أستحثاث الكالس من أوراق نبات الدفلة *Nerium oleander* وتقدير بعض مركباته الفعالة نوعياً داخل وخارج الجسم الحي

Callus induction from *Nerium oleander* leaves and qualitative determination of some active compounds *in vivo* and *in vitro*

لقاء علي جازع
كلية العلوم للبنات/ جامعة بغداد
Liqa'a Ali Jasaa
College of Science for Women/University of Baghdad.

المستخلص

دُرست أمكانية أستحثاث الكالس من زراعة قطع الأوراق الفتية لنبات الدفلة *Nerium oleander* بأستعمال وسط Murashige & Skooge (MS) وبأضافة منظمات النمو النباتية 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) بالتراكيز (0.0، 0.5، 1.0، 2.0) ملغم/لتر و Benzyle adinine (BA) بالتراكيز (0.0، 0.5، 1.0،) ملغم/لتر. أجريت دراسة مقارنة لوجود بعض المركبات الفعالة الرئيسة بين الكالس المنتج و أوراق النبات الحقلي (النبات الأم) بأستعمال عدد من الكواشف النوعية. بينت النتائج أن أضافة 2,4-D بتركيز 1.0و 2.0 ملغم/لتر و BA بتركيز 0.5و 1.0 ملغم/لتر للوسط والتداخل بينهما الأفضل لتحفيز نشؤ الكالس وأعطاء أعلى قيم للأوزان الطرية والجافة، وأوضحت نتائج الكشوفات النوعية أن المحتوى الداخلي للكالس المتحفز لم يختلف عن أوراق النبات الحقلي (النبات الأم) من ناحية وجود المركبات الفعالة ال رئيسة (Alkaloids, Flavonoids, Terpenoids, Tanins, Saponins, Cardiac Glycosides).

Abstract

Callus induction of *Nerium oleander* young leaves explants was studied using Murashige & Skooge (MS) Medium supplemented with 2,4-dichlorophenoxy acetic acid(2,4-D 0.0, 0.5, 1.0, 2.0) mg/l with Benzyle adinine (BA0.0, 0.5 or 1.0, mg/l). comparative study was made for qualitative determination of some active compounds between the initiated callus and leaves of fieled plant (intact plant). Results showed that 2,4-D at 1.0 or 2.0 mg/l with BA at 0.5 or 1.0, mg/l were the best for callus induction that gave the highest fresh and dry weight. Qualitative detection showed that (Alkaloids, Flavonoids, Terpenoids, Tanins, Saponins, and Cardiac Glycosides) the main active compounds were found in callus and leaves of field-grown plant.

المقدمة

خلال السنوات الماضية تطورت الدراسات في أستحثاث الكالس وأستعمالاته في زيادة أنتاج المركبات الثانوية من بعض النباتات الطبية مقارنة مع النبات الأصلي حيث تمتاز هذه المركبات بأستقرار عالي وفعالية بايولوجية عالية مقارنة بالمركبات الصناعية ذات التأثيرات الجانبية [1] فالمركبات الناتجة تكون على درجة عالية من النقاوة وكمياتها أكبر مقارنة مع النبات الحقلي (النبات الأم) أولاً فضلاً عن أمكانية أنتاجها على مدار السنة دون التقيد بموسم النموالذي ينتج فيه ذلك المركب الفعال، لأن بعض النباتات قد لا تكون المركب الفعال طيلة أش هر السنة وتتأثر بالعوامل البيئية المحيطة بالنبات[2]. يعود نبات الدفلة *Nerium oleander* الى العائلة الدفلية Apocynaceae وهو نبات زينة شجيري دائم الخضرة ويحتوي على عصير حليبي، يتحمل النبات مدى واسع من أنواع الترب وخاصة الرملية الجافة والترب الفقيرة بالمغذيات والملحية [3]، تحتوي أوراق الدفلة على عدة مواد مثل Oleandrine، Nerine، Neriodorin كما يحتوي على زيوت أساس ، حامض التانيك، resin، glycoside ويستعمل نبات الدفلة في علاج أمراض القلب فضلاً عن أستخدامها كمضاد بكتيري وفي علاج الأمراض الجلدية كالطفح الجلدي والجرب والجذام والبثور من خلال تأثيرها على الطفيليات المسببة لتلك الأمراض كالقمل وخاصة في قتل اليرقات في الجروح [4] كما درس تاثير مستخلصات اوراق الدفلة على الخطوط السرطانية من قبل العديد من الباحثين وخصوصاً مركباتها القلويدية والتي تعد من أهم وأكثر المركبات الفغالة الموجودة في المستخلصات النباتية والتي تمتاز بسميتها العالية للخلايا

