تأثير الإجهادات اللاإحيائية في إنتاج قلويدي الفنكرستين والفنبلاستين من كالوس نبات الونكا (*Catharanthus roseus* L.)

الدكتور: يوسف العموري[1]

نُفذت التجربة في الهيئة العامة للتقانة الحيوية في دمشق، خلال الموسم الزراعي 2019/2018، لمعرفة تأثير الإجهادات اللاإحيائية في الوزن الرطب والجاف للكالوس، وتركيز قلويدي الفنكرستين والفنبلاستين ضمن كالوس نبات الونكا. وضعت التجربة وفق التصميم العشوائي التام، بواقع ثلاثة مكررات لكل معاملة. عُقمت البذور بمحلول هيبوكلوريد الصوديوم (0.5%) NaOCl، وزرعت في أنابيب اختبار تحتوي على الوسط المغذي MS الخالي من منظمات النمو، وبعد نجاح الزراعات التأسيسية، نُقلت النبيتات إلى وسط الإكثار+ المدعم بالأكسينات NAA (1 مغ.ل$^{-1}$) والسيتوكينيات BA (2 مغ.ل$^{-1}$). تمّ استحداث الكالس من أوراق نبات الونكا باستعمال الوسط المغذي MS المدعم بكلٍ من NAA (1 مغ.ل$^{-1}$) و Kin (2 مغ.ل$^{-1}$)، تمَّ تعريض الكالوس لمستوياتٍ متزايدة بشكل تدريجي من الإجهاد الحلولي المُصطنع بإضافة سكر البولي إيثيلين جلايكول PEG-6000، (0، -0.2، -0.3، -0.4 Mpa)، والملحي NaCl (0، 25، 50، 75،100 mM) بواقع مستوى أعلى كل 35 يوماً. أظهرت النتائج أنَّ متوسط الوزن الرطب والجاف للكالوس الأدنى معنوياً في المعاملة NaCl 100 mM (3.047، 0.250 غ على التوالي)، وفي المعاملة −0.4 Mpa (2.35، 0.18 غ على التوالي)، بينما كان الأعلى معنوياً في الشاهد (بدون إجهاد) (6.207، 0.483 غ)، كان تركيز كلٍ من الفنكرستين والفنبلاستين الأعلى معنوياً في المعاملة 75 mM من الإجهاد الملحي (103.92، 112.60 ميكرو غ. غ$^{-1}$ وزن

جاف على التوالي)، في حين كان تركيز الفنكرستين الأدنى معنوياً عند المستوى 25 mM من الإجهاد الملحي والشاهد وبدون فروقاتٍ معنوية بينهما (88.56، 88.17 ميكرو غ. غ$^{-1}$ وزن جاف)، وتركيز الفنبلاستين الأدنى معنوياً في الوسط الشاهد (95.09 ميكرو غ. غ$^{-1}$ وزن جاف)، في الإجهاد الحلولي كان تركيز الفنكرستين والفنبلاستين الأدنى معنوياً في المعاملة −0.4 Mpa، (2.54، 3.36 ميكرو غ. غ$^{-1}$ وزن جاف على التوالي)، بالمقارنة مع الشاهد الأعلى معنوياً (88.17، 95.09 ميكرو غ. غ$^{-1}$ وزن جاف).

الكلمات المفتاحية: الونكا، الكالوس، ملح كلور الصوديوم، البولي إتيلين غلايكول، الفنكرستين، الفنبلاستين.

(1) عضو هيئة تدريسية في الجامعة السورية الخاصة، باحث في الهيئة العامة للتقانة الحيوية.

Effect of Abiotic stresses on vincristine and vinblastine production from callus of Madagascar Periwinkle *(Catharanthus roseus L.)*

(1) **Dr.Youssef AL-Ammouri**

Abstract

The research was carried out in the Syrian National Commission of Biotechnology, to study the effect of some abiotic stresses on fresh and dry weight of callus and the content of vincristine and vinblastine in *Catharanthus roseus* callus. The experiments was laid according to complete random desgin (CRD) with three replications. The seeds were sterilized by NaOCl solution, then planted on MS medium. Plantlets were transferred to MS medium enriched with NAA (1 mg L^{-1}) and BA (2 mg L^{-1}). The callus was initiated from leaves using MS medium containing NAA (1 mg.L^{-1}) and Kin (2 mg.L^{-1}). Callus was transferred to MS medium supplemented with PEG-6000 (0, -0.2, -0.3, -0.4, MPa), and NaCl (0, 25, 50, 75, 100 mM) in succession. The results showed that the fresh and dry weight of callus was significantly lower in 100mM NaCl treatment (3.047, 0.250 g respectively) and at the osmotic stress level of -0.4 Mpa (2.35 and 0.17 g respectively), while it was significantly higher in the control (6.207, 0.483 g respectively). The Vincristine and vinblastine content was significantly higher at the NaCl induction level of 75 mM NaCl (103.92, 112.60 µg.g^{-1} DW respectively), while vincristine was significantly lower at the salinity level (25 mM NaCl) and the control without significant differences between them (88.56, 88.17 µg.g^{-1} DW respectively), vinblastine was significantly lower at the control (95.09 µg.g^{-1} DW). Vincrstine and vinblastine was the lowest in osmotic stress level of -0.4 Mpa (2.25, 3.36 µg.g^{-1} DW respectively) compared to the non-stressed (control) treatment (88.17, 95.09 µg.g^{-1} DW respectively).

Keyword: *Catharanthus roseus*, callus, NaCl, PEG, vincristine, vinblastine.

