تأثير نترات الفضة في استثارة بعض مركبات الايض الثانوي لنبات السبحبح *Melia azedarach* L. خارج الجسم الحي

طه علاوي احمد

سعدية حسن محمود

الاء جبار طه

الجامعة المستنصرية/ كلية العلوم

الخلاصة

أجري البحث الحالي في مختبر زراعة الأنسجة النباتية, قسم علوم الحياة, كلية العلوم, الجامعة المستنصرية بهدف زيادة أنتاج بعض مركبات الأيض الثانوي في المزارع النسيجية لنبات السبحبح *Melia azedarach* L. باستعمال نترات الفضة $AgNO_3$ كمحفز غير حياتي (abiotic elicitor) ومقارنة انتاجيتها مع انتاجية النبات الكامل. تم تعقيم الاوراق باستخدام مادة هايبوكلورات الصوديوم بتركيز 1% لمدة 5 دقائق. استحث الكالس من زراعة الأوراق الفتية المفصولة من النبات على الوسط الغذائي MS المزود بـ 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) بتركيز 1.0ملغم/لتر، وقد استعمل نفس الوسط أعلاه لإدامة الكالس المستحث. قدرت مركبات الأيض الثانوي بالتحليل الكمي والنوعي باستعمال جهاز High Performance Liquid Chromatography (HPLC) لعينات المستخلص الميثانولي للأوراق والمزارع النسيجية للكالس. تميز المستخلص الميثانولي للكالس بارتفاع محتواه من بعض تراكيز المركبات الثانوية مقارنة بمستخلص الاوراق. وبغية زيادة إنتاج المركبات الثانوية تم استخدام نترات الفضة Silver nitrate بالتراكيز 0.1, 0.2, 0.3 او 0.4 ملي مولر. اظهرت النتائج

ارتفاع جميع تراكيز المركبات الثانوية في المزارع النسيجية لكالس نبات السبحبح وسجل المركبان Azadirachtin , p-hydroxy benzoic acid زيادة معنوية في تركيزيهما بالمقارنة مع معاملة السيطرة, اذ بلغ 0.0616, 0.7262 ملغم/غم على التوالي. اما المركبات p-cinamoylmelianolone , 1-cinnamoyl-3,11-dihydroxymeliacarpin , Salanin فقد بلغت 0.0787, 0.1821 و 0.1179 ملغم/غم ولكنها لم تسجل فروقات معنوية. كما كان لنترات الفضة تأثيرا على معدل الوزن الطري والجاف للكالس اذ انخفض الوزن الطري والجاف مقارنة بمعاملة السيطرة ولكن الانخفاض لم يكن معنويا.

المقدمة

تؤدي النباتات الطبية دوراً كبيراً ومهماً في حياة الأنسان لكثرتها وتعدد استعمالاتها. فتكمن فائدة هذه النباتات في قابليتها على إنتاج العديد من المركبات العضوية ذات أهمية خاصة للإنسان في مكافحة الآفات لزمن طويل حيث تم استخدام أجزاء نباتية مختلفة شملت الإزهار والأوراق والثمار والبذور لبعض النباتات الحاوية على مركبات سامة أو قاتلة أو طاردة, كذلك فان هذه المركبات ذات الخصائص الطبية والتي تدخل كمادة أولية أو عوامل مساعدة في صناعة الأدوية فضلا عن تحضير المبيدات الحشرية, المطعمات, العطور و الألوان [1] تسمى هذه بمركبات الأيض الثانوي (Secondary metabolites) أو النواتج النباتية الطبيعية (Phytochemicals). وغالباً ما يكون لها دور دفاعي ضد الآفات والمسببات المرضية وقد توفر الحماية للنبات ضد التعرض للـ UV والإجهادات وقد تكون بهيئة زيوت طيارة أو صبغات لجذب الملقحات [2]. ان النباتات البرية تنتج ما يربو على 100,000 مركب ايضي ثانوي تدافع بها عن نفسها ضد الحشرات التي تقتات عليها[3]. وفرت التطبيقات المختلفة من الزراعة النسيجية إمكانية الحصول على مركبات مهمة اقتصاديا ومن ضمنها المركبات الدوائية التي يصعب تحضيرها مختبرياً فضلاً عن كلفتها العالية عند تصنيعها [4]. تحتوي بذور واوراق السبحبح

