التحري عن زيادة بعض المركبات الفعالة والفيتامينات في كالس نبات الصبار *Aloe vera*

*هديل مكي حبيب** *غصون صائب صالح** *لقاء علي جازع**
*بسمة علي جاسم** *سجى حسن عبد الأمير**

استلام البحث 20، أيار، 2010
قبول النشر 18، تشرين الأول، 2010

الخلاصة:

وظفت تقانة زراعة الأنسجة النباتية لأستحثاث الكالس من نبات الصبار *Aloe vera* أذ أستعمل الوسط الزرعي Murashigueو Skooge (.MS) كامل القوة وأجريت تجربة تداخل فيها الأوكسين Naphthalin acetic acid (NAA) مع السايتوكاينين Benzyle adenine (BA) بتراكيز مختلفة ، وجد ان التوليفة 10 ملغم/لتر من NAA مع 5 ملغم/لتر من BA افضل توليفة لتكوين الكالس واستمر بالنمو بعد إجراء إعادة الزرع لذا أعتمدت هذه التوليفة. أخذ 1 غم وزن جاف لكل من الكالس الذي أستُحث من تاج crown نبات الصبار وتاج نبات الصبار المزروع في الحديقة النباتية. حضر مستخلصا التاج وبأستعمال جهاز HPLC والمحاليل القياسية لبعض المركبات الثانوية التي شملت Ascorbic acid (فيتامين C) و Salysilic acid و Nicotinic acid (فيتامين B5) للمقارنة. أظهرت النتائج زيادة بعض المركبات الثانوية في مزارع الكالس Callus culture لتاج نبات الصبار عنه في مزارع تاج الصبار المزروع حقلياً إذ بلغ تركيز Ascorbic acid في مزارع تاج الصبار المزروع حقلياً 1.829 مايكروغرام/لتر وزاد في مزارع الكالس الى 3.54 ايكروغرام/لتر، و Salysilic acid فقد زاد من 3.45 مايكروغرام/لتر الى 25.487 مايكروغرام /لتر أما المركب الثانوي Nicotinic acid فقد بلغ تركيزه في تاج الصبار المزروع حقلياً 19.391 مايكروغرام /لتر وقل التركيز في مزارع الكالس الى 7.438 مايكروغرام/لتر.

الكلمات المفتاحية: زراعة الكالس، نبات الصبار *Aloe vera*، تقانة HPLC، المركبات الثانوية.

المقدمة:

خلال السنوات الماضية تطورت الدراسات في مجال زراعة الأنسجة النباتية وأستعمالاتها في زيادة أنتاج المركبات الثانوية من بعض النباتات الطبية مقارنة بالكميات المستخرجة من النبات الكامل [1]. تمتاز هذه المركبات أيضاً بأستقرار عالي وفعالية بايولوجية عالية مقارنة بالمركبات الصناعية ذات التأثيرات الجانبية [2]. تُعد الفينولات من المركبات الثانوية الطبية المهمة في نبات الصبار *A. vera* وهي تتكون من حلقة أروماتية حاملة لمجموعة هيدروكسيل (-OH) أو اكثر، وللنباتات الطبية قدرة غير محدودة على أنتاج المركبات الأروماتية إذ تم فصل نحو 12000 نوع من هذه المركبات لحد الأن وهذه تمثل جزءاً من المجموع الكلي للمركبات الموجودة في النباتات الطبية [3]. يُعد نبات الصبار احد نباتات العائلة الزنبقية Liliaceae وهو من ذوات الفلقة الواحدة ويعد من الأعشاب المعمرة موطنه الأصلي الغابات الأستوائية وأستزرع في العراق في بداية السبعينيات [4]، يتميز الصبار بأن ساقه قائم وقد يتحور الى تركيب خازن او تراكيب ورقية، الأوراق قاعدية متبادلة وقد تختزل الى حرشفية او أنبوبية، الزهرة تامة (خنثية) وتتميز بأن نورتها عنقودية [5]. يتميز الصبار بقابليته على معالجة الجروح البسيطة وحساسية الجلد والحروق، وتعزى خاصيته المضادة للميكروبات الى مركبات الأيض الثانوية الغنية في هذا النبات ومنها الأنثراكينون وتحديداً Alion و Barbaloin فضلاً عن احتوائه على الفيتامينات المهمة مثل B5, B1 و C [6].

