Iraqi Journal of Biotechnology ISSN 1815-4794

Global Impact Factor 0.714

المجلة العراقية للتقانات الحياتية

المجلد 14– العدد 2 – 2015

تصدر عن معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الإحيائية

للدراسات العليا

جامعة بغداد

اعضاء هيئــة التحريــر من داخل القطر

أ.د. عبد الحسين مويت الفيصل	معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الإحيائية للدراسات العليا/ جامعة بغداد	رئيس التحرير
أ.م.د. أياد جابر كبة	معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الإحيائية للدراسات العليا / جامعة بغداد	مدير التحرير
أ.د. نورية عبد الحسين	معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الإحيائية للدراسات العليا / جامعة بغداد	عضواً
أ.د. محمد ابراهيم نادر	معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الإحيائية للدراسات العليا / جامعة بغداد	عضواً
أ.م.د. اسماعيل حسين عزيز	معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الإحيائية للدراسات العليا / جامعة بغداد	عضواً
أ.م.د. شروق محمد كاظم سعد الدين	معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الإحيائية للدراسات العليا / جامعة بغداد	عضواً
أ.م.د. ماجد شايع حمد الله	كلية الزراعة / جامعة بغداد	عضواً
أ.م.د. بشرى محمد جابر	كلية العلوم للبنات / جامعة بغداد	عضواً
أ.م.د. محسن عبد الموسوي	كلية العلوم / جامعة كربلاء	عضواً
أ.م.د. ابراهيم اسماعيل المشهداني	مركز بحوث التقنيات الاحيائية / جامعة النهرين	عضواً

إعضاء هيئة التحرير الدوليين

أ.د. خالد طويال	مستشفى كايز / لندن	عضواً
أ.د. محمد علي فاضل	جامعة دبلن / ايرلندا	عضواً

اعضاء الهيئة الاستشارية من داخل القطر

أ.د. علي حسين ادحية	وحدة بحوث أمراض المناطق الحارة / جامعة بغداد	عضواً
أ.د. كاظم محمد ابراهيم	كلية التقنيات الاحيائية التطبيقية / جامعة النهرين	عضواً
أ.د. سعد صالح الدجيلي	المعهد العالي لمعالجة العقم والتقنيات المساعدة للانجاب / جامعة النهرين	عضواً
أ.د. ضحى سعد صالح	كلية العلوم / جامعة بغداد	عضواً
أ.د. نعمان سلمان السامرائي	كلية الطب البيطري / جامعة بغداد	عضواً
أ.د. علي محمد الشيباني	كلية التربية للبنات / جامعة بغداد	عضواً
أ.د. نضال عبد المهيمن	كلية الطب / جامعة النهرين	عضواً
أ.د. خضر الجوراني	كلية العلوم/ الجامعة المستنصرية	عضواً
أ.م.د. عبد الكريم القزاز	كلية العلوم / جامعة بغداد	عضواً

إعضاء الهيئة الاستشارية الدوليين

أ.د. يالشن كايا	جامعة تراكيا/ تركيا	عضواً
أ.د. ناتيدا ويرابرياكول	كلية الصيدلة /جامعة كون كاين/ تايلند	عضواً
أ.د. ساهابات باروسركس	كلية الطب/ جامعة كون كاين / تايلند	عضواً
أ.د. باولا رو	كلية الطب/ جامعة سوانزي/ بريطانيا	عضواً

السكرتارية

زينب هادي حسين	معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الإحيائية للدراسات العليا / جامعة بغداد	مترجم

المحتويات

المعالجة الحيوية لمتبقيات الأكريلونايتريل المسرطنة باستخدام الأحياء المجهرية سفيان محمد شرتوح	**1**	**تسجيل جديد لنوعين من مثقوبات عائلة Echinostomatidae من بعض الطيور المائية في محافظة البصرة** عبد الحسين حبش عواد ، التفات عامر عبد الله التميمي	**56**
دراسة مستويات الكلوتاثايون ومالون ثنائي الديهايد ومواصفات السائل المنوي لدى عمال المخابز والأفران الحجرية في مدينة كركوك سنور دلشاد علي الزنگنة ، صاحب جمعة عبد الرحمن	**8**	**دراسة كمية ونوعية للدايتومات الهائمة في قطاع من نهر دجله بين بغداد والدجيل مع تسجيل انواع جديدة** ابراهيم مهدي السلمان ، بثينة عبد العزيز حسن	**63**
استخدام مؤشرات بايولوجية لدراسة تأثير بيئة العمل على العاملين في محطة كهرباء الدورة سراب سلمان كاظم ، جانيت لازارزوزان ، رسل بهاء الدين حسين ، سها عبد الحكيم	**20**	**استعمال فطريات المايكورايزا الحويصلية الشجيرية نوع *G. leptotichum* لمعالجة تربة مزيجية ملوثة بعنصري بالكاديوم والرصاص** مهدي صالح ياسر العتابي	**86**
تشخيص طفيليات الجنس *Paradiplozoon* (الديدان المسطحة أحادية المنشأ) المتطفلة على بعض أسماك نهر الفرات، العراق ساري عبيد خليفة السلماني وفاطمة شهاب الناصري	**28**	**الكشف عن بكتريا *Escherichia coli* O157:H7 في بعض أنواع اللحوم ومنتجاتها المتوافرة في الأسواق المحلية** رأفت أحمد أبو المعالي ، عادل تركي الموسوي	**99**
الكفاءة الأفتراسية للمفترس *Scymnus syriacus* (Coleoptera:Coccinellidae) Marseul على مَنْ القطن Aphis gossypii Glover (Homoptera :) Aphididae سنداب سامي جاسم الدهوي ، عبدالستار عارف علي ، صالح حسن سمير	**37**	**المقارنة بين المجتمعات السكانية لشغالات نحل العسل *Apis melliphera L* لمحافظتي بغداد وبابل باستخدام المقياس الهندسي** رياض علي عكيلي ، أحمد جاسم محمد ، عمار أحمد القرة غولي، باسم شهاب حمد ، ايلاف مؤيد قاسم ، أياد أحمد الطويل ، عماد أحمد محمود	**108**
الكشف عن التلوث الميكروبي وبعض العناصر الثقيلة لعينات من البذور المحمصة (الكرزات) في مدينة بغداد رنا علي حسن ، زينه هاشم شهاب ، فرح لطيف وهاب ، حوراء عمران ميرك	**48**	**ايجاد وسط غذائي محلي جديد للبكتريا المثبتة للنتروجين (*Rhizobium spp.*)** خميس حبيب مطلك ، حازم جاسم عبد الوهاب ، عيسى صالح مهدي ، صفاء عبد الرحيم محمود	**119**

المحتويات

دراسة تصنيفية كيميائية مقارنة للمركبات الفينولية لأنواع الجنس (Labiatae) L. *Nepeta* النامية بريا في العراق خزعل ضبع وادي الجبوري ، علي حسين عيسى الموسوي	**129**	**دراسة تعدد اشكال بروموتر جين الانترليوكين-6 للموقع - 174 G/C وتأثيره على مستوى الانترليوكين-6 لبعض مرضى التهاب المفاصل الرثوي** عدنان فاضل العزاوي ، سيماء عبد الرحمن شعبان ، اشواق ابراهيم العبيدي ، عقيل حسين العاصي	**214**
دراسة بيئية للقشريات في هور الدلمج / وسط – العراق ميسون حسن مشجل السراي، هيفاء جواد جوير	**143**	**الكشف عن الفطريات الملوثة للوسط الزرعي للفطر المحاري ومكافحتها** حرية حسين الجبوري ، كامل سلمان جبر ، أياد وليد عبدالله الجبوري	**228**
تأثير اول اوكسيد الرصاص (Pbo) على بعض معايير الكلية الفسيولوجية والنسجية لذكور الجرذان البيض حيدر كامل زيدان السعدي ، هالة عبد الهادي عبد الغني جابك	**154**	**تأثير تصاريف محطة كهرباء الرشيد في التنوع الإحيائي لأحياء متفرعة اللوامس في نهر دجلة ، جنوب بغداد** مهند رمزي نشأت ، إنعام كاظم عباس ، إيمان حسن علي ، فاطمة شغيت مفتن	**243**
دراسة مستضدات التطابق النسيجي من الصنف الاول الموقع A لمرضى تصلب الاعصاب المتعدد في العراق رشا ماجد عبد الامير حميد ، د.طالب عبد الله حسين ، دريد قاسم جاسم الشريف	**166**	**دور حامض السالسليك في نمو نبات الحلبة (*Trigonella foenum - L. graecum*) تحت ظروف الاجهاد المائي** حسن عبدالرزاق علي السعدي ، عباس جاسم حسين الساعدي ، امل غانم محمود القزاز	**255**
ملاحظات بيئية عن القوقع *Cornu aspersum* من صنف بطنية القدم (عائلة Helicidae) في ثلاث محافظات وسط العراق إيمان حسين عبد ، عماد الدين المختار	**180**	**تأثير المجال الكهرومغناطيسي في نسبة الانبات والحاصل وبعض الخصائص الكيميائية لنبات العصفر *Carthamus tinctorius L.*** ماهر زكي فيصل ، مروة قيس إبراهيم	**268**
دراسة التكـوين النوعي والكمـي للطحالب الملتصقة على نوعين من النباتات المائية الغاطسة في هور العودة ضمن مدينة العمارة، محافظة ميسان، جنوب العراق جنان شاوي الحسائي	**194**	**تاثير اضافة الليكوبين الى العليقة في بعض الصفات الكيموحيوية للسائل المنوي لذكور الاوز المحلي** حازم جبار الدراجي ، يحيى عباس مرداس الجنابي	**282**

المحتويات

تأثير الكافيين و المستخلص المائي و الكحولي للشاي الاخضر *Camellia sinensis* على الخمج التجريبي بالاميبا الحالة للنسيج *Entamoeba histolytica* في الفئران المختبرية مروان عبد الهادي حسين الجنابي ، الهام عائد اسعد التكريتي	**296**	**الفاعلية الحقلية لبعض أنواع المبيدات في مكافحة حوريات حلم الغبار *Oligonychus afrasiaticus*** حسين فاضل الربيعي ، محمد زيدان خلف ، جواد بلبل الزيداوي، فلاح حنش نهر	**381**
تأثير المستخلص الكحولي لنبات البمبر(*Cordal myxa L.*) على انزيمي GST, ALP ومضادات الاكسدة MDA في ذكور الفئران البيض المعاملة بمركب رابع كلوريد الكاربون أقبال فاضل علوان ، عمار مولى حمود ، عصام فاضل الجميلي	**314**	**التأثير السمي الخلوي للمستخلص المائي الخام لنبات عين البزون *Vinca rosea* في خلايا سرطان عنق الرحم البشري(Hela) خارج الجسم الحي** هند حسين عبيد ، لقاء حسون صكبان ، مصطفى نهاد جمعة الداجي ، رافد محمد كريم ، ديمة نزار باصات ، داليا أزهر أحمد	**388**
تأثير تبليل التربة بخليط البكتريا *Pseudomonas fluorescenes* و *Bacillus subtilis* في مقاومة فيروس موزائيك الخيار ليلى جبار صبر و ميسر مجيد جرجيس	**327**	**التقييم البيئي لتراكيز الهيدروكربونات العطرية متعددة الحلقات في الهواء لمحطة كهرباء الدورة في مدينة بغداد** اسراء محمد حسين الموسوي ، مثنى عبد الجبار شنشل ، عدنان حسن عفج	**403**
تأثير المعاملة بالجبرلين وفطر الترايكوديرما في نسبة وسرعة تنبيت وفعالية أنزيمي Peroxidase و amylase لبذور هجن الباذنجان فلاح حسن عيسى	**343**	**تقدير وتشخيص Proanthocyanidine في مخلفات عصير العنب المطحونة وغير المطحونة بجهاز الكروماتوكرافي السائل عالي الاداء** نضال محمد صالح ، رؤى جاسم كاظم	**415**
اختبار مدى فعالية بعض المستخلصات النباتية في نمو بعض الفطريات الجلدية dermatophyte خارج وداخل الجسم الحي فرح ل. وهاب و زهراء ر. طه و طيبة هـ. محمد	**355**	**تأثير المعاملة بفترات البرودة والرش بمستخلص عرق السوس في نمو واثمار الشليك Fragania X ananassa Duch. صنف Festival** فاطمة خيون محمد الوائلي رئاسة جامعة بغداد	**427**
استخدام تقنية تفاعل البلمرة التسلسلي المتعدد Multiplex PCR لتشخيص بعض انواع البكتريا السالبة لصبغة كرام وتحديد مقاومتها للمضادات الحياتية احمد عبد الجبار سليمان ، تمارا عدنان منديل ، احمد محمد تركي	**366**		

Iraqi Journal of Biotechnology, 2015, Vol. 14, No. 2 , 282-295

تاثير اضافة الليكوبين الى العليقة في بعض الصفات الكيموحيوية للسائل المنوي لذكور الاوز المحلي

حازم جبار الدراجي و يحيى عباس مرداس الجنابي

كلية الزراعة / جامعة بغداد ، وزارة العلوم والتكنلوجيا

الخلاصة: اجريت هذه الدراسة في حقل الطيور الداجنة التابع لقسم الثروة الحيوانية في كلية الزراعة / جامعة بغداد واستمرت التجربة الحقلية للمدة من 20 / 10 / 2013 ولغاية 28 / 3 / 2014، في الوقت الذي استمر فيه العمل المختبري حتى انتهاء مدة التجربة الكلية في 1 / 10 / 2014 لدراسة تاثير اضافة مستويات مختلفة من الليكوبين (Lycopene) الى العليقة في بعض الصفات الكيموحيوية للسائل المنوي لذكور الاوز المحلي. استعمل في التجربة 24 ذكر من الاوز المحلي وبعمر 2 سنة. وزعت الذكور عشوائياً على اربع معاملات، وبواقع 6 ذكور لكل معاملة. غذيت الطيور تغذية حرة على عليقة موحدة طوال مدة التربية تحتوي على 15.2% بروتين خام و 2927.3 كيلو سعرة طاقة ممثلة / لكل كغم علف. اضيف الليكوبين الى العليقة بثلاث تراكيز هي 300 و 600 و 900 ملغم / كغم علف لتمثل المعاملات T300 و T600 و T900على التوالي، بينما بقيت المعاملة T0 بدون اي اضافة وعدت كمعاملة سيطرة. ادت اضافة الليكوبين الى علائق ذكور الاوز بشكل عام الى انخفاض معنوي ($P\leq0.05$) في تركيز الكلوكوز والكولسترول وانزيمات الاسبارتيت امينوترانسفيريز Aspartate aminotransferase (AST) والالنين امينوترانسفيريز Alanine aminotransferase (ALT) والمالون داي الدهايد Malondialdehyde (MDA) في البلازما المنوية والى انخفاض عالي المعنوية ($P\leq0.01$) في تركيز البروتين في البلازما المنوية في جميع اشهر التجربة وفي المعدل العام لهذه الصفات. يستنتج من التجربة الحالية ان اضافة الليكوبين بمستويات مختلفة الى علائق ذكور الاوز المحلي ادت الى تحسن معنوي في الصفات الكيموحيوية للسائل المنوي ولجميع اشهر التجربة التي شملتها الدراسة الحالية، وبالتالي يمكن استخدام الليكوبين كاضافة غذائية مهمة لتعزيز الأداء التناسلي للطيور.

الكلمات المفتاحية: الليكوبين، صفات السائل المنوي الكيموحيوية ، الاوز المحلي

Effect of dietary supplementation with lycopene on some semen biochemical traits of local ganders

Hazim Jabbar Al-Daraji , Yihea Abas Al –Jnabi

College of Agriculture, University of Baghdad , Ministry of Sciences and Technology

Abstract: This study was conducted at the Poultry Farm belonging to the Department of Animal Resource, College of Agriculture, University of Baghdad during the period from 20/10/2013 to 28/3/2014 (Field Trial), while the lab work extended to the end of experiment on 1 / 10 / 2014. The aim of this study was to investigate the effect of dietary supplementation with different level of lycopene on some semen biochemical traits of local ganders. A total of 24 local ganders, two years old were used in this study. The geese were randomly distributed into four treatments groups of 6 birds each. Birds were fed during the whole period on diet containing 15.2 % crude protein and 2927.3 Kcal metabolic energy / kg. Lycopene was added to the diets of birds at the beginning till the end of experiment period. The birds were reared in single separated cages during the experiment period. groups were as following: Treatment 1 (T0) birds fed diet without any addition of lycopene (control group) , Treatment 2 (T300) birds fed diet supplemented with 300 mg lycopene / Kg of diet, Treatment 3 (T600) birds fed diet supplemented with 600 mg lycopene / Kg of diet, Treatment 4 (T900) birds fed diet supplemented with 900mg lycopene / Kg of diet. Results revealed that dietary supplementation with different levels of lycopene resulted in significant ($P\leq0.05$) decrease in seminal plasma glucose, cholesterol, and MDA and activity of seminal plasma AST and ALT and highly significant decrease ($P\leq0.01$) in seminal plasma protein during all months of experiment and as regards the total means of these traits. In conclusion, supplementing the diet of ganders with different levels of lycopene resulted in significant improvement in semen biochemical traits during all periods of experiment, thus lycopene can be used as an important feed additive to enhance reproductive performance of birds.

Key words: Lycopene, semen biochemical parameters, ganders.

المقدمة

الليكوبين هي الصبغة الحمراء أو الصفراء أو البنية التي تتواجد في بعض الخضراوات والفواكه، كالطماطة والمشمش والشمام، والبطيخ، والجوافة الوردية، والجريب فروت ذي القلب الوردي، ولكنها تتواجد بتراكيز عالية في ذوات اللون الاحمر، وخاصة الطماطة (1). الليكوبين مشتق كاروتيني، وهو عبارة عن صبغة طبيعية تصنعها النباتات والأحياء الدقيقة أثناء عملية التمثيل الضوئي لحمايتها من النشاط الضوئي وزيادة الحساسية الضوئية (2) ويضفي الليكوبين اللون الأحمر الخاص بالخضار والفواكه الغنية به (3). وقد أشارت الكثير من الدراسات منها (4) إلى أن تناول الطماطة ومنتجاتها المصنعة والمحتوية على الليكوبين تساهم في الوقاية من بعض الأمراض المزمنة نظرا لنشاطه المقاوم للأكسدة الذي يبلغ ضعف نشاط باقي مكونات البيتاكاروتين وعشرة أضعاف التوكوفيرول (5). كما أرتبط تناول الليكوبين بخفض الإصابة بهشاشة العظام ونقص كثافتها (6). وقد أثبتت العديد من الدراسات الحديثة قدرة هذه المادة الكيميائية على الوقاية اوالحماية اوالتقليل من التاثيرات الضارة للجذورالحرة وتقليل الاجهاد التاكسدي داخل الجسم الحي وتقليل الاصابة بالعديد من الامراض سواء في الانسان او الحيوان (7). ويعتبر طائر الاوز من الطيور الاقتصادية المهمة في مجال الانتاج الداجني، ويربى الاوز

اما بالإنتاج المكثف أوعن طريق التربية في قطعان صغيرة في المزارع والمنازل، اذ يمكن لتلك المشاريع بالإضافة لمساهمتها في زيادة الإنتاج الداجني المساهمة في تشغيل الشباب والتقليل من البطالة. وتتميز طيور الاوز بمقاومتها للأمراض وعدم حاجتها لبرامج خاصة للتلقيح ولها مناعة طبيعية عالية ضد أخطر مرضين يصيبان الدواجن وهما النيوكاسل والإسهال الأبيض وانها تتحمل درجات الحرارة العالية والمنخفضة ونسب الرطوبة المرتفعة وقابليتها للرعي والتغذية على المخلفات الحقلية والمنزلية (8). وكذلك يمكن ان يستخدم في تغذيتها علائق رخيصة الثمن نسبيا ويمكن تربيتها بنجاح على المسطحات المائية مما يساعدعلى تطهيرها من النباتات والطحالب والحشائش الضارة (9). وتعتبر مخلفات الاوز سماد عضوي غني بالنيتروجين لذا فأن تربيته بالمزارع السمكية يساعد على تنمية الغذاء الطبيعي للأسماك علاوة على أن بعض الأسماك يمكن أن تتغذى على هذه الفضلات (10). ولا تحتاج تربية الاوز الى استثمارات كبيرة وذلك لعدم حاجته الى بنايات مبردة في الصيف او تدفئة في الشتاء اضافة الى ان تغذيته يمكن ان تعتمد بشكل رئيسي على الرعي وهو سريع النمو فعندما يعطى علائق تسمين يصل لمتوسط وزن 4– 6 كغم في ظرف 8 أسابيع. ويمتاز الاوز بان لحومه تعتبر من اغنى انواع اللحوم بالبروتين اذ تبلغ نسبة البروتين في لحوم الاوز 22.3 % بينما تبلغ 20.6 و 16.8 و 14 % في كل من الدجاج و الابقار والاغنام على التوالي (11) وذكر نفس الباحث بان لحوم الاوز تعد شائعة بدرجة كبيرة للاستهلاك بسبب ارتفاع قيمته الغذائية خصوصا في دول أوروبا فهنالك رغبة كبيرة في استهلاك لحم الاوز. ان معظم الدراسات السابقة ركزت على دور الليكوبين في تعزيز الصحة العامة للانسان ودوره كمضاد اكسدة طبيعي فعال اضافة الى دوره في وقاية البشر من الامراض القلبية والسرطانات المختلفة. ولم تكن هناك دراسات على هذا المركب في مجال الطيورالداجنة الا بصورة محدودة لذلك اجريت هذه الدراسة لمعرفة تاثير اضافة الليكوبين الى العليقة في بعض الصفات الكيموحيوية للبلازما المنوية لذكور الاوز المحلي.

المواد وطرق العمل

اجريت هذه الدراسة في حقل الطيور الداجنة التابع لقسم الثروه الحيوانية في كلية الزراعة / جامعة بغداد واستمرت التجربة الحقلية للمدة من 20 / 10 /2013 ولغاية 28 / 3 / 2014، في الوقت الذي استمر فيه العمل المختبري حتى انتهاء مدة التجربة الكلية في 1 / 10 / 2014. لدراسة تاثير اضافة مستويات مختلفة من الليكوبين الى العليقة في بعض الصفات الكيموحيوية في البلازما المنوية لذكور الاوز المحلي. استعمل في التجربة 24 طيرمن ذكور الاوز المحلي بعمر 2 سنة، جهزت من حقل خاص في منطقة التاجي شمال بغداد. اسكنت الطيور في قاعة التجربة المتضمنة اقفاص سلكية شبكية. وزعت الطيور عشوائيا على اربع معاملات، وبواقع 6 ذكور لكل معاملة اذ عد كل قفصين مكرر و تم تسكين طير واحد في كل قفص اي ان كل مكرر يتكون من ذكرين وبواقع ثلاثة مكررات لكل معاملة. غذيت الطيور تغذية حرة على عليقة موحدة طوال مدة التربية تحتوي على 15.2% بروتين خام و 2927.3 كيلوسعرة طاقة ممثلة / لكل كغم علف.وصنعت العليقة في معمل علف الطيور الداجنة العائد لحقل الطيورالداجنة / قسم الثروة الحيوانية / كلية الزراعة / جامعة بغداد، زودت هذه الاقفاص بمعالف طولية وكذلك مناهل طولية. وقدم العلف والماء بصورة حرة طيلة مدة التجربة. طبق برنامج اضاءة يتضمن 16 ساعة ضوء و8 ساعات ظلام خلال اليوم طوال مدة التربية. اضيف الليكوبين المجهز من شركة Naturalin Bio- Resources الصينية، الى العليقة بثلاث تراكيز هي 900 و 600 و 300 ملغم / كغم علف بينما بقيت

معاملة السيطرة بدون اي اضافة ليصبح توزيع المعاملات على النحو التالي :

1. المعاملة الاولى T0: 0 ملغم ليكوبين / كغم علف (السيطرة).
2. المعاملة الثانية T300: 300 ملغم ليكوبين / كغم علف.
3. المعاملة الثالثة T600: 600 ملغم ليكوبين / كغم علف.
4. المعاملة الرابعة T900: 900 ملغم ليكوبين / كغم علف.

جمع السائل المنوي

جمع السائل المنوي من ذكور الاوز حسب الطريقة التي ذكرها (12) وتتطلب طريقة الجمع وجود شخصين، يقوم الأول بمسك الطير بجعل رأسه إلى الخلف والمجمع إلى الأمام، اما الشخص الأخر فيقوم بتدليك المنطقة الظهرية والبطنية وحول العظام العانية إلى إن تنبثق لاحقة الجماع ويتدفق السائل المنوي إلى أنبوبة الجمع.

تركيز الكلوكوز :

قدر تركيز الكلوكوز في البلازما المنوية حسب التعليمات المرفقة مع العدة الجاهزه لتقدير تركيز الكلوكوز والمنتجة من قبل شركة Biomaghreb الاسبانية، وباستعمال جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer، وحسب الطريقة التي ذكرها (13).

قياس تركيز البروتين الكلي :

قدر تركيز البروتين الكلي في البلازما المنوية حسب التعليمات المرفقة مع العدة الجاهزة والمنتجة من قبل شركة Biomaghreb الاسبانية، وعلى حسب الطريقة التي اشار اليها (14).

تركيز الكولسترول :

اتبعت النشرة المرفقة مع العدة القياسية المرفقة من قبل شركة REACTIFS BIOLABO الفرنسية وحسب الطريقة التي اشار اليها (15).

قياس فعالية إنزيم Aspartate aminotransferase (AST)

استعملت العدة القياسية المنتجة بواسطة شركة RANDOX laboratories limited الانكليزية ، والتي أشار إليها (16) وذلك لقياس فعالية إنزيم Aspartate aminotransferase في البلازما المنوية.

قياس فعالية إنزيم Alanine aminotransferase

تم قياس فعالية إنزيم Alanine aminotransferase (ALT) في البلازما المنوية بواسطة العدة القياسية الجاهزة والمنتجة من قبل شركة RANDOX laboratories الانكليزية وهي الطريقة التي أشار إليها (16).

قياس تركيز المالون داي الدهايد Malondialdehyde (MDA)

تم قياس تركيز (MDA) وفق الطريقة التي ذكرها (17).

استعمل البرنامج الإحصائي Statistical SAS- Analysis System (18) في تحليل البيانات لدراسة تأثير المعاملات المختلفة في الصفاة المدروسة وفق التصميم العشوائي الكامل (CRD) وقورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات باختبار Duncan متعدد الحدود (19).

النتائج والمناقشة

تركيز الكلوكوز في البلازما المنوية:

يتبين من الجدول (1) وجود انخفاضاً معنوياً ($P\leq0.05$) في تركيز الكلوكوز في

البلازما المنوية لصالح المعاملات T900 و T600 مقارنةً مع المعاملتين T300 و T0 أثناء كل المدد التجريبية جميعها، بينما لم تختلف المعاملتين T300 و T0 معنويا على الرغم من الانخفاض الحسابي للمعاملة T300 إلا إن هذا الانخفاض لم يصل الى المستوى المعنوي. كما لوحظ انخفاض معنوي ($P\leq0.05$) لصالح معاملة الليكوبين T900 مقارنةً بباقي معاملات الليكوبين T600 و T300 في كل مراحل التجربة تلتها المعاملة T600. ومن الجدول نفسه يمكن إن نلاحظ انخفاض المعدل العام للمعاملتين T900 و T600 معنوياً ($P\leq0.05$) عن المعدل العام لمعاملة السيطرة T0. وانخفاض المعدل العام للمعاملة T900 معنوياً عن باقي معاملات الليكوبين T600 و T300 وكذلك انخفاض المعدل العام للمعاملة T600 معنويا عن المعدل العام للمعاملة T300. بينما لم يختلف المعدل العام لمعاملة الليكوبين T300 معنوياً عن المعدل العام لمعاملة السيطرة. اذ بلغت المعدلات العامة لهذه الصفة 33.32 و 32.12 و 28.12 و 24.72 ملغم / ديسيلتر للمعاملات T0 و T300 و T600 و T900 على التوالي.

جدول (1): تأثير إضافة مستويات مختلفة من الليكوبين في تركيز الكلوكوز (ملغم / ديسيلتر) (المتوسط± الخطأ القياسي) في البلازما المنوية لذكور الاوز المحلي.

المدة	المعاملات				مستوى المعنوية
	T0	T300	T600	T900	
الشهر الأول	36.9 ^{a} 0.073 ±	35.8 ^{a} 0.051±	32.51 ^{b} 1.10 ±	26.8 ^{c} 0.38 ±	*
الشهر الثاني	30.1 ^{a} 0.75 ±	30.21 ^{a} 0.54 ±	27.11 ^{b} 0.37 ±	22.8 ^{c} 0.39 ±	*
الشهر الثالث	28.6 ^{a} 0.23 ±	27.6 ^{a} 0.24 ±	24.5 ^{b} 0.62 ±	21.9 ^{c}0.054 ±	*
الشهر الرابع	36 .8 ^{a} 0.47 ±	35.2 ^{a} 0.57 ±	30.2 ^{b} 0.85 ±	27.8 ^{c} 0.26 ±	*
المعدل العام	33.32 ± ^{a} 1.42	32.12 1.8 ^{a} ±	28.12 ^{b} 1.05 ±	24.72 ^{c} 0.78 ±	*

المعاملات: T0 = 0 ملغم ليكوبين / كغم علف، T300 = 300 ملغم ليكوبين / كغم علف، T600 = 600 ملغم ليكوبين / كغم علف، T900= 900 ملغم ليكوبين / كغم علف. كل مدة تمثل معدل اسبوعين. الحروف المختلفة ضمن الصف الواحد تدل على وجود فروق معنوية بين متوسطات المعاملات. * وجود فروق معنوية عند مستوى احتمال $P\leq0.05$.

إن الانخفاض الحاصل في تركيز الكلوكوز في البلازما المنوية نتيجة لإضافة الليكوبين الى علائق ذكور الاوز المحلي قد يرجع للزيادة الحاصلة في نشاط النطف العام مما أدى الى ارتفاع معدل الايض وزيادة استهلاك الكلوكوز، اذ يعد الكلوكوز الركيزة الأساسية لطاقة النطف (20). علما بان هناك علاقة عكسية تربط بين تركيز النطف ونشاطها من جهة وبين تركيز الكلوكوز في البلازما المنوية لذكور الطيورمن جهة أخرى (21). كما إن هناك ارتباطا سالبا بين تركيز النطف في القذفة وبين تركيز الكلوكوز في البلازما المنوية (22). وأكد هذه النتيجة كل من الخزرجي (23) و الحياني (24).

تركيز الكولسترول في البلازما المنوية

يتضح من الجدول (2) وجود انخفاض معنوي ($P\leq0.05$) في تركيز الكولسترول في

البلازما المنوية لصالح المعاملات T300 و T600 و T900 مقارنةً مع معاملة السيطرة T0 أثناء كل المدد التجريبية، مع ملاحظة انخفاض معنوي ($P\leq0.05$) لصالح معاملة الليكوبين T900 مقارنةً بباقي معاملات الليكوبين T600 و T300 طيلة مدة التجربة تلتها المعاملة T600 ثم T300. ومن الجدول نفسه يمكن ملاحظة انخفاض المعدل العام لتركيز الكولسترول في البلازما المنوية للمعاملة T900 معنوياً عن باقي معاملات الليكوبين T600 و T300 والتي سجلت جميعاً انخفاضاً معنوياً ($P\leq0.05$) في معدلاتها العامة مقارنةً بمعاملة السيطرة T0، كذلك انخفض المعدل العام للمعاملة T600 معنوياً عن المعدل العام للمعاملة T300. اذ بلغت المعدلات العامة لهذه الصفة 11.97 و 8.60 و 7.43 و 6.61 ملغم / ديسيلتر للمعاملات T0 و T300 و T600 و T900 على التوالي.

جدول (2): تأثير إضافة مستويات مختلفة من الليكوبين في تركيزالكولسيترول (ملغم / ديسيلتر) (المتوسط ± الخطأ القياسي) في البلازما المنوية لذكور الاوز المحلي.

المدة	المعاملات				مستوى المعنوية
	T0	T300	T600	T900	
الشهر الأول	11.5 ^{a} 0.080 ±	8.8 ^{b}0.121 ±	7.2 ^{c} 0.170 ±	6.4 ^{d} 0.115 ±	*
الشهر الثاني	12.3 ^{a} 0.075 ±	8.5 ^{b} 0.10 ±	7.8 ^{c}0.052 ±	6.5 ^{d}0.112 ±	*
الشهر الثالث	12.8 ^{a} 0.012 ±	8.8 ^{b} 0.121 ±	7.7 ^{c} 0.115 ±	7.2 ^{d} 0.088 ±	*
الشهر الرابع	11.6 ^{a} 0.088 ±	8.9 ^{b} 0.126 ±	7.0 ^{c} 0.122 ±	6.5 ^{d} 0.120 ±	*
المعدل العام	11.97 ^{a}0.160 ±	8.60 ^{b}0.071 ±	7.43 ^{c}0.111 ±	6.61 ^{d}0.110±	*

المعاملات: T0 = 0 ملغم ليكوبين / كغم علف، T300 = 300 ملغم ليكوبين / كغم علف، T600 = 600 ملغم ليكوبين / كغم علف، T900= 900 ملغم ليكوبين / كغم علف. كل مدة تمثل معدل اسبوعين. الحروف المختلفة ضمن الصف الواحد تدل على وجود فروق معنوية بين متوسطات المعاملات. * وجود فروق معنوية عند مستوى احتمال $P\leq0.05$.

إن ارتفاع الكولسترول في البلازما المنوية يترافق عادةً مع ارتفاع النسبة المئوية للنطف الميتة والمشوهة (22). وعلى العكس فان انخفاض تركيز الكولسترول يحدث عندما تكون النطف في حالة من النشاط والحيوية أو عندما يزداد تركيز وايض النطف وبما ان الليكوبين مضاد أكسدة فعال يعمل على حماية النطف من الإضرار المدمرة للجذور الحرة والمحافظة على غشاء خلية النطفة وتحسين صفات السائل المنوي وزيادة حيوية النطف ونشاطها (25) لذلك يصبح من البديهي القول ان السبب في انخفاض تركيز الكولسترول يعود الى قدرة الليكوبين العالية على المحافظة على خلايا النطف من التأكسد وزيادة نشاطها وفعاليتها، وهذا ما أثبتته هذه الدراسة إذ سجلت وجود علاقة عكسية بين تركيز الكولسترول في البلازما المنوية والتحسن في صفات السائل المنوي. وقد اتفقت هذه النتيجة مع ما توصل إليه الحياني (24). كذلك أكد هذه النتيجة (26) إذ وجدوا بان إضافة الليكوبين الى مخففات السائل المنوي للطيور الداجنة قد أدى الى تحسين معنوي في كل من نسبة النطف الحية وحركة النطف ونشاطها وترافق ذلك مع

انخفاض تركيز الكولسترول في البلازما المنوية.

تركيز البروتين الكلي في البلازما المنوية

يتبين من الجدول (3) إن هناك تأثير عالي المعنوية ($P\leq0.01$) لإضافة الليكوبين الى علائق ذكور الاوز المحلي باتجاه خفض تركيز البروتين في البلازما المنوية لهذه الذكور، اذ يتضح من الجدول المذكور وجود انخفاض عالي المعنوية ($P\leq0.01$) في تركيز البروتين في البلازما المنوية لصالح معاملات الليكوبين T900 و T600 و T300 مقارنةً مع معاملة السيطرة T0 أثناء كل المدد التجريبية، كذلك يلاحظ وجود انخفاض عالي المعنوية لصالح معاملة الليكوبين T900 مقارنةً بباقي معاملات الليكوبين T600 و T300 طيلة مدة التجربة تلتها المعاملة T600ثم T300 كما انخفض تركيز البروتين معنوياً ($P\leq0.01$) للمعاملة T600 عن تركيز البروتين للمعاملة T300 في جميع المدد التجريبية باستثناء الشهر الرابع اذ لم تختلف المعاملتين خلالهما معنوياً أثناء هذه المدة. ومن الجدول نفسه يمكن ملاحظة انخفاض المعدل العام للمعاملة T900 معنوياً ($P\leq0.01$) عن باقي المعدلات العامة لمعاملات الليكوبين T600 وT300 والتي سجلت جميعا انخفاضاً معنوياً ($P\leq0.01$) في معدلاتها العامة مقارنةً بالمعدل العام لمعاملة السيطرة T0، كذلك انخفض المعدل العام للمعاملة T600 معنوياً عن المعدل العام للمعاملة T300. اذ بلغت المعدلات العامة لهذه الصفة 0.60 و 0.42 و 0.30 و 0.22 غم / ديسيلتر للمعاملات T0 و T300 و T600 و T900 على التوالي.

جدول (3): تأثير إضافة مستويات مختلفة من الليكوبين في تركيز البروتين الكلي (غرام/ ديسيلتر) (المتوسط ± الخطأ القياسي) في البلازما المنوية لذكور الاوز المحلي.

المدة	المعاملات				مستوى المعنوية
	T0	T300	T600	T900	
الشهر الأول	0.660 ± 0.024 a	0.560 ± 0.031 b	0.374 ± 0.004 c	0.258 ± 0.029 d	**
الشهر الثاني	0.610 ± 0.029 a	0.410 ± 0.020 b	0.300 ± 0.032 c	0.189 ± 0.025 d	**
الشهر الثالث	0.533 ± 0.024 a	0.320 ± 0.010 b	0.221 ± 0.006 c	0.188 ± 0.007 d	**
الشهر الرابع	0.682 ± 0.022 a	0.358 ± 0.039 b	0.353 ± 0.021 b	0.228 ± 0.007 c	**
المعدل العام	0.604 ± 0.022 a	0.422 ± 0.030 b	0.302 ± 0.021 c	0.222 ± 0.02 d	**

المعاملات: T0 = 0 ملغم ليكوبين / كغم علف، T300 = 300 ملغم ليكوبين / كغم علف، T600 = 600 ملغم ليكوبين / كغم علف، T900= 900 ملغم ليكوبين / كغم علف. كل مدة تمثل معدل اسبوعين. الحروف المختلفة ضمن الصف الواحد تدل على وجود فروق معنوية بين متوسطات المعاملات. ** وجود فروق معنوية عند مستوى احتمال $P\leq0.01$.

إن التحسن المعنوي لصفات السائل المنوي نتيجة إضافة الليكوبين الى علائق ذكور الاوز ربما يفسر الانخفاض المعنوي في تركيز البروتين في البلازما المنوية اذ إن هناك ارتباط موجب بين تركيز البروتين في البلازما المنوية وبين النسبة المئوية للنطف الميتة والمشوهة (27). إضافة الى إن هناك علاقة عكسية بين حركة النطف وتركيزها في السائل المنوي

وتركيز البروتين في البلازما المنوية (28) وعلى هذا الأساس فقد استخدم تركيز البروتين مؤشرا للتنبؤ بنوعية ومواصفات السائل المنوي، اذ يمكن استخدام تركيز البروتين في البلازما المنوية لغرض انتخاب الذكور ذات البروتين المنخفض في البلازما المنوية (29).

نشاط إنزيمي AST وALT في البلازما المنوية

يتبين من الجدول (4) إن هناك تأثير معنوي ($P\leq0.05$) لإضافة الليكوبين الى علائق ذكور الاوز المحلي باتجاه خفض نشاط إنزيم AST في البلازما المنوية لهذه الذكور، اذ يتضح من الجدول المذكور وجود انخفاض معنوي ($P\leq0.05$) في نشاط إنزيم AST في البلازما المنوية لصالح معاملات الليكوبين T900 و T600 مقارنةً مع معاملة السيطرة T0 أثناء كل المدد التجريبية. اما المعاملة T300 فلم تختلف معنوياً مع معاملة السيطرة في الشهر الثالث إلا أنها سجلت انخفاضاً معنوياً ($P\leq0.05$) في باقي الاشهر. كذلك يلاحظ انخفاضاً معنوياً ($P\leq0.05$) لصالح معاملة الليكوبين الأولى T900 مقارنةً بباقي معاملات الليكوبين T600 و T300 طيلة مدة التجربة تلتها المعاملة T600 ثم T300. ومن الجدول نفسه يمكن ملاحظة انخفاض المعدل العام للمعاملة T900 معنوياً ($P\leq0.05$) عن باقي المعدلات العامة لمعاملات الليكوبين تلاها المعدل العام للمعاملة T600 ثم المعاملة T300 والتي سجلت جميعها انخفاضاً معنوياً ($P\leq0.05$) في معدلاتها العامة مقارنةً بمعاملة السيطرة T0. اذ بلغت المعدلات العامة لهذه الصفة 234.08 و 227.5 و 214.47 و 207.0 وحدة دولية / لتر للمعاملات T0 و T300 و T600 و T900 على التوالي.

جدول (4): تأثير إضافة مستويات مختلفة من الليكوبين الى العليقة في فعالية إنزيم AST (وحدة دوليه/لتر) (المتوسط ± الخطأ القياسي) في البلازما المنوية لذكور الاوز المحلي.

المدة	المعاملة				مستوى المعنوية
	T0	T300	T600	T900	
الشهر الأول	240 ^{a} 1.7 ±	232 ^{b} 1.15 ±	225 ^{c} 1.75 ±	220 ^{d} 2.88 ±	*
الشهر الثاني	236 ^{a} 1.11 ±	230 ^{b} 2.30 ±	218 ^{c} 1.15 ±	210 ^{d} 1.15 ±	*
الشهر الثالث	230 ^{a} 2.27 ±	228 ^{a} 1.15 ±	215 ^{b} 2.88 ±	208 ^{c} 1.73 ±	*
الشهر الرابع	230 ^{a} 1.15 ±	222 ^{b} 3.46 ±	200 ^{c} 3.17 ±	190 ^{d} 1.70 ±	*
المعدل العام	234.08 ^{a} 1.45 ±	227.5 ^{b} 1.37 ±	214.47 ^{c} 2.9 ±	207.0 ^{d} 3.36 ±	*

المعاملات: T0 = 0 ملغم ليكوبين / كغم علف، T300 = 300 ملغم ليكوبين / كغم علف، T600 = 600 ملغم ليكوبين / كغم علف، T900= 900 ملغم ليكوبين / كغم علف. كل مدة تمثل معدل اسبوعين. الحروف المختلفة ضمن الصف الواحد تدل على وجود فروق معنوية بين متوسطات المعاملات. * وجود فروق معنوية عند مستوى احتمال $P\leq0.05$.

كما يتبين من الجدول (5) أن هناك تأثير معنوي لإضافة الليكوبين الى علائق ذكور الاوز المحلي باتجاه خفض فعالية إنزيم ALT في البلازما المنوية لهذه الذكور، اذ يتضح من الجدول المذكور وجود انخفاض معنوي ($P\leq0.05$) في نشاط إنزيم ALT في البلازما المنوية لصالح معاملات الليكوبين T300 و T600 و T900 مقارنةً مع معاملة السيطرة

T0 أثناء كل المدد التجريبية. كما لوحظ انخفاض معنوي لصالح معاملة الليكوبين T900 مقارنةً بباقي معاملات الليكوبين T600 و T300 طيلة مدة التجربة. وسجلت المعاملة T600 انخفاضاً معنوياً ($P\leq0.05$) في نشاط انزيم الـ ALT مقارنةً مع المعاملة الثالثة T300 طوال مدة الدراسة. ومن الجدول نفسه يمكن ملاحظة انخفاض المعدل العام للمعاملة T900 معنوياً ($P\leq0.05$) عن باقي المعدلات العامة لمعاملات الليكوبين تلاها المعدل العام للمعاملة T600 ومن ثم المعاملة T300 والتي سجلت جميعاً انخفاضاً معنوياً ($P\leq0.05$) في معدلاتها العامة مقارنةً بالمعدل العام لمعاملة السيطرة T0. اذ بلغت المعدلات العامة لهذه الصفة 16.45 و 11.21 و 8.88 و 7.65 وحدة دولية / لتر للمعاملات T0 و T300 و T600 و T900 على التوالي.

جدول (5): تأثير إضافة مستويات مختلفة من الليكوبين الى العليقة في فعالية إنزيم ALT (وحدة دوليه / لتر) (المتوسط ± الخطأ القياسي) في البلازما المنوية لذكورالاوز المحلي.

المدة	المعاملات				مستوى المعنوية
	T0	T300	T600	T900	
الشهر الأول	17.1 1 ^{a} 0.49 ±	12.2 ^{b} 0.012 ±	8.8 ^{c} 0.17 ±	8.2 ^{d} 0.057±	*
الشهر الثاني	16.5 ^{a} 0.17 ±	11.4 ^{b} 0.24 ±	8.6 ^{c} 0.26 ±	7.7 ^{d} 0.202 ±	*
الشهر الثالث	16.3 ^{a} 0.11 ±	11.3 ^{b} 0.25 ±	8.8 ^{c} 0.23 ±	7.5 ^{d} 0.23±	*
الشهر الرابع	16.3 ^{a} 0.17 ±	10.5 ^{b} 0.29 ±	9.2 ^{c} 0.088 ±	7.2 ^{d} 0.088 ±	*
المعدل العام	16.45 ^{a} 0.16 ±	11.21 ^{b} 0.18 ±	8.88 ^{c} 0.10 ±	7.65 ^{d} 0.17 ±	*

المعاملات: T0 = 0 ملغم ليكوبين / كغم علف، T300 = 300 ملغم ليكوبين / كغم علف، T600 = 600 ملغم ليكوبين / كغم علف، T900= 900 ملغم ليكوبين / كغم علف. كل مدة تمثل معدل اسبوعين. الحروف المختلفة ضمن الصف الواحد تدل على وجود فروق معنوية بين متوسطات المعاملات. * وجود فروق معنوية عند مستوى احتمال $P\leq0.05$.

من المعروف بان زيادة نشاط إنزيمي AST و ALT في البلازما المنوية ناتج من تضرر النطف وحصول ترشيح لهذه الإنزيمات من داخل الخلية الى خارجها بسبب تضرر الغشاء الخلوي للنطفة (30). وبما ان الليكوبين يعد مضاد أكسدة فعال يعمل على حماية النطف من الإضرار المدمرة للجذور الحرة وهذا ما اكده (26) إذ أكد بان إضافة الليكوبين الى مخففات السائل المنوي للطيور الداجنة قد أدى الى تحسين معنوي في كل من نسبة النطف الحية وحركتها وحافظ على النطف من الأكسدة المفرطة حتى في حالة خزن النطف، لذلك فقد يعزى الانخفاض الحاصل في نشاط إنزيمي AST و ALT في البلازما المنوية الى دور الليكوبين في حماية غشاء النطفة من الضرر وبالتالي الحفاظ على حيوية النطف ونشاطها. وعلى الرغم من ان إنزيمي AST وALT تعد من الإنزيمات المهمة داخل خلية النطفة، وذلك لدورهما المهم في ايض النطف إلا ان ترشحهما الى البلازما المنوية وارتفاع تراكيزهما فيها يدل على وجود ضرر في النطف (31). ويعمل الليكوبين على الحفاظ على حيوية النطف وقابليتها الاخصابية من خلال المحافظة على غشاء خلية النطفة من التأكسد وبالتالي الحفاظ

على إنزيمي AST و ALT من الترشح الى البلازما المنوية، وهذا ما اكده (32) إذ وجد بان إضافة الليكوبين الى مخففات السائل المنوي قد أدى الى تحسين صفات السائل المنوي في الفئران إذ كان له دور فعال في حماية النطف من الإجهاد التأكسدي وخصوصا غشاء النطفة ومنع ترشح محتويات الخلية الى خارجها. وذكر (22) و(23) و (24) بان نشاط إنزيمي الـ AST و ALT في البلازما المنويه يرتبط ارتباطا سالبا مع نسبة الخصوبة والفقس ونسبة النطف الحية وموجبا مع تشوهات النطف. وهذا يتفق تماما مع ما توصلت اليه الدراسة الحالية.

تركيز MDA في البلازما المنوية

يتضح من الجدول (6) التأثير الايجابي لليكوبين المضاف الى علائق ذكور الاوز في خفض تركيز MDA، اذ يتبين بان معاملات الليكوبين الثلاث T300 و T600 و T900 سجلت انخفاضاً معنوياً ($P\leq0.05$) في تركيز MDA مقارنةً بمعاملة السيطرة T0 أثناء كل مدد الدراسة. وحققت معاملة الليكوبين الأولى T900 أفضل نتيجة اذ حققت اقل تركيز من MDA بين معاملات الليكوبين تلتها معاملة الليكوبين T600 ثم معاملة الليكوبين T300 طيلة مدة الدراسة. ولم يختلف المعدل العام للمعاملات عن هذه النتيجة اذ سجل المعدل العام لمعاملة الليكوبين T900 اقل تركيز من MDA تلاه المعدل العام لمعاملات الليكوبين T600 ثم T300، وسجلت المعدلات العامة لمعاملات الليكوبين الثلاث تركيز MDA اقل معنوياً من معاملة السيطرة T0. اذ بلغت المعدلات العامة لهذه الصفة 1.90 و 1.67 و 1.54 و 1.40 وحدة دولية / لتر للمعاملات T0 و T300 و T600 و T900 على التوالي.

جدول (6): تأثير إضافة مستويات مختلفة من الليكوبين الى العليقة في تركيز MDA (مايكرومول / مل) (المتوسط ± الخطأ القياسي) في البلازما المنويه لذكور الاوز المحلي.

المدة	المعاملات				مستوى المعنوية
	T0	T300	T600	T900	
الشهر الأول	1.96 ^{a} 0.006 ±	1.84 ^{b} 0.026 ±	1.68 ^{c} 0.014 ±	1.60 ^{d} 0.029 ±	*
الشهر الثاني	1.88 ^{a} 0.011 ±	1.63 ^{b} 0.01 ±	1.55 ^{c} 0.017 ±	1.48 ^{d} 0.022 ±	*
الشهر الثالث	1.91 ^{a} 0.010 ±	1.70 ^{b} 0.012 ±	1.54 ^{c} 0.011 ±	1.29 ^{d} 0.017 ±	*
الشهر الرابع	1.84 ^{a} 0.13 ±	1.52 ^{b} 0.080 ±	1.39 ^{c} 0.034 ±	1.26 ^{d} 0.017 ±	*
المعدل العام	1.90 ^{a} 0.01 ±	1.67 ^{b} 0.04 ±	1.54 ^{c} 0.03 ±	1.40 ^{d} 0.044 ±	*

المعاملات: T0 = 0 ملغم ليكوبين / كغم علف، T300 = 300 ملغم ليكوبين / كغم علف، T600 = 600 ملغم ليكوبين / كغم علف، T900= 900 ملغم ليكوبين / كغم علف. كل مدة تمثل معدل اسبوعين. الحروف المختلفة ضمن الصف الواحد تدل على وجود فروق معنوية بين متوسطات المعاملات. * وجود فروق معنوية عند مستوى احتمال $P\leq0.05$.

ان مركب MDA هو احد نواتج أكسدة الدهون (33). وان تركيز هذا المركب يتناسب طرديا مع الفعاليات التاكسدية للجذور الحرة وعكسيا مع نشاط الإنزيمات المضادة للأكسدة وعند إضافة الليكوبين الى علائق الاوز والذي يعتبر واحد من اقوى مضادات الأكسدة الطبيعية أدى ذلك الى تعزيز نشاط الإنزيمات المضادة للأكسدة SOD و GSH-px والتي

عملت على كبح جماح الجذور الحرة وتقليل نشاطها في البلازما المنوية وهذا بدوره أدى الى خفض تركيز الـ MDA مما أدى الى تحسين صفات السائل المنوي وقابليته الاخصابية (34). وقد اتفقت هذه النتيجة مع ما توصل إليه (35) اذ ذكر بان تدعيم العليقة بمضادات الأكسدة مثل الكاروتينات أدى الى انخفاض معنوي في تركيز MDA . وأكد (36) على دور الليكوبين الايجابي في الأداء الإنتاجي والفسلجي في الطيور الداجنة، إذ ان الليكوبين قد أدى الى تقليل الإجهاد التأكسدي وتحسين الأداء الإنتاجي والفسلجي للطيور. وقد اتفقت هذه النتيجة مع ما توصل إليه (33) إذ وجد بان لليكوبين دور ايجابي في تحسين الأداء الإنتاجي والفسلجي وتقليل تركيز MDA أثناء خزن لحوم الدجاج. كذلك فقد اتفقت نتائج هذه الدراسة مع ماتوصل إليه (37) اذ توصلوا الى ان تدعيم العلائق بمضادات الأكسدة يعمل على خفض أكسدة الدهون وبالتالي انخفاض تركيز MDA في البلازما. وأكد ذلك (38) اذ وجدوا بان مضادات الأكسدة ومنها الكاروتينات تؤدي الى تقليل الإجهاد التأكسدي وخفض تركيز MDA وبالتالي تحسين نوعية السائل المنوي.

المصادر

1. Rao, A. V. and H. Shen. 2002. Effect of low dose of lycopene in take on lycopene bioavailability and oxidive stress. Nutr. Res. 22: 1125-1131.
2. Rao, L. G., M. Gunns and A. V. Rao . 2003. The role of lycopene in the prevention of chronic diseases. J. Food Ind. High Technol. 1:25–30.
3. Shi, J. and L. Maguer. 2000. Lycopene in tomatoes: chemical and physical properties affected by food processing. Crt. Rev. Food Sci. Nutr, 40:1–42.
4. Silke, S., T. Ute, H. Eva, K .Winfried, J. Günther and B. Hans-Konrad. 2008. Lycopene inhibits disease progression in patients with benign prostate hyperplasia. J. Nutr, 138:49–53.
5. Rao, A. V. and A. Ali. 2007. Biologically active phytochemicals in human health: lycopene. Int. J. Food Prop, 10: 279 – 288.
6. Maggio, D., C. Polidori, M. Barabani and T. Angela. 2006. Low levels of carotenoids and retinol in involutional osteoporosis . Bone. 38: 244–248.
7. Purnima, D., G .Trapti and S. Ashok. 2012. Comparative analysis of Lycopene in oxidative stress. J. Assoc. Physic. India, 60: 17-20.
8. السبيل، عبدالله العلي و محمد احمد البدري. 2009. تربية الطيور المائية – كلية الزراعة-جامعة الملك سعود- مركز الارشاد الزراعي .
9. Jacquie, J., P. Tony, and A. Cantor. 2011. Selection the right geese breed. Cooperative extension service bulletin, University of Kentucky, College of Agriculture. Issued 02-2011.

10. Pakulska, E and K. Blelinski. 1993. Effect of reduced level of energy and protein in a feed mixture on reproductive performance of geese. Roczniki Naukowe Zootechniki.19: 143-154.

11. Bogenfurst , F. 1998. Effect of feed restriction during the laying period on the reproductive performances of geese kept under intensive conditions. Proceedings of 10th European Poultry Conference Jerusalem, 781-784.p.

12. الدراجي، حازم جبار. 2007. التلقيح الاصطناعي في الطيور الداجنة، الطبعة الاولى. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي - كلية الزراعة - جامعة بغداد .

13. Asatoor, A. M. and E. J. King. 1954. Simplified colorimetric blood sugar method. Biochim. J, 56: XLIV.

14. Wotton, I. D. and H. Freeman. 1982. Proteins, microanalysis in medical biochemistry. 6th edition. New York: Churchill Livingstone.

15. Ed , N .W. 2006. Clinical Guide to laboratory test. P 244-249.

16. Reitman, S. and S. Frankel. 1957. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminases . Amer. J. Clin. Pathol., 28: 56-63.

17. Nielsen, F, B. B. Mikkelsen, , J. B. Nielsen , H. R. Andersen and P. Grandjean. 1997. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. Clin. Chem. 43 (7): 1209-1214.

18. SAS. 2012. Statistical Analysis System, User's Guide. Statistical. Version 9.1th ed. SAS. Inst. Inc. Cary. N.C. USA .

19. Duncan, D.B. 1955. Multiple Rang and Multiple F-test. Biometrics. 11: 4-42.

20. Hammond, M., M. A. Boone. and B. D. Barnett. 1965. Study of the glucose, electrolyte, enzymes and nitrogen components of fowl seminal plasmas. J. Reprod. Fert. 10: 21– 28.

21. الدراجي، حازم جبار.1998. تاثير اضافة حامض الاسكوربيك الى العليقة في الصفات الفسلجية والانتاجية لقطعان امهات فروج اللحم فابرو المرباة خلال اشهر الصيف . اطروحة دكتوراه – كلية الزراعة – جامعة بغداد .

22. الدراجي، حازم جبار وبشير طه عمر وخالد حامد حسن وعبد الجبار عبد الكريم الراوي. 2002. استخدام تقنيات جديدة لتقدير التشوهات في نطف الطيور. مجلة ابحاث التقانة الحيوية. 4 (1) : 47-64.

23. الخزرجيK رعد حاتم رزوقي. 2009. تاثير بذور الجرجير . *Eruca sativa Mill* في الصفات الانتاجية والتناسلية في الديكة وانتاج دجاج البيض. اطروحة دكتوراه - كلية الزراعه جامعة بغداد.

24. الحيانيK وليد خالد. 2012. تاثير اضافة مستويات مختلفة من الكارنتين L-Carnitine الى العلائق في الاداء الانتاجي والفسلجي والتناسلي لدجاج غينيا. اطروحة دكتوراه - كلية الزراعة - جامعة بغداد .

25. Mangiagalli, M.G., P.A. Martino, T. Smajlovic, L. Guidobono and S.P. Marelli . 2010. Effect of lycopene on semen quality, fertility and native immunity of broiler breeder. Brit. Poultry Sci. 51: 152-157.

26. Mangiagalli, M.G., S.P. Marelli and L. G. Cavalchini. 2007. Effect of lycopene on fowl sperm characteristics during in vitro storage. Arch. Geflügelkd. 71: 25-29.

27. Al- Draji, H. J., A . J. Al-Rawi and B. T. O. Al- Tikriti . 2002b. study of the semen traits of indigenous rosters reared during summer months . Iraqi . J. Agric. Sci. 33 (1) : 223 – 228 .

28. Mustafa , A. R. and I. M. Meszaros.1980. Interrelationship between the total protein content of bovine seminal plasma and behavior of the spermatozoa after freezing and thawing. Acta Veterinaria Academiae Scientiarum Hangarica, 28: 403 – 408.

29. Thurston, R.J., R. A. Hess and N. Korn. 1992. Seminal plasma protein concentration as a predictor of fertility and hatchability in large white domestic turkeys . J . Appl . Poult Res . 1 : 335 – 338.

30. Buskland, R. B. 1971. The activity of six enzymes of chicken seminal plasma and sperms. Poult. Sci. 50: 1724 – 1734 .

31. Hussain, S. O.1995. Physical and biochemical study of semen of local bucks in Iraq. ph. D. Thesis. College of Veterinary Medicine, University of Baghdad.

32. Atessahin, A., I. Karahan, G .Turk, S. Gur, S. Yılmaz, A .Osman. and A.O. Ceribasi. 2006. Protective role of lycopene on cisplatinin-duced changes in sperm characteristics, testicular damage and oxidative stress in rats. Reprod. Toxicol., 21: 42-47.

33. Sevcikova, S., M. Skrivan and G. Dlouha . 2008 . The effect of lycopene supplementation on lipid profile and meat quality of broiler chickens. Anim. Sci. 53, (10): 431-440.

34. Miller, J., K. Brzezinska and E. Slebodzinska. 1993. Oxidative stress, antioxidants and animal function. J. Dairy Science. 76: 2812–2823.

35. Sheehy, P., P. Morrissey and A. Flynn .1994. Consumption of theramally oxidized sunflower oil by chicks reduces &-tocopherol status and increase susceptibility of tissue to lipid oxidation. Br. J. Nutr. 71: 53-65.

36. Sahin, K., M. C. Onderci and N. Sahin. 2006a. Effects of lycopene supplementation on antioxidant status, oxidative stress, performance and carcass characteristics in heat-stressed Japanese quail. J. Therm. Biol. 31: 307–312.

37. Monahan, F., D. Buckley, P. Morrissey, P. Lynech and J. Gray. 1990. Effect of dietary tocopherol supplementation on tocopherol levels in porcine tissues and on susceptibility to lipid peroxidation. Food Sci. Nutr. 42: 203-209.

38. Mournaki, E., R. Cardinali, A. Dal Bosco, L. Corazzi and C. Castellini. 2010. Effects of flaxseed dietary supplementation on sperm quality and on lipid composition of sperm subfractions and prostatic granules in rabbit. Theriogenology, 73: 629-637.

Iraqi Journal of Biotechnology, 2015, Vol. 14, No. 2 , 296-313

تأثـير الكافيين و المستخـلص المائي و الكحولي للشاي الاخضر *Camellia sinensis* على الـخمج التجـريـبي بالامـيبا الحـالة للـنسـيـج *Entamoeba histolytica* فـي الـفـئران المختبرية

مروان عبد الهادي حسين الجنابي[1] ، الهام عائد اسعد التكريتي[2]

[1]قسم علوم الحياة، كلية التربية للعلوم الصرفة، جامعة تكريت، صلاح الدين، العراق.
[2]قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة تكريت، صلاح الدين، العراق.

