مجلة جامعة النهرين المجلد ١٦ العدد(٣) ايلول، ٢٠١٣ ص ٣٣-٤٠
العلوم

تحفيز إنتاج بعض مركبات الأيض الثانوي في كالس نبات الحلبة.*Trigonella foenum- graecum* L بإضافة تراكيز من حامض الساليسليك خارج الجسم الحي.

إستبرق سامي عباس* ، سعدية حسن محمود* و كاظم محمد إبراهيم**
*** كلية العلوم ، الجامعة المستنصرية ، بغداد– العراق.**
**** كلية العلوم ، جامعة النهرين ، بغداد– العراق.**

الخلاصة

أجري البحث الحالي بهدف دراسة تأثير إضافة تراكيز مختلفة من حامض الساليسليك (٠، ٥٠، ١٠٠، ١٥٠ و ٢٠٠ ملغم/ لتر) في إنتاج مركبات الأيض الثانوي في كالس نبات الحلبة .*Trigonella foenum- graecum* L. قدرت مركبات الأيض الثانوي بالتحليل الكمي والنوعي بإستعمال جهاز High performance liquid chromatography (HPLC) لعينات المستخلص الميثانولي للسويقة الجنينية السفلى المفصولة من البادرات النامية تحت ظروف الحقل والبادرات المعقمة المجففتين. حفز الكالس على النشوء من زراعة السويقة الجنينية السفلى على وسط Murashige و Skoog(١٩٦٢) (MS) المدعم بإضافة 1.5ملغم/ لتر من Benzyl adenine (BA) و0.5 ملغم/لتر من 4-Dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D). وقد أستعملت التوليفة نفسها أعلاه لإدامة الكالس المستحث. تميز المستخلص الميثانولي للكالس بارتفاع المحتوى الكلي للقلويدات والكلايكوسيدات الصابونينية الأستيرويدية مقارنة بالمحتوى الكلي للبادرات النامية تحت ظروف الحقل والبادرات المعقمة. أدت إضافة حامض الساليسليك بالتراكيز اعلاه الى حدوث إنخفاض في الوزن الطري للكالس. وأظهرت النتائج وجود فروقات معنوية بين التراكيز المختلفة من حامض الساليسليك في محتوى الكالس من القلويدات. فقد إرتفعت تراكيز القلويدات عند إضافة ١٥٠ ملغم/لتر من حامض الساليسليك إذ وصلت الى 19.92، ٦٦,٥٠، ١٤٢,٢٣، ٨٤,٧٣ و ٩٩,٠١ ملغم/ غم وزن الكالس الطري لكل من السكوباليتين (Scopaletin)، الكولين (Choline)، الترايكونيلين (Trigonelline)، الكاربين (Carpaine) و الجنتيانين (Gentianine) على التوالي. إرتفع تركيز كلايكوسيد الياموجنين (Yamogenin) عند إضافة ٥٠ ملغم/لتر من حامض الساليسليك إذ وصل الى ١٤,٣٢ ملغم/ غم.

الكلمات المفتاحية: زراعة الأنسجة النباتية، نبات الحلبة، .*Trigonella foenum- graecum* L، مركبات الأيض الثانوي، حامض الساليسليك، HPLC.

المقدمة

تعد النباتات الطبية ذات أهمية كبيرة في حياة الأنسان لكثرتها وتعدد استعمالاتها. فتكمن فائدة هذة النباتات في قابليتها على إنتاج العديد من المركبات العضوية ذات الخصائص الطبية والتي تدخل كمادة أولية أو عوامل مساعدة في صناعة الأدوية إضافة الى تحضيرالمبيدات الحشرية، المطعمات، العطور و الألوان [١]. وفرت التطبيقات المختلفة لزراعة الأنسجة إمكانية الحصول على مركبات مهمة أقتصادياً و من ضمنها المركبات الدوائية التي يصعب تحضيرها مختبرياً فضلاً عن كلفتها العالية عند تصنيعها [٢]. وهناك الكثير من الفوائد التي تقترنُ بإنتاج هذه المركبات بهذه الطريقة إذا ماقورنت باستخلاصها من النبات الكامل. يمكن الحصول على هذه المركبات بدرجة نقاوة عالية من المزارع النسيجية تفوق تلك المستخلصة من النبات الكامل، وإنتاجها يكونُ سريع وغير معتمد على الموسم ولاحاجة لمساحات اراضي واسعة [٣].

