DOI: http://dx.doi.org/10.21123/bsj.2017.14.3.0461

تأثير منظمات النموالنباتية في استحثاث الكالس وانتاج الروتين في نبات الخروع *Ricinus communis* L.

غصون صائب صالح

البريد الالكتروني: Maanlouay@yahoo.com

قسم علوم الحياة، كلية العلوم للبنات، جامعة بغداد، بغداد، العراق.

استلام البحث 28/ 2016/12
قبول النشر 8/ 2017/3

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

الخلاصة:

يعد نبات الخروع *Ricinus communis* L. من النباتات المهمة على المستوى الطبي لاحتوائه على العديد من المركبات الفعالة.هدف البحث الى دراسة تأثير بعض منظمات النمو النباتية في استحثاث كالس نبات الخروع ومدى تأثيرها في المركب الثانوي الروتين Rutin. استعمل منظما النمو Benzyl adenine(BA)وIndol-3-acetic acid (IAA)وبالتراكيز (0.0 ، 1.0 ، 2.0) ملغم/لتر. بلغ اعلى وزن طري للكالس المستحث من سيقان الخروع 4.97 غم ضمن التوليفة (1.0 ، 1.0) ملغم/لتر (IAA ، BA) وشهدت المعاملة نفسها اعلى وزن جاف للكالس اذ بلغ 0.42 غم. اعطت التوليفة (2.0 ، 1.0) ملغم/لتر (IAA ، BA) اعلى وزن طري للكالس المستحث من الاوراق اذ بلغ 5.28 غم في حين شهدت التوليفة (1.0 ، 2.0) ملغم/لتر اعلى وزن جاف للكالس المستحث من الاوراق اذ بلغ 0.55 غم . استعمل جهاز المطياف الضوئي لقياس كمية الروتين في الكالس واظهرت النتائج ان اعلى مقدار للمركب الثانوي Rutin كان 126.31ppmمن وزن الكالس المستحث من السيقان عند التوليفة (2.0 ، 2.0) ملغم/لتر (IAA ، BA) وبلغت اعلى قيمة لهذا المركب 121.05 ppm من الكالس المستحث من الاوراق ضمن التوليفةنفسها .مقارنة بكمية الروتين في نبات الخروع المزروع في الحقل اذ بلغ في الاوراق 94.73ppm وفي السيقان 68.42ppm

الكلمات المفتاحية : نبات الخروع *Ricinus communis* L. ، المركب الثانوي Rutin ، استحثاث الكالس ، المطياف الضوئي spectrophotometer

المقدمة :

في السنوات الماضية وفي الحقبة الزمنية الحديثة تطورت الدراسات في استحثاث الكالس واستعمالاته في زيادة انتاج المركبات الثانوية من بعض النباتات الطبية مقارنة بالنبات الاصيل اذ تتمايز هذه المركبات باستقرار عالي وفعالية بايولوجية عالية مقارنة بالمركبات الصناعية ذات التاثيرات الجانبية فالمركبات الناتجة تكون على درجة عالية من النقاوة وكمياتها اكبر مقارنة بالنبات الحقلي (النبات الام) وفضلا عن امكانية انتاجها على مدار السنة دون التقيد بموسم النمو الذي ينتج فيه هذا المركب الفعال [1]. يعد نبات الخروع *Ricinus communis* L. من نباتات العائلة السوسبية (اليوفربيا). موطنه الاصلي الهند واستزرع في معظم بقاع العالم. تحتوي العائلة العديد من الانواع المهمة اقتصادياً ومنها ذات فائدة طبية اذ تستعمل بوصفها كعقاقيراً طبية مثل زيت الخروع [2]. يعد نبات الخروع من النباتات السريعة النمو حيث يصبح شجرة في غضون 3-4 شهور.يوجد في نبات الخروع العديد من المركبات الفعالة ذات التاثير الطبي المهم مثل RicinوRutin [3]. يعد مركب الروتين Rutin من مجموعة الفلافينويدات وهي مركبات عضوية قابلة للانحلال بالماء ينتجها بالايض الثانوي للنبات وتنتمي لفئة متعددة الفينول.[4] تؤدي هذه المركبات ادوارا متعددة في النبات فهي تحمي النبات من التأثير الضار للاشعة فوق البنفسجية والطفيليات ومنها مركبات الانثوسيانين ايضاً التي تشكل خضاباً لبعض الازهار والفواكه. للفلافينويدات مفعول مضاد للتأكسد ومضاد للجذور الحرة تستعمل بوصفها مؤشرات مهمة في مجال التصنيف الكيميائي للنباتات.[5] .التركيب الكيمياوي لمركب Rutin هو $C_{27}H_{30}O_{16}$ ويسمى

ايضا rutoside quercetin-3-0 rutinoside واسمه الاخر sophorin [6] .