الخلاصة: يعد داء الاميبات من الامراض الطفيلية الاكثر انتشارا وخصوصا في المناطق الاستوائية وشبه الاستوائية. تهدف الدراسة الحالية الى معرفة تاثير الكافيين والمستخلص المائي والكحولي للشاي الاخضر على الخمج التجريبي بالاميبا الحالة للنسيج في الفئران المختبرية. جمعت 1712 عينة براز للفترة من 2011/10/1 الى 2012/10/19 من الاطفال المراجعين لمستشفى الطفل المركزي. أظهرت نتائج التشخيص الكيميائي للمواد الفعالة تفوق المستخلص الكحولي على المائي باحتوائه على الراتنجات ولكنهما لم يحتويا على الستيرويدات، وكانت قيمة pH للمستخلص المائي 6.1، اما الكحولي فبلغت 5.3. وعزلت المادة الفعالة الكافيين، واظهرت نتائج اجهزة FTIR، UV و HPLC ان المادة المعزولة هي الكافيين، ونقاوتها 65.7 % بالمقارنة مع الكافيين القياسي. واوضحت النتائج تاثير التراكيز المختلفة للمستخلصات المائية والكحولية والمادة الفعالة الكافيين على التغيرات النسيجية لقولون الفئران المختبرية المخمجة، وعلى عدد الاكياس المطروحة مع الغائط يوميا لمدة 7 ايام، إذ لوحظت التغيرات اما زيادة في عدد الخلايا الكاسية، أو افراز كميات كبيرة من مادة الميوسين وارتشاح بسيط للخلايا الالتهابية، واظهر التركيز العالي 10 ملغم/كغم للمستخلصات النباتية المائية والكحولية والمادة الفعالة (الكافيين) أعلى تاثير معنوي في التقليل من عدد الأكياس المطروحة مع الـغائـط في الـتراكيز الثلاثة للمستخلصات، اذ بلغت نسبة الاكياس المطروحة بعد المعـاملة بالتركيز العالي 10 ملغم/كغم للمستخلص المائي 12.50 % و 18.75 % في التركيز العالي 10 ملغم/كغم للمستخلص الكحولي و31.25 % في التركيز العالي 10 ملغم/كغم للمادة الفعالة (الكافيين).

الكلمات المفتاحية: الاميبا الحالة للنسيج *Entamoeba histolytica*، المستخلصات النباتية، الكافيين، الشاي الاخضر.

Effect of caffeine, water and alcoholic extracts of green tea on the experimental infection of *Entamoeba histolytica* in laboratory mice

Marwan A. H. Aljanabi[1], Ilham A. A. Altikrity[2]

[1] Department of Biology, College of Education for Pure Sciences, University of Tikrit, SalahadDin, Iraq.
[2] Department of Biology, College of Science, University of Tikrit, SalahadDin, Iraq.

Abstract The amoebiasis is from the most prevalent parasitic diseases, especially in tropical and subtropical areas. The present study aims to find out the effect of caffeine, alcohol and aqueous extract of green tea on the experimental infection of *Entamoeba histolytica* in the laboratory mice. 1712 samples of children feces were collected from the Central Child Hospital for the period from 01/10/2011 to 19/10/2012. The results showed the effectiveness of the alcoholic extract over the aqueous extract as it contains resins but both extracts did not contain steroids, the pH values were 6.1 and 5.3 for the aqueous extract and the alcoholic extract respectively. Also the results from UV, FTIR and HPLC showed that the extracted compound is caffeine and its purity was 65.7% compared to the standard caffeine. The results showed the effect of different concentrations of the aqueous and the alcoholic extracts, caffeine on the histological changes of the infected mice colon and the cysts number in feces daily for 7 days, as observed, the changes were either an increase in the number of Goblet cells, or higher secretion of mucin and few inflammatory cells infiltration. The higher concentration of 10 mg/ kg of the aqueous, the alcoholic extracts and caffeine showed significant effect in reducing the number of cysts found in feces, the percentage of the raised cysts after treatment were 12.50%, 18.75% and 31.25% respectively.

Key words: *Entamoeba histolytica*, Plant extracts, caffeine, green tea.

المقدمة

ان طفيلي *Entamoeba histolytica* من الطفيليات الشائعة في العراق والعالم والذي يسبب داء المتحولات الاميبي والزحار الاميبي والتهاب الكبد الاميبي و تقدر عدد الاصابات بهذا الطفيلي (50) مليون شخص في العالم و يسبب (110.000) حالة وفاة سنويا. ان الاصابة بهذا الطفيلي تأتي بالمرتبة الثانية بعد الملاريا Malaria من بين الاصابات الطفيلية في تسبب حالات الوفيات سنويا [2,1] وينتشر الخمج ويتوطن في الدول الفقيرة والنامية بسبب تدني التجهيزات الصحية وتلوث مياه الشرب والغذاء بمياه الصرف الصحي ومن ثم تلوثه بالفضلات الحاوية على الأكياس رباعية النواة المعدية [3]. يعد هذا الطفيلي من الطفيليات الوحيدة الخلية حقيقية النواة ويعد الأنسان المضيف الطبيعي للطفيلي [4]. تظهر الأميبا في الغائط بعدة أشكال، الشكل المتحرك وهو الطور المتغذي أو الخضري Trophozoite والشكل ما قبل التكيس Precyst والشكل المتكيس Cyst وهو الطور المعدي Infective stage والمسؤول عن انتقال العدوى من شخص الى آخر. تتوطن الأطوار المتغذية في الأمعاء الغليظة للإنسان إذ لها القدرة على مهاجمة الطبقة المخاطية Mucosa والطبقة التحت مخاطية Submucosa ولها القابلية على إحداث التحلل الخلوي Cytolysis وتحلل الأنسجة Histolysis وذلك بإفراز مواد سامة تحلل وتحطم الطبقة المخاطية للأمعاء ثم تتغذى على

الأنسجة المتحللة وكريات الدم الحمر والبكتريا الطبيعية Bacterial flora في الأمعاء. ونتيجة لذلك يحدث التنخر Necrosis في بطانة الأمعاء، وهذا مايمكن الاميبا من الأنتقال الى باقي أنحاء الجسم عن طريق مجرى الدم وبشكل أساسي الى الكبد [6,5]. ونظرا للاهمية الطبية لهذا الطفيلي فقد بذلت في العقود الاربعة الاخيرة جهود حثيثة للتعرف بشكل اكبر على الطفيلي والمرض وكيفية علاجه، وتزايد الاهتمام باستخدام المستخلصات النباتية في علاج الاصابة بالطفيلي نظرا لما يحويه بعضها من مركبات تعيق من نمو الطفيلي وكذلك تساعد في القضاء على القرح المعوية وشفاءها [10,9,8,7]، ان استعراض الدراسات الأخيرة على الانسان تنص على أن الشاي الأخضر قد يقلل من أمراض القلب والشرايين وبعض أنواع السرطان، وتعزيز صحة الفم، والحد من ارتفاع ضغط الدم، ويساعد في السيطرة على وزن الجسم، ويمتلك خصائص مضادة للجراثيم والفيروسات، ويقدم حماية ضد الأشعة فوق البنفسجية ، وزيادة كثافة المعادن في العظام [11]. أظهرت ثلاث دراسات خارج جسم الكائن الحي أن epigallocatechin تثبط تكرار فيروس نقص المناعة البشرية HIV replication [12]، والكافيين هو قلويد بلوري مر الطعم يوجد بكميات متفاوتة في أوراق وحبوب وفاكهة أكثر من 60 نبتة، إذ يعمل مبيداً للآفات الطبيعية [13]. وهو يحتل أهمية في مجموعة متنوعة من المجالات، ومن المثير للاهتمام انه لم يتوصل الى التركيب البلوري للكافيين الا في عام 2007 [15,14]، ويوجد الكافيين على شكلين بلوريين، يكون الشكل غير المنتظم R-form في درجة الحرارة العالية، وشكل β-form في درجة حرارة الغرفة [16]. وله تاثير منشط على المزاج والأداء المعرفي [17]، وله تأثير كل من الاوعية الدموية الدماغية، وضغط الدم، وعمل الجهاز التنفسي، وعمل المعدة، والقولون، وحجم البول، و أداء التمارين الرياضية [18]، ويستخدم الكافيين للعلاج والوقاية من انقطاع النفس عند الخدج، لأنه يقلل من تكرار انقطاع النفس والحاجة إلى التهوية الميكانيكية خلال الأيام السبعة الأولى من العلاج [20,19]، والكافيين لديه العديد من المزايا أكثر من الثيوفيلين، ويعد أحسن من ميثيل بسبب مؤشراته العلاجية الواسعة [21].

المواد وطرائق العمل

جمع عينات الغائط:

جمعت (1712) عينة براز خلال المدة التي امتدت من 2011/10/1 ولغاية 2012/10/19 من الاطفال المراجعين لمستشفى الطفل المركزي الذين يعانون من إسهال شديد الى متوسط وفي معظم الحالات كانوا يعانون من إسهال دموي. وضعت العينات في حاوية معقمة ذات فتحة واسعة مزودة بسداد محكم للحفاظ على رطوبة العينة ومنع جفافها ،ورقمت كل عينة بشكل متسلسل مع كتابة الاسم والعمر والجنس والسكن.

فحص العينات:

فحصت العينات خلال نصف ساعة من وصولها المختبر بحثاً عن وجود الطور المتغذي المسؤول عن حدوث حالة الإصابة بالطفيلي فالطور المتغذي غالباً ما يلاحظ في العينات الطرية ونادراً ما يلاحظ في الغائط الصلب كامل التكوين أو شبه الصلب الذي يحوي عادة على الطور المتكيس مع ملاحظة احتواء العينة على الدم أو المخاط إذ غالباً ما يشير وجودها إلى حدوث إصابة بطفيلي الاميبا الحالة للنسيج [22] باحدى الطرق التالية:

الطريقة المباشرة:

فحصت العينات بطريقة المسحة المباشرة بأستخدام طريقة [23].

طريقة التطويف بكبريتات الخارصين:

يمزج 1-2 غم من الغائط مع كمية كافية من الماء المقطر بواسطة قضيب زجاجي لتحرير الاكياس من الغائط. ثم يرشح المزيج من خلال اربع طبقات من الشاش وبعدها ينقل

الراشح الى انابيب الاختبار وتوضع في جهاز الطرد المركزي لمدة 5 دقائق بسرعة 1000 (دورة /دقيقة).يطرح الطافي من انابيب الاختبار ويضاف محلول كبريتات الخارصين الى الراسب ثم تعاد انابيب الاختبار لجهاز الطرد المركزي لنفس السرعة والمدة. يسحب الطافي بواسطة ماصة باستور وينقل الطافي الى انابيب اختبار حاوية على ماء معقم ثم تعاد لجهاز الطرد المركزي لمدة 5 دقائق وبسرعة 500-1000 (دورة /دقيقة). بعدها ينقل الراسب الى انابيب حاوية على 2 ml من محلول دارئ الفوسفات الملحي ويحفظ بدرجة حرارة 4° لحين استعماله في تجريع الفئران المختبرية [24].

طريقة التطويف بمحلول السكروز:

تتبع نفس الخطوات في الفقرة السابقة مع استعمال محلول السكروز بدلا من محلول كبريتات الخارصين [25].

جمع العينات النباتية:

تم شراء كمية من الشاي الاخضر من الاسواق المحلية في الدورة - بغداد بشكل مسحوق من الاوراق المجففة المحفوظة داخل كيس مغلف، يزن 5 كغم، وهذا النوع من الشاي الاخضر صيني المنشأ، وأثبت أن *Camellia sinensis* هو الاسم العلمي الحالي للشاي الاخضر، إذ صنف هذا النبات الأستاذ الدكتور علي حسين الموسوي ، قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة بغداد.

الاستخلاص المائي للشاي الاخضر:

حضر بإذابة 50 غم من المسحوق النباتي في 500 مل ماء مقطر مغلي بدرجة حرارة 100 م°، وترك عشرة دقائق، وبعدها رشح خلال اوراق ترشيح واتمان رقم (1) وركز المستخلص بوساطة جهاز المبخر الدوار Rotary vacuum evaporator لحين الحصول على سائل كثيف، بعدها وضع في الحاضنة بدرجة 37 م° لمدة 48 ساعة للحصول على المسحوق الجاف للمستخلص، ثم وضع في أنبوبة محكمة الغلق ومغلفة بورق المنيوم ، وحفظ في الثلاجة بدرجة حرارة 4 م° لحين الاستعمال [26].

الاستخلاص الكحولي للشاي الاخضر:

حُضر المستخلص على وفق ما ورد في [27]وذلك بنقع 50 غم من المسحوق النباتي في 500 مل من الميثانول 99% لمدة 24 ساعة في الحاضنة الهزازة ، بعدها رُشح المزيج بالشاش ثم باوراق ترشيح نوع واتمان رقم 1 ، ركز المستخلص بوساطة جهاز المبخر الدوار لحين الحصول على سائل كثيف، بعدها وضع في الحاضنة بدرجة 37 م° لمدة 48 ساعة للحصول على المسحوق الجاف للمستخلص، اذ وضع في أنبوبة محكمة الغلق ومغلفة بورق المنيوم ، وحفظ في الثلاجة بدرجة حرارة 4 م° لحين الاستعمال .

الكشف النوعي الكيميائي عن المركبات الفعالة في مستخلصات الشاي الاخضر *Camellia sinensis*

تم تطبيق بعض الكشوفات على المستخلصات النباتية:-

تقدير الرقم الهيدروجيني للمستخلص الكحولي والمائي pH:

خلط 10 غم من المسحوق النباتي الجاف مع 50 مل من الماء المقطر مع الرجّ اليدوي المستمر، تم خلطه ومجانسته باستخدام الخلاط المغناطيسي (Magnetic stirrer) لمدة 10 دقائق ورُشحّ المحلول وقدر الـ pH باستعمال كل من أوراق زهرة الشمس وجهاز pH meter [28].

الكشف عن التربينات (Terpenes) والستيرويدات (Steroids):

تمت إذابة 1 مل من المستخلص مع قليل من الكلوروفورم بعدها أضيفت إليه قطرة من مادة حامض الخليك اللامائي(Acetic anhydrate) ، وقطرة من حامض الكبريتيك المركز ،

فظهور لون بني دليل على احتواء المستخلص على تربين، وإذا ترك المزيج لمدة وظهر لون أزرق داكن دلّ ذلك على أن المستخلص النباتي حاوٍ على الستيرويدات [29].

الكشف عن الفينولات (Phenols):

تم الكشف عنها باستخدام محلول كلوريد الحديديك (Ferric chloride) الذي حضر بإذابة ملح كلوريد الحديديك في الماء المقطر، وبنسبة 1%، وأضيف 3 مل من المستخلص النباتي لكل من المستخلص المائي والكحولي، الى 2 مل من محلول كلوريد الحديديك 1%،وإن ظهور اللون الاخضر المزرق دلالة على ايجابية الكشف [30].

الكشف عن القلويدات (Alkaloids):

لإجراء هذا الكشف وضع 3 مل من المستخلص النباتي لكل من المستخلص المائي والكحولي في انبوبة اختبار، وأضيف له 2 مل من الكاشفين الآتيين :-

أ- كاشف ماركيز الذي يعطي اللون الرمادي المحبب دليلاً على وجود القلويدات .

ب- كاشف ماير الذي يعطي راسباً أبيض دليلاً أيضاً على القلويدات[30].

الكشف عن الصابونينات (Saponines):

أجري الكشف كما ورد في [28] باتباع الطريقتين في أدناه :

- حضر محلول مائي للمسحوق النباتي في أنبوبة اختبار، ثم رجّ بشدة لحين ظهور رغوة كثيفة تبقى لعدة دقائق دلالة على وجود الصابونين .
- أضيف 1-3 مل من محلول كلوريد الزئبقيك ($HgCl_2$) بتركيز 1% إلى 5 مل من المستخلص النباتي، ويعد ظهور راسب أبيض دليلاً على ايجابية الكشف .

الكشف عن الراتنجات (Resins):

اتبعت الطريقة التي وردت في [28] للكشف عن الراتنجات بأخذ 10 مل من كل مستخلص، وأضيف له 20 مل ماء مقطر محمض بحامض الهايدروكلوريك HCl 4%، وقد استُدِلَّ على وجود الراتنجات بظهور عكورة (Turbidity).

الكشف عن الكلايكوسيدات (Glycosides):

تم إجراء الفحص بإضافة 2 مل من كاشف بندكت إلى 1 مل من المستخلص النباتي الموضوع في أنبوبة اختبار، ثم رجّ المحلول جيداً ووضع في حمام مائي مغلي لمدة 5 دقائق، ثم تركت الأنبوبة لتبرد. ودلَّ ظهور راسب أحمر على وجود الكلايكوسيدات [31].

الكشف عن التانينات (Tannins):

اتبعت الطريقة التي وردت في [32] للكشف عن التانينات، إذ تمّ غلي 10غم من المسحوق النباتي في 50 مل من الماء المقطر، ثم رُشح المحلول وترك ليبرد ، وبعدها قسم الراشح إلى قسمين أضيف للقسم الأول محلول 1% خلات الرصاص (Lead acetate) للاستدلال على وجود التانينات بظهور راسب أبيض هلامي القوام ، بينما أضيف للقسم الثاني محلول 1% كلوريد الحديديك (Ferric Chloride)، إذ يدل ظهور اللون الأخضر المزرق على وجود التانينات.

الكشف عن الزيوت الطيارة (Volatile oils):

اعتمدت طريقة الكشف عن الزيوت الأساسية كما ورد في [43]، فقد تمّ أخذ 10 مل من كل من المائي والكحولي، ورشحت كل على انفراد، بعد ذلك شبعت بها أوراق الترشيح وعُرِّضَت إلى مصدر للأشعة فوق البنفسجية، فدلَّ ظهور اللون الوردي البراق على وجود الزيوت الطيارة .

الكشف عن الفلافونات (Flavones):

اعتمدت الطريقة الواردة في [34] وعلى النحو الآتي: وضع 1 مل من المستخلص النباتي لكل من المائي والكحولي في أنبوبة اختبار وأضيف له قطرات من حامض الكبريتيك المركز (H_2SO_4)، إذ دل ظهور اللون البني المحمر على ايجابية الكشف .

الكشف عن الكومارينات (Coumarines):

كُشف عن الكومارين حسب ما ذكر في [35] بوضع كمية قليلة لكل من المستخلصات المذكورة سابقاً في أنابيب اختبار، وغطيت الأنابيب بأوراق ترشيح مرطبة بمحلول هيدروكسيد الصوديوم المخفف (NaOH)، ووضعت الأنابيب في حمام مائي (Water bath) مغلي لبضع دقائق، ثم بعد ذلك عُرضت أوراق الترشيح إلى مصدر للأشعة فوق البنفسجية ، إذ دل ظهور لون أصفر مخضر براق على وجود الكومارين .

تقدير الرقم الهيدروجيني للمستخلص الكحولي والمائي pH:

خلط 10 غم من المسحوق النباتي الجاف مع 50 مل من الماء المقطر مع الرجّ اليدوي المستمر، تم خلطه ومجانسته باستخدام الخلاط المغناطيسي (Magnetic stirrer) لمدة 10 دقائق ورُشّح المحلول وقدر الـ pH باستعمال كل من أوراق زهرة الشمس وجهاز (pH meter) [28].

استخلاص المادة الفعالة الكافيين من الشاي الاخضر:

أُخذت 10غم من اوراق الشاي الاخضر ووضعت في دورق مخروطي مع 100 مل من الماء المقطر، و 10غم من كاربونات الكالسيوم، وسخن المزيج حتى الغليان لمدة 25 دقيقة، ورشح بعد ذلك بواسطة قمع بخنر، ونقل الراشح الى قمع الفصل، حجم 250 مل، وأُضيف 80 مل من الكلوروفورم ورج المزيج بلطف لمدة 5 دقائق، ثم ترك ليستقر، وتنفصل طبقة الكلوروفورم عن الطبقة المائية، جمعت طبقة الكلوروفورم في دورق زجاجي حجم 100 مل، ونقلت الى الحمام المائي لحين تبخر الكلوروفورم. وغسلت البلورات الناتجة عن تبخر الكلوروفورم بالايثانول الساخن 95 % لقابلية ذوبان الكافيين فيه ورشح من خلال قمع بخنر وبرد وجمع الراشح في جفنة، وترك حتى الجفاف [36].

حيوانات التجربة:

إستخدم في هذا البحث 56 فأراً من نوع *Mus musculus* سلالة Balb-C (ذكور)، وبعمر6-8 أسابيع ووزن (20±5)غراماً، إذ وفرت الظروف البيئية المناسبة لهذه الحيوانات خلال مدة الدراسة وقسمت الفئران الى 4 مجاميع رئيسية تحتوي كل مجموعة على 20 فأراً هي مجموعة الفئران المعاملة بالمستخلص المائي ومجموعة الفئران المعاملة بالمستخلص الكحولي و مجموعة الفئران المعاملة بالمادة الفعالة الكافيين. جرعت ثلاث مجاميع منها عن طريق الفم بالعالق الاميبي 0.1 مليلتر والحاوي على 1000 كيس باستخدام محقنة محورة ، وذلك بإدخال المحقنة إلى الفم، ودفع السائل الحاوي على الأكياس. وبالطريقة نفسها تم تجريع المجموعة الرابعة حيوانات السيطرة السالبة بالمحلول الملحي الطبيعي، اذ قسمت المستخلصات الى ثلاثة تراكيز وهي (2,5 ملغم/ كغم، 5 ملغم/كغم، 10 ملغم/كغم)

الدراسة النسجية:

حضرت المقاطع النسجية باستخدام طريقة شمع البرافين، وحسب ما جاء في [37].

النتائج والمناقشة:

بين الجدول 1 نتائج فحص 1712 عينة غائط من المرضى المصابين بالإسهال أن عدد المخمجين بـ *E. histolytica* بلغ 270 مصاب، أي نسبة 15.77 % من مجموع 1712 عينة لكافة الفئات العمرية، ولكلا الجنسين، وبين الجدول وجود فروق معنوية $p<0,01$ بين نسبة العينات الموجبة والعينات السالبة للفحص.

جدول (1): يوضح العدد والنسبة المئوية للعينة المدروسة حسب الاصابة ولكلا الجنسين.

الحالة الصحية	العدد	النسبة المئوية (%)
سليم	1442	84.22
مصاب	270	15.77
قيمة مربع كاي (Chi-square)	----	** 12.094
** (P<0.01).		

ان هذا الانتشار الواسع لهذا الطفيلي يعود الى طريقة انتقاله بشكل مباشر عن طريق الاغذية، والمياه الملوثة، وعدم الاهتمام الكافي بالنظافة، وقد اشار [38] الى أن تناول 100 كيس كاف لإحداث الخمج، وأن الطور المتكيس مقاوم للكلورة الاعتيادية لمياه الشرب.

الكشف النوعي الكيميائي عن المركبات الفعالة في مستخلصات الشاي الاخضر *Camellia sinensis*

أظهرت نتائج الكشوفات الكيميائية لمستخلص الشاي الأخضر احتواء المستخلص المائي على المركبات الآتية الجدول 2 وذلك لقابلية هذه المركبات على الذوبان في الماء ، وهـذا يتفق مع ما جـــاء به [39]. اما المستخلص الكحولي للشاي الاخضر فقد احتوى ايضا مركبات راتنجية وكومارينات ، وهذه المركبات لا تذوب في الماء، ولكنها تذوب في المذيبات العضوية، وهـذا يتفق مع ما جـــاء به [41,40]، وكذلك فقد كانت قيمة الرقم الهيدروجيني للمستخلصات المائية والكحولية لاوراق الشاي الاخضر حامضية، ويعود اختلاف المركبات الفعالة بين المستخلصات الكحولية والمائية الى التركيب الكيميائي المختلف لهذه المركبات [42].

جدول (2): المركبات الفعالة في المستخلصات المائية والكحولية للشاي الاخضر (+ موجود، - غير موجود)

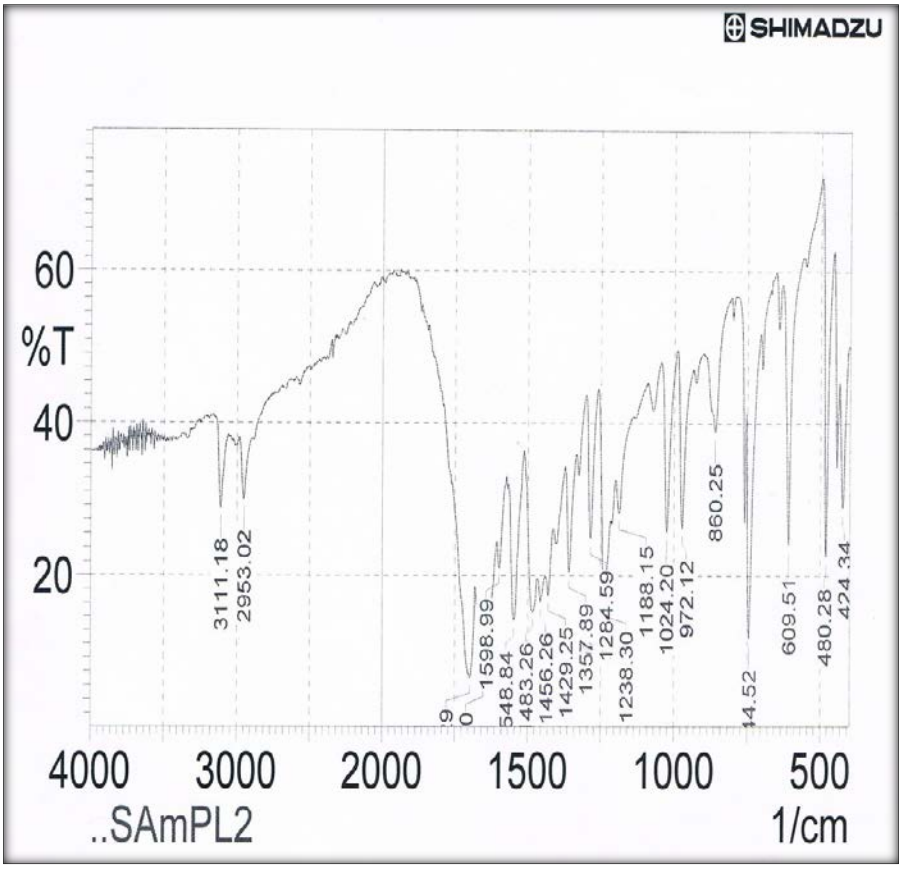
المواد الفعالة	المستخلص المائي	المستخلص الكحولي
القلويدات Alkaloids	+	+
الصابونيات Saponins	+	+
الفلافونات Flavonoids	+	+
الفينولات Phenols	+	+
الزيوت الطيارة Volatile oils	+	+
الكلايكوسيدات Glycosides	+	+
التانينات Tannins	+	+
التربينات Terpene	+	+
الكومارينات Coumarins	-	+
الراتنجات Resins	-	+
الستيرويدات Steroids	-	-
الرقم الهيدروجيني pH	6.1	5.3

تشخيص المادة الفعالة (الكافيين) بوساطة تقنية FTIR:

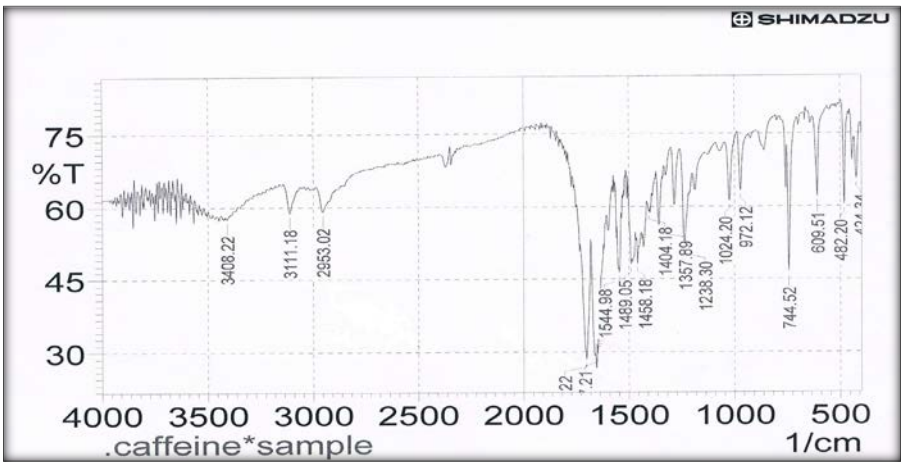
شخص الكافيين القياسي والمستخلص من الشاي الاخضر بجهاز ال FTIR وأظهرت النتائج ارقام القمم التشخيصية التي تعود الى الاواصر بين ذرات الكافيين وهو ما موضح في الجدول 3. ويبين الشكلين 1 و 2 وجود تطابق بين طيفي الكافيين القياسي والمستخلص من الشاي الاخضر، وهذا يدل على نقاوة المستخلص.

جدول (3): يوضح ارقام القمم للاواصر وحركة الذرات وقوتها.

رقم القمة	972 و860	1238، 1188 و1024	1357	1284	1701	2953
الاصرة	=C-H	C-N	C-H	C-N	C=O	C-H
حركة الذرات	Bend	Stretch	Bend	Stretch	Stretch	Stretch
قوة الحركة	Strong	Medium	Medium	Strong	Strong	Medium

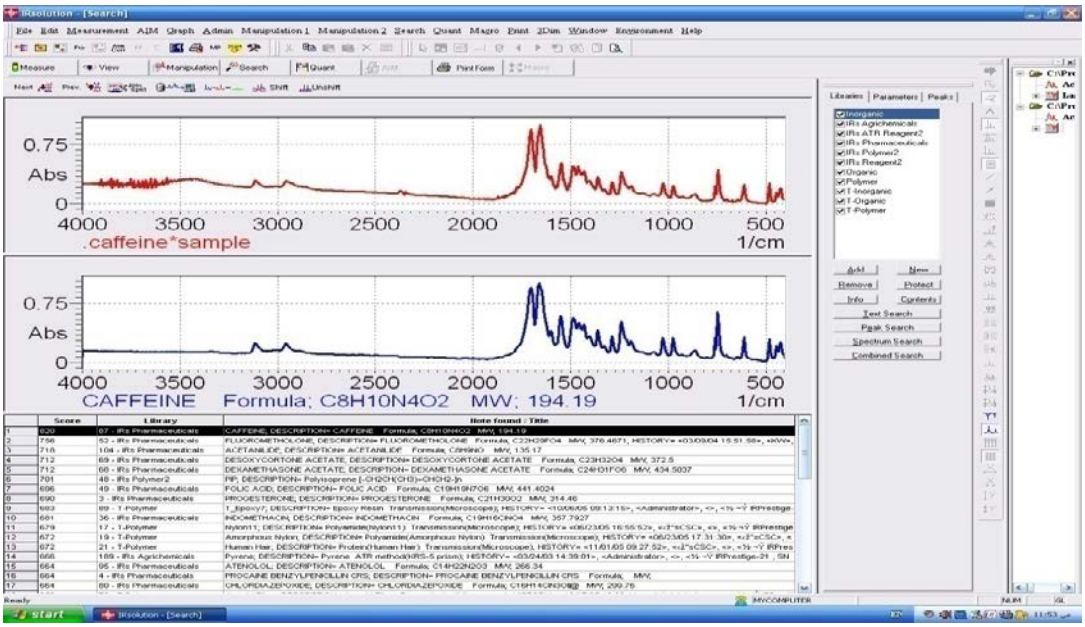


شكل (1): مقطع طيف الكافيين القياسي



شكل (2): طيف الكافيين المستخلص من الشاي الاخضر

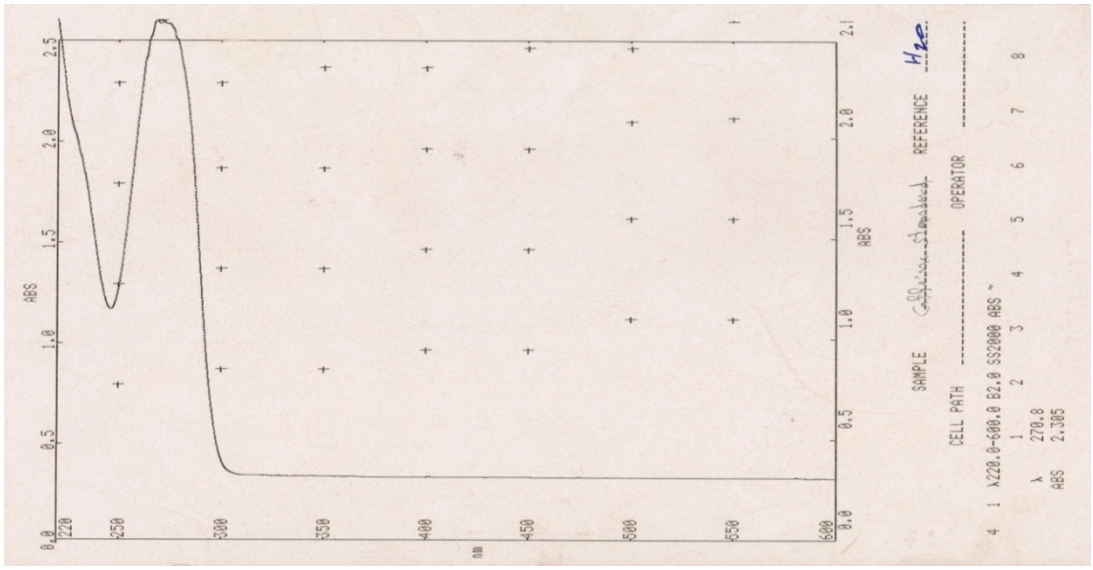
ويوضح الشكل 3 وجود تطابق بين طيف المستخلص والطيف الموجود في قاعدة بيانات الجهاز المخزونة في الشركة Shimadzu المجهزة للجهاز.



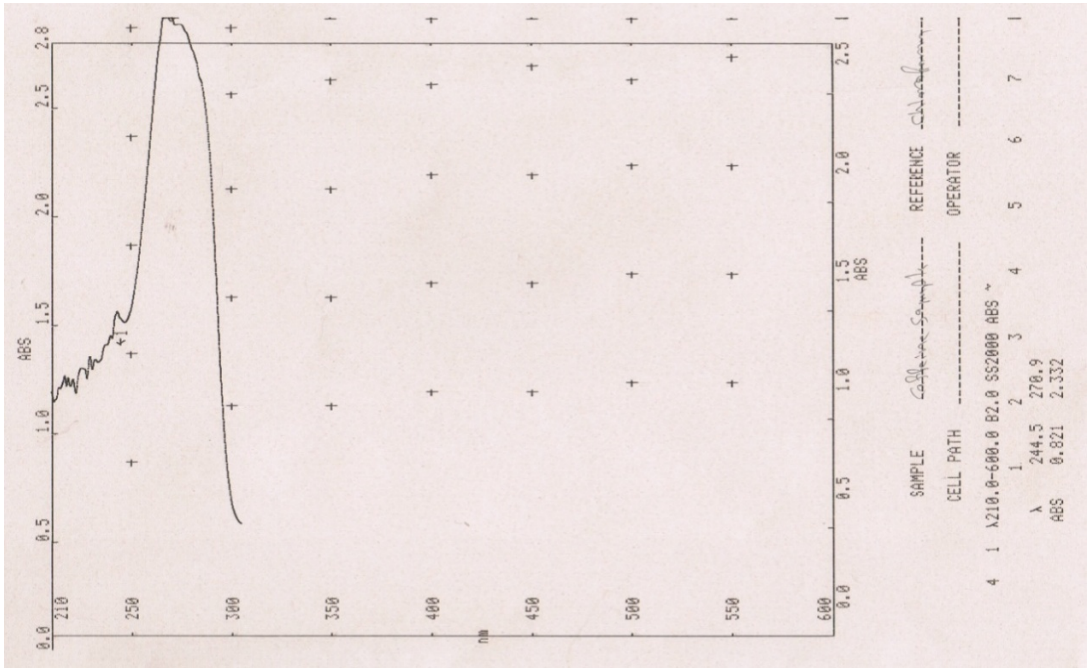
شكل (3): يوضح التطابق بين طيف الكافيين المستخلص والطيف المخزن بالجهاز

تشخيص المادة الفعالة (الكافيين) بوساطة تقنية UV:

سجلت قيمة الـ UV للكافيين القياسي، وقورنت مع قيمة الكافيين المستخلص من الشاي الاخضر، وكانت النسبة متقاربة لكل من الكافيين القياسي، اذ بلغت 270.8، والكافيين المستخلص، إذ بلغت 270.9، وحسب الشكل رقم 4 و5.



الشكل (4): يوضح طيف الـ UV للكافيين القياسي حيث x يمثل الطول الموجي و y يمثل الامتصاصية.

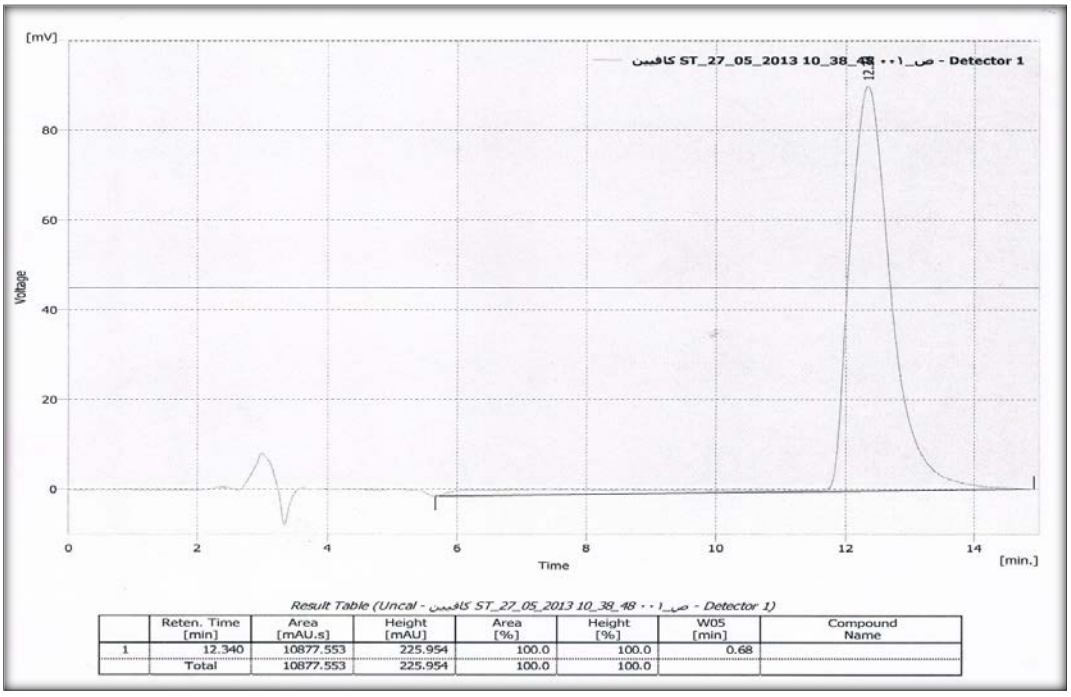


الشكل (5): يوضح طيف الـ UV للكافيين المستخلص من الشاي الاخضر حيث x يمثل الطول الموجي و y يمثل الامتصاصية.

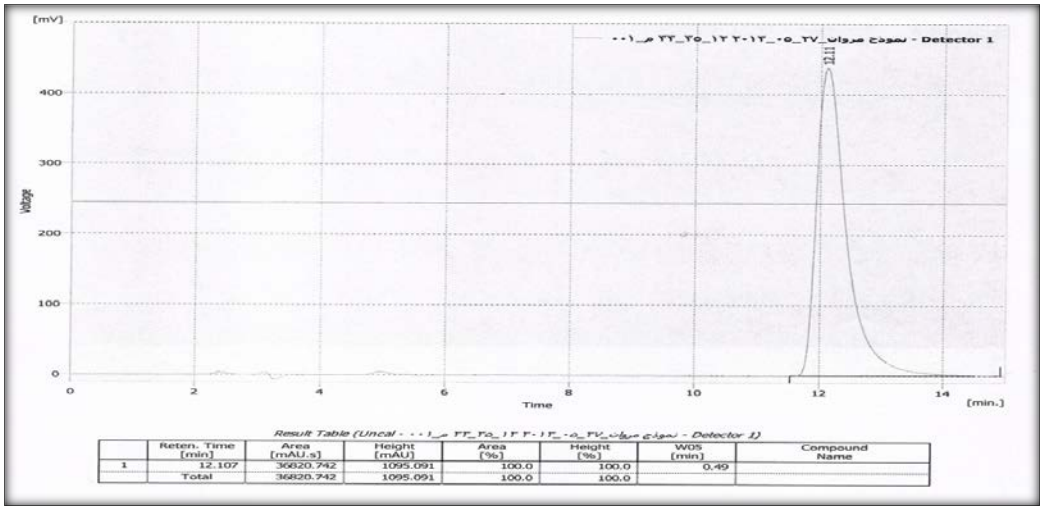
تشخيص المادة الفعالة (الكافيين) بجهاز كروماتوغرافيا السائل عالي الكفاءة HPLC: وضعت عينة للمادة الفعالة (الكافيين) القياسية، وهي إحدى أهم المواد في القلويدات بجهاز الـ HPLC لمدة 15 دقيقة، إذ ظهرت قمة واحدة فقط عند الـدقيقة 12.340، وهذا يدل على عدم وجود مركبات أخرى معه، الشكل 6، وكان وقت ظهور الكافيين المستخلص مـقارباً لوقت الكافـيين القياسي، إذ ظهرت النـتيجة عند الدقيـقة 12.107 حسب موضح في الشكل 7، ويظهر جدول 4 نقاوة الحزمة للمستخلص ومساحتها مقارنة بالكافيين القياسي.

جدول (4): مقارنة عدة عوامل بين الكافيين القياسي والمستخلص

المادة	زمن الاحتجاز (Min)	مساحة الحزمة (mAU.s)	النقاوة %
الكافيين القياسي	12.340	10877	99
الكافيين المستخلص	12.107	36820	65.7



شكل (6): يوضح وقت الاحتجاز للكافيين القياسي

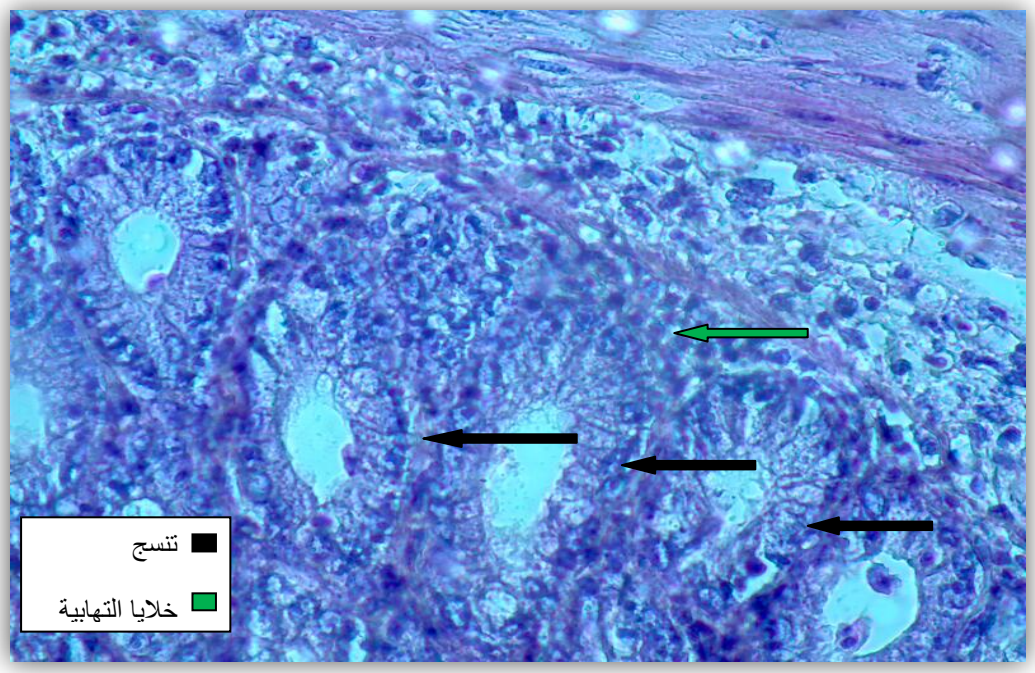


شكل (7): يوضح وقت الاحتجاز للكافيين المستخلص من الشاي الاخضر.

الدراسة النسجية للحيوانات المخمجة والمعاملة بالمستخلصات النباتية

المستخلص المائي للشاي الاخضر:

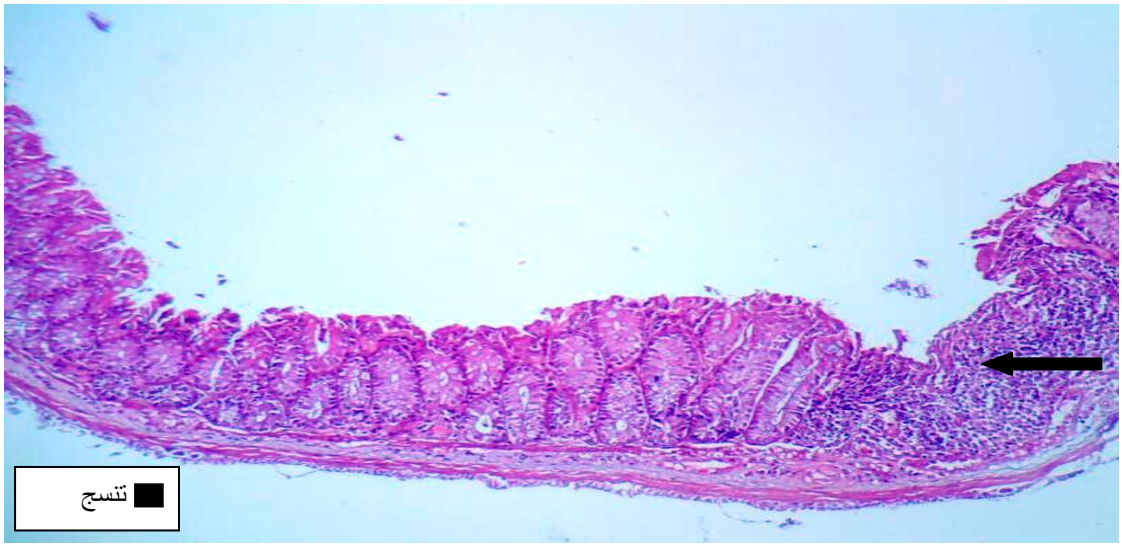
لوحظ تفاوت بين التراكيز الثلاثة المستخدمة في علاج الفئران المخمجة بطفيلي الاميبا الحالة للنسيج، إذ اظهر التركيز العالي من المستخلص 10 ملغم/كغم اعلى انخفاض في نسبة الخمج في الفئران المعالجة به اذ بلغت 12.50 % بعد انتهاء مدة المعاملة البالغة سبعة ايام، وأظهر الشكل 8 وجود تنسج في الخلايا المبطنة للغشاء المخاطي الغدي مع ارتشاح للخلايا الالتهابية.



شكل (8): مقطع عرضي في قولون فأر معامل بالتركيز العالي 10 mg/kg من المستخلص المائي X400 (الهيماتوكسيلين والمايوسين)

المستخلص الكحولي للشاي الاخضر:

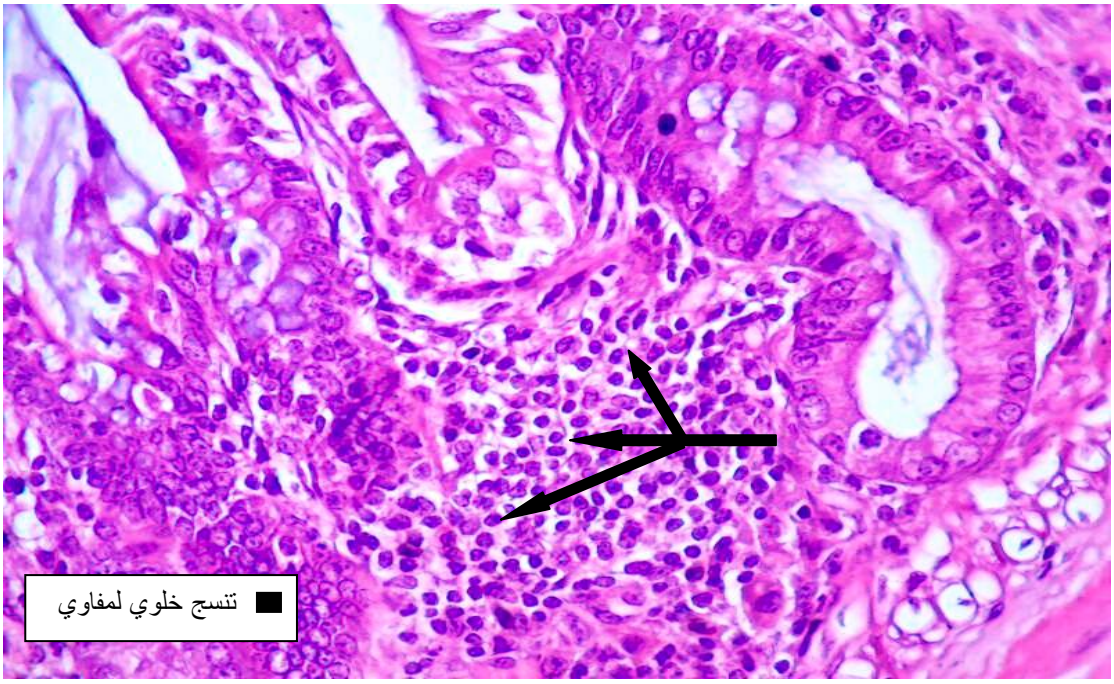
لوحظ تفاوت في نسب الخمج بين التراكيز الثلاثة المستخدمة في علاج الفئران المخمجة بطفيلي الاميبا الحالة للنسيج، إذ اظهر التركيز العالي من المستخلص 10 ملغم/كغم اعلى انخفاض في نسبة الخمج في الفئران المعالجة به اذ بلغت 68.75 % ويبين الشكل 9 وجود تنسج في العقدة اللمفاوية الموجودة في الغشاء المبطن للنسيج.



شكل (9): مقطع عرضي في قولون فأر معامل بالتركيزالعالي 10 ملغم/كغم من المستخلص الكحولي X100 (الهيماتوكسيلين والمايوسين).

المادة الفعالة الكافيين:

لوحظ تفاوت في نسب الخمج بين التراكيز الثلاثة المستخدمة في علاج الفئران المخمجة بطفيلي الاميبا الحالة للنسيج، إذ اظهر التركيز العالي من المستخلص 10 ملغم/كغم اعلى انخفاض في نسبة الخمج في الفئران المعالجة به اذ بلغت 31.25 %، ويبين الشكل 10 وجود تنسج خلوي لمفاوي.



شكل (10): مقطع عرضي في قولون فأر معامل بالتركيز العالي 10ملغم/كغم من المادة الفعالة (الكافيين) المستخلصة من الشاي الاخضر X400 (الهيماتوكسيلين والمايوسين).

تبين لنا النتائج السابقة أن كلا من التراكيز العالية للمستخلصات تأثير كبير في القضاء على الطفيلي وعلاج التأثيرات المرضية الناجمة عنه قياساً بالتراكيز المتوسطة والواطئة، إذ انخفض عدد الاطوار المتكيسة الخارجة مع البراز وهذه النتائج تتوضح لنا أكثر عند دراسة المقاطع النسجية للقولون الناجمة عن المعاملة بهذه المستخلصات لمختلف التراكيز، وقد يعزى ذلك الى التاثير العلاجي الفعال للمستخلصات النباتية بسبب احتوائها على مواد فعالة مثل القلويدات، الفينولات، التانينات، الفلافونات، الكلاسيدات، الصابونيات، والراتنجيات التي قد تعمل على القضاء على الطفيلي داخل القولون، اذ ان تثبيط الطفيلي ومنعه من الانقسام والتكاثر داخل تجويف القولون، يعود الى عدم استمرار الطفيلي باحداث الامراضية والتغيرات النسجية الشديدة في انسجة القولون، إذ تعمل القلويدات عوامل محفزة للمناعة الخلوية، ويعد الكافيين من القلويدات [13]، التي لها القدرة على تحطيم الجدار الخلوي Parasitophorous vacuole، وما يحويه من بروتينات ودهون، وبالتالي القضاء على الطفيلي [43]، وكذلك تمتاز القلويدات بقدرتها على التداخل مع الحامض النووي DNA، فيما تعمل التانينات على تثبيط الانزيمات والبروتينات الناقلة والموجودة في غشاء الخلية [45,44]. وذكر [46] ان الشاي الاخضر يحتوي على حامض الكاليك Gallic acid الذي يؤدي الى ايجاد بيئة غير ملائمة لنمو الطفيلي وقد أكدت بعض الدراسات أن استخدام التراكيز العالية من المستخلصات النباتية أكفأ من التراكيز الواطئة في قتل الطفيليات داخل الجسم الحي [47].

الاستنتاجات:

كانت نسبة الخمج بطفيلي *E. histolytica* 15.77% لدى الاطفال المراجعين لمستشفى الطفل المركزي. وتمثلت التغيرات النسجية بفعل الطفيلي الى فرط تنسج للخلايا الكاسية، ارتشاح خلوي وضمور الزغابات المعوية. وتفوق المستخلص الكحولي على المائي باحتوائه على الراتنجيات و الكومارينات بالاضافة الى المركبات الاخرى . كما اظهر المستخلص المائي للشاي الاخضر فعالية كبيرة في التقليل من عدد الاطوار المتكيسة مقارنة مع المستخلص الكحولي والمادة الفعالة (الكافيين) وكان التركيز العالي (10 ملغم/كغم) هو الافضل بين التراكيز لكل من المستخلص المائي والكحولي، المادة الفعالة. واظهرت الدراسة ان المادة الفعالة المستخلصة من الشاي الاخضر هي مادة الكافيين بالمقارنة مع الكافيين القياسي وبهذا تكون طريقة ألاستخلاص المستخدمة كفوءة.

التوصيات:

زيادة الوعي الصحي لدى السكان لمرض الاميبا الحالة للنسيج والتأكيد على العادات والممارسات الصحية لدى الأطفال للحد من انتشار الطفيلي. واختبار المستخلصات النباتية للشاي الأخضر وموادها الفعالة على خواص الدم بصورة كاملة للمخجين. بالاضافة الى معرفة التأثير ألتآزري للمستخلص المائي والكحولي والمادة الفعالة (الكافيين) في زيادة الكفاءة العلاجية ضد الطفيلي. كذلك فصل وتنقية المواد الفعالة الأخرى للشاي الأخضر و قياس فعاليتها ضد الأميبا وغيرها من الممرضات خارج و داخل الجسم الحي و التعرف على آلياتها في القتل فضلاً عن دراسة الخصائص العلاجية الأخرى لهذه المركبات.

المصادر:

1. Sannella, A.; Gradoni, L.; Persichini, T.Ongini, E.; Venturini, G.and Colasanti. M. (2003). Intracellular release of Nitric Oxide by NCX 972, a No-releasing Metronidazole, enhances In vitro killing of *E. histolytica* .*Anti microb. Agents Chemo*. 47(7):2303-2306.

Microb. Agent.chem. 50(5) : 1731-1737.

9. Singh, UP.; Prithiviraj, B.;Sarma, BK.;Singh, M.; and Ray , AB. (2001).Role of garlic Allium sativum in human and plant diseases. *Ind. J.exp. Bio*. 39(4) : 310-322.

10. Swiderski ,F.; Dabrowski, M.; Rusaczone k, A.; and Waszkiewicz, B. (2007). Bio active substances of garlic and their role in dietoprophylaxis and dieto therapy. Rocz.Panstw.Zaki . Hig .,58(1) :41-60.

11. Cabrera, C.; Artacho, R. and Giménez. (2006). Beneficial effects of green tea: a review. *J. Am. Coll. Nut.* 25(2):79-99.

12. Braun L, Cohen M. (2007). Herbs & Natural Supplements: an evidence-based guide, 2nd end. Marrickville: Elsevier.

13. Richard, K.C. (2007). Coffee: The demon drink, New Sci., 21: 4-6.

14. Enright, G. D.; Terskikh, V. V.; Brouwer, D. H. and Ripmeester, J. A. (2007). Cryst. Growth Des, 7 : 1406-1410.

15. Lehmann, C. W. and Stowasser, F. (2007). Chem. Eur. J. 13, 2908–2911.

16. Kishi, Y. and Matsuoka, M. (2010). Cryst. Growth Des., 10, 2916–2920.

2. Tachibana, H.; Matsumoto, N.; Tsukamoto, H.and Yoshihara, E. (2004). Improved affinity of a human anti- *E. histolytica* Gal\GalNAc Lectin Fab fragment by a single amino acid modification of the light chain. Clin. *Diagno. Lab. Immunol.*, 11(6):1085-1088.

3. DiMiceli, L. (2004). Distinguishing between pathogenic and non-pathogenic species of *Entamoeba*. *Lab. Med.*, 35:613-616.

4. Eichinger, D. (1997). Encystation of *Entamoeba* parasites. *BioEssays.*, 19 (7) : 633-639 .

5. Espinosa-Cantellano, M. and Martinez-Palomo,A. (2000).Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease. *Clin. Microbiol*., 13(2): 318-331.

6. Tanyuksel, M. and Petri, W.A. (2003). Laboratory Diagnosis of Amoebiasis. *Clin. Microbiol. Rev.*, 16:713-729.

7. Yu sung; Yu Yuchang and NiLun Ting. (2005). Capsaicin biosyn thesis in water stressed hot pepper fruits. Bot.Bull. Acad. Sin.,(46):35-42.

8. Coppi , A.; cabinian ,M.; Mirelman , D.; And Sinnis,P. (2006). Antimicrobial activity of Allicin abiologically active compound from garlic cloves

17. Lieberman HR (2001) The effects of ginseng, ephedrine and caffeine on cognitive performance, mood and energy. Nutr Rev 59:91–102.

18. James, J.E. (1997). Understanding caffeine. Sage, Thousand Oaks.

19. Orozco-Gregorio, H.; Mota-Rojas, D.; Bonilla-Jaime, H.; Trujillo-Ortega, ME.; Becerril-Herrera, M.; Hernández-González, R. and Villanueva-García, D. (2010). Effects of administration of caffeine on metabolic variables in neonatal pigs with peripartum asphyxia. Am. J. Vet. Res., 71: 1214 - 1219.

20. Schmidt, B. (2005). Methylxanthine therapy for apnea of prematurity: Evaluation of treatment benefits and risks at age 5 years in the international caffeine for apnea of prematurity (CAP) trial. Biol. Neonate, 88: 208-213.

21. Ergenekon, E.; Dalgiç, N.; Aksoy, E.; Koç, E. and Atalay, Y. (2001). Caffeine intoxication in a premature neonate. Pediatr. Anaesth., 11: 737-739.

22. Clark, C.G. and Diamond, L.S. (2002). Methods for cultivation of huminal parasitic protists of clinical importance. *Clin. Microbiol. Rev.*,15(2):329-341.

23. Singh, A.; Ericttouft, B.H. and William, A.C. (2009). Rapid diagnosis of intestinal parasitic protozoa .*J. Infect. Dis*.,61(3): 280-286.

24. Coles, E.H. (1986). Veterinary Clinical Pathology. 4th ed., Press of W.B. Saunders Co: 472-545.

25. Minvielle, M.C.; Molina, N.B.; Polverino, D. and Basualdo, J.A. (2008). First genotyping of *Giardia lamblia* from human and animal feces in Argentina, South America. Mem. Inst. Oswaldo. *Cruz. Rio de Janeiro*, 103(1):98–103

26. Anesininy, C. and Perez, C. (1993). Screening of plant used in Agrentine folk medicine for antimicrobial activity. J. Ethanopharmacol., 39 (2): 119-128.

27. Swamy, S.M. (2000). Cytogenetic and Immunopotential effect of ethanolic extract of *Nigella sativa* seed .J. Ethanopharma 70(1):1-7.

28. Shihata, I.M. (1951). A pharmalogical study of *Anagllis arvensis*. M.D. Vet. Thesis, Cairo University.

29. Al-Abid, M.R. (1985). Zurrzusamme mse turungder Abschla B membrane in Phoenix dactylifera. Wurzburg University. Wuzzburg, F.R. of Germany. pp: 153-140. (Abstract in English).

30. Harbone, J.B. (1973). Phytochemical methods. Chapman and Hall. London.

31. الشيخلي، محمد عبد الستار و العزاوي، فريال حسن وفياض، حسن. (1993). الكيمياء التحليلية، الجامعة المستنصرية، ص 320-323 .

32. Harbone, J. B. (1984). Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plant analysis. 2nd ed., Chapman and Hall. London.: 288.

33. Indian Herbal Pharmacopoeia. (1998). A joint Publication of Regional Research Laboratory, council of Scientific and industrial research. Jammatawi.1: 1-10.

34. Cannell, P. (1998). How to Approach the isolation of Natural products – 1st ed Human – press. inc.

35. Geisman, T. A. (1962). Chemistry of Favonoids Compounds. Macmillan Co. New York. 90-101.

36. AL-Hitti, I.K. and Ibrahim, S.S. (2009). Extraction, Identification and determination of caffeine and trace metals in three types of tea leaves, J. of Al-Anbar University for pure science: 3(1): 45-49.

37. Bancroft, J.D. and Stevens, A. (1982). Theory and practice of histological techniques, 2nd ed. Churchill Livingstone, London. pp109-120.

38. Pickering, L.K.; Woodward, W.E.; Dupont, H.L. and Sullivon, P**.** (1984) .Occurrence of *Giardia lamblia* in children in day-care centres.J. Pediatrics.104:522-526.

39. السدح، منصور محسن محمد. (2003). دراسة تأثير المستخلصات النباتية للقات والشاي الاخضر على فعالية إنزيمي AchE و MAO في أمصال مرضى السكري والكآبة. اطروحة دكتوراه فلسفة، كليةالعلوم، الجامعة المستنصرية.

40. Sofowara, A. (1984). A medicinal plants and Traditional medicine in Africa, John Wiley Chichester,: 256.

41. Opara, A.A. and Ansa, M.A. (1993). The antibacterial activity of tea and coffee on selected organisms. J. Med. Lab. Sci. 3: 45-48.

42. قطب، فوزي طه. (1981). النباتات الطبية زراعتها ومكوناتها. دار المريخ للنشر. الرياض – السعودية.

43. Anthony, H.R. (1976). Chemical Microbiology: an Introduction to Microbial Physiology. 3rd ed. Butterworth and Co. (publishers). London.

44. Phillipson, J.D. and Neill, M. G. (1987). New leads to the treatment of protozoal infections based on natural product molecules. Acta Pharm Nord. 1:131–144.

45. Cowan , M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents . Clin. Microbiol. Rev. 12(4):564-582 .

46. USDA/ US Department of Agriculture. (2003). USDA Database for the Flavonoid Contents of Selected Foods. Beltsville.

47. المسعودي، هيام خالص. (2001). استخدام مستخلصات الثوم وقشور ثمار الرمان في معالجة الفئران البيض المصابة بالمشعرات الفأرية *Trichomonas muris*. رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة بابل: صفحه 91.