(1) Syrian Private University, researcher in national commission of biothecnology, Damascus, Syria

1- المقدمة Introduction

يعد نبات الونكا(.*Catharanthus roseus* L) من أهم النباتات الطبية المعترف بها ضمن دساتير الأدوية العالمية، ينتمي هذا النبات إلى الفصيلة الدفلية Apocynaceae، وتضم هذه الفصيلة مجموعة كبيرة من الأجناس تصل إلى قرابة 411 جنساً، ونحو 4650 نوعاً [1]. ينتشر نبات الونكا في المناطق الدافئة من العالم، ويتسم بالمقدرة على تحمل درجات الحرارة المرتفعة Heat stress، ويُزرع كنباتٍ للزينة في الحدائق والمنتزهات لتنوع ألوان أزهاره (الأبيض، الزهري والبنفسجي)، ولطول فترة إزهاره التي تمتد من شهر حزيران حتى شهر تشرين الثاني [2] [3].

يحتل نبات الونكا مكانةً مهمةً في قائمة النباتات الطبية لاحتوائه أكثر من 130 قلويداً من القلويدات الإندولية التربينية ومشتقاتها، استعملت في الطب التقليدي الصيني والهندي لمعالجة الملاريا، والسعال، ولدغات الدبور، وآلام المعدة، وفقدان الذاكرة، وكمنشطٍ عام للجسم والدورة الدموية [4]، إلى أن اكتشف الباحثان الكنديان Robert Noble و Charles Beer في الفترة الممتدة من 1955-1960 أنّ مستخلصات أوراق هذا النبات لها تأثيرات مخفّضة لعدد الكريات البيضاء Leukopenic عند الجرذان [5]. قادت هذه الملاحظة الباحثين إلى إجراء تحرياتٍ كيميائيةٍ مكثفة على هذا النبات، بهدف عزل المكونات ذات الفعّالية في معالجة السرطان وتمكنت الدراسات الحديثة من تحديد المكونات الفعّالة لنبات الونكا (*C. rosuse*) وأهمها على الإطلاق مركبي Vincristine (VCR)، وVinbblastine (VLB) اللذان يمتازان بخواص مضادة للانقسام الخلوي، التي تُستعمل في علاج العديد من الأمراض، وبخاصةٍ سرطان الدم Leukemia، وسرطانات الغدد اللمفاوية، وسرطانات الجلد والثدي، وداء هودجكين Hodgkin's lymphoma [6] [7]).

إنّ الفعّالية الطبية لعددٍ من المركبات القلويدية في نبات الونكا وارتفاع قيمتها وندرتها جعلها جديرة بالاهتمام خلال السنوات الأخيرة، لإنتاج كمياتٍ أكبر منها بسبب انخفاض تركيزها في النباتات المزروعة، حيث نحتاج إلى قرابة 500 كغ من أوراق نبات الونكا الجافة لاستخلاص 1 غ فقط من مركب Vinblastine [8] [9]، وهذا ما يجعل من تقنيات زراعة الأنسجة أداة بديلة لإنتاج مستقلبات النبات الثانوية ومنها تقانة مزارع الكالوس التي أوجدت مصدراً جديداً وأكثر كفاءة من الاعتماد على النبات مباشرةً لاستخلاص المركبات المختلفة منه [10]، وتعتمد الزراعة الخلوية على نظرية القدرة الكلية الكامنة للخلية، التي تعني قابلية أي خلية حية لتكوين نبات كامل، حيث توجد المعلومات الوراثية المطلوبة لتصنيع نواتج الاستقلاب الثانوية في هذه الخلايا غير المتمايزة Callus للأنواع المعنية بالدراسة، ويمكن بتفعيل هذه المورثات إنتاج نواتج الاستقلاب الثانوية المطلوبة [11].

تُؤثر الإجهادات اللاأحيائية Abiotic stresses (الجفاف، والحرارة المرتفعة، والملوحة ... وغيرها) في إنتاج Production، وإنتاجية Productivity العديد من الأنواع النباتية، وتُشير العديد من الدراسات أنّ تعرّض النباتات الطبية إلى الإجهادات المختلفة يؤدي إلى تحفيز إنتاج مستقلبات النبات الثانوية [12]. ويُعد استعمال العوامل المُحفزة واحداً من العوامل المهمة والفعّالة لزيادة الإنتاج من القلويدات في الخلايا النباتية، وذلك من خلال استعمال المركبات العضوية والأملاح المعدنية التي تُضاف إلى الأوساط الغذائية، فتُسرّع من إنتاج المواد الأولية والوسيطة التي تدخل في المسارات البنائية لإنتاج القلويدات [13].

دُرست التغيرات المتعلقة بتأثير الملوحة في أنسجة نبات الونكا في مراحل نموه في الحقل [14] [15]، وفي الزجاج [16]، وقد وجد [12] أنّ نبات الونكا تحمَّل الملوحة حتى 150 mM، وقد أُختبر تأثير الإجهاد الملحي في المزارع الخلوية لنبات الونكا في

تحسين إنتاج مستقلبات النمو الثانوية بإضافة ملح كلوريد البوتاسيوم KCl، أو كلوريد الصوديوم NaCl، ولوحظ زيادة في محتوى نبات الونكا من الكاثارانثين Catharanthine، بالإضافة إلى زيادةٍ معنوية في المركبات المضادة للسرطان مثل Vincristine، و Vinblastine.

درس [17] تأثير الإجهاد الحلولي في تصنيع القلويدات (VCR، VLB)، وذلك باستعمال مركب البولي إتيلين غلايكول Polyethylene glycol 4000− PEG، حيث زُرع الكالوس في الوسط المغذي MS [18] الحاوي على منظمات النمو (NAA، Naphthalene acetic acid) Kin و Kinetin، وتمّت معاملة الكالوس بعمر 13 أسبوعاً بالبولي اتيلين غلايكول بتراكيز مختلفة (0، 6، 9، 12%) (PEG-4000 w/v) مدة 24، 48، 72 ساعة، وقُدرت القلويدات باستعمال تقنية High Performance HPLC Liqued Chromatography. ازداد تركيز قلويد الفنكرستين في المعاملة ذات التركيز الأعلى من PEG-4000 (12%) (0.355 ميكروغرام. غ$^{-1}$ وزن جاف)، بالمقارنة مع الشاهد، حيث كان تركيز الفنكرستين نحو 0.165 ميكروغرام. غ$^{-1}$ وزن جاف.