الحلبة .*Trigonella foenum- graecum* L نبات عشبي حولي يعود الى العائلة البقولية (Fabaceae = Leguminosae). ويتراوح ارتفاع النبات عند النضج 20–60 سم، ويمتاز بسيقان جوفاء، واوراق

ريشية مركبة ثلاثية الوريقات، أزهاره بيضاء مائلة الى الاصفرار و ثمارها من نوع البقلة [٤]. يعد نبات الحلبة من أقدم النباتات الطبية المعروفة لقابليتة على خفض نسبة السكر والكوليسترول في الدم وتثبيط نمو الخلايا السرطانية [٥ و ٦]. وبناءاً على ماسبق من أهمية طبية للنبات واحتوائه على مركبات ثانوية مهمة تدخل في الصناعات الصيدلانية ولكن إنتاجها قليل مقارنة بالحاجة الفعلية لهذه المركبات. فقد أجريت هذه الدراسة التي تهدف الى حث إنسجة النبات على زيادة إنتاج مركبات الأيض الثانوي وذلك عن طريق تجهيز الوسط الحاوي على الكالس لتراكيز مختلفة من حامض الساليسليك. والكشف كماً ونوعاً عن المركبات المنتجة عن طريق التحليل الكروماتوغرافي بإستعمال جهاز HPLC لمستخلصات السويقة الجنينية السفلى المفصولة من البادرات النامية تحت ظروف الحقل والبادرات المعقمة المجففتين والكالس الرطب.

المواد وطرائق العمل

تم الحصول على بذور نبات الحلبة من محلات العطارة في بغداد. عقمت البذور بهايبوكلورات الصوديوم تركيز ٣% لمدة ١٠ دقائق ثم غسلت البذور بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات متتالية ثم زرعت على وسط Murashige و Skoog [٧] (MS) بنصف قوة الأملاح. حضنت الزروعات على درجة حرارة 25±١°م وإضاءة ١٠٠٠ لوكس مدة ١٦ ساعة يومياً. بعد ١٠ أيام من إنبات البذور، أخذت السويقة الجنينية السفلى بطول ١ سم تقريباً. جرى ذلك تحت ظروف معقمة داخل منضدة سريان الهواء الطبقي وزرعت في أنابيب زراعة بأبعاد ٨×٢,٥ سم الحاوية على ١٠ مل من الوسط الغذائي الذي يحتوي على BA و 2,4-D بالتراكيز ١,٥ و ٠,٥ ملغم/ لتر على التوالي لإستحثاث الكالس. حضنت الزروعات تحت الظروف المشار لها في زراعة البذور. وقد إستعملت التوليفة نفسها أعلاه لإدامة الكالس المستحث وحسب الوزن الطري للكالس.

أخذ 250 ملغم من الكالس وزرع في وسط إدامة الكالس مضافاً أليه حامض الساليسليك بتراكيز مختلفة (٠، ٥٠، ١٠٠، ١٥٠ و ٢٠٠ ملغم/لتر). حضنت الزروعات تحت الظروف المشار لها في زراعة البذور وبعشرة مكررات لكل تركيز. حسب الوزن الطري للكالس بعد ثلاثة أسابيع من الزراعة.

ولغرض إستخلاص القلويدات تم أتباع طريقة Zaho وآخرون [٨] وزن 10ملغم من العينات (السويقة الجنينية السفلى المفصولة من البادرات النامية تحت ظروف الحقل والبادرات المعقمة المجففتين والكالس الرطب) وأضيف لكل عينة 10 مل من الميثانول النقي 95% نوع HPLC grade (لايحتوي على مواد ممتصة من قبلUV وذات 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 0.5 مل (زيادة تركيز المذيب بطريقة التبخير). تمت زيادة حجم المذيب بإضافة كمية من محتوى الطور المتحرك : 0.01M phosphate buffer pH8.2 Acetonitrile (60:40 v\v) للوصول بالحجم الى 1 مل. رشح الحجم الأخير بأستعمال ورق ترشيح قياس 0.25 مايكروميتر. حقن 20 مايكروليتر في جهاز HPLC تحت ظروف الفصل المثلى. أما بالنسبة لأستخلاص الكلايكوسيدات الصابونينية الأستيرويدية فقد أجريت وفق طريقة Yang وآخرون [٩] وتمت تحت نفس الظروف المشار لها في أستخلاص القلويدات، عدا أن زيادة حجم المذيب تمت بإضافة كمية من محتوى الطور المتحرك Acetonitrile: Water 8:92 v\v للوصول بالحجم الى 1 مل.

استعمل جهاز كروموتوغرافيا السائل ذو الأداء العالي HPLC نوع Spectrophysic\UV-Visible detector في تقدير كمية ونوعية النواتج الثانوية في مستخلصات الكالس. قدرت القلويدات بحقن العينة في عمود نوع Reversed phase chiral column ذي ابعاد (50×4.6mm I.D) وحجم الدقائق 3µm ودرجة حرارة ٣٠°م. و قدرت النواتج الثانوية لمستخلص العينات بحقن 25 مايكروليتر في العمود وتحت الظروف الأتية:

- الطور المتحرك : 0.01M phosphate buffer pH8.2 .: Acetonitrile (60:40 v\v)
- سرعة الجريان: 0.9 مل \دقيقة.
- الطول الموجي: 220 نانوميتر [٨].

قدرت الكلايكوسيدات الصابونينية الأستيرويدية بحقن العينة في عمود نوع Lichrospher C18 ذي ابعاد 4.6×50 mm I.D وبنفس حجم الدقائق ودرجة الحرارة المستعملة في القلويدات.