Iraqi Journal of Biotechnology, 2015, Vol. 14, No. 2 , 314-326

تأثير المستخلص الكحولي لنبات البمبر (*Cordal myxa* L.) على انزيمي GST, ALP ومضادات الاكسدة MDA في ذكور الفئران البيض المعاملة بمركب رابع كلوريد الكاربون

أقبال فاضل علوان [1] ، عمار مولى حمود[1] ، عصام فاضل الجميلي[2]

[1]وزارة العلوم و التكنولوجيا / دائرة بحوث الكيمياء – الجادرية- بغداد – العراق . ص. ب.760
[2]فرع التقنية الاحيائية – معهد الهندسة الوراثية و التقنية الاحيائية للدراسات العليا – جامعة بغداد

الخلاصة: تم دراسة تاثير مستخلص الكحولي لنبات البمبر(*Cordal myxa* L.) اتجاه إنزيمي (ALP , GST) و مضادات الاكسدة (MDA) في ذكور الفئران البيض و تم استخدام (32) فأر ذكر من نوع (Swiss albino) بعمر (5-8 عوبس) و بوزن تقريبي (20-25) غم وتمت معاملتها بمركب رابع كلوريد الكاربون . اجريت الاختبارات على التداخل بين ثلاثة تراكيز لمستخلص الكحولي لنبات البمبر (350,250,100 ملغم / كغم) و 3.2 ملغم / كغم لمركب رابع كلوريد الكاربون من خلال التجريع عن طريق الفم لمدة 7 أيام (قبل وبعد المستحث) .
أظهرت الدراسة بان التركيز 350 ملغم / كغم هو الافضل و تقترح الدراسة ان تستخدم تراكيز اعلى من هذا التركيز كون النبات يستخدم للاستهلاك البشري بصورة واسعة .
الكلمات المفتاحية : رابع كلوريد الكاربون ، مستخلص نبات البمبر ، مضادات الاكسدة ،التغيرات الانزيمية .

Effect of alcoholic extract of (*Cordal myxa* L.) on (GST,ALP) and MDA antioxidant on mice treated by carbon tetrachloride

Iqbal Fadhel Alwan[1] , Amar M. Hamood[1]and Essam F. Alwan[2]

[1]Ministry of Science and Technology , Research Department material , Bag. Iraq .
[2]Biotechnology Dep. Genetic Engineering and Biotechnology For postgraduate studies, University of Baghdad .

Abstract: The effects of alcoholic extracts of (*cordial myxa* L.) plant against enzymes (ALP, ,GST) and MDA on the albino mice treated with carbon tetrachloride were studied . 32 male albino mice (Swiss albino, 5-8 weeks and 20-25 gm weight) .Conducted tests on the overlap between the three concentration (100, 250,350 mg / kgm) of alcoholic extract of (cordial myxa L) and 3.2 mg / kgm of carbon tetrachloride with interaction included two types of treatment (pre- ccl_4 and post-ccl_4) through oral dosage and for a period of 7 days. The result of the study shows that the concentration 350mg / kgm is the best concentration of alcohol extract there was used and study suggests that use the concentrations of this because that the plant is used for human consumption broadly .
Keywords: carbon tetrachloride, extract plant cordial myxaL, antioxidant , enzymatic changes

المقدمة:

ينتمي نبات البمبر cordial myxa) (L.) الى عائلة البورانجية(Boraginaceae) و تنتشر زراعة نبات البمبر cordial) myxa (L.) في العراق بمنطقة البصرة بشكل واسع و يستخدم للاغراض الطبية و المشروبات العطرية و الزيتية حيث تكون ثمرة نبات البمبر ذات لب غروي صمغي و له استخدامات في الطب الشعبي ، و المستخلص الكحولي لثمار نبات البمبر يحتوي على المركبات الفلافونيدية و قلويدات و صمغ و مواد دباغية وتكون ثمار البمبر حلوة المذاق ولها دور كبير في تحفيز الجهاز المناعي بالإضافة إلى احتواء الثمرة على الماء و فيتامين C و مواد مضادة للأكسدة التي تحمي الخلايا من التلف و السرطان , فضلا عن وجود المواد الكيمياوية كالقلويدات و البولي فينولات و الصابونين و الفلافونيدات(1) بالاضافة إلى الفيتامينات الأساسية التي هي مركبات مهمة في تخفيف خطر الإصابة بالسرطان و تساعد على تعزيز مناعة الجسم و تقي ضعف الجهاز المناعي المرتبط بتقدم العمر حيث يقوم بتنشيط جينات و إنزيمات معنية كمضادة للاكسدة في الخلايا المناعية و تقليل الجذور الحرة بالإضافة إلى أهميتها في علاج أمراض السرطان ومسبباتها و منع بعض التهابات الكبد (2). تعد الملوثات البيئية بالمواد الضارة بصحة الإنسان و من أهم مشاكل العصر نتيجة التقدم الصناعي وزيادة نشاط الإنسان في اكتشاف العديد من المركبات الكيميائية التي تستخدم لاغراض متعددة منها صناعة المبيدات و العقاقير و الصناعات الكيمياوية منها مركب رباعي كلوريد الكاربون ، وهو من المركبات العضوية واسعة الاستخدام و رائحته خفيفة و يمكن تحديدها ولو كانت عند مستويات قليلة ، يسبب سمية واضحة للكبد من خلال تحطيم خلاياه او تضررها من خلال اليات عديدة منها تنخر و تشحم الكبد (3).

أن الزيادة في فعالية الإنزيمات الكبد يمكن أن تحدث نتيجة لزيادة عمليات التصنيع في الخلية أو كأستجابة لعمليات النمو الحاصلة في الخلية .

يوجد أنزيم ، Alkaline phosphatase (ALP)في الكبد و الكلية و يستخدم لقياس او تحديد مدى الضرر الذي يحصل في الخلايا الكبدية اذ يتركز هذا الانزيم في الخلايا الكبدي (4) .

ومن جانب آخر لاحظ (5) أن المواد المضادة للأكسدة تؤدي الى استحثاث زيادة في نشاط انزيم glutathione – S- (GST) transfers اذ يعد هذا الانزيم من الانزيمات متعددة الوظائف من خلال أزالة المتأيضات السمية لبعض المسرطنات و المطفرات . أماMDA تحدث نتيجة تأكسد الاحماض الدهنية غير المشبعة الموجودة في الدهون تؤدي الى تحول الاواصر المزدوجة الى بيروكسيد و بالتالي الى الديهايد أوكتيون ، ويسمى التلف الحاصل في الاحماض الدهنية غير المشبعة و متعددة الاواصر غير المشبعة و الموجودة في الاغشية الخلوية بواسطة الجذور الحره بعملية الاكسدة الفوقية للدهون و التي تحدث عادة بعملية التأكسد الذاتي للاحماض في الخلية (6) . ان النتواتج النهائية لميكانيكية اكسدة الحوامض الدهنية غير المشبعة و متعددة الاواصر المزدوجة هي الالديهايدات و منها Malondialdehyde (MDA) و الذي يمتلك سمية عالية و فعالية تثبيطية للانزيمات المضادة للاكسدة كما وانه يعمل بوصفه بادئ للاورام وعاملا مساعدا للسرطان (7) .

الهدف من هذه الدراسة هو معرفة تأثير فعالية المستخلص الكحولي لنبات البمبر قبل و بعد تجريع الحيوانات المختبرية بالمركب العضوي CCl4 وذلك من خلال قياس فعالية انزيم ALP و مضادات الاكسدة الفوقية للدهون (MDA) و انزيم GST في دم الفئران المختبرية .

المواد و طرائق العمل

تحضير المستخلص الكحولي :

تم استخلاص مسحوق ثمار نبات البمبر بواسطة الكحول الاثيلي بتركيز 70% باستخدام جهاز السكسوليت ُجفف المستخلص باستخدام جهاز المبخر الدوار تحت درجة حرارة 50م^0 ، ثم ُجفد المستخلص بجهاز التجفيد بالتبريد للحصول على مسحوق للمستخلص (8) .

تم تحديد الطول الموجي للمستخلص) (UV281-.283 nmبواسطة جهاز المطياف الضوئي uv.vis .

تم قياس المركبات الفعالة في المستخلص الكحولي لثمار نبات البمبر باستخدام جهاز HPLC من نوع Shimadz A6 و نوع العمود C_{18} ODS (9) .

الطورالمتحرك : A مكون من ماء لا ايوني + حامض الفسفوريك (1000-1) حجم / جحم .

B : مكون من أسيتونايترايل + حامض الفسفوريك (1000-1) حجم / جحم .

برنامج مزج محاليل الطور المتحرك أثناء عملية الفصل خلال مروره في عمود الفصل يتكون من -(20min)15%, 30%,(25min)- 100%, (45min0) % 0=B و معدل سرعة الطور المتحرك .1ml/1min.

لتحليل الكيميائي التقريبي و النوعي للمستخلص الكحولي لثمار نبات البمبر .

تم تحليل الكيميائي وفق طريقة التحليل النوعي الكيمياء التحليلية للمكونات الطبية .

الكشف الكيميائي لبعض المكونات المواد الفعالة الموجودة في مستخلص ثمار نبات البمبر(10) .

الكشف عن التانينات : باستخدام كاشف خلات الرصاص بظهور راسب ابيض هيلامي.

الكشف عن القلويدات : باستخدام كاشف ماير بظهور راسب ابيض .

الكشف عن الفلوفينات : عن طريق استخدام محلول هيدروكسيد الامونيوم .

الكشف عن الصابونيات : عن طريق استخدام كلوريد الحديد .

الكشف عن كلاسيدات : عن طريق استخدام محلول فهلنك .

أدارة الحيوانات المختبرية

استخدام (32) فأر ذكر من نوع) (Swiss albino بعمر (5-8 أسبوع) وبوزن تقريبي (20-25غم) وضعت في أقفاص بلاستيكية، تم تغذيتها بالعلف المركز والماء . و قسمت الى اربع مجاميع كما يلي :

المجموعة الأولى :

تتكون من (أربعة فئران) وأعطيت محلول PBS (محلول دارئ الفوسفات) باليوم الاول والماء لمدة (ستة ايام) و تم قتلها في اليوم السابع عن طريق فصل الفقرات العنقية وتعتبر السيطرة السالبة .

المجموعة الثانية :

تتكون من (أربعة فئران) و أعطيت مادة CCl_4 بتركيز3.2 ملغم / كغم في اليوم الاول عن طريق الفم وبعدها اعطيت الماء (لمدة ستة ايام) و تم قتلها في اليوم السابع عن طريق فصل الفقرات العنقية وتعتبر مجموعة السيطرة الموجبة .

المجموعة الثالثة :

تتكون هذه المجموعة من (اثنا عشر فأرا) قسمت إلى ثلاثة مجاميع اعطيت محلول CCl_4 بتركيز3.2 ملغم / كغم عن طريق الفم وبعده 6 ساعات أعطيت المستخلص الكحولي لنبات البمبر بثلاثة تراكيز هي (100 ، 250 ، 350 ملغم /كغم) مستمرة لمدة ستة أيام ويتم قتلها في بداية اليوم السابع عن طريق فصل الفقرات العنقية.

المجموعة الرابعة :

تتكون هذه المجموعة من (اثنا عشر فارا) قسمت إلى ثلاثة مجاميع اعطيت المستخلص

الكحولي لنبات البمبر عن طريق الفم بثلاثة تراكيز هي (100، 250 ، 350 ملغم /كغم) لمدة ستة ايام وبعدها أعطيت المطفر CCl_4 بتركيز 3.2 ملغ /كغم بعد مرور (6 ساعات) من نهاية أعطاء الجرعة الساد سة و يتم تشريحها في بداية اليوم السابع عن طريق فصل الفقرات العنقية .

تحضيرعينات الدم :
قتلت الحيوانات عن طريق الازاحة العنقية و أخذ الدم من قلب الفأره ووضع في أنبوبة ابنروف . و نبذ بواسطة جهاز نبذ المركزي بسرعة 3000 دوره / دقيقة لمدة 10 دقائق واستخدم الراشح في قياس الإنزيمات .

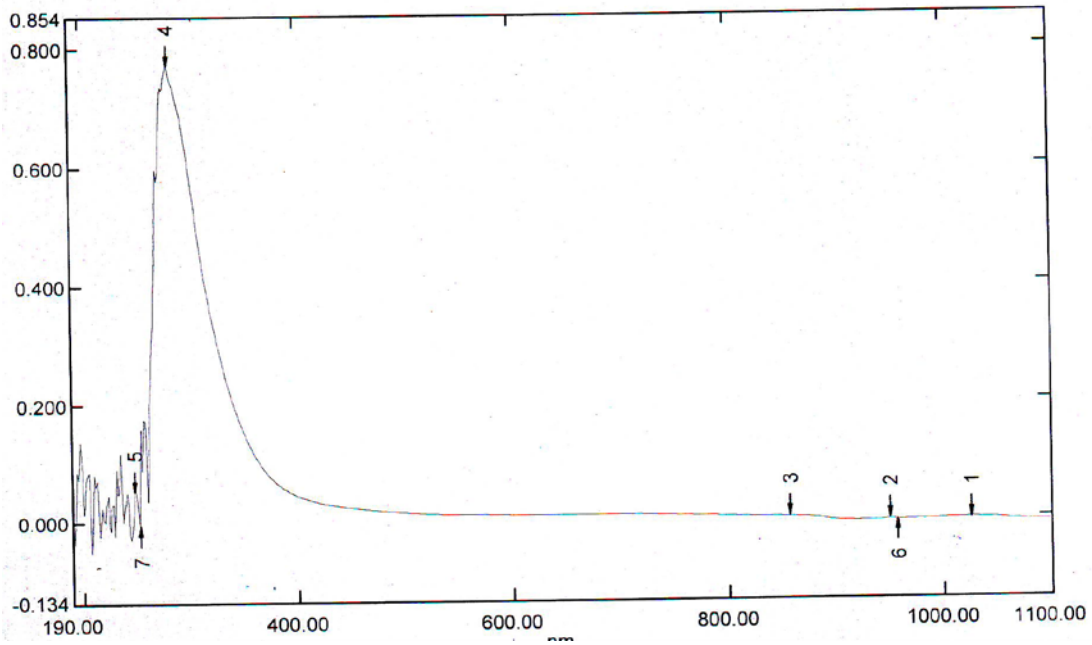
تحديد مستوى و فعالية إنزيم Alkaline (phosphatase) (ALP)**:**
ان العينه المستخدمة في هذا الاختبار هي المصل (Serum) لتحديد فعالية انزيم (Alkaline phosphatase) (ALP) واتبعت (11) حيث تم استخدام اربعة انابيب اختبار لكل نموذج تمثل الاولى عينة النموذج Sample و الثانية ضابطة النموذج Sample blank و الثالثة تمثل العينة القياسية Standard واخيرآ تمثل الرابعة العينه الضابطه Reagent blank وحضرت هذه النماذج تبعا لتعليمات المعتمدة في العدة المستخدمة لقياس الأنزيم ، مزجت الانابيب جيدا ووضعت في مكان مظلم لمدة 5 دقائق ، بعدها تم قياس الكثافة الضوئية للمحاليل على طول موجي (510nm) باستخدام جهاز المطياف الضوئي .

تحضير محلول الدم (لتحديد مستوى و فعالية أنزيم GST) .
تقتل الحيوانات عن طريق الازاحة العنقية و يأخذ الدم من قلب الفأره و يوضع في أنبوبة أختبار يحتوي على (EDTA) كمادة مانعه للتخثر . مزج المحلول و نبذ بواسطة جهاز الطرد المركزي بسرعة 3000rpm لمدة 10 دقائق بواسطة محلول ملح الطعام (0.9%) . يترك الراشح ويضاف 1مل من الماء المقطر ثم يمزج جيدآ و يحفظ بدرجة (-20^0م) إلى حين استخدامه لقياس أنزيم (GST) .

تحديد مستوى و فعالية أنزيم GST:
النموذج المستعمل هو نفس النموذج المحضر المستخدم لقياس فعالية أنزيم glutathione – S- transfers ، وفق طريقة (12) .

طريقة تقدير مستوى(MDA) الاكسدة الفوقية للدهون في مصل دم الحيوان :
قياس مادة المالون داي الديهايد التي هي من نواتج الثانوية للاكسدة الفوقية للدهون بالطريقة اللونية المستخدمة و التي تعتمد على التفاعل بين مركب حامض الثايوباويثورك و المالون داي الديهايد ليعطي مركب لونيا على امتصاص بطول موجي له هو (nm532) وقد استخدمت طريقة (13) .
أخضعت نتائج مستويات الإنزيمات GST, (ALT) **في** الكبد ومصل الدم GST وكذلك MDA إلى تحليل التباين باستخدام برنامج الإحصائي (2001) SAS لمعرفة اقل فرق معنوي بين معدلات المجاميع تم استخدام تحليل Least Significant difference / LSD عند مستوى احتمالية **($P \leq 0.05$)** لمعرفة الفروق المعنوية بين مستويات المعاملات المختلفة .

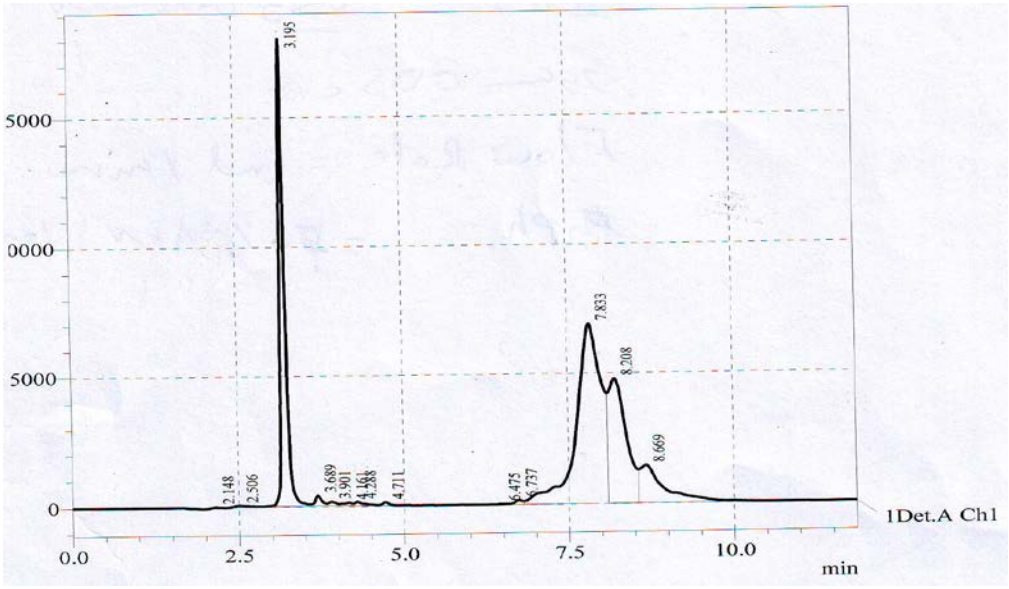
النتائج و المناقشة :
قياس أطياف الاشعة فوق البنفسجية :
تم تشخيص الطول الموجي لمركب المستخلص الكحولي لثمار نبات البمبر بواسطة قياس الطيف الضوئي (UV.Visible) و كان الطول الموجي بحدود (281-283nm) و الشكل رقم (1) يوضح ذلك .



شكل (1) يوضح الطول الموجي لمستخلص الكحولي لنبات البمبر بواسطة جهاز (UV.Visible).

فحوصات HPLC :

يبين الشكل رقم (2) عملية فصل مركبات مستخلص ثمار نبات البمبر الكحولي بظهور مركب عند زمن احتجاز هو (3.2) دقيقة بواسطة جهاز الكروماتوغرافي السائل العالي الاداء HPLC (14) .



شكل رقم (2) يوضح الفصل بجهاز HPLC الكروماتوغرافي السائل العالي الاداء للمستخلص الكحولي لثمار نبات البمبر .

تقدير المكونات الكيمياوية للمستخلص الكحولي لثمار نبات البمبر :

جدول رقم (1) يبين المركبات الكيمياوية الموجودة في مستخلص الكحولي لثمار نبات البمبر حيث يحتوي على الكاربوهيدرات و البروتينات حيث توفر احتياجات الجسم للسعرات الحرارية، و الطاقة الكافية للاستهلاك البشري كما يحتوي على كمية قليلة من الدهون حيث تقلل من الاضطرابات القلبية و تصلب الشرايين و السرطان وضد الشيخوخة و إن ارتفاع محتوى الرماد هو انعكاس على احتواء مستخلص ثمار البمبر على العناصر النزرة (15), (16).

جدول رقم (1) يبين المركبات الكيميائية لمستخلص الكحولي ثمار نبات البمبر .

المركبات	Percentage mean ± S.D.
البروتين	7.9 ± 0.41
الدهون	2.1 ± 0.02
الرماد	6.8 ± 0.18
الكاربوهيدرات	59.1 ± 0.23
الألياف	26.3 ± 0.01

الكشف الكيميائي للمواد الفعالة للمستخلص الكحولي لثمار نبات البمبر :

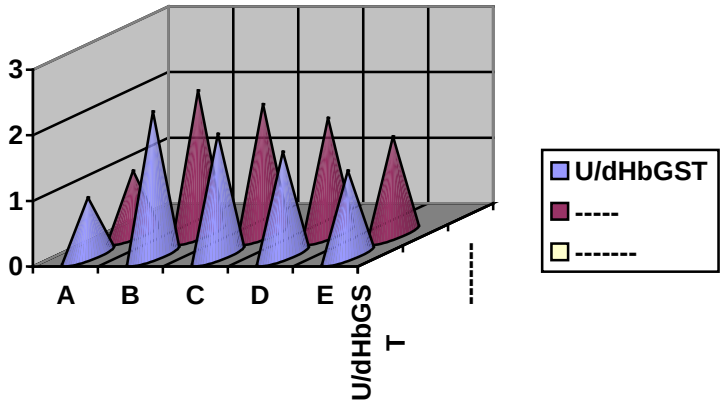
جدول رقم (2) يوضح وجود القلويدات ، و الصابونيات و الفلافونات و الكلاسيدات في المستخلص الكحولي لنبات البمبر ، و أن فعل التانينات يعود على احتواءها لبعض المركبات الفينولية مثل حامض الكاليك و حامض التانيك حيث التي لها القدرة على تحطيم الإنزيمات التي تشترك في تصنيع الحوامض الامينية الضرورية في زيادة الانقسام الخلوي . وكذلك فعل الصابونيات يعود لاحتوائها على الكلايكوسيدات الصابونية حيث تمتلك مجاميع الهيدروكسيل التي لها القدرة على إذابة طبقة الدهون الموجودة في جدران الخلية حيث يؤثر على انتقائية جدار الخلية مما يسهل دخول و خروج المواد خلال جدار الخلية (17). وقد تعمل المركبات الثانوية الأخرى الموجودة بقيمتها الطبية و نشاطها الفسيولوجي كمضادات للالتهابات و الحساسية وكذلك مضادات للفيروسات و الأورام السرطانية و كمضادات قوية لأكسدة وطاردة إلى الجذور الحرة ، (18) .

جدول رقم (2) يبين الكشف الكيميائي للمواد الفعالة لمستخلص الكحولي لثمار نبات البمبر :

الفحص الكيمياوي	النتيجة
القلويدات	+
الصوبونيات	+
الفلافونات	+
الكلاسيدات	+
التانينات	+

مستوى فعالية أنزيم GST في كريات الدم الحمر .

من شكل رقم (1) وجدول رقم (3) نلاحظ انخفاض في مستوى فعالية إنزيم GST في المجموعة المجرعة ب100 ملغم/ كغم من المستخلص الكحولي لنبات البمبر مقارنة مع المجموعة المعاملة بمادة CCl_4 بتركيز 3.2 ملغم / كغم . إما في المجموعة المجر ّ عة بـ(250ملغم /كغم) من مستخلص البمبر . لوحظ انخفاض أكثر من مجموعة (100ملغم / كغم) وهذا دليل على فعالية المستخلص . ووجد في المجموعة المجر ّ عة بـ (350ملغم / كغم) من المستخلص انخفاض أكثر بالمقارنة مع المجموعتين السابقتين وهذا دلالة على تأثير زيادة تركيز المستخلص على فعالية الإنزيم GST . يلاحظ من شكل رقم (1) و جدول رقم (3) بان فعالية الإنزيم GST قد تزداد عند إعطاء مركب CCl_4 مقارنة مع المجموعة السالبة خلال فترة التجريع حيث توضح بان استخدام المستخلص قبل إعطاء مركب رابع كلوريد الكاربون هو أفضل منبعد مركب رابع كلوريد الكاربون لان الجسم يكون يحتوي على مواد مضادة للأكسدة و كذلك بأنها تساعد على زيادة مناعة الجسم(19) .يتضح من النتائج اعلاه بان المستخلص الكحولي لنبات البمير له القابلية على تعزيز قوة المادة المزيلة للاكسدة حيث تقلل من الجذور الحرة و تتحدد معها وبالتالي تثبيط تكوين الأجسام الغريبة (الجذور الحرة)والتي تأثر على تكون المادة الاساس لعمل أنزيم GST أو تحول عدم حدوث سرطان بواسطة تحفيز مختلف فعاليةالاشكال المتساوية من أنزيم كليتوثايونين –S- الانتقالي في حميع حالات سرطان الكبد (20) . هناك العديد من البحوث و التقارير التي تشير إلى أنواع مختلفة من أمراض السرطان منها سرطان المريء و العصارات المعوية أي سرطان المعدة و تأثيرها على فعالية أنزيم GST و لذا يجب لحفاظ على توازن معدل وجود أنزيم GST و كذلك لمحافظة على محتويات أو مكونات أنزيم GST .



الشكل رقم (1) يوضح تاثير تجريع المستخلص الكحولي لنبات البمبر على فعالية أنزيم GST لمدة سبعة أيام قبل وبعد اعطاء مركب CCl_4 .

A= السيطرة السالبة (ماء مقطر) .

B=السيطرة الموجبة CCl_4 بجرعة 3.2 ملغم / كغم .

C= المستخلص بجرعة (100 ملغم / كغم) .

D= المستخلص بجرعة (250 ملغم / كغم) .

E= المستخلص بجرعة (350 ملغم / كغم) .

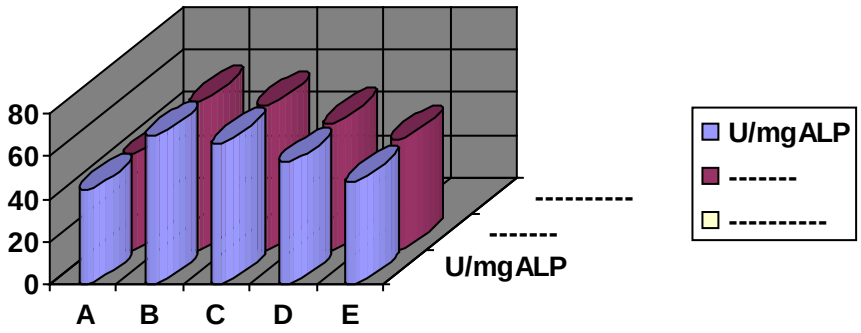
جدول رقم (3) يوضح تأثير تجريع المستخلص الكحولي لنبات البمبر على فعالية أنزيم GST لمدة سبعة أيام قبل و بعدإعطاءه مركب CCl_4 .

معاملة الانزيم	السيطرة السالبة (ماء مقطر)	السيطرة الموجبة CCl_4 بجرعة 3.2 ملغم / كغم	المستخلص بجرعة (100ملغم / كغم)	المستخلص بجرعة (250ملغ / كغم)	المستخلص بجرعة (350ملغم /كغم)
U/ gHb GST قبل المعاملة بمادة ccl4	± 0.0680.9	2.2±0.03	1.86±0.01	1.59±0.03	1.3±0.05
U/gHb GST بعد المعاملة بمادة ccl4	0.98 ±0.06	2.2±0.03	1.99±0.3	1.78± 0.02	1.5±0.5

التحليل الإحصائي ($P \leq 0.05$) .

مستوى فعالية أنزيم ALP

انزيم (ALP) يتواجد في مناطق مختلفة من الجسم مثل الامعاء و نخاع العظم و الكبد و الكلية ولكن بتراكيز مختلفة و قليله مقارنة مع الانزيمات الاخرى . تتغير فعالية الانزيم بتغير درجة الحرارة و قيمة دالة الحموضة (pH) ، وكذلك تركيز المادة الاساس مع وجود المواد المنشطه أو المثبطة في وسط التفاعل (21) و يلاحظ في شكل رقم (2) و جدول رقم (4)نتائج دراسة تاثير ثلاثة تراكيز مختلفة من المستخلص الكحولي لنبات البمبر على أنزيم (ALP) في دم الفئران المختبرية قبل و بعد التجريع لفترة سبعة أيام من التجريع لمعرفة تاثير مادة CCL_4 خلال مدة التجريع مقارنة مع نماذج السيطرة السالبة و السيطرة الموجبة فوجد هناك فروقات معنوية عالية ($p<0.01$) .من شكل رقم (2) وجدول رقم (4)نلاحظ انخفاض في مستوى فعالية إنزيم ALP في المجموعة المجرعة ب(100ملغم /كغم) من المستخلص الكحولي لنبات البمبر مقارنة مع المجموعة المعاملة بمادة CCl_4 . إما عند المجموعة المجرعة بـ(250ملغم /كغم) من المستخلص فقد لوحظ انخفاضا أكثر من مجموعة (100ملغم / كغم) وهذا دليل على فعالية المستخلص . ووجد في مجموعة المجرعة بـ (350ملغم / كغم) من المستخلص انخفاضا أكثر بالمقارنة مع المجموعة (100و 250 ملغم /كغم) وهذا دلالة على تأثير زيادة تركيز المستخلص الكحولي لنبات البمبر على نشاط و فعالية إنزيم (ALP) (22) . مما يدل على انه هناك تأثيراً أكثر فعالية لمستخلص الكحولي نبات البمبر عند إعطاءه قبل مادة رابع كلوريد الكاربون (المستحث) وليس بعد (المستحث) لفترة سبعة أيام مما يدل على إن الخلايا كانت تحتوي على مادة مضادة للأكسدة و منشطة لإنزيم ALP قبل إعطاء المستحث . أن نبات البمبر يحتوي على مركبات فعالة لها القابلية على عدم حدوث أي ضرر للبروتينات التي تثبط الإنزيمات التي تعمل معا لمنع حدوث الإضرار الناجمة من عملية أكسدة محتويات الخلية مثل الأحماض النووية و البروتينات و الدهون ومنها الأنظمة التي تمنع حدوث أنواع هذه التفاعلات أو إزالتها قبل أن تسبب الضرر لمحتويات الخلية .



الشكل رقم (2) يوضح تاثير تجريع المستخلص الكحولي لنبات البمبر على فعالية أنزيم ALP لمدة سبعة أيام قبل وبعد اعطاء مركب CCl_4 .

A= السيطرة السالبة (ماء مقطر) .

B=السيطرة الموجبة CCl_4 بجرعة 3.2 ملغم / كغم .

C= المستخلص بجرعة (100 ملغم / كغم) .

D= المستخلص بجرعة (250 ملغم / كغم) .

E= المستخلص بجرعة (350 ملغم / كغم) .

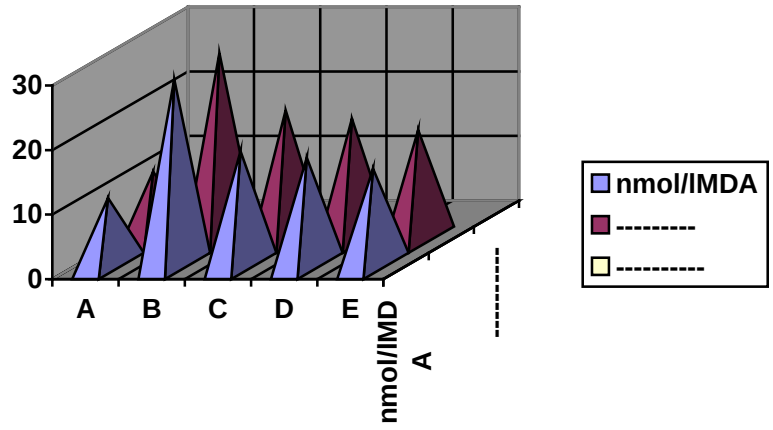
جدول رقم (4) يوضح تأثير تجريع المستخلص الكحولي لنبات البمبر على فعالية أنزيم (ALP) لمدة سبعة أيام قبل و بعد إعطاءه مركب CCl_4 .

معاملة	السيطرة السالبة (ماء مقطر)	السيطرة الموجبة CCl_4 بجرعة 3.2 ملغم / كغم	المستخلص بجرعة (100ملغم /كغم)	المستخلص بجرعة (250ملغ / كغم)	المستخلص بجرعة (350ملغم /كغم)
الفعاليةلنوعية لأنزيم ALP ± الخطا القياسي وحدة ملغم/ بروتين قبل المعاملة بمادة ccl4	44.4± 0.13	69.2±0.03	65.8±2.1	56.9±0.8	45.13±1.0
الفعالية النوعية لأنزيم ALP ± الخطا القياسي وحدة ملغم/ بروتين بعد المعاملة بمادة ccl4	44.2 ±0.13	69.2±0. 3	66.8±1.2	58.8± 0.71	50.8±1.6

التحليل الإحصائي ($P \leq 0.05$) .

مستوى فعالية المالون داي الديهايد MDA في الدم الفئران المختبرية .

ونلاحظ من نتائج دراسة تاثير ثلاثة تراكيز مختلفة من المستخلص الكحولي لنبات البمبر على مستوى فعالية الاكسدة الفوقية للدهون (MDA) في دم الفئران المختبرية قبل و بعد التجريع بالمستحث لفترة سبعة أيام لمعرفة تاثير مادة CCl_4 خلال مدة التجريع مقارنة مع نماذج السيطرة السالبة و السيطرة الموجبة فوجد هناك فروقات معنوية عالية .من شكل رقم (3) و جدول رقم (5)نلاحظ انخفاض في مستوى للاكسدة الفوقية للدهون (MDA) في المجموعة المجرعة بـ(100ملغم /كغم) من المستخلص مقارنة مع المجموعة المعاملة بمادة CCl_4 . إما في المجموعة المجرعة بـ (250ملغم /كغم) من المستخلص فقد لوحظ انخفاضا أكثر من مجموعة (100ملغم / كغم) وهذا دليل على فعالية المستخلص .ولوحظ انخفاضا معنويا أعلى في المجموعة المجرعة بـ(350ملغم / كغم) من المستخلص بالمقارنة مع المجموعة (100و 250 ملغم /كغم) وهذا دلالة على تأثير زيادة تركيز المستخلص الكحولي لنبات البمبر على نشاط و فعالية للاكسدة الفوقية للدهون (MDA) (23). مما يدل على انه هناك تأثيرآ لمستخلص الكحولي نبات البمبر أكثر فعالية عند إعطاءه قبل مادة رابع كلوريد الكاربون (المستحث) وليس بعد (المستحث) لفترة سبعة أيام مما يدل على إن الخلايا كانت تحتوي على مادة الفلافينات المضادة للأكسدة و منشطة لستهلاك الدهون MDA بعد إعطاء المستحث .ان تجريع الحيوانات المختبرية بالمستخلص الكحولي لنبات البمبر يلاحظ انخفاض في مستوى MDA الامر الذي يؤكد على دوره (24) كمادة مضادة للاكسدة لاحتوائه على مواد فعالة لها قابلية وفاعليته عالية في تقليل الجذور الحرة بنسبة ملحوظة حيث وجد بان اعطاء المستخلص قبل مادة المطفرCCl4 هي افضل من اعطاءه بعد مادة المطفر CCl4 وهذه ماتشير لها النتائج في شكل رقم (3) وجدول رقم (5) .



الشكل رقم (3) يوضح تاثير تجريع المستخلص الكحولي لنبات البمبر على فعالية أنزيم MDA لمدة سبعة أيام قبل وبعد اعطاء مركب CCl_4 .

A= السيطرة السالبة (ماء مقطر) .

B=السيطرة الموجبة CCl_4 بجرعة 3.2 ملغم / كغم .

C= المستخلص بجرعة (100 ملغم / كغم) .

D= المستخلص بجرعة (250 ملغم / كغم) .

E= المستخلص بجرعة (350 ملغم / كغم) .

جدول رقم (5) يوضح تأثير تجريع المستخلص الكحولي لنبات البمبر على فعالية أنزيم (MDA) لمدة سبعة أيام قبل إعطاءه مركب CCl_4 .

معاملة	السيطرة السالبة (ماء مقطر)	السيطرة الموجبة CCl_4 بجرعة 3.2 ملغم / كغم	المستخلص بجرعة (100ملغم / كغم)	المستخلص بجرعة (250ملغ / كغم)	المستخلص بجرعة (350ملغم /كغم)
فعالية MDA ±الخطا القياسي (nmol/l) قبل المعاملة بمادة ccl4	10.57± 0.16	.59±0.92 28	17.8±0.4	16.8±0.4	15.13±0.04
فعالية MDA ±الخطا القياسي (nmol/l) بعد المعاملة بمادة ccl4	10.57 ±0.16	28.95±0. 92	20.1±0.1	18.8± 0.25	17.0±0.42

التحليل الإحصائي ($P \leq 0.05$) .

الاستنتاجات :

توضح نتائج الدراسة إن التراكيز العالية لمستخلص الكحولي لنبات البمبر لها فوائد ذات قيمة عالية لذلك ينصح لتلافي الآثار الصحية السلبية التي تسببها الملوثات ومنها مادة رابع كلوريد الكاربون لأنه يحتوي على مركبات فلافونية وكذلك مواد فعالة اساسية للسيطرة على فعالية كل من أنزيم (ALP) وكذلك أنزيم (GST) و الاكسدة الفوقية للدهون (MDA) في مصل دم الحيوان المختبري قبل و بعد أعطاء مادة المستحث رابع كلوريد الكاربون.

المصادر :

1. Agra, M.F.; Franca, P.F.and Barbosa-Filho, J.M. (2011) . Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in northeast of parazil. Rev. as. armaccogn, 17, 114,140.
2. Barroso, J.C. and Oliveira, F.(2012) . pharmacoghostic diagnosis of fruits of cordialsellowianacham and myxal. Rev. Bras. Farmacogh, 29, 458,470.
3. Morimitsu, Y.; Nakagawa, Y.; Hayashi, K.; Fujji, H.; Kumagai, T.; Nakamura, Y.; et al. (2012). Asulforaphane analogue that potently activates the Nrf2 –dependent detoxifivation pathway . Journal of Biological Chemistry,277(5), 3456, 3463.
4. Boyd, J.W.(1988) . J. Comp. path., 98 : 381-400.
5. Singh, S.v. Creadon; G. , Das, M.; Mukhtar, H. and Awasthi, Y.C. (1987). Glutathione – S-transferases of mouse lung selective binding of benzo (a) pyrene metaboliter by the subunit which are preferentially by t-butylated hydroxyanisole, Biochem. J ., 243, 351, 348.

antioxidant proteins in plasma and cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients Neurochem. Res., 10,1645,1652.

14. Liang, H.;Yuan, QP.; Dong, HR. and Liu,YM.(2015). Determination of sulforaphane in broccoli and cabbage by high – performance liquid chromatography . Journal of Food Composition and Analysis, 19 (5) , 473,476.

15. Aberoumand, A.and Deokule, S.S. (2013) . Assessment of the Nutritional Value of plant-Base Diets in Relation to Human carbohydrates, Advance Journal of FoodScience and Technology, 2(1), 1,5 .

16. Southgate, D.A.T. (2015). Determination of carbohydrates in foods. 11-unavailable carbohydrates., Sci. Food, Agric. 20,331,335.

17. Iniaghe, O.M.; Malomo, S.O., and Adebayo, J.O. (2012). Proximate composition and phytochemical constituents of leaves of some. Acalypha species. Pak.J.of Nutr., 8(3), 256,258.

18. Elkhalafawy A.K., Lasheen Y.F. and Borai E.H.(2015). Assessment of base line Concemtrations for Trace elements and total alpha, Betagross for some Herbs. Arab J. Nuc. Sci. Appl., vol.(48) No.1,1,9.

6. Burtke,T.M. and Sand strom , P.A. (2010). Oxidation stress as amediator of apoptosis . Immunol Today, 15:7-10.

7. Cabiscol, E.; Tamarit, J. and Ros, J. (2011). Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species internatl microbial, 3,3 ,8 .

8. Ladd, T.L.;, Jacobson, M. and Burff, C.R. (1978). J.Econ.Entorol,71, 810,813.

9. Yumik,N.;, Sumiko, T. And Yasuhide , T.(2013). curcumin protects the rat liver from ccl4 – caused injury and fibrogenesis by attenuating oxidative stress and suppressing inflammation . Journal of Health Science, 49 (1) , 45,54.

10. Jaffer, H.J.; Mohmood , M.M.J.and Jawad, A.M.(1983) . Phytochemical and biological screening of some Iraqi plant.

11. Kind, P.R.N. and KINg, E.J.(1984). Essential of medical microbiology, botanical Muscum, anethnobotanical study . J.Cln. path, 7,322,326.

12. Francoise, C.; Pierre, M.; Jacqueline, R. and Henri, J. (2014). plant extracts to accelerate healing and reduce inflammation cosmetics and toiletries. chemical clinical, Acta , 209,217.

13. Hunter, M.I.S.; Niemadim , B.C. and Davidson , DL.W.(2014) . Lipid peroxideation products and

19. ABd El-Rahman, N.A. and Sherif,N.H.(2015). Caffeine and Aspirin protecting Albino Rats against Biochemical and Histological DisordersInduced by Whole body Gamma Irradiation.Arab J. Nuc. Sci. Appl.,vol.(48)No.1,99,111.

20. John, Shi.; Jianmei, Yu . and at el. (2015) . Food Agriculture and environment, vol. 1(2), 42, 47.

21. Khan, B.A.; Abraham , A. and Leclanma, S. (2013) . Hematological and histological studies after curry leaf (Murray a Koenig I) and mustere (Brassesjoufeeding) in rats , Indian, J. Med. Res., 102, 184,186**.**

22. Bones Amand Rossiter JT. (2012) .The enzymic and chemically induced decomposition of glucosinolates. Phytochemistrry, 67(11) , 1053,1067.

23. World health organization (2013) . Basic laboratory procedures in clinical bacteriology Geneva.

24. Ciragil , p; Ergul, B.K.; Mastafa , G.; Metin , K.; Muret , A. and Alanur, G. (2015). The Effects of oxidative stress in urinary Tract infection During pregnancy. Mediators inflamm, 5, 309,311.

Iraqi Journal of Biotechnology, 2015, Vol. 14, No. 2 , 327-342

تأثير تبليل التربة بخليط البكتريا *Pseudomonas fluorescenes* و *Bacillus subtilis* في مقاومة فيروس موزائيك الخيار

ليلى جبار صبر و ميسر مجيد جرجيس

كلية الزراعة – جامعة بغداد

الخلاصة: هدفت الدراسة الى تقويم كفاءة كلا من البكتريا *P. fluorescens* و*B. subtilis* كعوامل استحثاث مقاومة نباتات الطماطة ضد فيروس موزائيك الخيار Cucumber mosaic virus عند استعمالها بطريقة تبليل التربة تحت ظروف البيت الزجاجي. وتضمنت التجربة التشخيص الحيوي باستخدام النباتات الكاشفة والتشخيص المصلي والذي أظهر تفاعلا موجبا للعينات من نباتات طماطة مصابة بالفيروس مع مصل مضاد وحيد النسيلة خاص بالفيروس باعتماد الاشرطة المناعية Immunostrip، وظهرت خطوط ترسيب بين الحفر الحاوية على المصل المضاد لعزلة الفيروس قيد الدراسة وتلك الحاوية على مستخلص نبات الطماطة ، خيار ، تبغ صنف sumsun والمعداة بالفيروس في اختبارالانتشار المناعي المزدوج، أظهرت النتائج وجود تأثيرات معنوية للعوامل المذكورة في في خفض نسبة وشدة المرض وزيادة في معايير النمو لنباتات الطماطة المدروسة قياساً الى معاملة المقارنة والمعداة بالفيروس بمفرده. بينت النتائج وجود كفاءة عالية لخليط معلق نوعي البكتريا *P. fluorescens* و*B. subtilis* عند تبليل التربة بعد أربعة ايام من العدوى بالفيروس في خفض نسبة وشدة الاصابة إذ بلغت 8.33% و 16.67% على التتابع. وادت معاملة الخلط بمعلق نوعي البكتريا بطريقة تبليل التربة بعد يومين من التبليل دوراً في إعطاء أعلى نسبة منع تضاعف الفيروس في اختبار اليزا إذ بلغت 76.52% . واعطت معاملة الخلط بنوعي البكتريا والعدوى بالفيروس بعد يومين من التبليل زيادة في فعالية إنزيم Peroxidase حيث كان التغير في الامتصاص الضوئي / دقيقة/ غم وزن طري بعد 15 و30 يوماً من العدوى بالفيروس78.253 و 61.40 على التتابع.

وأعطت معاملة تبليل التربة بخليط نوعي البكتريا والعدوى بالفيروس بعد يومين من التبليل أعلى زيادة في فعالية انزيم الـ PAL والتي بلغت 2.311 و1.456 مايكروغرام حامض سينناميك /ساعة / غم وزن.

Effect of soil drench in mixture of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* for resistance *cucumber mosaic cucumovirus*

Layla J. Sabier and Mysir M.Jarjees

College of Agriculture ,University of Baghdad

Abstract: The aim of this study was to evaluate the efficiency of biotic agents *Pseudomonas fluorescens, Bacillus subtilis* in inducing resistance in tomato plants super queen cultivar against cucumber mosaic virus (cmv) under greenhouse conditions. The experiment included the identification of cmv depending on biological methods such as using indicator plants, cowpea *Vigna unigutate* , cucumber *Cucumis sativus, Chenopodium amaranticolor,* tobacco var . Samsun and Xanthi in addition to serological test. Results of serological test was showed positive reaction between samples which taken from infected tomato plants with cmv polyclonal antiserum as demonstrated by Immunostrip – ELISA. Double diffusion test was also resulted in positive reaction where precipitin lines were occurred between the wells which contain the antiserum cucumber mosaic virus and those containing sap extracted from infected tomato, cucumber and tobacco cultivar Samsun with virus isolate. Results of biological and serological test revealed that the virus isolate represents cucumber mosaic virus isolate. . Results of this work were indicated that induce resistance agents caused decreased in disease percentage and severity, while the growth parameters were increased compare with control treatment which inoculated with the virus only. The use of mixture of *P. fluorescens* and *B. subtilis* by the means of soil drench after 4 days of virus inoculation was decreased the incidence and severity percentage of viral infection to 8.33% and 16.67%respectively. The best treatment was soil drench of the mixture suspension of both bacteria and inoculation of virus after 2 days of soil drench was caused high inhibition activity of virus (cmv) multiplication as demonstrated by ELISA absorbance values 76.52. The best treatment was soil drench of the mixture suspension of both bacteria and inoculation with the virus after 2 days of soil drench was caused significant increased in the activity of peroxidase after 15 and 30 days of virus inoculation was 78.253 and 61.40 respectively , on the other hand the use of mixture of both bacteria by the means of soil drench and inoculation of virus after 2 days of the treatment gave significant increase in the activity of PAL enzyme after 15 and 30 days of virus inoculation which was gave 2.311 and 1.456% respectively.

Keywords: *Pseudomonas fluorescens, Bacillus subtilis***,** PAL enzyme

المقدمة

يعد محصول الطماطة من بين أكثر محاصيل الخضر أهمية من الناحية الغذائية في العراق والعالم ؛ وتصاب نباتات الطماطة بالعديد من المسببات المرضية وفي مقدمتها الفيروسات[27] ، إذ تحتل الامراض الفيروسية مكانة خاصة من بين مسببات امراض نبات الطماطة بسبب انتشارها الواسع عالمياً ولما تسببه من خسائر اقتصادية كبيرة وتاثيرها في تدهور وتدني انتاجية محصول الطماطة فقد تصل في حالة شدة الاصابة العالية الى نسبة 100%[26] ، وحددت نسبة الخسائر في محصول الطماطة نتيجة الاصابة بالمسببات الفيروسية مابين 15- 25% من انتاجية المحصول في العالم[22] ، ونتيجة تزايد هذه الخسائر في المحصول وعدم وجود مبيد فايروسي وقائي يوفر حماية للنباتات ضد الفيروسات ولاسيما تلك التي تنقل بالحشرات

بطريقة غير باقية كفيروس موزائيك الخيار إذ تقوم الحشرة باكتساب الفيروس ونقله في ثواني[26]. لذا برزت أهمية وضع استراتيجيات بديلة عن مقاومة نواقل الامراض الفيروسية تقوم على أساس على استحثاث الدفاعات الذاتية داخل النباتات ولهذا فقد تكثفت جهود الباحثين في ايجاد مثل هذه الطرائق ومنها المكافحة الاحيائية باستعمال احياء دقيقة مضادة كالفطريات والمايكورايزا والبكتريا[20,11]، وحظيت البكتريا المعزولة من جذور النباتات باهتمام كبير من قبل الكثير من الباحثين كمحفزات للنمو وعنصراً من عناصر المكافحة الاحيائية لمسببات أمراض النبات اطلق عليها Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) ووجد أن معظمها يعود للجنسين *Pseudomonas* و*Bacillus* وتُعزى كفاءة هذه البكتريا الى التنافس مع المسببات المرضية على المواد الغذائية لقابليتها على النمو السريع وأنتاجها Siderophores وHCN وكذلك أنتاجها المضادات الحياتية ضد المسببات المرضية فضلاً عن أفرازها لأنزيمات محللة مثل Chitinase و B – 1,3 – glucanase وPeroxidase و PR[12,16] Proteins –. ووجد أن المركب Lipopoly saccharide (Lps) المعزول من البكتريا *P. fluorescens* لا يقل فعالية عن البكتريا الحية في تحفيز المقاومة، ووجدت طفره في البكتريا *P. fluorescens* تفتقر الى السلسلة الانتيجية O-antigenic من Lps فقدت قدرتها على تحفيز المقاومة الجهازية المستحثة ISR وهذه المعطيات تُشير الى أن مركب Lps يمثل أحد المحددات الرئيسية في تحفيزISR في النبات[18]. واستعملت البكتريا *P. fluorescens* و *B.subtilis* كعوامل استحثاث مقاومة في النباتات ضد فيروس موزائيك الخيار، وأدت الى خفض نسبة وشدة الاصابة بالفيروس[10,5] ، إن استخدام خليط متوافق ومناسب من سلالات الـ PGPR يمكن أن يستحث مستوى عالي من المقاومة وتوفير طيف واسع من الحماية للنبات وتفعيل المقاومة المستحثة ضد مختلف المسببات المرضية قياساً بالاستعمال المفرد للسلالة، وان الخليط المتوافق يمكن أن يحفز ايضاً دفاعات النبات مثل انزيم Peroxidase و Lignification، Superoxide dismutase أو المركبات الفينوليه بمستوى أعلى من الاستخدام المفرد لسلالة من نوع PGPR [15]، فقد استخدم الباحثان المذكوران خليطاً من السلالات هي:

N937ab) +*B. subtilis* (IN937b) *pumilus* ، (*B. amyloliquefaciens* + SE49 ، IN937b) + *B.* (SE34) (T4) + *B. subtilis* (INR7 و IN937b *B. pumilus* في استحثاث مقاومة جهازية ضد العديد من المسببات المرضية ومنها فيروسCMV في نباتات الخيار باستخدام المعاملات المفردة والمتكاملة للسلالات باضافة 100 مل/ اصيص تركيز10^8 وحدة تكوين مستعمرة / مل . واستخدمت البكتريا *P. fluorescens* في حماية نباتات البطيخ من الاصابة بفيروس CMV وبمعاملتين غمر البذور لمدة 24 ساعة و تبليل التربة بـ 100مل من المعلق البكتيري وبتركيز 4×10^9 وحدة تكوين مستعمرة/ مل ثم العدوى في مرحلة الأوراق الأولية فوجد أن قيم الامتصاص لأختبار ELISA بعد 10 أيام من التلقيح بالفيروس كانت 0.160 لمعاملة غمر البذور و 0.298 في معاملة تبليل التربة ونسبة التثبيط 74.14% و86.55% على التوالي قياساً بـ 1.190 في النباتات غير المعاملة [6].

المواد وطرائق العمل مصدر الفايروس

جمعت عينات من اوراق نباتات الطماطة التي تظهر عليها اعراض الموزائيك واعراض الورقة الشريطية من مشاتل منطقة الكريعات/ بغداد، اجريت عدوى بعصير مستخلص من هذه العينات على نباتات اللوبيا التي تستجيب للاصابة للفيروس بتكوين بقع موضعية متنخرة للتاكد من وجود الفيروس، كما اعيدت نباتات طماطة ونباتات خيار.

تشخيص الفايروس :

أ- النباتات الكاشفة استعمل في تشخيص الفايروس النباتات الكاشفة الاتية:

اللوبيا *Vigna unguiculata* صنف Black eye، الخيار *Cucumis sativus* L. صنف Beit – Alpha، الطماطة *Lyopersicon esculentum* Mill صنف Super Qeen، التبغ *Nicotiana tabacum CV*. Samsun، *Nicotiana tabacum* CV. Xanthi، نباتات الزربيح *Chenopodium amaranticolor*. إذ عقمت مجموعة من الاصص البلاستيكية ذات قطر 22سم وارتفاع 20سم باستعمال هايبوكلورات الصوديوم 30% ثم غسلت جيداً بالماء لازالة اثار الهايبوكلورات. ملئت الاصص بخليط من تربة مزيجية وبتموس بنسبة 1:1 معقم بواسطة غاز بروميد المثيل (500غم/م^3) وزرعت نباتات الاختبار في البيت الزجاجي التابع لقسم وقاية النبات/ كلية الزراعة – جامعة بغداد.

ب- الطرائق المصلية: تم الحصول على المصل المضاد من الدكتورة صفاء قمري – مختبر الفايروسات – المركز الدولي للبحوث الزراعية في المناطق الجافة (ICARDA)] واجري اختبار الانتشار المناعي المزدوج Double Diffusion Test] واستعملت اشرطة مناعية Immunostrip – ELISA تحوي مصل مضاد لفايروس CMV، والمجهز من شركة Agdia – biofords الامريكية، واجري الاختبار حسب طريقة العمل الموصى بها من قبل الشركة المجهزة والتي تتلخص بالاتي: وضع 0.15غم من العينات النباتية المراد فحصها والتي يشك باصابتها في الكيس الحاوي على محلول دارئ الاستخلاص وسحقت جيداً بوساطة مدقة هاون Pestle، غمرت نهاية الشريط (Flash Kits) المعاملة بالمصل المضاد لمسافة 0.5 سم في الكيس الحاوي على محلول العينة المراد اختبارها، وسجلت النتائج بعد 15 – 30 دقيقة وهو الوقت اللازم لحدوث التفاعل. كررت الخطوات اعلاه مع مستخلص من نبات سليم للمقارنة.تقويم فعالية تبليل التربة ببعض عوامل استحثاث المقاومة في نباتات الطماطة المعداة بفيروس موزائيك الخيار في نسبة وشدة الاصابة بالفيروس تحت ظروف البيت الزجاجي.

استعمل في التجربة نباتات لوبيا بمرحلة نمو ورقتين حقيقتين وبطريقة تبليل التربة بالبكتريا*P. fluorescens* بشكل مزرعة سائلة KB بعمر 48 ساعة وبتركيز 1×10^9 (وحدة تكوين مستمرة / مل) وبمعدل 200 مل/ اصيص حدول جذور نباتات اللوبيا وبعمر 2 اوراق حقيقية و*B. subtilis* بشكل مزرعة سائلة KB بعمر 48 ساعة وبتركيز 6×10^7 (وحدة تكوين مستعمرة/ مل) وبمعدل 200 مل/ اصيص حدول جذور نباتات اللوبيا وبعمر 2 اوراق حقيقية قبل وبعد 2 و4 أيام من العدوى الصناعية بالفيروس .

وقد تم تحضير اللقاح الفايروسي الذي استخدم في العدوى الصناعية من اوراق طماطة مصابة بفيروس موزائيك الخيار وذلك بسحق 1غم من الاوراق القمية لنبات الطماطة المصاب بالفيروس مع 4 مل من محلول دارئ الاستخلاص الفوسفاتي (49سم^3 من KH_2Po_4 مع 51سم^3 من Na_2HPo_4 تركيز 0.01 مولاري بدالة حامضية pH = 7 مبرد [21]، تم تمرير العصير المستخلص من خلال طبقتين من قماش الململ واعتماد الراشح لقاحاً للفايروس، ثم مسحت اوراق نباتات الاختبار باللقاح الفايروسي بعد تحضيرها بمادة الكاربوراندم 600 مش، ورشت النباتات الملقحة بالماء المقطر بعد 1 – 2 دقيقة من العدوى . نفذت التجربة في البيت الزجاجي التابع الى قسم وقاية النبات- كلية الزراعة –

جامعة بغداد وبثلاثة مكررات وفق التصميم الاحصائي التام التعشية وحللت النتائج احصائيا ، وتمت متابعة التجربة وتسجيل البيانات الخاصة بالمعاملات والتي هي تطور اعراض الاصابة على النباتات والنسبة المئوية للاصابة وشدة الاصابة .

وجرت متابعة ظهور الاعراض وشدتها على النباتات المعاملة ومتابعة تضاعف الفايروس في النباتات المعاملة باستعمال اختبار تقنية اليزا ELISA) Enzyme-Linked Immunosorbent Assy)، وتم اعتماد مدرج من ستة درجات لتقييم تطور الاعراض الظاهرة على النباتات حسب ما اشار اليه [30]وعلى النحو الاتي:

0 = لا توجد اعراض ، 2 = موزائيك طفيف 4 = موزائيك شديد على الاوراق ، 6 = موزائيك والتفاف الاوراق ، 8 = موزائيك شديد والتفاف شديد الاوراق ، 10 = موزائيك شديد والتفاف الاوراق مع تشوهات.

% شدة المرض Y (Disease severity)=

$$\frac{(\text{عدد النباتات في الدرجة0} \times 0) + (\text{عدد النباتات في درجة1} \times 1) + \ldots + (\text{عدد النباتات في الدرجة 6} \times 6)}{(\text{عدد نباتات الكلي}) \times 10}$$

وتم تقيم النتائج بالاعتماد على تقدير فعالية انزيمي الـ Peroxidase (POD) و (PAL Phenylalanine ammonia Lyase في النباتات المعاملة وغير المعاملة [10] .

النتائج والمناقشة

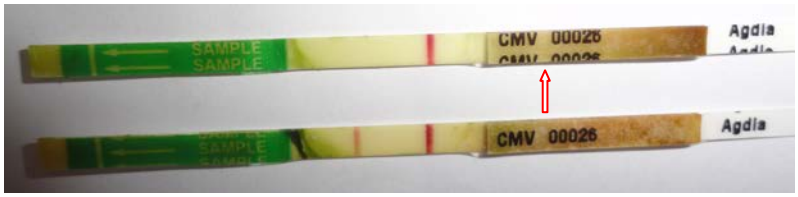
أستجابت نباتات الطماطة صنف Super Queen للعدوى بمستخلص من أوراق نباتات الطماطة التي يشك باصابتها بالفايروس بظهور اعراض موزائيك على الاوراق وتحولها الى شكل شريطي بعد مرور اربعة أسابيع من العدوى(شكل 1). وظهرت على اوراق الخيار صنف Beit –Alpha المعداة ميكانيكياً بمستخلص من أوراق نباتات الطماطة المصابة بالفايروس، مساحات صغيرة خضراء على الأوراق الحديثة النمو بعد مرور 10 أيام من أجراء العدوى بالعصير، تطورت الى اعراض موزائيك على جميع أوراق النبات المصاب الاوراق (شكل 2). وظهرت على أوراق نباتات اللوبيا *Vigna unguiculata* صنف Black Eye المعداة بمستخلص من اوراق نباتات طماطة مصابة بالفايروس، بقعاً موضعية متنخرة مختلفة الاحجام بعد مرور ثلاثة اسابيع من العدوى ولم تتطور هذه البقع الى اصابة جهازية، في حين هذه الاعراض لاتتفق مع ماذكره [2] في ظهور أعراض جهازية تمثلت بشفافية العروق ثم تطورت الى تبرقش اصفر على جميع أوراق النبات . واستجابت نباتات الزربيح *Chenopodium amaranticolor* للعدوى بعصارة اوراق نباتات الطماطة المصابة بالفايروس، بظهور بقعا موضعية صفراء صغيرة الحجم بعد عشرة أيام من العدوى ثم تطورت الى بقع موضعية ميتة مع عدم ظهور أي اعراض جهازية الا ان [3] ذكر ان البقع الموضعية الصفراء ظهرت على الاوراق بعد يومين من العدوى ولم تتطور الى بقع موضعية ميتة. وظهرت على أوراق نباتات التبغ صنف Samsun المعداة بعصارة من أوراق نباتات طماطة مصابة بالفايروس أعراض توضح العروق بعد مرور اسبوعين من العدوى اعقبها ظهور أعراض موزائيك على الأوراق الحديثة. واستجابت نباتات التبغ صنف Xanthi للعدوى بمستخلص من أوراق نباتات طماطة مصابة بالفايروس بظهور أعراض موزائيك بعد مرور ثلاثين يوما من العدوى وهذه الاعراض تؤكد نتائج مسبقة

سجلت على النباتات الكاشفة أعلاه بعد العدوى بفايروس موزائيك الخيار[4,2، 5]

الاختبارات المصلية :أظهرت نتائج الاختبار المصلي Immunostrip ELISA احتواء نباتات الطماطة *Lycopersicon esculentum* على فايروس موزائيك الخيار CMV، إذ ظهرت حزمة Band على الاشرطة المناعية الحاوية على المصل المضاد لفايروس CMV مما يشير الى وجود الفايروس، ولم تظهر مثل هذه الحزمة على الاشرطة المعاملة بمستخلص نبات طماطة سليم (شكل3) ، وهذه النتائج تتفق مع ماذكره [2,3,6]. وظهرت خطوط ترسيب بين الحفر الحاوية على المصل المضاد لفايروس CMV وتلك الحاوية على عصارة نباتات طماطة، خيار، التبغ صنف Samsun المعداة بالفايروس ولم يظهر خط الترسيب بين الحفر الحاوية على المصل المضاد للفايروس وتلك الحاوية على عصارة نباتات سليمة في اختبار الانتشار المناعي المزدوج Double Diffusion Test.