على عدة مواد فعالة ويعد مركب الازادرختين Azadirachtin من اهم تلك المركبات , ويمتاز هذا المركب بخصائص كثيرة, اذ يعتبر المركب الرئيس في علاج كثير من الامراض, اضافة الى ذلك فانه يستخدم كمادة طاردة للحشرات حيث وجد ان اليرقات او الحوريات التي تمت معاملتها بالازادرختين مات منها 60-70% خلال 3 الى 14 يوما, حيث يؤثر الازادرختين على الاكدايسون Ecdysone وهو النظام الهرموني الذي يعمل على انسلاخ الحشرات في الاطوار الاولى من دورة الحياة [5]. وخلافا للمبيدات الحشرية الصناعية التي تؤثر على الجهاز الهضمي او العصبي, فان تأثير الازادرختين يكون على الجهاز الهرموني وبالتالي لا تتمكن الحشرات من تكوين مناعة له في المستقبل. وتعتبر مادة الازادرختين غير سامة للإنسان والحيوانات الاليفة والطيور والحشرات النافعة. وتمتاز ايضا بسرعة تحللها في الطبيعة لذلك فهي لا تشكل خطرا على البيئـــــــة [6]. أن الهدف من البحث توظيف هو تقنية زراعة الانسجة في امكانية زيادة المركبات الثانوية في نبات السبحبح والتي تعد مواد طبية و مبيدات وذلك عن طريق استخدام نترات الفضة كمحفز كيمياوي لزيادة هذه المركبات.

المواد وطرائق العمل

أجري البحث في مختبر زراعة الأنسجة /قسم علوم الحياة /كلية العلوم/الجامعة المستنصرية. عقمت الاوراق السبحبح بهايبوكلورات الصوديوم1.0% لمدة 5دقائق ثم غسلت الاوراق بالماء المقطر المعقم 3 مرات متتاليه وزرعت على وسط(1962)Murashige and Skoog (MS) [7] يحتوي على1 ملغم/لترD-2,4. حضنت الزروعات في الظلام تحت درجه حراره1±25°م لمدة اربعة اسابيع .وقد استعملت التوليفه نفسها اعلاه لأدامة الكالس المستحث لحين الحصول على كميه كافيه من الكالس.بعد الحصول على الكميه المطلوبه من الكالس أخذ 200ملغم من الكالس لكل مكرر وزرع في وسط ادامة الكالس مضافاً اليه نترات الفضة Silver nitrate بالتراكيز 0.1, 0.2, 0.3 او 0.4 ملي مولر.

حضنت الزروعات تحت نفس الظروف اعلاه وبواقع عشرة مكررات لكل تركيز. حسب الوزن الطري والجاف للكالس بعد ثلاثة اسابيع من الزراعة .ولغرض استخلاص المركبات الثانوية تم اتباع طريقة[8] أذ تم وزن 5 ملغم من عينات الاوراق والكالس وأضيف لكل منها 10 مل من الميثانول تركيز 95% نوع HPLC grade (لا يحتوي على مواد تمتص من قبل أشعة UVوذات درجة عالية من النقاوة), حرك النموذج بوساطة جهاز الأمواج فوق الصوتية لمدة 10 دقائق, ركز المذيب الحاوي على المواد الفعالة بوساطة تيار من النيتروجين (N2) للوصول بالحجم إلى 1 مل (زيادة تركيز المذيب بطريقة التبخير), رشح الحجم الأخير باستعمال وحدة الترشيح الفائق (Millipore filter) قياس 0.22 مايكروميتر و حقن 20 مايكروليتر في جهاز HPLC تحت ظروف الفصل المثلى وحسب ارشادات الجهة المصنعة. وتم تعيين تراكيز المواد الفعالة كمياً بمقارنة مساحة حزمة المادة القياسية مع مساحة حزمة النموذج تحت نفس الظروف باستخدام القانون الاتي :-

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

حللت التجارب وفق تصميم كامل التعشيه Completely Randomize Design (CRD) لدراسة تاثير المعاملات المختلفة في الصفات المدروسة .وقورنت الفروقات المعنوية بين المتوسطات باختبار اقل فرق معنوي LeastSignificant Differences (LSD) باحتمالية 5%[14].