الكلمات المفتاحية: نبات الدفلة، أستحثاث الكالس، *in vivo*، *in vitro*

السرطانية [5] كما أن لزيوتها الأساسية فعالية م ثبطة عالية ضد أنواع عديدة من البكتريا مثل *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa* [6]، درس عدد من الباحثين الأكثار الدقيق وأستحثاث الكالس من أجزاء مختلفة من نبات الدفلة كالبادرات والثمار والأوراق حيث وجد [7] أن زراعة قطع الأوراق أعطت نتائج جيدة لأستحثاث الكالس والمزارع المعلقة عند دراستهم التخليق الحيوي وزيادة أنتاج مركب Oleandrine، كما أشار [8] أن أضافة 2,4-D و BA للأوساط الزرعية هما الأفضل لأستحثاث الكالس من قطع العقد والسلاميات والأوراق والأخيرة كانت الأكثر أنتاجاً للكالس، لذا هدف هذا البحث الى دراسة الطريقة الأمثل لأستحثاث الكالس من قطع أوراق نبات الدفلة وقياس الوزن الطري والجاف له ومن ثم الكشف النوعي عن عدد من المركبات الفعالة الرئيسية في الكالس المتكون وهي Alkaloids, Flavonoids, Terpenoids, Tanins, Saponins, Cardiac Glycosides ومقارنتها مع أوراق النبات الحقلي.

المواد وطرائق العمل

جمعت الأوراق الفتية لنبات الدفلة *N. oleander* المزروعة في حدائق جامعة بغداد كمصدر للأجزاء النباتية.