شكل (1): اعراض الورقة الشريطية التي يسببها فايروس cmv

شكل (2): اعراض الموزائيك على اوراق الخيار التي يسببها فايروسcmv



شكل (3) تفاعل الاشرطة المناعية مع مستخلص النباتات المصابة بفايروس CMV والنباتات السليمة
A : التفاعل مع مستخلص نبات طماطة سليم .
B :التفاعل مع مستخلص نبات طماطة مصاب بالفايروس.

تقويم فعالية تبليل التربة ببعض عوامل استحثاث المقاومة في نسبة وشدة الاصابة بفايروس موزائيك الخيار.

أظهرت نتائج التجربة الموضحة في الجدول (1) أن المعاملات جميعها وفرت حماية جيدة لنباتات الطماطة من الأصابة بفيروس موزائيك الخيار إذ بلغت نسب الأصابة

بالفيروس عند تبليل التربة بالبكتريا *P. fluorescens* و *B. subtilis* وخليطيهما معاً ثم تلقيح نباتات الطماطة بمستخلص عصير النبات المصاب بفيروس موزائيك الخيار بعد يومين من تبليل التربة 33.33، 41.69، 16.69%على التتابع. وبلغت شدة الاصابة للمعاملات نفسها 28.38، 30.17، 18.33% على التتابع. ولم تختلف هذه المعاملات معنوياً عن بعضها البعض. كما بلغت نسب الاصابة عند تبليل التربة بالبكتريا *P. fluorescens* و *B. subtilis* وخليطهما معاً بعد يومين من تلقيح نباتات الطماطة بعصير النبات المصاب بالفيروس 50.04، 33.38 ، 25% على التتابع. وبلغت شدة الاصابة ولنفس المعاملات 40.96، 33.38، 20.02على التتابع. وقد اختلفت شدة الاصابة معنوياً في معاملة تبليل التربة بخليط نوعي البكتريا عما هو عليه عند تبليل التربة بأحد نوعي البكتريا على انفراد. كما لم تختلف معاملات تبليل التربة بالبكتريا *P. fluorescens* أو *B. subtilis* أو خليطيهما معاً قبل أربعة أيام من تلقيح نباتات الطماطة بعصير النبات المصاب بالفيروس بنسب وشدة الأصابة عن معاملات تبليل التربة قبل يومين من تلقيح النباتات بعصير النبات المصاب بالفيروس، ولكنها اختلفت معنوياً عن معاملة المقارنة بوجود الفيروس في نسبة الاصابة 91.69 % وشدة الاصابة 76.67%.

أما في معاملات العدوى بعصير الفيروس قبل اربعة أيام من تبليل التربة بنوعي البكتريا كلاً على انفراد او خليطهما معاً فلم تختلف نتائجها معنوياً عن معاملات تبليل التربة قبل العدوى باربعة أيام في نسب الاصابة. وأظهرت النتائج ان شدة الاصابة بحالة المعاملة بالبكتريا *B. subtilis* أختلفت معنوياً عن المعاملات الاخرى إذ بلغت 40% (جدول 1) في حين كانت شدة الاصابة عند تبليل التربة بالبكتريا *P. fluorescens* 21.71 % وفي حالة خليط نوعي البكتريا مع بعضهما 16.67%.

أظهرت النتائج أن أضافة نوعي البكتريا كلا على انفراد أو أضافتها بصورة خليط أدى إلى تحسين معايير نمو نباتات الطماطة المدروسة إذ تفوقت معنوياً معاملة تبليل التربة بالبكتريا *P. fluorescens* و *B. subtilis* عند خلطهما معاً بعد يومين وأربعة أيام من العدوى بالفيروس على بقية المعاملات في زيادة ارتفاع النبات بوجود الفيروس التي كانت 34.06، 34.50 سم تلتها معاملتي تبليل التربة بالبكتريا *P. fluorescens* والعدوى بالفيروس قبل أربعة أيام وبعد يومين من العدوى بالفيروس إذ بلغت أرتفاعات النباتات 33.21، 33.83 سم قياساً بارتفاع النباتات في معاملة المقارنة بوجود الفيروس والذي بلغ 14.06 سم (شكل 4). كما وجدت فروقاً معنوياً بين ارتفاع النباتات السليمة وغير المعاملة بالبكتريا وارتفاع النباتات المصابة وغير المعاملة بالبكتريا ايضاً.

وكان لتبليل التربة بالبكتريا تأثيراً في زيادة عدد أفرع النباتات فقد بينت النتائج (جدول 1) ان أضافة كل من *P. fluorescens* و *B. subtilis* أو كليهما بصورة خليط ومن دون تلقيح النباتات بالفيروس قد أدى الى زيادة معنوية في عدد أفرع النبات إذ بلغت 9.27، 8.44، 10.15 فرع/النبات الواحد قياساً بمعاملة المقارنة ومن دون وجود الفيروس والتي بلغت 6.35 فرع/ النبات الواحد. كما لوحظ وجود فروقات معنوية في جميع معاملات تبليل التربة والعدوى بعصير النباتات المصابة بالفيروس مما يؤشر التأثير الأيجابي للبكتريا المستعملة في هذه الدراسة. إن هذه النتائج تؤكد التأثيرات السلبية للفيروس كمسبب مرضي من جهة ولفعالية عوامل المكافحة الاحيائية في أستحثاث المقاومة في نبات الطماطة مما أدى الى خفض نسبة الاصابة وشدتها فضلاً عن دورها في تحسين معايير النمو لنبات الطماطة من جهة اخرى. إن معاملة خليط نوعي البكتريا *P. fluorescens* و *B. subtilis* ودورها في حماية النبات من الاصابة بفيروس موزائيك الخيار وأهمية هذا الخليط في تحسين معايير نمو

النباتات يدل على عدم وجود تأثيرات سلبية أو تضاد بين العاملين المستعملين في هذه الدراسة مما جعل فعلهما تآزري تجاه التأثيرات الايجابية لحالة النبات.

وهذا ماأثبتته دراسات الكثير من الباحثين الذين أشاروا الى وجود حالة تداخل إيجابية بين البكتريا *P. fluorescens* و *B. subtilis* وأشاروا الى دور علاقة التداخل هذه في خفض نسبة الاصابة بفيروس موزائيك الخيار وتحسين معايير النمو[28,14,9].

تباين تأثير المعاملات في الوزن الطري والجاف للمجموع الخضري، فقد بلغ الوزن الطري لنباتات الطماطة عند تبليل التربة بالبكتريا *P. fluorescens* و *B. subtilis* وخليطهما معاً ثم العدوى بعصير النبات المصاب بالفيروس بعد يومين 11.26، 11.62، 12.50غم / نبات على التتابع. وبلغ الوزن الجاف للمعاملات نفسها 3.69 ، 3.60 ، 3.73 غم / نبات على التتابع. وباختلاف معنوي عن معاملة العدوى بعصير النبات المصاب بالفيروس بمفرده إذ بلغ الوزن الطري والجاف فيها 5.75 غم / نبات و 1.72 غم/ نبات.

كما ان اضافة كل من البكتريا *P. fluorescens* و *B. subtilis* أو خليطهما الى التربة والعدوى بالفيروس بعد يومين من تبليل التربة قد أدت الى زيادة في الوزن الطري والذي بلغ 4.64 ، 8.74 ، 8.80 غم/ نبات على التتابع. وبلغ الوزن الجاف لنفس المعاملات 2.94، 3.42، 3.44 غم/ نبات على التتابع. اما معاملات العدوى بعصير النبات المصاب بالفيروس قبل أربعة أيام من تبليل التربة بالبكتريا كلا على انفراد أو بخليطهما معاً لم تختلف نتائجها معنوياً عن معاملات تبليل التربة قبل العدوى بأربعة أيام في الوزن الجاف والطري. كما لوحظ وجود فروقات معنوية عند اضافة كلا من البكتريا أو خليطهما معاً ومن دون تلقيح النباتات بالفيروس والتي كان فيها الوزن الطري 13.22، 13.42، 15.44 غم/ نبات على التتابع. وبلغ الوزن الجاف للمعاملات نفسها 4.36، 4.27 ، 4.39 غم/ نبات على التتابع قياساً بمعاملة المقارنة ومن دون وجود الفيروس إذ بلغ الوزن الجاف والطري فيها 8.28 غم/ نبات و 1.93 غم/ نبات. ويعتقد أن سبب ذلك قد يرجع لوجود البكتريا بأعداد كبيرة على سطح الجذور وبوجود إفرازات الجذور التي تمثل وسطاً غذائياً ملائماً لنمو البكتريا اضافة الى إنها تحفز النبات لأنتاج مواد تعمل على تحفيز مقاومة جهازية في النبات كالـ Salyclic acid و Jasmonic Acidوالـ Ethylene [29,24].

شكل (4): كفاءة عوامل الأستحثاث في مقاومة فيروس موزائيك الخيار بطريقة تبليل التربة

A: Pf+Bs+virus B: Pf +virus C: control D: virus

جدول (1): تقويم فعالية معاملة تبليل التربة ببعض عوامل استحثاث المقاومة في نباتات الطماطة المعداة بـ CMV قبل وبعد 2،4 يوم في نسبة وشدة الاصابة وبعض معاييرالنمو

المعاملة	نسبة الاصابة %	شدة الاصابة %	ارتفاع النبات /سم	عدد الافرع / نبات	الوزن الطري /غم	الوزن الجاف /غم
تبليل التربة بالبكتريا Pf	0.00	0.00	35.46	9.27	13.22	4.36
تبليل التربة بالبكتريا Bs	0.00	0.00	35.88	8.44	13.42	4.27
تبليل التربة بالبكتريا Pf وBs	0.00	0.00	37.10	10.15	15.44	4.39
تبليل التربة بالبكتريا Pf ثم العدوى بالفيروس بعد 2 يوم	33.33	28.38	33.83	6.75	11.26	3.69
تبليل التربة بالبكتريا Bs ثم العدوى بالفيروس بعد 2 يوم	41.69	30.17	32.00	6.35	11.62	3.60
تبليل التربة بالبكتريا Pf وBs ثم العدوى بالفيروس بعد 2 يوم	16.69	18.33	34.06	8.17	12.50	3.73
العدوى بالفيروس ثم تبليل التربة بالبكتريا Pf بعد 2 يوم	50.04	40.96	28.75	5.96	4.64	2.94
العدوى بالفيروس ثم تبليل التربة بالبكتريا Bs بعد 2 يوم	33.38	33.38	31.10	8.10	8.74	3.42
العدوى بالفيروس ثم تبليل التربة بالبكتريا Pf وBs بعد 2 يوم	25.00	20.02	30.44	9.00	8.80	3.44
تبليل التربة بالبكتريا Pf ثم العدوى بالفيروس بعد 4 أيام	26.67	43.33	26.27	7.65	7.11	2.59
تبليل التربة بالبكتريا Bs ثم العدوى بالفيروس بعد 4 أيام	27.50	35.17	30.00	6.17	7.65	2.74
تبليل التربة بالبكتريا Pf وBs ثم العدوى بالفيروس بعد 4 أيام	41.67	26.69	30.60	8.52	9.14	3.11
العدوى بالفروس ثم تبليل التربة بالبكتريا Pf بعد 4 أيام	25.02	21.71	33.21	7.00	9.92	3.54
العدوى بالفيروس ثم تبليل التربة بالبكتريا Bs بعد 4 أيام	41.69	40.00	30.77	5.42	8.22	2.24
العدوى بالفيروس ثم تبليل التربة بالبكتريا Pf وBs بعد 4 أيام	8.33	16.67	34.50	8.63	10.64	3.77
المقارنة / بوجود الفيروس	91.69	76.67	14.06	3.71	5.75	1.72
المقارنة /من دون الفيروس	0.00	0.00	19.54	6.35	8.28	1.93
أقل فرق معنوي L.S.D. عند مستوى P=0.05	40.905	7.9434	4.17	1.515	4.9417	1.0355

Pf= *Pseudomonas fluorecens* Bs= *Bacillus subtilis*، الفيروس = فيروس موزائيك الخيار *Cucumber mosaic cucumovirus*

* كل رقم في الجدول يمثل معدل 3 مكررات

وتفوقت معاملة تبليل التربة بخليط *P. fluorescens* و *B. subtilis* ثم العدوى بالفيروس بعد يومين من الاضافة أو التبليل على معاملة المقارنة والتي أعطت أعلى نسبة تثبيط لتضاعف الفيروس إذ بلغت 76.52% بعد 10 أيام من العدوى اعتماداً على تفاعلات أختبار اليزا حيث بلغ الامتصاص على طول موجي 405 نانوميتر 0.231. (جدول 2،3).

تلتها معاملة التبليل بالبكتريا *P. fluorescens* ثم العدوى بعد يومين من الاضافة فكانت نسبة تثبيط تضاعف الفيروس 72.69% وبقيمة امتصاص0.272 %. (جدول 2، 3). وربما يعود ذلك إلى استقرار البكتريا *P. fluorescens* على سطح الجذور وافرازها مواداً ترتبط على مستقبلات معينة عليها فتصدر اشارات الى بعض مورثات الخلايا لأنتاج مواد (بروتينات) تعمل على ايقاف تضاعف الفيروس، إذ تتحفز الخلايا المصابة على تصنيع مواد تنتقل جهازياً الى المناطق الاخرى من النبات وتضفي عليها مقاومة ضد المسببات المرضية وبالتالي فإن وجودها على جذور النباتات يعمل على تحفيز عوامل المقاومة فيها قبل حصول الاصابة ومن ثم تحد من الاصابة[25]. واشيرالى وجود المركب Lipopoly saccharide (Lps) المعزول من البكتريا *P. fluorescens* والذي لا يقل فعالية عن البكتريا الحية نفسها في تحفيز المقاومة، ولقد وجدت طفره في البكتريا*P. fluorescens* تفتقر الى السلسلة الانتيجية O-antigenic من Lps فقدت قدرتها على تحفيز المقاومة الجهازية المستحثة ISR وهذه المعطيات تُشير إلى أن مركب Lps يمثل أحد المحددات الرئيسية في تحفيز ISR في النبات [18] .

واظهرت معاملة تبليل التربة بنوعي البكتريا *P . fluoresecens* و *B . subtilis* ثم العدوى بالفيروس بعد يومين من الاضافة زيادة في فعالية إنزيم Peroxidase حيث بلغ التغير في الامتصاص الضوئي 78.253 بعد 15 يوماً من العدوى بالفيروس في حين بلغ التغير في فعالية الانزيم بعد 30 يوماً وللمعاملة نفسها61.400 . وأعطت معاملة تبليل التربة بخليط نوعي البكتريا والعدوى بالفيروس بعد يومين من التبليل أعلى زيادة في فعالية انزيم الـ PAL والتي بلغت 2.311 و1.456 مايكروغرام حامض سينناميك /ساعة/ غم وزن.

يسهم انزيم الـPOD في عملية تصنيع وترسيب اللكنين Lignin وبيروكسيد الهيدروجين والتي تؤدي الى تقوية جدران الخلايا ضد غزو المسبب المرضي[23]. كما يعمل أنزيم الـ Peroxidase فضلاً عن أنزيميPoly phenol oxidase والـ Catalase على أكسدة المواد الفينولية وتحولها الى مواد اكثر سمية كالـ quinine وبيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 فتتحرر الجذور الحرة الفعالة مثل OH^- و O_2^- فتحفز جينات الدفاع بالنبات وتزداد بلمرة مركبات اللكنين التي تتداخل مع تطور المرض فيما بعد[17]. ويعد هذا الأنزيم من البروتينات المرتبطة بالدفاع ويدعىPR-9 [13]. كما يسهم إنزيم PAL في عملية التصنيع الحيوي للمواد الايضية السامة مثل الدواحر (Phytoalexins)، المركبات الفينولية، اللكنين، وحامض السالسيلك في المسالك الدفاعية للنبات [19]. وأن هذا الإنزيم هو المسوؤل عن تحويل الحامض الاميني Phenyl alanine إلى Trans-Cinnamic acid الذي يعد من المواد الوسطية الأساسية في سلسلة بناء العديد من الأحماض العضوية، وتتحول الاخيرة الى فينولات مثل حامض الكافئيك Caffeic acid و Coumaric acid كما إن له دوراً مهماً في سلسلة البناء الحيوي لمادة Phenyl ProPanoids من مواد الايض الثانوي المهمة في تخليق العديد من الفينولات والقلويدات [8].

وان هذه النتائج تتفق مع ما اشار اليه عدد من الباحثين الى ارتباط مقاومة النباتات المختلفة مع زيادة فعالية أنزيمي Peroxidase و Phenyl Alanine نتيجة لاستحثاث المقاومة فيها بعوامل مختلفة (احيائية ولا احيائية [14])

جدول (2): قيم امتصاص اختبار اليزا لنباتات الطماطة المزروعة في تربة مبللة بالعوامل الاحيائية والمعداة بفيروس موزائيك الخيار .

المعاملة	قيم امتصاص اختبار اليزا موعد القراءة (يوم من العدوى)		
	بعد 2 يوم	بعد 6 يوم	بعد 10 يوم
تبليل التربة بالبكتريا Pf ثم العدوى بالفيروس بعد 2 يوم	0.300	0.250	0.272
تبليل التربة بالبكتريا Bs ثم العدوى بالفيروس بعد 2 يوم	0.244	0.395	0.400
تبليل التربة بالبكتريا Pf وBs ثم العدوى بالفيروس بعد 2 يوم	0.408	0.257	0.231
العدوى بالفيروس ثم تبليل التربة بالبكتريا Pf بعد 2 يوم	0.419	0.460	0.357
العدوى بالفيروس ثم تبليل التربة بالبكتريا Bs بعد 2 يوم	0.527	0.470	0.406
العدوى بالفيروس ثم تبليل التربة بالبكتريا Pf وBs بعد2 يوم	0.438	0.399	0.415
تبليل التربة بالبكتريا Pf ثم العدوى بالفيروس بعد 4 أيام	0.450	0.485	0.300
تبليل التربة بالبكتريا Bs ثم العدوى بالفيروس بعد 4 أيام	0.355	0.480	0.604
تبليل التربة بالبكتريا Pf وBs ثم العدوى بالفيروس بعد 4 أيام	0.370	0.405	0.291
العدوى بالفيروس ثم تبليل التربة بالبكتريا Pf بعد 4 أيام	0.416	0.505	0.574
العدوى بالفيروس ثم تبليل التربة بالبكتريا Bs بعد 4 أيام	0.543	0.488	0.385
العدوى بالفيروس ثم تبليل التربة بالبكتريا Pf وB بعد 4 أيام	0.418	0.470	0.489
مقارنة بوجود الفيروس	0.607	0.681	0.984
مقارنة من دون الفيروس	0.056	0.071	0.066
أقل فرق معنوي L.S.D. عند مستوى P=0.05	0.046	0.023	0.045

Bacillus subtilis : Bs *Pseudomonas fluorecens* : Pf الفيروس :فيروس موزائيك الخيار

Enzyme – Linked Immunosorbent Assay : اليزا ، (CMV)

جدول (3): تأثيرتبليل التربة بعوامل استحثاث المقاومة في منع تضاعف فيروس موزائيك الخيار اعتمادا على قيم امتصاص اختبار اليزا .

المعاملة	% لمنع تضاعف الفايروس موعد القراءة (يوم من اجراء العدوى)		
	2يوم	6 يوم	10 يوم
تبليل التربة بالبكتريا Pf ثم العدوى بالفيروس بعد 2 يوم	50.58	63.29	72.69
تبليل التربة بالبكتريا Bs ثم العدوى بالفيروس بعد 2 يوم	59.80	42.00	59.35
تبليل التربة بالبكتريا Pf وBs ثم العدوى بالفيروس بعد 2 يوم	32.78	62.26	76.52
العدوى بالفيروس ثم تبليل التربة بالبكتريا Pf بعد 2 يوم	30.97	32.45	63.72
العدوى بالفيروس ثم تبليل التربة بالبكتريا Bs بعد 2 يوم	13.18	30.98	58.74
العدوى بالفيروس ثم تبليل التربة بالبكتريا Pf وBs بعد2 يوم	27.84	41.41	57.83
تبليل التربة بالبكتريا Pf ثم العدوى بالفيروس بعد 4 أيام	25.86	28.78	70.43
تبليل التربة بالبكتريا Bs ثم العدوى بالفيروس بعد 4 أيام	41.52	29.52	38.62
تبليل التربة بالبكتريا Pf وBs ثم العدوى بالفيروس بعد 4 أيام	39.04	40.53	69.51
العدوى بالفيروس ثم تبليل التربة بالبكتريا Pf بعد 4 أيام	31.47	25.84	41.67
العدوى بالفيروس ثم تبليل التربة بالبكتريا Bs بعد 4 أيام	10.54	28.34	60.87
العدوى بالفيروس ثم تبليل التربة بالبكتريا Pf وB بعد 4 أيام	31.14	30.98	50.30
مقارنة من دون الفيروس	90.77	89.57	93.29
أقل فرق معنوي L.S.D. عند مستوى P=0.05	6.08	3.53	6.83

Pseudomonas fluorecens : Pf ، *Bacillus subtilis*: *Bs* ،الفيروس : فيروس موزائيك الخيار Cucumber mosaic virus (CMV) ، اليزا : Enzyme – Linked Immunosorbent Assay

المصادر

1. العاني ، رقيب عاكف ،ليث خليل توفيق .2011. تحفيز المقاومة الجهازية في نباتات الخيار ازاء فيروس موزائيك الخياربأستخدام البكتريا *Pseudomonas flourescens*. مجلة وقاية النبات العربية . 29 : 36- 42.

2. العاني ، رقيب عاكف وليلى جبار صبر ومصطفى علي عذاب والاء خضير حسان .(2009). استجابة بعض أصناف البطيخ للاصابة بفايروس موزائيك الخيار تحت الظروف الحقلية .مجلة العلوم الزراعية العراقية .40(6): 1- 8.

3. صبر، ليلى جبار2010. تشخيص سلالة لفايروس موزائيك الخيار من نبات الفاصوليا بأستعمال التقنيات البايولوجية والمصلية في العراق مجلة الانبار للعلوم الزراعية . المجلد 8، العدد 1، صفحة 230- 237.

4. صبر، ليلى جبار، رقيب عاكف العاني. 2008. تحديد اربع سلالات لفايروس موزائيك الخيار مصلياً وبايولوجياً وعلاقتها بالامراضية . مجلة العلوم الزراعية العراقية 39.(1):59-68.

5. عذاب ، مصطفى علي، رقيب عاكف العاني .(2009). تقويم كفاءة الاختبار المصلي Immunostrip ELISA في تشخيص فايروسي موزائيك التبغ TMV وموزائيك الخيار CMV في العراق . مجلة جامعة الانبار للعلوم الزراعية 7 (3)

6. Al-Ani,A. and M. A. Adhab. 2012. Protection of melon plants against Cucumber mosaic virus infection using *Pseudomonas fluorescens* biofertilizer. Department of Plant Protection, University of Baghdad, Baghdad, Iraq.

7. Cho1, S. Lee1, S.-H. Park2, S. Choi1, K.-U. J. Cho1, Hur3, J. H. Shrestha1, A. and Lim1,* C.. 2009. Identification of a Genetic Locus Related to Antivirus Production in *Pseudomonas fluorescence* strain Gpf01 Against Cucumber mosaic virus. Plant Pathol. J. 25(1): 77-85.

8. Delaney,T.P. 2004. Salicylic acid .In : Plant Hormones : Biosynthesis. Signal Transduction ,Action .P.J.Davies(ed) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

9. El-Borollosy, A. M. and Oraby, M.M. 2012. Induced systemic resistance against *Cucumber mosaic cucumovirus* and promotion of cucumber growth by some plant growth –promoting rhizobacteria .Annals of Agricultural Science. 57(2): 91-97.

resistance induced against faba bean chocolate spot disease Egypt. J. Phytopathol. 35: 35-48.

14. Harish, S., Kavino, M., Kumar, N., Balasubramanian, P. and Samiyappan, R. 2009. Induction of defense-related proteins by mixtures of plant growth promoting endophytic bacteria against Banana bunchy top virus. Biological Control, 51 (1): 16-25.

15. Jetiyanon, K. Fowler ,W.D and Kloepper , J.W. 2003. Broad-spectrum protection against several pathogens by PGPR mixtures under field conditions in Thailand. Plant Dis, 87:1390–1394.

16. Kloepper, J. W. and Schroth, M. N., 1978. Plant growth promoting rhizobacteria on radish. In : Proc. of the Fourth Int. Conference on Plant Pathogenic Bacteria, Vol. 2, Angers, A. B. and Gibert, Tennesse, USA, pp. 879-882.

17. Kloepper, J. W., Reddy, M. S., Kenney, D. S., Vavrina, C., Kokalis-Burelle, N., and Martinez-Ochoa, N. 2004. Theory and applications ofrhizobacteria for transplant production and yield enhancement. Proc. XXVI

10. El-Dougdoug, K. A.; Ghaly, M.F. and Taha,M.A. 2012. Biological control of cucumber mosaic virus by certain local *Streptomyces* isolates:Inhibitory effects of selected five Egyptian isolates. International Journal of Virology .8(2):151-164.

11. El-sharkawy, M. M., Shimizu, M., Takahashi, H. and Hyakumachi, M. 2012. Induction of systemic resistance against Cucumber mosaic virus by *Penicillium simplicissimum* GP17-2 in Arabidopsis and tobacco. Plant Pathology, 61: 964–976.

12. Han, J., L. Sun, X. Dong, Z. Cai, X. Sun, H. Yang, Y. Wang and W. Song, 2005. Characterization of a novel plant growth-promoting bacteria strain *Delftia tsuruhatensis* HR4 both as a diazotroph and a potential biocontrol agent against various plant pathogens. Syst. Appl. Microbiol., 28: 66-76.

13. Hassan , E. ; Magyie, M. ; Saieda , S. ; Abd EL-Rahman , I.; EL-Abbasi,H.and Mikhail ,M.S.2007. Changes in peroxidase activity due to

IHC—Transplant Production and Stand Establishment. S. Nicola, J. Nowak, and C. S. Vavrina, eds. Acta Hortic. 631:217-229.

18. Leeman, M., J.A. Van Pelt, F.M. Den Ouden, M. Heinsbroek, P.A.H.M. Bakker and B. Schippers. 1995. Induction of systemic resistance against Fusarium wilt of radish by lipopolysaccharides of *Pseudomonas fluorescens*. Phytopathology, 85: 1021-1027.

19. Mauch- Mani, B. and Slusarenko, A. J. 1996. Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia – lyase in the resistance of Arabidopsis to Peronospora parasitica – Plant Cell.8:203-212.

20. Megahed ,A.A. S.M. Lashin, K.h.A. El-Dougdoug , B.A. Othman and M.A. Ibrahim . 2012. Potential of biotic inducers on disease severity and variation of Cucumber mosaic cucumovirus in cucumber plants . Archives of Phytopathology and Plant Protection. 46: 193- 200.

21. Noordam, D., 1973. Identification of plant viruses. Methods and Experiments. Center for Agriculture Publishing and Documentation, Wageningen the Nethelands , pp: 207.

22. Othman .B.A., KH.E-Dougdoug ., and M. Abo-E-Nasr. 1991. Effect of garlic bubbilies extraction on tomato mosaic virus .Annals Agric.sci.36 (2):423-430.

23. Ride, J. P., 1975, Lignification in wounded wheat leaves in response to fungi and its possible role in resistance. Physiol. Plant Pathol., 5 : 125-134.

24. Ryals, J., Neuenschwander, Urs., Willits, M., Molina, A., Steiner, H. and Hunt, M., 1996. Systemic acquired resistance. The Plant Cell, 8: 1809-1819.

25. Ryu, C. M., Murphy, J. F., Mysore, K. S., and Kloepper, J. W. 2004. Plant growthpromoting rhizobacteria systemically protect *Arabidopsis thaliana* against Cucumber mosaic virus by a salicylic acid and NPR1- independent and jasmonic acid-dependent signaling pathway. Plant Journal, 39, 381-392.

26. Sikora,E.J., Gudauskas ,R.T., Murphy,J.F.,Porch,D.W., Andrianifahanana ,M., Zehnder ,G.W., Bauske, E. M., Kemble, J. M., Lester, D. F. 1998. Amultivirus epidemic of tomatoes in Alabama .Plant Disease. 82: 117-120.

27. Sikora,E.J.1994. Virus disease of tomato .Alabama Cooperative Extension service ,Auburn Univ 3P.

28. Shoman, S.A., Abd-Allah, Nagwa.A., El-Baz, A.F., 2003. Induction of resistance to tobacco necrosis virus in bean plants by certain microbial isolates. Egypt. J. Biol. 5, 10–18.

29. Van Loon, L. C., Bakker, P. A. H. M. and Pieterse, C. M. J. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. Annual Review of Phytopathology, 36, 453-483.

30. Wang,S.; Wu,H.; Zhan,J.; Xia,Y.; Gao.S.; Wang,W.; Xue,P. uewand Gao,X. 2011. The role of synergistic action and molecular mechanism in the effect of genetically engineered strain *Bacillus* subtilis OKBHF in enhancing tomato growth and cucumber mosaic virus resistance for Biological Control.56:113–121.

Iraqi Journal of Biotechnology, 2015, Vol. 14, No. 2 , 343-354

تأثير المعاملة بالجبرلين وفطر الترايكوديرما في نسبة وسرعة تنبيت وفعالية أنزيمي Peroxidase و amylase لبذور هجن الباذنجان

فلاح حسن عيسى

كلية الزراعة – جامعة المثنى

الخلاصة: أجريت التجربة في مختبرات قسم البايلوجي (علوم الحياة) لكلية التربية الاسا سية واستخدم فيها هجن بذور الباذنجان هما A الفرنسي المنشأ و B السوري المنشأ وعوملت بالمعاملات التحفيزية للتنبيت وهي المعاملة بالجبرلين بالتركيزين 5 ، 10 ملغم / لتر ، والمعاملة بالسماد الحيوي الترايكوديرما اضافة الى معاملة السيطرة المعاملة بالماء المقطر فقط ولمدة 15دقيقة لكل منهم ، واخذت قياسات التنبيت وسرعته وفعالية انزيمي البيروكسيديزوالاميليز ،وكررت كل معاملة 3 مكررات (أطباق) وفي كل طبق وضعت 20 بذرة لكل هجين ، وحللت التجربة وفق التصميم االعشوائي الكامل CRD وقورنت المتوسطات عند مستوى احتمال 0.05 .

وقد بينت النتائج التالي :

1- تفوق الهجين B على الهجين A في نسبة التنبيت وشدة فعالية انزيم الأميليز فبلغ (94.4 %و 50.5 وحدة امتصاص) على التوالي بينما تفوق الهجين A في شدة فعالية انزيم البيروكسيديز فبلغ 30.4 وحدة امتصاص وسرعة التنبيت بلغت 9.8 يوم .

2- تفوق المعاملة بالجبرلين10 ملغم / لتر في نسبة التنبيت وسرعة التنبيت وشدة فعالية انزيم الاميليز فبلغت (92.5 % ، 8.6 يوم ، 57.4 وحدة امتصاص) على التوالي مقارنة بمعاملة المقارنة .

3- حقق التداخل الثنائي للهجين B في المعاملة 10 ملغم / لتر اعلى نسبة تنبيت بلغت 100 % واعلى فعالية لانزيم الاميليز بلغت 59.9 وحدة امتصاص واوطأ فعالية لانزيم البيروكسيديز بلغت 20.0 وحدة امتصاص .

Effect of GA and Tricoderma on germination percentage and activity of peroxidase and amylase enzymes on seeds of Eggplant hybride.

Falah H. Issa

College of Agriculture / Al-Muthanna Uni.

Abstract: This study was carried out in the laboratories of Biology Department -College of Basic Education. Two types of eggplant hybrid Seeds were used (A) French and (B) Syrian originated hybrid. Both hybrids seeds were treated with 5and 10 mg/l of GA_3 or Tricoderma biofertilyzer in addition to control treatment (distilled water) for (15 min) only. Data were recorded for speed and germination percentage, the activity of peroxidase and amylase enzymes were assayed .Three Petri dish (as replicates) and 20 seeds in each were carried out. The experiment was setup using Completely Randomized Design and means were compared at 0.05 of probability level.

The results revealed as follows:

1- B hybrid was superior as compared with A hybrid in germination rate and amylase activity which reached 94.4% and 50.5 absorption unit respectively while A hybrid was superior concerning to peroxidase activity and germination speed which were 30.4 absorption unit and 9.8 day.

2- 10 mg/l of GA_3 treatment affected positively on speed, germination percentage and amylase activity (8.6 day, 92.5% 57.4 absorption unit) as compared with control treatment.

3- The interaction between B hybrids in 10 mg /l gave germination percentage, high amylase activity and less peroxidase activity which reached (100%, 59.9 and 20.0) absorption unit respectively.

Keywords: Eggplant hybrid Seeds, Hybrids, peroxidase

المقدمة :

يتبع الباذنجان Eggplant (*Solanum melongen*) العائلة الباذنجانية Solanaceae المهمة اقتصاديا لأحتوائها على أجناس متعددة مثل الطماطةوالبطاطا والفلفل وغيرها (كاتب ، 2000) وهو من محاصيل الخضروات الصيفية الشائعة الاستخدام في العراق حيث يعد من الاغذية الرئيسية للعائلة العراقية لما يحتويه من مواد كربوهيدراتية وبروتينية وعناصر معدنية وسعرات حرارية جيدة (المحمدي والمشعل،1989).

الباذنجان نبات عشبي معمر يصل ارتفاعه 70 سم له أوراق زغبية وأزهار بنفسجية وثمار كبيرة نسبيا ويعتقد أن منطقة أواسط الهند هي الموطن الأصلي للباذنجان اذ لاتزال نباتاته تنمو بصورة برية في هذه المناطق كما انه موجود في الصين منذ العصور الأولى ونقله العرب الى أوربا (شوفاليه ،2003).

يتأثر نبات الباذنجان بدرجات الحرارة المنخفضة أكثر من نبات الطماطة والفلفل حيث أنه حساس جدا للبرودة ولذا فان المحصول يحتاج الى موسم دافئ طويل خال من الصقيع وتحتاج النباتات الى درجات حرارة مرتفعة نسبيا خلال المرحلة الأولى من حياتها لغرض النمو الخضري وتعتبر درجة 25 ْم نهارا ودرجة 20 ْ م ليلا أنسب درجات الحرارة للأزهار والعقد ،ويتوقف النمو تقريبا اذا انخفضت الحرارة عن 15 ْم ويمكن ان تتعفن الثمار تحت ظروف الحرارة العالية خاصة من الأصناف ذات الثمار الطويلة (الدقر ،1977).

ينمو الباذنجان ويعطي حاصلا في جميع الترب بشرط ان تكون خصبة وخالية من الملوحة وجيدة الصرف وغنية بالمواد العضوية وتبدأ زراعته بعد زوال خطر الصقيع ويصبح الجو دافئا خلال منتصف آذار للمنطقة الوسطى في العراق وفي نهاية آذار للمنطقة الشمالية كما يزرع المحصول في غير موعده الأصلي (في الشتاء) تحت ظروف الزراعة المحمية في البيوت البلاستيكية والزجاجية (المحمدي ،1987)اضافة الى زراعته مبكرا في نهاية الشتاء في الأنفاق الواطئة(الصحاف،1986).

يحتوي الباذنجان على العديد من المركبات الفعالة منها الأحماض الفينولية(Phenolic acids) وكميات كبيرة من فيتامين C ومجموعة فيتامين Bوالفيتامينات A ,E بكميات قليلة (Helmja و Kaljurand ،2007) كما يحتوي على العديد من العناصر المعدنية والأملاح المهمة على هيئةNO2 ،NO3 وعلى هيئة P Mn,Mg,Na,K,Fe,Ca,SO4,PO4, واحتوائه على القلويدات والصابونيات القلويداالصابونيات (حسن ، 1996).

يستعمل الباذنجان للاغراض الطبية فهو يساعد في علاج مرض السكري والتهاب المفاصل والربو والتهاب المجاري التنفسية فضلا عن خفضه لمستويات الكولسترول في كل من الدم والكبد للانسان كما انه يعتبر مضاد للتأثيرات المطفرة لبعض من المواد الكيمياوية (Claudia وElisabeth ،2005).

تختلف أصناف الباذنجان فيما بينها في شكل ولون الثمار فمنها الكروية أو المتطاولة الشكل كما توجد ثمار سوداء أو بنفسجية أو بيضاء اللون ومن أهم الاصناف الشائعة عندنا هي المحلي والموصلي ، وهناك أصناف هجينة حديثة غزيرة الأنتاج تحت ظروف الزراعة المحمية في المنطقة الوسطى من العراق مثل هجن برشلونة ولشبونة وريمة وديمة وغيرها(مطلوب،وآخرون،1980) ويزرع في المناطق الباردة في وسط أوربا أصناف هجينة أخرى مثل Night Queen ، Long Purple ، Florida High Bush ، Night King(خليل،2004)،غير أن هذه الهجن وكذلك الهجين White Sicilia ذو الثمار البيضاء والذي يعتبرغذاء مناسب لمرضى السكري لم تلائم أذواق المستهلكين العراقيين أما بسبب شكل الثمار أو ألوانها أو طعمها (الراوي،1982).

نظرا لأهمية نبات الباذنجان الغذائية والأقتصادية ولغرض السعي للوصول الى انتاجية مرتفعة وغزيرة وبسبب قلة الحاصل نتيجة لقلة تنبيت البذور المخزونة لفترة طويلة والغالية الثمن لذلك كان هذا البحث الذي يهدف الى امكانية استخدام المخصبات الحيوية ومقارنتها بالوسائل التقليدية المتبعة ومنها استخدام الجبرلين وفطر الترايكوديرما في زيادة سرعة وتنبيت بذور الباذنجان وتأثيرها على أنزيمات البيروكسيديزوالأميليز.

المواد وطرائق العمل

استخدمت بذور الباذنجان الهجين البلدي من انتاج وزارة الزراعة السورية ويرمز له بالرمز(B) والهجين الفرنسي Black Beauty ويرمز له بالرمز(A) واستخدمت المعاملات التالية :

T0: التنقيع بالماء المقطر لمدة 15 دقيقة.

T1 : التنقيع بالمخصب الحيوي الترايكوديرما .

T2 : التنقيع بمحلول الجبرلين (5 ملغم / لتر) لمدة 15 دقيقة .

T3 : التنقيع بمحلول الجبرلين (10 ملغم / لتر) لمدة 15 دقيقة .

وكررت المعاملات بثلاث مكررات في كل مكرر توجد ثلاث اطبا ق في كل منها 20 بذ رة معاملة.

استخدم التحليل العشوائي الكامل CRD لتحليل النتائج وقورنت المتوسطات للمعاملات عند اختيارأقل مستوى معنوي 50 . 0 وأخذت القياسات التالية:

نسبة التنبيت ، سرعة التنبيت و قياس فعالية انزيمي الأميليز حسب طريقة (سعيد،1996) وانزيم البيروكسيديز(الخزعلي ، 2006)

النتائج والمناقشة :

نسبة التنبيت للبذور :

يتضح من الجدول رقم (1) تفوق الهجين B (السوري المنشأ) معنويا على الهجين A (الفرنسي المنشأ) في نسبة التنبيت فقد بلغا (94.4، 76.4 %) على التوالي اي بنسبة زيادة بلغت 23.5 % ، وقد يعود السبب الى الاختلاف بالصفات الوراثية بين الهجن ومدى قابليتها على التنبيت وهذا يتفق مع الخزعلي (2000).

من الجدول ذاته يتضح وجود فروقات معنوية بين المعاملات التحفيزية للتنبيت فقد تفوقت معاملة T2 (10 ملغم جبرلين / لتر) على معاملة المقارنة T0 (الرش بالماء المقطر) فبلغا (92.5 ، 77.9 %) على التوالي اي بنسبة زيادة بلغت 18.7 % وهذا يتفق مع عيسى (2013) حيث وجد زيادة نسبة التنبيت لبذور هجن الفلفل المعاملة بالجبرلين ، ولم تختلف معنويا معاملة T2 عن معاملتين T1 ، T3 .

من التداخل الثاني بين الهجن والمعاملات التحفيزية للتنبيت ظهر في الجدول اعلاه وجود فروقات معنوية في هذه الصفة فكانت اعلى نسبة تنبيت بلغت 100.0 % في معاملة T2 للهجين B بينما كانت اقل نسبة تنبيت في معاملة T0 للهجين A بلغت 66.5 %

جدول رقم (1): تأثير المعاملة بالجبرلين والترايكوديرما في نسبة التنبيت لهجن من بذور الباذنجان

المعاملات	الهجن		معدل المعاملة
	A	B	
T0	66.5	89.3	77.9
T1	76.5	95.8	86.1
T2	85.0	100.0	92.5
T3	77.5	92.5	85.0
معدل الهجن	76.4	94.4	

L .S.D 0 . 0 5 للهجن = 5.7
L .S.D 0 . 0 5 للمعاملات = 8.2
L .S.D 0 . 0 5 للتداخل =11.5

سرعة التنبيت لبذور الهجن المدروسة :

يتضح من الجدول رقم (2) وجود فروقات معنوية بين الهجن في سرعة التنبيت فقد اسرع الهجين A معنويا بالتنبيت مقارنة بالهجين B فبلغا (13.1 ، 9.6 يوم) اي بنسبة زيادة بلغت 36.4 % وهذا يرجع للاختلافات بين الهجن ومدى احتوائها على الهرمونات النباتية ذات التأثير على سرعة التنبيت .

من الجدول ذاته يتضح وجود فروقات معنوية بين المعاملات في سرعة التنبيت فكانت معاملة T2 اسرع المعاملات في سرعة التنبيت فكانت (8.6 يوم) متفوقة معنويا على معاملة المقارنة T0 التي بلغت (14.6 يوم) وقد يعزى السبب الى ان الجبرلين يزيد من استطالة وانبات البذور وسرعة انباتها وهذا يتفق مع الخزعلي (2000) الذي أكد على زيادة تزريع درنات البطاطا بزيادة تركيز الجبرلين المضاف .

كان للتداخل الثاني بين الهجن والمعاملات الكيميائية التحفيزية للتنبيت قد بلغ فيه اسرع تنبيت (7.1 يوم) في المعاملة T2 للهجين A ،بينما كان اطول مدة تنبيت في معاملة المقارنة T0 للهجين B حيث بلغ (16.7يوم) .

شدة فعالية انزيم البيروكسيديز لهجن بذور الباذنجان

يتضح من الجدول رقم (3) تفوق الهجين A (الفرنسي المنشأ) على الهجين B(السوري المنشأ) معنويا في فعالية انزيم البيروكسيديز (30.4 ، 21.6) وحدة امتصاص على التوالي اي بنسبة زيادة بلغت 40.7 % وقد يعود السبب الى الاختلاف بالصفات الوراثية بين الهجن ومدى قابليتها على التنبيت وهذا يتفق مع الخزعلي (2000).

من الجدول ذاته يتضح وجود فروقات معنوية بين المعاملات التحفيزية للتنبيت فقد تفوقت معاملة T0 (الرش بالماء المقطر) على معاملة T2 (10 ملغم جبرلين / لتر) فبلغا (28.7 ، 23.2) وقد يعود السبب الى ان انزيم البيروكسيديز من انزيمات الاكسدة والاختزال فتقل فعاليته في النسب العالية للتنبيت والتي تتجاوز 70% وكما وضحه الخزعلي (2006)بسبب نسبة الانزيم التي تتناسب عكسيا

جدول رقم (2):تأثير المعاملة بالجبرلين والترايكوديرما في سرعة التنبيت لهجن الباذنجان.

المعاملات	الهجن		معدل المعاملة
	A	B	
T0	12.5	16.7	14.6
T1	10.3	12.5	11.4
T2	7.1	10.2	8.6
T3	9.6	13.1	11.3
معدل الهجن	9.8	13.1	

L .S .D 0 . 0 5 للهجن = 1.6

L .S .D 0 . 0 5 للمعاملات = 2.9

L .S .D 0 . 0 5 للتداخل = 5.4

مع نسب التنبيت للبذور اذا تجاوزت 60% كنسبة تنبيت .

من التداخل الثاني بين الهجن والمعاملات التحفيزية للتنبيت ظهر في الجدول اعلاه وجود فروقات معنوية في هذه الصفة فكانت اعلى نسبة تنبيت بلغت 34.3% في معاملة T0 للهجين A بينما كانت اقل نسبة تنبيت في معاملة T2 للهجين B حيث بلغت 20.0 % .

جدول رقم (3): تأثير المعاملة بالجبرلين والترايكوديرما في فعالية انزيم البيروكسيديز لهجن الباذنجان

المعاملات	الهجن		معدل المعاملات
	A	B	
T0	34.3	22.1	28.7
T1	30.9	21.3	26.1
T2	26.4	20.0	23.2
T3	29.9	22.1	26.6
معدل الهجن	30.4	21.6	

L .S .D 0.05 للهجن = 0.9
L .S .D 0.05 للمعاملات = 2.1
L .S .D 0.05 للتداخل = 4.9

شدة فعالية انزيم الاميليز لبذور هجن الباذنجان:

يتضح من الجدول رقم (4) تفوق الهجين B (السوري المنشأ) على الهجين A(الفرنسي المنشأ) معنويا في فعالية انزيم الاميليز فقد بلغا (50.5 ، 47.6) وحدة امتصاص على التوالي اي بنسبة زيادة بلغت 6 . 90 % وقد يعود السبب الى الاختلاف بالصفات الوراثية بين الهجن ومدى قابليتها على التنبيت وهذا يتفق مع الخزعلي (2000).من الجدول ذاته يتضح وجود فروقات معنوية بين المعاملات التحفيزية للتنبيت فقد تفوقت معاملة T2 (10 ملغمجبرلين / لتر) على معاملة T0 (الرش بالماء المقطر) فبلغا (57.4 ، 43.4) على التوالي اي بنسبة زيادة بلغت 32.2 % وقد يرجع السبب الى ان منظم النمو الجبرلين يساعد على زيادة نسبة سرعة التنبيت (جدول 1 ، 2) نتيجة لزيادة فعالية انزيم الاميليز الذي له دور كبير في تجهيز الجنين للبذور بالطاقة اللازمة للنمو والانبات وهذا يتفق مع ما وجده عيسى (2013) حيث زادت نسبة التنبيت لبذور الفلفل بزيادة تراكيز الجبرلين المعاملة بها البذور ، ولم تختلف معنويا معاملة T2 عن معاملتين T1 ، T3 .

من التداخل الثاني بين الهجن والمعاملات التحفيزية للتنبيت ظهر في الجدول اعلاه وجود فروقات معنوية في هذه الصفة فكانت اعلى نسبة تنبيت بلغت 59.9 % في معاملة T2 للهجين B بينما كانت اقل نسبة تنبيت في معاملة T0 للهجين A بلغت 40.1 % .

جدول رقم (4): تأثير المعاملة بالجبرلين والترايكوديرما في فعالية انزيم الاميليز لهجن الباذنجان

المعاملات	الهجن		معدل المعاملات
	A	B	
T0	40.1	46.8	43.4
T1	47.5	49.5	48.5
T2	55.0	59.9	57.4
T3	47.9	45.7	46.8
معدل الهجن	47.6	50.5	

0.05 L.S.D للهجن = 1.4
0.05 L.S.D للمعاملات = 6.2
0.05 L.S.D للتداخل = 9.3

نستنتج من الدراسة أن استخدام الهجين البلدي السوري المنشأ اعطى اعلى نسبة وسرعة تنبيت مقارنة بالهجين الفرنسي المنشأ Black Bueaty ، وان أنزيم البيروكسيديز له تأثير عكسي على نسبة التنبيت وخصوصا بالنسب العالية للتنبيت لبذور هجن الباذنجان أما أنزيم الاميليز له تأثير ايجابي في زيادة نسب التنبيت لبذور هجن الباذنجان.وامكانية استخدام الفطر *Tricoderma*في زيادة نسبة التنبيت وسرعتها بدل التراكيز القليلة من الجبرلين.

وننصح باجراء مزيد من الدراسات في معرفة مدى تأثير الجبرلين (اكثر من 10 ملغم/لتر) وفطر الترايكوديرما في نمو وحاصل البذورالهجينة المعاملة بهما ومراقبتهما حقليا.

المصادر :

1. حسن ، أحمد عبد المنعم .1996 ،أساسيات انتاج الخضر وتكنولوجيا الزراعات – الدار العربية للنشر والتوزيع . القاهرة . مصر .
2. خليل ، محمود عبد العزيز ابراهيم. 2004 .نباتات الخضر . منشأة المعارف – جليل حزي وشركائه 44 شارع سعد زغلول / الاسكندرية – مصر .
3. الخزعلي ، فلاح حسن . 2000 .تأثير الجبرلين ومركبات الكالسيوم في في تزريع ونمو درنات البطاطا الدقيقة الناتجة من الزراعة النسيجية . رسالة ماجستير. جامعة بغداد / كلية الزراعة .
4. جبارة ، أفتخار موسى .2002 . تأثيرالبشرة الشمسية في بقاء مبيدي المقاومة الاحيائية التحدي والصمود في مكافحة بعض امراض الجذورفي الزراعة المحمية .رسالة ماجستير – كلية الزراعة – جامعة بغداد – العراق.
5. حسن ، أحمد عبد المنعم .1999.انتاج البطاطس .الدار العربية للنشر والتوزيع .
6. دلالي ، باسل كامل . 1993. فهم الانزيمات .وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . جامعة الموصل .
7. سلمان ، محمد عباس . 1988 . أساسيات زراعة الخلايا والانسجة النباتية . ص 62.
8. سعيد ، اكرم ثابت محمد . 1996 . انتاج الاميليزات من الفطر AspergillusOrnatus Group المتحمل للحرارة العالية بواسطة تخمرات الحالة الصلبة ، اطروحة دكتوراة كلية الزراعة – جامعة بغداد ، ص 167.

9. شوفالية ، أندرو .2003 .الطب البديل والتداوي بالاعشاب والنباتات الطبية . (عمر الايوبي) أكاديميا انترناشيونال . بيروت – لبنان .
10. الصحاف ، فاضل محمد . 1986 . زراعة الخضروات في البيت المحمية . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي / بغداد – العراق .
11. عيسى ، فلاح حسن . 2013 . تأثير المغنطة والجبرلين في انبات بذور الفلفل . مجلة أوروك ،كلية العلوم – جامعة المثنى .
12. عبد الرسول ، ايمان جابر . 1996 . تأثير حجم الدرنة والتغطيس بكلوريد الكالسيوم في تحفيز درنات البطاطا Solanumtuberosum على التزريع .مجلة العلوم الزراعية . مج 27 .العدد الثاني . ص 51–58 .
13. كاتب ، يوسف منصور . 2000 .تصنيف النباتات البذرية ، جامعة الموصل . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . ط 2 .
14. الراوي ، عادل وفيق . 1982 .نتائج تقييم أصناف وهجين الخضروات الخاصة بالزراعة المحمية – تقارير من مديرية البستنة العامة مقدمة الى وزارة الزراعة / بغداد – العراق .
15. الدقر ، محمد مطيع . 1977 .زراعة الباذنجان .وزارة الزراعة السورية / دمشق – سوريا .
16. المحمدي والمشعل ، فاضل مصلح حمادي و عبد الجبار جاسم . 1989 .انتاج الخضروات (لطلبة الصف الثالث - ارشاد زراعي والشعب الزراعية غير المتخصصة) كلية الزراعة – جامعة بغداد / وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . بغداد – العراق .
17. مطلوب ، وآخرون ، عدنان ناصر وعز الدين سلطان محمد وكريم صالح عبدول . 1980 ،انتاج الخضروات. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي / بغداد – العراق .
18. مصلح وعبدول ، محمد سعيد صالح وكريم صالح عبدول . 1988 . البطاطا ، انتاجها .خزنها وتصنيعها . مترجم . تأليف أدراسمث . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي – جامعة صلاح الدين .
19. محمد ،عبد المطلب سيد . 1982 . الهرمونات النباتية ، فسلجتها وكيماؤها الحيوية . مترجم ،تأليف توماس . س . مور. مطابع مديرية دار الكتب والنشر . جامعة الموصل . ص 122- 126 .
20. مطلوب ، وآخرون ، عدنان ناصر وعز الين سلطان وكريم صالح عبدول .1989. انتاج الخضروات . ج 2. مؤسسة دار الكتب للطباعة والنشر – جامعة الموصل .
21. المحمدي ، فاضل مصلح حمادي . 1987 . الزراعة المحمية . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي (رئاسة مؤسسة المعاهد الفنية) / بغداد – العراق .
22. ياسين ، بسام طه . 1992 . فسلجة الشد المائي في النبات . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي - جامعة الموصل .
23. Alejar, A . A . and L . R . Gonzal . 1986 .Variation in plant hormones III . The effect of light or darkness on hormone levels in buds of sprouting potato tubers . PHIL .AGR . 69 : 353 – 360 .
24. Alexopoules, C. J.; Mims, C.W. and Black well ,M.1996. Introductory My Cology,4th Ed., pp. 869, John wiley and Sons,Newyork.U.S.A.
25. Bailey, K . M . ; I . D . J . Phillips and D . pitt . 1977 .The Role of Buds and Gibberellin in dormancy and the Mobilization of reserve materials in potato tuber . Ann .Bot . 42 : 649:657.

26. Bayogan , E . V ; V .B .Salda and E . B . Tie guingan . 1989 . Alternative methods of breaking dormancy in seed potatoes .2 . Tren . conf . APA – Kunming. China . pp .127 – 145 .

27. Bishop , J . C . , Timm . 1968 . Comparative influence of gibberllic acid of plant population on distribution of potatoe tuber size . American potato J .45(5) : 182 – 187 .

28. Bruinsma , I . and J . Swart . 1970 .Estimation of the Course of dormancy of potato tubers during growth and storage with the aid of gibberellic acid . potato Res . 13 : 29 – 40 .

29. Burnett , F . S . 1977 .Peroxidase and its relation ship to food f lavor and quality : Areview . J . food Sci .42 : 1-5.

30. Brunim, p.J. and W.M. Teague. 1988. Areduced stability. B. Stearothermophilus a-amylase ForFood application Biot Lelt .Vol 10 (7):445-450.

31. Boel, E.: Brady ;A.M. Brozozowsk and H. Woldike . 1990. Biochemistry Vol 29:6244-6249.(cited from Brosnan etal;1992.

32. Byers, R.E. and F.H. Emerson.1969.Effect of Sccinamic acid 2 ,2 dimethyl hydrazide (Alar) on peach Fruit Maturation and tree growth. J. Amer .Sco. Hort.Sci.94:641-645.

33. Chiange, J. p; .E. Aler and M. Stunberg. 1979. Stark.Vol 31: 86-92.(cited from srivastva, 1987).

34. Clegg, M.D. and L. Rappaport. 1970. Regulation of bud restin tubers of (*Solanum tuberosum* L.) V1 Biochemical changes induced in excised potato buds by gibberelic acid .1 bid 45:8-13.

35. Classen, P. A.; M.A. Budde; and M.H. Van calker .1993. Increase in phosphory lase-activity during cold indused Sugar accumulation in potato tubers potato Res.36(2):205-217.

36. Claudia, M. and Elisabeth, M. 2005. Eggplant (Solanummelongena L .) :tissue culture ,genetic transformation and use as an alternative model plant .Acta Bot, Bras 19 (1): 139-148.

37. Cottrell,J.E.; C.M. Duffus,: L; Paterson and M.J.Allison.1993. The effect of Storage temperature on reducing Sugar concentration and the activities of three amylolytis enzymes in tubers of the cultivated potato, Solanum tuber osumL.potato Research 36(2): 107- 117.

harzianum T22 plant Dis Rep 84(4):377-393.

44. Helmja ,K . M .Vahert , J . Gorbatsova ,and M . Kaljurand . 2007 . Characterization of bioactive compounds contained in Vegetables of the Solaanceae family by capillary electrophoresis, proc , Estonian Acad, Sci. Chem .56 (4) :172-186 .

45. Hemberg , T . 1947 . ActaHorti Bergiani 14 , 133 – 220 .

46. Higgins , T . J . W . ; J . A .Zwar and J . V . Jacobsen . 1976 . Nature (London) 260: 166 – 169 (cited from khan ,A . A . Ed .) 1980 . The physiologlogy and Biochemistry of seed dormancy and germination . North Holland publishing Co . Nether lands .

47. Holmes , J . C . ; R . W . Lang and A . K . Singh . 1970 . The effect of five growth regulators on apical dominance in potato seed tubers and on subsequent tuber production . potato Res . 13 : 342 – 352 .

48. Howell,C.R.Hanson,L.E,Stipan ovic, R.D., and puckhaber, L.S .2000 .Induction of terpenoid Synthesis in Cotton roots and control of RhizoctoniaSolani by Seed treatment with *Trichoderma viride*. phgtopathol. 90:248-252.

38. Duwening E.,Steup M., Willmitzer L., kossmann J.1997. Antisense inhibition of cytosolic phosphorylase in potato plants (*Solanum tuberosum* L.) Effect on carbohydrate metabolism. The plant Journal 12,323-333.

39. Fogarty,W.M. and E.T.Bourke. 1983. Microbial amylases. Inimicrobial Enzymes and Biotechonlogy.19,268-272.

40. Grondona,R,;Hermosa,M.;Teja da,M.D.; Gomis, P. F.; Mateos, P. D.; Bridge, E. M. and Garcia,A.1997.Physiological and biochemical characterization of control agent against Soil borne fungal plant pathogens. App. Environ Microbiol.63:3189-3198.

41. Glenn ,W .T . 1953 . Enzyme studies on dormant and active potato tubers. physiologocalplantarum , (6) : 169 – 187 .

42. Grechusluikov , A .T . ; V . P . Kiryukin , V . S . Serebrenikov and I . P . Terkonidi. 1964 .Some physiologyical and biochemical changes in p0tatoes after treating the tubers with gibbrellin. Fizid. Rost 11 : 620 – 629 . (In potato , production , storing and processing . part 1 Ed .

43. Harman, C.E.2000 .Myths and dogmas of biocontrol change in perceptions derived frome Search on *Trichoderma*

amylase, The plant Journal 20,519-527.

57. Norman ,B.B .1979 .The application of polysaccharide degrading Enzymes in the starch industry. In: Microbiol ploysaccharide Barkely. R,C. Et. chp. 15: 339-374 Academic press.

58. Okazawa, Y .1966. Proc. CropsciSoc . 5 : 180 – 194 in Harris, P . M .1978 .The potato crop .

59. Priest,F.G.1984. Extracellular Enzymes, Vannostr and Reinhold VK CO. Ltd.

60. Ringard, T. A. and P. A. Palladine. 1980 . Changes in the content of growth activating Substances in potato after treatment with gibberellins. Doki. Akad. Nauk SSSR 153 (20) : 481 – 484 .

61. Rifai,M.A.1969.Areversion of the genus *Trichoderma* .Mycol papers 116:1056.(cited in Grondona 1997).

62. Schleucher J., Vanderveer P.J., Sharkey T.D.1998. Export of carbon from chloroplasts at night .plant physiology (Abstract Free Full Text).

63. Sekhon , H . S . and M .Singh . 1985 . Effect of mechanical and chemical Seed treatments on the number and size of Seed tubers and yield of potato. J.A gric. SciCamb .103: 487 – 495 .

49. IPGSA . 1988 . International conference on plant growth Substances August 13 to 17, 1988 . Makuhari Masse , Chiba Japan .

50. Jacobsen , J . V . and J . A . Zwar . 1974 . Aust . J . plat physiology . 1 : 343 – 356 cited from (khan , A . A . (Ed.)1980).

51. Jones , R . L .1973 . Gibberellic acid and ionrelease from barley aleur one tissue . Evidence for hormone – dependention transport capacity 52 : 303 – 308 .

52. Jones, R. L. and J. L. Stoddart . 1980 . Gibberellins and Seed germination cited from (Khan , A . A . (Ed) . 1980) .

53. Khan ,A. A. 1971. Cytokinins: permissive role in Seed germination Science 171:853 – 859 .

54. Khan , A . A .1980 . The physiology and Biochemistry of Seed Dormancy and Germination . North- Holland publishing Co . Nether land .

55. Khan,J.;Oka,J.J.and Miller,S.A.2004.Systemic resistance induced by *Trichoderma hamatum* 382 in cucumber against phytophthora crown rot and leaf blight .plant Dis.88:280-286.

56. Lao NT .Schoneveldo, Mould RM, Hibberd JM ,Gray Jc, kavanagh TA .1999 . An Arabidopsis gene encoding achloroplast – targeted beta-

64. Smith, O. E. and L. Rappaport . 1961. Endogenous gibberelline in testing and sprouting potato tuber. Advances in chemistry . 28 : 42 48 .

65. Srivastava, P.A. 1987. Purifection and chemical characterization of the rmostable amylase produced by *B.stearoThermophallus* Enzymes Microbi .Technol.Vol 9:749-754.

66. Stephane ,D . ; C .Jean ; L . H . Jean and V .Jacques . 1995 . Protein changes in *Solanum tuberosum* during storage and dormancy breaking of in vitro microtubers . Plant physiol Bio chem. 33 (4) : 479 – 487 .