قدرت النواتج الثانوية لمستخلص العينات بحقن 25 مايكروليتر في العمود وتحت الظروف الأتية :

- الطور المتحرك: Acetonitrile: Water 8:92 v\v.
- سرعة الجريان: 1.2 مل/ دقيقة.
- الطول الموجي: 203 نانوميتر [٩].

سجلت القراءات على الأطوال الموجية وحسب زمن الاحتجاز Rt للمحاليل القياسية والعينات المدروسة. قدرت تراكيز المواد الفعالة كمياً بمقارنة مساحة حزمة المادة القياسية مع مساحة حزمة النموذج تحت نفس الظروف أعتمادا على القانون التالي :

تركيز المادة المجهولة= مساحة حزمة النموذج/ مساحة حزمة القياسي × تركيز القياسي × عدد مرات التخفيف. اخضعت جميع البيانات الى التحليل الأحصائي كتجارب عاملية باستعمال التصميم العشوائي الكامل (CRD)، وتم حساب قيمة اقل فرق معنوي على مستوى احتمال٠,٠٥ [١٠].

النتائج والمناقشة

مزارع الكالس

أظهرت النتائج تكوين كالس هش ذي لون أخضر من قطع السويقة الجنينية السفلى المفصولة من بادرات الحلبة المعقمة في وسط MS المدعم بإضافة ١,٥ و 0.5 ملغم/لتر من BA و ٢,4-D على التوالي. بينما لم تستجب قطع الأوراق لأستحثاث الكالس. قد يعود ذلك الى كون خلاياها متمايزة وبطيئة الأنقسام وأحتياجها لمدة زمنية أطول لكي تنقسم وتنمو [١١].

تأثير حامض الساليسليك في الوزن الطري للكالس

يلاحظ من الجدول 1 أن أضافة تراكيز مختلفة من حامض الساليسليك أدى إلى تناقص معنوي في الوزن الطري للكالس ووصلت أدنى قيمة (٩٥ ملغم) عند تجهيز الوسط بـ ٢٠٠ ملغم/ لترمن حامض الساليسليك. قد يوثر حامض الساليسليك في نمو وحيوية الخلايا من خلال تثبيطه لتكوين ATP و عملية التنفس مؤدية الى نقصان حجم الخلايا أو موتها كما حدث في المزارع النسيجية لنبات التبغ [١٢]. وذكر القدسي [١٣] بأن أقل وزن طري للكالس حصل عند التركيز ٢٠٠ ملغم/ لتر من حامض الساليسليك وهذا يتفق مع النتائج الحالية.

جدول (١)

تأثير حامض الساليسليك المضاف الى الوسط الغذائي في الوزن الطري للكالس بعد ثلاثة اسابيع من الزراعة، n=10.

التركيز (ملغم/لتر)	الوزن (ملغم)
0	250
50	175
100	130
150	119
200	95
أ. ف.م P≤0.05	*37.62

التقدير الكمي والنوعي للقلويدات في مستخلصي السويقة الجنينية السفلى المفصولة من البادرات النامية تحت ظروف الحقل والبادرات المعقمة المجففتين ومستخلص الكالس الرطب

توضح نتائج جدول ٢ زمن أحتجاز القلويدات في مستخلصي السويقة الجنينية السفلى المفصولة من البادرات النامية تحت ظروف الحقل والبادرات المعقمة المجففتين ومستخلص الكالس الرطب والتي أظهرت وجود ٥ مركبات. عند حساب تراكيز القلويدات وكما مبين في الجدولين ٣ و٤ وجد هنالك فروقاً معنوية (P≤0.05) بين تراكيز المركب الواحد وبأختلاف الأجزاء النباتية. حقق قلويد Scopaletin اعلى تركيز له وبلغ ٩,١٦ ملغم/ غم وزن جاف يليه في البادرات النامية تحت ظروف الحقل وبلغ ٧,٧٦ ملغم/ غم وأقل تركيز له كان في الكالس وبلغ ٣,٩ ملغم/ غم وزن رطب. قلويد choline سجل أعلى تركيز له في البادرات النامية تحت ظروف الحقل وبلغ ٨,٥٣ ملغم/ غم يليه في البادرات المعقمة وبلغ ٤,١٣ ملغم/ غم واقل تركيز له كان في الكالس وبلغ