المواد وطرائق العمل :

أستعملت في هذه الدراسة ثلاثة محاليل قياسية standards وهي كالأتي: 1. Ascorbic acid (فيتامين C). 2. Salysilic acid 3. Nicotinic acid (فيتامين B5).
مع مستخلص كالس تاج نبات الصبار و مستخلص تاج نبات الصبار المزروع من الحديقة النباتية للمقارنة.

جمع العينات وأستخلاصها : تم في هذه الدراسة أستعمال كالس مستحث من تاج نبات الصبار والذي تم الحصول عليه بأجراء تجربة عاملية بين NAAو BA بتراكيز مختلفة وكان أفضل تداخل بين NAA بالتركيز 10 ملغم/لتر و BA بالتركيز 5 ملغم/لتر إذ استمر فيه الكالس المستحث بالنمو

* كلية العلوم للبنات / قسم علوم الحياة

ولم يتدهور بعد عملية اعادة الزرع لذا أعتمد هذا التركيز ضمن الدراسة الحالية.

وعلى وفق طريقة [7] أخذ (1) غم وزن جاف من كل من الكالس المستحث من التاج وتاج نبات الصبار النامي في الحقل وسحق بالهاون الخزفي ونقع بالكحول الأثيلي بتركيز 95% وبمقدار (15) مل ولمدة (36) ساعة، رُشح المستخلص ونقل الى جهاز الطرد المركزي عند 1500 دورة بالدقيقة ولمدة (15) دقيقة ثم ترك المستخلص لكي يتركز في الحاضنة عند درجة 32مْ، حقن جهاز HPLC بمقدار (0,02) مل من كل عينة. تم أستعمال العينات في جهاز الفصل الكروماتوكرافي ذي الأداء العالي HPLC بعد أن أجريت عملية الأستخلاص السالفة الذكر تم حقن جهاز HPLC امريكي الصنع موديل 6000نوع V6K Universal، أستخدم الكاشف UV-Vis موديل 481. أستخدم العمود C_{18} بأبعاد (150 × 3,9) ملم والمجهز من شركة Assoc. Walter Company . حقن جهاز HPLC بمقدار (0,02) مل من كل عينة والمقدار نفسه من المحاليل القياسية السالفة الذكر لأجراء المقارنة النوعية بين العينات والمحاليل القياسية.

حسب تركيز المركب في المستخلص على وفق المعادلة الاتية:

تركيز المركب في المستخلص = ذروة المساحة للمحلول القياسي × ذروة الساحة للانموذج / تركيز المحلول القياسي

النتائج والمناقشة :

أظهرت النتائج المبينة بالجدولين (1و 2) أن تركيز المركب الأول وهو Ascorbic acid في مزارع تاج الصبار 1.829 مايكروغرام/لتر وزاد في الكالس الى 3.905 مايكروغرام/لتر وتم التوصل الى زمن الترحيل مقارنة بالمنحنى القياسي لمركب Ascorbic acid إذ بلغ زمن ترحيل المحلول القياسي لهذا المركب (5) دقائق وبلغت ذروة المساحة القياسية 30.532 في حين بلغت ذروة المساحة في مستخلص مزارع تاج الصبار 5.991 وذروة المساحة لمستخلص الكالس بلغت 18.791 وتم حساب تركيز هذا المركب في مستخلص مزارع تاج الصبار على وفق المعادلة السالفة الذكر:

$$\frac{5.991 \times 30.532}{100\ \text{Ppm}} = 1.829$$

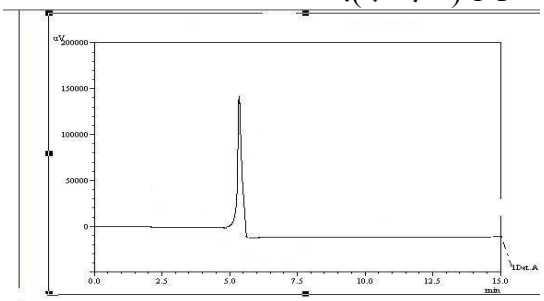
جدول (1) ذروة المساحة للمركبات الثلاثة في مزارع تاج النبات الحقلي وفي مزارع الأنسجة النباتية (الكالس)