درس [19] في الهند تأثير الإجهادات اللاأحيائية، مثل الإجهاد الملحي، والمائي في المعلق الخلوي لنبات الونكا المزروع في الوسط B5، واستعملت تراكيز مختلفة من ملح كلور الصوديوم (0، 25، 50، 75، 100، 125، 150، 175، 200 mM)، ومن PEG- 6000 (3، 6، 9، 12، 15، 18%) لمعرفة تأثيرها في الكتلة الحية للمعلق الخلوي، والتركيز المُحرّض لزيادة تراكم القلويدات. أظهر المعلق الخلوي تحملاً جيداً للملوحة حتى تركيز 100 mM ويمثل هذا التركيز المستوى المُحرّض الذي ظهرت عنده الزيادة في معدّل تراكم القلويدات بالمقارنة مع الشاهد، ولكن كانت أعلى زيادة عند استعمال التركيز 150 mM (6.562 مغ. غ$^{-1}$ وزن جاف)، وانخفض عند التراكيز

الأعلى من NaCl. وازداد أيضاً معدّل تراكم القلويدات بإضافة السكر PEG -6000 وكانت الزيادة العظمى عند التركيز 15% (6.383 مغ. غ$^{-1}$ وزن جاف).

2- أهداف البحث Objectives

1. دراسة تأثير الإجهادات اللاأحيائية (الملحي والحلولي) في معدل نمو الكالوس لنبات الونكا *C.roseu*.
2. دراسة تأثير تراكيز مختلفة من الإجهاد الملحي والحلولي في تركيز القلويدات الإندولية ضمن الكالوس.

3- مواد البحث وطرائقه Materials and methods

3-1 مكان تنفيذ البحث Site of experimentation: نُفذ البحث في الهيئة العامة للتقانة الحيوية، قسم التقانات الحيوية للنباتات الطبية.

3-2 المادة النباتية Plant material: تمَّ الحصول على بذور نوع الونكا (*C.roseus*) من شركة Syngenta flowers الهولندية.

3-3 تطهير البذور وتحضيرها للزرع: غُمرت كمية كافية من بذور نبات الونكا في الكحول الإيتيلي (70%) مدّة دقيقة واحدة، ثمّ عُقمت بمحلول هيبوكلوريد الصوديوم (NaOCl) باستعمال التركيز 0.5% لمدة 5 دقائق ثمّ غُسلت بعدها بالماء المقطر المعقم ثلاث مرّات متتالية بمعدّل 5 دقائق في كل مرّة، وتركت مكشوفةً مدّة 30 دقيقة حتى جفت هوائياً وأصبحت جاهزة للزرع. وجرت عمليتا الغسيل النهائي والزرع في شروط تعقيم صارمة تحت جهاز العزل الجرثومي (Laminar airflow hood) من النوع JSCR-1200 SB.

زرعت البذور بمعدل بذرة واحدة في كل أنبوب، وذلك باستعمال وسط الزراعة الأولي MS الخالي من منظمات النمو، وحُضنت الأنابيب عند درجة حرارة 2± 24 مْ حتى إنبات البذور، ثمّ حُضنت النبيتات النامية بظروف 16 ساعة إضاءة و8 ساعات ظلام بالتناوب، ثمّ أُعيدت زراعتها على وسط الإكثار حيث استعمل الوسط MS المدعم بهرموني BA Benzyl adinien (2 مغ.ل$^{-1}$)، و NAA (1 مغ.ل$^{-1}$) للحصول على كميةٍ كافية من المادة النباتية اللازمة لتنفيذ تجارب استحداث الكالوس.

3-4 استحداث الكالوس: تمَّ استزراع أوراق نبات الونكا (*C.roseus*) على عدد من الأوساط المغذية المعتمدة على وسط MS والمدعم بمجموعة من الفيتامينات مثل ميواينوزيتول (0.08 غ)، والكازئين (0.5 غ)، بالإضافة إلى عددٍ من منظمات النمو النباتية Kin (2 مغ.ل$^{-1}$)، و NAA (1 مغ.ل$^{-1}$).

3-5 تطبيق الإجهاد على مزارع الكالوس: تمَّ تعريض الكالوس إلى مستوياتٍ متزايدة وبشكلٍ تدريجي من العامل المجهد (NaCl) (0، 25، 50، 75، 100 mM)، ومن البولي إيثيلين جلايكول PEG-6000 (0، 0.2-، 0.3-، 0.4-، Mpa)، بواقع مستوى أعلى كل 35 يوماً، بهدف معرفة تأثير الإجهاد الملحي والحلولي في الوزن الرطب والجاف للكالوس، بالإضافة إلى إنتاج المواد البيولوجية الفعالة من الكالوس.

3-6 الكشف عن قلويدات الإندول في نبات الونكا *C. roseus*: تمَّ استخلاص القلويدات، تبعه التقدير الكمي باستعمال تقنية الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC) للمركبين القلويدين الأندوليين Vincristine و Vinblastine إذْ قدر التركيز النهائي من كلا المركبين في العينات المدرسة التالية:

1- الكالوس الشاهد.

2- الكالوس المجهد ملحياً (25، 50، 75، 100 mM).

3- الكالوس المجهد حلولياً (0.2-، 0.3-، 0.4- Mpa).