المواد وطرائق العمل:

تحضير الاوساط الزرعية

حُضر الوسط الغذائي Murashigeو [7] Skoog(MS)كامل القوة باستعمال منظمي النمو IAA و BA وبالتراكيز (0.0 ، 1.0 ، 2.0) ملغم/لتر لكل منهما واضيف السكر بتركيز 30 غم/لتر وعدل الاس الهيدروجيني الى 5.6 – 5.8 واضيف الاكار Agar – Agar بمعدل 8 غم/لتر وعقمت الاوساط بجهاز الموصدة بدرجة حرارة 121 مْ وضغط 25 ∓ 2 ومدة اضاءة 16 ساعة /يوم وشدة اضاءة مقدارها 3000 لوكس. زرعت المعاملات عشوائيا وبمكررات عددها عشرة ضمن تقسيم القطاعات العشوائية Randomized CompleteDesign وقورنت المتوسطات بحسب اختبار LSD وبمستوى احتمالية 0.05.

مرحلة استحثاث الكالس

بعد مرور اربعة اسابيع على زراعة الاجزاء النباتية تم الحصول على الكالس الطري المستحث من الاوراق والسيقان النباتية لكل توليفات منظمات النمو السابقة. تم حساب الوزن الطري للكالس ثم جفف وبحسب الوزن الجاف.

تحضير المستخلصات النباتية

1- مستخلص السيقان والاوراق غير المعامل

اخذ(10) غم من مسحوق اوراق وسيقان نبات الخروع التي تم جمعها من الحقل واضيف اليها 100 ml من كحول الميثانول وتم استخلاصه بطريقة الاستخلاص الكحولي البارد (كحول الميثانول المطلق) بنسبة (1 : 10) (كالس : كحول) وحضن بدرجة حرارة 25 ∓ 2 مْ في حاضنة معقمة ومظلمة لمدة 48 ساعة ومن ثم رشح وجفف[8].

2- مستخلص الكالس

جمع الكالس المستحث من الاوراق والسيقان النباتية ثم جفف وطحن وتم استخلاصه بالطريقة السابقة.

اجراء تحليل جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer

اجريت تحاليل جهاز المطياف الضوئي لجميع المستخلصات النباتية ولجميع التوليفات. اخذ المستخلص المجفف وحُضر 100 ملغم/لتر باستعمال الميثانول بوصفه مذيباً واستعمل المحلول القياسي (Standard) للمركب الثانوي Rutin.

التحليل الاحصائي

حللت النتائج احصائيا باستعمال برنامج (SAS) Statistical Analysis System (2010) وقورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات باختيار اقل فرق معنوي (LSD) Least Significant Differences وتحت مستوى احتمالية $P \leq 0.05$.

النتائج والمناقشة:

اظهرت النتائج المبينة في جدول رقم (1) ان اعلى وزن طري للكالس المستحث من اوراق نبات الخروع بلغ 5.28 غم عند التوليفة (2.0 ، 1.0) ملغم/لتر من (IAA ، BA) وقد تفوقت هذه المعاملة على معاملة السيطرة ، قد يرجع السبب في زيادة الوزن الطري للكالس الى زيادة السايتوكايثينات التي تعمل على زيادة ايض السكريات وتنظيم البروتينات واهمها بروتين Tubulin ومن ثم تحفيز انقسام الخلايا.[9، 10]. كما بلغ اعلى معدل وزن طري للكالس المستحث من السيقان 4.97 غم عند التوليفة (1.0 ، 1.0) ملغرام/لتر لـ (IAA ، BA) يرجع ذلك الى اهمية الاوكسينات في استحثاث الكالس ولكن ليس بمفردها وانما بالتداخل مع السايتوكايثينات [12،11].

جدول (1) الوزن الطري لكالس نبات الخروع المستحث من السيقان والاوراق بعمر اربعة اسابيع على وسط MSيتضمن توليفات مختلفة من 1AA,BA