Nicotinic acid	Salysilic acid	Ascorbic acid	Peak area
40.796	3.655	5.991	تاج النبات الحقلي
15.650	26.260	18.791	الكالس

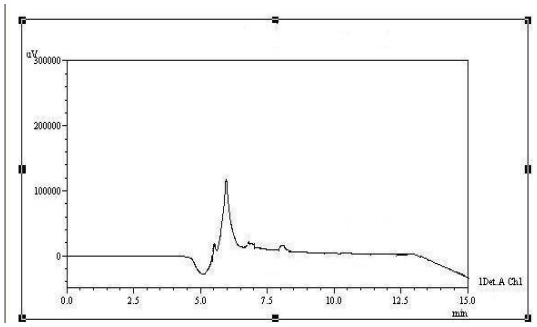
جدول (2) تراكيز المركبات الثلاثة في مزارع تاج النبات الحقلي ومزارع الأنسجة النباتية (الكالس)

Nicotinic acid	Salysilic acid	Ascorbic acid	التراكيز مايكروغرام/لتر
19.391	3.54	1.829	تاج النبات الحقلي
7.438	25.487	3.905	الكالس

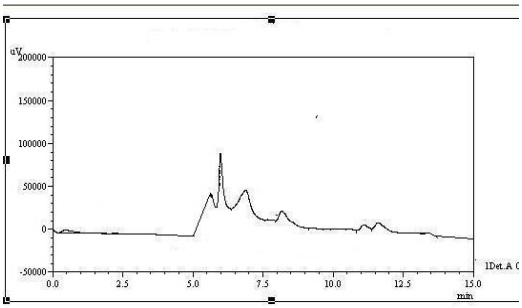
وكذلك حُسب تركيز Ascorbic acid في الكالس بالطريقة السابقة الذكر نفسها إذ بلغت ذروة المساحة لهذا المركب في المستخلص 12.791 شكل 1 (أ، ب، جـ).



شكل (1-أ) المنحنى القياسي Ascorbic acid لمستخلص تاج نبات الصبار على وفق تحليل HPLC. Rt. = 5 , Peak Area = 30.532

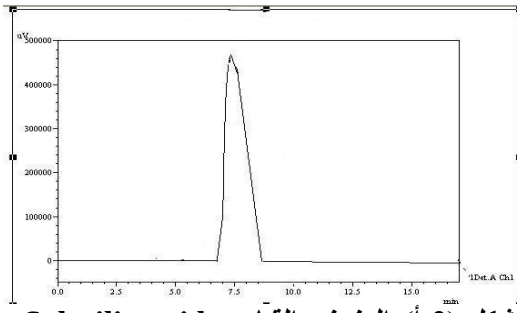


شكل (1-ب) منحنى مركب Ascorbic acid لمستخلص تاج نبات الصبار على وفق تحليل HPLC Rt.= 5 , Peak Area = 5.991

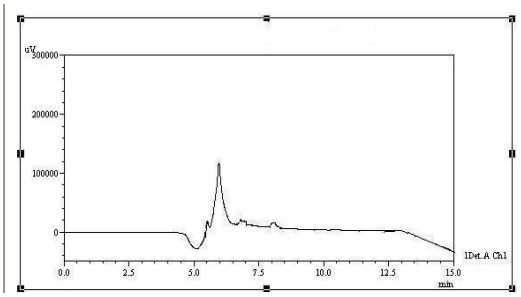


شكل (1-جـ) منحنى مركب Ascorbic acid لمستخلص كالس تاج نبات الصبار على وفق تحليل HPLC. Rt. = 5 , Peak Area = 12.791