أُخذت القراءات على ثلاثة مكررات من كل معاملة من المعاملات السابقة. وتمَّ اتباع الطريقة الآتية لاستخلاص القلويدات من الكالوس [20]: أُخذ 1 غ من الأوراق المجففة والمطحونة لنبات *C. roseus*، ومزجت مع 100 مل من الكحول الإيثيلي (95%)، ثمَّ مُزجت مدّة 5 دقائق بوساطة جهاز التحريك المغناطيسي، وتُركت مدّة 24 ساعة. تمّ ترشيح المزيج تحت ضغط مخلخل في قمع بوخنر، وأُخذت الخلاصة ووضعت في حاوية الاستخلاص Thumble ثمّ أُدخلت في جهاز السوكسوليه Soxholet حتى تبخر الكحول، جفف المستخلص باستخدام جهاز المبخر الدوار Rotary evaporator. وأُذيبت المادة الجافة في 5 مل من الكحول الإيثيلي (95%)، بالإضافة إلى 30 مل من حمض الكبريت (2%)، ثمّ وضع المستخلص في جهاز المبخر الدوّار للتخلص من الكحول، حيث بقي المحلول الحمضي فقط. ثمّ تمَّ رفع pH المحلول إلى 9 باستعمال

الأمونيا (10%)، ليُصبح المحلول جاهزاً للفصل. ثمّ وضع المحلول في قمع الفصل وأُضيف إليه 10مل من الكلوروفورم، ورج عدّة مرّات ثمَّ تُرك المزيج ليستقر وينفصل إلى طورين، وأُخذ الطور السفلي وهي طبقة الكلوروفورم المذابة فيها القلويدات. وكررت هذه العملية 3 مرّات، فُصِلَ الطور السفلي في كل مرة، ثمَّ وضع في جهاز المبخر الدوّار للتخلص من الكلوروفورم. وأُذيبت المادة الجافة في 1 مل من الميثانول لتصبح جاهزةً للقياس باستعمال جهاز HPLC. تمَّ استعمال هذا البروتوكول لاستخلاص القلويدات من جميع معاملات الكالوس.

3-7 تحضير المحاليل القياسية: أُخذ 1 مغ من المركبات القياسية للفنكرستين والفنبلاستين وحُلّت في 1 مل من الميثانول النقي للحصول على محلول أم من كلا الستاندرين، بعدها تمَّ تمديد المحلول الأم للستاندرين إلى تراكيز مختلفة (100، 150، 200 ميكرو غرام . مل$^{-1}$) باستعمال الميثانول، وذلك لرسم المخطط المعياري لكلا المادتين واستعماله لاحقاً في قياس تراكيز القلويدات ضمن العينات المدروسة.

3-8 تحليل العينات باستعمال الكرماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC: حُللت العينات باستعمال جهاز الكرماتوغرافيا السائلة عالية الأداء من طراز YL9100 المكون من الوحدات التالية:

1- YL9110 مضخة رباعية Quaternary pump.
2- YL9101 طارد غازات Vacuum degasser.
3- YL 9150 حاقن عينات Auto sampler.
4- YL9116 كاشف بالأشعة فوق البنفسجية PDA detector.
5- YL 9131 فرن للعمود Column compartment.

شروط التحليل

1- نوع العمود المستعمل C18 D4 (150*4.6 mm، 54 µ).

2- الطور الحامل مؤلف من 0.02 NaH_2PO_4، والميثانول بنسبة (36:64).

3- طول الموجة 276 nm.

4- درجة الحرارة 30 مْ.

5- معدّل التدفق 0.9 مل.دقيقة$^{-1}$.

6- حجم الحقن للعينات والستاندر 50 µL.

7- مدّة التحليل 15 دقيقة.

كُررت كل معاملة ثلاث مرّات، وتمّت فلترة الطور الحامل باستعمال فلتر عقيم 0.45µ ووضع الطور الحامل في جهاز الأمواج فوق الصوتية مدّة نصف ساعة، قبل البدء بالتحليل.

3-9 تصميم التجارب والتحليل الاحصائي Experiments design and statistical analysis:

نُفذت جميع التجارب باستعمال التصميم العشوائي التام (CRD)، بمعدّل 3 مكررات، وتمَّ تحليل البيانات بعد تبويبها باستعمال برنامج التحليل الإحصائي Mstat-C لحساب قيم أقل فرق معنوي (LSD) عند مستوى المعنوية 0.01، وقيم معامل التباين (CV%).

4- النتائج والمناقشة Results and disscution

4-1 تأثير الإجهادين الملحي والحلولي في الوزن الرطب والجاف للكالوس:

بيّنت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروقاتٍ معنوية في متوسط الوزنين الرطب والجاف للكالوس بين المعاملات المدروسة حيث كان متوسط الوزن الرطب والجاف للكالوس الأدنى معنوياً في معاملة الإجهاد الحلولي -0.4 Mpa (2.35، 0.18 غ على التوالي) بالمقارنة مع الشاهد (6.207، 0.483 غ على التوالي). وكان متوسط الوزن الرطب الأدنى معنوياً في معاملة الإجهاد الملحي 100 Mm NaCl (3.047غ)، بالمقارنة مع الشاهد (6.207 غ)، في حين كان الوزن الجاف الأدنى معنوياً في المعاملتين 100 و75 Mm (0.250، 0.277 غ على التوالي) بالمقارنة مع المعاملة الشاهد (0.483غ) (الجدول، 1). عموماً، تؤدي إضافة العامل المجهد لوسط النمو إلى تثبيط استطالة الخلايا وانقسامها، الأمر الذي يؤثر سلباً في معدّل نمو خلايا الكالوس، سواءً من خلال التأثير الحلولي لكلٍ من الإجهاد الحلولي والملحي، حيث تعمل جزيئات البولي إتيلين غلايكول (PEG-6000)، وجزيئات الملح على مسك جزيئات الماء، مقلّلةً بذلك من عدد جزيئات الماء الحرة والمتاحة للامتصاص من قبل خلايا الكالوس، الأمر الذي يؤثر سلباً في ضغط الامتلاء، الذي يُعد بمنزلة القوة الفيزيائية التي تدفع جدر الخلايا النباتية على الاستطالة، أو نتيجة التأثير السمي الأيوني لشاردتي الصوديوم والكلور في معاملة الإجهاد الملحي [21]. تتفق هذه النتائج مع نتائج الحجيمي وعبد الحسين [22]، حيث أظهرت نتائجهما تناقصاً في الوزنين الرطب والجاف لكالوس نبات *C.roseus* عند إضافة ملح كلور الصوديوم إلى وسط النمو، حيث كان الوزن الرطب والجاف الأدنى معنوياً عند التركيز الأعلى (75 Mm NaCl) بالمقارنة مع الشاهد. ولم تتفق مع ما توصل إليه البحاثة [19]، الذين لاحظوا زيادة الوزنين الرطب والجاف تحت ظروف الإجهاد الملحي عند المستويات الملحية المنخفضة نسبياً (0، 25، 50، 100