67. Weaver,J.R.1972. Plant growth Substances in Agriculture .W.H. freeman and CO; San Fracisco.185p.

Iraqi Journal of Biotechnology, 2015, Vol. 14, No. 2 , 355-365

اختبار مدى فعالية بعض المستخلصات النباتية في نمو بعض الفطريات الجلدية dermatophyte خارج وداخل الجسم الحي

فرح ل. وهاب و زهراء ر. طه و طيبة هـ. محمد

كلية العلوم – جامعة بغداد

الخلاصة: هدفت هذه الدراسة إلى استخدام المستخلص الكحولي لأوراق نبات إكليل الجبل *Rosmarinus officinalis*، الحناء *Lawsonia Inermis*، وثمار الفلفل الحار *Capsicum annuum* بأربع تراكيز (100,50,25,12.5) ملغم \مل ، واختبار فعاليتها على عدد من أنواع الفطريات الجلدية dermatophyte المعزولة من مرضى يعانون من إصابات بهذه الأنواع وهي *Trichophyton rubrum*، *Microsporum canis* وبعد تشخيصها باستخدام المفتاح التصنيفي، تم معاملة هذه العزلات الفطرية بالمستخلصات النباتية مختبريا باستخدام أطباق بتري .أظهرت النتائج إن جميع المستخلصات النباتية كان لها تأثير تثبيطي على الفطريات الجلدية ، إذ أظهر المستخلص الكحولي لنبات الحناء أعلى نسبة تثبيط للفطر*T.rubrum* (98,94,88,60) % ، بينما سجل مستخلص ثمار الفلفل الحار نسبة تثبيط (89,77,62,22)%. كما وسجل مستخلص نبات إكليل الجبل نسبة تثبيط (91,72,60,35)% للتراكيز(100,50,25,12.5) ملغم /مل على التوالي . كما سجل مستخلص نبات الحناء نسبة تثبيط للجنس *M.canis* (100,92,83,72) % ، مستخلص نبات الفلفل الحار(90,69,42,15)% و إكليل الجبل (88,71,58,20)% للتراكيز السابقة على التوالي . كما تم اختبار فعالية المستخلصات على المرضى المصابين وقد أظهرت النتائج أن مستخلص نبات الحناء أعلى كفاءة يليها مستخلص نبات اكليل الجبل ثم الفلفل الحار في اختفاء العلامات السريرية بعد 18 يوم من العلاج.

الكلمات المفتاحية: المستخلصات النباتية ،الفطريات الجلدية

Test the effectiveness of some plant extracts in the growth of Some Dermatophyte inside and outside vivo

Farah L. Wahab Zahraa R. Taha Teeba H. Mohammad

College of Science- University of Baghdad

Abstract: This study aimed to use alcoholic extract of leaf plant rosemary *Rosmarinus officinalis*, Henna *Lawsonia Inermis* , and the fruits of *Capsicum annuum* chili four concentrations (100,50,25,12.5) mg \ ml, and test the effectiveness of a number of types of skin fungi dermatophyte isolated from patients suffering from injuries these types namely *Trichophyton rubrum* and *Microsporum canis* and after diagnosed using a taxonomic key. This has been the treatment of this fungal isolates with plant extracts using Petri dishes .The results showed that all plant extracts had an impact inhibitory on the skin fungus, as shown alcoholic extract of plant henna the highest percentage inhibition of the fungus *T.rubrum* where recorded (98,94,88,60)%, while the fruits of hot pepper extract record percentage inhibition (89,77,62,22)% plant extract and rosemary scored inhibition rate (91,72, 60,35%) of the concentrations (100,50,25,12.5) mg / ml, respectively. Henna plant extract also scored for the inhibition of the genus *M.canis* (100,92,83,72)%, chili plant extracts (90,69,42,15)% and rosemary (88,71,58,20)% for concentrations previous respectively.Has also been testing the effectiveness of extracts on patients have shown henna followed chili and rosemary efficiency in the disappearance of clinical signs after 15 days of treatment.

Key word : plant extracts , Dermatophyte

المقدمة :

الفطريات الجلدية مجموعة من الفطريات لها القابلية على هضم المادة الكراتينية وتحليلها مسببة أمراضا جلدية للإنسان والحيوان تسمى Dermatophytosis [1]. تقسم هذه الفطريات على ثلاث أجناس رئيسة هي *Trichophyton, Microsporum, Epidermophyton* .تفضل هذه الأجناس النمو المناطق الحارة والرطبة لهذا نجدها أكثر شيوعا في البيئات الاستوائية وشبة الاستوائية[2]. يعتبر الفطر *Microsporum canis* من الفطريات التي تسبب أمراضا جلدية للقطط والكلاب وتنتقل إلى الإنسان عن طريق ملامسة الأجزاء المصابة مسببة له تسلخ في فروه الرأس أو تكون بشكل انتفاخ , أما الفطر *Trichophyton rubrum* فيسبب أمراضا جلدية في منطقة القدم تسمى سعفة القدم Tinea pedis ، منطقة الأطراف Tinea manuum ،الأظافر Tinea unguium ومنطقة الجذع Tinea corporis [3].تزداد هذه الفطريات وتزدهر في فصل الصيف بتوفر العوامل الملائمة لنموها من حرارة ورطوبة لهذا يزداد عدد الأشخاص الذين يستخدمون العلاجات الكيماوية وما لها من تأثيرات جانبية على جسم المريض إضافة إلى مقاومة الفطريات لهذه العقاقير. لذلك اتجهت العديد من الدراسات إلى استخدام النباتات في علاج الأمراض لما تحويه من مواد فعالة لها القدرة على تثبيط الأحياء المجهرية الممرضة للإنسان ومنها استخدام نبات الحناء الذي يعود للعائلة الحنائية Lythracea هو نبات شجيري دائم الخضرة كثير التفرع يصل طوله إلى 6 أمتار انتشرت زراعته في حوض البحر الأبيض المتوسط واستخدم في علاج الأمراض الجلدية وفروه الرأس وغيرها من الأمراض، أما نبات إكليل الجبل الذي يعود للعائلة الشفوية Labiatae فهو نبات عشبي صغير دائم الخضرة ذا أفرع متعددة له رائحة عطرية مميزة موطنها جنوب أوربا يستخدم كعلاج للالتهابات ، كذلك نبات الفلفل الحار يعود إلى العائلة الباذنجانية حيث يعتبر كمضاد للبكتريا ويستخدم في علاج الأمراض الجلدية ومنها القوباء لاحتوائه على مادة الكابسيسين وغيرها من المواد الفعالة [4] لذلك هدفت هذه الدراسة على تقييم فعالية المستخلصات الكحولية لنبات الحناء وإكليل الجبل والفلفل الحار كعلاج بديل عن الأدوية للإصابات الجلدية بفطري *T.rubrum* و *M.canis* .

المواد وطرق العمل

1- عزل وتشخيص الفطريات

- عزلت العينات من المرضى المحالين للعيادات الاستشارية في مدينة بغداد ،حيث أخذت منهم العينات بواسطة القشط من منطقة (القدم ،الأظافر، الجذع وفروه الرأس) أو بواسطة قص الجزء المصاب من الشعر والأظافر وبعد معاملاتها بمادة KOH بنسبة 10% لتحليل المادة الكراتينية الموجودة مع العينات المفحوصة ليتسنى رؤية الهايفات والسبورات والتي تسمى arthrospore [5]. نقلت إلى أطباق بتري معقمه تحتوي على وسط Sabouraud's Dextrose Agar (SDA) مع 50 ملغم من المضاد الحيوي Chloramphenicol لغرض تنمية الفطريات دون البكتريا والخمائر .
- تم نقل العينات المعزولة إلى مختبر الفطريات في كلية العلوم للبنات \جامعة بغداد ووضعت في الحاضنة بدرجة حرارة 27-30 °م لمدة أسبوعين فحصت بعدها المستعمرات وأجريت عليها بعض الاختبارات لغرض تأكيد التشخيص:

- **اختبار الشعرة:** يحضر بأخذ شعر بطول 1 سم ومعقم بجهاز الموصدة يضاف إلى محلول يحتوي على 10% من yeast extract، يلقح الفطر المراد تشخيصه ويوضع بالحاضنة بدرجة 25-30 °م ويفحص .

- **اختبار الرز:** تعقم كمية من الرز 10 غم لكل طبق بتري 9سم بجهاز الموصدة ويضاف له 10 مل ماء مقطر معقم ويلقح الفطر المراد تشخيصه، ويفحص بعد اسبوع [6].

جدول (1): الاختبارات العينية والمجهرية لتشخيص الفطر*M.canis* و*T.rubrum*

نوع الفطر	اختبار اختراق الشعرة	النمو في درجة حرارة 37°C	تشخيص الكونيديات الكبيرة	تشخيص الكونيديات الصغيرة	اختبار الرز	الصفات المميزة للمزرعة الفطرية
M.canis	+	-	مغزلية، سميكة ، خشنة الجدار ، مع نهاية منحنية أو معقوفة	غير موجودة بكثرة وان وجدت فشكلها هراوي	مستعمرة صفراء	مغزلية، حافاتها خشنة مع قمة مقوسة
T.rubrum	-	+	تتخذ شكل السيكار أو القلم	ذات شكل` هراوي إلى برميلي تنمو على طول خيوط المغزل	-	المستعمرة تعطي صبغة حمراء تلاحظ أسفل الطبق الكونيديات ذات شكل هراوي والهايفات شجرية الشكل

2- جمع النباتات وإعدادها لغرض الاستخلاص:

جمعت النباتات المستخدمة في البحث من حديقة المنزل في مدينة بغداد وتشمل اوراق الحناء واكليل الجبل وثمار الفلفل الحار وبعد تنظيف النماذج من الأتربة جففت طبيعيا بنشرها على أوراق مع الاستمرار بالتقليب لحين جفاف العينات ، وبعد جفاف العينات تم سحقها وتحويلها إلى باودر باستخدام هاون خزفي ثم حفظت في اكياس بلاستيكية نظيفة وسجل عليها اسم النبات وموعد الجمع لحين استخدامها في الاستخلاص الكحولي .

3- تحضير المستخلصات النباتية الكحولية :

اتبعت طريقة [7]في تحضير المستخلص الكحولي إذ تمت عملية الاستخلاص بسحق النبات مع المذيب(Methanol) بنسبة (5- 1 غم/مل) وزن/حجم رج المزيج بشكل جيد ولمدة 1-2ساعة باستخدام المحرك الكهرومغناطيسي (Magnatic Stirrer) ثم ترك بعد ذلك المزيج في الثلاجة لمدة (24) ساعة لغرض النقع , رشح بعدها خلال عدة طبقات من الشاش لتخلص من الجزيئات غير الذائبة وأجريت عملية تبخير المذيب باستخدام جهاز المبخر الدوار (Rotary Vacuum evaporator)عند درجة حرارة لا تزيد عن40 °م ، أستمرت عملية التبخير هذه لحين إزالة المذيب الموجود في المزيج بشكل كامل وبذلك تم الحصول على المستخلص النباتي الكحولي وهو على هيئة طبقة سميكة وأخيراً جفف هذا المستخلص بعملية التجفيد.

تم تحضير التركيز القياسي للمستخلص الكحولي للنباتات وذلك عن طريق وزن 1غم من المستخلص النباتي وإذابتها في 5 مل من مادة DMSO) Dimethyl Sufoxide) وبهذا يكون التركيز 100 ملغم /مل , وعقم بإمرار المحلول من خلال ورق ترشيح قياس (0.22) الذي يمنع مرور الجراثيم ،ثم حضرت التركيز التالية (50-25-12.5) ملغم /مل من التركيز القياسي .

4- اختبار الفعالية الحيوية للمستخلصات النباتية في المختبر :

أضيف المستخلص الكحولي للنباتات إلى وسط (SDA) Sabouraud's Dextrose Agar قبل التوزيع في الأطباق للحصول على التراكيز السابقة في الفقرة 3 ، وبعد تصلب الأطباق

نقلت أقراص بقطر 0.4 سم من العزلة الفطرية إلى الأطباق السابقة وبثلاث مكررات لكل تركيز [8] ، حضنت الأطباق في الحاضنة بدرجة حرارة 25 °م لحين ملء الفطر أطباق السيطرة التي لا تحوي المستخلصات النباتية ، بعد ذلك تم قياس أقطار المستعمرات في كل أطباق التجربة وسجلت النتائج وحسبت نسبة التثبيط باستخدام المعادلة التالية :

$$\text{نسبة التثبيط} = \frac{\text{معدل قطر الفطر في أطباق المقارنة}}{\text{معدل قطر الفطر في أطباق المقارنة - معدل قطر الفطر في أطباق المعاملة}} \times 100$$

5- التحليل الإحصائي :

استعمل البرنامج الإحصائي Statistical SAS- Analysis System [9] في تحليل البيانات لدراسة تأثير العوامل المختلفة (التركيز والمعاملة) في الصفات المدروسة، وقورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات باختبار اقل فرق معنوي (LSD).

6- اختبار فعالية المستخلصات النباتية داخل الجسم الحي :

تم اختبار فعالية المستخلص الكحولي لأوراق نبات الحناء ،إكليل الجبل وثمار الفلفل بتركيز 100ملغم/مل داخل الجسم الحي على مجموعتان من المتطوعين متقاربين بالعمر والوزن، أعمارهم تتراوح بين (30 – 40) مصابين بـ *T.rubrum* و *M.canis* بعد اخذ مسحات من المنطقة المصابة وتشخيصها مختبريا للتأكد من أن المسبب المرضي يعود لهذه الفطريات ، تضم المجموعة الأولى 8 مرضى مصابين بـ*T.rubrum* أجريت عليهم المعاملات التالية وبواقع ثلاث مرات باليوم:

*معاملة السيطرة : تضم مصابين لم يعاملوا بالمستخلصات النباتية

*المعاملة بمستخلص أوراق نبات الحناء عن طريق مسح المناطق المصابة بالمستخلص.

*المعاملة بمستخلص أوراق نبات إكليل الجبل .

*المعاملة بمستخلص ثمار الفلفل الحار.

أما المجموعة الثانية فتضم 8 مرضى مصابين بالفطر *M.canis* أجريت عليهم نفس المعاملات السابقة .

النتائج والمناقشة :

1- **اختبار الفعالية الحيوية للمستخلصات النباتية في المختبر :**

أظهرت النتائج معاملة الفطر *T.rubrum* بالمستخلصات النباتية ، تفوقاً معنوي لمستخلص نبات الحناء في تثبيط نمو الفطر بنسبة تثبيط (100 %) ، يليه مستخلص نبات إكليل الجبل اذ بلغت نسبة التثبيط (91%) ثم نبات الفلفل الحار الذي كانت نسبة التثبيط (89%) عند التركيز 100 ملغم/مل ،في حين كانت نسبة التثبيط عند التركيز 50 ملغم /مل (94 ، 82 ،77) % لمستخلصات الحناء ، إكليل الجبل والفلفل الحار ،وكانت نسبة التثبيط عند التركيز 25 ملغم/مل (88 ، 60 ،58) % والتركيز 12.5 ملغم /مل (60 ، 35 ، 22)% لمستخلصات الحناء ، إكليل الجبل والفلفل الحار. جدول (2)

كما أظهرت النتائج معاملة الفطر*M.canis* بالمستخلصات النباتية ، تفوقاً معنويا لنبات الحناء في تثبيط نمو الفطر اذ كانت نسبة التثبيط (100%) ، يليه مستخلص نبات إكليل الجبل اذ بلغت نسبة التثبيط (90%) ثم نبات الفلفل الحار الذي كانت نسبة التثبيط (78%) عند التركيز 100 ملغم/مل ،في حين كانت نسبة التثبيط عند التركيز 50 ملغم /مل (92 ،69 ،63) % لمستخلصات الحناء ، إكليل الجبل والفلفل الحار على التوالي ،وكانت نسبة التثبيط عند التركيز 25 ملغم/مل (83 ، 42 ،50) % والتركيز 12.5 ملغم /مل (72 ، 20 ، 15)% لمستخلصات الحناء ، اكليل الجبل والفلفل الحار على التوالي جدول (3) .

جدول (2): الفعالية التثبيطية للمستخلصات الحكولية للنباتات على الفطر *Trichophyton rubrum*

التركيز(ملغم\مل) / المعاملة	متوسط أقطار المستعمرات (سم)				قيمة LSD	النسبة المئوية للتثبيط (%)				قيمة LSD
	12.5	25	50	100		12.5	25	50	100	
نبات الحناء	3.6	1.08	0.54	0.00	1.025 *	60	88	94	100	8.925 *
نبات اكليل الجبل	5.85	3.6	1.62	0.81	2.077 *	35	60	82	91	11.753 *
نبات الفلفل الحار	7.02	3.9	2.07	0.99	2.825 *	22	56	77	89	8.703 *
قيمة LSD	2.066 *	1.173 *	0.935 *	0.863 *	قيمة LSD	9.351 *	9.844 *	7.562 *	8.215 *	---

*** (P<0.05). تمثل النتائج معدل 4 مكررات لكل معاملة**

جدول (3): الفعالية التثبيطية للمستخلصات الحكولية للنباتات على الفطر *Microsporum canis*

التركيز(ملغم\مل) / المعاملة	متوسط أقطار المستعمرات (سم)				قيمة LSD	النسبة المئوية للتثبيط (%)				قيمة LSD
	12.5	25	50	100		12.5	25	50	100	
نبات الحناء	2.52	1.53	0.72	0.00	0.923 *	72	83	92	100	9.315 *
نبات اكليل الجبل	7.2	5.22	2.79	0.9	2.176 *	20	42	69	90	14.674 *
نبات الفلفل الحار	7.65	4.5	3.33	1.98	2.094 *	15	50	63	78	11.207 *
قيمة LSD	2.036 *	1.883 *	1.055 *	0.961 *	قيمة LSD	8.644 *	9.369 *	8.941 *	8.246 *	---

*** (P<0.05). تمثل النتائج معدل 4 مكررات لكل معاملة**

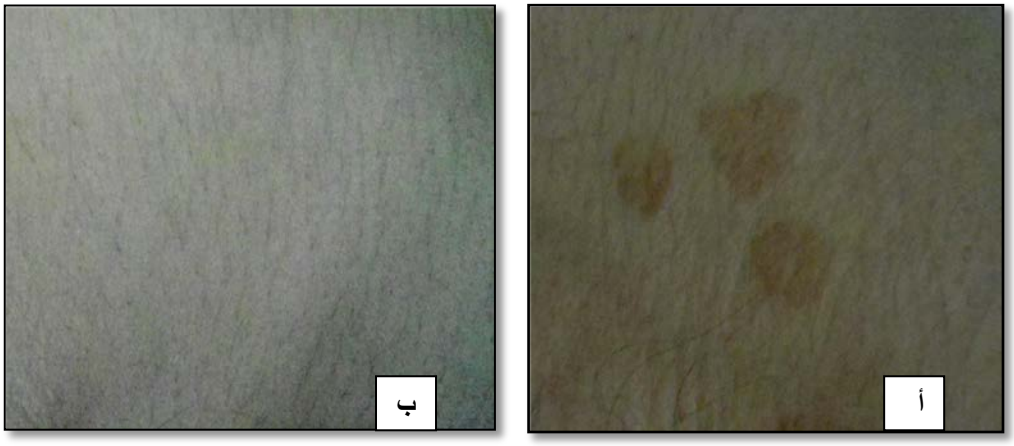
اختبار فعالية المستخلصات النباتية داخل الجسم الحي:

أظهرت نتائج مسح المناطق المصابة للمتطوعين المرضى المصابين بـ T.rubrum و M.canis بالمستخلص الكحولي لنبات الحناء بتركيز 100ملغم/ مل وقد لوحظ (تحذف) شفاء العلامات السريرية للمجموعة المعالجة بمستخلص الحناء بعد مرور 20 يوم وقد تم التأكد من الشفاء بأخذ مسحات جلدية وزرعها مختبرياً على وسط PSA(شكل 1)، بينما كانت نتائج مسح المناطق المصابة للمجموعة المعالجة بالمستخلص الكحولي لنبات إكليل الجبل والفلفل الحار شفاء جزئي للعلامات السريرية (شكل2 و3) إذ تم عزل الفطريات الجلدية من المجموعة المعالجة بعد مرور 20 يوم من بدء العلاج .

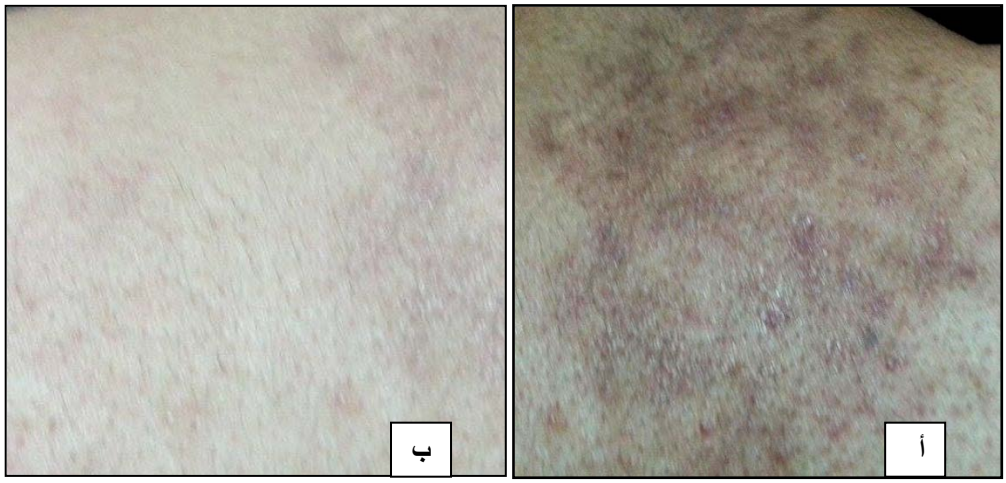
إن اختلاف نسب التثبيط باختلاف المستخلصات النباتية المستخدمة في الدراسة بثبوت التراكيز تعود إلى اختلاف المكونات الفعالة التي تثبط نمو الفطريات ، إذ إن تفوق نبات الحناء على تثبيط نمو الفطرين *T.rubrum* و *M.canis* يعود إلى احتوائه على الكلايكوسيدات والفلافونات والراتنجات والصابونين والدباغيات وصبغة اللوسن Lawson [10، 11] ، كما اشار Fuller وجماعته [12] الى ان الراتنجات والصابونيات الموجودة في النبات تعمل كمواد سامة للأحياء المجهرية . كما أشار Vonshak [13] أن الدباغيات الموجوده في النباتات الطبية تعمل على تثبيط الفطريات الجلدية Anti dermatophytic effect , وقد يعود السبب الى فعالية الدباغيات في تثبيط انزيمات الغشاء الخلوي للاحياء المجهرية [14]وقد فسر Stankiewicz وجماعته[15] كفاءة نبات الحناء في علاج الإصابات الجلدية الفطرية بارتباط الدباغيات الموجودة في النبات مع الكيراتين مما يقوي الجلد ويجعله أكثر مقاومة للتحلل بواسطة الانزيمات الفطرية . وتتفق هذه النتائج مع[13] الذي اثبت تأثير المستخلص الكحولي لنبات الحناء على الفطر الجلدي *Trichophyton mentagrophytes*.

كما تعود قدرة مستخلص نبات إكليل الجبل التثبيطي إلى احتوائه على العديد من المكونات الفعالة من كلايكوسيدات وقلويدات و فلافونات وتاتينات والراتنجات وصابونيات وفينولات [16] والتي لها فعالية تثبيطية لمجموعة كبيرة من الأحياء المجهرية [17] . كما تعمل الفلافونات على تثبيط الغزل الفطري وتبقيه في حالة سكون [19,18]، حيث وجدت فعالية بعض النباتات الطبية ومن ضمنها نبات اكليل الجبل على تثبيط نمو الفطريات الجلدية *T.rubrum* و *M.canis* .

أما نبات الفلفل الحار فقد أثبتت الدراسات على احتواءه على القلويدات واهمها Capsaicin، Dihydrocapsaicin و Capsorubin والتي لها تأثير تثبيط عالي على الفطريات الممرضة للنبات والإنسان [20 ،21]ما يحوي على الكلايكوسيدات ومواد صابونية وعفصية والتي لها دور في تثبيط نمو الفطريات [22] ،ويحوي غلى فلافونيات(4) وهذه النتائج تتفق مع ما توصل اليه Vaijayanthimala وجماعته 2004, الذين بينو قدرة بعض النباتات ومن ضمنها الفلفل الحار في تثبيط الفطريات الجلدية .



1



2

شكل(1) : استخدام مستخلص نبات الحنة في معالجة مريض يعاني من الإصابة بالفطر *T.rubrum* (1) و في معالجة مريض يعاني من الإصابة بالفطر *M.canis* (2)

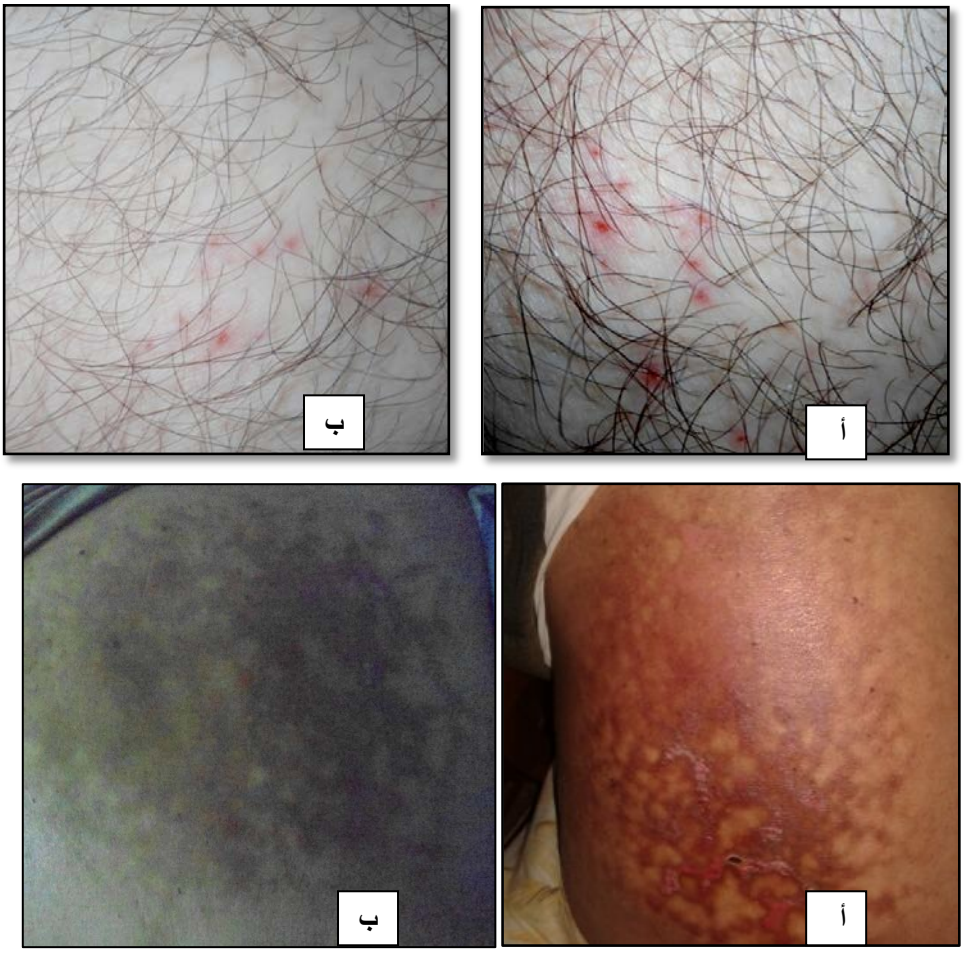
أ - قبل المعالجة ب- بعد المعالجة

1

2

شكل(2) : استخدام مستخلص نبات إكليل الجبل في معالجة مريض يعاني من الإصابة بالفطر *T.rubrum* (1) و في معالجة مريض يعاني من الإصابة بالفطر *M.canis* (2)

أ - قبل المعالجة ب- بعد المعالجة



شكل(3) : استخدام مستخلص نبات الفلفل الحار في معالجة مريض يعاني من الإصابة بالفطر *T.rubrum* (1) و في معالجة مريض يعاني من الإصابة بالفطر *M.canis* (2)

أ - قبل المعالجة ب- بعد المعالجة

المصادر:

1. Acha PN, Szyfres B (Pan American Health Organization [PAHO] ;2003. Zoonoses and communicable diseases common to man and animals. Scientific and Technical Publication.1(580):.332-9.
2. de Hoog, G.S., Guarro, J., Figueras, Gene & M.J. 2000. Atlas of Clinical Fungi,2nd ed.
3. Evans, E. G.V and Richardson, M.D. (1989) .Medical mycology ., IRL press at Oxford University.

4. شوفاليه، اندرو. (2001) . الطب البديل التداوي بالاعشاب والنباتات الطبية. أكاديميا انترناشينول. بيروت. لبنان.
5. Rebell, Gerbert, Taplin, David. 1974. Dermatophytes, Their Recognition and Identification. University of Miami , Coral Gables, Florida.
6. Gomezir, E. and Raymaekers, G. (2011). Evaluation of Dermatophytes Determination Methodes. Academiejaar ., REF: E.11. S. BLT.26 Schurmans Kris .
7. Grand, A.; Verpoort, R.; Wondergem, P.A. and Pousset, J.L. (1988): Anti-infections phytother apies of the tree-Savannah of seugal (west-Africa), 11-Antimicrobial activity of 33 species .Ethanopharmacol, 22-25-31.
8. التكريتي ، نجلاء طارق .2009 . تأثير المستخلصات الكحولية لبعض المواد النباتية على نمو الفطر *Alternaria alternate*. مجلة تكريت للعلوم الصرفة. 14(2).218-212 .
9. SAS.2012. Statistical Analysis System, User's Guide. Statistical. Version 9.1th ed. SAS.Inst.Inc.Cary. N.C. USA.
10. الحمداني ، عدنان حمد ، المحنة ، بلسم ميري مزهر .(2009) .دراسة تأثير مستخلص الحناء Lawsonia inermis في نمو الفطر الجلدي Trichophyton mentagrophytes في الزجاج (In vitro) وفي الجسم الحي (In vivo) .مجلة القادسية لعلوم الطب البيطري .8(1) .
11. Arafa, H.(2003). Prophetic medicine :An old prescription for a new era. U.S.A.
12. Fuller, H. J.; Carothers, Z.B.; Payne, W.W. and Balbach, M.K.(1972).The plant world.5th ed. U.S.A.
13. Vonshak,A.;Barazani,O.;Sathi yamoorthy, P.; Shalev, R.; Vardy, D.; Gola, N. and Golghirsh, A. (2003). Screening South Indian medical plants for antifungal activity against cutaneous pathogens. phytother .Res., 17(9) : 1123-1125
14. Greulach ,V.A. (1973) . Plant function and structure.The Macmillan Co. New York .
15. Stankiewicz, A.; Hutchins, J.; Thomson , R.; Briggs, D. and Evershed, R. (1997). ssessment of Bog-Body tissue preservation by pyrolsis–Gas chromatography / Mass spectrometry Rapid Communication in Mass spectrometry, Vol.2:1884-1890.
16. عبد، مجيد محمود. (2011). تأثير المستخلص الزيتي والمائي لنبات اكليل الجبل *Rosmarinus officinalis* كمادة حافظة في اللحوم المفرومة. المجلة الطبية البيطرية العراقية.35 (2).
17. Ellof JN. Which extract should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants? J. Ethnopharmacol.1998; 60:1-6.

18. Boone ,Laura G.; Rocío, A.-R.; Ricardo, S.-A.; Anabel, T.-C.; Verónica, M. R.-G.; Noemí ,W. de T.;Gloria, G. and Luis ,A. P.-L. .2015. Antimicrobial and antioxidant activities and chemical characterization of essential oils of Thymus vulgaris, Rosmarinus officinalis, and Origanum majorana from northeastern México . Pak. J. Pharm. Sci. Vol.28, No.1.

19. Delrio, J.A.,; Baidez, A.G.; Botia, J.M. & Ortuno, .(2003). Enhancement of phenolic compounds in olive plants (Olea europaea L.) and their influence on resistance against Phytophthora sp. Food Chemist., 83:75-78.

20. Tewart , S.N. and M. Nayak .(1991). Activity of four plant leaf extracts against three fungal pathogens of rice. Tropical Agriculture, 68(4): 373-375.

21. Hussien. F.T.K.(1985). Medicinal plants in Libya ArabEncyclopedia House.

22. Jiratko, J and G, Vesela .(1992).Effect of plant extracts on growth ofPlant pathogenic fungi in vitro. Ochrana Restlin, 28(4).

23. الجوهري ،احسان فليح .(2012). تاثيرالمستخلصات الاسيتونية لبعض النباتات على الفطريات المرافقة لبذور الشعير في مدينة مصراتة . مجلة جامعة ذي قار للبحوث الزراعية, 1(2) .

24. Vaijayanthimala ,J.; Rajendra Prasad,N. ; Anand, C. and Pugalendi ,K.V. .2004. Anti-dermatophytic activity of some Indian medicinal plants . JOURNAL OF NATURAL REMEDIES.4(1). 26 – 31.

Iraqi Journal of Biotechnology, 2015, Vol. 14, No. 2 , 366-380

استخدام تقنية تفاعل البلمرة التسلسلي المتعدد Multiplex PCR لتشخيص بعض انواع البكتريا السالبة لصبغة كرام وتحديد مقاومتها للمضادات الحياتية

احمد عبد الجبار سليمان[1] تمارا عدنان منديل[1] احمد محمد تركي[2]

[1] جامعة الانبار/ مركز دراسات الصحراء(dr_2178@yahoo.com)

[2]جامعة الانبار/كلية العلوم/ قسم علوم الحياة

الخلاصة: تم جمع 450 عينة من عينات سريريه مختلفة (أدرار، جروح، حروق ، خروج ، ومسحات الأنف والبلعوم) خلال الفترة من تشرين الثاني 2014 ولغاية شباط 2015 . شخصت 64 عينة منها على انها *Klebsiella pneumonia* و 56 عينة *Escherichia coli* باستخدام طرق التشخيص المظهري والزرعي والبايو كيميائي وللتأكيد شخصت باستخدام جهاز الفايتك Vaitek. أظهرت نتائج اختبار مقاومة العزلات لــ 10 من المضادات الحياتية من مختلف المجاميع تباينا في مقاومتها لهذه المضادات، واختيرت 10 عزلات من كل جنس على أساس التباين في مقاومة المضادات. صممت عدد من البوادئ للكشف عن البكتريا باستخدام جين متميز فيها وللكشف أيضا عن مقاومتها للمضادات باستخدام تقنية تفاعل البلمرةالتسلسلي المتعدد multiplex PCR، وأظهرت نتائج التضاعف بعد ترحيلها إن كل عزلات *E. coli* تحتوي على الجين *hly*A والذي يمكن ان يتخذ مؤشر تشخيصي وكل عزلات *K. pneumonia* تحتوي على الجين *Kca*A ، وفي نفس التفاعل تم الكشف عن وجود جينات مقاومة سبعة من المضادات الحياتية العائدة الى مجاميع مختلفة (*Amp, tetR, Tri, Gen, Imp, Qnl* and *mecA*) حيث احتوت كل عزلات *E. coli* على جين *Imp* and *Tri ,tetR, Amp, Gen,* في حين تباينت في احتواءها على *mecA* اما عزلات *K. pneumonia* فقد احتوت على جينات *Imp, tetR,* and *Tri* وتباينت في احتوائها *Qnl* and *Amp* حيث لم يظهرا في جميع العزلات في حين لم تحتوي على الجينين *mecA* and *Gen*. ومن خلال هذه الدراسة يمكن استثمار تقنية البلمرة التسلسلية المتعددة في تشخيص البكتريا من النماذج المرضية وبصورة دقيقة وتشخيص مقاومتها للمضادات الحياتية الشائعة الاستعمال بوقت قصير وجهد اقل ودون الرجوع للفحوصات الروتينية المعروفة.

الكلمات المفتاحية: multiplex PCR, antibiotic resistance, *E. coli* , *K. pneumonia*

Use of Multiplex PCR Technique to Detect Some Gram Negative Bacteria Species and Determine its Antibiotic Resistance

Ahmed A. Suleiman Tamara A. Mandeel Ahmed M. Turky

Anbar university

Abstract: 450 samples were collected from different pathological cases (urine, wounds, Burns, stool, and nasal and pharyngeal swabs) from November 2014 through February 2015. 64 samples were diagnosed as *K. pneumoniae* and 56 samples were *E. coli* using phenotypic, cultural and biochemical diagnosis features and definitely diagnosed with Vaitek test. Results of antibiotic resistance against different antibiotics showed variations in their resistance to these antibiotics, and 10 isolates were selected of each gender on the basis of variation in antibiotic resistance. A number of primers were designed to detect bacteria use distinct gene and also to detect resistance to antibiotics using multiplex PCR. Agarose gel electrophoresis for polymerization reaction showed that all *E. coli* isolates had *hly*A which might be used as detection marker where all *K. pneumoniae* had *Kca*A, in the same reaction of multiplex PCR ,detection of seven genes related with resistance to different antibiotic groups (*Amp, tetR, Tri, Gen, Imp, Qnl* and *mecA*) were done, all *E. coli* contained Imp, Gen, *tet*R,*Tri*, and *Imp* genes while its varied in their contain of *mec*A gene , while all *K. pneumoniae* had *tetR, Imp*, and *Tri* genes while its varied in their contain of *Qnl* and Amp which not detected in all isolates also its not contain *Gen* and *mec*A genes. From this study it's easy to use multiplex PCR to detect pathogenic bacteria along with their antibiotic resistance without need to long routine work.

Keywords: multiplex PCR, antibiotic resistance, *E. coli* , *K. pneumonia*

المقدمة :

يتم التمييز بين انواع البكتريا اعتمادا على صبغة كرام والتي تعد من اهم انواع الصبغات المستعملة في المستشفيات للتعرف على البكتريا اذ ان البكتريا السالبة لصبغة كرام تتلون باللون الاحمر عبر صبغة السفرانين الوردية من خلال تركيب الجدار الخلوي لها اذ يتكون من طبقة رفيعة من البيبتيدوكلايكان وتكون للداخل والطبقة الخارجية تتكون من Lipopolysaccharide وبروتين وهي لاتحتوي اساسا على حامض الريبونيوكليك وبالتالي لاتحتفظ بالصبغة الاساسية عند الغسل لكن عند صبغها بالسفرانين فأنها تثبت معها . ويشكل الغشاء الخارجي لهذه البكتريا حاجزا نضوحيا امام المضادات الحيوية ذات الوزن الجزيئي الكبير والتي ان مرت فانها تمر ببطء مما يضفي المقاومة لهذه المضادات وتختلف نضوحية هذا الغشاء من نوع الى اخر بالنسبة لهذه البكتريا (1) وتتألف هذه البكتريا من عدد كبير من الانواع واهمها بكتريا العائلة المعوية وبكتريا الزوائف وغيرها، .تتألف العائلة المعوية من مجموعة كبيرة من البكتريا ذات الصفات المشتركة اهمها انها عصوية سالبة لصبغة كرام ويقدر عدد اجناسها بحوالي 40 جنسا (2) تكون أجناسها قصيرة ذات حافات

مدورة غير مكونة للسبورات يتراوح طولها بين (4-5) مايكرون وتكون هوائية او لاهوائية اختيارية درجة الحرارة المثلى لنموها 37م°متحركة بسبب احتواء بعض أجناسها على الاسواط المحيطية ماعدا جنسي *Klebsilla* و *Shigella*فهي غير متحركة، لبعضها القابلية على تخمير سكر اللاكتوز واختزال النترات الى نتريت لغرض انتاج الطاقة (3) . تعد سلالات هذه العائلة المسبب الرئيسي للعديد من الحالات المرضية كالتهاب الجروح والحروق وذات الرئة والمجاري البولية وغيرها من الامراض اضافة الى خمج المستشفيات (4) .تعتبربكتريا *E. coli* من البكتريا السالبة لصبغة كرام التي تنتمي الى العائلة المعوية (Enterobacteriaceae) وهي مشتقة من حقيقة كون أفراد هذه العائلة تعيش في القناة الهضمية للإنسان ومن الكلمة الإغريقية Enteronوتعني Intestine (5) . تعد بكتريا*E. Coli* جزءا من الفلورا الطبيعة في الامعاء الا ان هناك سلالات يمكن ان تسبب امراضا عديدة للإنسان اذ توجد في بيئات مختلفة من جسم الانسان ولها سلالات مرضية يمكن ان توجد في القناة الهضمية وخصوصا في الامعاء اما السلالات الممرضة لهذه البكتريا والتي تتواجد في بيئات خارج منطقة الامعاء فتسمى بمجموعة الاشريشيا القولونية الممرضة الخارج معوية (6) ، والتي يمكنها ان تحدث الخمج في مناطق اخرى غير المنطقة المعوية وقد تكون احد سلالاتها هي من الموجودة في المنطقة المعوية الا انها لاتحدث اي حالة مرضية في المنطقة المعوية (7) . سلالات بكتريا*E. Coli* الممرضة خارج معويةمازال الغموض يحيط بها فيما اذا كانت تمتلك عوامل ضراوة خاصة بمنطقة محددة من جسم الانسان ام انها تمتلك عوامل ضراوة تستطيع استعمار مناطق تشريحية مختلفة من جسم الانسان من خلال عوامل الضراوة هذه ومن ثم احداث المرض (8) .، ان عوامل الضراوة تكون مرتبطة بالجينات التي تكون موجودة في الانواع المسببة للإسهال وعلى اساس جينات عوامل الضراوة تم تقسيم سلالات هذه البكتريا الى ست سلالات رئيسية ممرضة (9) . وباستعمال الخواص الجزيئية وجد ان بكتريا *E. coli* تمتلك جينات ضراوة مختلفة تصل الى 18 جين مشخص وتعتبر المصدر الرئيسي لنقل المرض في بكتريا*E. col*التي توجد بشكل طبيعي في امعاء الانسان والحيوان وبالتالي مسببة المرض للانسان في كل اجزاء العالم من خلال انتقال عوامل الضراوة لها عن طريق هذه الجينات (10) . من اهم هذه الجينات والذي يعد تشخيصي لهذه البكتريا هو جين( ) A *hly* alphaheamolysin اذ يعد من جينات الضراوة والسمية وله القابلية على الربط مع الجينات الاخرى لهذه البكتريا (11) ، وله القدرة على انتاج التحلل في وسط الدم (12) . كما تعد بكتريا *Klebsiella* عموما بأنها عصيات سالبة لصبغة كرام غير متحركة محاطة بمحفظة (Capsule) ،وتعود للعائلة المعوية (Enterobactriaceae) ،،وتصنف انواع بكتريا *Klebsiella* المهمة طبيا الى اربع انواع مهمة جدا وهي *Klebsiella pneumoniae*،و *K. oxytoka*،و *K. Ornithinolytica*،و *K. Ozaenae*اما الانواع الاخرى فهي اقل اهمية من الناحية الطبية .تسبب البكتريا العائدة للجنس *Klebsiella*الأمراض المكتسبة من الرقود في المستشفى (Nosocomial infections) للإنسان،ويتميز النوع *Klebsiella pneumoni*a بانه الأكثر أهمية طبية اذ سجل أعلى نسب من الامراض المكتسبة من المستشفيات مثل التهاب المجاري البولية وذات الرئة،وانتان الدم، والتهاب الانسجة الرخوة (13) .تعد بكتريا*K. Pneumonia* من الممرضات واسعة الانتشار في الطبيعة اذ ترتبط بمدى واسع من الامراض التي تصيب الانسان والحيوانات اذ انها تعد من الممرضات الانتهازية بسبب امتلاكها المحفظة التي تقاوم عمليات البلعمة (14) .وتسبب هذه البكتريا تجرثم الدم وذات الرئة والتهاب المجاري البولية والتهاب الجروح والحروق (15) . تمتلك هذه

البكتريا العديد من جينات الضراوة مثل جينات *magA* , *FosA* , *SHV* , *rmpA* , *OKP* , *CTX*-Mوالسلالات التابعة لهذه البكتريا تكون ذات تغايرات فيما بينها على مستوى الجينوم (16) وقد استعمل جين *K2CPS* كهدف للكشف عن بكتريا *K.* *Pneumoniae*وتشخيصها في العديد من الدراسات اذ يوجد هذا الجين في النوع الثاني من الكلبسيلا والمسؤول عن بناء *K2CPS*هوجين *rmpA2* اذيمتلك هذا الجين منشطات استنساخ لجين *K2CPS*ويعد جين *rmpA*2المسؤول عن بناء *K2CPS* من بلازميد الضراوة للكلبسيلا(17)

المواد وطرائق العمل

جمع العينات وتشخيص العينات:-تم جمع (450) عينة من حالات مرضية مختلفة شملت (الادرار ، الحروق ، الجروح ، الخروج ، القشع ، التهابات الانف والاذن ،التهاب اللوزتين) من مستشفى الرمادي التعليمي العام وللفترة من تشرين الثاني 2014 ولغاية شهر شباط 2015. وأجريت الفحوصات المجهرية والكيموحيوية اعتماد على المصادر العلمية المتبعة عالميا لتشخيص البكتريا (18 ; 19) اضافة الى استخدام نظام API20Eواخير تم استخدام التشخيص الكيموحيوي باستخدام جهاز Vitek 2 system. ومن ثم اختبرت مقاومة العزلات للمضادات الحياتية بطريقة الأقراص وحسب ما مذكور (20) للتعرف على مدى حساسية العزلات البكتيرية قيد الدراسة للمضـادات الحياتيـة باستخدام مجموعة من أقراص المضادات الحياتية المجهزة من قبل شركةoxoid البريطانيةالجدول (1).

جدول (1) أقراص مضادات الحيوية المستخدمة في اختبار الحساسية

N	Antibiotic	الرمز	التركيز مايكروغرام/ قرص
1	Tobramycin	TOB	10
2	Chloramphenicol	C	30
3	Gentamicim	Gen	15
4	Cefotaxime	CTX	30
5	Pencillin	P	10
6	Ampicillin	AmP	10
7	tetracycline	TE	30
8	Imipenem	IPM	10
9	Naldix acid	NA	30
10	Vancomycin	VAC	30
11	Cefepime	FEP	30
12	Trimethoprim/ Sulfamethoxazole	COT	25

استخلاص وتنقية الدنا الجينومي:-

استخلصت عينات دنا الجينومي للعزلات البكتيرية البالغ عددها 20عزلة بكتيرية باستخدام عدة استخلاص الدنا الجينومي للبكتريا المنتج من شركةGeneaid ذي الرقم التسلسلي GBB101

البادئات المستخدمة:-

يبين الجدول (2) البادئات النوعية والتي تم تصميمها بشكل خاص لهذه الدراسة والتي تستهدف جينات الهدف والتي تم الحصول على تسلسل قواعدها النيتروجينية من موقع NCBI ncbi.nlm.nih.gov (*AMP*, *mecA*, impenem gentamycin, *qnl*, *hly*A,*Kca*A,trimethoprim, *tetR*, وفقاً لما ذكر (21) والتي جُهزت بشكل مسحوق مجفد (Lyophilized) من شركة (BIONEER)، وقد تمت إعادة تذويبها بحجم من الماء المقطر والمعقم بحسب توصيات الشركة للحصول على محلول خزين لكل بادئ بتركيز (Pmol/µl100) ثم حفظ هذا المحلول الخزين بدرجة حرارة -20 مْ .

جدول (2) البادئات المستخدمة في تفاعل البلمرة المتسلسل

اسم البادىء	تسلسل القواعد 3→5	حجم الجين المستهدف bp
hlyA-F	TTATTGCGCTTCGGGCATTG	362
hlyA-R	CCATAAAACGCGCCAGGATG	
KcaA-F	TGTGCAGCTATACCCGGTTG	564
KcaA-R	CGGTCAGCCGAACGATATGA	
MecA-F	CCAGGAATGCAGAAAGACCAAAGCA	656
MecA-R	GGGTGGATAGCAGTACCTGAGCCA	
Gen-F	ATCCCGCAACAGCCCGGGACTTA	600
Gen-R	AACCTGAAGGCTCGCAAGAGCG	
Amp-F	TTCCCACGCTACTGGTGTGGCT	458
Amp-R	GGCCGGTAACGCTTTCTCACCA	
Qnl-F	CGCAGCGACTTTCGACGTGCTA	374
Qnl-R	AGTGATGCACCCGCTAGGTTCGT	
Imp-F	CTGGTGCTGCAATGGCGGATGA	280
Imp-R	GTGCTTGCACCCCATGGACGAA	
TetR-F	GCTTTGCTCGACGCCTTAGCCAT	267
TetR-R	CCCCACAGCGCTGAGTGCATATAA	
Tri-F	TGGAGTTATCGGGAATGGCCCTG	104
Tri-R	TCTTGCGTCCAACCAACAGCCA	

hlyA : alpha heamolysinEscherchia Coli.; ; kcaA :Klebsiell pneumonia capsuler gene colonic acid capsular biosynthesis activation proteinA. ; mecA:methicillin ; Gen: gentamycin ;Amp : ampicillin ; Qnl: qunolate ; imp: imipenem ; tetR: tetracycline ; tri : trimethoprim

خليط تفاعل Multiplex PCR :-PreMix أستخدم هذا الخليط المجهز من قبل شركة (Bioneer) المتكون من المحلول المنظم لعمل انزيم البلمرةPCR buffer والنيوكليدات منقوصة الاوكسجين dNTPs وانزيم بلمرة الدنا pfu DNA polymerase و Pyrophosphatase and pyrophosphate وصبغة Stapilizer and trcking dye. كما استعمل الدليل الحجمي 100 DNA Ladder لمعرفة احجام القطع الناتجة بعد التضاعف كما استعمل الدليل 1Kb لمعرفة سلامة الدنا المستخلص من العزلات البكتيرية

التحري عن الجينات البكتيرية باستعمال تفاعل البلمرة المتسلسل Multiplex PCR:

حضر مزيج التفاعل الرئيسي غير الحاوي على الـDNA المستخلص من عينات العزلات البكتيرية لعمل تفاعل Multiplex PCR لكل من بكتريا (*E. coli , K. pneumonia*) كل بكتريا على حدة وتم تحضير مزيج تفاعل لعشر عينات DNA من هذه الانواع البكتيرية بالإضافة الى ذلك تم اضافة عينة سيطرة سالبة لكل نوع بكتيري مع البادئات التي من المفترض ان تعطي نتيجة سالبة لهذه الانواع البكتيرية ليصبح عدد العينات الكلية لكل مزيج تفاعل 11 عينة ومن ثم وزع محلول التفاعل الرئيسي على انابيب سعة 0.2 ملليلتر وبحجم 23 مايكروليتر لكل انبوبة بعدها اضيف الى كل انبوبة 2 مايكروليتر من الـ DNA الخاص لكل عينة ليصبح الحجم النهائي لكل عينة 25 مايكروليتر باستثناء السيطرة السالبة كما موضح جدول (3) بعدها أدخلت في جهاز المبلمر الحراري تحت ظروف 95م° للانفصال الاولي لمدة 3 دقائق ومن ثم 35 دورة تبدأ ب 95م° لمدة 30 ثانية و59م° لارتباط البرايمرات لمدة 1 دقيقة ووقت تضاعف 1 دقيقة على درجة 72م° ومن ثم وقت تضاعف نهائي بعد ال 35 دورة على درجة 72م° لمدة 7 دقائق ثم حمل المزيج في حفر هلام الأكاروز المحضر بتركيز 1.5% للكشف عن وجود الجينات .

جدول (3) مكونات تفاعل البلمرة المتسلسل

المكونات	الحجم لعينة واحدة (µl)	التركيز النهائي
الماء المقطر	2	ــــــــــــ
Green pre mix	5	1x
Primer forward	8	1Pmol/µl
Primer reverse	8	1Pmol/µl
DNA template	2	ــــــــــــ
الحجم النهائي	25	ــــــــــــ

النتائج والمناقشة

بعد اجراء الفحوصات الكيموحيوية للعزلات البكتيرية المعزولة من مستشفى الرمادي التعليمي تم تشخيص 120 نوع من البكتريا السالبة لصبغة كرام والتي شملت بكتريا *E. coli* و *Kl. Pneumoniae* وذلك اعتمادا على الصفات المزرعية والمجهرية والكيموحيوية وباستخدام ApiE20, Api staph, Api strep وكذلك استخدام جهاز

الـ Vitek2 . شخصت العزلات المرضية التي بلغت 56عزله لبكتريا *E. coli* اذ اظهر الفحص المجهري والتصبيغ بصبغة كرام بانها عصيات صغيرة سالبة لملون كرام. تم تشخيص 64 عزلة من بكتريا *K. pneumoniae*اعتمادا على الصفات المزرعية والمظهرية والكيموحيوية بالاعتماد على الصفات المظهرية للمستعمرات النامية على وسط الـMaCconkey agarإذ اعطت مستعمرات وردية براقة ذات قوام مخاطي وهذه الصفة مميزة لهذه البكتريا ،وعند الفحص المجهري ظهرت مستعمراتها على شكل عصيات قصيرة سالبه لصبغة كرام ،تتواجد بشكل منفرد او على هيئة ازواج او على شكل سلاسل قصيرة .

اجري اختبار مقاومة المضادات بطريقة الاقراص لتحديد مدى حساسية او مقاومة هذه العزلات البكتيرية تجاه 12 نوع من المضادات الحيوية ، اعتمادا على قطر منطقة التثبيط المحيطة بأقراص المضادات ومقارنتها بأقطار التثبيط القياسية الواردة في (NCCLS 2013) إذ يوضح الجدول (4) العدد الكلي للعزلات البكتيرية المختبرة وعدد العزلات الحساسة والمقاومة والمتوسطة المقاومة للمضادات الحيوية قيد الدراسة إذ اوضحت النتائج ان معظم العزلات البكتيرية كانت مقاومة لأغلب المضادات الحيوية وهذه النتيجة متوقعة بسبب الاستعمال المفرط والعشوائي للمضادات الحيوية فضلا عن تطور اليات المقاومة التي تمتلكها البكتريا ضد اغلب المضادات الحيوية المستخدمة في العلاج(22) وكان الهدف الرئيسي من اجراء هذا الاختبار هو الحصول على اعلى واقل عزلة لكل من العزلات البكتيرية المعزولة من حالات مرضية مختلفة والتي اعطت مقاومة او حساسية ضد اقراص المضادات الحيوية المستعملة في الدراسة.

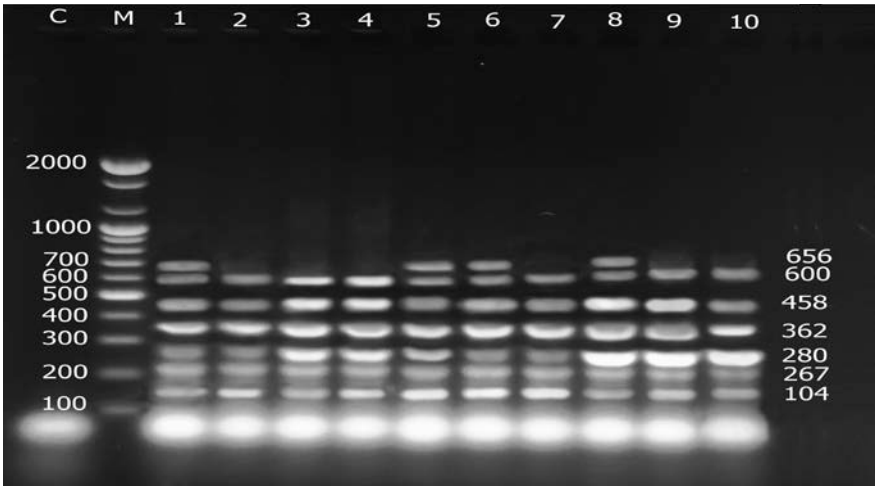
جدول رقم (4) تأثير المضادات الحيوي المختلفة تجاه الانواع البكتيرية الاربعة

اسم البكتريا		*E.coli*			*Kl.pneumonia*		
العدد		56			64		
ت	R	R	I	S	R	I	S
1	41	41	2	13	46	5	13
2	35	35	3	18	49	0	15
3	34	34	0	22	24	0	40
4	42	42	0	14	62	0	2
5	56	56	0	0	64	0	0
6	56	56	0	0	64	0	0
7	44	44	1	11	60	0	4
8	6	6	0	50	8	0	56
9	50	50	0	6	38	3	23
10	38	38	3	15	48	6	10
11	56	56	0	0	59	0	5
12	51	51	1	4	61	0	3

S: Sensitive I: Intermediate R: Resistance.

اظهرت النتائج المبينة في صورة (1) احتواء جميع العزلات المدروسة على الجين التشخيصي *hlyA*وكذلك احتواء جميع هذه العزلات على كل من جينات (*tetR , trim , gen , Amp , Imp*) في حين تباينت هذه العزلات في احتوائها على جين *mecA* فقد احتوت علية العزلات التي تحمل الارقام المحلية (1، 5، 6 ، 8) بينما خلت بقية العزلات من هذا الجين مما يعني احتمالية عدم وجود هذا الجين في بقية العزلات ، ومن خلال ذلك نجد ان جميع عزلات بكتريا *E. coli* اظهرت وجود حزم جين *hlyA* على هلام الأكاروز وبالتالي يمكن الاستدلال على ان هذه البكتريا المعزولة هي بكتريا تعود لهذا النوع وهو مطابق تماما لنتائج التشخيص الاولية لاختبارات التشخيص الكيموحيوي واستخدام نظام APi20E وجهاز الفايتيك وبذلك يمكن تشخيص هذه البكتريا مباشرة دون الحاجة الى اجراء هذه الاختبارات التشخيصية الروتينية التي تحتاج الى وقت طويل وهذا ما يعتمد عليه حاليا في كثير من البحوث التي يتم من خلالها الاستدلال على وجود بكتريا الـ *E. coli* في العينات المأخوذة من نماذج مرضية مختلفة. يبدو كذلك من خلال النتائج ان صفة وجود جينات مقاومة المضادات الحيوية هي صفة سائدة في اغلب سلالات بكتريا *E.coli* مما يعني ان هذه البكتريا تمتلك الجينات الحاملة للشفرة الوراثية الخاصة بإنتاج صفة المقاومة للمضادات الحيوية وهذا ما نجده في مضاد Imipenem الذي كانت نسبة عالية من هذه البكتريا حساسة له بطريقة الاقراص الا ان الجين الخاص بهذا المضاد ظهر في جميع العزلات البكتيرية التي اجري علية اختبار Multiplex PCR مما يدل على وجود هذا الجين داخل هذه البكتريا ويشير ذلك ان الجين موجود ولكن متوقف عن العمل ومن المحتمل تحفيزه وتصبح البكتريا مقاومة في حين ان جين Amp ظهر في جميع العزلات البكتيرية ونتائجه جاءت متطابقة مع نتائج اختبار الحساسية لمقاومة المضادات الحيوية إذ كانت جميع العزلات مقاومة لهذا المضاد وبنسبة مقاومة 100% مما يعني وجود هذا الجين وظهور فعاليته في المقاومة وكذلك الحال بالنسبة لجينات مضادات *gent , tetR ,trim*إذ احتوت جميع العزلات على هذه الجينات بالرغم من تباين نتائجها في اختبار حساسيتها للمضادات الحيوية . وقد عزى (23) سبب التباين في مقاومة بكتريا *E. coli* للمضادات الحيوية الى انها تحتوي على اكثر من نوع واحد من البلازميدات وممكن ان تكون هذه البلازميدات صغيرة او كبيرة . بيمنا اوضح (24) ان انزيمات البيتالاكتام هي المسؤولة عن صفة المقاومة للمضاد الحيوي Ampicilln وهي صفة بلازميدية ونادرا ما تكون كصفة كروموسومية في بكتريا *E. coli* وهذا يتوفق لحد ما مع ما وجدناه من مقاومة هذه البكتريا تجاه هذا المضاد الحيوي . وجاءت نتائج الدراسة متوافقة مع (25) الذي اظهرت نتائج التحليل الجيني له وجود جينات مقاومة مضادات Ampicillin و Trimethoprim في جميع سلالات بكتريا الـ *E. coli* باستخدام Multiplex PCR وكانت مقاومة 100% لهذين المضادين وعزى ذلك الى وجود هذه الجينات في سلالات هذه البكتريا التي اعطتها صفة المقاومة الرئيسية . من جانب اخر تطابقت نتائجنا بخصوص مضاد Trimethoprim مع دراسة (26) الذي اثبت وجود هذا الجين هو السائد في مقاومة هذا المضاد والمشفر له على البلازميدات التي تحوي مورث *tem* وهذا هو السبب الذي يعزى الى انتشار القابلية العالية لعزلات بكتريا *E. coli* الى مقاومة هذا المضاد الحيوي في المستشفيات اضافة الى وجود جينات اخرى تشفر لهذه المقاومة العالية . اما (27) فقد استعمل جين *hly*A في تشخيص هذه البكتريا اضافة الى تشخيصه وجود جين *trim*المسؤول عن مقاومة هذه البكتريا لمضاد trimethoprim باستخدام تفاعل Multiplex PCR لجميع العزلات المدروسة وهذا يتوافق مع نتائج الدراسة الحالية . وجاءت نتائج الدراسة الحالية متوافقة نوعما مع (28)الذي استعمل ثلاث جينات بتفاعل Multiplex

للكشف عن الجينات المقاومة لمضادات PCR erythromycin, tetracycline, chloramphenicol لبكتريا *E. coli* المعزولة من الامعاء في ايران وظهرت هذه الجينات الثلاث في جميع العزلات المتحصل عليها وعد هذه الطريقة سهلة وبسيطة للكشف عن مجموعة من الجينات في تفاعل واحد . اما عند استخدم هذه الطريقة للكشف عن ثمان جينات مقاومة للمضادات الحيوية من قبل (29) فقد تغايرت عزلات بكتريا *E. coli* في احتوائها على هذه الجينات وحسب مصدر العزل وهذا متوافق تماما مع النتائج الموضحة في صورة (1).



