تأثيرالمحفزات الكيميائية في إنتاج مركبات الايض الثانوي لنبات عنب الذيب *Solanum nigrum* خارج الجسم الحي

Effect of chemical elicitors on secondary metabolite induction of *Solanum nigrum In vitro*.

بان منعم عبدالرزاق سعدية حسن محمود كاظم محمد ابراهيم*
كليةالعلوم/ الجامعةالمستنصرية
*كليةالعلوم/ جامعةالنهرين

Baan M. Abdulrazzak Saadia H. Mahmood Kadhim M. Ibrahim*
College of Science/ Al-Mustansiriyah University
*College of Science/ Al-Nahrian University

المستخلص

اجري البحث الحالي بهدف زيادة إنتاج بعض مركبات الايض الثانوي في المزارع النسيجية لنبات عنب الذيب *Solanum nigrum*, قدرت مركبات الايض الثانوي بالتحليل الكمي والنوعي باستعمال جهاز HPLC وقورنت مع المستخلص الميثانولي للأوراق الجافة للنبات الكامل. تم الحصول على الكالس بأخذ أجزاء من أوراق النبات وزراعتها على الوسط الغذائي Murashige and Skoog (MS) الحاوي على منظمات النمو Naphthalene acetic acid (NAA) بالتركيز 2.0ملغم/لتر و Benzyl adinenine(BA) بالتركيز 1.0 ملغم /لتر لنبات عنب الذيب. وبغية زيادة إنتاج المركبات الثانوية، وظفت عوامل تحفيز كيميائية تضمنت حامض الجاسمونك Jasmonic acid وحامض السااليسااليك Salicylic acid ، بالتراكيز 2،4،6،8 ملغم/لتر لـحامض الجاسمونك و50،100،150،200 ملغم/لتر لـحامض السااليسليك. أظهرت النتائج بان هناك فروقات معنوية بين المعاملات المختلفة المستخدمة كمحفزات وكان أفضل تركيز من حامض الجاسمونك للتحفيز وزيادة الإنتاج هو 8ملغم/لتر للكالس، أما حامض السااليسليك فكان أفضل تركيز للتحفيز وزيادة الإنتاج 100 ملغم/لتر لكالس نبات عنب الذيب.

الكلمات المفتاحية: زراعة الانسجة النباتية، نبات عنب الذيب *Solanum nigrum* مركبات الايض الثانوي، كروماتوكرافيا السائل ذو الأداء العالي

Abstract

This project aimed to increase the production of some secondary metabolites using chemical elicitors in tissue cultures of *Solanum nigrum* L. plants. The quality and quantity of phytochemicals were estimated using methanolic extracts of dried leaves and callus were analyzed using HPLC. Callus was initiated from leaf discs cultured on Murashig and Skoog (MS) medium supplemented with Naphthalene acetic acid (NAA) at concentrations of 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 or 5.0 mg/l and BA at 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 or 2.5 mg/l for S. nigrum callus initiation. The same combination was used for callus maintenance for the plant. The results showed an increase in the concentration of secondary metabolites in methanol extracts induced from leaves. Callus cultures induced from leaf discs were treated with some chemical stimuli such as jasmonic acid and salicylic acid, (2,4,6, 8 mg/l jasmonic acid), or (50, 100, 150, 200 mg/l salicylic acid). Result showed that there were significant differences between the various treatment, the best concentration of jasmonic acid to stimulate and increase the production was 8 mg/l for S. nigrum. Moreover, Salicylic acid at 100 mg/l stimulated the production of secondary metabolites in callus culture of S. nigrum.

Key words: Plant tissue culture, *Solanum nigrum*, production of some secondary metabolites, HPLC

المقدمة

تنتج النباتات مركبات كيميائية بوساطة عمليات الايض Metabolism تعرف بنواتج الايض الثانوي هي مركبات تختلف في درجة تعقيدها ولا تدخل في بناء وتكاثر ونمو الخلية النباتية، إذ هي وسيلة دفاعية تنتج بعد إصابة النبات بالأمراض أو مهاجمتها من قبل الكائنات الحية، إذ إن هناك الآلاف من القلويدات والكلايكوسيدات والراتنجيات والزيوت الطيارة، ولا يعرف دورها في حياة النبات، وإنها مركبات خازنة للنتروجين أو الكربون أو عناصر أخرى [1]. تلعب دورا مهما كمواد فعالة دوائيا إذ يمكن استعمالها في علاج كثير من الأمراض لفاعليتها وكونها توفر الجانب الأمن من الاستخدام البشري الطبي والعلاجي[2] .

