، اما معاملة 1.0ملغم.لتر$^{-1}$ كلوريد الصوديوم مع 0.75 ملغم.لتر$^{-1}$ 2,4-D اعطت اعلى قيمة امتصاص للـVincristine عند زمن الاحتباس (18.456) وكانت مساحتها تحت المنحني (31961) ، اما معاملة 0.0 ملغم.لتر$^{-1}$ كلوريد الصوديوم مع 0.75 ملغم.لتر$^{-1}$ 2,4-D اعطت ا على قيمة امتصاص للـVindoline عند زمن الاحتباس (20.042) وكانت مساحتها تحت المنحني (38995) ، اما معاملة 0.25 ملغم.لتر$^{-1}$ كلوريد الصوديوم مع 0.75 ملغم.لتر$^{-1}$ 2,4-D اعطت اعلى قيمة امتصاص للـAjmalicine عند زمن الاحتباس (31.105) وكانت مساحتها تحت المنحني (54682) الشكل (5). وهذا يتوافق مع Misawa وGoodbody (1996) وData وSrivastava (1997) وVan der Heijden واخرون (2004) وMisra وGupta (2006).

الجدول (4): زمن الإحتباس (دقيقة) والمساحة تحت المنحني للمركبات القلويدية المفصولة من مستخلصات كالس اوراق نبات عين البزون *Catharanthus roseus* النامية على وسط MS المزود بـNaCl بعد 50 يوم من الزراعة.

Ajmalicine		Vindoline		Vincristine		Vinblastine		2,4-D ملغم/ لتر	NaCl ملغم/ لتر
المساحة تحت المنحني	زمن الاحتباس (دقيقة) R.t	المساحة تحت المنحني	زمن الاحتباس (دقيقة) R.t	المساحة تحت المنحني	زمن الاحتباس (دقيقة) R.t	المساحة تحت المنحني	زمن الاحتباس (دقيقة) R.t		
1109	32.367	38995	20.042					0.75	0.0
54682	31.105					2603302	11.229		0.25
						385083	11.096		0.5
12512	30.571			4240	19.177				0.75
83358	30.181	1160476	21.065	31961	18.456	352303	11.103		1.0
47578681	31.378	98833026	20.013	2095603	18.882	15153803	12.921	العينة القياسية	



الشكل (4): زمن الاحتباس (دقيقة) لمركب Vinblastine لمستخلص عينة كالس اوراق نبات عين البزون *Catharanthus roseus* النامية على وسط MS المجهز بـ0.25ملغم.لتر$^{-1}$ NaCl مع 0.75 ملغم.لتر-1 2,4-D بعد 50 يوم من الزراعة باستخدام تقانة HPLC.