Mm NaCl)، وبدأ الانخفاض عند التركيز الأعلى (200 Mm) بالمقارنة مع الشاهد. ويُعد انخفاض معدّل النمو بتأثير الإجهادات نوعاً من أنواع التأقلم للبقاء على قيد الحياة، وتتجه الخلايا نحو زيادة معدّل إنتاج مستقلبات النمو الثانوية وتراكمها بوصفها وسائلَ دفاعية على حساب معدّل النمو.

الجدول رقم (1): تأثير الإجهاد الملحي والحلولي في الوزنين الرطب والجاف (غ) للكالوس في نبات الونكا.

الإجهاد الحلولي (Mpa)	الوزن الجاف (غ)	الوزن الرطب (غ)	الإجهاد الملحي (mM NaCl)	الوزن الجاف (غ)	الوزن الرطب (غ)
الشاهد	0.483^{a}	6.207^{a}	الشاهد	0.483^{a}	6.207^{a}
0.2 -	0.28^{b}	3.19^{b}	25	0.417^{b}	5.140^{b}
0.3 -	0.23^{c}	2.86^{bc}	50	0.323^{c}	4.060^{c}
0.4 -	0.18^{d}	2.35^{c}	75	0.277^{d}	3.563^{d}
المتوسط	0.298	3.652	100	0.250^{d}	3.047^{e}
			المتوسط	0.361	4.403
LSD (0.01)	0.030	0.524	LSD (0.01)	0.0274	0.287
CV (%)	6.74	6.57	CV (%)	3.48	2.36

تُشير الأحرف المتماثلة على مستوى الأعمدة إلى عدم وجود فروقاتٍ معنوية بين المتوسطات عند مستوى معنوية 0.01.

4-2 تركيز الفنكرستين Vincristine concentration (ميكرو غرام. غ$^{-1}$ وزن جاف):

أظهرت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروقاتٍ معنوية في تركيز الفنكرستين بين المعاملات المدروسة والشاهد (الجدول، 2). كان تركيز الفنكرستين الأعلى معنوياً في معاملة الإجهاد الملحي mM75 (103.92 g.gμ $^{-1}$ وزن جاف)، تلاها وبفروقاتٍ معنوية المعاملة mM 50 (98.88 ميكرو غرام. غ$^{-1}$ وزن جاف)، ثمّ معاملة الإجهاد الملحي mM 100 (93.67 ميكرو غرام. غ$^{-1}$ وزن جاف)، في حين كان الأدنى معنوياً عند المستوى mM 25 من الإجهاد الملحي والشاهد وبدون فروقاتٍ معنوية بينهما (88.56، 88.168 ميكرو غرام. غ$^{-1}$ وزن جاف). يُلاحظ هنا التأثير الإيجابي للعامل المجهد، حيث وصلت نسبة الزيادة في تركيز الفنكرستين عند إضافة ملح كلور الصوديوم بتركيز mM 75 إلى قرابة 17.87% بالمقارنة مع الشاهد، ولكن بالمقابل سبّبت إضافة مركب PEG-6000 انخفاضاً كبيراً في تركيز الفنكرستين، حيث كان تركيز الفنكرستين الأدنى معنوياً عند معاملة الإجهاد الحلولي -0.4 Mpa (2.54 ميكرو غرام. غ$^{-1}$ وزن جاف)، تلاها المعاملتين -0.3، -0.2 Mpa وبفروقاتٍ معنوية بينهما (16.92، 23.37 ميكرو غرام. غ$^{-1}$ وزن جاف على التوالي)، في حين كان الأعلى معنوياً في معاملة الشاهد (بدون إجهاد) (88.168 ميكرو غرام. غ$^{-1}$ وزن جاف) (الجدول، 2).

4-3 تركيز الفنبلاستين Vinblastine concentration (ميكرو غرام. غ$^{-1}$ وزن جاف):

أدّت إضافة ملح كلور الصوديوم بتراكيز مختلفة إلى وسط النمو إلى حدوث زيادة معنوية في تركيز الفنبلاستين، وبخاصةٍ عند المستوى الملحي mM 75، فقد كانت الاستجابة الأعلى معنوياً عند هذه المعاملة (112.60 ميكرو غرام. غ$^{-1}$ وزن جاف)، وبزيادةٍ مقدارها 18.41% بالمقارنة مع الشاهد، بينما كان الأدنى معنوياً في معاملة

الشاهد (95.093 ميكرو غرام. غ$^{-1}$ وزن جاف) (الجدول، 2). أمّا بالنسبة إلى معاملات الإجهاد الحلولي، لوحظ انخفاض معنوي في جميع المعاملات، وكان تركيز الفنبلاستين الأدنى معنوياً في المعاملة -0.4 Mpa (3.06 ميكرو غرام. غ$^{-1}$ وزن جاف) تلاها وبفروقاتٍ معنوية المستويان الحلوليان -0.3، -0.2 Mpa وبفروقاتٍ معنوية بينهما (23.25، 31.61 ميكرو غرام. غ$^{-1}$ وزن جاف)، في حين كان الأعلى معنوياً في معاملة الشاهد (95.093 ميكرو غرام. غ$^{-1}$ وزن جاف) (الجدول، 2).