يعتبر حامض الجاسمونك بأنه أحد هرمونات النموالمؤدية للشيخوخة، اذ يقلل من مستوى التعبير الجيني [3] . أما حامض السااليسليك فهوحامض كربوكسيلي أروماتي عديم اللون يستخلص طبيعيا من بعض النباتات كالصفصاف الأبيض ، وإكليلة المروج ، ويمكن صنعه مختبريا [4]. بالنظر للأهمية الطبية لنبات عنب الذيب ولاحتوائه على مركبات ثانوية مهمة تدخل في المستحضرات الصيدلانية ولكن إنتاجه منها قليل مقارنة بالحاجة الفعلية لهذه المركبات. لذا أستوجب الأمر إكثار النبات نسيجيا وإضافة بعض المحفزات التي قد تزيد من إنتاج النبات للمركبات الفعالة. عندها يمكن تبني خطوط إنتاجية في معامل الأدوية لإنتاج هذه المركبات بكميات كبيرة وباستخدام المفاعلات الحيوية. وبناءا على ماسبق فقد هدفت الدراسة الحالية إلى أمكانية زيادة إنتاج المركبات الثانوية في أنسجة النبات بالاستفادة

من تقانات الزراعة النسيجية. كما يمكن التحري عن مقدار الزيادة الحاصلة في بعض المركبات الفعالة والمهمة صيدلانيا نتيجة اضافة محفزات كيميائية ومقارنتها مع النباتات غير المعاملة. اضافة الى الكشف عنها كما ونوعا عن مركبات الايض الثانوي المنتجة عن طريق التحليل الكروماتوكرافي باستخدام جهاز كروماتوكرافيا السائل ذو الأداء العالي HPLC.

المواد وطرائق العمل

تحضير المحلول الخزين

حضر المحلول الخزين لجميع منظمات النمو النباتية بواقع 100ملغم/لتر. وحفظ في حاضنة على درجة حرارة 25±1م واستبدل شهريا بتحضير محلول خزين جديد.

الوسط الغذائي MS

حضر وسط MS [5] مختبريا من مجموعة العناصر الكبرى والصغرى ومصدر الحديد وفيتامينات وسكروز، وأضيف إليه منظمات النمو النباتية وحسب التركيز المطلوب. عدل الرقم الهيدروجيني إلى 5.7 بإضافة قطرات من هيدروكسيد الصوديوم عياري 0.1 أو حامض الهايدروكلوريك عياري 0.1ثم أضيف إليه الاكار (Agar-Agar) وحسب التركيز المطلوب ووزعت الأوساط في قناني زجاجية Universal tubes بأبعاد 8 ×2.5 سم بمقدار 10 مل لكل قنينة.

استحثاث الكالس

تم استخدام الاوراق النباتية لاستحثاث الكالسواعتمدت التوليفة BA بتركيز 1.0 ملغم /لتر و NAA بتركيز 2.0 ملغم / لتر والتي كانت الأفضل في إعطاء أعلى نسبة من كالس نبات عنب الذيب وكررت عملية إعادة الزراعة Reculture كل 3 أسابيع واعتمد هذا الوسط كوسط أدامه.

إضافة حامض الجاسمونك

بعد الحصول على كمية كافية من كالس نبات عنب الذيب، وزعت أوزان مقدارها 150ملغم على أوساط غذائية جديدة تحتوي على نفس مكونات وسط إدامة الكالس مضافا إليه حامض الجاسمونك بتراكيز تراوحت بين 2،4،6،8 ملغم /لتر.

إضافة حامض الساليسليك

استعملت نفس مكونات وسط إدامة الكالس مع إضافة حامض الساليساليك بتراكيز تراوحت بين 50،100،150،200 ملغم /لتر وحضنت تحت ظروف إدامة الكالس.