النتائج والمناقشة

تأثير نترات الفضة في الوزن الطري والجاف للكالس

يوضح الجدول (1) ان اضافة تراكيز مختلفة من نترات الفضة $AgNO_3$ لم يؤدي الى فروقات معنوية في الوزن الطري عن معاملة السيطرة , وقد ادت الى تناقص في الوزن الطري للكالس. اذ بلغ اعلى وزن طري للكالس 311.1 ملغم عند التركيز 0.1 ملي مولر. وقد بلغ الوزن الطري 295.3, 288.5 , 293.2 ملغم عند تجهيز الوسط بـ 0.2 , 0.3 ,0.4 ملي مولر على التوالي من $AgNO_3$. اما الوزن الجاف فأيضا لم تختلف المعاملات معنويا عن معاملة السيطرة, وبلغ اعلى وزن جاف 36.9 ملغم عند التركيز 0.1 ملي مولر من $AgNO_3$, جدول (2). ان اضافة المعادن الثقيلة الى الاوساط الزرعية يؤدي الى نقصان وزن الكالس , وذلك للتأثيرات السمية لهذه المركبات على الخلايا النباتية, ولذلك يتم استخدامها بتراكيز واطئة [15,9]. ان اضافة كلوريد الزئبق $HgCl_2$ الى الوسط الزرعي لكالس نبات *Catharanthus roseus* ادت الى انخفاض الوزن الطري والجاف للكالس في معظم التراكيز المستخدمة[10].

جدول (1): تأثير تراكيز مختلفة من نترات الفضة (ملي مولر) في الوزن الطري (ملغم) للكالس المستحث من الاوراق والمضافة الى وسط إدامة الكالس بعد ثلاثة أسابيع من نقله الى وسط الإدامة. n=3

التركيز (ملي مولر)	الوزن (ملغم)
السيطرة	427.4
0.1	311.1
0.2	295.3
0.3	288.5
0.4	293.2
قيمة LSD	NS

جدول (2): تأثير تراكيز مختلفة من نترات الفضة (ملي مولر) في الوزن الجاف (ملغم) للكالس المستحث من الاوراق والمضافة الى وسط إدامة الكالس بعد ثلاثة أسابيع من نقله الى وسط الإدامة. n=3

التركيز (ملي مولر)	الوزن (ملغم)
السيطرة	44.9
0.1	36.9
0.2	33.1
0.3	31.1
0.4	34.6
قيمة LSD	NS

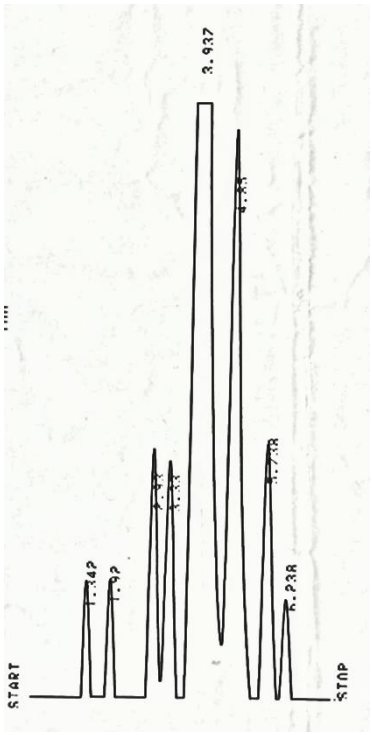
تأثير نترات الفضة في تركيز المركبات الثانوية

توضح النتائج في الجدول (3) والشكل (1) زمن احتجاز ومنحنيات عينات الكالس النامية على وسط غذائي مجهز بتراكيز مختلفة من نترات الفضة. حصلت اختلافات في معدلات المركبات اعتمادا على تراكيز نترات الفضة المضافة الى وسط الإدامة, جدول (4). اذ تبين نتائج هذا الجدول ارتفاع جميع معدلات المركبات عند التركيز 0.1 ملي مولر من نترات الفضة مقارنة بمعاملة السيطرة, اذ بلغ تركيز المركبات 0.0356 , 0.0787 , 0.4952 , 0.1199 , 0.1112 ملغم/غم لكل من المركبات التالية على التوالي p-hydroxy benzoic acid , p-cinamoylmelianolone , Azadirachtin , 1-cinnamoyl-3,11-dihydroxymeliacarpin , Salanin . كما شهد التركيز 0.2 ملي مولر ارتفاع تركيز جميع المركبات مقارنة بمعاملة السيطرة , اذ بلغ تركيز المركبات 0.0334, 0.4075, 0.0643, 0.1070 و0.1058 ملغم/غم لكل من المركبات التالية على التوالي p-hydroxy benzoic acid , p-cinamoylmelianolone , Azadirachtin , 1-cinnamoyl-3,11-dihydroxymeliacarpin , Salanin.