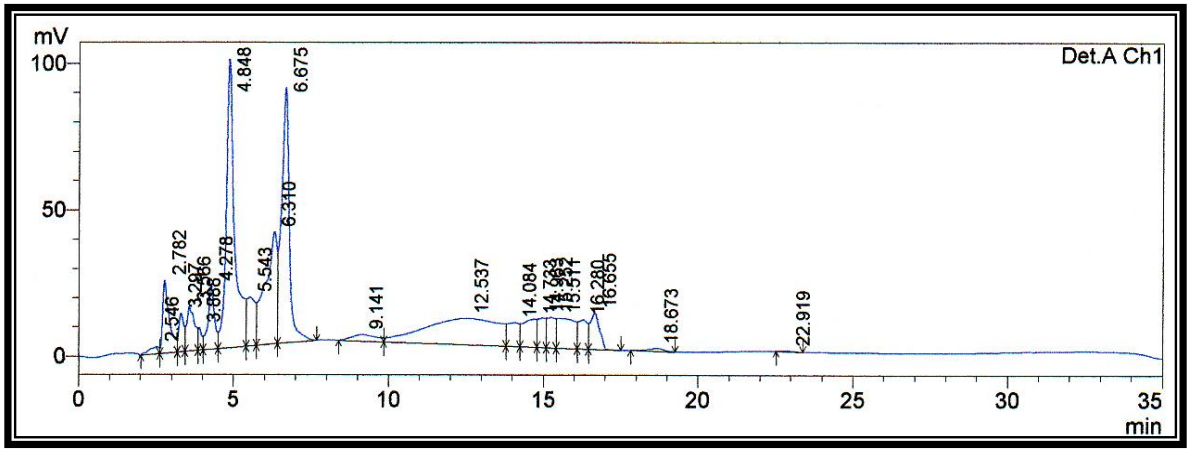


الشكل (5): زمن الاحتباس (دقيقة) لمركباتVincristineوVindolineو Ajmalicine لمستخلص عينة كالس اوراق نبات عين البزون *Catharanthus roseus* النامية على وسط MS المجهز بـ1.0 ملغم.لتر$^{-1}$ NaCl مع 0.75 ملغم.لتر-1 2,4-D بعد 50 يوم من الزراعة باستخدام تقانة HPLC.

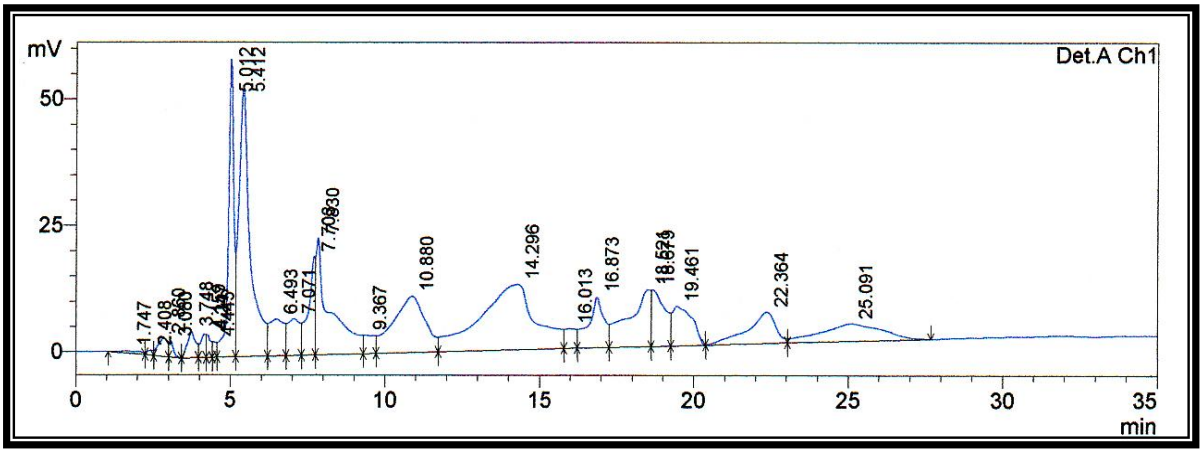
ويبين الجدول (5) زمن الاحتباس والمساحة تحت المنحني لمركبات Vinblastine وVindoline وVincristine وAjmalicine في عينات مستخلصات كالس اوراق نبات عين البزون *Catharanthus roseus* النامي على وسط MS المجهز بتراكيز مختلفة من الفنكرستين مع 0.75 ملغم.لتر$^{-1}$ 2,4-D اذ يتضح ان عينة مستخلص كالس معاملة 0.5 ملغم.لتر$^{-1}$ فنكرستين مع 0.75 ملغم.لتر$^{-1}$ 2,4-D اعطت اعلى قيمة امتصاص للـVinblastine عند زمن الاحتباس (12.537) وكانت مساحتها تحت المنحني (1491696) الشكل (6)، اما معاملة 0.12 ملغم.لتر$^{-1}$ فنكرستين مع 0.75 ملغم.لتر$^{-1}$ 2,4-D اعطت اعلى قيمة امتصاص للـVincristine عند زمن الاحتباس (18.679) وكانت مساحتها تحت المنحني (329765) اما معاملة 0.0 ملغم.لتر$^{-1}$ فنكرستين مع 0.75 ملغم.لتر$^{-1}$ 2,4-D اعطت اعلى قيمة امتصاص للـVindoline عند زمن الاحتباس (20.042) وكانت مساحتها تحت المنحني (38995) الشكل (7)، اما معاملة 0.25 ملغم.لتر$^{-1}$ فنكرستين مع 0.75 ملغم.لتر$^{-1}$ 2,4-D اعطت قيمة امتصاص للـAjmalicine عند زمن الاحتباس (30.396) وكانت مساحتها تحت المنحني (104565) الشكل (8) وقد تفسر هذه النتائج على اساس ظاهرة isomeration (التماثل الجزيئي) مابين الـVincristine والـVinblastine وتحولهما الواحد الى الاخر نتيجة المسارات الايضية الثانوية وعند اضافة احدهما بتركيز معين يزداد الاخر في العينة وهذا ما يطلق عليه بظاهرة التماثل الجزيئي (ايوب ومحمد، 1986، و دلالي، باسل كامل 1994).