٤,٠ ملغم/غم. قلويد trigonelline سجل أعلى تركيز له في الكالس وبلغ ٤٨,٣٢ ملغم/ غم يليه في البادرات المعقمة وبلغ ٩,١٣ ملغم/ غم واقل تركيز له كان في البادرات النامية تحت ظروف الحقل وبلغ ٨,٦٠ ملغم/ غم.اما قلويدي carpaine و gentianine فقد سجلا أعلى تركيز لهما في الكالس وبلغا ٢٨,٨ و ١٠,٢٨ ملغم/ غم على التوالي ثم في البادرات النامية في ظروف الحقل وبلغا ١٤,٧٨ و ٨,٧٦ ملغم/ غم على التوالي وأقل تركيز لهما كان في البادرات المعقمة وبلغا ١٤,٣٥ و ٤,٦٨ ملغم/ غم على التوالي. يتبين من النتائج أعلاه أن الكالس حقق أعلى زيادة في المحتوى الكلي للقلويدات وبلغ ١٩,١٦ ملغم/ غم يليه البادرات النامية تحت ظروف الحقل وبلغ ٩,٧٧ ملغم/ غم وأقل محتوى للقلويدات سجل عند البادرات المعقمة وبلغ ٨,٢٩ ملغم/ غم. لذلك يختلف محتوى الأجزاء الثلاث حسب نوع المركبات وحسب الجزء النباتي المفصولة منه. أن الأختلاف في تراكيز المركبات قد يرجع الى عوامل بيئية (الضوء، الرطوبة، نوع الجزء النباتي، مرحلة نمو النبات والعوامل الوراثية) [١٤]، بالأضافة الى عوامل اخرى مثل مكان تواجد النبات وحالة النبات الفسلجية قبل الأستخلاص [١٥]. ويمكن أيعاز سبب زيادة المركبات في الكالس إلى ان منظمات النمو المضافة الى وسطي إستحثاث وإدامة الكالس أدت الى تحفيز وزيادة إنتاج المركبات الثانوية في الكالس ويمكن أيضاً ان يكون اعادة الزراعة (Sub Culture) المستمر أدى الى نشوء تغاير جسماني (Somaclonal Variation) في الخلايا مما أدى الى زيادة إنتاجها للمركبات الثانوية في الكالس [١٦]. تتفق هذه النتائج مع ما ذكره Radwan و Kokate [١٧] اللذان وجدا إن أضافة حامض النيكوتنك الى الوسط الغذائي قد أثر معنوياً في زيادة إنتاج Trigonelline.

جدول (٢)

زمن أحتجاز (دقيقة) القلويدات المدروسة في مستخلصي السويقة الجنينية السفلى النامية المفصولة من البادرات النامية تحت ظروف الحق والبادرات المعقمة المجففتين ومستخلص الكالس الرطب.

القلويدات	البادرات النامية تحت ظروف الحقل	البادرات المعقمة	الكالس
Scopaletine	١,٥٤	١,٦٨	١,٣٦
Choline	٢,٠٣	٢,٠٥	٢,٣٨
Trigonelline	٣,٨٨	٣,٣٣	٣,٦٠
Carpaine	٤,٢٢	٤,٢٢	٤,٢٠
Gentianine	٥,٠٣	٥,٠٨	٤,٩٦

جدول (٣)

زمن الأحتجاز، المساحة، تراكيز القلويدات القياسية المدروسة بإستعمال جهاز HPLC.

ت	القلويدات المدروسة	زمن الأحتجاز (دقيقة)	مساحة القلويدات القياسية	تركيز المحلول (مايكروغرام/ مل)
1	Scopletin	1.38	12962	25
2	Choline	2.36	9979	25
3	Trigonelline	3.55	16998	25
4	Carpaine	4.20	11020	25
5	Gentianine	5.00	13975	25

جدول (٤)

القلويدات (ملغم/غم) في السويقة الجنينية السفلى المفصولة من البادرات النامية تحت ظروف الحقل والبادرات المعقمة المجففتين والكالس الرطب بأستعمال جهاز HPLC، n=3*.

ت	القلويدات	النامية تحت ظروف الحقل	البادرات المعقمة	الكالس	أ.ف.م P≤0.05
١	Scopletin	٧,٧٦	٩,١٦	٣,٩	١,٤٤ *
٢	Choline	٨,٥٣	٤,١٣	٤,٠	٢,١٦*
٣	Trigonelline	٨,٦٠	٩,١٣	٤٨,٣٢	٣,٣٩ *
٤	Carpaine	١٤,٧٠	١٤,٣٥	٢٨,٨	٣,٣٩*
٥	Gentianine	٨,٧٦	٤,٣٥	٤,٦٨	١٠,٨٢*
	متوسط تراكيز القلويدات	٩,٧٧	٨,٢٩	١٩,١٦	-----

*القيم مضروبة ×١٠٠.

التقدير الكمي والنوعي للكلايكوسيدات الصابونينية الأستيرويدية في مستخلصي السويقة الجنينية السفلى المفصولة من البادرات النامية تحت ظروف الحقل والبادرات

المعقمة المجففتين ومستخلص الكالس الرطب بأستعمال جهاز HPLC.