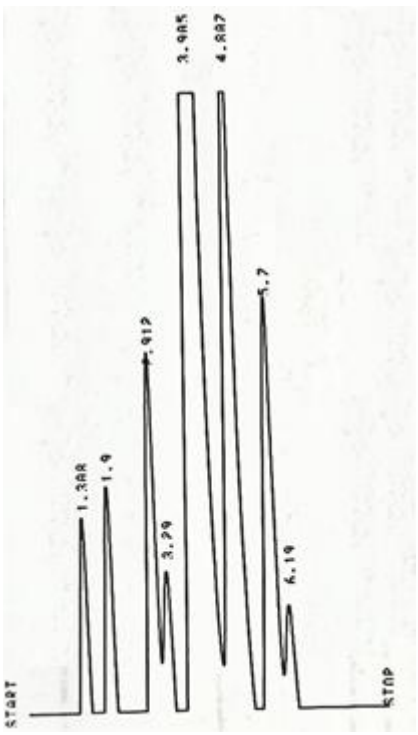
ارتفعت ايضا تراكيز جميع المركبات عند التركيز 0.3 ملي مولر مقارنة بمعاملة السيطرة , اذ بلغ تركيز المركبات 0.0616, 0.0652, 0.7262, 0.1821و 0.1020ملغم/غم لكل من المركبات التالية على التوالي p-hydroxy benzoic acid , 1-cinnamoyl-3,11- , Azadirachtin , p-cinamoylmelianolone dihydroxymeliacarpin , Salanin ومن الملاحظ ان هذا التركيز قد سجل ارتفاعا في تركيز اغلب المركبات مقارنة بالمعاملات الاخرى. اما عند التركيز 0.4 ملي مولر فقد سجلت المركبات ارتفاعا في التركيز بلغ 0.0492, 0.0377, 0.5657, 0.1662و0.1179 ملغم/غم لكل من المركبات التالية على التوالي p-hydroxy benzoic acid , 1- , Azadirachtin , p-cinamoylmelianolone , cinnamoyl-3,11-dihydroxymeliacarpin , Salanin . كما يتبين من الجدول نفسه ان الزيادة في تراكيز المركبات كانت غير معنوية باستثناء المركبان p-hydroxy benzoic acid , Azadirachtin اللذان كانت الزيادة في تركيزيهما معنويا في جميع التراكيز المستخدمة من نترات الفضة بالمقارنة مع معاملة السيطرة.ان المعادن الثقيلة لها القابلية على استثارة المركبات الثانوية لانها تولد شداً Stress على الانسجة لكونها تعتبر مواد سامة للخلايا, و ان $AgNO_3$ كان فعالا في زيادة مركب (Polyamine) الحر والمقترن في نبات البطاطا *Solanum tuberosum* [11] , وقد كانت نترات الفضة فعالة في زيادة انتاج مركب Taxol من نبات *Taxus chinensis* [12]وهذا يتفق مع النتائج الحالية. كما ان نترات الفضة كانت الاكثر فعالية من بين العديد من المثيرات التي استخدمت لزيادة تركيز مركبي Phyllanthin and Hypophyllanthin في نبات *Phyllanthus amarus* [13].

جدول (3): زمن الأحتجاز (دقيقة) للمركبات بعد إضافة تراكيز مختلفة من (ملغم/لتر) الى وسط إدامة الكالس المستحث من الاوراق.