الجدول (5): زمن الإحتباس (دقيقة) والمساحة تحت المنحني للمركبات القلويدية المفصولة من مستخلصات كالس اوراق نبات عين البزون *Catharanthus roseus* النامية على وسط MS المجهز بـVincristine بعد 60 يوم من الزراعة.

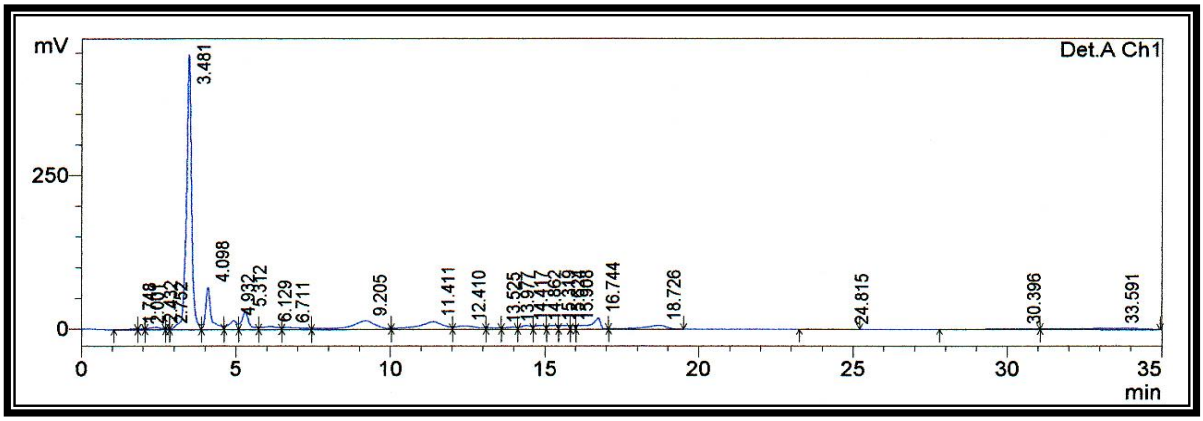
Ajmalicine		Vindoline		Vincristine		Vinblastine		2,4-D ملغم/ لتر	Vinc ملغم/ لتر
المساحة تحت المنحني	زمن الاحتباس (دقيقة) R.t	المساحة تحت المنحني	زمن الاحتباس (دقيقة) R.t	المساحة تحت المنحني	زمن الاحتباس (دقيقة) R.t	المساحة تحت المنحني	زمن الاحتباس (دقيقة) R.t		
1109	32.367	38995	20.042					0.75	0.0
		397803	22.364	340353	18.679				0.12
104565	30.396			329765	18.726	274849	12.410		0.25
				37272	18.673	1491696	12.537		0.5
47578681	31.378	98833026	20.013	2095603	18.882	15153803	12.921	العينة القياسية	



الشكل (6): زمن الاحتباس (دقيقة) لمركب Vinblastine لمستخلص عينة كالس اوراق نبات عين البزون *Catharanthus roseus* النامية على وسط MS المجهز بـ0.5 ملغم.لتر$^{-1}$ Vinc. مع 0.75 ملغم.لتر$^{-1}$ 2,4-D بعد 60 يوم من الزراعة باستخدام تقانة HPLC.