توضح نتائج جدول ٥ زمن أحتجاز الكلايكوسيدات في مستخلصي السويقة المفصولة من البادرات النامية تحت ظروف الحقل والبادرات المعقمة المجففتين و مستخلص الكالس الرطب والتي أظهرت وجود ٣ مركبات من الكلايكوسيدات الصابونينية الأستيرويدية. وعند حساب تراكيز الكلايكوسيدات و كما مبين في الجدولين ٦ و ٧ وجد هنالك فروقاً معنوية ($P\leq0.05$) بين تراكيز المركب الواحد باختلاف الأجزاء النباتية. حقق كلايكوسيد yamogenin أعلى تركيز له في البادرات المعقمة وبلغ ٢٣,٩٦ ملغم/ غم وزن جاف يليه في البادرات النامية تحت ظروف الحقل وبلغ ١٠,٣٥ملغم/ غم وأقل تركيز لهذا المركب كان في الكالس وبلغ ٤,٥١ ملغم/ غم وزن رطب. حقق diosagenin و tigogenin أعلى تركيز لهما في الكالس وبلغا ١٠٠,٩ و ٤١,٧٩ ملغم/ غم على التوالي يليه في البادرات المعقمة وبلغا ٢١,٨٤ و ٣٨,٠٧ ملغم/ غم على التوالي وأقل تركيز لهما كان في البادرات النامية تحت ظروف الحقل وبلغا ١٠,٣٧ و٩,٢ ملغم/ غم على التوالي. يتبين من النتائج أعلاه أن الكالس حقق أعلى زيادة في المحتوى الكلي للكلايكوسيدات بلغ ٤٩,٠٦ ملغم/ غم يليه في البادرات المعقمة بلغ ٢٨,٠٧ ملغم/ غم وأقل محتوى كلي للكلايكوسيدات كان في البادرات النامية تحت ظروف الحقل وبلغ ٩,٩٧ ملغم/ غم. تتفق هذه النتائج مع ماذكره Oncina وآخرون، [١٨] و Rezaeian، [١٩] اللذان أكدو بان منظمات النمو المضافة الى الوسط الغذائي لها دور كبير في تنظيم عمليات بناء وتراكم مركب diosgenin في كالس نبات الحلبة. ويفسر هذا التأثير دور هذه المنظمات في تحفيز نمو الكالس مما يترتب عليه زيادة البناء الحيوي لهذا المركب، خاصة وأن خلاياها من النوع البرنكيمي وإحدى وظائفها هي الخزن. إما بالنسبة للمركب triqocoumarine فقد أختفى تركيزه من منحنيات تحليل كلايكوسيدات المستخلصات (السويقة النامية تحت ظروف الحقل، البادرات المعقمة والكالس) قد يعزى سبب ذلك الى نوع الجزء النباتي الداخل في التحليل، في الوقت الذي تمكن Parmar وآخرون [٢٠] من عزل هذا المركب من مستخلص النبات الكامل.

جدول (٥)

زمن أحتجاز (دقيقة) الكلايكوسيدات الصابونينية الأستيرويدية المدروسة في مستخلصي السويقة الجنينية السفلى المفصولة من البادرات النامية تحت ظروف الحقل والبادرات المعقمة المجففتين ومستخلص الكالس الرطب.

الكلايكوسيدات الصابونينية الأستيرويدية	البادرات النامية تحت ظروف الحقل	البادرات المعقمة	الكالس
Yamogenin	١,٤٠	١,٤٣	١,٠٩
Diosagenin	٢,٢٧	٢,٣٩	٢,٣٩
Tigogenin	٣,٨٧	٣,٦١	٣,٩٢٣

جدول (٦)

زمن الأحتجاز، المساحة و تراكيز الكلايكوسيدات الصابونينية الأستيرويدية القياسية المدروسة بأستعمال جهاز HPLC.

ت	الكلايكوسيدات الصابونينية الأستيرويدية المدروسة	زمن الأحتجاز (دقيقة)	مساحة الكلايكوسيدات الصابونينية الأستيرويدية القياسية	تركيز المحلول (مايكرو غرام/ مل)
1	Yamogenin	1.09	29931	25
2	Diosgenin	2.27	30885	25
3	Triqocoumarin	2.91	17796	25
4	Tigogenin	3.92	27745	25

جدول (٧)

الكلايكوسيدات الصابونينية الأستيرويدية (ملغم/ غم) في السويقة الجنينية السفلى المفصولة من البادرات النامية تحت ظروف الحقل والبادرات المعقمة المجففتين والكالس الرطب بأستعمال جهاز HPLC، n=3*.

ت	الكلايكوسيدات	النامية تحت ظروف الحقل	البادرات المعقمة	الكالس	أ.ف.م P≤0.05
١	Yamogenin	١٠,٣٥	٢٣,٩٦	٤,٥١	*١٠,٨
٢	Diosgenin	١٠,٣٧	٢١,٨٤	١٠٠,٩	*٢٤,١
٣	Tigogenin	٩,٢	٣٨,٤٢	٤١,٧٩	*١٥,٢
	متوسط تراكيز الكلايكوسيدات	٩,٩٧	٢٨,٠٧	٤٩,٠٦	----

* القيم مضروبة ×١٠٠.

تأثير تراكيز حامض الساليسليك في إنتاج القلويدات من الكالس والتقدير الكمي والنوعي لهذه المركبات بأستعمال جهاز HPLC.