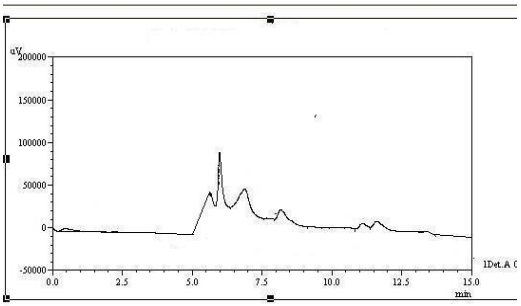
تتفق هذه النتيجة مع ماتوصل اليه [1] من أمكانية زيادة أنتاج المركبات الثانوية بأستعمال تقنية زراعة الأنسجة النباتية، أذ تم الحصول على هذا المركب بنقاوة عالية تفوق المستخرج من النبات الكامل. التركيب الكيمياوي لحامض Ascorbic acid هو $C_6H_8O_6$ و يشتق من السكر الأحادي الكلوكوز monosaccharide-glucose الذي يعد ذا فعالية أختزالية قوية ويتأكسد الى dihydroascorbic acid بواساطة الهواء، قد يكون أكسدة هذا الحامض في الهواء عاملاً مؤثراً في قلة تركيزه [8] نظراً لظروف الزراعة المعقمة والمعزولة نسبياً عن الهواء يزيد من أحتمالات مسار التخليق الحيوي لهذا الحامض [9]. أما المركب الثانوي Salysilic acid فقد بلغ في مزارع تاج نبات الصبار 3.54 مايكروغرام/لتر في حين زاد التركيز زيادة كبيرة جداً وصلت الى ثمانية أضعاف تقريباً إذ بلغ 25.487 مايكروغرام/لتر إذ بلغت ذروة المساحة للمركب القياسي 97.057 وزمن الترحيل 6.8 دقيقة ولمستخلص تاج نبات الصبار 3.655 ولمستخلص كالس تاج نبات الصبار 26.260 وتم حسابه على وفق المعادلة السابقة. هذه الزيادة قد ترجع الى حدوث طفرة جينية اذ أن أنتاج المركبات الثانوية يسيطر عليه جين خاص وفي كثير من الأحيان أنتاج هذه المركبات في النبات غير المعامل في الطبيعة يكون أقل لذلك يتم اللجوء الى زيادتها عن طريق المزارع النسيجية أما بأضافة منظمات النمو واما المحفزات واما البادئات واما المفاعلات البايلوجية[11,10] يعد Salysilic acid من المركبات الفينولية البسيطة وهو من مشتقات benzoic acid الذي ينحدرُ أساساً من furanocoumarins، يعد هذا الحامض وأستراته المثيلية methylsalysilic acid ضرورية في نظام التحميل systemic acquired resistance (SAR) في النبات ضد الأمراض [8] التركيب الكيمياوي لهذا الحامض هو $C_6H_4(OH)COOH$ والتخليق الحيوي له ضمن دورة shikimic acid الذي يتحول الى chorismic acid ثم الى prephenic acid والذي يتحول الى arogenic acid ثم phenylalanine والذي يتحول عن طريق أنزيم خاص هو phenyl (PAL) alanine ammonialyase ، تعد أضافة بعض منظمات النمو النباتية في مزارع الأنسجة النباتية ضرورياً في زيادة مسار التخليق الحيوي لهذا الأنزيم الذي يؤدي الى زيادة مسار تحويل phenylalanine الى cinnamic acid و coumaric acid وبدورهما يعطيان مركبات فينولية بسيطة والذي يعد Salysilic acid واحداً منها [12] شكل 2 (أ، ب، جـ).



شكل (2-أ) المنحنى القياسي Salysilic acid لمستخلص تاج نبات الصبار على وفق تحليل HPLC. Rt. = 6.8 , Peak Area = 97.057.