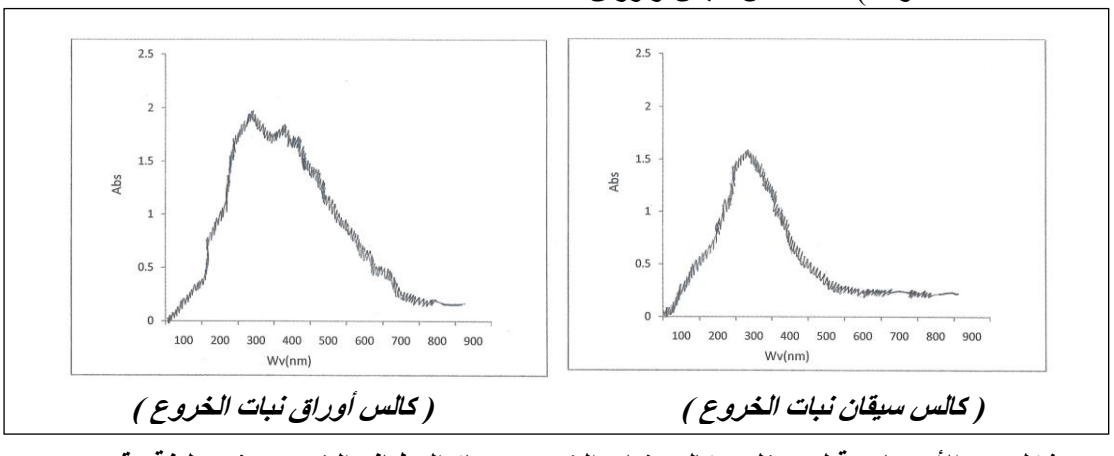
المعاملات	التراكيز ملغم/لتر	الكالس المستحث من الاوراق (غم)	الكالس المستحث من السيقان (غم)	قيمة LSD
1	Control(00.00)	0.34	0.38	NS 0.196
2	(IAA ، BA) (1.0 ، 0.0)	0.57	1.02	0.335
3	(IAA ، BA) (2.0 ، 0.0)	1.91	1.48	0.302
4	(IAA ، BA) (0.0 ، 1.0)	0.21	0.48	0.217
5	(IAA ، BA) (1.0 ، 1.0)	2.38	4.97	0.761
6	(IAA ، BA) (2.0 ، 1.0)	4.20	1.21	0.639
7	(IAA ، BA) (0.0 ، 2.0)	0.38	0.21	NS 0.175
8	(IAA ، BA) (1.0 ، 2.0)	5.28	2.46	1.056
9	(IAA ، BA) (2.0 ، 2.0)	4.77	2.08	0.667
	قيمة LSD	0.862	0.579	

لوحظ من نتائج الجدول رقم (2) للوزن الجاف ان اعلى وزن جاف للكالس المستحث من الاوراق بلغ 0.55 غم عند التوليفة (1.0 ، 2.0) ملغم/لتر لـ (BA ، IAA) قد يرجع سبب ذلك الى ان زيادة تركيز الاوكسينات تعمل على تفكيك الجدران الخلوية ومن ثم زيادة انقسام الخلايا فضلاًعن زيادة بعض الاحماض النووية وخصوصا RNA الذي له دور في تصنيع البروتينات الضرورية لعملية انقسام وتكاثر الخلايا وهذا يؤدي الى نمو وتطور الانسجة في النبات ممايعمل على زيادة الوزن الجاف [13].

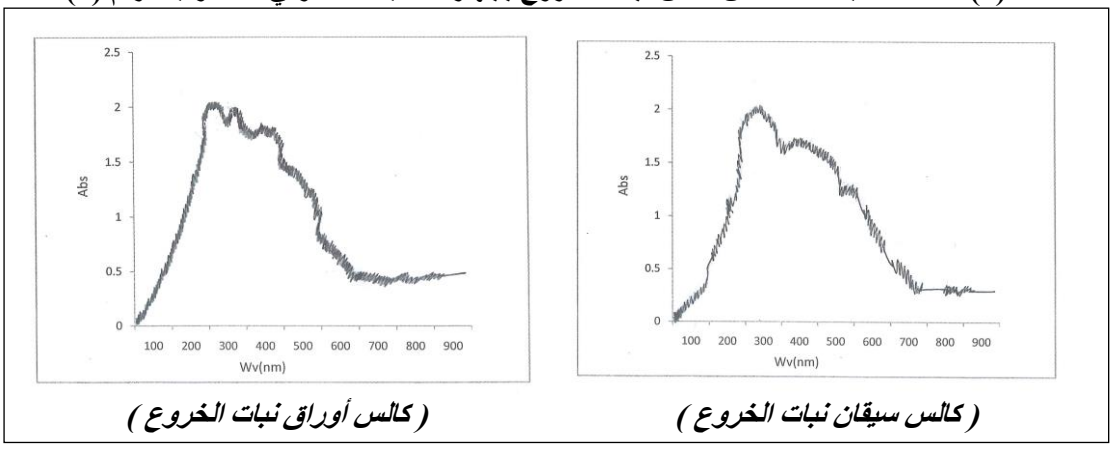
جدول رقم (2) الوزن الجاف لكالس نبات الخروع المستحث من السيقان والاوراق بعمر اربع اسابيع على وسط MSيتضمن توليفات مختلفة من 1AA,BA

المعاملات	التراكيز ملغم/لتر	الكالس المستحث من الاوراق (غم)	الكالس المستحث من السيقان (غم)	قيمة LSD
1	Control (00.00)	0.05	0.02	NS 0.032
2	(IAA ، BA) (1.0 ، 0.0)	0.08	0.13	NS 0.052
3	(IAA ، BA) (2.0 ، 0.0)	0.22	0.15	0.059
4	(IAA ، BA) (0.0 ، 1.0)	0.05	0.05	NS 0.000
5	(IAA ، BA) (1.0 ، 1.0)	0.29	0.42	0.107
6	(IAA ، BA) (2.0 ، 1.0)	0.55	0.06	0.138
7	(IAA ، BA) (0.0 ، 2.0)	0.03	0.10	0.053
8	(IAA ، BA) (1.0 ، 2.0)	0.45	0.25	0.133
9	(IAA ، BA) (2.0 ، 2.0)	0.46	0.13	0.108
قيمة LSD		0.178	0.166	