توضح نتائج الجدول ٨ زمن أحتجاز القلويدات عند إضافة تراكيز حامض الساليسليك الى وسط الإدامة. وتوضح نتائج جدول ٩ حصول أختلافات في تراكيز القلويدات أعتماداً على تراكيز حامض الساليسليك المضافة الى وسط الإدامة، إذ حصلت فروقات معنوية بين تراكيز المركب الواحد مقارنة مع السيطرة. إرتفعت تراكيز المركبات عند إضافة ١٥٠ ملغم/ لتر من حامض الساليسليك إذ وصلت الى ١٩,٩٢، ٦٦,٥٠، ١٤٢,٢٣، ٨٤,٧٣ و ٩٩,٠١ ملغم/ غم وزن رطب لكل من Scopletin، Cholin، Trigonelline، Carpaine و Gentianine على التوالي، وإنخفضت أغلب تراكيز ألمركبات عند إضافة 200 ملغم/لتر من الحامض مسجلة ١٤,٩٥، ٧٥,٥٨، ١٠٧,٣٤، ٦٣,٨٩ و ٢٧,٨٠ ملغم/ غم لكل من Scopletin، Cholin، Trigonelline، Carpaine و Gentianine على التوالي مقارنة بمعاملة 150 ملغم/ لترمن حامض الساليسليك. تبين النتائج إن زيادة تراكيز حامض الساليسليك لم تؤدي الى حصول نقصان في تراكيز القلويدات مقارنة بمعاملة السيطرة. يلاحظ بأن أفضل تركيز لحامض الساليسليك والذي أدى الى زيادة تحفيز وإنتاج القلويدات في كالس النبات كان عند التركيز ١٥٠ ملغم/ لتر تحت ظروف التجربة الحالية. وقد أكد Kamal وآخرون [٢١] أن إضافة حامض الساليسليك الى الوسط الغذائي يعمل على تحفيز التعبير الجيني لمركبات الأيض الثانوي، ووجدو أن أضافة هذا الحامض يعتبرمن أكثر الطرق الفعالة في زيادة إنتاج القلويدات لدى المزارع النسيجية لنبات الحلبة وخصوصاً الترايكونيلين. وقد وجد القدسي [١٣] إن التحفيز بالتراكيز المختلفة لحامض الساليسليك في المزارع الخلوية أدى إلى زيادة معنوية في تراكم القلويدات في كالس نبات عنب الذيب بالتركيز 100ملغم/ لتر مقارنة بالسيطرة.

جدول (٨)

زمن أحتجاز القلويدات المدروسة (دقيقة) عند إضافة تراكيز من حامض الساليسليك الى وسط إدامة الكالس بعد ثلاثة أسابيع من الزراعة.

تركيز حامض الساليسليك (دقيقة)	زمن أحتجاز القلويدات (دقيقة)				
	Scopletin	Choline	Trigonelline	Carpaine	Gentianine
السيطرة	١,٣٦٧	٢,٣٨٧	٣,٦٠٣	٤,٢٠٣	٤,٩٦٢
٥٠	١,٣	٢,٢٩٢	٣,٦١٣	٤,٢٣٥	٤,٨٧
١٠٠	١,٢٠	٢,٧٥٨	٣,٥٦٢	٤,١٣٢	٥,٠٧٢
١٥٠	١,٢٩	٢,٧٦	٣,٥٩٢	٤,١٨٢	٥,٠٤٢
٢٠٠	١,٠٩٧	٢,٨١٧	٣,٩٨٢	٤,٥٥	٥,٠٠٨

جدول (٩)

تأثير تراكيز مختلفة من حامض الساليسليك في إنتاج القلويدات المضافة الى وسط إدامة الكالس المستحث من السويقة الجنينية السفلى بعد ثلاثة أسابيع من الأدامة، n=3.*

تركيز حامض الساليسليك (ملغم/لتر)	القلويدات (ملغم/غم)				
	Scopletin	Choline	Trigonelline	Carpaine	Gentianine
السيطرة	٣,٩	٤,٠	٤٨,٣٢	٢٤,٨٨	١٠,٨٢
٥٠	١١,٥٦	١٢,٦٥	٨٦,٤٤	٧٣,٦٢	٢٩,٣٨
١٠٠	١٣,٧٩	١٧,٣٦	١٠٣,١٧	٦٦,٤٦	٨٠,٣٨
١٥٠	١٩,٩٢	٦٦,٥٠	١٤٢,٢٣	٨٤,٧٣	٩٩,٠١
٢٠٠	١٤,٩٥	٧٥,٥٨	١٠٧,٣٤	٦٣,٨٩	٢٧,٨٠
أ. ف. م P≤0.05	*٥,٧	٣٥,٢١٨	*٣٦,٢	*٢١,٩	*٣٨,٦

* القيم مضروبة ×١٠٠.

تأثير تراكيز حامض الساليسليك في إنتاج الكلايكوسيدات الصابونينية الأستيرويدية من كالس نبات الحلبة والتقدير الكمي والنوعي لهذه المركبات بأستعمال جهاز HPLC.