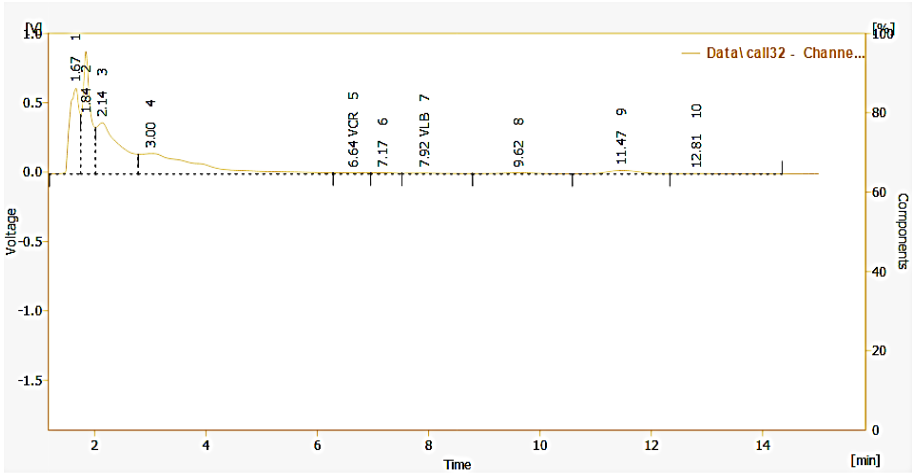
الجدول رقم (2): تأثير الإجهادين الملحي والحلولي في تركيز الكالوس من الفنكرستين والفنبلاستين (ميكرو غرام. غ$^{-1}$ وزن جاف) .

الإجهاد الملحي (mM NaCl)	تركيز الفنكرستين	تركيز الفنبلاستين	الإجهاد الحلولي (Mpa)	تركيز الفنكرستين)	تركيز الفنبلاستين
0	88.168^{d}	95.093^{e}	0	88.168^{a}	95.093^{a}
25	88.56^{d}	99.98^{d}	0.2 -	23.37^{b}	31.61^{b}
50	98.88^{b}	108.39^{b}	0.3 -	16.92^{c}	23.25^{c}
75	103.92^{a}	112.60^{a}	0.4 -	2.541^{d}	3.060^{d}
100	93.67^{c}	104.28^{c}	Mean	32.75	38.25
Mean	94.64	104.067			
CV (%)	5.78	2.38	CV (%)	6.57	6.74
LSD (0.01)	5.022	4.105	LSD (0.01)	4.236	6.020

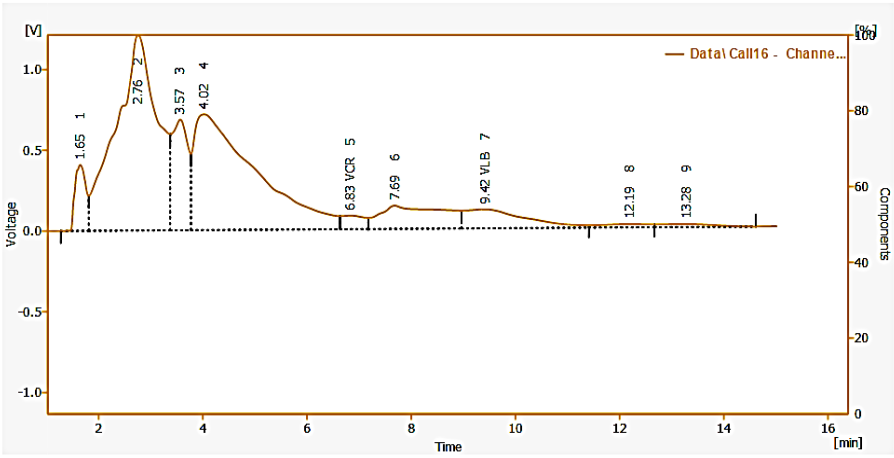
تُشير الأحرف المتماثلة على مستوى الأعمدة إلى عدم وجود فروقاتٍ معنوية بين المتوسطات عند مستوى معنوية 0.01.