الشكل (7): زمن الاحتباس (دقيقة) لمركبات Vincristineو Vindoline لمستخلص عينة كالس اوراق نبات عين البزون *Catharanthus roseus* النامية على وسط MS المجهز بـ0.12 ملغم.لتر$^{-1}$ Vinc. مع 0.75 ملغم.لتر$^{-1}$ 2,4-D بعد 60 يوم من الزراعة باستخدام تقانة HPLC.



الشكل (8): زمن الاحتباس (دقيقة) لمركب Ajmalicine لمستخلص عينة كالس اوراق نبات عين البزون *Catharanthus roseus* النامية على وسط MS المجهز بـ0.25 ملغم.لتر$^{-1}$ Vinc. مع 0.75 ملغم.لتر$^{-1}$ 2,4-D بعد 60 يوم من الزراعة باستخدام تقانة HPLC.

نستنتج من هذه الدراسة:

ان اضافة كلوريد الصوديوم وVincristine مع 2,4-D كان له الاثر في نمو الكالس لنبات *Catharanthus roseus* وهذا بدوره اثر ايجابياً في تشخيص المركبات القلويدية وتقديرها.

المصادر

1. ايوب، مقداد توفيق ومحمد نزار ابراهيم (1986). كتاب مترجم (جي مان). الايض الثانوي - رقم الايداع في المكتبة الوطنية ببغداد 800 لسنة 1986.
2. الحديدي، محمد علي حسين (2002). تجارب في زراعة الانسجة. دار الفكر للطباعة والنشر والتوزيع، عمان، الأردن.
3. الحجيمي، احسان جالي اذبيب (2010). استعمال تقنية زراعة الانسجة في انتاج الفنكرستين والفنبلاستين في كالس نبات عين البزون *Catharanthus roseus* L. G.Don المتحمل للاجهاد الملحي. رسالة ماجستير، كلية الزراعة – جامعة الكوفة.
4. دلالي، باسل كامل (1994). أساسيات الكيمياء الحيوية. دار ابن الأثير للطباعة والنشر/ جامعة الموصل، العراق.
5. الزركاني، نصير جواد كاظم (2003). دراسة تشريحية لبعض انواع العائلة الدفلية. رسالة ماجستير- كلية العلوم – جامعة الكوفة، العراق.
6. الشحات، نصر ابو زيد (1986). النباتات والاعشاب الطبية، دار البحار بيروت، لبنان.
7. الشحات، نصر ابو زيد (2000). الهرمونات النباتية والتطبيقات الزراعية. الدار العربية للنشر والتوزيع، الطبعة الثانية. مدينة النصر، مصر.
8. الكناني، فيصل رشيد (1987). زراعة الانسجة والخلايا النباتية.مديرية دار الكتب والطباعة/جامعة الموصل - العراق.
9. محمد، عبدالمطلب سيد وعمر، مبشر صالح (1990) المفاهيم الرئيسة في زراعة الخلايا والانسجة والاعضاء للنبات. دار الكتب للطباعة والنشر. جامعة الموصل.
10. A.O.A.C. (2002). "Official Method of Analysis ". 17th ed. Association of official Analytic Chemist Washington. DC.
11. Azimi, A.A.; B.D. Hashemloian; H. Ebrahimzadeh and A. Majd (2008). High in vitro production of anti-cancericindole alkaloids from periwinkle (*Catharanthus roseus*) tissue culture. Afri J. of Biotech., 7(16): 2834-2839.
12. Bhojwani, S.S. and M.K. Razdan. (1996). "Plant Tissue Culture: Theory and Practice. a Revised Edition". ELESEVIER. Amsterdam-Lausanne-New York-Oxford-Shannon-Tokyo.
13. Data, A. and P.S. Srivastava (1997). Variation in vinblastine production by Catharanthus roseus during in vivo and in vitro differentiation. Phytochemistry, 46:135-137.
14. Gilman, E.F. and T. Howe (1999). *Catharanthus roseus*. University of Florida-Cooperative Extension Service. Institute of Food and Agri. Sci. Fact Sheet FPS-112.
15. Hartmann, H.T.; D.E. Kester; F.T. Davies and R.L. Geneve (2002). Plant Propagation Principles and Practices. 7th ed. Perntice Hall. Inc. New Jersey. USA.
16. Leveque, D.; J. Wihlm and F. Jehl (1996). Pharmacology of Catharanthus alkaloids. Bull. Cancer, 83: 176-186.
17. Misawa, M. and A.M. Goodbody (1996). Plant Cell Culture Secondary Metabolism: Toward Industrial Application. Boca Raton DiCosmo, F. and M. Misawa (eds). CRC Press., 123-138.