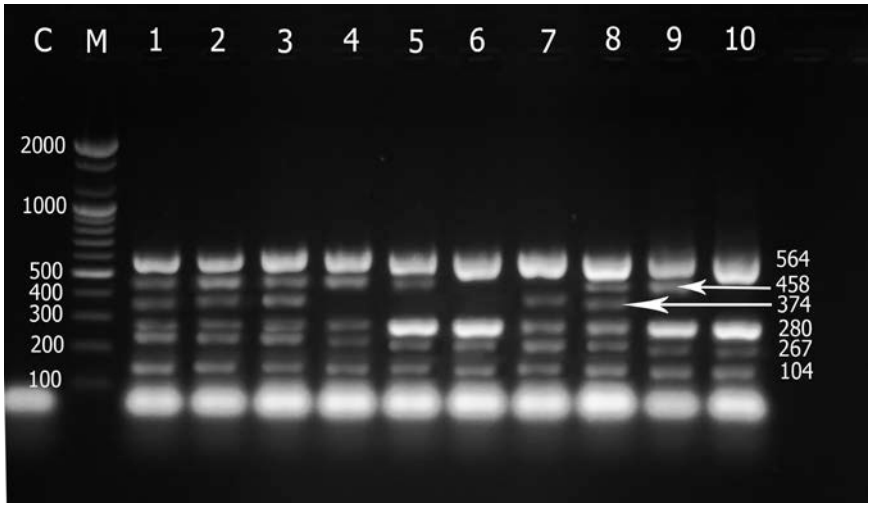
صورة (1) الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل البلمرة التسلسلي المتعدد Multiplex PCR لسلسلة الـDNA باستعمال البوادئ *Imp , Amp , gen , trim , tetR , mecA , hlyA* على هلام الأكاروز بتركيز 1.5%, M الدليل الحجمي ,C:100bp معاملة السيطرة السالبة ، 1-10:ارقام العزلات لبكتريا *E. coli*.

لغرض اثبات امكانية استعمال ثمان جينات في تفاعل Multiplex PCR واحد بدلا من اجراء التفاعل لمرات متعددة فقد استعملت هذه البوادئ الثمان (*gen , Amp , Imp,kcaA, mecA , Qnl , tetR , tri*) في مزيج التفاعل بمرة واحدة واظهرت النتائج الموجبة لوجود حزم الـ DNA بعد الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز وفحصها بالأشعة فوق البنفسجيةوجود هذه الحزم ولكن بنسب متفاوتة فيما بين هذه العزلات البكتيرية العشرة صورة (2) فقد احتوت جميع العزلات على جين *kcaA* اضافة الى احتواء جميع العزلات على جينات مقاومة مضادات (*Imp , tet*R, *tri*) في حين تباينت العزلات في احتوائها على جيني (*Amp , Qnl*) اذ احتوت العزلات ذات الارقام (1 ، 2 ، 3 ، 7 ، 8) على جين Qnl بينما لم تحتوي باقي العزلات على هذا الجين ، اما جين *Amp* فقد خلت منه العزلات ذات الارقام (6 ، 7 ، 10) واحتوت علية باقي العزلات اما جيني (*gen , mec*A) فقد خلت جميع العزلات من هذين الجينين ولم تظهر لهما اي حزمة خلال عملية الترحيل الكهربائي .

من خلال النتائج المتحصل عليها تم التأكد من وجود عدد من الجينات بشكل كلي في بكتريا *K. pneumonia* وفي عدد اخر منها ظهر احتمالية عدم وجود قسم من الجينات بشكل كامل

في حين تفاوت القسم الاخر من هذه الجينات في وجوده بهذه البكتريا وهذا الاختلاف في التواجد لهذه الجينات طبيعي لكون ان تركيب الجين يختلف من بكتريا الى اخرى بحسب اختلاف انواعها ,واماكن عزلها لوجود تغايرات في تركيب هذه البكتريا بل وحتى البكتريا من نفس النوع وقد تصل نسبة التغاير الى 99% في تسلسل الاحماض النووية وبالمقابل فان هذه الشفرات الوراثية وتسلسل القواعد النيتروجينية ستختلف من بكتريا لأخرى وبالتالي فان البادئ المستعمل قد

صورة (2) الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل البلمرة التسلسلي المتعددMultiplex PCR لسلسلة الـDNA باستعمال البوادئ*tri* , *tetR* , *Qnl* , *mecA* ,*Imp kcaA* , *Amp* , *gen* على هلام الأكاروز بتركيز 1.5%، M: الدليل الحجمي C,100bp: معاملة السيطرة السالبة ، 1-10:ارقام العزلات لبكتريا *K. pneumoniae*،.



يكون غير مناسب للجين وينتج عن ذلك عدم ظهور حزم الـ DNA لهذا الجين . فقد استدل (30) على وجود جين *kca*A كجين تشخيصي لبكتريا *Kl. pneumonia* المعزولة من حالات مرضية مختلفة اضافة الى احتواء عزلات هذه البكتريا على جينات مقاومة مضادات *Imp* , *amoxillin* , *Clauvalnic acid* عند استخدام تفاعل Multiplex PCR وتطابقت نتائج الدراسة الحالية لبعض الجينات مع (31)الذي وجد جينات مقاومة مضادات *gentamycin* , *amoxillin,* *tetracycline, ciprophlaxine* في العزلات البكتيرية التي تم اختيارها مناصفة على قسم مقاوم والاخر حساس لهذه المضادات بطريقة الاقراص ولكن عند استخدام تفاعل Multiplex PCR فقد ظهرت حزم جينات مقاومة هذه المضادات في جميع العزلات المدروسة الحساسة منها والمقاومة . ومع ذلك فان استعمال المضادات الحيوية في هذه النظم قد حدد للكائنات الحية المقاومة للمضادات الحيوية وتوصف بكتريا *Kl. pneumonia* بانها متعددة المقاومة للمضادات الحيوية اذ يتم نقل محددات المقاومة من نظم اخرى لها وتصبح بذلك خطرة على الصحة العامة (13) وقد استدل هذا الباحث ان هذه البكتريا لها القدرة على مقاومة العديد من المضادات منها *tetracycline* , *Qunolat* , *Penicillin* , *Ampicillin* , *Naldix acid* الا انه اثبت ان

مقاومة هذه البكتريا للكوينولات تنشأ من خلال طفرات في DNA gyrase او من خلال Topoisomerase IV gene . وعند استخدام تفاعل Multiplex PCR من قبل (16) للكشف عن وجود اربع جينات هي (TEM , SHV , CTX –M , OXA) وجدت جين SHV بنسبة 45.5 % وجين TEM بنسبة 44% . بينما (32) فقد شخص جين *Imp* في حالات متعددة من بكتريا *KL. Pneumonia* في مدينة سيدني وقد وجد ان صفة هذا الجين محمولة على البلازميد . في حين شخص (33) وجود جيني TEM , SHV في هذه البكتريا عند استخدام Multiplex PCR وظهور حزم الـ DNA في جميع العزلات المدروسة ، على العكس من ذلك فقد شخص (34) جين CTX-M من اصل ثلاثة جينات تم استخدامها في تفاعل Multiplex PCR هي (CTX-M , TEM , SHV) وهي جينات تشفر لمقاومة مضادات البيتالاكتام في بكتريا *KL. Pneumonia* .

اكدت النتائج المشخصة باستعمال طريقة الانتشار حول الاقراص على الطبق تطابقا نسبيا مع التشخيص باستخدام Multiplex PCR في تشخيص الجينات المقاومة لهذه المضادات وقسم من النتائج اعطت نتيجة سالبة في تشخيص هذه الجينات على الرغم من انها كانت مقاومة للمضادات الحيوية بطريقة الاقراص وقد يعود السبب في ذلك الى ان الجين ليس هو المسؤول عن اظهار الصفة او ربما يكون جين اخر هو المسؤول عن اظهار هذه الصفة وهناك كثير من الدراسات تشير الى ذلك ، او ربما يكون هذا الجين محمول على Integron والذي يشكل صعوبة في تشخيصه فقد اكد عدد من الباحثين على وجود الجين المحمول على Integron (35، 36) او ربما حدثت طفرة في هذا الجين ادت الى تغير في تسلسل الاحماض النووية .

المصادر :

1. الخفاجي ، زهرة محمود (2008) . التقنية الحيوية الميكروبية توجهات جزيئية . معهد الهندسه الوراثيه والتقنيات الاحيائيه للدراسات العليا ، جامعة بغداد .
2. Khaton, R., Haider, M. G.; Paul, P. K., Das, P. M. &Hossain, M. M. (2008). Colibacillosis in commercial chickens in Bangladesh. Bangl. Veterin. 25(1): 17-24.
3. حمادي ، علي حسون (2015) دور اجهاد المضادات الحياتية في امراضية الممرضة البولية الايشريكية القولونية المنتجة للبيتا لاكتاميز موسعة الطيف في الفئران المختبرية . اطروحةدكتوراه ، قسم علوم الحياة ، كليةالعلوم ، جامعةالانبار.
4. Lockhart, S. R.,Abramson, M. A., Beekmann, S. E., Riedal, G. S., Diekema, D. J., uinn, J. P. & Doern, G. V. (2007). Antimicrobial resistance among gram-negative bacilli causing infections in intensive care units in the United States between 1993 and 2004. J. Clin. Microbiol. 45(10): 3352-3359.
5. Hossein Esameili1 , Ali Khanjari and FatemehGholami . (2015). Detection and characterization of *Escherichia coli* O157:H7 from feral pigeon in Qom province, Iran. Journal of Tropical Disease: 5(2) 116- 118.
6. Korzeniewska, E., Korzeniewska, A.andHarnisz, M., (2013). Antibiotic resistant *Escherichia coli* in hospital and municipal sewage and their emission to the environment. Ecotoxicol. Environ Saf. (91). 96-102.

JP, Jimenez de Anta MT (2005) . Extended virulence genotypes and phylogenetic background of Escherichia coli isolates from patients with cystitis, pyelonephritis, or prostatitis. J. Infect Dis;191:46–50.

12. Mainil J.(2013). *Escherichia coli* virulence factors. Vet Immunol Immunopathol.152: 2-12.

13. Mohamed Nawaz , Khan. S.A, Tran Q., Sung K., Khan . A.A., AdamuI.b, Steele. R.S. (2012) . Isolation and characterization of multidrug-resistant *Klebsiella* spp. isolated from shrimp imported from Thailand . International Journal of Food Microbiology .155 : 179–184.

14. Kesteman, A.S.; Gugomard, A; Laurentie, M.; sanders, P.; Toutain, P. and melon , A. (2010). Emergence of Resistant *Klebsiella Pneumoniae* in the intestinal Tract during successful Treatment of *Klebsiella Pneumoniae* Lung infection in Rats. Antimicrob Agent chemother .; 54(7): 2960-2964.

15. Manu C. and Anurag P. (2014). Molecular characterization and in vitro susceptibilities of β-lactamase producing *Escherichia coli*, *Klebsiella* species, *Acinetobacter* baumannii, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* to CSE1034 and other β-lactams . Journal of Tropical Medicine . 7(1):S 217–S223 .

7. Nielsen, K.L., Dynesen, P., Larsen, P. and Frimodt-Moller, N.,(2014). Faecal*Escherichia coli* from patients with E. coli urinary tract infection (UTI) and healthy controls who have never had UTI. J. Med. Microbiol. (25) . 1083- 1099 .

8. Oteo, J., Cercenado, E., Cuevas, O., Bautista, V., Delgado-Iribarren, A., Orden , B., Pe´rez-Va´ zquez, M., Garcı´a-Cobos, S., Campos, J., (2010) .AmpC beta-lactamases in *Escherichia coli*: emergence of CMY-2-producing virulent phylogroup D isolates belonging mainly to STs 57, 115, 354, 393, and 420, and phylogroup B2 isolates belonging to the international clone O25b-ST131. Diagn .J. Microbiol. Infect. Dis. 67, 270–276.

9. Bii,C.; Taguchi,L.W.; Ouko, N. Muta and S. Kamiya. (2005). Detection of virulence – related genes by multiplex PCR in multidrug resistance diarrheagenic *E.coli*i solates from Kenya and Japan . J . Epidemol .Infect . 133:627-633.

10. 10 - Ferjani , S. , Saidani ,M. , Ennigrou ,S. , Hsairi ,M. , Ben Redjeb,S.(2012). Virulence determinants, phylogenetic groups and fluoroquinolone resistance in Escherichia coli isolated from cystitis and pyelonephritis . J. Pathologie Biologie 60 : 270–274.

11. Johnson JR, Kuskowski MA, Gajewski A, Soto S, Horcajada

16. Ahmed O.A. , El-Hady S. A., Ahmed T. M.,and. Ahmed I. Z (2013). Detection of bla SHV and bla CTX-M genes in ESBL producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from Egyptian patients with suspected nosocomial infections . Journal of Medical Human Genetics .14 : 277- 283.

17. Chuang Y., Fang C., Lai S., and Chang S., (2006). Genetic Determinants of Capsular Serotype K1 of *Klebsiella pneumoniae* Causing Primary Pyogenic Liver Abscess . Journal of Infectious Diseases ; 193:645–54 .

18. Baron ,E.J. and Finedgold , S.M. (1990) Diagnostic microbiology . 8th ed . Mosby –Year – Book . Inc. Missouri . USA.

19. Holt, J.G.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H.A.; Stalyt, J.T. and Williams, S.T. (1994). Bergey`s manual of determinative bacteriology. Williamsand Wilkins Publication. 9th ed. London, New York.

20. Vandepitte, J. ; Engback, K. ; Piot, P. and Heuck, C.C.(1991).Basic laboratory procedures in clinical bacteriology. WHO., Geneva. , PP: 78-110.

21. Arif S. K. and Salih I.F. (2010). Identification of Different Categories of Diarrheagenic Escherichia coli in Stool Samples by Using Multiplex PCR Technique . J. Medical Sciences. 2(5): 237-243.

22. Blahna M.T., Zalewski C.A., Reuer J., Kahlmeter G., Foxman B., and Marrs C.F (2006) . The role of horizontal gene transfer in the spread of trimethoprim–sulfamethoxazole resistance among uropathogenic Escherichia coli in Europe and Canada. J Antimicrob Chemother; 57:666–72.

23. Sasirekha, B. ; Manasa, R.; Ramya, P. and Sneha, R. (2010) . Frequency and antimicrobial sensitivity pattern of extended spectrum -Lactamases Producing *E. coli* And *Klebsiella pneumoniae* isolated in a tertiary care hospital . Al Ameen J. Med. Sci. , 3 (4): 265-271 .

24. Jacoby, G. A. and Han, p. (1996). Detection of Extended-Spectrum b-Lactamases in Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* . J. Clin. Micro. , 34 (4): 908-911 .

25. Kar D., Bandyopadhyay S., Bhattacharyya D., Samanta I., Mahanti A. , Nanda P.K., Mondal B., Dandapat P., Das A.K., Dutta T. K., Bandyopadhyay S. and Singh R.K. (2015). Molecular and phylogenetic characterization of multidrug resistant extended spectrum beta-lactamase producing Escherichia coli isolated from poultry and cattle in Odisha, India . journal Infection, Genetics and Evolution. 29:82–90 .

Klebsiella species, *Acinetobacter* baumannii, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* to CSE1034 and other β-lactams . Journal of Tropical Medicine . 7(1):S 217–S223 .

31. Ahmad S. and Abulhamd A.. (2015). Phenotypic and molecular characterization of nosocomial K. pneumoniae isolates by ribotyping . journal Advances in Medical Sciences., 60 : 69–75.

32. Ginna A. N., Zonga Z. , Wiklendt A. M., Thomas L. C., Merlino J., Gottlieb T., Half S., Harknessg J., Macleodh C., Bell S. M., Leroij M., Partridge S. R.,and Iredell J. R., (2013). Limited diversity in the gene pool allows prediction of third-generation cephalosporin and aminoglycoside resistance in Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae . International Journal of Antimicrobial Agents ; 42 : 19– 26 .

33. Daef E. A., Aly S. A, Seif El-Din S. A., El Sherbiny N.M. and El-Gendy S.M., (2009) . Phenotypic and Genotypic Detection of Extended Spectrum Beta Lactamase Klebsiella Pneumoniae Isolated from Intensive Care Units in Assiut University Hospital . *Egyptian Journal of Medical Microbiology*; 18 (2) : 29- 40.

26. Al-Hammadani, A.H. (2013). Detection of TEM and SHV genes *Escherichiacoli* and Klebseilla Species isolated from cancer patients in Al-Diwaniya Governrate. QMJ .,9 (16)

27. Mukherjee, M., Basu, S., Mukherjee, S.K., Majumder, M., (2013) . Multidrug resistance and extended spectrum beta-lactamase production in uropathogenic*E. coli* which were isolated from hospitalized patients in Kolkata, India. J. Clin. Diagn. Res. 7, 449–453.

28. Momtaz. H, E. Rahimi , S. Moshkelani (2012) . Molecular detection of antimicrobial resistance genes in *E. coli* isolated from slaughtered commercial chickens in Iran. J. *Veterinarni Medicina, 57, (4): 193–197* .

29. Aline S. Marques a, Edgar P. Moraes a, Miguel A. A. Júnior b, Andrew D. Moura b, Valter F. A. Neto b, Renato M. Neto b, Kássio M.G. Lima .(2015). Rapid discrimination of *Klebsiella pneumonia* carbapenemase 2 – producing and non-producing *Klebsiella pneumoniae* strains using near-infrared spectroscopy (NIRS) and multivariate analysis. Journal Talanta.,134 :126–131.

30. Chaudhary M. and Payasi A.(2014). Molecular characterization and in vitro susceptibilities of β-lactamase producing *Escherichia coli*,

34. Muzaheed A., Yohei D. , Adams-Haduch J.M., Shivannavar C.T., Paterson D.L., and Gaddad S.M., (2009) . Faecal carriage of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* in patients with acute gastroenteritis . Indian J Med Res . 129 : 599-602 .

35. Daoud, Z.; Hobeika, E.; choucair, A.; and Rohban, R. (2008). Isolation of the first metallo -*β*- Lactamases producing *Klebsiella pneumoniae* in Lebnanon. Rev ESP Quimioter, 21(2): 123-126.

36. Lincopan, N.; Mcculloh, J. A.; cassettari, V.C. and Mamizuka, E.M. (2005). First isolation of Metall -*β*- Lactamases- producing Multiresistant*Klebsiella pneumoniae* from a partient in Brazil. Jourual of clinical microbiology., 43(1): 516-519

Iraqi Journal of Biotechnology, 2015, Vol. 14, No. 2 , 381-387

الفاعلية الحقلية لبعض أنواع المبيدات في مكافحة حوريات حلم الغبار *Oligonychus afrasiaticus*

حسين فاضل الربيعي ، محمد زيدان خلف ، جواد بلبل الزيداوي و فلاح حنش نهر

مركز ابحاث المكافحة المتكاملة ، دائرة البحوث الزراعية ، وزارة العلوم والتكنولوجيا ، ص . ب 765 ، بغداد ،جمهورية العراق

mkhalaf34@yahoo.co.uk

الخلاصة: جرى تقييم الفاعلية الحقلية لتسعة انواع مختلفة من مبيدات الحشرات والحلم ذات طرائق فعل متباينة في مكافحة حلم الغبار *Oligonychus afrasiaticus* على ثمار التمر في بساتين النخيل وسط وجنوب العراق خلال الموسم 2014. اشارت النتائج بأن التراكيز الموصى بها للمبيدات المستخدمة اظهرت كفاءة عالية في خفض اعداد الحلم على الثمار. ازدادت بعد اسبوعين من المعاملة معدلات انخفاض الحوريات على الثمار ولكافة المبيدات المستعملة لتصبح تقريبا صفر او مقاربة لذلك في معظم المبيدات في حين حافظ معدل اعداد الحوريات في معاملة السيطرة على 81.4 حورية/ثمرة. تراوحت الفاعلية لمختلف المبيدات المستعملة مابين 83.3- 99.6% بعد يومين من المعاملة. وارتفعت معدلات الفاعلية لتتراوح مابين 91.2- 100% بعد 7 ايام من المعاملة. اما بعد مرور اسبوعين فقد حافظت فاعلية المبيدات على مستواها العالي. ان هذه النتائج تساعد في ايجاد بدائل للمبيدات القديمة وفي وضع برنامج لادارة الافة يقلص من فرصة تطوير المقاومة لهذه الافة.

الكلمات المفتاحية: فاعلية ، مبيدات آفات، حلم الغبار، نخيل التمر

Field Efficacy of Some Pesticides in Controlling Dust Mite Nymphs *Oligonychus afrasiaticus*

Hussain F. Alrubeai, Mohammed Z. Khalaf, Jawad B. Al-Zedawi and Falah H. Naher

Integrated Pest Control Research Center, Directorate of Agricultural Research, Ministry of Science & Technology, Baghdad, Iraq

Abstract: Field efficacy of nine different kinds of insecticides and mitecides with various mode of action was evaluated against dust mite nymphs *Oligonychus afrasiaticus* infested date fruits in middle and south of Iraq date palm orchards at season 2014. The results indicated that the recommended dose for each used pesticides showed high efficacy in reduction numbers of mite nymphs infested date fruits. After two weeks from treatments, the average numbers of nymphs were reduced for all kind of pesticides used, reaching zero in most treatment compared to 81.4 nymph/fruit in the control treatment. The efficacies ranged between 83.3% and 99.6% after two days of treatment and increased to become 91.2% to 100% after seven days. These results will assist in finding alternative to old pesticides and in implementing of pest management program to reduce resistance development chances.

Keywords: Efficacy, Pesticides, Dust mite, Date palm

المقدمة:

يعد حلم الغبار (McGregor) *Oligonychus afrasiaticus* احد (Prostigmata: Tetranychidae) الافات المهمة والرئيسية التي تصيب ثماراشجار النخيل وتسبب خسائر اقتصادية واسعة في البلدان المنتجة للتمور مثل العراق (11). تأتي خطورة الافة من تأثيرها في ثمار التمر وهي في مراحل نموها ونضجها حيث تقوم بأمتصاص عصارة الثمار مما يقود الى توقف نموها والاضرار بالمحصول حيث يصبح جلد الثمرة قاسيا ومن ثم يتشقق (2، 9) وتزداد هذه الخسائر في حال عدم اتخاذ الاجراءات اللازمة لمكافحة هذة الافة التي اساسا تعتمد على المبيدات الكيميائية التقليدية (4، 6). وقد تصل الاضرارالى مستويات عالية مما يؤدي الى تلف كميات من التمور تتراوح مابين 30 و70% (16) ويعد الطور اليرقي والاطوار الحورية المتحركة هي الاطوار الضارة (1). ان افراد هذا النوع من الحلم تتميز بافراز كميات كبيرة من الانسجة التي تغطي الثمار، مما يؤدي الى تجمع الاتربة على الثمار الذي يعيق بعض العمليات الفسلجية ويؤخر تلون الثمار واكتمال نضجها (1، 5). تعد المكافحة الكيميائية واحدة من الطرائق الفعالة لخفض الكثافة السكانية لهذه الافة تحت مستوى الحد الاقتصادي الحرج (7) .تبعا لذلك فان الهدف من هذا البحث هو قياس الفاعلية الحقلية لبعض انواع مبيدات الحشرات و الحلم ذات طرائق فعل مختلفة في مكافحة حوريات حلم الغبار *Oligonychus afrasiaticus*.

المواد وطرائق العمل

نفذت التجربة على اشجار النخيل المصابة بشدة بحلم الغبار *O. afrasiaticus* في احد البساتين الواقعة في منطقة الزعفرانية، محافظة بغداد خلال موسم 2014 اختيرت 21 نخلة منخفضة الارتفاع الا انها مثمرة ومصابة بالحلم وقسمت الى 9 معاملات اعتمادا على نوع المبيد بالاضافة الى معاملة السيطرة وعلمت الاشجار (المكررات) باشرطة مختلفة الالوان ، حيث ضمت كل معاملة ثلاثة مكررات . تم اختيار خمس عشر ثمرة من كل مكرر بصورة عشوائية وحساب عدد الحوريات المتواجدة على الثمره الواحدة تحت المجهر قبل الرش بيوم واحد، بأستعمال عداد يدوي يسجل الاعداد عند كل ضغطة بالابهام. تم تحضير المبيدات (جدول 1) وحسب الجرعة الموصى (بحسب الجدول لكل مبيد) بها واستعملت مرشة يدوية سعة 15 لتر في عملية الرش مع التأكيد على غسل المرشة جيدا بالماء بعد كل استعمال. اخذت العينات من كل مكرربعد الرش بنفس الطريقة المذكورة انفا وعلى فترات مختلفة هي : يومين و اسبوع واسبوعين من عملية الرش وتم حساب اعداد الحوريات الحية المتواجدة على الثمرة الواحدة في التوقيتات المذكورة. استخدمت معادلة Hendrson & Telton 1955 ، % فاعلية المبيد = 100[1- (عدد افراد الافة بعد المعاملة ×عدد افراد الافة في المقارنة قبل المعاملة /عدد أفراد الافة قبل المعاملة× عدد أفراد الافة في المقارنة بعد المعاملة) لاستخراج فعالية كل مبيد و حللت النتائج احصائيا باستخدام اقل فرق معنوي LSD وعلى مستوى 0.05 ، بأستخدم البرنامج الاحصائي GenStat في تنفيذ عملية تحليل النتائج.

جدول (1): أنواع المبيدات وطريقة فعلها المستعملة ضد حوريات حلم الغبار *Oligonychus afrasiaticus*.

المبيد وطبيعة المستحضر	المجموعة وطريقة الفعل وبحسب (12)IRAC, 2012	المادة الفعالة وصنف المبيد	الشركة المنتجة
Jalisco (WP)	10A, Mite growth inhibitors	Hexythiazox /Thiazolidine acaricide	Prolpan / Spain
Envidor (SC)	23, Inhibitors of acetyl COH carbaxylase	Spirdoriclfen / Tetronic acid drevitive	Bayer / Germany
Polo (SC)	12A, Inhibitors of mitochondrial ATP synthase	Diafenthiuron/ Thiourea acaricide drevitive	Syngenta / England
Levo (SL)	Un, unknown or uncertain MoA	Oxymatrine / Botanical insecticide	Sineria / Cypus
Zoro Super (EC)	6, chloride channel activators	Abamectin / Avermectin acaricide	Cheminova / Denemark
Nissorun (WP)	10A, Mite growth inhibitors	Hexythiazox / Thiazolidine acaricide	Nippon / Japan
Biotrine (ME)	6, chloride channel activators	Abamectin / Avermectin acaricide	Russell IPM / UK
Talstar (EC)	3A, Sodium channel modulators	Bifenthrin / Pyrethroid ester	FMC / USA
Cascade (DC)	15, Inhibitors of chitin biosynthesis, type 0	Flufenoxuron / Chitin synthesis inhibitor	BASF/ Germany

النتائج والمناقشة :

تبين نتائج الدراسة بأن التراكيز الموصى بها للمبيدات اعلاه اظهرت كفاءة عالية في خفض اعداد الحلم على التمر ، حيث تشير النتائج في جدول 2 الى انخفاض كبير في معدل أعداد الحوريات على الثمرة الواحدة بعد المعاملة بيومين، واستمر انخفاض اعداد افراد الحلم بعد اسبوع واسبوعين من المعاملة. حيث تراوحت اعداد الحوريات مابين 0.2 -16.20 حورية / ثمرة بعد يومين من المعاملة بالمبيدات مقارنة مع 83.33 حورية/ ثمرة في معاملة السيطرة. واستمر انخفاض معدلات الحوريات بعد 7 ايام من المعاملة واصبحت تتراوح مابين 5- 3 حورية / ثمرة مقارنة مع 80 حورية/ ثمرة في معاملة السيطرة، وازدادت بعد اسبوعين من المعاملة معدلات انخفاض الحوريات لكل ثمرة ولكافة المبيدات المستعملة لتصبح تقريبا صفر او مقاربة لذلك في معظم المبيدات في حين حافظ معدل اعداد الحوريات في معاملة السيطرة على 81.4 حورية/ثمرة ، وتشير نتائج التحليل الاحصائي الى وجود

فروق معنوية مابين كافة المبيدات المستخدمة من جهة ومعاملة السيطرة من جهة اخرى ولكافة الفترات فضلا عن وجود فروق معنوية مابين بعض المبيدات في اليوم الاول وانعدمت بعد ذلك.

كذلك يلاحظ من خلال نتائج التقييم الحقلي بان المبيدات المستعملة في الدراسة كانت فعالة في مكافحة الافة على طول فترة اخذ العينات من خلال حساب فعالية المبيد (جدول 3). حيث تراوحت الفاعلية لمختلف المبيدات المستعملة مابين 83.3- 99.6 بعد يومين من المعاملة. وارتفعت معدلات الفاعلية لتتراوح مابين 91.2-100 بعد 7 ايام من المعاملة. اما بعد مرور اسبوعين فقد حافظت فاعلية المبيدات على مستواها العالي. ومن المبيدات المستعملة هو مبيد Levo SL (مادته الفعالة Oxymatrine) وهو مبيد ذو اصل نباتي مستخلص من نبات *Sophora flavescens* (العائلة البقلية) الحاوي على العديد من انواع القلويدات منها الماترين Matrin والاوكزمترين Oxymatrine(15). وقد تم انتاج العديد من مستحضرات المبيدات بالاعتماد على هذه القلويدات او عبر خلطها مع المبيدات الكيميائية التقليدية لمكافحة العديد من الافات الحشرية والافات البكتيرية والفطرية والديدان الثعبانية التي تصيب محاصيل الخضر والفاكهة والازهار ونبات الشاي في الصين (13، 14، 15). وفي العراق تم تجربة أنواع تجارية مختلفة واثبتت فاعليتها الحقلية في مكافحة حشرة دوباس النخيل (3) وتفوق مبيد Envidor SC الذي تعود مادته الفعالة الى مجموعة كيميائية جديدة هي Tetronic acids كذلك المبيدات الحاوية مادة Abamectin. وفي هذا الخصوص اشار (1) الى تفوق مبيد الفيرتمك Vertimec (المادة الفعالة Abamectin) ومبيد البولو Polo (المستخدم في هذه الدراسة ايضا و مادته الفعالة Diafenthiuron) في تحقيقها اعلى نسبة قتل لحوريات حلم الغبار بعد شهر واحد من المكافحة. وفي دراسته لتقييم بعض المبيدات الكيميائية ، اشار (2) الى ان النتائج الحقلية اثبتت ان مبيد البارق Albark EC(% Triazophos 40% + Daltamethrin 2.5) سجل أعلى فاعلية من باقي المبيدات مثلEC Baythroid (Cyfluthrin %) والفالكون Falcon EC (Triazophos 40%).

من جهه اخرى اشارت نتائج (10) الى امكانية استخدام المستخلصات النباتية في مكافحة بالغات اناث حلم الغبار. واشار (7) الى فاعلية ثمانية مبيدات حلم في خفض مستوى الاصابة بحلم الغبار حتى بعد 27 يوميا من المعاملة.

ومن النتائج اعلاه يمكن الاستنتاج :

1. ان جميع المبيدات المختبرة كانت ذات فاعلية عالية حتى بعد يومين من المعاملة واستمرت هذه الفاعلية العالية طيلة مدة الاختبار.
2. هناك خيارات متعددة لمبيدات متخصصة ومن مجاميع كيميائية وطرائق فعل mode of action مختلفة.

جدول (2): تأثير المبيدات في أعداد حوريات حلم الغبار على النخيل *Oligonychus afrasiaticus* حقليا

المبيد	التركيز الموصى به مل / لتر	معدل عدد الحوريات / تمرة			
		قبل الرش (1 يوم)	بعد عملية الرش (يوم)		
			2	7	14
Jalisco	0.5	65	11.87	1	0.5
Envidor	0.3	82	1.93	0	0
Polo	0.5	52	18	3	2
Zoro Super	0.25	30.47	1.4	0	0
Nissorun	0.5	30.87	10	0	0
Biotrine	1.5	26.67	0.20	0	0
Talstrar	0.8	25.47	2.33	0	3
Cascade	0.07	32.53	.2011	2.5	1
Levo	0.25	71.80	3.67	2.07	1
Control	ماء فقط	40.13	83.33	80	81.4
$LSD_{0.05}$	———	16.77	9.33	6.3	6.8

جدول (3): فاعلية المبيدات المختبرة ضد حلم الغبار *Oligonychus afrasiaticus* حقليا

المبيد	التركيز الموصى به (مل/لتر)	النسبة المئوية لكفاءة المبيد بعد المعاملة (يوم)		
		2	7	14
Jalisco	0.5	91.2	99.2	99.4
Envidor	0.3	98.8	100	100
Polo	0.5	83.3	91.8	98.11
Zoro Super	0.25	97.7	100	100
Nissorun	0.5	4.84	100	100
Biotrine	1.5	99.6	100	100
Talstrar	0.8	95.5	100	91.8
Cascade	0.7	6.18	96.1	97.8
Levo	0.25	97.5	98.6	99.5
$LSD_{0.05}$	———	5.1	0.69	0.9

التوصيات

هناك امكانية لاستخدام اي من المبيدات المذكورة اعلاه في مكافحة حوريات حلم الغبار *Oligonychus afrasiaticus* وحسب التركيز الموصى به لكل مبيد على ان تتم عملية الرش من بداية ظهور الافة. حيث ان هذه المبيدات اعطت حماية جيدة للثمار المصابة طيلة فترة التجربة بالمقارنة مع معاملة السيطرة.

المصادر

1. الجبوري ، ابراهيم جدوع (1999) عنكبوت الغبار على النخيل. الهيئة العامة للارشاد والتعاون الزراعي– نشرة رقم (9) وزارة الزراعة– العراق.

2. الدوسري ، ناصر حميد (2010) تقييم كفاءة بعض المبيدات الكيمائية والمصائد اللاصقة الملونة في حماية ثمار نخيل التمر من الاصابة بحلم الغبار *Oligonychus afrasiaticus* وحشرة الحميرة *Batrachchedra amydraula*. مجلة البصرة للعلوم الزراعية، المجلد 23، العدد1: 162-184.

3. الربيعي، حسين فاضل؛ خلف ، محمد زيدان؛ السويدي، طه موسى ؛ حمود، جواد بلبل و نهر ، فلاح حنش. 2015. فاعلية بعض المبيدات ذات الاصل النباتي و المبيدات الكيميائية التقليدية في مكافحة حشرة دوباس النخيل *Ommatissus lybicus* (Homoptera: Tropiduchidae). مجلة كلية الزراعة، جامعة كربلاء (مقبول للنشر).

4. السويدي ، طه موسى محمد (2003) التجميع الحراري وبناء جداول القابيلية التكاثرية والحياتية لحلم الغبار على النخيل *Oligonychusafrasiaticus*. رسالة ماجستير، جامعة بغداد، كلية الزراعة، قسم وقاية النبات، ص 51.

5. عبدالحسين ، علي (1963) افات النخيل والتمور وطرق مكافحتها في العراق. جامعة بغداد. كلية الزراعة. العراق. ص 209.

6. Abo-El-Saad, M.M. and Sallam, A-K. 2015. Efficacy Assessment of Certain Highly Selective Acaricides Against Date Dust Mite *Oligonychus afrasiaticus* (McGregor): Laboratory and Field Experiments. http//www.dprckfu.org/home/en/page.aspx?id=18285465&type=9 .

7. Al-Doghairi , Mohammed A. (2004) Effect of eight acaricides against the date dust mite, Oligonychus afrasiaticus (Mcgregor) (Acari : Tetranychidea). Pakistan J. Bio. Sci. 7(7): 1168-1171.

8. Aldosari, S., Ali,A.G. 2007. Susceptiblility of date palm fruit cultivars to the natural infestation by *Oligonychus afrasiaticus* (Mcg.) (Acari : Tetranychidea) in relation to their chemical composition. Assiout University Bulletin Environment Research,10(2):1-7.

9. Ben chaaban, S., Chermiti, B. and Kreiter, S. 2011. Oligonychus afrasiaticus and phytoseiid predators' seasonal occurrence on date palm Phoenix dactylifera (Deglet Noor cultivar) in Tunisian oases. Bulletin of insectology, 64(1): 15-21.

10. El-sabah, B., Fetoh, A. and Al-shammary, K. A. 2011. Acaricidal ovicial and repellent activities of some plant extracts on the date palm dust mite, *Oligonychus afrasiaticus* Meg. (acari: tetranychidae). Int. J. of Environ. Sci. and Engin. 2:45-52.

11. Fetoh, B.E.S.A. and Al-Shammery, K.A. 2011. Acaricidal Ovicial and Repellent Activities of Some Plant Extracts on the Date Palm Dust Mite, Oligonychus afrasiaticus Meg. (Acari: Tetranychidae). Int. J. of Environ. Sci. and Engin. (IJESE), 2, 45-52.

12. IRAC MoA .2012. Insecticide Resistance Action Committee Classification Scheme. 23pp. <www.irac-online.org>.

13. Fu, Y., Wang C. and Ye F., 2005. The application of *Sophora flavescens* Ait. alkaloids in china. Pestic. Sci. Admin. 26: 30-33.

14. Lou W.-C., Mu L. Y. and Liy S. 1997. Toxic effects of alkaloids from Plants against insect pests. Pesticides, 36: 11-15.

15. Mao L. and Henderson G. 2007. Antifeedant Activity and Acute and Residual Toxicity of Alkaloids from *Sophora flavescens* (Leguminosae) Against *Formosan subterranean* Termites (Isoptera: Rhinotermitidae) . J. Econ. Entomol., 100 (3) 866-870.

16. Yousof,D.E. and Mahmoud M.E.E. 2013. Distribution of Date Palme Mite *Oligonychus afrasiaticus* (Mcgregor) (Acari : Tetranychidea) in Northern State in Sudan and its Impact on Productivity of Fruits of Date. Persian Gulf Crop Protection ,2(4):54-59.

17. Zheng, Y. Q., Yao J.R. and Shao X. D. 2000 . Review on the constituents and agricultural application of *Sophora flavescens*Ait. Pestic. Sci. Admin., 21: 24-26.

Iraqi Journal of Biotechnology, 2015, Vol. 14, No. 2 , 388-402

التأثير السمي الخلوي للمستخلص المائي الخام لنبات عين البزون *Vinca rosea* في خلايا سرطان عنق الرحم البشري(Hela) خارج الجسم الحي

هند حسين عبيد[1]* لقاء حسون صكبان[2] مصطفى نهاد جمعة الداجي[3] رافد محمد كريم[4]
ديمة نزار باصات[1] داليا أزهر أحمد[1]

[1]*قسم علوم الحياة - كلية العلوم - جامعة بغداد – بغداد – العراق
[2]قسم علوم الحياة- كلية التربية للعلوم الصرفة- جامعة كربلاء- كربلاء - العراق
[3]قسم علوم الحياة - كلية العلوم – جامعة الانبار – الأنبار - العراق
[4]مركزدراسات علوم البحار- جامعة البصرة – البصرة – العراق

الخلاصة: شملت الدراسة التحري عن التأثير السمّي الخلوي للمستخلص المائي الخام لنبات عين البزون (أوراق ، أزهار ، بذور) في خط خلايا سرطان عنق الرحم البشري (Human cervix uteri epitheloid carcinoma(Hela))، وذلك من خلال استعمال عشرة تراكيز (بإجراء تخافيف نصفية) تراوحت مابين (1000- 1.95) مكغم/مل ولفترات تعريض (24،48،72) ساعة.
أظهر الكشف التمهيدي الاستدلالي عن المركبات الكيميائية للأجزاء النبات الثلاثة بانها تحتوي على القلويدات والتربينات والفلافونويدات والكلايكوسيدات.

توصلت الدراسة إلى وجود تأثير سمي لمستخلصات عين البزون المائية في الخلايا السرطانية المدروسة (Hela) ولكنه لم يكن تأثيرا" كبيرا" ، فقد بلغت النسبة المئوية لمعدل تثبيط نمو الخلايا السرطانية Inhibitory Rate (IR) ، (46، 37، 40) % للأوراق والازهار والبذور على الترتيب بعد 72 ساعة من التعريض للمستخلصات عند التركيز 1000مكغم/مل ، في حين اعطت التراكيز الواطئة حسب هذه الدراسة معدل تحفيز نمو Proliferation Rate (PR) بلغ 115% لمستخلص الازهارعند التركيز 1.95مكغم / مل. لذلك وحسب هذه النتائج تعد خلايا سرطان عنق الرحم البشري (Hela) خلايا مقاومة لمستخلصات نبات عين البزون المائية وتمتلك فعالية الـ hormetic effect (Hormesis)، وذلك لانها تمتلك القدرة على تحفيز انقسام الخلايا باستخدام التراكيز الواطئ من المسخلص عند التعريض لمدة 72 ساعة.

الكلمات المفتاحية: Hela , *Vinca rosea*, cytotoxicity, Inhibitory Rate

Cytotoxicity Effect of *Vinca rosea* Aqueous Extracts on Human Cervix Uteri Epitheloid Carcinoma Cell Line (Hela) *In Vitro*

Mustafa N. J. Al-Darraji [3] Liqaa H. Saqban [2] Hind H.Obaid [1*]
Dimah N. Passat [1] Dalia A. Ahmed [1] Rafid M. karim [4]

[1*]Dep. of Biology, College of Science, Baghdad University, Baghdad, Iraq
[2]Dep. of Biology, College of education pure Science, Karbala University, Karbala, Iraq
[3]Dep. of Biology, College of Science, Al-Anbar University, Al-Anbar, Iraq
[4]Marine Science Centre, Basrah University, Al-Basrah, Iraq

Abstract: The present of studying included the cytotoxic effects of aqueous crude extracts of *Vinca rosea* leaves , flowers and seeds on Human cervix uteri epitheloid carcinoma cell line (Hela) *in vitro* , by using double dilution series (concentration between 1.95 – 1000 µg/ ml.

The results showed , the cytotoxic effect of extract dependent on amount of dose and exposure time. The concentration 1000 µg/ml gave higher growth inhibition (IR) , were (46, 37 and 40) % to leafs, rose and seeds respectively compared with control 100% after 72 hours from exposure time.

However low concentrations of aqueous extracts were found to induce the Hela cells growth and proliferation (PR), it was 115% by treatment with rose extract in 1.95 µg/ ml.

According to the results, the Hela cells were resistant to crud aqueous extract of *Vinca rosea*, and also have hormetic effect (Hormesis) , because they induced the proliferation of cancer cells by used low concentration of extract after 72 hours exposure time .

Key Words: Hela , *Vinca rosea*, cytotoxicity, Inhibitory Rate

***E- mail Hind _3000 @Yahoo.com**

المقدمة

برز مرض السرطان بوصفه أحد المسببات الرئيسة للوفيات في العالم ، إذ يعد من الأمراض الخطيرة التي تقضي على حياة الملايين من البشر سنوياً ، ويصيب مرض السرطان رجلاً واحداً من بين كل إثنين منهم خلال فترة حياتهم ، ويصيب امرأة واحدة من ثلاث منهن ، في حين يسبب وفاة امرأة واحدة من بين كل أربع منهن (1) ، لذلك بذل العلماء والباحثون جهوداً كبيرة من أجل تطوير أساليب وأنواع العلاجات ، محاولةً منهم للقضاء عليه وإنقاذ حياة الإنسان. ظلّ مرض السرطان عصياً على العلماء بالرغم من وجود عدة أساليب للعلاج ، فهناك العلاج الكيميائي والفيزيائي والجراحي ، لكن لم تكن هذه العلاجات مقنعة للأطباء ولا للمريض نفسه . لذلك اتجهت المراكز البحثية والباحثون إلى إيجاد علاجات بديلة أخرى للعلاجات الحالية ، و اتخذت منحى آخر ربما يكون فيه الأمل الكبير للقضاء على هذا المرض تكلف الأدوية التجارية مبالغ كبيرة في استيرادها فضلاً عن أن استعمالها المستمر في العلاج يفقدها فعاليتها تدريجياً بسبب مقاومة الخلايا السرطانية لها (2) ، لذا أولت الكثير من دول العالم اهتماماً كبيراً بنباتاتها باعتبارها المصدر الطبيعي للأدوية (3). إن إكتشاف الفعالية المضادة للسرطان

Anticancer لقلويدات نبات عين البزون أكسبه أهمية طبية كبيرة ، فهذه القلويدات تعد عوامل معالجة كيميائية Chemotherapy agents لمختلف أنـواع السرطانات البشرية (4,5, 6)، إذ اكتشف حوالي 75 نوعاً من القلويدات بعض منها ذو فعالية مضادة للسرطان أهمها الفنبلاستين والفنكرستين (7) ، فضلا" عن إستعمال هذا النبات في معالجة داء السكري(8,9) . كما أُجريت بحوث عديدة لإستعمال مستخلص النبات في معالجة الأمراض المايكروبية مثل الاسهال والأصابات الجلدية (11, 10) . تحتل مثبطات الانقسام الخيطي ومنها قلويدات الفينكا Vinca alkaloids المشتقة من نبات عين البزون *Vinca rosea* (= *Catharanthus roseus*) ، مكانة خاصة بين أصناف العلاج الكيمياوي المستعمله في علاج أنواع عديدة من أمراض السرطان (13 ,5,12) ومن هذا المنطلق ولغرض تعزيز دراسة تأثير مستخلصات النباتات الطبيعية الموجودة في البيئة العراقية ضد بعض خطوط الخلايا السرطانية كخطوة أولى لاستكشاف فعاليتها المضادة للسرطان ،حيث صممت هذه الدراسة لمعرفة تأثيرالمستخلصات الخام لنبات عين البزون *Vinca rosea* الموجودة في البيئة المحلية العراقية في تثبيط نمو خط خلايا سرطان الرحم البشري (Hela – cells).

المواد وطرائق العمل :

- **جمع النبات**

تم جمع نبات عين البزون *Vinca rosea* المزروع بوصفه نبات زينة في حدائق كلية التربية / جامعة كربلاء ، وقد صنف النبات من قبل المعشب الوطني العراقي /الهيأة العامة لفحص وتصديق البذور التابع لوزارة الزراعة. بعد جمع النبات و تنظيفه غُسِل بالماء جيداً ، وفصلت الأجزاء النباتية (الأوراق والأزهار والبذور) وتركت لتجف في الظل وبدرجة حرارة الغرفة ضمن محيط جاف جيد التهوية لمنع تلف النماذج ، وبعد جفاف هذه الأجزاء الثلاثة تم طحنها طحناً ناعماً بمطحنة كهربائية ، ثم حُفظت الأجزاء المطحونة في حاويات بلاستيكية نظيفة بعيداً عن الضوء والحرارة والرطوبة لحين الاستعمال.

- **تحضير المستخلصات المائية الخام لنبات عين البزون**

حُضر المستخلص المائي باردا حسب الطريقة المتّبعة من قبل هاربورن وجماعته (14) ، فقد أخذ 50 غم من المسحوق الجاف لكل جزء من النبات وأضيف اليه 250 من الماء وترك المزيج علي جهاز المحرك المغناطيسي magnetic stirrer بدرجة حرارة الغرفة ولمدة 3 أيام ،بعدها رشح المزيج بالشاش ثم بورق الترشيح (Whatman No.1) ، بعدها جفف الراشح للحصول على المسحوق الجاف والذي حضر منه التراكيز المطلوبة .

- **الكشف الكيميائي الاستدلالي عن المركبات الفعالة**

تم تحديد انواع مركبات الايض الثانوي الكيميائية الموجودة في المستخلصات النباتية المدروسة (القلويدات والتربينات والفلافونويدات والكلايكوسيدات)، إعتمادا" على ماورد في (14).

- **دراسة التاثيرات السمية لمستخلصات نبات عين البزون في نمو خط خلايا سرطان عنق الرحم البشري Hela- cell line**

❖ **نوع الخلايا السرطانية المدروسة**

تم إستعمال خط خلايا سرطان عنق الرحم البشري بالتمريرة رقم (225)، فقد تم الحصول عليه من مختبر الصحة المركزي ، في حين تم إجراء التجربة في المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية. تم تنمية الخلايا بوسط MEM المزود بـ(5%) من مصل العجل الجنيني (FCS).

❖ **التأثيرات السمية الخلوية**

إستخدمت أطباق الزرع النسيجي ذات الحفر المتعددة (96-Microtiter plates) والقعر المسطح (Flat Bottom) لاجراء هذا الاختبار، وتضمنت التجربة ثلاثة مراحل:

1- زرع أو بذار الخلايا Cell Seeding

- بعد ان تمت عملية تنمية وتكثير الخلايا السرطانية، أخذت الاوعية ذات النمو الكامل، وتم قلع(حصد) الخلايا باستعمال محلول الـتربسين – فرسين (T.V).
- أضيف (20) مل من الوسط الزرعي المزود بالمصل الى كل وعاء (حسب نوع الخلايا) ومزج بصورة جيدة، بعدها عُدت الخلايا باستعمال شريحة عد خلايا الدم (Haemocytometer) باستخدام صبغة التريبان الزرقاء (1%) وحسب ماأشار اليه Freshney (15).
- أخذ (0.1) مل بوساطة الماصة الدقيقة من عالق الخلايا ووضع في كل حفرة من حفر الطبق إذ احتوت كل حفرة على (1×10^4) خلية/حفرة، ثم تمت تغطية سطح حفر الطبق بورق لاصق شفاف معقم خاص لهذا الغرض وحُرِّك الطبق بلطف، حضن بعدها بدرجة حرارة (37)° م الى اليوم التالي للسماح بالتصاق الخلايا (Cell attachment).

2- معاملة (تعريض) الخلايا السرطانية بالمستخلص النباتي Exposure

- في اليوم التالي للزرع (Seeding)، تمّ عمل تخافيف نصفية متسلسلة في أنابيب اختبار معقمة لكل نوع من المستخلص النباتي باستعمال الوسط الزرعي الخالي من المصل (SF -MEM)، وبدأت التخافيف من (2/1 ← 1024/1) وبصورة تدريجية التي أعطت التراكيز من(1000 ← 1.95 مكغم /مل)على التوالي، مع مراعاة تحضير التخافيف آنياً عند العمل. سكب الوسط الزرعي من حفر أطباق الزرع النسيجي بعد رفع اللاصق، وعد العمود رقم (1) كسيطرة سالبة، فقد أضيف له (0.2) مل من الوسط الزرعي الخالي من المصل، أما الاعمدة من (2 ← 12) فقدأضيفت لها تخافيف مستخلصات نبات عين البزون المحضرة بحجم (0.2) مل/حفرة/ من كل تركيز) ، ثم أعيد وضع طبقة جديدة من الورق اللاصق على سطح الطبق.
- حضنت الأطباق بدرجة حرارة (37مْ) ، أما فترات التعريض (Exposure time) فكانت (24، 48، 72) ساعة.

3- الكشف عن التأثير السمي Cytotoxicity Assay

إستخدمت صبغة البنفسج البلوري (crystal violet stain) للكشف عن التأثير السمي الخلوي للمستخلصات في الخلايا السرطانية وعلى وفق الآتي :

- بعد انتهاء كل فترة حضن، أخذت الأطباق وسكبت محتوياتها، ثم غسلت بمحلول دارئ الفوسفات (PBS)، ثم أضيف (0،1) مل من صبغة البنفسج البلوري (المحضرة حسب ماجاء في (16)) ،الى كل حفرة من حفر الطبق ،وتركت لمدة (20) دقيقة.غسلت بعدها الخلايا بمحلول PBS مرات عدة لحين زوال الصبغة الزائدة، بعد جفاف الأطباق تماما قرئت النتائج باستخدام جهاز المطياف الضوئي الخاص بأطباق المعايرةالدقيقة (ELISA microplate spectrophotometer)، عند طول موجي مقداره (492) نانوميتر.
- تم حساب معدل تثبيط نمو الخلايا السرطانية (Inhibitory Rate/I.R) وفق المعادلة المشار اليها في (17) وكالاتي :

$$IR\% = \frac{A - B}{A} \times 100$$

كما حُسب معدل تحفيز النمو (Proliferation Rate/ PR) وفقاً لـ (18) وكالآتي:

$$PR\% = \frac{B}{A} \times 100$$

حيث ان:

IR = النسبة المئوية لمعدل التثبيط

PR= النسبة المئوية لمعدل التحفيز.

A = الكثافة الضوئية للسيطرة السالبة.

B = الكثافة الضوئية لمجموعة الاختبار.

النتائج :

- **الكشف الاستدلالي للمركبات الكيميائية الفعالة**

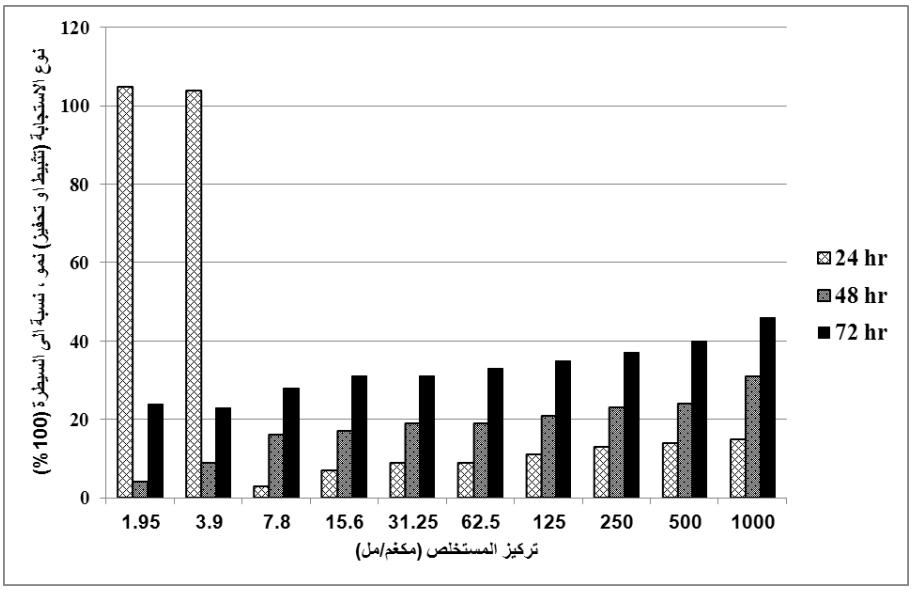
أظهرت نتائج الكشف عن المواد الكيميائية في مستخلصات نبات عين البزون المائية أنها تحتوي على القلويدات والتربينات والفلافونويدات والكلايكوسيدات.

- **التأثيرات السمية لمستخلصات نبات عين البزون في خلايا سرطان عنق الرحم البشري (Hela).**

- التأثير السمي لمستخلص الأوراق.

درس التأثير السمي لمستخلص أوراق نبات عين البزون في خلايا سرطان عنق الرحم البشري بالتمريرة رقم (225) . بنيت النتائج الموضحة في الشكل (1) أن التأثير التثبيطي لم يكن كبيراً ، فقد بلغت أعلى نسبة مئوية لتثبيط النمو 46 % عند التركيز 1000مكغم / مل من المستخلص بعد 72 ساعة من التعريض ، ويبدأ التثبيط يقل كلما انخفض التركيز.أما التراكيز الواطئة فأنها أدت الى تحفيز نمو الخلايا ، فقد بلغت نسبة الخلايا الحية 105 % عند التركيز1,95 مكغم / مل بعد 24 ساعة من المعاملة مقارنة بالسيطرة 100 % .

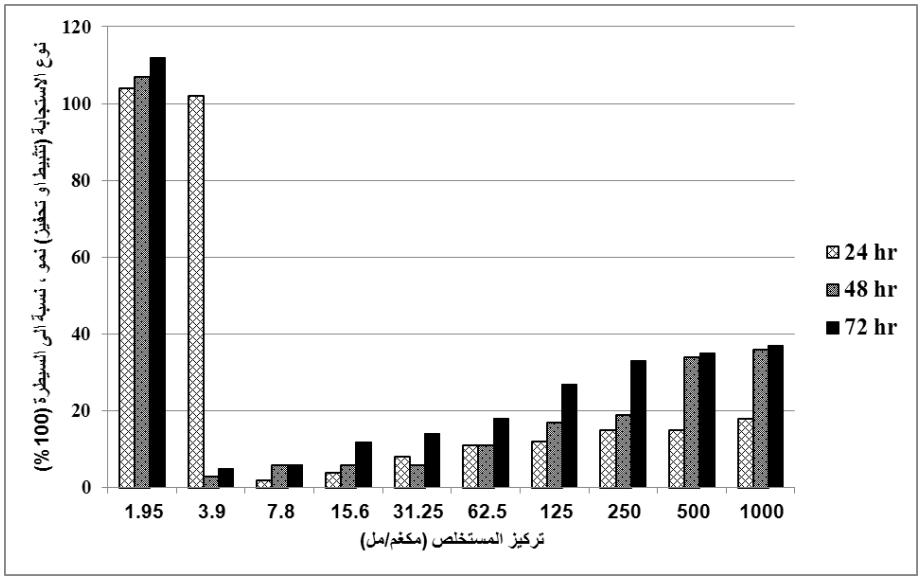
كذلك يلحظ ان التأثيرالسمي التثبيطي بعد 24 و 48 ساعة من المعاملة بالمستخلص النباتي كان ضعيفا" حتى عند استعمال التراكيز المرتفعة فقد بلغت أعلى نسبة تثبيط نمو 31% (نسبة عيوشية viability مقدارها 69 %) عند التركيز 1000مكغم /مل و48 ساعة من المعاملة.



الشكل (1): تأثير مستخلص الأوراق المائي لنبات عين البزون في النسبة المئوية لحيوية خلايا سرطان عنق الرحم البشري Hela بعد التعريض لفترات زمنية مختلفة.

- **التأثير السمي لمستخلص الأزهار.**

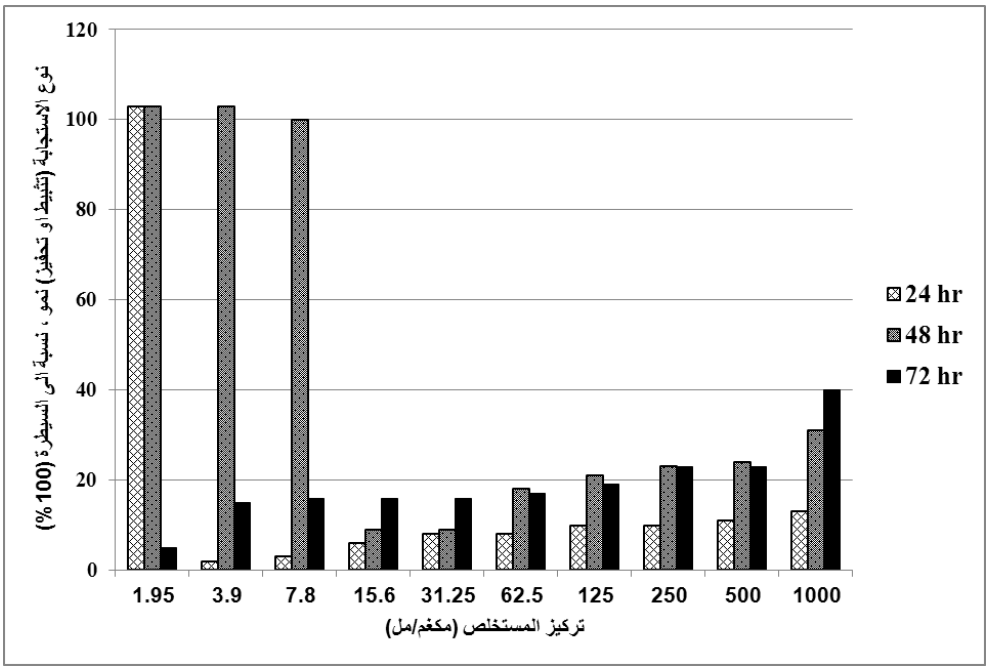
أظهرت نتائج معاملة خلايا Hela بمستخلص أزهار نبات عين البزون ، أن التأثير السمي التثبيطي يكون في اليوم الثاني والثالث للتعريض وبالتراكيز المرتفعة فقط (500 و1000) مكغم /مل ، اذا تراوحت نسبة تثبيط النمو مابين (34-37) % ، الشكل (2). أما نسبة تثبيط النمو بعد 24 ساعة من التعريض فقد كانت ضعيفة ولجميع التراكيز المستعملة. اما فيما يخص تحفيز النمو (معدل التكاثر Proliferation Rate) فقد بلغت أعلى قيمة له 112% نسبة الى السيطرة 100% عند استخدام أقل التراكيز حسب هذه الدراسة 1.95 مكغم / مل بعد 27 ساعة من التعريض للمستخلص.



الشكل (2) :تأثير مستخلص الأزهار المائي لنبات عين البزون في النسبة المئوية لحيوية خلايا سرطان عنق الرحم البشري Hela بعد التعريض لفترات زمنية مختلفة.

- **التأثير السمي لمستخلص البذور.**

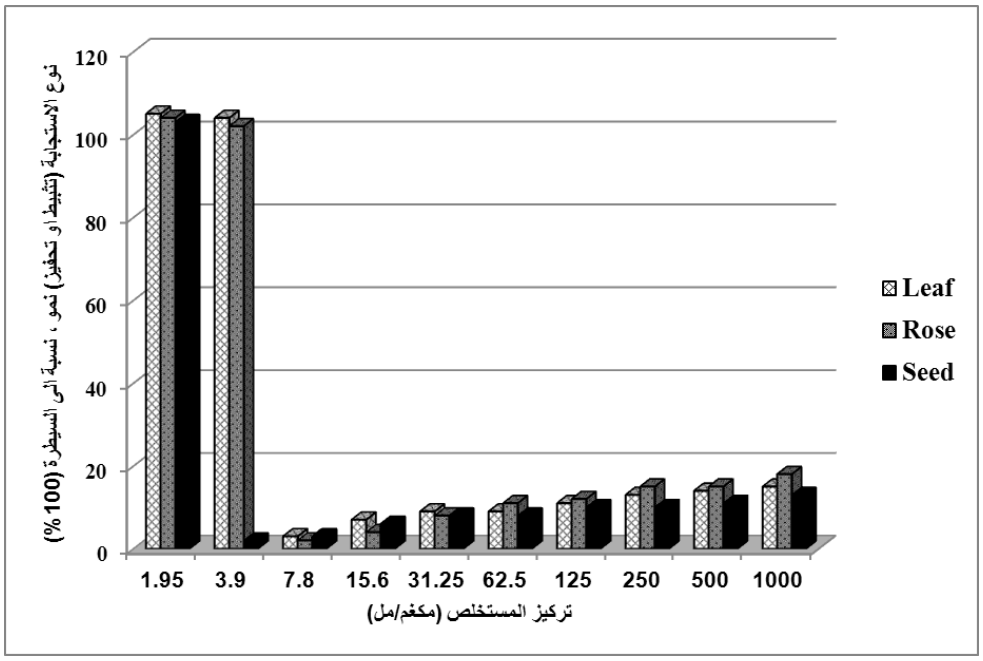
تأثير مستخلص بذور نبات عين البزون في خلايا سرطان الرحم البشري شابه في إطاره العام نوعي المستخلصين السابقين (الاوراق والازهار) .فقد ظهر التأثير السمي الأفضل بعد 72 ساعة من المعاملة، وبلغ 40% اي بنسبة حيوية 60% عند أعلى التراكيز المستخدمة 1000مكغم / مل اي انه كان ضعيفا". فضلا" عن ذلك كان التأثير المحفز للنمو ضعيفا" كذلك ، فقد بلغ 103% عند أوطأ التراكيز بعد 24 و48 ساعة من المعاملة.شكل (3).