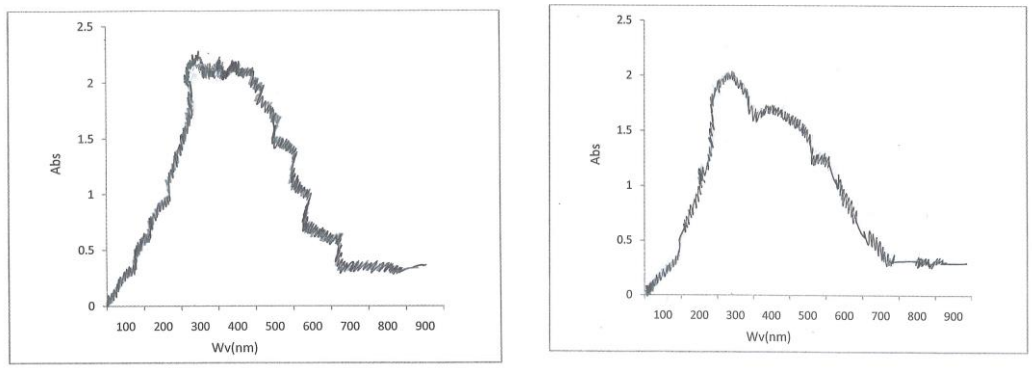
اوضحت نتائج تحليل جهاز المطياف الضوئي الموضحة في جدول رقم (3) والأشكال (1، 2، 3، 4،5 ، 6، 7، 8،9 و10) لمستخلص سيقان وأوراق كالس نبات الخروع مقارنة بالمادة القياسية الموضحة في شكل رقم (11).



شكل (1) الأمتصاصية لمستخلص كالس نبات الخروع بجهاز المطياف الضوئي عند توليفة رقم (1).

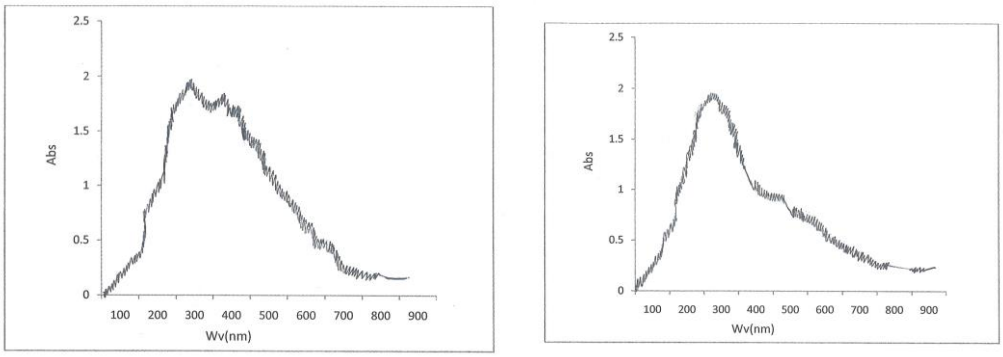


شكل (2) الأمتصاصية لمستخلص كالس نبات الخروع بجهاز المطياف الضوئى عند توليفة رقم (2).



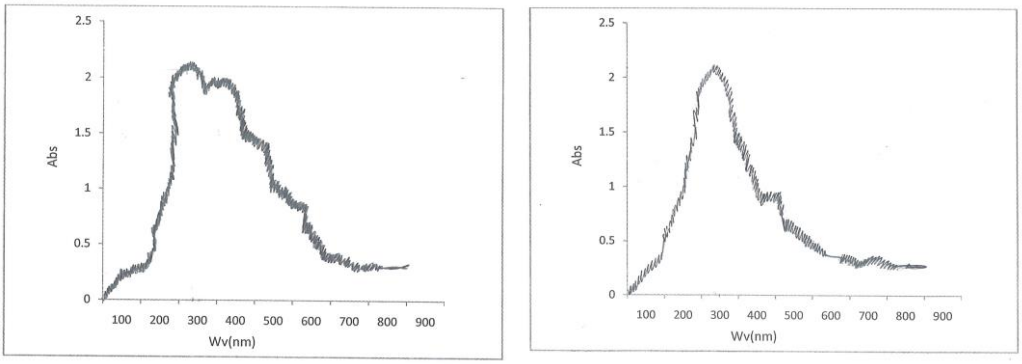
(كالس سيقان نبات الخروع) *(كالس أوراق نبات الخروع)*

شكل (3) الأمتصاصية لمستخلص كالس نبات الخروع بجهاز المطياف الضوئي عند توليفة رقم (3).