تحضير مستخلصات الأوراق النباتية والكالس لنبات عنب الذيب

تم الاستخلاص حسب الطريقة المستخدمة من قبل [6] وزن 50 ملغم من العينات (الأوراق الجافة، والكالس) لنبات عنب الذيب وأضيف إليها 5 مل من الميثانول تركيز 95% نوع HPLC grade. حمض بإضافة بضع قطرات من حامض ألخليك تركيز 1%. وحرك النموذج بواسطة جهاز الأمواج فوق الصوتية لمدة 10 دقائق. بعدها ركز المذيب الحاوي على المواد الفعالة بوساطة تيار من النيتروجين (N2) للوصول بالحجم إلى 0.25 مل.تم زيادة التركيز للمذيب المحتوي على المواد الفعالة بإضافة خلات الامونيوم وصولاالى حجم الى 1 مل. بعدها رشح الحجم الأخير على ورق ترشيح قياس 0.25 مايكروميتر. وحقن 20 مايكروليتر في جهاز HPLC تحت ظروف الفصل المثبتة من قبل المصنع.

التقدير الكمي والنوعي للنواتج الثانوية

استعمل جهاز كروماتوغرافيا السائل ذي الأداء العالي HPLC نوع Spectrophysics/UV-visible detector في تقدير كمية ونوعية النواتج الثانوية في مستخلصات الأوراق والكالس[7] وقورنت بالعينات القياسية.

فصلت المكونات الفعالة لكالس نبات عنب الذيب تحت ظروف قياسية ثابتة وحسب [6]، إذ حقنت العينات في عمود الطور المعكوس نوع Reversed phase suspelcosil C-180D ذي أبعاد (I.D .4.6mm ×50) وحجم الدقائق µm 3 ودرجة حرارة 30C [8] وقدرت النواتج الثانوية لمستخلص الأوراق والكالس وذلك بحقن 20 مايكروليتر في العمود وتحت الظروف التالية:- الطور المتحرك: 0.5 Acetonitrile HPLC gradeHepta fluorobuytric acid (30:70 V/V). سرعة الجريان 1 مل / دقيقة.الطول ألموجي 210 nm نانوميتر. درجة حرارة 30 درجة مئوية.الوقت المستغرق 10 دقائق.

قيست القراءات على الأطوال الموجية وحسب زمن الاحتجاز Rt للمحاليل القياسية والعينات تحت الدراسة. وتم تعيين تراكيز المواد الفعالة كما بمقارنة مساحة حزمة المادة القياسية مع مساحة حزمة النموذج تحت نفس الظروف باستخدام القانون التالي :-

$$\text{تركيز المادة المجهولة} = \frac{\text{مساحة حزمة النموذج}}{\text{مساحة حزمة القياسي}} \times \text{تركيز القياسي X عدد مرات التخفيف}$$

النتائج والمناقشة

التقدير الكمي والنوعي لبعض المركبات الكيميائية في مستخلصات أوراقنبات عنب الذيب

توضح النتائج في جدول (1) وكما موضح في شكل (1،2) تراكيز المركبات الثانوية القياسية للمقارنة مع تراكيز المركبات الثانوية المفصولة من الأوراق النباتية المجففة والتي أظهرت وجود 8 مركبات ثانوية. وعند حساب تركيز المركبات الثانوية في الأوراق، يتضح من جدول (1،2) تركيزها في الأوراق إذ سجل أعلى تركيز للمركبات في الأوراق β-Solamargin بلغ 1.2251 ملغم /غم بينما في الكالس بلغ 3.0653 ملغم/غم . ويمكن إيعاز السبب إلى إن منظمات النمو المضافة في استحثاث وإدامة الكالس أدت إلى تحفيز وزيادة إنتاج المركبات الثانوية في الكالس ويمكن أيضا أنلإعادة الزراعة المستمرة قد أدت إلى نشوء تغاير جسمي (Somaclonal variation) في الخلايا مما أدى إلى زيادة في إنتاجها للمركبات الثانوية في الكالس. تعتبر مرحلة نشوء الزروعات واستحثاث وإدامة الكالس والظروف

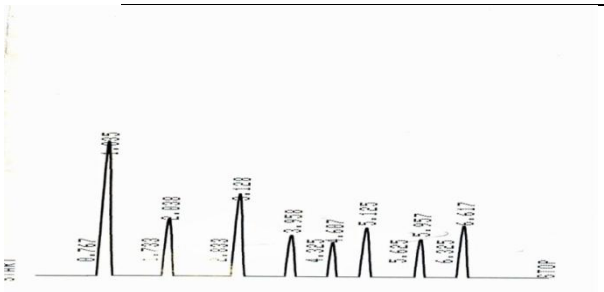
المثالية للمزارع النسيجية محفزات عملية أدت إلى زيادة في إنتاج مركبات الايض الثانوي في كالس الأوراق الفتية مقارنة مع النبات الأم [9].