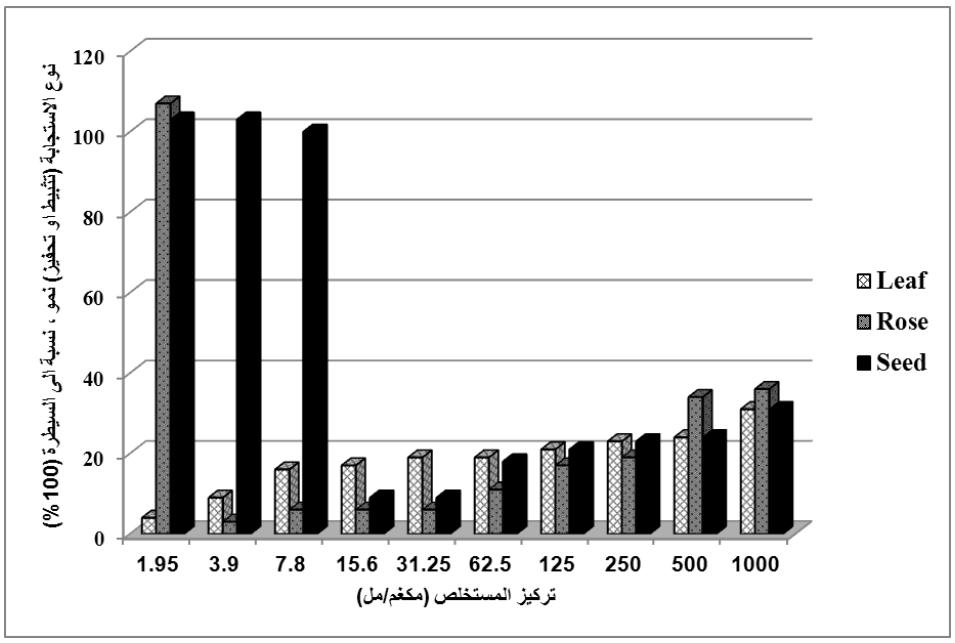
الشكل (3) :تأثير مستخلص البذور المائي لنبات عين البزون في النسبة المئوية لحيوية خلايا سرطان عنق الرحم البشري Hela بعد التعريض لفترات زمنية مختلفة.

- **مقارنة تأثير فترة التعريض في حيوية خلايا سرطان عنق الرحم البشري لأنواع المستخلصات الثلاث المدروسة .**

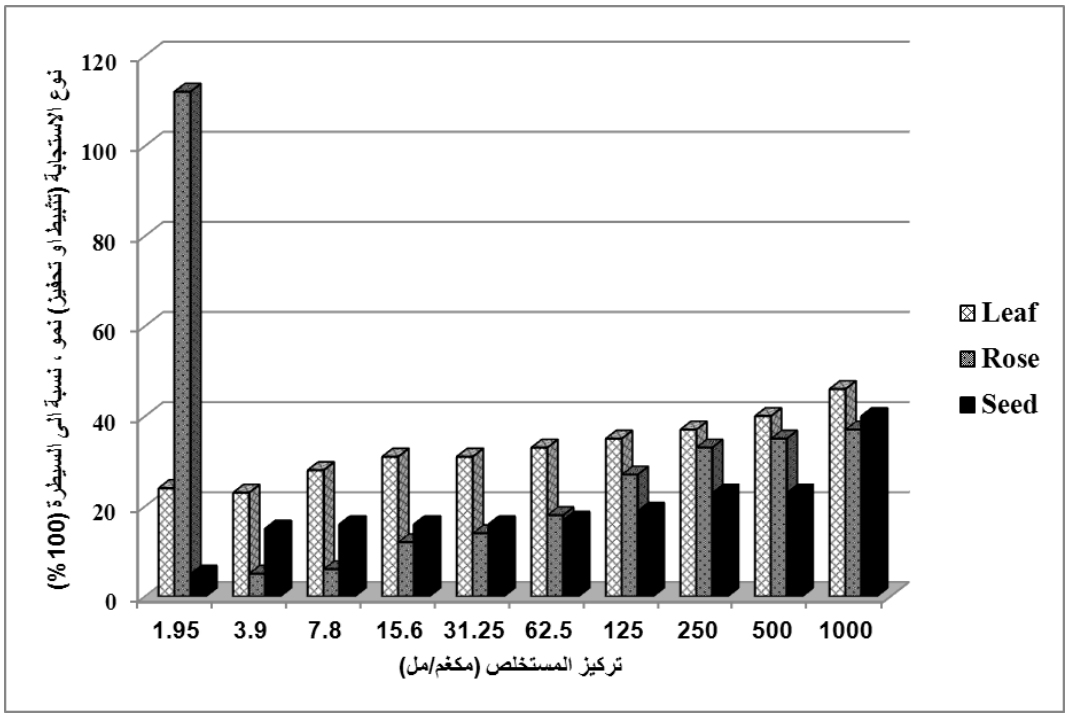
عند اجراء مقارنة بين حيوية انواع المستخلصات الثلاث المدروسة (الأوراق و الأزهار و البذور) في كل فترة زمنية للتعريض ، وجد بعد الـ 24 ساعة الأولى من المعاملة أن نسب التثبيط كانت منخفضة جدا" ، فقد بلغت حيوية الخلايا (85 و 82 و 87)% اي بنسب تثبيط نمو مقدارها (15 و 18 و13)% للمستخلصات الثلاث المدروسة على الترتيب وعند أعلى التراكيز المعاملة بها 1000مكغم / مل (الشكل 4) . فضلا" عن ذلك كانت نتائج التعريض لمدة 48 ساعة مشابها في أطارها العام لنتائج التعريض بعد 24 ساعة، فقد بلغت نسب تثبيط النمو (31 و 36 و 31)% لأنواع المستخلصات الثلاث على الترتيب (الشكل 5).أما عن افضل نسبة تُثبيط نمو فقد ظهرت خلال 72 ساعة من المعاملة ، وان التركيز 1000 مكغم/ مل قد أعطى أفضل النتائج لنسبة التثبيط (46 و 37 و 40) % أي بنسبة عيوشية مقدارها (54 ، 63 و 60) % على الترتيب مقارنة بالسيطرة 100% (الشكل 6) .لذلك تعد خلايا سرطان عنق الرحم البشري المدروسة خلايا مقاومة للمستخلصات المستعملة بسبب بقاء حيوية الخلايا السرطانية بنسب مرتفعة.



الشكل (4) : مقارنة تأثير المستخلصات المائية لنبات عين البزون في النسبة المئوية لحيوية خلايا سرطان عنق الرحم البشري Hela بعد 24 ساعة من المعاملة.



الشكل (5) : مقارنة تأثير المستخلصات المائية لنبات عين البزون في النسبة المئوية لحيوية خلايا سرطان عنق الرحم البشري Hela بعد 48 ساعة من المعاملة.



الشكل (6) : مقارنة تأثير المستخلصات المائية لنبات عين البزون في النسبة المئوية لحيوية خلايا سرطان عنق الرحم البشري Hela بعد 72 ساعة من المعاملة.

المناقشة

نظراً لأهمية إيجاد مواد فاعلة ضد مرض السرطان وإيجاد المزيد من أنواع النباتات التي تمتلك تلك المواد ، فقد تم اختيار نبات عين البزون *Vinca rosea* الذي يعد واحداً من النباتات الطبية المتوفرة محلياً الذي يمتلك خواص علاجية مختلفة ، وذلك للتعرف على تأثيرات المستخلصات المائية الخام في خلايا سرطان عنق الرحم البشري ومدى إمكانية استخدام هذه المستخلصات كمواد علاجية طبية ضد السرطان مستقبلاً.

يعُد إختبار الكشف عن التأثيرات السمية لمادة ما في الخلايا السرطانية في الزجاج أحد االتقانات المهمة التي يتم اعتمادها مبدئياً في التحري عن امتلاك تلك المواد تأثيراً قاتلاً تجاه هذه الخلايا الخبيثة ، التي قد تعقد عليها الآمال كعلاج مستقبلي .

تم في هذة الدراسة التحري عن مدى التأثيرات السمية للمستخلصات المائية لنبات عين البزون بأنواعها الثلاث (اوراق ، أزهار ، بذور) في خلايا سرطان عنق الرحم البشري Hela ، خلال ثلاث فترات زمنية للتعريض (24 ، 48 ، 72) ساعة، بأستخدام سلسلة تخافيف ثنائية بتراكيز تدريجية تراوحت ما بين (1.95 – 1000) مكغم / مل.

إستخدمت طريقة التصبيغ بالبنفسج البلوري في الكشف عن التأثير السمي ، من خلال التحري عن عدد الخلايا الحية ، ولأجله قيست الكثافة الضوئية عند طول موجي 492 نانوميتر و شدة اللون هو تعبيرعن عدد الخلايا الحية . اما تقييم مدى التأير السمي ، فتم اعتماداً على استخراج النسبة المئوية لمعدل تثبيط النمو (IR) مقارنة بالسيطرة التي يعد معدل نموها (100 %) ، كما إستخرج معدل تحفيز النمو(PR) حسب المبدأ نفسه .

تحتوي مستخلصات نبات عين البزون على العديد من المركبات وحسب ماظهر في الكشف الكيميائي الاستدلالي وجود القلويدات واالتربينات والفلافونويدات والكلايكوسيدات التي قد تساهم معاً بقتل الخلايا السرطانية بفعالية أفضل نتيجة العمل التآزري فيما بينها مما قد يقلل من سمية المركبات النقية المستعملة.

وُجد من خلال نتائج الدراسة أن المستخلصات الخام لعبت دوراً في قتل الخلايا السرطانية وتثبيط نموها وانقسامها خارج الجسم الحي ، فقد أشارت النتائج أن التأثير السمي لنبات عين البزون في خلايا سرطان عنق الرحم البشري (Hela) إعتمد بصورة أساس على التركيز المستخدم ومدة التعريض ، ولم يكن لنوع المستخلص المستعمل دوا" في التأثير، بمعنى آخر ليس هناك فرق ملحوظ مابين مستخلص الأوراق والازهار والبذور. من جانب آخر يلحظ ان هذا النوع من الخلايا السرطانية وحسب نتائج هذه الدراسة تعد مقاومة للمستخلاصات المائية العلاجيية المحضرة ، فبالرغم من أنها سببت تثبيط نمو الخلايا ، إلا أن التثبيط لم تتجاوز نسبته المئوية الـ 46% في مستخلص الأوراق وبعد 72 ساعة من المعاملة.

توصلت دراسة اجريت من قبل ياسين وجماعته (19) تم فيها المقارنة بين نوعي المستخلصين الكحولي والمائي ، فوجد أن المستخلصات الكحولية أكثر فعالية من مثيلاتها المائية في خلايا Hep-2 .قد يعود ذلك الى إن نسبة المادة الفعالة التي تم استخلاصها بالكحول الاثيلي (70 %) تكون اكبر مما هو عليه عند استخدام المستخلص المائي وهذا ما أشار إليه هاربورن وجماعته (14) .

تحتوي المستخلصات الخام لنبات عين البزون على نسبة مرتفعة من القلويدات، إذ تعد خزيناً لأكثر من 75 نوعاً منها (20) ، فضلاً عن وجود التربينات والفينولات (21) والكثيرمن العناصر المعدنية (22) . تتباين نسبة النواتج الأيضية الثانوية الموجودة في النبات تبعاً لنوع العضو النباتي (أوراق ، أزهار ، بذور) ، كما تتأثر هذه النسبة بألعوامل البيئية المحيطية (21).

تعد القلويدات من أهم وأكثر المواد الفعالة الموجودة في تلك المستخلصات ، أما آلية عملها فتكون من خلال تثبيط عملية الإنقسام الخيطي ، لتبقى الخلايا في الطور الإستوائي Metaphase وذلك بوساطة منع بلمرة بروتين التيوبيولين Tubulin المسؤول عن تكوين خيوط المغزل (13,23,24) . فضلاً عن ذلك تعمل القلويدات على تثبيط بناء الأحماض النووية خارج الجسم الحي (25,26).

كما أشارت العديد من الدراسات السابقة التي قام بها الباحثون الى امتلاك قلويدات عين البزون فعالية ضد الخلايا السرطانية ، ومنها خلايا سرطان عنق الرحم البشري Hela cells، إذ تسبب التراكيز الواطئة منها تثبيط عمل خيوط المغزل (27,28) .

من جانب آخر أكد الباحثان Parekh و Simpkins (29) إن هذه القلويدات تؤثر في خطوط الخلايا اللمفاوية السرطانية للجرذ وفي خطوط خلايا سرطان المبيض البشري التي تتميز بمقاومة العلاجات الكيميائية الشائعة الاستعمال كالـ Cisplatin ، فضلاً عن كونها أكثر فعالية من الـ Taxol و Adriamycin . أما سمّية هذه المركبات تجاه خلايا سرطان الدم Leukemia L1210 فهي مرتبطة بدرجة تأثيرها على بروتين Tubulin T وترتيبه المغزلي (30,31) .

أما فعالية المركبات الفينولية ومنها الفلافونويدات (Flavonoids) فيكون من خلال إمتلاكها فعالية مضادة للأكسدة (Antioxidant) إذ تعمل على إزالة الجذور الحرة المتولدة ، وتُوَّجه الخلية للدخول في مرحلة الموت المبرمج (32) ، ومن الأمثلة عن الخلايا السرطانية التي وجد أنها حساسة للمركبات الفينولية هي خلايا سرطان الحنجرة

البشري Hep-2 وخلايا سرطان عنق الرحم Hela وسرطان الدماغ البشري AMGM والقولون والبروستات البشرية(30 ,33 ، 34).

تعمل العديد من المركبات الفعالة باتجاهين متعاكسين اعتمادا على التركيز المستخدم ، فكما يلحظ من خلال النتائج المذكورة إن التراكيز المرتفعة قد ثبطت نمو خلايا Hela ، في حين حفزت التراكيز الواطئة من نمو تلك الخلايا فإزدادت الحيوية وإن كانت الزيادة بنسب قليلة تراوحت مابين (103- 112)% نسبة الى السيطرة (100%) ، وهذا يشير الى ان المستخلص قيد الدراسة يمتلك تأثير (Biphasic effect) [35]. او مايسمى Hormetic effect ، فهناك الكثير من المركبات الكيميائية العلاجية و المضادات الحياتية والسموم تنقاد في عملها لظاهرة الـ Hormesis(هي ظاهرة بايولوجية شائعة في علم السموم) ، اذ تعمل بتراكيز واطئة على التحفيز مماقد يكون مفيداً للكائن الحي لاسيما عند تنشيط الخلايا المناعية ، في حين تسبب الجرعات العالية تثبيط جزئي او كلي للخلايا (36) تظهر هذه الحالة نتيجة فعل بعض المركبات المضادة للسرطان مثل Mitomycin C و Bleomycin و Actinomycin والمضادات الحيوية والمضادات الفيروسية (37) ، فضلا" عن مبيدات الأعشاب والمبيدات الحشرية والفطرية والطفيلية(38) وبعض الهيدروكربونات والعناصر المعدنية (39) ، كذلك ينتج عن بعض العوامل الفيزيائية كالأشعة المؤينة (40) والأشعة الكهرومغناطيسية (41) ،ودرجات الحرارة الواطئة (42) وغيرها من العوامل.

أوضحت النتائج إن الفترة الزمنية التي تتعرض خلالها الخلايا السرطانية للمستخلصات تلعب دوراً في تحديد شدة التأثير التثبيطي ، إذ يزداد التأثير السمي بزيادة الفترة الزمنية ، فقد كانت النسب المئوية للتثبيط قليلة جدا بعد 24 ساعة الأولى من التعريض ثم أرتفعت بصورة ضئيلة بعد 48 ساعة ، في حين ظهر التثبيط بنسبة أعلى بعد 72 ساعة وفي الجرع المرتفعة فقط.

ومن الجدير بالذكر ان المستخلص المستخدم في هذهِ الدراسة هو مستخلصاً خاماً ، اي انه يحوي العديد من انواع المركبات الفعالة التي تم التطرق الى فعاليتها او التي لم يرد ذكرها ، مما يدعم نتائج ظهور التضادية في التأثير على الخلايا السرطانية اعتماداً على التركيز المستخدم. فمن المحتمل ان يكون تأثيره على المادة الوراثية باتجاهين ، الاول يسبب تثبيط لجينات معينة ، في حين يحفز الاخر النمو و التضاعف.

ومما يجب التطرق اليه ، ان تاثير المواد المضادة للسرطان لايختلف حسب نوع الخلايا فقط ، و انما حسب تمريره الخلايا Passag وذلك بسبب حدوث طفرات بالمادة الوراثية بعد عدة تمريرات (43).وبذلك سوف تختلف المستضدات الخلوية للخلايا السرطانية فضلاً عن خصائصها الاخرى. اما عالمياً فتدرس الخلايا الام او التمريرات القريبة منها تلافياً لذلك .فضلاً عن ان الخلية السرطانية الام المعزولة من المريض تتلف وراثياً ومستضدياً عن تلك التي نميت لفترات طويلة فالهيئة الكروموسومية لاتشبه ماموجود في الخلايا الاصل التي نشات منها، مما ينتج عنها اختلاف الاستجابة للمادة العلاجية المدروسة (44). لذلك تعد هذهِ النتائج دليل اولي على وجود التأثير التثبيطي خارج الجسم الحي ، ومن ثم اختبار الكفاءة العلاجية داخل الجسم الحي.

المصادر:

1. American Cancer Society (2015). Cancer Facts and Figures 2015 American Cancer Society, Atlanta.
2. Murray, R.K.(1996). Cancer, Cancer Genes, and Growth Factors. In: Harper's Biochemistry. (24th Ed). R.K. Murray, D.K. Granner, P.A. Mayes, V.W. Rodwell (Eds.), Appleton and Lange, Stamford . pp. 757-778.
3. Safarzadeh, E; Shotorbani, S.S and Baradaran, B.(2014). Herbal Medicine as Inducers of Apoptosis in Cancer Treatment. Adv Pharm Bull, 4(1), 421-427.
4. Lobert, S. ; Fahy, J. ; Hill,B.T. ; Duflos, A. ; Etievant, C and Correia, J.J. (2000). Vinca alkaloid-induced tubulin spiral formation correlates with cytotoxicity in the leukemia L 1210 cell line. Biochemistry, 39:12053-12062.
5. Aslam, J, H. K.; Sheba, H. S; Zahid , F; Zohra , M, Mehpara and Mukthar, A .(2010). *Catharanthus roseus* Don. L an Important Drug IT'S Applications and Production, Pharmacie Globale (IJCP),4:12.
6. Al-Azawee, N.H.I.(2015). The cytotoxic effect of some chemotherapti drugs & functional activity of breast cancer patients peripheral blood lymphocytes. *International Journal of Advanced Research*), 3 (1), 81-86.
7. Almagro, L.; Fernandez-Perez, F. and Pedreno, M.A. (2015). Indole Alkaloids from *Catharanthus roseus*: Bioproduction and Their Effect on Human Health, *Molecules*, *20*, 2973-3000.
8. Ghosh, S.; Suryawanshi, S.A. (2001). Effect of *Vinca rosea* extracts in treatment of alloxan diabetes inmale albino rats. Indian J. Exp.Biol, *39*,748–759.
9. Ahmed, M.F; Kazim,S.M; Ghori,S.S; Mehjabeen, S.S; Ahmed, S.R; Ali,S.M and Ibrahim, M.(2010) . Antidiabetic activity of *vinca rosea* extracts in alloxan – induced diabetic rats.Int. J. Endocrinology., vol, article ID 841090, 6.
10. Raza, M. L ; Nasir, M ; Abbas, T. and Naqvi, B. S. (2009). Antibacterial activity of different extracts from the *Catharanthus roseus*. CEMED,3(1): 81-85.
11. AL-makhzumi, A. A. ; AL-dulaimy, H. H. and Jawaad, A. M. (2015).In vivo effect of *Catharanthus roseus crude* extracts on pathogenic bacteria isolated from skin infections.Iraqi Journal of Science, 56(1) : 656-664.

12. Fattorusso, E. and T. Scafati. (2008). Modern Alkaloids Structure. 12 – WILE -VCH Verlag Cmb H. and kga A Co., Germany:28-41.

13. Mohammed, I. H.(2012). Effect of Vincristine and Vinblastine from *Vinca rosea* on Microtubules of Tumor H22 Cell line.Diyala Journal of Medicine, 3 (1):97–104.

14. Harborne J.B. (1984). Phytochemical Methods . (2nd ed.) Chapman and Hall, H. p. London,193 .

15. Freshney, R.I. (2000). Culture of animal cells: A manual for basic technique. 4th ed. Wiley-Liss, A John Wiley and Sons, Inc. Publication, New York.

16. Mather K.E. (2000) . Principles of radation therapy. *In: B.M. Nevidjon and K.M. Sowers(ed).A nurse's guide to cancer care*. Lippincott, philadelpphia,pp:215.

17. Gao, S.; Yu, B.; Li, Y.; Dong, W. and Luo, H. (2003). Antiproliferative effect of Octreotide on gastric cells mediated by Inhibition of Akt/PKB and telomerase. World J. Gastroenterol, 9: 2362-5.

18. Chumchalova, J. and Smarda, J.(2003)**.** *Human Tumor Cells are Selectively* Inhibited by Colicins. Folia Microbiol.,48: 111-5.

19. ياسين، ناهي يوسف ; حسن ، هادي رسول و صكبان، لقاء حسون.(2009)، دراسة تأثير المستخلصات الخام لنبات عين البزون *Vinca rosea* على نمو الخطوط الخلوية السرطانية والطبيعية لبعض اللبائن خارج الجسم الحي *In vitro*.مجلة جامعة كربلاء العلمية (عدد خاص ببحوث المؤتمر العلمي الخامس للجامعة).

20. Mukherjee, A.K. ; Basu, S. ; Sarkar, N. and Ghosh,C.A.(2001). Advances in cancer therapy with plant based natural products.Current Medicinal Chemistry, 8:1467-1486.

21. Vazquez-Flota, F. ; Carrillo-Pech, M. ; Minero-Garcia, Y. and Miranda-Ham,M.(2004). Alkaloid metabolism in wounded *Catharanthus roseus* seedlings. Plant Physiology and Biochemistry, 42:623-628.

22. Sahito, S.R. ; Kazi, T.G. ; Kazi, G.H. ; Jakhrani, M.A. and Shaik, M.S.(2001). Trace elements in two varieties of indigenous medicinal plant *Cathranthus roseus* (*Vinca rosea*). The Science,:74-77.

23. Pourroy, B. ; Carre, M. ; Honore, S. ; Bourgarel-Rey, V.; Kruczynski, A. ; Briand, C. and Braguer, D. (2004). Low concentrations of vinflunine induce apoptosis in human SK-N-SH neuroblastoma cells through a postmitotic G1 arrest

and a mitochondrial pathway . Mol. Pharmacol., 66:580-591.

24. Ngan, V.K. ; Bellman, K. ; Hill, B.T. ; Wilson, L. and Jordan,M.A. (2001) . Mechanism of mitotic block and inhibitionof cell proliferation by the semisynthetic vinca alkaloids vinorelbine and its new derivative vinflunine. Molecular Pharmacology, 60:225-232.

25. Medinger,M. ; Unger,C. and Drevs,J.(2003). Pflanzliche Zytostati Forschung and klinik . Bundesgesund Heitsbl-Gesundheits Forsch-Gesundheitsschutz .46:1050-1054.

26. Gascoigne, K.E and Taylor, S.S. (2009). How do anti-mitotic drugs kill cancer cells?. *Journal of Cell Science*, 122, 2579-2585.

27. Jordan, M.A. ; Thrower, D. and Wilson, L.(1991). Mechanism of inhibition of cell proliferation by vinca alkaloids . Cancer Research, 51:2212-2222.

28. Becvarova, P.; Skorp Ikova, J.1.; Janisc h. R and Novy, J. (2006). Avinca Alkaloids Effect on Microtubules of HeLa Cells. SCRIPTA MEDICA (BRNO), 79 (1):19–34.

29. Parekh, H.R. and Simpkins, H.(1996). Cross-resistance and collateral sensitivity to natural product drugs in cisplatin-sensitive and resistant rat lymphoma and human ovarian carcinoma cells. Cancer Chemother. Pharmacol. , 37:457-462 .

30. Lopez-Lazaro, M.(2002). Flavonoids as anticancer agents : Structure- activity relationship study . Curr. Med. Chem., 2:691-714 .

31. Ahmad, N.H; Abdul Rahim , R and Mat,I.(2010). *Catharanthus roseus* Aqueous Extract is Cytotoxic to Jurkat Leukaemic T-cells but Induces the Proliferation of Normal Peripheral Blood Mononuclear Cells. Tropical Life Sciences Research, 21(2), 101–113. Sathiya, S ; Karthikeyan, B ; Jaleel, C. A ; Azooz, M. M. and Iqbal, M. (2008). Antibiogram of *Catharanthus roseus* extracts. Global J. Mol. Sci., 3(1) : 1-7.

32. Forkmann, G. and Martens, S.(2001). Metabolic engineering and application of flavonoids . Curr. Opinion Biotech. , 12:155-160.

33. سلمان، إسراء صكر; ياسين، ناهي يوسف ; أحمد ،أيسر عايد و حسين، لقاء مائدة ; طه، زهراء رافع ;شاكر ;هبة كريم; حسن، أيمن علي.(**2011**).تأثير الفلافونيدات على الخطوط الخلوية السرطانية والطبيعية خارج الجسم الحي.المجلة العراقية لبحوث السرطان والوراثة الطبية ، 4(1): 94-100.

34. Pedra , M ; ferreira , M , M ; cidade H , ; Kijjoa , A. ; Bronze –da– rocha , E and Nascimento, M. S. J.(2005) . *Artelastin is a cytotoxic prenylated Flavone that disturbs microtubules and interferes with DNA replication in MCF -7 human breast cancer cells*. Life Sciences,77:993- 311.

35. Calabrese E . J . and Baldwin , L .A., (2003). *Hormesis :* the dose - response revolution. Annu. Rev .Pharmacol. Toxicol., 43 : 175 – 197 .

36. Calabrese, E. J. and Baldwin, L. A. (2003). Chemotherapeutics and hormesis . Crit. Rev. Toxicol., 33:305-353 .

37. Zheng, T. 29; Holford, T.R. ; Mayne, S.T. ; Ward, B. ; Carter, D. and Owens, P.H. (1999). DDE and DDT in breast adipose tissue and risk of female breast cancer . Am. J. Epidemiol., 150:453-458.

38. Calabrese, E.J. and Baldwin, L. A.(2003). Inorganics and hormesis . Crit. Rev. Toxicol., 33:215-304. Feinendegen, L.E. and Neumann, R.D.(2005). Physics must join with biology in better assessing risk from low-dose irradiation . Radiat. Prot. Dosimetry, 33:105-153.

39. Pollycove, M. and Feinendegen, L.E.(2003). Radiation-induced versus ndogenous DNA damage: possible effect of inducible protective responses in mitigating endogenous damage . Hum. Exp. Toxicol., 22:290-306.

40. Rattan, S.I.(2004). Hormetic mechanisms of anti-aging and rejuvenating effects of repeated mild heat stress on human fibroblasts *in vitro*. Rejuvenation Res., 7:40-48.

41. علي ، آمال محمد ،(2004)، دراسة وراثية خلوية ومناعية لخط خلايا سرطان الحنجرة Hep-2 . رسالة ماجستير . كلية العلوم – جامعة بغداد .

42. Bruserud , O . ; Gjertsen , B.T ; Foss , , B . and Huang , T. (2001) . New Strategies in the treatment of acate Myelogenous leukemia (AML) : In vitro culture of AML cells the present use in Expermental Studies and the possible Importance for future Therapeutic Approaches . Stem cells , 19 : 1 – 1.

Iraqi Journal of Biotechnology, 2015, Vol. 14, No. 2 , 403-414

التقييم البيئي لتراكيز الهيدروكربونات العطرية متعددة الحلقات في الهواء لمحطة كهرباء الدورة في مدينة بغداد

اسراء محمد حسين الموسوي[1] ، مثنى عبد الجبار شنشل[1] و عدنان حسن عفج[2]

[1]قسم الكيمياء ، كلية العلوم ، جامعة بغداد ، بغداد ، العراق.
[2]وزارة العلوم والتكنولوجيا ، بغداد ، العراق.

الخلاصة: قيست تراكيز الهيدروكربونات العطرية متعددة الحلقات ((Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) في ثمانية واربعون نموذج من عينات الهواء في محطة كهرباء الدورة والتي جمعت في الفترة من نيسان عام 2012 إلى شباط عام 2013 ، لمدينة بغداد. جمعت عينات الهواء على مرشحات سليلوزية لمدة ساعة ونصف للموقع ولفترتي الصباح والمساء، استخلصت عينات الهواء باستخدام جهاز الاستخلاص (Soxhlet) ومزيج الميثانول- ثنائي كلورميثان كمذيب وحللت بجهاز كروماتوغرافيا الغاز – مطيافية الكتلة (GC- MS) لتقديرستة عشرمركبا من مركبات الـ PAHs.

قيست معلمات الأرصاد الجوية مثل درجة الحرارة والرطوبة النسبية وسرعة الرياح خلال فترة القياس. تفاوتت تراكيز هذه المركبات PAH بين الموقع الداخلي والخارجي لمحطة كهرباء الدورة حيث لوحظ إن تركيز النفثالين الأكثر وفرة في جميع المواقع ولجميع الفصول، كما وجد ارتباط ايجابي للتركيز الكلي لمركبات الهيدروكاربونية العطرية (TPAH) مع درجة الحرارة والرطوبة النسبية في كل من الصيف والشتاء والربيع بينما علاقة شبه ضعيفة في فصل الخريف. هناك علاقة قوية بين التركيز الكلي للدقائق العالقة (TSP) ودرجة الحرارة والرطوبة النسبية في فصلي الربيع والخريف مقارنة مع فصلي الشتاء والصيف.

Environmental assessment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons concentrations in the air of Daura power plant in Baghdad city

Israa M. H. Almousawi[1], Muthna Shanshal[1] and Adnan H. Afaj[2]

[1] Department of Chemistry, College of Science , University of Baghdad, Baghdad, Iraq .
[2] Ministry of Science and Technology, Baghdad, Iraq .

Abstract: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) were measured in 48 aerosol samples, which collected from air of Daura power plant for the period from April 2012 to February 2013, in Baghdad city. Aerosol samples were collected by Sniffer on cellulose fiber filters for 1.5 hours in each site at the morning and evening time. These aerosol samples undergone soxhlet extraction using mixture of methanol and dichloromethane and analyzed by GC-MS in order to determine 16 PAHs.

The meteorological conditions temperature, relative humidity and wind speed were measured during the measurement period. The PAH concentrations were different for inside and outside location at Daura power plant. Naphthalene was the most abundant PAH detected in all points at the site and for all seasons. There is strong correlation between total concentration of PAHs and temperature; relative humidity in the spring, summer and winter seasons. There is positive correlation between total suspended particles (TSP) and temperature; relative humidity in the spring and autumn seasons.

Key words: Polycyclic aromatic hydrocarbons, Daura power plant.

المقدمة

المركبات الهيدروكربونية العطرية متعددة الحلقات (PAHs) تشكل فئة كبيرة من المركبات العضوية التي تحتوي على اثنين أو أكثر من الحلقات العطرية في تركيبها والمكونة من ذرات الكربون والهيدروجين فقط [1].

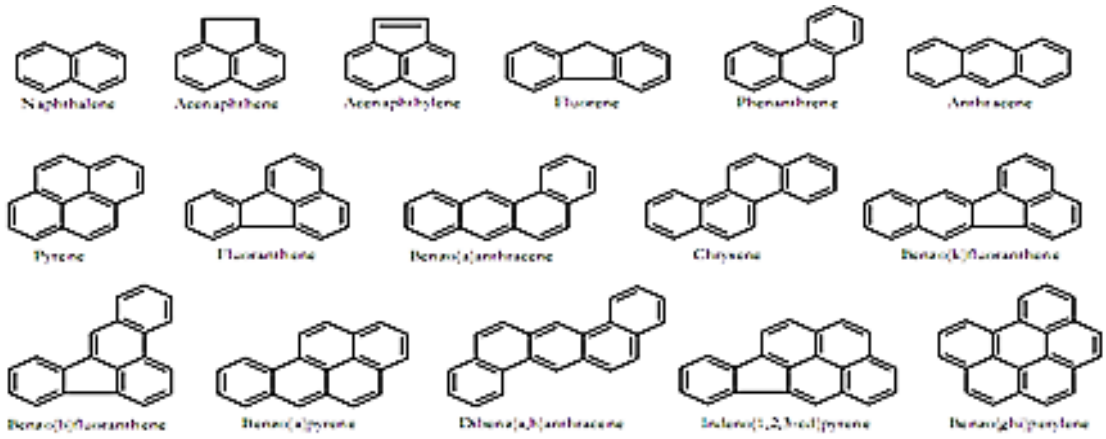
أهم المصادر الرئيسية لانبعاث المركبات الهيدروكربونية العطرية متعددة الحلقات هي النفط الخام والفحم والصخر الزيتي، حيث تنبعث أثناء الاحتراق غير الكامل للوقود المستخرج (الأحفوري ،المتحجر fossil fuels) أو المواد العضوية الأخرى في الهواء. من أهم المصادر البشرية الرئيسية التي تساهم في انبعاث هذه المواد الملوثة هي : الأنشطة المحلية (الطبخ والتدفئة)، وسائط النقل (باستخدام محرك الاحتراق)، والأنشطة الصناعية والزراعية (حرق الكتلة الحيوية) ، والتي تساهم بالتلوث بكميات متفاوتة اعتمادا على المناطق الريفية والحضرية والموسم والأحوال الجوية. اما المصادر الطبيعية تشمل حرائق الغابات والبراكين[2-4].

شخصت مئات من الهيدروكربونات العطرية متعددة الحلقات كملوثات، واستنادا لوكالة حماية البيئة في الولايات المتحدة (USEPA) فأن ستة عشر مركب حلقي في قائمة "الملوثات ذات الأولوية" والشكل (1) يبين تراكيبها. وفي الآونة الأخيرة أعطي الكثير من الاهتمام لهذه المركبات بسبب تأثيراتها المسرطنة والمسببة للطفرة الوراثية [5].

توجد الهيدروكربونات العطرية متعددة الحلقات في الهواء الجوي بطورين، الطور الغازي والطور ألدقائقي الذي تكون فيه مرتبطة بالجسيمات العالقة (particular matter) في الجو. تكون النسب متفاوتة في الطورين اعتمادا على عدد من العوامل بما في ذلك ضغط البخار للمركبات الحلقية العطرية ، ودرجة الحرارة المحيطة، والرطوبة والأمطار، ومقدار وطبيعة الجسيمات العالقة الموجودة في الغلاف الجوي. بشكل عام، في درجات حرارة الهواء المحيط، تم العثور على المركبات ذات 2-3 حلقة بالطور الغازي، في حين وجد أن المركبات مع خمسة أو أكثر من حلقة مرتبطة بالجسيمات العالقة في الغلاف الجوي، وتوزع المركبات ذات الأربع حلقات نفسها بين الطورين[6-8].

هناك العديد من الاستخدامات التجارية للعديد من الهيدروكربونات العطرية حيث تستخدم في الغالب كوسيط في مجال المستحضرات الصيدلانية، والمنتجات الزراعية، ومنتجات التصوير الفوتوغرافي، وتصنيع البلاستيك بالحرارة ومواد التشحيم، وغيرها من الصناعات الكيماوية [9- 12].

يتضمن البحث جمع واستخلاص عينات هواء من محطة كهرباء الدورة في مدينة بغداد لتشخيص وتقدير ستة عشر مركبا من المركبات الـ PAHs باستخدام جهاز تحليل GC- MS، وحسبت تراكيزها من خلال المعادلة الخطية المستخرجة من منحني المعايرة للمواد القياسية. كما تم دراسة تأثير معلمات الأنواء الجوية على التركيز الكلي للمركبات الحلقية العطرية والجسيمات العالقة في الغلاف الجوي باستخدام برنامج إحصائي (statistical package for social scientist (SPSS)).



شكل (1): الهيدروكربونات العطرية متعددة الحلقات.

المواد وطرائق العمل

1- موقع النمذجة

اختيرت محطة كهرباء الدورة الواقعة على محيط مدينة بغداد لأخذ عينات الهواء الجوي وقياس مستويات الهيدروكاربونات العطرية متعددة الحلقات كملوثات . واختير موقعين من المحطة لجمع عينات الهواء، الأول داخل المحطة بالقرب من مصدر انبعاث الهيدروكاربونات العطرية متعددة الحلقات والثاني خارج المنطقة بالقرب من المنطقة السكنية المحيطة بها. كما ان هذه المحطة تستخدم النفط الاسود كوقود والذي يعتبر من اهم ملوثات البيئة.

2- المواد الكيميائية والأجهزة المستخدمة

- استخدم الميثانول وثنائي كلوروميثان (المجهزين من شركة Fluka بنقاوة 99.8%) كمذيبين لاستخلاص الهيدروكاربونات العطرية.

- الهيدروكاربونات العطرية القياسية [Naphthalene, Acenaphthylene, Ace naphthene, Fluorene, Phenanthrene, Anthracene, Fluoranthene, Pyrene, Benz (a) anthra-cene, Chrysene, Benzo(b)fluoranthene, Benzo (k) fluor-anthene, Benzo (a) pyrene, Dibenz (a,h)- anthracene, Benzo (ghi) peryleneand Indeno (1,2,3-cd)- Pyrene] .

تم الحصول عليها بنقاوة 99.9 % وتركيز (5-400) مايكروغرام/لتر من شركة " Dr. Ehrenstorfer " ألمانيا لقياس زمن الاحتجاز (Retention time (t_R)) لكل مركب.

- جهاز كروماتوغرافيا الغاز – مطيافية الكتلة (GC – Ms spectrometer) من شركة (Agilent Technologies (5975C Series GC/ MSD, USA في جامعة دارمشتات التكنولوجية (TUD) في ألمانيا، لتحليل وتشخيص الهيدروكربونات العطرية نوعيا وكميا.

- جهاز سحب الهواء (Sniffer) من شركة (RADECO, Inc., England) لجمع عينات الهواء بسرعة جريان 9.0 قدم^3/دقيقة ومعدل حجم الهواء 7.5 متر مكعب، باستخدام مرشحات سليلوزية بقطر 4.5 سم وسمك 47 ملم من شركة (Schleicher & Schuell, Germany).

- جهاز المبخر الدوار (Rotary evaporator, Yamato RE 510) لتبخير المذيب.
- قياس سرعة الرياح باستخدام جهاز محمول (Lambrech , England).
- قياس درجة الحرارة والرطوبة النسبية باستخدام جهاز محمول (VAISALA model HM1, Finland).

3- تحضير واستخلاص النموذج:-

تم تهيئة المرشحات السيللوزية قبل عملية القياس بتسخينها بدرجة 70 م^{o} لمدة 45 دقيقة للتخلص من الرطوبة ثم وزنها بدقة واستخدامها لجمع عينات الهواء في جهاز (Sniffer) لمدة ساعة ونصف بواقع مرتين يوميا صباحا ومساءا داخل محطة كهرباء الدورة وخارجها، بارتفاع 2-4 م فوق سطح الأرض، وبعد انتهاء القياس توزن المرشحات السيللوزية بدقة. جمعت 48 عينة مختلفة للفترة من نيسان عام 2012 ولغاية شباط عام 2013.

استخلصت الهيدروكاربونات العطرية من المرشحات السيللوزية بجهاز (Soxhlet) وباستخدام مزيج الميثانول الدايكلوروميثان (1:1) لمدة ثمانية عشر ساعة، بخر مزيج المذيبات لغاية الجفاف، ثم أضيف للمستخلص 5 مل من الميثانول ورشح بوساطة مرشح مايكرو (Micro filter).

4- تحضير المحاليل القياسية:-

حضرت المحاليل القياسية لمزيج الهيدروكاربونات العطرية الستة عشر بأربعة تراكيز مختلفة هي (3.33، 36.47، 67.41، 334.22) مايكروغرام/ لتر للحصول على منحني المعايرة.

5- تحليل النموذج:-

شخصت المركبات الهيدروكاربونية العطرية بعد حقن واحد مايكروليتر من النموذج بجهاز GC-MS وباستخدام البرنامج الحراري لعمود كروماتوغرافيا الغاز المرتبط مع كاشف التأين أللهبي (Flame Ionization Detector (FID))، بدرجة حرارة ابتدائية 75 م^{o}/ دقيقة (لمدة ثلاث دقائق)، ترفع الحرارة إلى 235 م^{o} (20 م^{o} /د)، ثم ترفع إلى 300 م^{o} (5 م^{o}/د)، لتصل إلى الدرجة النهائية 320 م^{o} (10 م^{o}/د) (لمدة تسع دقائق) واستغرق التحليل الواحد مدة 43 دقيقة للحصول على مساحات الاستجابة وكتل الايون للمركبات في نموذج الهواء الجوي عن طريق برنامج (ChemStation software) [13,14] .

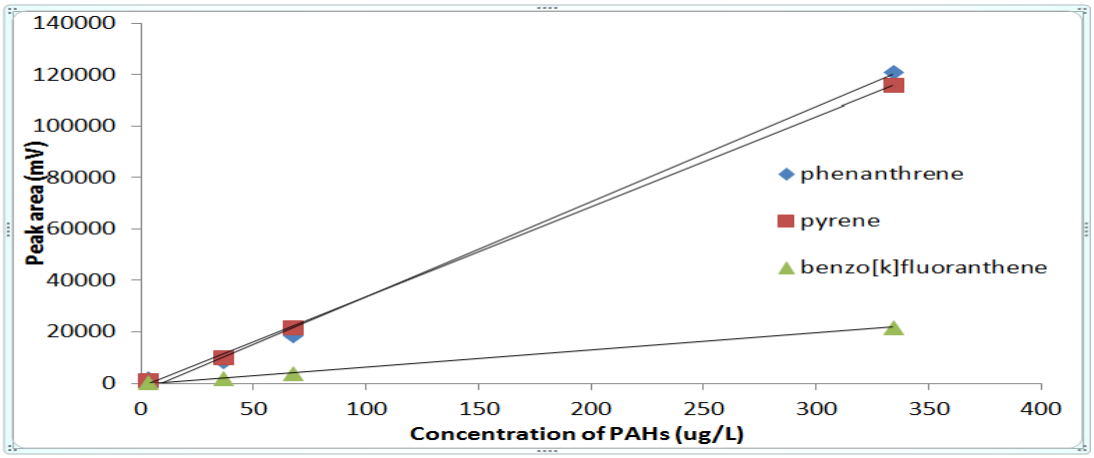
النتائج والمناقشة

- **تقدير مركبات الهيدروكربونات العطرية متعددة الحلقات باستخدام جهاز GC-MS**

باستخدام البرنامج الحراري لجهاز GC-MS والظروف المثبتة في الجزء العملي فقرة (4 و5) وبتحضير مجموعة من محاليل مخففة للهيدروكربونات العطرية متعددة الحلقات القياسية بتركيز يتراوح بين(5-400) مايكروغرام/لتر وتكرار كل قياس ثلاث مرات للحصول على أزمان الاحتجاز (Retention times) لكل مركب بصورة انفرادية.

عينت مساحة الاستجابة لكل تركيز من مزيج الهيدروكربونات العطرية متعددة الحلقات القياسية المحضرة ، وحضرت منحنيات المعايرة لكل مركب والذي يوضح العلاقة بين مساحة الاستجابة (mV) مع التركيز، وتم تلخيص النتائج بالجدول 1.

يبين الشكل (2) منحنيات المعايرة لبعض المركبات والتي تم من خلالها حساب المعادلة الخطية التي استخدمت في حساب تراكيز المركبات في نماذج الهواء.



شكل 2. منحني المعايرة لبعض المركبات

استخدم منحني المعايرة المبين أعلاه في حساب تركيز المركبات الموجودة في نماذج الهواء لمحطة كهرباء الدورة، وتعيين التركيز الكلي للمركبات الحلقية العطرية الهيدروكاربونية (TPAH's) والدقائق العالقة (TSP) كما تم قياس درجة الحرارة والرطوبة النسبية وسرعة الرياح خلال فترة القياس كما يوضحها الجدول (2).

معدل درجة الحرارة يتراوح بين (36.7-49.6) م^{o} لفصل الصيف بينما معدلها لفصل الشتاء يتراوح بين (13.3 - 24.6) م^{o} .أما الرطوبة النسبية فان معدلها خلال فصل الصيف يتراوح بين (16.05-24.1)% أما في فصل الشتاء يتراوح بين (36.2 -78.7)%. لوحظ أعلى قيمة للتركيز الكلي للمركبات (TPAH) لنموذج الهواء كان في فصل الربيع حيث بلغت قيمته (5.408) مايكروغرام /م^{3}، أما التركيز الكلي للجسيمات العالقة فكان في فصل الخريف حيث بلغت قيمته (1142.413) مايكروغرام /م^{3}.

جدول (1): قيم ازمان الاحتجاز للمركبات القياسية باستخدام تحليل جهاز GC-MS.

Season	Location	Time	Temp. ^{o}C	Hum. %	Wind rate m/s	Tsp (µg/m^3)	TPAHs (µg/m^3)
Spring	Inside	Morn.	32.85	39.98	1.5	563.900	0.375
		Even.	33.22	34.45	1.8	606.060	0.563
	outside	Morn	30.82	44.45	0.3	820.100	5.408
		Even.	36.10	27.17	0.6	481.256	0.281
Summer	Inside	Morn.	41.95	20.70	0.7	502.008	1.289
		Even.	44.52	16.05	2.0	395.114	0.019
	outside	Morn	36.70	27.60	1.5	564.972	0.115
		Even.	43.00	18.82	1.0	396.825	0.038
	Inside	Morn.	46.45	18.10	0.7	438.398	0.009
		Even.	49.65	14.68	0.9	402.113	0.016
	outside	Morn	40.20	24.10	0.6	611.229	0.116
		Even.	50.60	14.73	2.0	552.721	0.004
Autumn	Inside	Morn.	34.45	23.30	1.3	578.898	0.033
		Even.	37.93	21.45	1.2	341.880	0.034
	outside	Morn.	30.93	31.40	0.3	485.986	0.070
		Even.	38.63	21.18	1.5	322.782	0.035

$\hat{Y}$: المحسوبة من العلاقة الخطية لمنحني المعايرة. C : تركيز المركب (نانوغرام/لتر).

جدول (2): معاملات الظروف الجوية وقيم التركيز الكلي للـ (TPAH) وتركيز الدقائق العالقة (TSP) بوحدة (µg/m^3) في محطة كهرباء الدورة.

Winter	Inside	Morn.	19.28	59.85	1.3	460.513	0.102
		Even.	22.28	52.43	2.5	251.155	0.005
	outside	Morn	13.30	78.7	1.2	290.360	0.013
		Even.	22.00	52.73	1.0	216.450	0.022
	Inside	Morn.	19.95	49.55	0.7	114.638	0.067
		Even.	24.67	36.27	1.3	195.695	0.020
	outside	Morn	14.38	71.00	1.5	231.160	0.018
		Even.	21.55	44.77	2.1	185.326	0.023

حسبت تراكيز الهيدروكربونات العطرية متعددة الحلقات الانفرادية في كل نموذج هواء من خلال منحنيات المعايرة لكل مركب ومع مقارنة كتلة المركب العطري مع كتلة الايون في طيف الكتلة حيث بينت النتائج وجود هذه المركبات بتراكيز مختلفة لكافة المواقع وحسب فترة القياس لفصلي الصيف والشتاء وكما موضح بالجداول (3 و4).

جدول (3):قيم تراكيز PAHs لنماذج الهواء (ng/m^3) باستخدام تحليلGC-MS لفصل الصيف في محطة كهرباء الدورة.

compounds	Inside/ morning	Inside / evening	Outside/ morning	Outside/ evening
	Mean ± Confidence * interval	Mean ± Confidence interval	Mean ± Confidence interval	Mean ± Confidence interval
Naph	746.540 ± 65.936	10.73 ± 0.574	68.75 ± 3.851	8.750 ± 0.621
Acy	24.00 ± 2.484	0.195 ± 0.012	1.60 ± 0.248	0.950 ± 0.124
Ace	27.00 ± 0.248	0.407 ± 0.068	2.00 ± 0.497	0.950 ± 0.124
Flu	58.295 ± 3.242	1.145 ± 0.634	5.05 ± 2.112	2.895 ± 0.261
Phe	227.150 ± 5.093	2.574 ±0.810	13.90 ± 4.472	3.50 ± 0.248
Ant	36.395 ± 1.006	0.594 ± 0.015	1.80 ± 0.248	16.00 ± 4.969
Flt	38.805 ± 2.497	0.665 ± 0.086	3.00 ± 0.497	1.950 ± 0.124
Pyr	65.050 ± 4.348	2.063 ± 0.342	6.25 ± 1.615	2.947 ± 0.132
B[a]A	3.20 ± 0.745	0.095 ± 0.012	0.385 ± 0.037	-
Chry	9.95 ± 0.124	0.190 ± 0.025	0.65 ± 0.124	-
B[b]F	-	-	0.90 ± 0.497	-
B[k]F	-	-	1.29 ± 0.770	-
B[a]P	-	-	2.05 ± 0.373	-
Ind(cd)P	11.760 ± 1.888	-	2.55 ± 0.870	-
dBA	22.745 ± 4.335	-	0.675 ± 0.062	-
BghiP	18.290 ± 0.969	-	3.85 ± 0.870	-

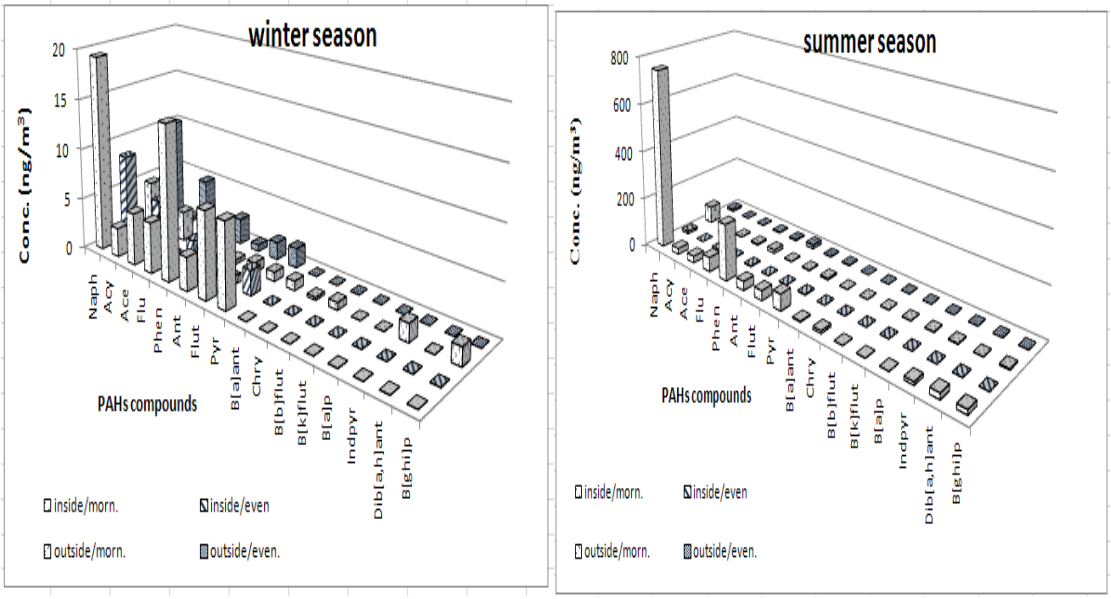
جدول (4):قيم تراكيز PAHs لنماذج الهواء (ng/m^3) باستخدام تحليل GC-MS لفصل الشتاء في محطة كهرباء الدورة.

compounds	Inside/ morning	Inside /evening	Outside/mor ning	Outside/ evening
	Mean ± Confidence* interval	Mean ± Confidence interval	Mean ± Confidence interval	Mean ± Confidence interval
Naph	19.280 ± 10.253	8.332 ± 2.466	4.549 ± 2.056	10.021 ± 0.301
Acy	2.821 ± 0.679	-	-	0.361 ± 0.133
Ace	5.046 ± 0.427	5.136 ± 1.848	2.885 ± 0.332	4.981 ± 1.626
Flu	4.919 ± 2.132	0.291 ± 0.122	0.376 ± 0.095	1.136 ± 0.502
Phe	15.020 ± 9.062	2.704 ± 0.185	2.509 ± 0.541	2.493 ± 0.186
Ant	3.236 ± 2.414	0.243 ± 0.196	0.406 ± 0.028	0.646 ± 0.276
Flt	8.368 ± 3.089	0.770 ± 0.065	0.925 ± 0.082	1.671 ± 0.258
Pyr	8.196 ± 1.301	2.365 ± 2.042	0.880 ± 0.131	1.884 ± 0.368
B[a]A	-	-	0.888 ± 0.072	-
Chry	-	-	0.259 ± 0.034	-
B[b]F	-	-	0.703 ± 0.251	-
B[k]F	-	-	-	-
B[a]P	-	-	-	-
Ind(cd)P	-	-	1.688 ± 0.047	-
dBA	-	-	-	-
BghiP	-	-	1.694 ± 0.084	-

-: غير قابلة للكشف. Mean = معدل ثلاث قراءات لكل نموذج.

***Confidence interval : فاصل الثقة = $t \times \frac{\sigma_{n-1}}{\sqrt{3}}$ ، t = 4.303 عندما يكون التكرار(n) =3.**

يلاحظ من الجدولين أعلاه بان تركيز المركبات في فصل الصيف أعلى من فصل الشتاء ويعزى السبب إلى طبيعة الظروف المناخية التي صاحبت عملية القياس وخصوصا تأثير درجة الحرارة وسرعة الرياح على التباين في تركيز المركبات العطرية كما انه سبق عملية القياس في فصل الشتاء هطول أمطار غزيرة أدى إلى تقليل المركبات في الجو. تم تمثيل توزيع المركبات بشكل ثلاثي الأبعاد وكما موضح بالشكل (3).



الشكل (3): قيم التراكيز الانفرادية للمركبات في محطة كهرباء الدورة: A – فصل الصيف، B -فصل الشتاء باستخدام تحليل GC-MS.

درس تأثير الظروف الجوية مثل درجة الحرارة والرطوبة النسبية وسرعة الرياح على انبعاث الهيدروكاربونات العطرية متعددة الحلقات (PAH) بوساطة البرنامج الإحصائي (SPSS) وباستخدام تحليل (Pearson Correlation). لوحظ ارتباط إيجابي بين التركيز الكلي لهذه المركبات (TPAH) و الرطوبة النسبية في جميع المواسم كما هو مبين في الجدول 4 ، ومن المحتمل أن يعزى السبب إلى إن ارتفاع الرطوبة النسبية يؤدي إلى زيادة كمية المركبات في الغلاف الجوي.

ويمكن ملاحظة الترابط الإيجابي القوي بين درجة الحرارة و التركيز الكلي الهيدروكاربونات العطرية متعددة الحلقات (TPAH) في كل من الصيف والشتاء والربيع بينما علاقة شبه ضعيفة في فصل الخريف. هناك علاقة قوية بين التركيز الكلي للدقائق العالقة (TSP) ودرجة الحرارة والرطوبة النسبية في فصلي الربيع والخريف مقارنة مع فصلي الشتاء والصيف وقد يعزى السبب إلى إن درجة الحرارة في فصلي الربيع والخريف تكون معتدلة مما يؤدي إلى زيادة تركيزها في الجو مقارنة بفصل الصيف والشتاء[15] .

جدول (4): حساب Pearson Correlations لتأثير معلمات الظروف الجوية على تركيز المركبات في المواسم المختلفة.

Parameters	Temp. (^oC)	Hum.%	Wind (m/s)	Tsp	TPAHs
Tsp μ(g/m^3)	-0.973*	0.985*	0.931	1	
TPAHs μ(g/m^3)	-0.946	0.883	0.684	0.893	1

Correlations - Spring

Parameters	Temp. (^oC)	Hum. %	Wind (m/s)	Tsp	TPAHs
Tsp μ(g/m^3)	0.457	-0.538	-0.838	1	
TPAHs μ(g/m^3)	-.0952*	0.942	0.822	-0.452	1

Correlations – Summer

Parameters	Temp. (^oC)	Hum. %	Wind (m/s)	Tsp	TPAHs
Tsp (μg/m^3)	-0.432	0.422	-0.662	1	
TPAHs (μg/m^3)	0.864	-0.799	0.999**	-0.629	1

Correlations - Autumn

Parameters	Temp. (^oC)	Hum.%	Wind (m/s)	Tsp	TPAHs
Tsp (μg/m^3)	-0.865	0.862	-0.846	1	
TPAHs (μg/m^3)	-0.631	0.823	-0.778	.499	1

Correlations - Winter

References

1. Lao, R. C.; Thomas, R. S.; Oja, H. and Dubois, L. (1973). Application of gas chromatograph-mass spectrometer-data processor combination to the analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and polychlorinated biphenyls. Anal. Chem., 65: 338-344.
2. Harvey, R. G. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. John Wiley & Sons: New York, 1997.
3. Schauer, C.; Niessner, R. and Poschl, U. (2003).Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in urban air particulate matter: decadal and seasonal trends, chemical degradation, and sampling artifacts. Environ. Sci. Technol., 37: 2861-2868.
4. Ravindra, K, Sokhi, R, Van Grieken, R. (2008). Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Source attribution, emission factors and regulation. Atmos. Environ., 42: 2895-921.
5. Allen, J.O. and Dookeran, N. M. (1996). Measurement of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons associated with size-segregated atmospheric aerosols in Massachusetts. Evnrion. Sci. Technol., 30: 1023-1031.
6. Rajput, N. and Lakhani, A. (2010). Measurement of polycyclic aromatic hydrocarbon in an urban atmospheric of Agra, India. Atomósfera, 23(12): 165-183.
7. Weingartner, E.; Burtscher, H. and Baltensperger, U. (1997). Hygroscopic properties of carbon and diesel soot particles". Atmos. Environ., (14) 31: 2311-2327.
8. Nirat, R. and Anita, L. (2009). Measurements of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons at an industrial site in India. Environ. Monitor Assess, 50: 273–284**.**
9. Freeman, D. J. and Cattell, F. R. (1990). Wood burning as a source of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons. Environ Sci. Technology, 24 1581–1585.
10. Lim, L. H.; Harrison, R. M. and Harrad, S. (1999). The contribution of traffic to atmospheric concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons". Environ. Sci. Technology, 33: 3538–3542.
11. Phillips, D. H. (1999). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the diet. Mutat. Res., Genet. Toxicol. Environ. Mutagen., 443 139 - 47.

12. World Health Organization (WHO) International Program on Chemical Safety (IPCS). Selected non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons. Environmental health criteria 202. World Health Organization (WHO), Geneva, 1998.

13. Dejean, S. and Raynaud, C. (2009). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in atmospheric urban area: monitoring on various types of sites. Environ. Monit. Assess, 148: 27–37.

14. Menezes, H.C. and Cardeal, Z. L. (2011). Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from ambient air particulate matter using a cold fiber solid phase microextraction gas chromatography–mass spectrometry method". J. Chromatogr., A, 1218: 3300–3305.

15. Callén, M. S.; de la Cruz, M. T.; López, J. M. and Murillo, R. (2008). Long-Range Atmospheric Transport and Local Pollution Sources on PAH Concentrations in a South EuropeanUrban Area. Fulfilling of the European Directive. Water Air Soil Pollut., 190:271–285.

Iraqi Journal of Biotechnology, 2015, Vol. 14, No. 2 , 415-426

تقدير وتشخيص Proanthocyanidine في مخلفات عصير العنب المطحونة وغير المطحونة بجهاز الكروماتوكرافي السائل عالي الاداء

نضال محمد صالح [1] ، رؤى جاسم كاظم[2]

قسم علوم الأغذية والتقانات الاحيائية / كلية الزراعة / جامعة بغداد

الخلاصة : أجريت الدراسة على مخلفات عصير العنب المطحونة وغير المطحونة والتي تشمل البذور والقشرة وباقي لحمة الثمرة Flesh ، بهدف استخلاص مركب البروانثوسيانيدين Proanthocyanidin من هذه الأجزاء الثلاثة المجتمعة في مخلفات العنب بعد عصره ، أظهرت نتائج التقدير الكمي لمستخلص مخلفات عصير العنب المطحونة وغير المطحونة ، تفوق مستخلص المخلفات غير المطحونة في محتواه البروانثوسيانيدين على مستخلص المخلفات المطحونة. كما أجريت دراسة فصل وتشخيص البروانثوسيانيدين المستخلص من مخلفات عصير العنب المطحونة وغير المطحونة بتقنية HPLC وأمكن بذلك الاستدلال على وجود اكثر من قمة لكل مستخلص إذ تمثل كل قمة نوعاً من انواع البروانثوسيانيدين وكان التركيز للقمة 1 و2 العائدة لمستخلص المخلفات المطحونة 9660 و2680 جزء في المليون على الترتيب ، وبلغ في مستخلص المخلفات غير المطحونة 13800 ، 35980 و11240 جزء في المليون للقمم 1 ، 2 و3 على الترتيب .