يوضح نتائج جدول 10 زمن أحتجاز الكلايكوسيدات عند إضافة تراكيز حامض الساليسليك الى وسط الإدامة. وتوضح نتائج جدول ٩ حصول أختلافات في تراكيز الكلايكوسيدات أعتماداً على تراكيز حامض الساليسليك المضافة الى وسط الإدامة، إذ حصلت فروقات معنوية بين تركيز المركب الواحد مقارنة مع السيطرة. إذ أثرت تراكيز حامض الساليسليك المضافة جميعها سلبياً في إنتاج الكلايكوسيدات، فقد إنخفضت أغلب التراكيز عند إضافة 150 ملغم/ لتر من حامض الساليسليك ووصلت الى ٣١,١٤ و ١٨,٧٤ ملغم/ غم وزن رطب لكل من Diosgenin و Tigogenin على التوالي، وعند إضافة 50 ملغم/لتر من حامض الساليسليك ارتفع تركيز Yamogenin مسجلاً ١٤,٣٢ ملغم/ غم وزن رطب، مقارنة بمعاملة السيطرة. أكد Ghasemzadeh وآخرون [٢٢] بأن حامض الساليسليك يحفز زيادة أنتاج المركبات الفينولية وبالتالي يؤثر سلباً في إنتاج بعض أنواع الكلايكوسيدات وهذا ماأكدوه من خلال تجاربهم على نبات *Zingiber officinale*.

جدول (١٠)

زمن أحتجاز الكلايكوسيدات الصابونينية المدروسة (دقيقة) عند إضافة تراكيز من حامض الساليسليك المضافة الى وسط إدامة الكالس بعد ثلاثة أسابيع من الزراعة.

تركيز حامض الساليسليك (ملغم/لتر)	زمن أحتجاز الكلايكوسيدات الصابونينية الأستيرويدية (دقيقة)		
	Yamogenin	Diosgenin	Tigogenin
السيطرة	١,٠٩	٢,٢٧	٣,٩٢
٥٠	١,١١٢	٢,٣	٣,٩
١٠٠	١,٠٩٨	٢,٣	٣,٩٥
١٥٠	١,١٠	٢,٢٤	٣,٩٦٢
٢٠٠	١,٠٩٣	٢,٢٦٢	٣,٩٣٣

جدول (١١)

تأثير تراكيز مختلفة من حامض الساليسليك في إنتاج الكلايكوسيدات الصابونينية الأستيرويدية المضافة الى وسط إدامة الكالس المستحث من السويقة الجنينية السفلى وبعد ثلاثة أسابيع من الإدامة، n=3.*

تركيز حامض الساليسليك (ملغم/لتر)	الكلايكوسيدات الصابونينية الأستيرويدية (ملغم/غم)		
	Yamogenin	Diosgeni	Tigogenin
السيطرة	٤,٥١	١٠٠,٩٠	٤١,٧
٥٠	١٤,٣٢	٢٢,٤٢	٢٩,١٥
١٠٠	١١,٥١	٣٩,٩٩	١٨,٩٩
١٥٠	٦,٨	٣١,١٤	١٨,٤٧
٢٠٠	٥,١٨	٣٤,٠٣	٣٧,١١
أ.ف.م P≤0.05	*٣,٧	*٥٨,٣	*٦,٢

*القيم مضروبة ×١٠٠.

يستنتج من البحث أن الكالس حقق أعلى زيادة في أنتاج مركبات الأيض الثانوي (القلويدات والكلايكوسيدات الصابونينية الأستيرويدية) مقارنة بأنتاج المركبات في السويقة الجنينية السفلى المفصولة من البادرات النامية تحت ظروف الحقل والبادرات المعقمة. إضافة الى ذلك فأن أضافة حامض الساليسليك بتركيز ١٥٠ ملغم/ لتر أدى الى أعلى زيادة في إنتاج القلويدات، في الوقت الذي أثر سلباً في إنتاج الكلايكوسيدات الصابونينية الأستيرويدية. عدا أن تركيز ٢٠٠ ملغم/ لتر من حامض الساليسليك أدى الى زيادة في أنتاج الياموجنين والتايجوجنين.

References

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

[2] Purohit, S. S. "Agriculture Biotechnology". Published by Updesh Purohit for Agrobios (India), P.833، 1999.

[3] Discosmo, F. and Misawa, M. "Plant cell and tissue culture: Alternatives for

[14] Briskin, D. and Gawienowski, M. "HPLC profiling of the invasive plant species *Hypericum canariense* to assess rapid evolutionary changes in defensive chemistry". Plant Physiology Biochemist., 39: 1078-1081. 2001.

[15] Kirakosyan, A.; Gibson, M. D. and Sirvent, T. "A comparative study of *Hypericum perforatum* plants as a source of hypericins and hyperforins". J. of Herbs, Spices and Medicinal Plants, 10(4): 73-89. 2003.

[16] Mohy, A.; Khan, Z.; Ahmad, M.; Kashmiri, M. A.; Yasmin, S. and Mazhar, H. "Chemotaxonomic significance of flavonoids in *Solanum nigrum* complex". Plant Sci., 108:216-222, 2009.