عموماً، للإجهادات بكافة أنواعها دور مهم في تركيز المواد الفعّالة في النباتات الطبية، ومنها ملح كلور الصوديوم، الذي يعمل محفزاً لإنتاج هذه المواد عند إضافته بتراكيز غير كبيرة إلى وسط النمو، فهو يعمل على تحسين التصنيع الحيوي لمستقلبات النبات الثانوية مثل الفينولات، والتربينات، والقلويدات، وغيرها، حيث تؤدي هذه المركبات دوراً مهماً في تحسين مقدرة النباتات على التأقلم مع ظروف الإجهاد. وقد أظهرت نتائج بعض الدراسات زيادةً في تركيز قلويدي الفنكرستين والفنبلاستين في نبات *C.roseus* النامي في الأوساط الملحية [23] [24] [14]. وتقترح بعض الدراسات آلية مختلفة لتفسير زيادة تركيز القلويدات في الأوساط الملحية، تعتمد هذه الدراسات على الزيادة الكلية في مستوى الأحماض الأمينية الكلية، الأمر الذي يؤدي إلى زيادة تركيز متعددات الأمين، التي تُعزز بدورها إنتاج النتريك أسيد (NO)، الذي يتحرك بسهولة ضمن الغشاء السيتوبلازمي للخلية، ويعمل محفزاً Stimulating agent لإنتاج قلويدي الفنكرستين والفنبلاستين، لأنُه يعمل على زيادة تصنيع مركب الكاثارنثين [25]. ووجدت بعض الدراسات أنَّ وجود ملح كلور الصوديوم يعمل على زيادة تفعيل بعض المورثات الداخلة في عملية التصنيع الحيوي للقلويدات، فقد وجد [26] زيادةً في التعبير المورثي للمورثات التي تضبط عمل بعض الأنزيمات الداخلة في مسار التصنيع الحيوي للقلويدات، الأمر الذي أدّى إلى تفعيل عمل هذه الأنزيمات مثل deacetylvindoline 4-O-acetyl DAT transferase و D4H desacetoxyvindoline- 4-hydroxylase ، التي تتوسط بعض مراحل التصنيع الحيوي، وكذلك أنزيم tryptophan decarboxylase TDC المسؤول عن تصنيع مركب التريبتامين من الحمض الأميني التربتوفان، بالإضافة إلى أنزيم strictosidine synthetase (STR)، الذي يتوسط المرحلة الوسطية في تصنيع القلويدات، التي يتم فيها دمج مركبي التريبتامين والسكولوغانين لتشكيل مركب الستركتوسيدين. كما ينشط أنزيم Anhydrovinblastine synthase (AVLBS)

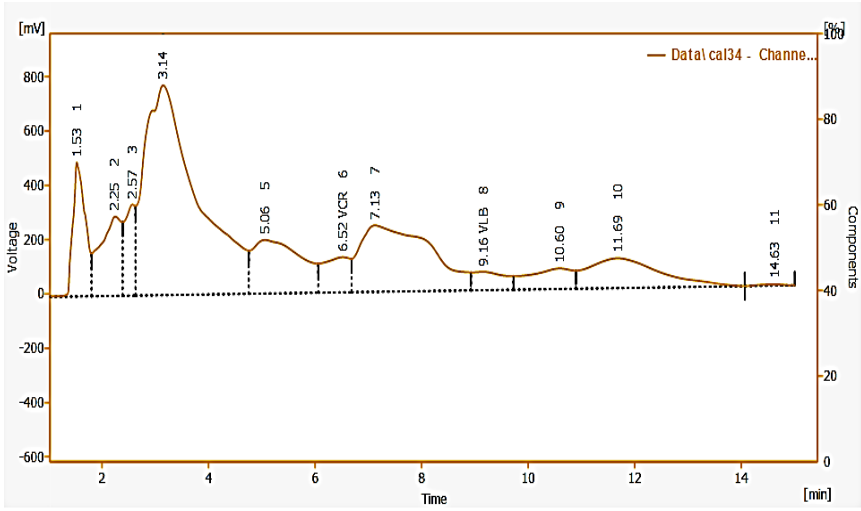
بوجود الإجهاد الملحي. ومن جهةٍ أخرى وجد [27] أنَّ إضافة مركب PEG-6000 تؤدي إلى انخفاض في مستوى العمليات الاستقلابية داخل النبات، حيث أحدث الجفاف تغيراً ديناميكاً في مستوى قلويدي الفندولين والكاثارانثين، بالنسبة للفندولين فقد أظهر ارتفاعاً ثمّ انخفاضاً، أما قلويد الكاثارنثين انخفض بشكلٍ تدريجي في أنسجة نبات الونكا، كما انخفض تركيز مركب الجيرانيول Geraniol الذي يُعد أحد المركبات الأساسية في حلقة تصنيع القلويدات الإندولية، الذي اعتمد تركيزه داخل الخلايا على مستوى الإجهاد، والفترة الزمنية لتطبيق الإجهاد [28].



الشكل رقم (1) تركيز الفنكرستين والفنبلاستين في الكالوس المجهد حلولياً (PEG-6000).



الشكل رقم (3) تركيز الفنكرستين والفنبلاستين في الكالوس الشاهد.



الشكل رقم (4) تركيز الفنكرستين والفنبلاستين في المجهد ملحياً (NaCl).

5-الاستنتاجات والمقترحات:

1- تُقلل الإجهادات اللاأحيائية مثل الملوحة والإجهاد الحلولي من معدّل نمو الكالوس لنبات الونكا وتؤثر سلباً في معدّل النمو بزيادة شدّة الإجهاد.

2- ازداد تركيز قلويدي الفنكرستين والفنبلاستين باستعمال ملح كلور الصوديم عند المستوى 75 mM والذي يعد بمثابة المستوى المحرض الأمثل.

3- تسبب إضافة مركب البولي اتيلين غلايكول انخفاضاً كبيراً في تركيز القلويدات المستهدفة ولا يوصى باستعماله كمحفزٍ لزيادتها.

References المراجع

1- YANG L., WEN K. S., RUAN, X., ZHAO, Y. X., WEI, F., & WANG, Q. 2018- Response of plant secondary metabolites to environmental factors. Molecules, 23(4): 762.

2- MISHRA J.A., VERMA N.A., 2017- A brief study on *Catharanthus Roseus*: A review. Int. J. Res. Pharm. Sci. 2(2): 20-23

3- DUBEY, A., TIWARI, D., SRIVASTAVA, K., PRAKASH, O., & KUSHWAHA, R.-2020. A discussion on vinca plant. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. *9*(5): 27-31.

4- SANDEEP, P., JAGJIT, K., RAMAN, K., & KULDEEP, K. 2014- *Catharanthus roseus*: a medicinal plant with potent anti-tumor properties. International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy. *5*(6): 652-656.

5- PEREIRA, D. M., FARIA, J., GASPAR, L., FERRERES, F., VALENTÃO, P., SOTTOMAYOR, M., & ANDRADE, P. B. 2010-Exploiting Catharanthus roseus roots: Source of antioxidants. Food chemistry. 121(1): 56-61.