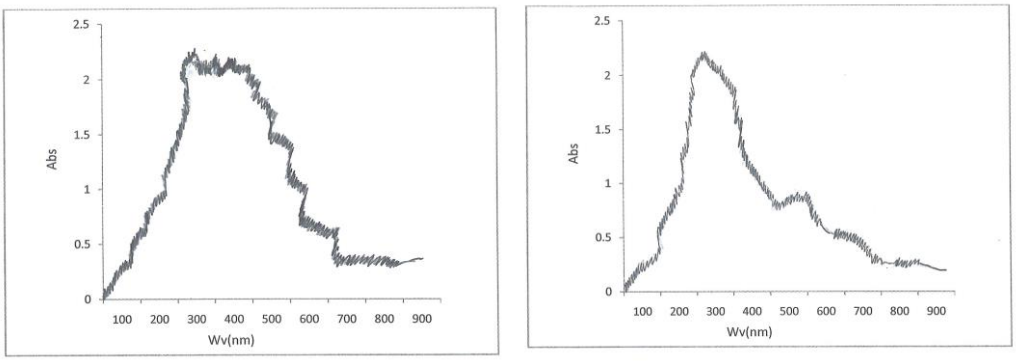
(كالس سيقان نبات الخروع) *(كالس أوراق نبات الخروع)*

شكل (4) الأمتصصية لمستخلص كالس نبات الخروع بجهاز المطياف الضوئي عند توليفة رقم (4).



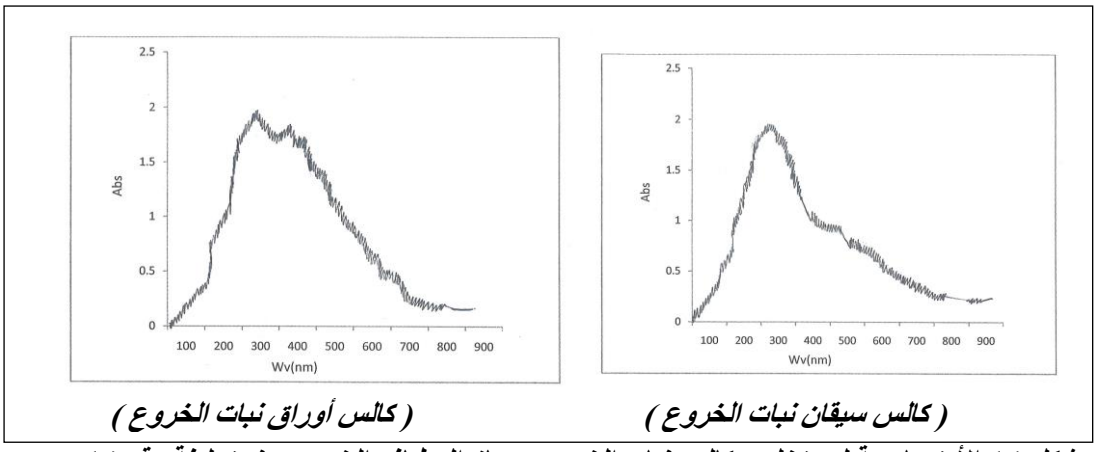
(كالس سيقان نبات الخروع) *(كالس أوراق نبات الخروع)*

شكل (5) الأمتصاصية لمستخلص كالس نبات الخروع بجهاز المطياف الضوئي عند توليفة رقم (5)



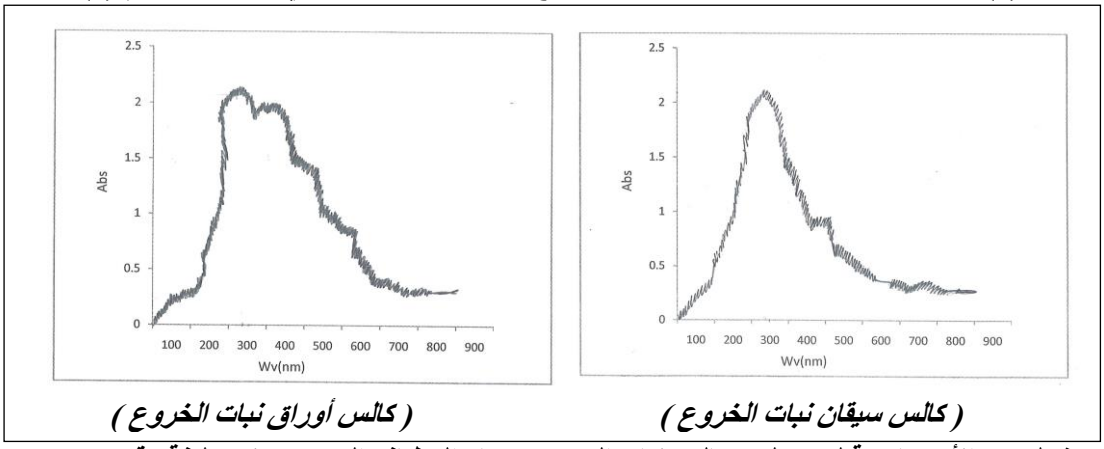
(كالس سيقان نبات الخروع) *(كالس أوراق نبات الخروع)*

شكل (6) الأمتصاصية لمستخلص كالس نبات الخروع بجهاز المطياف الضوئي عند توليفة رقم (6).