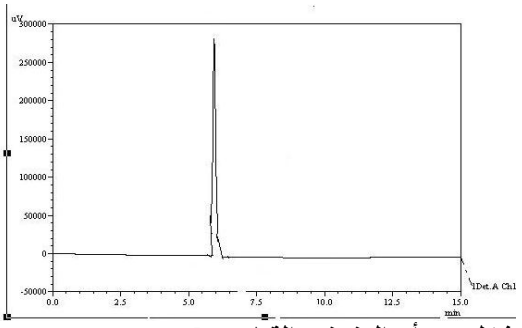
شكل (2-ب) منحنى مركب Salysilic acid لمستخلص تاج نبات الصبار على وفق تحليل HPLC .Rt.= 6.8 , Peak Area = 3.655



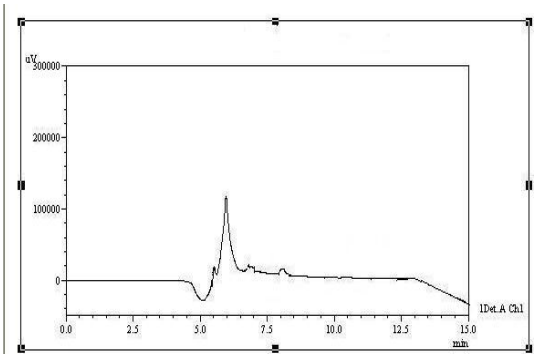
شكل (2-جـ) منحنى مركب Salysilic acid لمستخلص كالس تاج نبات الصبار على وفق تحليل HPLC. Rt. = 6.8 , Peak Area = 26.260

بلغ تركيز المركب الثانوي Nicotinic acid في مزارع تاج الصبار 19.391 مايكروغرام/لتر وفي

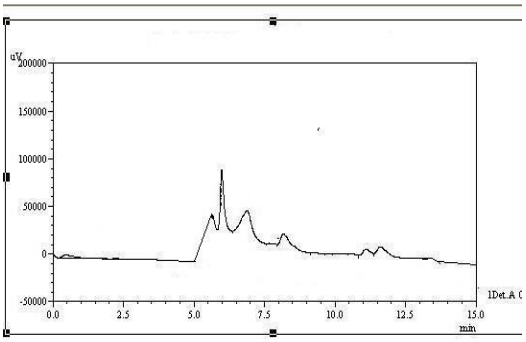
الكالس 7.438 مايكروغرام/لتر إذ بلغت ذروة المساحة لهذا المركب في المحلول القياسي 47.533 وزمن الترحيل 5.9 دقيقة وفي مستخلص مزارع تاج الصبار 40.796 وفي مستخلص الكالس 15.650 وتم حساب التراكيز على وفق المعادلة سالفة الذكر. قد يرجع قلة التركيز لهذا المركب في مستخلص الكالس الى حدوث تغايرات وراثية في الخلايا نفسها مما أثر في البناء الحيوي لهذا الحامض [14,13] شكل 3 (أ، ب، جـ). يوجد Nicotinic acid في النبات بهيئة مساعد إنزيمي co-enzyme nucleotides-NAD and NADP ويعد أحد أهم فيتامينات المجموعة B وهو فيتامين B5 التركيب الكيمياوي لهذا الحامض هو $C_5H_4NCO_2H$ له دور رئيس في تصنيع الأواصر عالية الطاقة وفي عمليات تحليل السكريات، وتحديداً التخليق الحيوي للبايروفيت وتخليق اللبيدات وأيض النتروجين وله دور رئيس في تفاعلات الأكسدة والأختزال لأنتاج ATP [9].



شكل (3-أ) المنحنى القياسي Nicotinic acid لمستخلص تاج نبات الصبار على وفق تحليل Rt. = 5.9, Peak Area = 47.533.HPLC.