1. تجربة التعقيم: أستعملت القاصر التجاري (الحاوي على مادة هابوكلورات الصوديوم بنسبة 5-6%) لتعقيم الأوراق بتركيز 1:1، حجم:حجم ،قاصر:ماء ولمدتين 5و 10 دقائق وبواقع 12 مكرر فضلاً عن معاملة السيطرة.
2. أستحثاث الكالس : زرعت قطع أوراق نبات الدفلة المعقمة بطول 1 سم وجرحت طبقة البشرة السفلى لزيادة الأستجابة أذ زرعت على وسط MS [9]، مضافة له منظمات النمو النباتية 2,4-D بالتراكيز (0.0، 0.5، 1.0، 2.0) ملغم/لتر و BA بالتراكيز (0.0، 0.5، 1.0) ملغم/لتر وبواقع 12 مكرر، وسجلت النتائج بعد مرور خمسة أسابيع من زراعتها في الوسط.
3. تحضير مستخلص الكالس والأوراق النباتية : جمع الكالس المستحث والأورا ق من النبات الحقلي (النبات الأم) كل على حِدة ومن ثم جفف وطحن وتم أستخلاصه بطريقة الأستخلاص الكحولي البارد (كحول الأيثانول المطلق) بنسبة 1:10، وزن:حجم، كالس:كحول، وحضن على درجة حرارة 2±25 مئوية، في حاضنة معقمة ومظلمة لمدة يومين، ومن ثم رشح وجفف[10].
4. الكشف النوعي عن المركبات الفعالة في كالس نبات الدفلة والأوراق من النبات الحقلي (النبات الأم): أستعملت عدد من الكواشف وبواقع كشفين لكل مجموعة مركبات (Alkaloids, Flavonoids, Terpenoids, Tanins, Saponins, Cardiac Glycosides) [11، 12، 13] وهي:
   أ. القلويدات:1. كاشف ماير (ظهور راسب أبيض للنتيجة الأيجابية) 2. كاشف واكنر (ظهور راسب بني للنتيجة الأيجابية)
   ب. التانينات : 1. الكشف بأضافة قطرات من $FeCl_2$ (ظهور لون أزرق الى برتقالي للنتيجة الأيجابية)
   2. الكشف بأضافة قطرات من خلات الرصاص (ظهور راسب أصفر للنتيجة الأيجابية)
   ج. السابونينات : 1. كشف الرغوة (ظهور رغوة كثيفة فوق سطح المستخلص للنتيجة الأيجابية)
   2. الكشف بأضافة $HgCl_2$ (ظهور راسب أبيض للنتيجة الأيجابية)
   د. الفلافونويدات : 1. الكشف بأضافة بلورات من Mg ثم قطرات من حامض الهدروكلوريك المركز (ظهور لون أحمر للنتيجة الأيجابية) 2.الكشف بأضافة قطرات من حامض الكبريتيك المركز (ظهور لون أحمر للنتيجة الأيجابية)
   ه ـ. التربينات : 1. الكشف بأضافة خليط من الكلوروفورم وحامض الكبريتيك المركز (ظهور لون بني محمر للنتيجة الأيجابية) 2. كاشف Anace-aldihyde (ظهور راسب بني للنتيجة الأيجابية)
   و. الكلايكوسيدات القلبية : 1. الكشف بأضافة خليط من حامض الخليك الثلجي و $FeCl_2$ ثم أضافة قطرات من حامض الكبريتيك المركز (ظهور حلقة بنية اللون للنتيجة الأيجابية) 2.كاشف Kedde's reagent (ظهور لون بنفسجي للنتيجة الأيجابية)
5. التحليل الأحصائي : قورنت الفروق المعنوية بين المتوسطين بأختبار أقل فرق معنوي (LSD) عند مستوى أحتمالية ($P\leq0.05$) ، حيث أستعمل البرنامج SAS(2004) في التحليل الإحصائي [14].

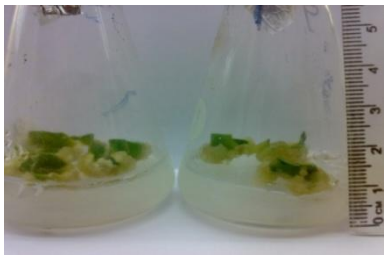
النتائج والمناقشة

1. تجربة التعقيم: أوضحت نتائج تجربة التعقيم ان مادة القاصر التجاري(الحاوي على مادة ها يبوكلورات الصوديوم بنسبة 5-6%) بتركيز 1:1، حجم:حجم، قاصر :ماء ولمدة 5 دقائق هي الأفضل لعملية تعقيم قطع أوراق نبات الدفلة مقارنة بمدة 10 دقائق والتي تضررت فيها قطع الأوراق لأصابتها بالتحلل او التدهور أما معاملة السيطرة فقد تلوثت فيها الزروعات بنسبة 100%.

2. أستحثاث الكالس: بينت النتائج الموضحة في جدول (1) أن التوليفات الهرمونية من 2,4-D بتركيز 1.0 أو 2.0 ملغم/لتر مع BA بتركيز 0.5 أو1.0 ملغم/لترتفوقت معنوياً على باقي المعاملات التي أعطت أفضل النتائج للوزن الطري للكالس وهي 6.89و 6.29 غم عند أضافة 1.0 ملغم/لتر 2,4-D مع 0.5و 1.0 ملغم/لتر BA على التوالي، و7.29 عند أضافة 2.0 ملغم/لتر 2,4-D مع 0.5 ملغم/لتر BA مقارنة مع أضافة 2,4-D بتركيز 0.5 ملغم/لتر لوحده أو بالتداخل مع BA بتركيز 0.5 أو1.0 ملغم/لتر ومعاملة السيطرة وكانت نسبة الكالس الناتج 0.0 غم من قطع الأوراق. من الجدير بالذكر أن لون الكالس المتكون تراوح ما بين الأبيض الى الأبيض الحليبي شكل (1) ومن النوع الصلب (compact) .