جدول(1): زمن الاحتجاز، المساحة، تراكيز المركبات القياسية لمركبات الايض الثانوي التي ظهرت من تحليل HPLC

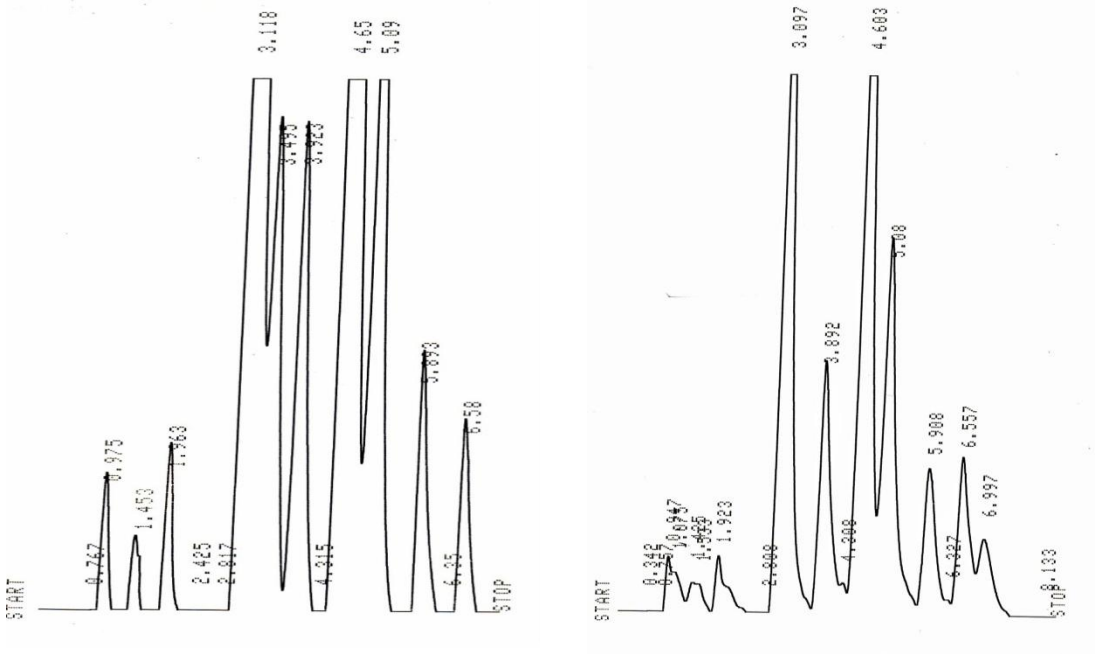
ت	مركبات الايض المدروسة	زمن الاحتجاز (دقيقة)	مساحة المركبات القياسية	تركيز المحلول القياسي(مايكروغرام\مل)
1	Ascorbic acid	1.03	11584	25
2	α-solanine	2.03	7521	25
3	Solasodin	3.12	8502	25
4	Solanidin	3.95	5195	25
5	β-solamargin	4.60	4982	25
6	α-solamargin	5.12	5836	25
7	Solasonine	5.95	4061	25
8	Demission	6.61	4311	25

جدول (2): المقارنة بين المركبات الثانوية (ملغم /غم) المستخلصة من الأوراق المجففة (السيطرة) وكالس نبات عنب الذيب، n=3

المركبات الثانوية	الأوراق الجافة	الكالس	قيمة T- ≤0.05
Ascorbic acid	0.06988	0.171	0.02777
α-solanine	0.13974	0.22937	ns
Solasodin	0.61757	1.59717	0.22901
Solanidin	0.39282	0.70697	0.27093
β-solamargin	1.2251	3.0653	0.76092
α -solamargin	0.5434	1.087	0.37358
Solasonin	0.4642	0.7677	ns
Demission	0.3018	0.671	0.30639