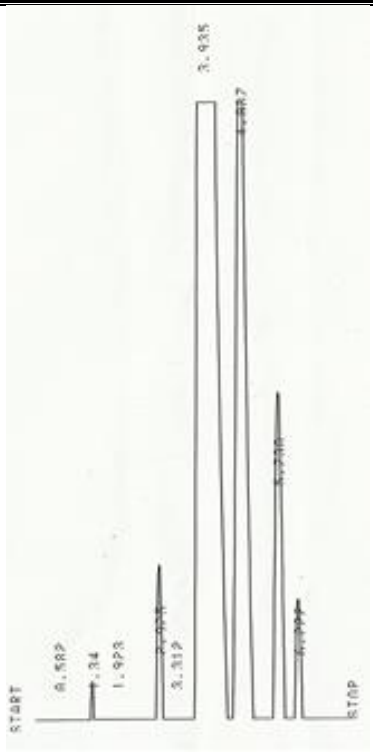
تركيز $AgNO_3$ (ملي مولر) / زمن الاحتجاز (دقيقة) للمركبات المدروسة	السيطرة	0.1	0.2	0.3	0.4
p-hydroxy benzoic acid	1.348	1.308	1.342	1.340	1.323
p-cinamoylmelianolone	1.990	1.900	1.920	1.923	1.858
Azadirachtin	3.917	3.905	3.937	3.312	3.930
1-cinnamoyl-3,11-dihydroxymeliacarpin	4.792	4.807	4.850	4.837	4.827
Salanin	5.737	5.700	5.738	5.738	5.722



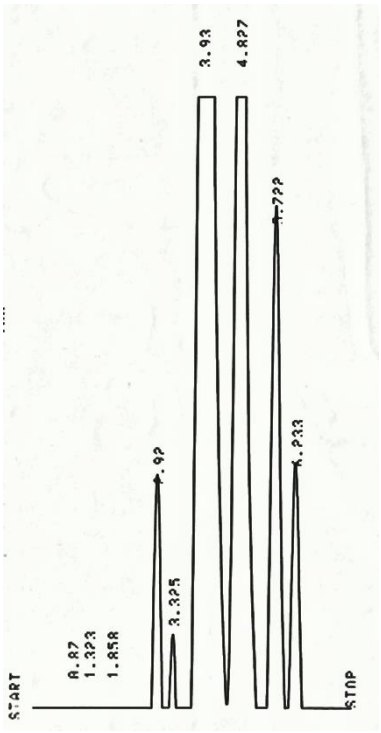
(B)



(A)



(C)



(D)

شكل(1): منحنيات المركبات في مستخلص كالس نبات السبحبح المستحث من الاوراق الفتية بعد إضافة نترات الفضة بتراكيز مختلفة الى وسط إدامة الكالس A) 0.1 ملي مولر , B)0.2 ملي مولر, C)0.3 ملي مولر , D)0.4 ملي مولر باستعمال جهاز HPLC.

جدول (4): تأثير تراكيز مختلفة من نترات الفضة (ملي مولر) المضافة الى وسط إدامة الكالس المستحث من الاوراق في إنتاج المركبات (ملغم/غم) وبعد ثلاثة أسابيع من الزراعة.

تركيز $AgNO_3$ (ملي مولر) / المركبات (ملغم/غم)	السيطرة	0.1	0.2	0.3	0.4	LSD
p-hydroxy benzoic acid	0.0093	0.0356	0.0334	0.0616	0.0492	0.02268
p-cinamoylmelianolone	0.0356	0.0787	0.0643	0.0652	0.0377	NS
Azadirachtin	0.1416	0.4952	0.4075	0.7262	0.5657	0.2090
1-cinnamoyl-3,11-dihydroxymeliacarpin	0.0598	0.1199	0.1070	0.1821	0.1662	NS

Salanin	0.0483	0.1112	0.1058	0.1020	0.1179	NS

المصادر

1- Balandrin, M. J. and Klocke, J. A. (1988). Medicinal, aromatic and industrial materials from plants. In :Bajaj. Y. P. S., editor. "Biotechnology in Agriculture and Forestry". Medicinal and Aromatic Plants". 4-Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, PP:1-36.

2- Hermann, K. M., and Weaver, L. M. (1999). The shikimate pathway. Annu. Rev. Plant Physiology. Plant Mol. Biol., 50:473-503.

3- Schoonhoven, LM. 1982. Biological aspects of antifeedants. Entomo-logia expermentalis applicata. 31:57-69.