جدول (1) الوزن الطري الناتج من زراعة قطع أوراق نبات الدفلة على وسط MS حاوٍ على توليفات مختلفة من 2,4-Dو BA

BA	2,4-D ملغم/لتر				
ملغم/لتر	0.0	0.5	1.0	2.0	المعدل
0.0	0.0	2.59	4.91	4.32	2.96
0.5	0.0	4.10	6.89	7.29	4.57
1.0	0.0	5.26	6.29	5.12	4.17
المعدل	0.00	3.98	6.03	5.58	-------
قيمة LSD للتداخل 2.79 (P≤0.05)					



شكل (1) الكالس المستحث من قطع أوراق الدفلة بأضافة2,4-D (2.0ملغم/لتر) وBA(0.5 ملغم/لتر) على وسط MS

وبالنسبة للوزن الجاف كما موضح في جدول رقم (2) لم تكن هناك فروق معنوية بين التوليفات المكونة من أضافة 2,4-D بتركيز 0.5، 1.0 أو 2.0 ملغم/لتر مع BA بتركيز 0.5 و1.0 ملغم/لتر وكانت الأوزان 0.54، 0.52و 0.49 غم على التوالي، لكنها تفوقت معنوياً عن معاملة السيطرة.

جدول (2) الوزن الجاف الناتج من زراعة قطع أوراق نبات الدفلة على وسط غذائي يحتوي توليفات مختلفة من 2,4-Dو BA

BA	2,4-D ملغم/لتر				
ملغم/لتر	0.0	0.5	1.0	2.0	المعدل
0.0	0.0	0.29	0.52	0.30	0.278
0.5	0.0	0.42	0.52	0.54	0.370
1.0	0.0	0.39	0.49	0.36	0.310
المعدل	0.00	0.367	0.510	0.400	-----
قيمة LSD للتداخل 0.275 (P≤0.05)					

أن لوجود الأوكسينات أهمية كبيرة في أستحثاث الكالس بمفردها أو مع وجود السايتوكاينينات [2] أذ تعمل الأوكسينات على أولاً تفكك الجدران الخلوية وبالتالي انقسام الخلايا وثانياً أيض الأحماض النووية وخصوصاً RNA الذي يؤدي الى تصنيع البروتينات الضرورية لعملية أنقسام وتكاثر الخلايا وكل ذلك يؤدي الى نمو وتطور الأنسجة في النبات وتكوين الكالس وتؤثر السايتوكاينينات على أيض السكريات وتنظيم بروتين Tubulin وبالتالي تحفيز انقسام الخلايا [15]، تتفق النتائج السابقة مع [7, 8] بأستعمال 2,4-D بالتداخل مع BA كمنظمات النمو الأمثل لأستحثاث نمو الكالس من قطع أوراق نبات الدفلة الفتية مقارنة مع غيرها من أجزاء النبات الأخرى، لكنها لاتتفق مع [16] حيث أستعمل قطع

الاوراق لتحفيز نشؤ البراعم العرضية بالدرجة الأساس وكانت نسبة تطورها قليلة قد يعود ذلك لأختلاف الضرب النباتي والذي يؤثر على مدى الأستجابة.