شكل (1): منحني المركبات الثانوية القياسية لنبات عنب الذيب باستخدام تقنية HPLC



(A) الاوراق الجافة (B) كالس الاوراق

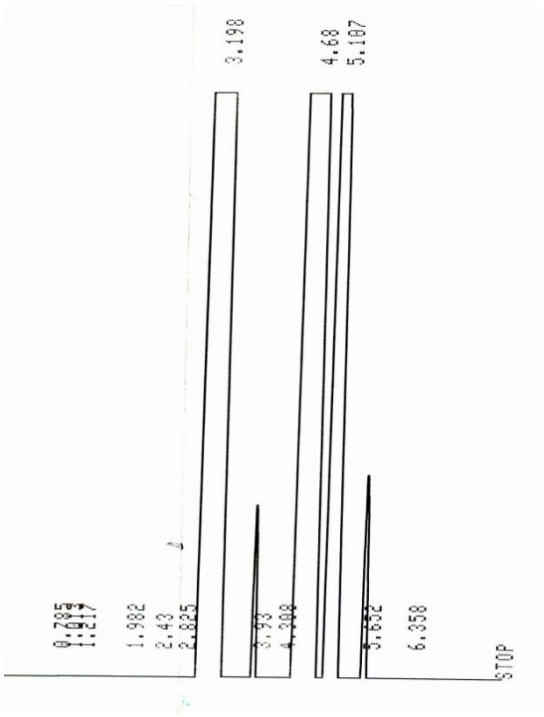
شكل (2): تحليل HPLC للمركبات الثانوية في عينات من الأوراق الجافة(A)، الكالس الناشئ على أجزاء ألورقة(B)، لنبات عنب الذيب

تأثير حامض الجاسمونكفي إنتاج المركبات الثانوية من كالس نبات عنب الذيب والتقدير الكمي والنوعي لها

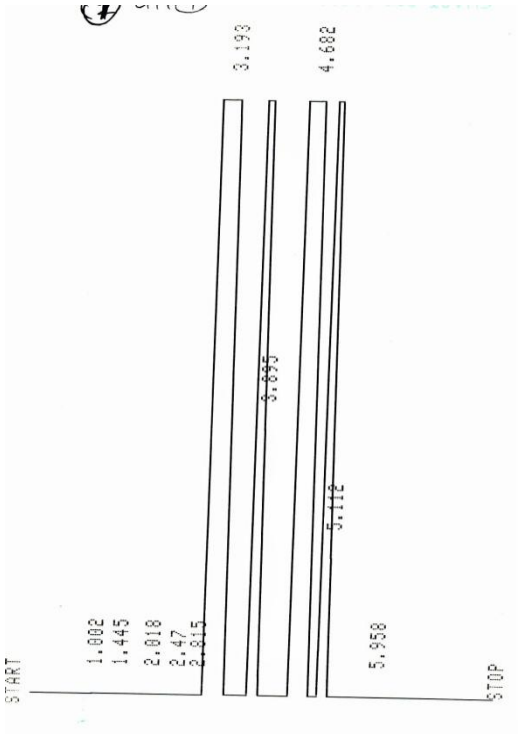
توضح نتائج جدول (3) وكما موضحة بالشكل 3المركبات الثانوية في الكالس المعامل بحامض الجاسمونك إن هناك فروقا معنوية بين تراكيز المركب الواحد مقارنة بمعاملة السيطرة، وعند حساب تركيز المركبات الثانوية اعتمادا على تركيز حامض الجاسمونك وملاحظة منحني المركبات الثانوية للكالس المعامل بالجاسمونك وجد ارتفاع تركيز اغلب المركبات عند إضافة 8 ملغم /لتر من حامض الجاسمونك إذ وصلت إلى 1.6456،3.850،1.9579،2.5684،0.7689،0.4566 ملغم/غم لكل من المركبات Ascorbic acid, α-Solanine, Solanidin, α-Solamargin, Solasonin, Demission على التوالي. وعند إضافة 6 ملغم/لتر من حامض الجاسمونك ارتفع تركيز المركبين β-،Solasodin Solamargin وسجلا 4.6544،2.8692 ملغم/غم على التوالي مقارنة بمعاملة السيطرة. ويلاحظ بان أفضل تركيز لحامض الجاسمونك والذي أدى إلى زيادة تحفيز وإنتاج المركبات الثانوية في كالس نبات عنب الذيب كان التركيز 8 ملغم /لتر تحت ظروف التجربة الحالية. وجد القدسي [10] أن استعمال التراكيز المختلفة من حامض الجاسمونك في المزارع النسيجية لنبات عنب الذيب أدى إلى زيادة معنوية في تراكم مركبات الايض الثانوي في خلايا كالس الأوراق الفتية وكان أفضل تركيز 6 ملغم /لتر مقارنة بالسيطرة.