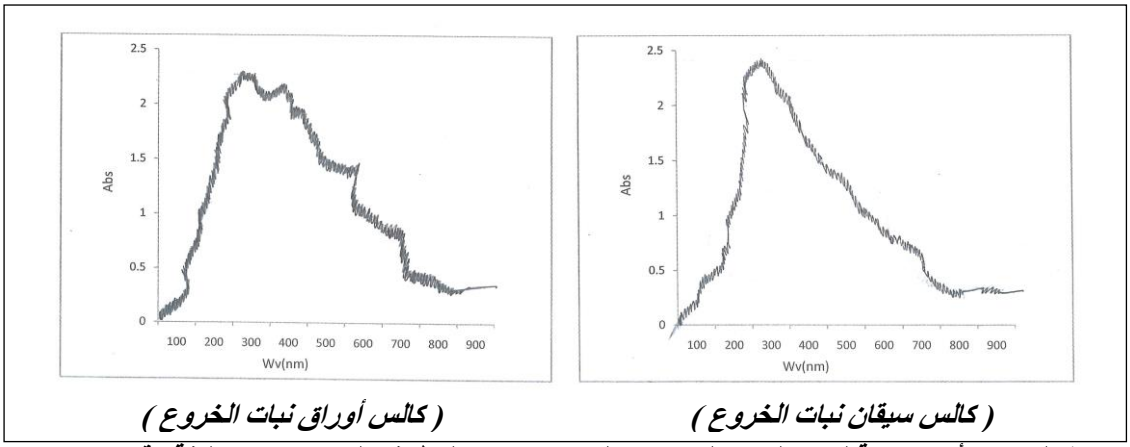
(كالس سيقان نبات الخروع) *(كالس أوراق نبات الخروع)*

شكل (7) الأمتصاصية لمستخلص كالس نبات الخروع بجهاز المطياف الضوئي عند توليفة رقم (7).



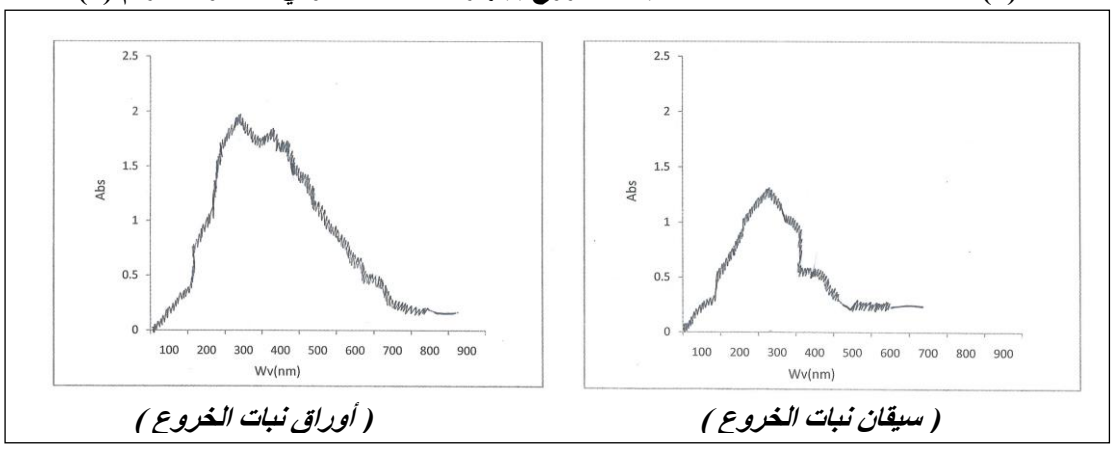
(كالس سيقان نبات الخروع) *(كالس أوراق نبات الخروع)*

شكل (8) الأمتصاصية لمستخلص كالس نبات الخروع بجهاز المطياف الضوئي عند توليفة رقم (8).



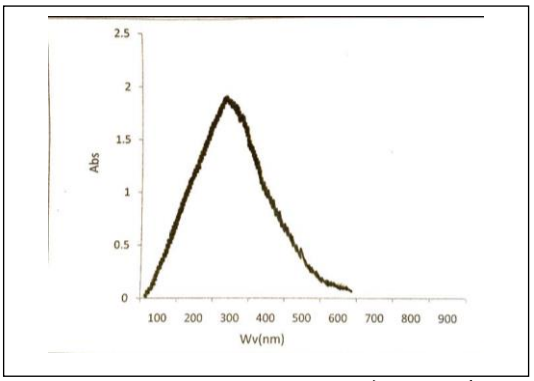
(كالس سيقان نبات الخروع) *(كالس أوراق نبات الخروع)*

شكل (9) الأمتصاصية لمستخلص كالس نبات الخروع بجهاز المطياف الضوئي عند توليفة رقم (9).