[17] Radwan, S.S. and Kokate, C.K. "Production of higher levels of trigonelline by cell cultures of *Trigonella foenum-graecum* than by the differentiated plant. Biomedic". and Life Sci. J., 147 (4): 340-344, 1979.

[18] Oncina, R.; Botía, J.M.; Río, D. and Ortuño, A. "Bioproduction of diosgenin in callus of *Trigonella foenum graecum"*. Food Chem., 70 (4): 489-492. 2000.

[19] Rezaeian, S. "Assessment of diosgenin production by *Trigonella foenum-graecum* L. *In vitro* condition", America. J. of Plant Physio., 6:261-268, 2011.

[20] Parmar, V.S.; Jha, H.N.; Sanduja, S.K. and Sanduja, R. "Triqocoumarine- a New Coumarin from *Trigonella foenum-graecum"*. Z. Naturforsch, 37B. 521, 1982.

[21] Kamal, R., Moreno, R. P. H. and Verpoorte, R. "Effect of elicitor on production of alkaloid and enzymes activates of *Catheranthus roseus* suspension cultured cells". J. Biol. Chem., 234-244, 1995.

[22] Ghasemzaeh, A; Hawa, Z. and Jaafar, E. "Effect of salicylic acid application on biochemical changes in ginger *(Zingiber officinal* Roscae)". J. Medic. Plants, 6(5), 790-795, 2012.

Abstract

The effect of adding different concentrations of salicylic acid (0, 50, 100, 150 or 200 mg/l) on the production of some secondary metabolites in callus of *Trigonella foenum- graecum* L. plant was studied. The quality and quantity of phytochemicals were investigated using

metabolite production". Biotechnology Advances, 13(3):425-453, 1995.

[4] Peteropoulos, G.A. "Fenugreek-the genus *Trigonella"*, 1-127.1st Ed. Taylor and Francis group, London and New York. 2002.

[5] Devasena, T. and Menon, V.P. "Fenugreek affects the activity of β-Glucuronidase and mucinase in the colon, Phytother". Res. 9:1088-1091, 2003.

[6] Suboh, S.M.; Bilto, Y.Y. and Aburjiai, T.A. "Protective effects of selected medicinal plants aginst protein degradation, lipid peroxidation and deformability of oxidatively stressed human erthocytes". Phytother, Res. 18 (4): 280-284, 2004.

[7] Murashige, T. and Skoog, F. "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture". Physiol. Plant, 15:473-497, 1962.

[8] Zaho, H.; Wang، Y.; Zhang, H.; Li، F. and Hattari, M. "Determination of trigonelline in *Trigonella foenum- grarcum* L. by HPLC". Yao Xue Xue Bao. 27 (3):194-196, 2003.

[9] Yang, D. J.; Lu, T. J. and Hwang, L.S. "Stimultaneous determination of furostanol and spirostanol glycosides in Taiwanese yam (*Dioscorea* spp) cultivars by high performance liquid chromatography". J. of Food and Drug Analysis, 11(4):271-276, 2003.

[10] SAS. "SAS/ STAT Users Guide for Personal Computers". Release 7.0. SAS Institute Inc., Cary، NC., USA, 2004.

[11] Salih, S. M. and Al- Mallah, M. K. "Plant regeneration from *in vitro* leaf and stem tissue of *Solanum nigrum"*. Dirasat Agric. Sci. 27 (1): 64-71, 2000.

[12] Xie, Z. and Chen, Z. "Salicylic acid induces rapid inhibition of mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation in tobacco cells", Plant Physiol., 120، 217-226, 1999.

[١٣] القدسي، عادل سلطان سلمان. "إنتاج بعض المركبات الثانوية من نبات عنب الذيب *Solanum nigrum* في المزارع النسيجية"، إطروحة دكتوارة، كلية الزراعة، قسم البساتين، جامعة القاهرة، جمهورية مصر العربية، 2009.

methanol extracts of hypocotyls seedlings *in vivo, in vitro.* Calli were analyzed using high performance liquid chromatography (HPLC). Callus was initiated on dissected hypocotyls explants using Murashige and Skoog (1962) (MS) medium supplemented with Benzyl adenine (BA) at 1.5 mg/l with 0.5 2،4-Dichlorophenoxy acetic acid (2،4-D). The same combination was used for callus maintenance. Results also showed an increase in alkaloids and steroidal sapinogen glycosides in methanol extracts of callus culture. Results showed that above concentrations caused a reduction in callus fresh weight. Results also showed that a significant increase in the contents of alkaloids derived from callus. The best concentration of salicylic acid stimulated the production was 150 mg/l for alkaloids reached to 19.92, 66.50, 142.23, 84.73 and 99.01 mg/g for Scopaletine, Choline, Trigonelline, Carpaine and Gentianine respectively, and Yamogenin reached 14.32 mg/g at the concentration 50 mg/l of salicylic acid.