جدول (3): تأثير حامض الجاسمونك (ملغم /لتر) في إنتاج المركبات الثانوية من كالس نبات عنب الذيب3=n

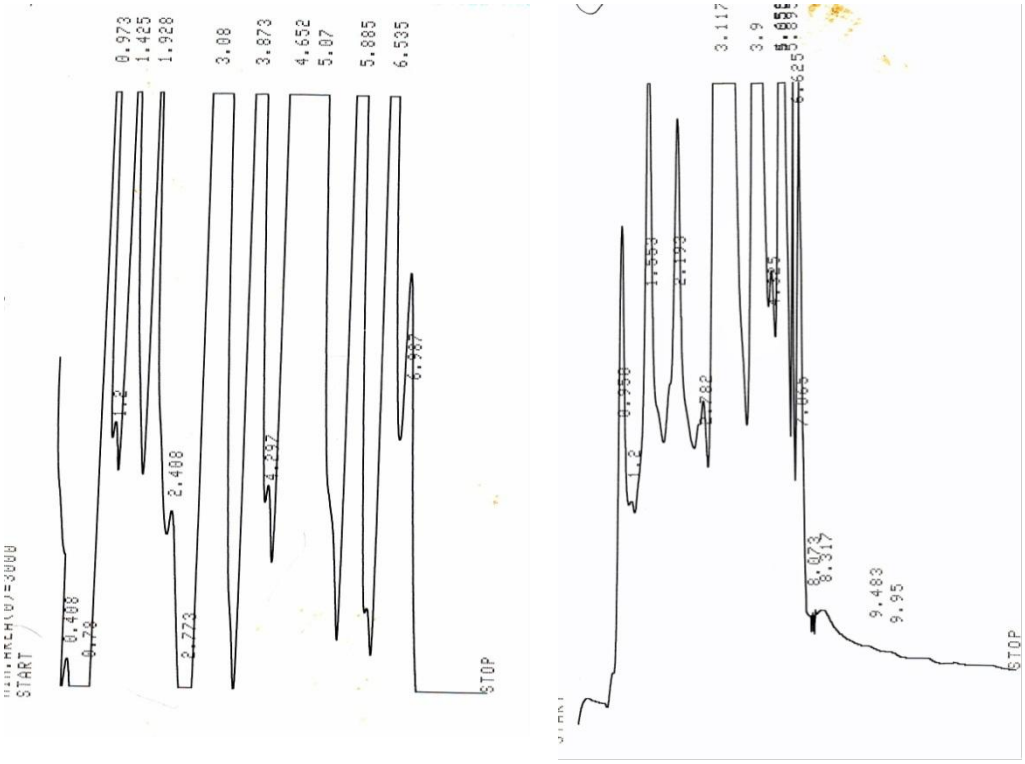
Jasmonicacid / Secondary metabolites	Control	2	4	6	8	LSD ≤0.05
Ascorbic acid	0.171	0.082	0.1165	0.1649	0.4566	0.266
α-solanine	0.22937	0.1324	0.2088	0.3419	o.7689	0.237
Solasodin	1.59717	2.1747	2.8501	2.8692	2.3846	0.883
Solanidin	0.70697	1.1404	1.1288	1.3727	2.5684	1.672
β-solamargin	3.0653	3.6353	4.5651	4.6544	4.2634	Ns
α-solamargin	1.087	1.2258	1.2545	1.725	1.9579	0.567
Solasonin	0.7677	0.504	1.145	1.360	3.850	2.379
Demission	0.671	0.3303	0.4052	0.7367	1.6456	0.264



(B)



(A)