(سيقان نبات الخروع) *(أوراق نبات الخروع)*

شكل (10) الأمتصاصية مستخلص نبات الخروع الحقلي (غير المعامل) بجهاز المطياف الضوئي.



شكل (11) الأمتصاصية للمركب القياسي Rutin بجهاز المطياف الضوئي.

ان اعلى مقدار للمركب الثانوي Rutine بلغ 126.31 ppm في مستخلص الكالس المستحث من السيقان عند استعمال منظمي النمو (IAA ، BA) وبالتركيزين (2.0, ، 2.0) ملغم/لتر و كذلك بلغت اعلى قيمة لهذا المركب في مستخلص الكالس المستحث من الاوراق 121.05 ppm وبتراكيز منظمات النمو السابقة نفسها شكل رقم (9) ولقد فاقت هذه المعاملة معاملة السيطرة .

تتفق هذه النتيجة مع ماتوصل اليه [14]في امكانية زيادة انتاج المركبات الثانوية باستعمال تقانة زراعة الانسجة النباتية وان ظروف الزراعة النسيجية المعقمة والمعزولة نسبيا عن الهواء تزيد من احتمالات مسار التخليق الحيوي للمركبات الفعالة [15].

كذلك تتفق نتيجة البحث مع [17,16]اذ ان وجود السايتوكاينين BA مع الاوكسين IAA مهم اذ تتداخل فعاليتهما مع بعض اذ يعمل الاوكسين على زيادة استطالة الخلايا عن طريق زيادة لدانة جدار الخلية ومن ثم ستقل مقاومة الجدار الخلوي للشد اي يقل ضغط الانتفاخ او جهد الانتفاخ فيصبح الجهد المائي للعصير الخلوي اكثر سالبية فيدخل الماء الى داخل الخلية ويزداد حجمها ويتمدد الجدار،السايتوكاينين مهم في الانقسام الخلوي اذ يحفز الخلايا على الانقسام والانتقال الى مرحلة G2 الى الانقسام MITOSIS عن طريق تحفيز بناء بروتينات بعضها قد يكون له دور في انزيمات الانقسام كما ان السايتوكاينين يرتبط بـt-RNA وهذا له دور في التحكم الايضي في عمليات انتاج المركبات الثانوية[18].

لوحظ من الجدول رقم (3) ان اقل قيمة لهذا المركب بلغت 94.73 ppm في مستخلص الكالس المستحث من الاوراق الموضحة بالشكل (1،4 ،7 ،10) ان المعاملات التي انعدم فيها IAA قد انخفض فيها تركيز مركب الروتين Rutin لان IAAيحفز بناء جميع انواع RNA وان تحفيزقابلية الخلايا على الاستطالة تعتمد على استمرار بناء RNA ومن ثم فان انعدام IAA في الوسط سيؤثر في بناء بعض المركبالت الثانوية ومنها الروتين [19].

جدول (3) تركيز المركب الفعال Rutine في جميع المعاملات لنبات الخروع باستعمال جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer

التراكيز ملغم/لتر	مقدار المركب الثانوي Rutine في الكالس المستحث من الاوراق ppm	مقدار المركب الثانوي Rutine في الكالس المستحث من السيقان ppm
1 Control (00.00)	94.73	78.94
2 (IAA ، BA) (1.0 ، 0.0)	105.26	105.26
3 (IAA ، 3BA) (2.0 ، 0.0)	115.78	105.26
4 (IAA ، BA) (0.0 ، 1.0)	94.73	100
5 (IAA ، BA) (1.0 ، 1.0)	110.52	110.52
6(IAA ، BA) (2.0 ، 1.0)	115.78	115.78
7(IAA ، BA) (0.0 ، 2.0)	94.73	100
8(IAA ، BA) (1.0 ، 2.0)	110.52	110.52
9 (IAA ، BA) (2.0 ، 2.0)	121.05	126.31
Intact 10	94.73	68.42

الاستنتاجات :

تم التوصل في هذه الدراسة الى امكانية زيادة المركب الثانوي Rutin ضمن تقانة زراعة الانسجة النباتية وباستعمال منظمي النمو (BA, IAA) وبالتراكيز 2 ملغم/لتر لكلا المنظمين في الكالس المستحث من سيقان واوراق نبات الخروع.

المصادر:

[1]Gunjan, S. and Anart, R.N. 2009. Influence of explant type and plant growth regulators on invitro multiple shoots regeneration of Laurel from Hmalaya.Nature and Science.7(9):1-7.