4- Purohit, S. S. (1999). Agriculture Biotechnology. Agro Botanical. J. N. V. Yas Naggrr, Bikaner, India, P: 833.

5- Mordue, A. J. 2004. Present Concepts of the Mode of Action of Azadirachtin From Neem. Neem: Today and in the New Millennium pp 229-242.

6- Cecilia C., Carlos F., Graciela V., Maria D., Sara P. 2002. Potent limonoid insect antifeedant from *Melia azedarach*. Bioscience Biotechnology and Biochemistry. 66(8):1731-6.

7- Murashige, T.; and Skoog, F.(1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant*. 15:473-497.

8- Sundaram, K.; and Curry, J.(1993).High performance liquid chromatographic determination of azadirachtin in conifer and deciduous foliage, forest soils, leaf litter and stream water. *J. Liq. Chromatogr. Rel. Tech.* 16(15): 3275–3290.

9- Benavides, M.P.; Gallego, S.M.; Tomaro, M.L.; and Braz, J. (2005). Cadmium toxicity in plants. *Plant Physiol*. 17 (1).

10- Fathalla, M. Abd-El-Kareem, Abd-El Kawy A.M and Taha H.S.(2011). Effect of Heavy Metal (HgCl2) on Accumulation and Production of Total Indole Alkaloids, Vinblastine And/or Vincristine from Egyptian *Catharanthus Roseus* (L.) G. Don. Calli Cultures. Journal of Applied Sciences Research, 7(4): 542-549

11- Mader, J.C. 1999. "Effects of jasmonic acid, silver nitrate and L-AOPP on the distribution offree and conjugated polyamines in

roots and shoots of *Solanum tuberosum invitro*", *J PLANT PHY*, 154(1), pp. 79-88

12- Miao Z-Q, Wei Z-J, Yuan Y-J. 2000. Studies on the action of methyl jasmonate in taxol biosynthesis pathway and its compatibility. Acta Biophys Sin , 16: 204-212. (in Chinese with English abstract)

13- Thakur J.S., Agarwal R.K. and Kharya M.D. (2011). Immobilization mediated enhancement of Phyllanthin and Hypophyllanthin from *Phyllanthus amarus* . *International Conference on Environmental, Biomedical and Biotechnology*. *vol.16*

14- الراوي, خاشع محمود; خلف, عبدالعزيز محمد (1980). تصميم وتحليل التجارب الزراعية, مديرية دار الكتب للطباعة والنشر, جامعة الموصل, العراق.

15- ابراهيم, كاظم محمد و شيماء يسر يوسف (2009). دراسات عن تحمل نبات السيسبان *Sesbania grandiflora* L. للمعادن الثقيلة خارج وداخل الجسم الحي. مركز بحوث التقانات الاحيائية. 3 : 2.

16- *In vitro* effect of silver nitrate on elicitation of some secondary metabolites in *Melia azedarach* L.

Abstract

This project was conducted in the plant tissue culture laboratory, Biology Department, College of Science, Al-Mustansiriyah University. The major objective of this study was to increase some secondary metabolites using Silver nitrate as abiotic elicitors added to the tissue culture medium of *Melia azedarach* L. plants. The productivity was compared with those produced by the intact plants. Plant leaves were disinfected by NaOCl at 1% for 5 min. Callus was initiated on leaves explants grown on MS medium supplemented with 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) at concentrations 1.0 mg/l. The same combination was used for callus maintenance. The quality and quantity of phytochemicals were investigated using methanol extracts of leaves and Callus tissues were analyzed using High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Results showed an increase of secondary metabolites concentration in methanol extracts of callus cultures compared with leaves extract. Callus cultures were treated with silver nitrate ($AgNO_3$) at the concentrations 0.1, 0.2, 0.3 or 0.4 mM. Results also showed all concentration of secondary metabolites were increased. P-hydroxy benzoic acid , Azadirachtin were recorded significant differences compared with control, reached 0.0616, 0.7262 mg\g respectively. While p-cinamoylmelianolone , 1-cinnamoyl-3,11-dihydroxy meliacarpin and Salanin concentration reached 0.1821 ,0.0787 and 0.1179 mg\g respectively but not recorded significant differences. Results also showed that using silver nitrate caused decrement of fresh and dry weight without any significant differences compared to control.