(D) **(C)**

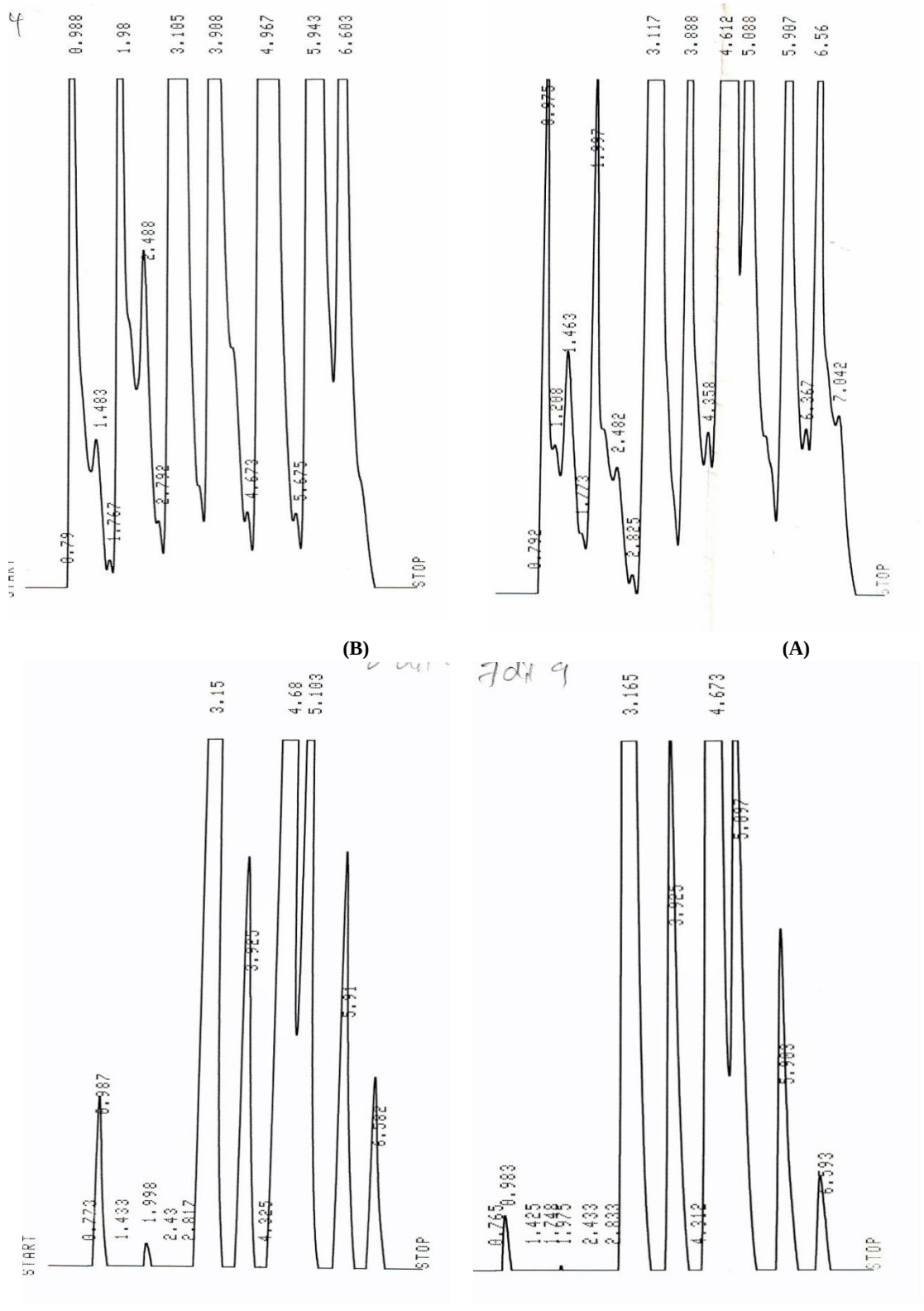
شكل(3): تحليل HPLC للكالس المستحث من الأجزاء الورقيةلنبات عنب الذيب بعد إضافة تراكيز مختلفة من حامض الجاسمونك، A2mg\l)، 8mg\l (D ،6mg\l (C ،4mg\l (B

تأثير حامض الساليسليكفي إنتاج المركبات الثانوية من كالس نبات عنب الذيب والتقدير الكمي والنوعي لها

يوضح شكل (4) والنتائج في جدول (4) اختلاف تراكيز المركبات الثانوية اعتمادا على تراكيز حامض الساليسليك المضافة. عند حساب تركيز المركبات الثانويةوجد أن هناك فروق معنوية بين تراكيز المركب الواحد مقارنة مع معاملة السيطرة، إذ أثرت جميع تراكيز حامض الساليسليك المضافة في تحفيز زيادة إنتاج المركبات الثانوية لكن بصوره غير متساوية، فقد ارتفعت اغلب التراكيز عند إضافة 100 ملغم/لتر من حامض الساليسليك إذ وصلت إلى 0.44918، 1.9273،3.8175،3.4705 ملغم/غم لكل من المركبات Ascorbic acid، Solanidin، α-Solamargin، Solasonin على التوالي، وعند إضافة 150 ملغم/لتر من حامض الساليسليك ارتفع تركيز المركبين β-Solasodin، Solamargin إذ سجلا 7.311،3.7974 ملغم/غم على التوالي، أما المركب Demission وصل إلى 1.2849 ملغم/غم عند إضافة 200 ملغم/لتر من حامض الساليسليك، والمركب α-Solanine سجل 0.5668 ملغم/غم عند إضافة 50 ملغم/لتر من حامض الساليسليك، مقارنة بمعاملة السيطرة. وذكر القدسي [10] أن التحفيز بالتراكيز المختلفة لحامض الساليساليك في المزارع النسيجية أدى إلى زيادة معنوية في تراكم مركبات الايض الثانوي في كالس الأوراق الفتية عند المعاملة بالتركيز 100 ملغم / لتر مقارنة بالسيطرة.