شكل (3-ب) منحنى مركب Nicotinic acid لمستخلص تاج نبات الصبار على وفق تحليل Rt.= 5.9 ,Peak Area =40-796.HPLC



شكل (2-جـ) منحنى مركب Nicotinic acid لمستخلص كالس تاج نبات الصبار على وفق تحليل Rt. = 5.9, Peak Area = 15.650 .HPLC

المصادر:

1. Oomah, B. D. .2003. Isolation characterization and assessment of secondary metabolites from plants for use in human. J. plant physio. 2: 81-98.
2. Fernandez, M. A., Garcia, M. D. and Saenz, M. T. .1996. Antibacterial activity of the phenolic acid fraction of *Serophularia frutescens.* J. Ethnopharmacol ,53: 11-14.
3. Lucrecia, L., Chaillou, L. and Nazareno, A. .2009. Method to determine antioxidant activity of polyphenols. J. Agric. Food chem.. 66: 228-250.
4. Chakravarty, H. L. .1976. Plant Wealth of Iraq, a dictionary of economic plants. Botany Directorate Ministry of Agriculture and Agrarian Reform, Baghdad, Iraq: 1-51
5. Serrano, M., Valverde, JM., Guillen, F., Castillo, S., Martinez, D. and Valero, D. .2006. Use of *Aloe vera* gel coating preserves the functional properties of table grapes. J. Agric. Food chem. 54(11): 3882-3886.
6. Surjushe, A, Vasani, R, and Saple,DG. 2008. Aloe vera : A Short review. Indina J of Dermatology. 53(4): 163- 166.
7. Swamy, S. M. .2000. Cytogenetic and immunopotential effects of

producents of Radioprotective compounds. 1(1). 21-23.
11. Budhiani, O. E. .2006. Micropropagasi *Aloe vera* melalui mutiplikasi thnas Skolah Ilmudan Tekndogi Hayati (SITH). ITB. 10: 4-37.
12. Becker, W. M.; Leinsmith, L. J. and Hardin,J. .2003. The world of the cell. 5th. Edition. Benjamin Cummings publishing company, Inc. New York. 200-205.
13. Shetty, K. and Wahlqvist, M. .2004. A model for the role of the proline linked pentose phosphate pathway in phenolic phytochemical biosynthesis and mechanism of action human health and environmental applications. J. Clin. Nutre., 13 (1): 1-24.
14. يحيى، توفيق الحاج 2003. النبات والطب البديل. الدار العربية للعلوم. بيروت - لبنان.

ethanolic extract of *Nigella sativa* seeds. J. Ethanopharma. 70(1): 1-7.
8. Vanisree, M.; Lee C.; Lo, S.; Nalwadel S.; Lin, C. and Tasy, H. .2004. Studies on the production ofsome important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue culture. J. plant Biotech. Bull. Acad. Sin., 45: 1-22.
9. Craker, L. E. and Giblette, J. .2002. . Chinese medicinal herbs: Opportunities for domestic production. p. 491-496. In: J. Janick and A. Whipkey (eds.), Trends in new crops and new uses. ASHS Press, Alexandria, VA.
10. Kovalenko, P.G., Antonjuk, V.P. and Maluta, S.S. .2002. Secondary metabolites production from transformed cells of *Glycyrrhiza glabra* and *Potentilla alba* as

Detection of Some Active compounds and Vitamins Increasing in *Aloe vera* Callus culture

Hadeel M. Habeeb* Ghussun S. Salih* Liqaa A. Jazaa* Basma A. Jasim* Saja H. Abidalameer*

* College of Science for Woman / Biology Dep.

Abstract:

This study was aimed to use plant tissue culture technique to induce callus formation of *Aloe vera* on MS. Medium supplied with 10 mg/l NAA and 5 mg/l BA that exhibit the best results even with subculturing. As the method of [1] 1g. dru weight of callus induced from *A. vera* crown and *in vivo* crown were extracted then injected in HPLC using the standards of Ascorbic acid (vit. C), Salysilic acid and Nicotenic acid (vit. B5) to compare with the plant extracts. Results showed high potential of increasing some secondary products using the crown callus culture of *A. vera* as compared with *in vivo* crown, Ascorbic acid was 1.829 µg/l in *in vivo* crown and increased to 3.905 µg/l crown callus culture . Salysilic acid raised from 3.54 µg/l in *in vivo* crown and reached to 25,487µ g/l and the Nicotenic acid was 19.391 mg/l and decreased to 7.438 µg/l.