18. Misawa, M. and T. Endo (1988). Antitumor compound. In: Constabel, F. and Vasil, K. (ed.): Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plant. Vol. 5, pp: 553-586. Academic Press Inc.
19. 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 *Catharanthus roseus* seedlings. J. Plant Physiol., 136: 11-18.
20. Miura Y.; K. Hirata and N. Kurano (1987). Formation of vinblastine in multiple shoot of *Catharanthus roseus*, Planta Med., 50: 18-20.
21. Murashige, T. and F. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia plantarum., 15: 473-497.
22. Oksman-Caldentey,K. M.O. & W. H. Barz(2002). " Plant Biotechnology and Transgenic Plant ". Marcel Dekker. Inc. New York. USA.
23. 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 Journal. Plant Science, 6(8): 1223-1228.
24. Phillipson, J.D. (1990). Plant as sources of valuable products. In: B.V. Charlwood and M.J.C. Rhodes (Eds.). Secondary Products from Plant Tissue Culture. Clarendon Press. Oxford. 1-21.
25. Renaudin J.P. (1984). Reversed-phase High-performance liquid chromatography, J. Chromat., 291: 165-174.
26. Sorvari, S; M.G. Fari; M. Laszio and O. Toldo (1995). Application of tissue culture and molecular farming in the production of pharmaceuticals. International Society for Horticultural Science. ISHS Acta Horticulturar 725: V International Symposium on *in Vitro* Culture and Horticultural Breeding.
27. Umamaheswari, A. and V. Lalitha (2007). *In vitro* effect of various growth hormones in *Capsicum annuum* L. on the callus induction and production of capsaicin. J. Plant Science, 2(5): 545-551.
28. Van der Heijden, R.; D.I. Jacobs; W. Snoeijer; D. Hallard and R. Verport (2004). The Catharanthus alkaloids: Pharmacognosy and biot. Curr. Med. Chem., 11(5): 607-628.
29. Vardhan, S.; A.K. Yadav.; R.K. Suri and B.B.S. Nag (2012). Genetic relatidness and in vitro antimicrobial activities of alkaloids isolated from Indian varieties of (*Catharanthus roseus* L.) Current Bot., 3(4): 43-48.
30. Verma, A.K.; R.R. Singh and S. Singh (2012). Improved alkaloid content in callus culture of Catharanthus roseus.Bot.Serbica., 36(2):123-130.
31. Yong, J.; Gong, Z.C. and X. Tan (2008). Induction of callus and extraction of alkaloid from Yi Mu Cao (Leonurus heterophylus Sw.) Culture. Afri J. of Biot., 7(8): 1157-1162.
32. Yuan, F.; W. Quan; P. Qifang; W. Guofeng; Z. Jingta; T. Yuesheng; J. Zhao; W.H. Zhu; Q. Hu and Y.Q. Guo (2011). Improvement of indole alkaloid production in *Catharanthus roseus* cell cultures by osmotic shock. Biot. Letters, 22(15): 1227-1231.
33. Zhou, L.G. and J.Y. Wu. (2006). Development and application of herbal medicine in China. Nat. Prod. Rep., 23: 789-810.