جدول (4): تأثير حامض الساليسليك (ملغم /لتر)في نتاج المركبات الثانوية من الكالس المستحث من الأجزاء الورقية لنبات عنب الذيب، n=3

Salicylic acid / Secondary metabolites	Control	50	100	150	200	LSD ≤0.05
Ascorbic acid	0.171	0.28007	0.44918	0.2348	0.3166	0.098
α-solanine	0.22937	0.5668	0.4445	0.2739	0.3576	0.301
Solasodin	1.59717	3.3183	3.4003	3.7974	3.1932	1.545
Solanidin	0.70697	1.3596	1.9273	1.4688	1.3634	0.936
β-solamargin	3.0653	3.993	4.654	7.311	6.649	3.334
α-solamargin	1.087	1.9315	3.8175	2.162	2.0795	1.689
Solasonin	0.7677	1.6535	3.4705	1.660	1.5391	1.620
Demission	0.671	0.9228	1.1678	0.7745	1.2849	0.427



(B) **(A)**

(D) **(C)**

شكل(4): تحليل HPLC للكالس المستحث من الأجزاء الورقيةلنبات عنب الذيب بعد إضافة

(200 mg/l=D) (150 mg/l =C) (100 mg/l =B) (50 mg/l = A)

يستنتج من النتائج أعلاه

إضافة المحفزات الكيميائية Jasmonic acid و Salicylic acid بتركيز 8 و 100ملغم /لتر قد أعطى أعلى كمية من المركبات الثانوية لكالس نبات عنب الذيب على التوالي.

المصادر

1. الشماع، علي عبدالحسين. (1989). العقاقير وكيمياء النباتات الطبية، دارالكتب للطباعة والنشر، الموصل، جمهورية العراق.
2. Davuluri, G.R., Van, T.A. and Fraser, P.D. (2005). Fruit specific RNAi –mediated suppression of DET1 enhances carotenoid and flavonoid content in tomatoes. Nature Biotechnology. 23(7):890-895.
3. إدريس، محمد حامد. (2010). موسوعة فسيولوجيا النبات، قسم البساتين، كلية الزراعة، جامعة الأزهر، جمهورية مصر العربية.
4. هايلو، سمير. (2007). بعض الاستخدامات الطبية للنباتات، مجلة الجمعية الأردنية للنباتات الطبية، العدد 32، المملكة الأردنية الهاشمية.
5. Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15:473-497.
6. Yogananth, N., Bhakyaraj, R., Chanthuru, A., Parvathi, S., and Palanivel, S. (2008). Comparative analysis of solasodine from in vitro and in vivo culture of Solanum nigrum L.. Department of Botany, Government Arts and Science College, Karur, Tamil Nadu, India.
7. Budhiraja, R.P. (2004). Separation Chemistry. New Age International Ltd, Publishers, New Delhi, pp.171.239.
8. Eisenthal, R. and Danson, M. J. (1992). Enzyme Assays. Practical Approach. Oxford University Press, chapter 4,123-166.
9. Mohy, A., Khan, Z., Ahmad, M., Kashmiri, M. A., Yasmin, S. and Mazhar, H. (2009). Chemotaxonomic significance of flavonoids in *Solanum nigrum* complex. Department of Botany, GC University, Katchery Road, Pakistan.
10. القدسي، عادل سلطان سلمان. (2009). إنتاج بعض المركبات الثانوية من نبات عنب الذيب Solanum nigrum في مزارع الزراعة النسيجية، كلية الزراعة، قسم البساتين، جامعة القاهرة، جمهورية مصر العربية.