Determination and identification of proanthocyanidine in milled and non-milled grape juice wastes by high performance liquid chromatography

Nidhal Mohammad Salih[1], Roa'a Jassim Kadim[2]

Department of Food Science and Biotechnology/College of Agriculture/University of Baghdad

Abstract: This study had been conducted on milled and non-milled grape juice wastes extract including seeds, peels and flesh of the fruit in order to extract Proanthocyanidin from these parts. The quantitative determination results of milled and non-milled grape juice wastes extract showed that the non-milled wastes extract had the higher content of proanthocyanidin comparison with milled wastes extract. The study of separation and diagnosis of pranthocyanidin from the milled and non-milled grape juice wastes extracts was performed by HPLC technology which revealed that the total concentration of pranthocyanidin the milled grape juice wastes extracts was 2680 and 9660 ppm in 1,2 peaks respectively , while it reached to 11240,35980 and 13800 ppm in the non-milled grape juice wastes extracts of 1,2,3 peaks respectively.

Key wards : grape juice wastes, Proanthocyanidine, HPLC .

المقدمة

البروانثوسيانيدين مركب رئيس من المركبات الفينولية الموجودة في العنب (1) . حيث يتوزع في

NIDHALSPRING@YAHOO.COM .1
2. **البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الثاني**

الاجزاء الصلبة من عنقود العنب مثل الساق والقشور والبذور (2). البروانثوسيانيدين مركب ذائب في الماء غير سام ومتوفر حيوياً بدرجة كبيرة (3) ، وعديم اللون و ينتج مركب الانثوسيانيدين Anthocyanidin الملون عند كسر الاصرة التي تربط وحدات الـ flavan عند التسخين في وسط حامضي (5,4). ان وحدة flavan-3-ol هي النواة المكونة للبروانثوسيانيدين والتي تكون عبارة عن وحدات من Catechin (+) و epicatechin (-) وان الاختلاف فيما بينها يكمن في أن Catechin(+) يكون بشكل 2,3- Trans أما epicatechin(-) يأخذ شكل 2,3-Cis (6). يتميز البروانثوسيانيدين بعدد من الفوائد والوظائف الحيوية المهمة لصحة جسم الانسان إذ انه يعمل كمضاد لامراض السرطان والحساسية والالتهابات فضلاً عن فعالياتة الموسعة للاوعية الدموية (7). أثبتت عدة دراسات ان تناول البروانثوسيانيدين المستخلص من بذور العنب له عدة فوائد كما في حالة الحساسية من الانسولين والتقليل من الأعراض المزمنة المتصلة بسن الشيخوخة وامراض السكري والفشل الكلوي وامراض الجهاز العصبي وارتفاع ضغط الدم فضلاً عن تليف الكبد (8، 9، 10). كذلك يعتبر البروانثوسيانيدين المستخلص من بذور العنب هو أفضل كابح للجذور الحرة ومثبط لتلف الانسجة التأكسدي داخل جسم الكائن الحي اكثر من فيتامين C وE والبيتاكاروتين(11) بالاضافة الى انه يعمل كمضاد للبكتريا والفطريات والفايروسات (12، 13). كذلك يدخل البروانثوسيانيدين في تحضير المواد المستعملة في لصق الاخشاب وتنقية المياه فضلاً عن استعماله كمادة مضافة للطين في عمليات التنقيب عن النفط (14) ، وبصورة عامة تستعمل المركبات الفينولية في مجال التصنيع الكيميائي لانتاج المبيدات الحشرية والادوية والاصباغ فضلاً عن استعمالها في عملية القصر في صناعة الورق (15). توجه الاهتمام في السنوات الأخيرة الى مخلفات التصنيع الغذائي التي تطرحها معامل الأغذية إذ تقوم هذه المعامل بطرح كميات هائلة من بذور الثمار والمخلفات الزراعية نواتجاً عرضية وبعد ان كشفت التحاليل الكيميائية عن احتواء تلك المخلفات على مركبات كيميائية متنوعة ذات تأثيرات حيوية مختلفة تتصدرها المركبات الفينولية مما شجع الباحثين على القيام بدراسات مختلفة لتحويل تلك المخلفات الى مواد ذات فائدة طبية وصيدلانية وغذائية وصناعية ، وللهدف نفسه الذي استهوى الباحثين من الاستفادة من مخلفات التصنيع الغذائي والمساعدة في تخليص البيئة من التلوث بها ، فقد هدفت الدراسة الحالية الى الاستفادة من مخلفات عصير العنب صنف *Vitis vinifera L.* الناتجة من صناعة عصير الزبيب وتقدير وتشخيص محتواها من المركب الفعال البروانثوسيانيدين ذا الأهمية الحيوية.

المواد وطرائق العمل

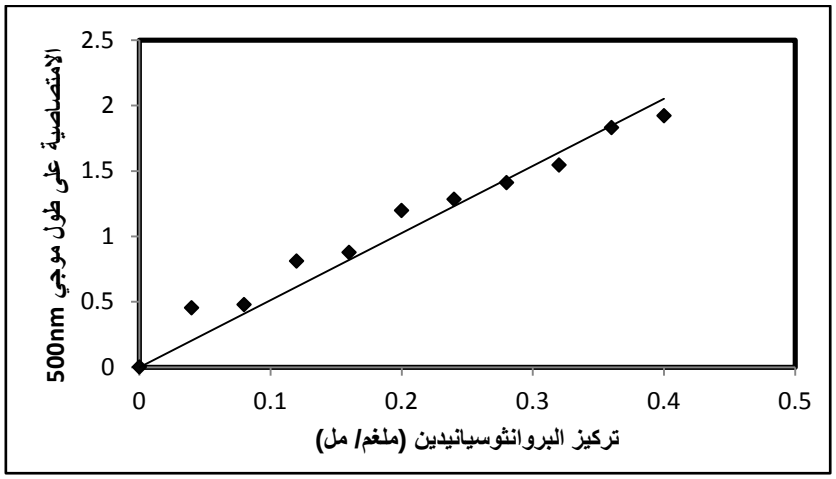
تم الحصول على مخلفات عصير العنب الطازجة من احد محلات إعداد الشربت في الفلوجة . وقد جمعت المخلفات بمقدار25 كغم تقريباً ثم غسلت بماء الحنفية وجففت تجفيفاً طبيعياً بفرشها في الظل مع التقليب المستمر، بعدها قسمت المخلفات الى قسمين الاول حفظ في اكياس من البولي اثلين والقسم الاخر تم طحنه بمطحنة كهربائية وحفظه ايضاً في اكياس البولي اثلين لحين الاستعمال. وتم أستخلاص البروانثوسيانيدين بأتباع طريقتين في الاستخلاص من مخلفات عصير العنب المطحونة وغير المطحونة ، الاولى باتباع طريقة (16) في الاستخلاص إذ مزج 10 غم من مخلفات مع 100 مل من الكلوروفورم في

دورق محكم الغلق وترك لمدة ساعة على جهاز الهزاز Shaker ثم رشح المستخلص ، وكررت هذه العملية مرتين على المخلفات نفسها لغرض أتمام عملية الاستخلاص ، ركز الراشح الى 50% بجهاز المبخر الدوار تحت الضغط المخلخل على درجة حرارة 40 مْ بعدها اضيف 50 مل من خلات الاثيل Ethyl acetate وترك لمدة ساعة على الهزاز ، ثم وضع المستخلص في قمع الفصل لفصل الطبقة السفلية الحاوية على البروانثوسيانيدين مخلفاً الطبقة العلوية الحاوية على الزيوت ، وبخر المستخلص الى 10% بجهاز المبخر الدوار تحت ضغط مخلخل على درجة حرارة 40 مْ ثم وضع المستخلص النهائي في اطباق لغرض التجفيف بالفرن الكهربائي على درجة حرارة 40 مْ وقشط ثم حفظ المستخلص المجفف بقناني معتمة ومحكمة الغلق بدرجة حرارة الثلاجة لحين الاستعمال . اما الطريقة الثانية فاتبعت الطريقة الموصوفة من قبل(17) إذ تم خلط 25 غم من المخلفات مع 250.

مل من مزيج أسيتون : ماء بنسبة (3:7) في دورق محكم الغلق وترك على الهزاز بدرجة حرارة الغرفة لمدة ساعة ، كررت عملية اضافة المذيب ثلاث مرات إذ يضاف في كل مرة 250 مل لاتمام عملية الاستخلاص ، رشح المستخلص وركز بجهاز المبخر الدوار تحت ضغط مخلخل وعلى درجة حرارة 38 مْ ليصبح حجم المستخلص النهائي 150 مل ، ثم وضع المستخلص في قمع الفصل واضيف الهكسان ثلاث مرات بواقع 150 مل في كل مرة بهدف التخلص من الزيوت، بعدها اضيف 150 مل من الايثر النفطي Petroleum ether بديلا عن dichloromethane الى المستخلص الناتج من عملية الفصل وكررت العملية ثلاث مرات في قمع الفصل للتخلص الكامل من الزيوت والشموع ، جفف المستخلص الناتج بالفرن الكهربائي على درجة حرارة 40 مْ بوضعه في اطباق ثم جمع المستخلص المجفف ووضع في قناني معتمة ومحكمة الغلق وحفظ بدرجة حرارة الثلاجة لحين اجراء بقية الاختبارات اللازمة على وفق متطلبات الدراسة.

التقدير الكمي للبروانثوسيانيدين :

أتبعت طريقة (18) في تقدير المحتوى الكلي من البروانثوسيانيدين ، إذ اذيب 1ملغم من مسحوق المستخلص المجفف للمخلفات المطحونة وغير المطحونة في 1مل من الكحول المثيلي واضيف اليه 9 مل كاشف الفانيلين وتم الخلط بالمازج لمدة 10 ثواني ثم حضن بدرجة حرارة 19-21 مْ وبعد مرور 15 دقيقة قيست الامتصاصية على طول موجي 500 نانومتر ، وبالرجوع الى المنحنى القياسي قدرت كمية البروانثوسيانيدين في المستخلص الشكل (1).



شكل (1): المنحنى القياسي للبروانثوسيانيدين Proanthocyanidin

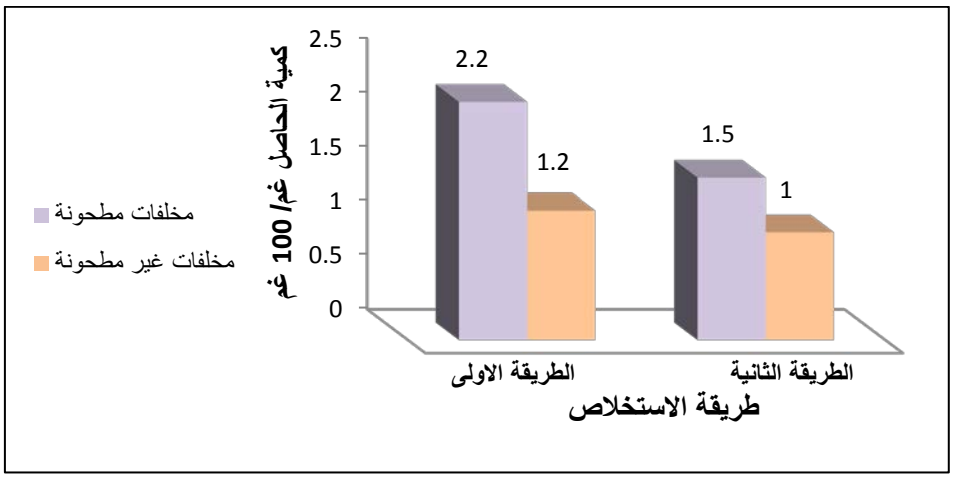
تقنية كروماتوكرافي السائل عالي الأداء HPLC :

استعملت هذه الطريقة في تشخيص البروانثوسيانيدين في مستخلص مخلفات عصير العنب المطحونة وغير المطحونة، و اتبعت الظروف نفسها التي ذكرها (19) مع بعض التحوير باستعمال عمود فصل نوع O.D.S وحجم الدقائق 5 ميكرون (250 ملم × 4.6 ملم) والطور المتحرك Mobile phase ميثانول : حامض الخليك : ماء وبالنسب (50 : 8 : 42) ح/ح وبمعدل جريان Flow rate 1.5 مل/ دقيقة ، بدرجة حرارة 30 مْ أما الطول الموجي Wave length المستعمل هو 280 نانوميتر. تم الفحص بأخذ 1مل من المستخلص واضيف له 1مل من الطور المتحرك وبعد ان مزجت جيداً باستعمال المازج Vortex حقن 5 مايكروليتر منه في الجهاز وقورن زمن احتجاز المركب للأنموذج Retention time مع زمن ظهور المركب القياسي.

النتائج والمناقشة

الاستخلاص:

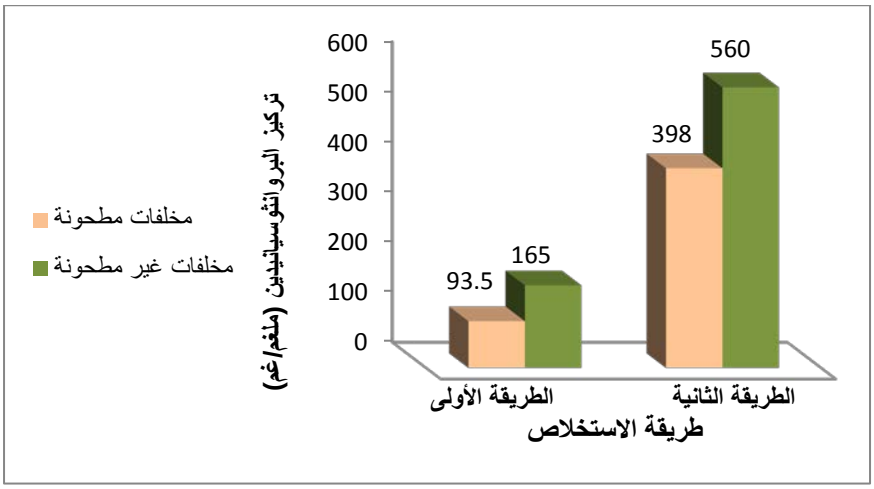
بعد أن تم استخلاص مخلفات عصير العنب المطحونة وغير المطحونة بطريقة الاستخلاص الأولى بوساطة الكلوروفورم ثم بخلات الاثيل والثانية اسيتون : ماء (3:7) ثم بالهكسان وبعدها بالأثير النفطي حسبت كمية الحاصل لكل مستخلص ولكل طريقة استخلاص الشكل (2). وكانت حصيلة الاستخلاص لمستخلص المخلفات المطحونة أعلى من غير المطحونة ، إذ تؤثر عملية الطحن في زيادة نسبة استخلاص المركبات غير المرغوب فيها والشوائب (20) . كما أن حصيلة الاستخلاص للطريقة الأولى أعلى من الطريقة الثانية وهذا قد يعود إلى اختلاف أنواع المذيبات المستعملة في الطريقتين ، إذ ان لمذيب الاستخلاص دوراً مهماً في تحديد كمية ونوعية المركبات الفينولية المستخلصة (21) . ويتحكم نوع المذيب (قطبيتة) المستعمل في عملية الاستخلاص بنوع المركبات الفينولية المستخلصة (22) . فلمذيب الاستخلاص خلات الاثيل Ethyl acetate المستعمل في الطريقة الأولى القدرة على استخلاص البروانثوسيانيدين ذو الأوزان الجزيئية الواطئة (16) . أما الاسيتون acetone المستعمل في الطريقة الثانية فله القدرة على استخلاص البروانثوسيانيدين ذو الأوزان الجزئية العالية وهذا يتفق مع ما أشار إليه (23) كلما زادت الأوزان الجزيئية للبروانثوسيانيدين المستخلص قلت حصلية الاستخلاص والعكس صحيح .



شكل (2) كمية الحاصل لمستخلص مخلفات عصير العنب المطحونة وغير المطحونة بطريقتي الاستخلاص الاولى والثانية.

التقدير الكمي للبروانثوسيانيدين :

قدرت كمية البروانثوسيانيدين التي حسبت على أساس مركب البروانثوسيانيدين Proanthocyanidi القياسي شكل (1) لمستخلص مخلفات عصير العنب المطحونة وغير المطحونة وباختلاف طريقة الاستخلاص ، ويظهر الشكل (3) ارتفاع تركيز البروانثوسيانيدين لطريقة الاستخلاص الثانية في كل من مستخلص المخلفات المطحونة وغير المطحونة واقلها عند الاستخلاص بالطريقة الأولى لكلا نوعي المستخلص في حين كان تركيز البروانثوسيانيدين أعلى في مستخلص المخلفات غير المطحونة عن مستخلص المخلفات المطحونة لكلتا طريقتي الاستخلاص ، وكان تركيز البروانثوسيانيدين 93.5 و 165 ملغم/غم لمستخلص المخلفات المطحونة وغير المطحونة بالطريقة الأولى على الترتيب و398 و560 ملغم/غم لمستخلص المخلفات المطحونة وغير المطحونة بالطريقة الثانية على الترتيب. وقد يعزى سبب انخفاض تركيز البروانثوسيانيدين في مستخلص المخلفات المطحونة الى تأثير عملية الطحن التي تزيد في استخلاص الشوائب التي تعيق أو تمنع الحصول على البروانثوسيانيدين فضلاً عن أن عملية الطحن تؤدي الى اكسدة المركبات الفعالة وتحويلها الى مركبات أخرى (24) ، وهذا ما أكدته (20) من احتواء بذور العنب غير المطحونة على اكثر من ستة أضعاف كمية البروانثوسيانيدين في البذور المطحونة تقريبا ولجميع أصناف العنب التي درستها الباحثة نفسها وباختلاف مواسم تجربته .



شكل (3) تركيز البروانثوسيانيدين في مستخلص مخلفات عصير العنب المطحونة وغير المطحونة

وتوافقت نتائج هذه الدراسة مع ما بينه (25، 26) من ضرورة استعمال بذور العنب الكاملة من دون طحنها عند الاستخلاص لان حصيلة البروانثوسيانيدين ستكون مضاعفة ، إذ ان البروانثوسيانيدين يؤلف 95% تقريبا من المكونات الكيميائية الرئيسة لبذور العنب ، كما يوضح الشكل ارتفاع تركيز البروانثوسيانيدين لطريقة الاستخلاص الثانية على الطريقة الأولى لكلا المستخلصين ، وهذا قد يعزى الى نوع المذيب المستخدم في الاستخلاص ، إذ ان نوع المذيب يحدد نوع وكمية الفينولات المستخلصة (21) . وهذا يوافق مع ما وجدته (27) من تفوق الاسيتون 70% على المذيبات المستعملة في الدراسة في استخلاص الفينولات و التانينات والبروانثوسيانيدين من بذور العنب ويليه الايثانول والميثانول وابدى المستخلص المائي ومستخلص حامض الفورميك ومستخلص خلات الاثيل محتوى واطئاً من المركبات

المذكورة ، وهذا قد يعود الى الانتقائية العالية للاسيتون و قابليته على استخلاص البروانثوسيانيدين حتى وان كان وزنه الجزئي عالياً (23) . اما خلات الاثيل فيقتصر دورها في استخلاص البروانثوسيانيدين ذو الوحدات القليلة والاحادية وان هذه الوحدات الأحادية تكون ذات استجابة قليلة في هذا التقدير فتعطي لوناً اضعف مقارنةً مع البوليمرات وهذا ما يعطي امتصاصية وتركيز أقل (16، 28) . أو قد يعزى السبب الى إضافة الماء للاسيتون 30% من دون اضافته الى خلات الاثيل إذ أن الماء يزيد من كفاءة المذيب على استخلاص المركبات الفعالة وهذا يتفق مع ما أشار إليه (29) الى أن خلات الاثيل غير فعالة لوحدها في استخلاص البروانثوسيانيدين من بذور العنب لعدم قدرتها على التغلغل الى داخل أنسجة البذور واستخلاص البروانثوسيانيدين ولكن خلط الماء مع خلات الاثيل يزيد من كفاءتها في الاستخلاص بسبب زيادة النفاذية ، وهذا ما وجدته (20) من أن الماء مع خلات الاثيل يزيد من نفاذيته داخل انسجة البذور لذلك يصبح اكثر قابلية على الانتقال من خلال الانتشار الجزيئي وأن افضل نسبة هي 10% والزيادة الاكثر تؤدي الى اذابة مركبات أخرى غير مرغوب فيها لكون الماء مذيباً عضوياً قوياً . وبصورة عامة تختلف تراكيز البروانثوسيانيدين اعتماداً على نوع النبات والجزء النباتي المستخلص منه وهذا ما اكدته دراسات عدة إذ بين(30) احتواء المستخلص الايثانولي لنبات الصنوبر على 360 ملغم/غم من البروانثوسيانيدين ، ومع ما توصل إليه (31) عن تراوح تركيز البروانثوسيانيدين بين 44-145 ملغم/غم عند دراسة محتوى وتركيب البروانثوسيانيدين في تسعة انواع من نبات البتولا.

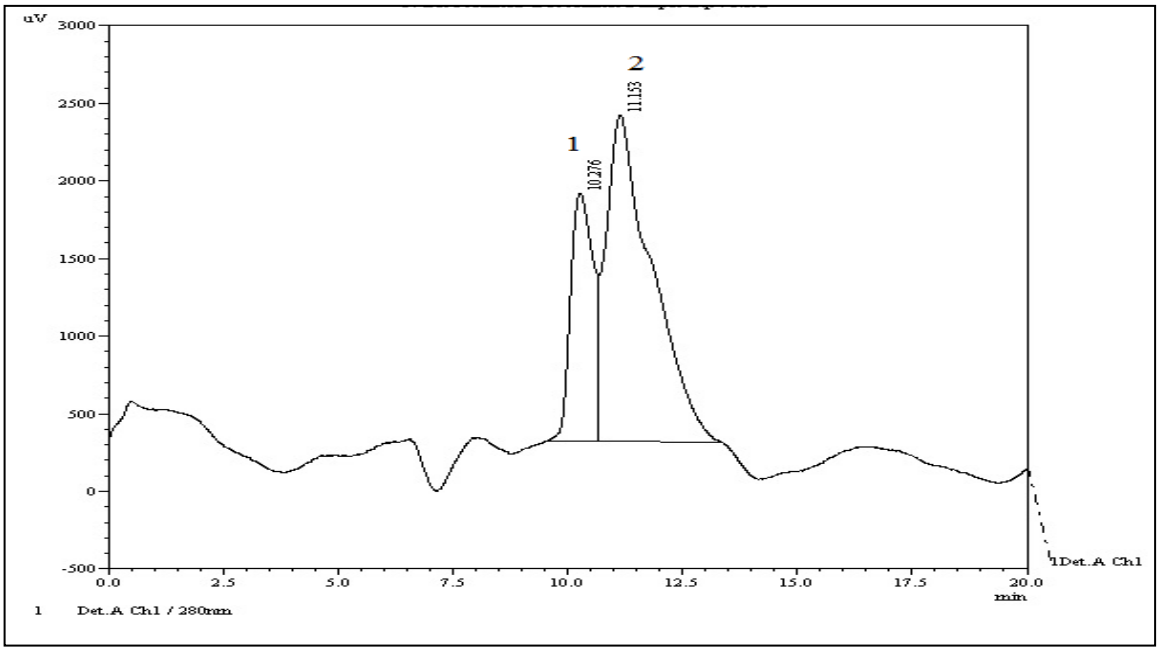
كروماتوكرافي السائل عالي الأداء HPLC :

أظهرت النتائج المبينة في الجدول (1) والاشكال (4) و(5) و(6) تقارب نتائج استخدام تقنية HPLC لمستخلص مخلفات عصير العنب المطحونة وغير المطحونة المستخلصة بالطريقة الثانية مع نتائج المركب القياسي البروانثوسيانيدين Proanthocyanidin ، إذ تبين امتلاك المركب القياسي قمتين 1 و2 وهذا يدل على وجود نوعين من المركب القياسي والتي يتطابق وقت الاحتجاز لها مع وقت احتجاز القمة 1 و2 العائدة لمستخلص المخلفات المطحونة والتي بلغ تركيزها من البروانثوسيانيدين 9660 و2680 جزء في المليون على الترتيب ، كذلك بينت النتائج امتلاك مستخلص المخلفات غير المطحونة على ثلاث قمم وان القمة 1 و2 للمستخلص يتطابق فيها وقت الاحتجاز مع القمة 1 للمركب القياسي ، أما القمة 3 فتتطابق مع وقت احتجاز القمة 2 في المركب القياسي وبذلك بلغ تركيز البروانثوسيانيدين في المستخلص الأخير 13800 ، 35980 و11240 جزء في المليون للقمة 1 ، 2 و3 على الترتيب ، ان هذه المعطيات التي تم الحصول عليها بتطبيق تقنية HPLC توافقت مع ما وجده (32، 33) ان للبروانثوسيانيدين اكثر من قمة وكل قمة تمثل نوعاً معيناً من انواعه ، كذلك تتفق النتائج مع ما توصلت إليه (20) من ظهور قمتين للمركب القياسي البروانثوسيانيدين Proanthocyanidin عند الفصل بتقنية HPLC . يلاحظ من الشكل (6) ظهور قمة 3 و4 عند فصل مستخلص مخلفات عصير العنب المطحونة والتي تعود الى مركبات اخرى غير المركب المطلوب دراسته والتي ربما ظهرت نتيجة تأثير عملية الطحن وما تسببه من ظهور مركبات وشوائب غير مرغوبة ، ونستدل من هذه النتائج على ارتفاع تركيز البروانثوسيانيدين في مستخلص المخلفات غير المطحونة مقارنةً مع مستخلص المخلفات المطحونة وهذا ماتوصلت اليه (20) من احتواء بذور العنب غير المطحونة على اكثر من ستة أضعاف من كمية البروانثوسيانيدين في البذور المطحونة تقريباً ، ومتفقة ايضاً مع ماتوصل اليه (24) من ان تركيز البروانثوسيانيدين في مستخلص البذور الكاملة غير المطحونة أعلى من تركيزها في البذور المطحونة ، ومن النتائج المستحصل

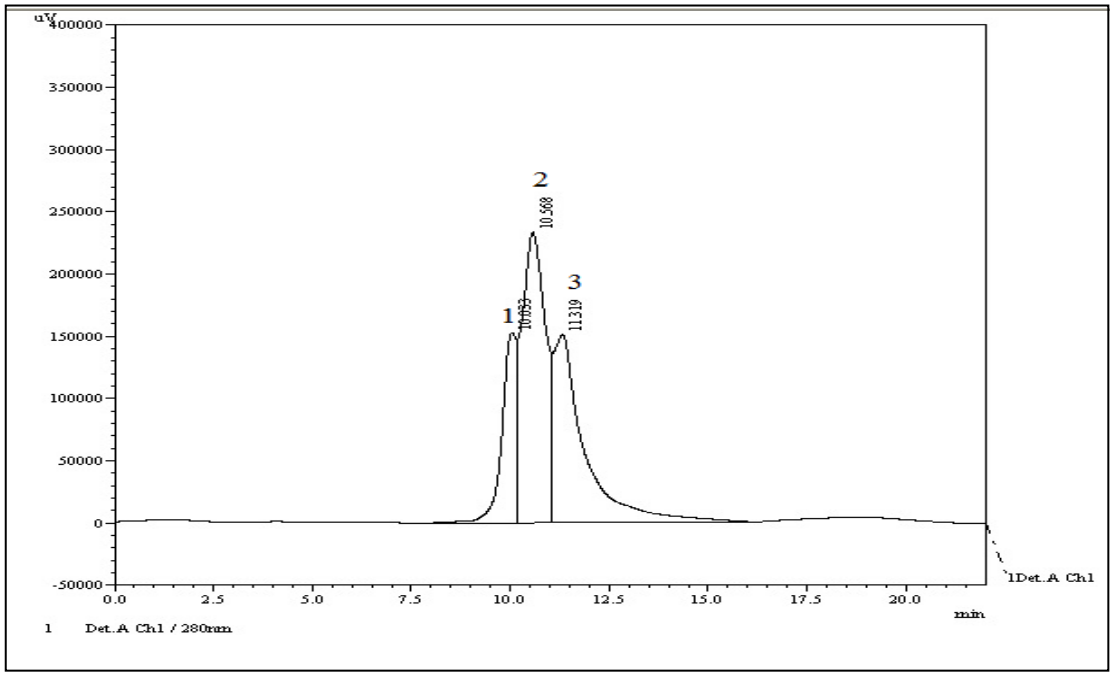
عليها باستعمال تقنية HPLC والتقدير الكمي للبروانثوسيانيدين نستدل على ان مستخلص مخلفات عصير العنب غير المطحونة محتواها اعلى من هذا المركب من المخلفات المطحونة ، إذ تتألف هذه المخلفات من الساق والقشور ولحمة الثمرة والبذور والتي يكون فيها البروانثوسيانيدين هو المركب الرئيس من المركبات الفينولية (2) إذ يكون تركيز هذا المركب في البذور 19-43 ملغم/غم و2-21 ملغم/غم في القشور (34) .

جدول (1) وقت احتجاز RT المركب القياسي البروانثوسيانيدين ومستخلص مخلفات عصير العنب المطحونة وغير المطحونة ونسب وجودها

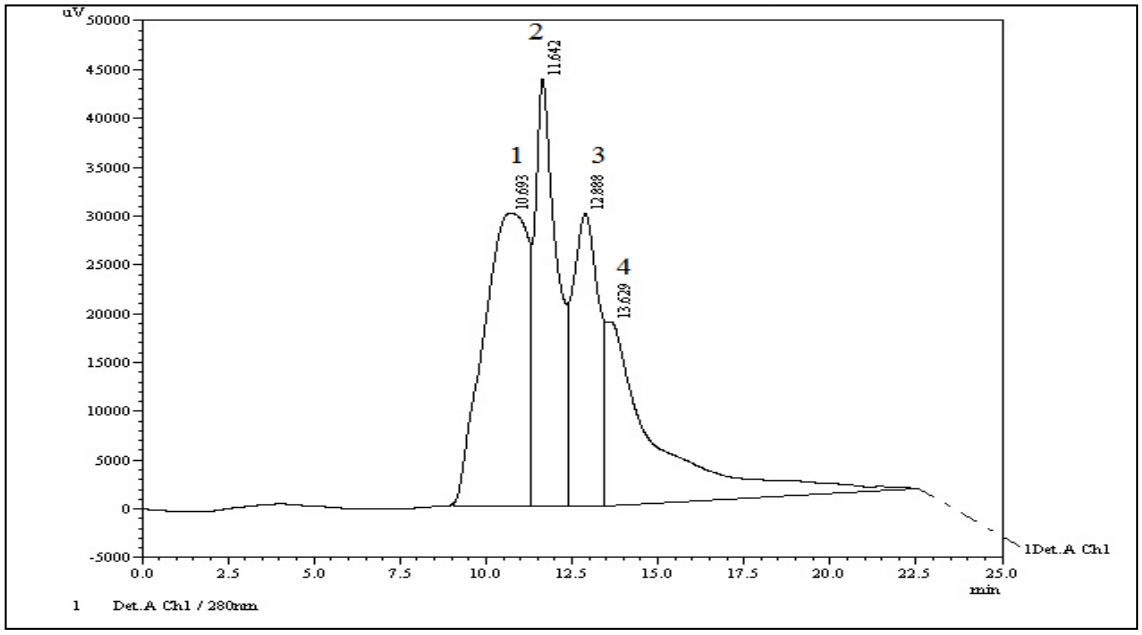
ت	المركبات	رقم القمة	وقت الاحتجازRT	كمية المركب في المستخلص ppm
1	Proanthocyanidin	1	10.276	---
		2	11.153	---
2	مستخلص المخلفات المطحونة	1	10.693	9660
		2	11.642	2680
3	مستخلص المخلفات غير المطحونة	1	10.033	13800
		2	10.568	35980
		3	11.319	11240



شكل (4) كروماتوكرام يبين تركيز البروانثوسيانيدين القياسي بتقنية كروماتوكرافي السائل عالي الأداء HPL



شكل (5) كروماتوكرام يبين تركيز البروانثوسيانيدين بتقنية كروماتوكرافي السائل عالي الأداء HPLC لمستخلص مخلفات عصير العنب غير المطحونة



شكل (6) كروماتوكرام يبين تركيز البروانثوسيانيدين بتقنية كروماتوكرافي السائل عالي الأداء HPLC لمستخلص مخلفات عصير العنب المطحون

المصادر

1. Spranger, M.I.; Sun, B.S.; Leandro, M.C.; Cavalho, E.C.and Bechior A.P. (1998). Changes in anthocyanins, catechins and proanthocyanidins during fermentation and early post-fermentation of red grapes. In: Proceeding of XXIII Word Congress on Vine and Wine, Lisbon, Portugal, II:183-189.
2. Peyrot Des Gachons, C. and Kennedy, J.A. (2003). Direct method for determining seed and skin proanthocyanidin extraction into red wine. *J. Agric. Food Chem., 51*: 5877-5881.
3. Passwater, R.A.and Kandaswami, C.(1994). Pycnogenol :The Super˝ Protector˜ Nutrient .Keats Publishing Inc., Connecticut.
4. Glories ,Y. (1978). Recherches sur la matière colorante des vins rouges. PhD. Thesis of State, Université de Bordeaux II.
5. Sun,B.;andSprangerM.I.(200). Quantitative extraction and analysis of grape and wine proanthocyanidins and stilbenes (Review). Ciência Têc Vitiv., 20 (2): 59-89.
6. Foo, L.Y. and Porter, L.J. (1980). The phytochemistry of proanthocyanidin polymers. *Phytochemistry*, 19: 1747–1754.
7. Bagchi, D.; Garg, A.; Krohn, R.L.; Bagchi, M.; Tran, M.X. and Stohs, S.J. (1997): Oxygenfree radical scavenging abilities of vitamins C and E, and a grape seed proanthocyanidin extract in vitro. Res Commun Mol Pathol Pharmacol,l95: 179–189.
8. Packer, L.; Rimbach,G.and Virgili, F. (1999).Antioxidant activity and biological properties of a procyanidin-rich extract from pine (*Pinus maritima*) bark, pycnogel. Free Radic Biol Med.,27: 704-24.
9. Schonlau, F.and Rohdewald, P. (2001). Pycnogenol for diabetic retinopathy. A review. *Int Ophthalmol*, 24:161-171.
10. Preuss, H.G.; Bagchi, D. and Bagchi, M.(2002).protective effects of anovel niacin-bound chromium complex and a grape seed proanthocyanidin extract on advancing age and varions aspects of syndrome x. Ann NY Acad Sci.,957:250-9.
11. Murray, M. and Pizzorno, J. (1999). Procyanidolic oligomers. In: Murray M, Pizzorno J, eds. *The Textbook of Natural Medicine*. 2nd ed. London: Churchill Livingston, 899-902.

12. Bruno, G. and Sparapano, L. (2007).Effects of three esca-associated fungi on *Vitis vinifera* L : V. Changes in the chemical and biological profile of xylem sap from diseased cv. Sangiovese vines. *Physiol. Mol. Plant Pathol., 71*:210–229.

13. Chavez, J.H.; Leal, P.C.; Yunes, R.A.; Nunes, R.J.; Barardi, C.R.; Pinto, A.R.;Simoes,C.M.andZanetti, C.R.(2006).Evaluation of antiviral activity of phenolic compounds and derivatives against rabies virus. *Vet. Microbiol., 116*: 53–59.

14. Venter, P.B.; Senekal, N.D.; Amra-Jordaan,M.; Bonnet, S.L. and Westhuizen, J.H.(2012). Analysis of commercial proanthocyanidins. Part2: An electrospray mass spectrometry investigation into the chemical composition of sulfited quebracho (*Schinopsis lorentzii* and *Schinopsis balansae*) heartwood extract. Phytochemistry ,78156– 169.

15. Li, Z.H.; Wang, Q.; Ruan, X.; Pan, C.D. and Jiang, De-An.(2010). Phenolic and Plant Allelopathy(Review).*Molecules*,15: 8933-8952.

16. Kennedy, J.A, (2002). Proanthocyanidins: Extraction, Purification, and Determination of Subunit Composition by HPLC. Current Protocols in Food Analytical,11.4.1-11.4.11.

17. Wei,S.D.; Lin, Y.M.; Liao,M.M.; Chai, W.M.and Zhou,H.C.(2012). Structural Composition and Free Radical Scavenging Activity of Structural Composition and Free Radical Scavenging Activity of Proanthocyanidins Extracted from *Grevillea robusta*. Rec. Nat Prod., 6 (3):218-229.

18. Broadhurst, R.B.; Jones, W.T. (1978) Analysis of condensed tannins using acidified vanillin, *J. Sci. Food Agric*., *29*: 788–794.

19. بلاسم ، زياد طارق .(2000). دراسات في الجهد الاليلوباثي لاصناف مختلفة من زهرة الشمس Helianthus annuns L. . رسالة ماجستير – كلية الزراعة –جامعة بغداد .

20. المالكي ، زينب صاحب لازم (2004).دراسة محتوى بعض أصناف العنب المحلي .Vitis vinfera L من المركبات الفينولية.أطروحة دكتوراه – كلية الزراعة – جامعة بغداد .

21. Hismath, I., Wan Aida, W. M. and Ho, C.W (2011). Optimization of extraction conditions for phenolic compounds from neem (Azadirachta indica) leaves. International Food Research Journal, 18(3): 931-939 .

22. Naczk, M.; and Shahidi, F.(2004). Extraction and analysis of phenolics in food(Review). Journal of Chromatography A,1054:95-111.

23. Prior, R.L. and Gu, L. (2005). Occurrencand biological significance of proanthocyanidins in the American diet. Phytochemistry, 66: 2264 – 2280.

24. Pekic, B.; Kovac, V.; Alonso, E. and Revilla, E.(1998).study of the extraction of proanthocyanidins from grape seed.Food Chemistry, 61(1/2):201-206 .

25. Bourzeix, M.; Weyland, D. and Heredia, N.(1986). Étude des catéchines et des procyanidols de la grappe de raisin, du vin et d.autres dérivés de la vigne. Bull O.I.V., 59: 1171-1254.

26. Kovac, V.; Alonso, e. and Revilla, E.(1995).the effects of adding supplement ary quantities of seeds during fermentation on the phenolic composition of the wine. American. J. of Enology and Viticulture, 46:363-367 .

27. جبار، مريم هادي .(2013). استخلاص البروانثوسيانيدينات وتنقيتها جزئياً من بذور العنب (*Vitis vinfera*) ونوى التمر (*Phoenix dactylifera*) ودراسة بعض من فعالياتها الحيوية . رسالة ماجستير – قسم علوم الحياة – كلية العلوم –جامعة كربلاء .

28. Hagerman, A. E. (2002). Tannin Handbook . Miami University U.S.A.

29. Wei, F. Han, J.; Zhang ,L.; Yang, H.and Wang, Z. (2001).Study on technology of extracting oligoprocyanidins from grape seeds. Xian Dai Hua Gong (Modern Chemical Industry). 21 (4): 27-9. (In Chinese)

30. Yu,L.;Zhao,M.;Wang,J.S.;Cui, C.;Yang,B.;Jiang,Y.andZhao, Q.(2009).Antioxidant ,immunomodulatory and anti-breast cancer activityes of phenolic extract from pine (*Pinus massoniana Lamb*) bark.Inno Food Sci and Emer Tech., 9:122-128.

31. Karonen,M.;Ossipov,V.;Sinkk onen,J.;Loponen,J.;Haukioja,E .andPihlaja,K.(2006). Quantitative analysis of polymeric proanthocyanidins in Birch leaves with normal-phase HPLC. Phytochem. Anal.,17: 149–156.

32. Sun,B.;Leandro,C.; Ricardo-da-silva, J.M. and Spranger, I. (1998). spration of grape and wine proanthocyanidins according to their degree of poly merization. J. Agric. Food Chem.,46:1390-1396 .

33. Shan, B.; Cai, Y. Z.; Brooks, J. D. and Corke, H. (2007). Antibacterial Properties and Major Bioactive Components of Cinnamon Stick (*Cinnamomum burmannii*): Activity against Foodborne Pathogenic Bacteria. J. Agric. Food Chem.,55:5484-5490.

34. Sun, B.S.; Ricardo-da-Silva, J.M. and Spranger, M.I. (2001). Quantification of catechins and proanthocyanidins in several Portuguese grapevine varieties and red wines, Ciência Téc. Vitiv., 16: 23-34.

Iraqi Journal of Biotechnology, 2015, Vol. 14, No. 2 , 427-433

تأثير المعاملة بفترات البرودة والرش بمستخلص عرق السوس في نمو واثمار الشليك *Fragania* X *ananassa Duch*. صنف Festival

فاطمة خيون محمد الوائلي

رئاسة جامعة بغداد

الخلاصة: نفذت هذه التجربة خلال الموسم الزراعي (2012-2013) في البيت البلاستيكي غير المدفأ التابع لمشتل جامعة بغداد ، بهدف دراسة تأثير الرش بمستخلص عرق السوس والمعاملة بساعات البرودة والتداخل بينها على نبات الشليك (*Fragania* x *ananassa* Duch) صنف Festival تحت ظروف محافظة بغداد.تضمنت التجربة ثلاثة تراكيز من مستخلص عرق السوس (0،2،4،6)غم/لتر ومعاملة شتلات الشليك لدرجات الحرارة المنخفضة (1±3) م وكما يلي:(بدون معاملة تبريد ، 7 ايام ،14يوم ،21 يوم) نفذت بتصميم القطاعات العشوائية الكاملة (RCBD) وبثلاث مكررات، وشملت كل وحدة تجريبية 6 نباتات وكانت ملخص النتائج كالاتي:

- اعطى الرش بمستخلص عرق السوس بالتركيز 4 غم/لتر اعلى ارتفاع للنبات ،وعدد الاوراق ومساحة ورقية واعلى نسبة مئوية للازهار (نسبة عقد) وكما يلي (11.77 سم، 14.95ورقة/نبات، 26.1).

- ادى تعريض شتلات الشليك للبرودة لمدة 14يوم والتي اعطت اعلى ارتفاع للنبات ،في حين اعطت معاملة البرودة 21 يوما اعلى عدد من الاوراق بلغ 15.84ورقة/نبات وواعلى مساحة ورقية بلغت 27.37 ،اعلى نسبة عدد ازهار بلغ 17.25،اعلى نسبة للعقد بلغت81.12.

The effect of treatment periods of cold and spraying licorice extract to the growth and nuts Strawberry Fragania X ananassa Duch. Class Festival

Fatima M. K. AL-Wailli

Presidency of Baghdad University

Abstract :An experiment carried out during the growing season (2013-2012) in the plastic house is heated 's nursery Baghdad University , to study the effect of licorice extract spray treatment hours cold and overlap each other on the strawberry plant *Fragania X ananassaDuch*. Class Festival under the Baghdad governorate conditions .

Experience included three concentrations of licorice extract (0,2,4,6) g / L of strawberry seedlings to low temperatures (1 ±3) m , as follows: (treatment without cooling , 7 days, 14 days ,21 days) carried out the design sectors full random (RCBD) and three replicates , and each unit included six experimental plants and summary results were as follows :

- Spraying licorice extract focusing 4 g / L highest high of the plant , and the number of leaves and paper space and the highest percentage of flowers (the proportion of contract) , as follows (11.77 cm , 14.95 paper / plant)
- Exposing strawberry cooler seedlings for 14 days , which gave the highest high of the plant , while given the treatment of cold 21 days highest number of leafs reached 15.84 paper / plant and high space of paper reached 27.37 , the highest number of flowers reached 17.25 , the highest proportion of the contract amounted to 81.12 .

Keyword: Fragania, Glycyrrhiza

المقدمة

الشليك ***Fragania ananassa Duch.*** نبات عشبي معمر يمتاز بشكله الجميل وطعم ثماره اللذيذ ويعد من الفواكه ذات الثمار الصغيرة المنتشرة في العالم لما يتمتع به من قيمة غذائية وعلاجية عالية ،ينتمي الشليك الى رتبة Rosales والعائلة الوردية Rosaceae وتحت العائلة Rosoideae والجنس Fraganiaوالى النوع ananassa(1).

يعرف نبات عرق السوس باسم *(Glycyrrhiza)* وتعني العروق الحلوة باللغة اليونانية ،ويسمى ايضا بـ Leguminaseae (2) واكثر الانواع انتشارا هو (*Glycyrrhiza glabra*) ويحتوي نبات عرق السوس على العديد من المركبات الكيميائية ،فهو يتميز بوجود مركبات كيميائية ذات مذاق حلو، اذ يحتوي لى مادة (الكليسيريزين)glycyrrhejel وliquoric acid ومركبات فلافونيدبة منها glabridin وglabrin وغيرها(3)

وان الكليسيريزين وحامضه هي اهم مكونين في عرق السوس لهما فعالية مشابهة لفعالية الهرمونات الستيرويدية، اذ انها من الهرمونات النباتية التي تؤدي الى زيادة تكوين البروتينات لذلك ترفع من معدل النمو (4)

لاحظ(5) ان تعريض شتلات الشليك صنف Maradesboise لدرجات الحرارة المنخفضة 4م ولمدة اسبوعين ادى الى حصول زيادة معنوية في الحاصل الكلي واعطى اعلى معدل لوزن الثمرة وعدد الثمار الكبيرة والمتوسطة وحصل انخفاض معنوي في عدد الثمار الصغيرة الحجم .

ولاحظ(6)وجود فروق معنوية في عدد الثمار وتحسين كبير في الانتاج الكليللنبات ووحدة المساحة نتيجة تعريض خمسة اصناف من الشليك الى الارتباع.

وجد(7)ان رش مستخلص عرق السوس على نبات الفريزيا ادى الى زيادة في ارتفاع الساق الزهري وزيادةبعدد الاوراق /نبات وعدد النورات الزهرية/نبات فضلا عن عدد الازهار /نبات وقطر الزهرة،وبكرت معاملة الرش بالمستخلص في موعد ظهور الازهار على النبات.

كما لاحظ(8) ان نباتات البصل المرشوشة بمستخلص جذور عرق السوس زادت نسبة التزهير فيها .

كما لاحظ (9)ان رش نباتات الخيار بمستخلص جذور عرق السوس ادى الى زيادة المساحة الورقية والحاصل ومحتوى الاوراق من الكلورفيل.

المواد وطرائق العمل

بهدف دراسة تاثير الرش بمستخلص عرق السوس والمعاملة بساعات البرودة والتداخل بينها على نبات الشليك صنف Festival تحت ظروف محافظة بغداد.

تم تحضير التربة بحراثتها ثم تسويتها واستعملت مبيدات الديازينون المحبب والرادوميل والفيوردان للوقاية من الامراض الحشرية والفطرية ،تم الحصول على شتلات الشليك *Fragania ananassa Duch* صنفFestival من شتلات الامهات المزروعة في البيت البلاستيكي التابع لمركز البحوث الزراعية /وزارة الزراعة-ابي غريب وكانت في اصص قاطرها 6سم وحاوية على 4-5 ازواج من الاوراق الحقيقية ولغرض تماثل الشتلات تم اجراء عليها عملية التقليم لغرض الموازنة بين المجموع الخضري والجذري بتقصير الجذور وازالة الاوراق الجافة والتالفة والابقاء على ثلاث اوراق لكل شتلة.

زرعت في الثلث العلوي من المرز وبمسافة 5 سم بين نبات واخر،سقيت الشتلات مباشرة بعد الزراعة ثم اجريت بعض العمليات

الزراعية من تنعيم للتربة حول النبات وتعشيب وتمت اضافة السماد المركب NPK(20,20,20) وبمعدل 2 غم للنبات الواحد الى التربة على دفعتين ...الاولى بعد السقية الاولى من الاسبوع الاول والثانية عند بدء النمو ،وبعد تثبيت النبات نفسه بالتربه بعد 10ايام تم اجراء الرشة الاولى لمستخلص عرق السوس وباربعة تراكيز (6,4,2,0)غم /لتر في 11/1 واجريت الرشة الثانية في 1/10. وزن 2،4،6 غم (حسب المعاملة) كمية مطحونة من جذور عرق السوس وتمت اضافة 1 لتر من الماء اليها وتركت تنقع لمدة 24 ساعة ثم رشحت بقماش الململ.

عوملت الشتلات الماخوذة جميعها بمبيد عناكبي Refaktenالمادة الفعالة Abamectin للوقاية من الحلم.اخذت 100 شتلة في كل موعد لغرض حفظها في المخزن المبرد قبل الزراعة وتحت درجات حرارة منخفضة (3±1 م) وحسب ما يلي:

- خزنت الوجبة الاولى بتاريخ 9/29 لمدة ثلاثة اسابيع
- خزنت الوجبة الثانية بتاريخ 10/7 لمدة اسبوعان
- خزنت الوجبة الثالثة بتاريخ 10/14 لمدة اسبوع واحد
- الوجبة الرابعة بدون معاملة برودة والتي وضعت في الظلة الخشبية للمحافظة عليها من التلف والذبول بسبب درجات الحرارة المرتفعة لحين انتهاء مدة الخزن المبرد.

وبعد انتهاء مدة الخزن اخرجت جميع الشتلات من المخزن المبرد بتاريخ 10/20 وزرعت جميعها في الصباح الباكر في البيت البلاستكي المعد لها مسبقا.

تضمن البحث دراسة تاثير عاملان هما :

الاول: معاملات برودة بثلاث فترات خزنية مع معاملة بدون برودة .

الثاني: رش النباتات بمستخلص عرق السوس وتم الرش باربعة تراكيز (6,4,2,0)غم /لتر وبواقع ثلاث رشات الاولى بعد 10 ايام والثانية بداية نشاط النمو الخضري (2013/1/10) والثالثة عند بداية عقد الثمار 2013/3/10. وبذلك تكون التجربة عاملية وبعاملين 4×4= 16للمعاملات ضمن تصميم القطاعات العشوائية الكاملة (R.C.B.D)، حيث تضمنت الوحدة التجريبية 6 نباتات وكررت ثلاث مرات لكل معاملة وحللت النتائج احصائيا وقورنت المتوسطات حسب اختبار اقل فرق معنوي (L.S.D) وعلى مستوى احتمال 0.05 (10)).

الصفات المدروسة :

الصفات الخضرية

1. ارتفاع النبات (سم): تم اخذ القياس ابتداءاً من سطح التربة الى قمة النبات بواسطة شريط القياس.
2. عدد الاوراق /نبات : حسب عدد الاوراق على الساق لجميع النباتات للكل وحدة تجريبية ثم استخرج معدل الاورق للنبات الواحد.
3. المساحة الورقية نبات/دسم2: حسبت على اساس الوزن الجاف كما جاء في (11) فقد اخذت 5 اوراق حديثة البلوغ من كل نبات (12) واقتطع منها 25 قرص معلوم المساحة ثم جففت لاوراق مع الاقراص بـ (الفرن) oven بدرجة حرارة 70م لحين ثبات الوزن ، ووزنت الاوراق الجافة مع الاقراص واحتسب معدل المساحة الورقية حسب المعادلة التالية:

المساحة الورقية (دسم2)= مساحة الاقراص × الوزن الجاف الكلي للاوراق النبات (معدل وزن ورقة واحدة × عدد الاوراق الكلي) /الوزن الجاف للاقراص

الصفات الزهرية

1.النسبة المئوية للازهار العاقدة (نسبة الاثمار):تم احتسابها حسب المعادلة الاتية

عدد الثمار العاقدة

العقد % = ----------×100

عدد الازهار الكلي

2.عدد الازهار/نبات

النتائج و المناقشة :

1. ارتفاع النبات (سم): يشير جدول (1) الى وجود تباين معنوي لتركيز عر ق السوس 4 غم /لتر من صفة ارتفاع النبات الشليك اذ بلغ ارتفاعه 11.77 سم واختلف معنويا عن معاملة السيطرة والتي بلغ ارتفاع نباتات المعاملة 10.8 سم . ولم تختلف معنويا عن تركيز عرق السوس تركيز 6 غم/لتر والتي بلغ ارتفاعها 11.4سم

اما بالنسبة لتاثير ساعات البرودة فكانت اقل. اذ بلغ ارتفاع نباتات معاملة المقارنة 9.07 سم واختلف معنويا عن معاملة 14 يوم والتي اظهرت اعلى ارتفاع بلغ 13.67 سم ولم تختلف معنويا عن 21 يوم والذي بلغ 12.5سم.

كما اظهرت نتائج جدول (1) عدم وجود تداخل معنوي بين ايام البرودة ومستخلص عرق السوس فقد اظهرت معاملة المقارنه اقل ارتفاع بلغ 8.5سم واختلف معنويا عن معاملة الرش ب 4 غم/لتر من مستخلص عرق السوس مع معاملة برودة 14 يوم فكانت اعلى ارتفاع بلغ 14.1 سم .

جدول (1) تأثير المعاملة بالبرودة والرش بمستخلص عرق السوس على ارتفاع النبات/سم

معاملات البرودة / يوم / تر كيز عرق السوس غم /لتر	Control	7	14	21	المتوسط
Control	8.5	10.0	13.5	11.2	10.8
2	9.1	9.9	13.4	12.5	11.22
4	9.4	10	14.1	13.6	11.77
6	9.3	9.8	13.7	12.8	11.4
المتوسط	9.07	9.7	13.67	12.5	
L.S.D					

لتراكيز 1.1 للبرودة 1.5 للتداخل N.S

2.عدد الاوراق /نبات

اشارت نتائج جدول (2) الى تفوق معاملة تركيز عرق السوس 4غم/لتر باعطاء اعلى عدد للاوراق بلغ 14.95ورقة/نبات واختلفت معنويا عن معاملة المقارنه والتي بلغت 13.55 ورقة/نبات

وتفوقت معاملة 21 يوم باعطاء اعلى عدد من الاوراق بلغ 15.84 ورقة/نبات واختلفت معنويا عن معاملة المقارنه اذ بلغت 13.55 ورقة /نبات لكنها لم تختلف معنويا عن معاملة 6 غم /لتر لتركيز عرق السوس واشارت نتائج الجدول عن وجود تداخل معنوي بين معاملات الرش وساعات البرودة

جدول (2) تأثير المعاملة بالبرودة والرش بمستخلص عرق السوس على عدد الاوراق

معاملات البرودة / يوم / تر كيز عرق السوس غم /لتر	Control	7	14	21	المتوسط
Control	11.25	13.16	14.62	15.17	13.55
2	11.95	13.96	15.31	15.7	14.23
4	12.46	14.62	15.92	16.8	14.95
6	12.54	14.57	14.83	15.7	14.41
المتوسط	12.05	14.07	15.17	15.84	
L.S.D					

لتراكيز 1.96 للبرودة 2.1 للتداخل N.S

(L.S.D.)

3. المساحة الورقية/نبات (دسم2)

اشارجدول (3) الى تفوق معاملة الرش بمستخلص عرق السوس تركيز 4 غم /لتر باعطاء اعلى مساحة ورقية بلغت 26.1 نتيجة لاعطاء اعلى عدد من الاوراق للنبات فانعكس ذلك عن المساحة الورقية الكلية للنبات واختلف عن معاملة المقارنه التي اعطت اقل عدد من الاوراق كما اظهر الجدول تفو ق معاملة البرودة 21يوم باعطاء اعلى مساحة ورقية للنبات بلغت 27.37 ورقة/نبات نتيجة لاعطاء نفس المعاملة اعلى عدد من الاوراق الكلية للنبات كما اظهر الجدول عدم وجود معنوية لمعاملات الرش وساعات البرودة. النسبة المئوية للازهار العاقدة (نسبة الاثمار)

اشارت نتائج جدول (4) الى تفوق معاملة التركيز 4 غم/لتر في النسبة المئوية للازهار العاقدة اذ بلغت 68.05ويعود ذلك لزيادة المساحة الورقية الكلية للنبات وزيادة عملية التمثيل الضوئي مما انعكس على زيادة التمثيل الغذائي وزيادة نسبة الخصب

واشارت نتائج الجدول لتفوق معاملة البرودة 21 يوم باعطاء اعلى نسبة عقد بلغت 81.12 نتيجة لزيادة المساحة الورقية الكلية للنبات المعاملة بـ21 يوم برودة.

جدول (3) تأثير المعاملة بالبرودة والرش بمستخلص عرق السوس على المساحة الورقية

معاملات البرودة / يوم / تر كيز عرق السوس غم /لتر	Control	7	14	21	المتوسط
Control	20.1	21.7	22.8	23.1	21.92
2	22.4	23.8	25.7	28.3	25.05
4	23.9	24.2	26.9	29.4	26.1
6	24.5	24.99	25.10	28.7	25.8
المتوسط	22.72	23.65	25.12	27.37	
L.S.D					

التراكيز 2.6 للبرودة 1.9 للتداخلN.S

(L.S.D.)

جدول (4) تأثير المعاملة بالبرودة والرش بمستخلص عرق السوس على نسبة العقد

معاملات البرودة / يوم / تر كيز عرق السوس غم /لتر	Control	7	14	21	المتوسط
Control	42.1	57.3	66.6	69.4	58.85
2	49.3	58.4	70.7	81.3	64.9
4	50.8	60.7	72.3	88.4	68.05
6	50.7	60.4	73.4	85.4	67.47
المتوسط	43.22	59.2	70.75	81.12	

للتراكز2.45 = للبرودة = 1.78 للتداخل =N.S

(L.S.D.)

4.عدد الازهار/نبات

تشير نتائج جدول (5) الى تفوق معاملة 6 غم/لتر باعطاء اعلى عدد للازهار بلغت 14.45 ولم تختلف معنويا عن معاملة 4 غم/لتر ،وهذا نتيجة لزيادة المساحة الورقية للنبات مما اثر على نسبة التمثيل الغذائي وزيادة فعالية عرق السوس في تحفيز البراعم باعطاء اعلى نسبة للتزهير ،اما معاملات البرودة فقد اشار الجدول ان معاملة 21 يوم برودة اعطت اعلى نسبة لعدد الازهار بلغ 17.25 زهرة /نبات نتيجة لتفوقها في عدد الاوراق الكلية للنبات مما اثر ايجابا باعطاء اعلى عدد من الازهار .

جدول (5) تأثير المعاملة بالبرودة والرش بمستخلص عرق السوس على عدد الازهار

معاملات البرودة / يوم / تر كيز عرق السوس غم /لتر	Control	7	14	21	المتوسط
Control	7.2	8.11	14.3	14.5	11.02
2	8.3	9.4	16.5	17.1	12.82
4	8.9	10.1	17.8	18.3	13.77
6	9.1	10.9	18.7	19.1	14.45
المتوسط	8.37	9.6	16.8	17.25	
L.S.D					

للتراكيز= 1.23 للبرودة = 1.68 للتداخل=N.S

(L.S.D.)

المصادر

1. الابراهيـــم، انـــور (2002) الفريز- نشرة ارشادية(451)-وزارة الزراعة والاصلاح الزراعي –الهيئة العامة للبحوث الزراعية –ادارة بحوث البستنة ،سوريا.

2. ابو زيد، الشحات نصر.1986. النباتات والاعشاب الطبية، المركز القومي للبحوث، القاهرة، دار مكتبة الهلال، بيروت. الطبعة الاولى.

3. العجيلي، ثامر عبد الله زهوان .2005. ثاثير الجبرلين GA3 وبعض المغذيات على انتاج الكليسيريزين Glycyrrhizin وبعض المكونات الاخرى في نبات عرق السوس *Glycyrrhizaglabra L* اطروحة دكتوراه .كلية الزراعة. جامعة بغداد. العراق.

4. Tyler,V.1993.TheHonest Herbal, Pharmaceutical products press, Ny. pp. 197-990.

5. المحمدي ، علي فدعم عبد الله.2010 .تاثير مواعيد الزراعة والجبرلين والمستخلصات والفيتامينات في نمو وحاصل الكراوية.اطروحة دكتوراة .كلية الزراعة .جامعة بغداد. العراق.

6. Lutchoomun,S.(2003).performance of new strawberry varieties using cold-stored and fresh runners. AMAS, Food and Agricultural ResearchCouncil,Rrduit,Mauritius,p.67-73

7. Verdial,M.F;T.Neto;K.Minami;J.A.S.Filho;P.J.Christoffoleti;F.V.Scarpare;J.F.Barela;J.S.Daguial and R.A, Kluge (2007). Vernalization on five cultivars of strawberry .Ciencia Rural, Santa Maria ,37(4):976-981.

8. الربيعي ،نوال محمود علوان منصور.2003 تاثير الرش بالمحلول المغذي النهرين ومستخلص عرق السوس في النمو والازهار والعمر المزهري في الفريزيا *Freesia Hybrida L.* رسالة ماجستير. كلية الزراعة. جامعة بغداد. العراق.

9. المرسومي ،حمود غربي خليفة.1999. تاثير بعض العوامل في صفات النمو الخضري والتزهير وحاصل البذور في ثلاثة اصناف من البصل .اطروحة دكتوراه. كلية الزراعة .جامعة بغداد. العراق.

10. حسين، وفاء علي.2002. تاثير مستخلص الثوم وجذور عرق السوس واليوريا في صفات النمو الخضري والزهري والحاصل والصفات النوعية لنبات الخيار .Cucumissativus L . رسالة ماجستير. كلية الزراعة.جامعة بغداد. العراق.

11. الساهوكي ، مدحت ووهيب ، كريمة محمد .1990. تطبيقات في تصميم و تحليل التجارب دار الحكمة للطباعة والنشر .وزارة التعليم العالي والبحث العلمي كلية الزراعة جامعة بغداد

12. Dvornic,V.1965.Lucraripactic de ampelographic E. Didactictapeda-gogica Bucureseti R.S. Romania.

13. ابراهيم ،حمدي ابراهيم محمود.2010. العينات النباتية جمعها وتحليلها. الطبعة الاولى . .دار الفجر للنشر والتوزيع .جمهورية مصر العربية.