6- VAN DER HEIJDEN D. I; JACOBS; W. SNOEIJER; D. HALLARD; AND R. VERPOORTE 2004- The Catharanthus alkaloids: pharmacognosy and biotechnology, Current Medicinal Chemistry,. 11(5): 607–628.

7- DAS, S., & SHARANGI, A. B. 2017-Madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus* L.): Diverse medicinal and therapeutic benefits to humankind. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. 6(5): 1695-701.

8- TAHER, Z. M., AGOUILLAL, F., MAROF, A. Q., DAILIN, D. J., NURJAYADI, M., RAZIF, E. N., & EL ENSHASY, H.

A. 2019-Anticancer Molecules from *Catharanthus roseus*. Indonesian Journal of Pharmacy, 30(3): 147.

9- BARRALES-CUREÑO, H. J., REYES, C. R., GARCÍA, I. V., VALDEZ, L. G. L., DE JESÚS, A. G., CORTÉS RUÍZ, J. A., & ESPINOZA PEREZ, J. 2019- Alkaloids of pharmacological importance in Catharanthus roseus (1):18. Intech Open Ltd.: London, UK.

10- MAIDANYUK, D. M., ANDREEV, I. O., SPIRIDONOVA, K. V.,& KUNAKH, V. A. 2007- Genetic polymorphism of maize somaclonal lines de rived from P346 line. Biopolymers and cell. 23(4):324-331. Translated from Ukrainian.

11- EVANS, W. C. 2002-Trease and Evans' Pharmacognosy. 15 th edition, W. B.Sauders Company Ltd. Edinburgh, London, New York, Philadelphia, St Louis, Sydney, Toronto.

12- DIPTI, A., MUJIB, A., MAQSOOD, M., ALI, M & ZAFAR, N. 2016-Aspergillus flavus fungus elicitation improves vincristine and vinblastine yield by augmenting callus biomass growth in *Catharanthus roseus*. Plant Cell Tissue Organ Culture. 126: 291- 303.

13- KARUPPUSAMY, S. 2009- A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ and cell cultures. Journal of Medicinal Plants Research. *3*(13): 1222-1239.

14- ELFEKY, S. S., OSMAN, M. E., HAMADA, S. M., & HASAN, A. M. 2007- Effect of salinity and drought on growth criteria and biochemical analysis of *Catharanthus roseus* shoot. International Journal of Botany. 3(2):202-207.

15- JALEEL, C. A., MANIVANNAN, P. A. R. A. M. A. S. I. V. A. M., WAHID, A., FAROOQ, M., AL-JUBURI, H. J., SOMASUNDARAM, R. A. M. A. M. U. R. T. H. Y., &

PANNEERSELVAM, R. 2009-Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. International Journal of Agricultural Biological. 11(1): 100-105.

16- ELKAHOUI, S., HERNÁNDEZ, J. A., ABDELLY, C., GHRIR, R., & LIMAM, F. 2005-Effects of salt on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of *Catharanthus roseus* suspension cells. Plant Science, 168(3): 607-613.

17- ISKANDAR, N. N. 2016-Vinblastine and vincristine production on madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) callus culture treated with polethylene glycol. Makara journal of science, 20(1): 2.

18- MURASHIGE, T AND F. SKOOG. 1962- A revised Medium for Rapid growth and bioassays with Tobacco tissue culture. Plant physic. 15(1):473 - 479.

19- MISHRA, M. R., SRIVASTAVA, R. K., & AKHTAR, N. 2019-Abiotic stresses of salinity and water to enhance alkaloids production in cell suspension culture of *Catharanthus roseus*. Global Journal of Bio-Science and Biotechnology 9(1): 7-14.

20- HARBORNE, A. J. 1998-Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis. springer science & business media.

21- BEKHEET, S. A. 2015- Effect of cryopreservation on salt and drought tolerance of date palm cultured in vitro. Sci Agric, 9(3): 142-149.

22- ALHUJAMY. A.J., ABDALHUSEN M. A., 2012- Effect of NaCl on Callus growth of Catharanthus roseus and its vincristine and vinblastine alkaloids content. kufa journal of biological science. (4):1. In arabic

23- MISRA, N., & GUPTA, A. K. 2006- Effect of salinity and different nitrogen sources on the activity of antioxidant enzymes and indole alkaloid content in *Catharanthus roseus* seedlings. Journal of plant physiology, 163(1): 11-18.

24- XU, M., & DONG, J. 2005- Elicitor-induced nitric oxide burst is essential for triggering catharanthine synthesis in *Catharanthus roseus* suspension cells. Applied microbiology and biotechnology, 67(1): 40-44.

25- OSMAN, M. E., ELFEKY, S. S., EL-SOUD, K. A., & HASAN, A. M. 2007-Response of *Catharanthus roseus* shoots to salinity and drought in relation to vincristine alkaloid content. Asian Journal of Plant Sciences. 6(8): 1223-1228.

26- MOKHABERI, A., AHMADI, J., & MAFAKHERI, S. 2013- The expression profile of D4H and DAT genes in *Catharanthus roseus* in response to drought, salinity and salicylic acid. Iranian Journal of Genetics and Plant Breeding. 2(2): 38-46.

27- LIU, Y., MENG, Q., DUAN, X., ZHANG, Z., & LI, D. 2017- Effects of PEG-induced drought stress on regulation of indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. Journal of Plant Interactions. 12(1): 87-91.

28- NISHANTH, M. J., SHESHADRI, S. A., RATHORE, S. S., SRINIDHI, S., & SIMON, B. 2018- Expression analysis of Cell wall invertase under abiotic stress conditions influencing specialized metabolism in *Catharanthus roseus*. Scientific reports. 8(1):1-15.