[2]Al-kateb. Yousef mansour.. 2000. Classification of seed plant.house of books for printing and publishing. second edition. Baghdad university. ministry of higher eduction and scientific research.the republic of Iraq.

[3]Hassan. Ahmd budul Mnnem. 2007. biotechnoogy and plant breeing Application of tissue culture s and grnetic engineering in the field of agricultural prodiction ang genetic improvement for plant. Arabic publishing house.Addition1..783.

[4]Devlin, R.; Francis, M. 2000. Plant physiology. Prindle Weber and Schmidt. 4th Edition. pp:125-130.

[5]Vaughn, 5.R. 2009. Higher plant Flavonoids in principles and practices in plant ecology. J. of. Agric. food chem. 59 : 841 – 844.

[6]Lucrecia, L., chaillou, L. and Nazareno, A. 2009. Method to determine antioxidant activity of polyphenols. J. Agric. Food chem. 66: 228 – 250.

[7].Murashige, T. and Skoog, F. 1962. Arevised mediun for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant.,15: 473-479.

[8]Hussain, I., khattak, and Haider, S. 2012. phytochemical screening and microbial activities of seletcted medicinal plant of Khyberpakhtunkhwa Pakistan. African J. of pharmacdogy. 5(6):746-750.

[9]Mahesh, S. 2008. Plant Molecular Biotechnology New Age International (P) Ltd., publishers 1st Edit. pp (99 – 101).

[10]De, S., Dey, Y. N. and Ghosh, A. K. 2010. Phytochemical investigation and chrom-atographic evaluation of the different extracts of tuber of Amorphaphallus paeoniifolius (Araceae). International J. on pharm. and Bioche. Research. 1(5) : 150 – 157.

[11] Chalahi.satar abd allah.2010,study the effect of some factor in the induction of callus from the stalk of the bean plant. Diylal. j. scien. 6:(4){209-226}

[12]Zibbu, G and Batra, A. 2012. Invitro and in vivo determination of phenolic contents and anti oxidant activity of desert plant Appocynaceae family. Asian. J. of pharm. and clin. Research. 5(1): 76 – 83.

[13]Taha, H. S.; Farag, S.H., Shams; K. A.; Abdel – Azim, N.S. and seif EL – Nasr , M.M. 2011. In viov and in vitro studies of Thevetia species growing in Egypt, II. Establishment of in vitro tissue culture system and production of cardiac glycosides. J. of American Science. 7(3): 1 – 12.

[14]Hanson, D. R. 2013. Natural Products: the secondary Metabolites. The Royal Society of Chemistry, London.

[15]Triataphyllou, K. 2011. Antioxidative properties of water extracts obtained from herbs of species Euphorbiaceae. Int. J. Food. Sci. Nut. (61): 217 – 225.

[16]Soundarajan, T. 2011. Microprapagation of Nerium oleander throught the immature pods. J. of Agric. Science. 2(2):181-195.

[17]Olero, J. and Segura, J. 2012. Micropropagation of oleander. Hort Science. 68(2):85-91

[19]Oomah, B. O. 2013. Isolation characterization and assessment of secondary metabolites from plants for use in human. J. plant physio. 2: 81 – 98.

[18]Vanisree, M.; Lee, C. Lo. and Tasy, H. 2004. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue culture. J. plant Biotech. Bull. Acad. Scin. 45: 1 – 22.

Effect of plant growth regulators on callus induction and Rutin production of *Ricinus communis* L. plant

Ghussun S. Salih

Department of Biology, College of Science for Women, University of Baghdad, Baghdad, Iraq.

E-mail: Maanlouay@yahoo.com

Received 28 /12 /2016
Accepted 8 / 3/2017

Abstract:

Ricinus communis L. is an important medical plant hence it contains many active compounds. The aim of this research is to study the effect of plant growth regulators on callus induction and Rutin concentration. A combination of Benzyle adenine (BA) and Indol Acetic acid (IAA) at (0.0,1.0,2.0) mg/L was added to the media, the highest fresh weight of the induced callus from stem explant was (4.97) gr . at (1.0,1.0) mg/L BA and IAA consenquently the same combination gave the highest dry weight of callus (0.42) gr. while the combination at (2.0,1.0) mg/L BA and IAA gave the highest fresh weight of induced callus from Leaves explant (5.28) gr., then (2.0,1.0) mg/L BA and IAA gave the highest dry weight for callus induced from leaves at (0.55)gr.Spectrophotometer used to estimate rutin quantity and results showed that the present of rutin at (126.31) ppm in callus induced from stem at (2.0,2.0) mg/L BA and IAA, the highest value of this compound (121.05) ppm on callus induction from the leaves in the same combination as compared with Rutin quantity in intact plant that reached (94.73) ppm in leaves and (68.42) ppm in stem.

Key words: Ricinus communis L.secondary compound Rutin.callus induction,spectro photometer