3. الكشف النوعي عن المركبات الفعالة في كالس نبات الدفلة : أوضحت النتائج المبينة في جدول (3) أن المركبات الثانوية الرئيسة وهي Alkaloids, Flavonoids, Terpenoids, Tanins, Saponins, Cardiac Glycosides الموجودة في أوراق النبات الحقلي هي نفسها موجودة في الكالس المستحث من قطع أوراق الدفلة خارج الجسم الحي ولكل تراكيز 2,4-D و BA جدول (2،1) التي أستحثت الكالس مقارنة مع معاملة السيطرة وثُبتت هذه النتيجة بأستعمال كاشفين لكل مجموعة رئيسة .

جدول رقم (3) الكشف النوعي لبعض المركبات الفعالة في الكالس المستحث من أوراق نبات الدفلة وأوراق النبات الحقلي

معاملات الكالس المستحث من قطع أوراق الدفلة		القلويدات		التانينات		السابونينات		الفلافونويدات		التربينات		الكلاكوسيدات القلبية	
BA ملغم/لتر	2,4-D ملغم/لتر	*1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
0.0	0.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.0	0.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.0	1.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.0	2.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.5	0.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.5	1.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.5	2.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1.0	0.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1.0	1.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1.0	2.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
أوراق النبات الحقلي (النبات الأم)		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

***الأرقام تدل على تسلسل الكاشف ونوعه بحسب ما موضح في طرائق العمل**

تتفق النتائج السابقة مع ما وجده [17] عند دراستهم لنبات الدفلة ومقارنة المحتوى الداخلي للنبات من الفينولات ومضادات الأكسدة مع ما أنتج خارج وداخل الجسم الحي وتوصلوا الى أن هذه المركبات زادت كمياتها بالكالس المستحث من أجزاء نباتية مختلفة للنبات، وتتفق أيضاً مع ما وجده [18] عند دراستهم لنوعين من نبات *Thevetia* sp. العائد للعائلة الدفلية حيث أستحث نمو الكالس والأفرع من أجزاء نباتية مختلفة ومن ضمنها الأوراق، ووجدوا أيضاً زيادة مركبات Cardiac Glycosides نتيجة لتراكمها بالكالس المستحث وأشاروا أن هناك العديد من العوامل التي تؤثر في قابلية تكوين المركبات الثانوية في الكالس منها طبيعة النبات ونوع الجزء النباتي المستعمل فبعضها ذات أنتاجية عالية للمركبات في الكالس والبعض الأخر لا ينتج، وكذلك الوسط الغذائي الذي يعمل على تشجيع النمو السريع للخلايا وبالتالي زيادة كتلتها الحية التي تؤثر في أنتاج المركبات الثانوية. لاتتفق النتائج السابقة مع ما وجده [19] عند دراستهم لوجود نوع من الكلايكوسيدات حيث لم تزداد نسبة هذه المركبات بالكالس المستحث من أوراق نبات *Baleria* sp. مقارنة مع النبات الحقلي .

أن أهمية ذلك تكمن في تعزيز تواجد ونقاوة المركبات الفعالة بالزراعة النسيجية، فالمركبات الناتجة تكون على درجة عالية من النقاوة مقارنة مع النبات الحقلي أولاً أضافة الى أمكانية أنتاجها على مدار السنة دون التقيد بموسم النموالذي ينتج فيه ذلك المركب الفعال، لأن بعض النباتات لا تكون المركب الفعال طيلة أشهر السنة وتتأثر بالعوامل البيئية المحيطة بالنبات[2].

المصادر

1. Oomah, B. D. 2003. Isolation characterization and assessment of secondary metabolites from plants for use in human. J. plant physio. 2: 81-98.
2. Mahesh, S. (2008). Plant Molecular Biotechnology. New Age International (P) Ltd., Publishers 1st. Edit. Pp. 99-101.
3. Hussain, M. A. and Gorsi, M. S. (2004). Antimicrobial activity *Nerium oleander* linn. sian J. of plant Science. 3(2): 177-180.

4. غني، سندس وفي، حبيب، سهير عبد الكريم ، جعفر، عفيفة يوسف . (2010). دراسة الفعالية التضادية للمستخلص المائي الحار لأوراق نبات الدفلة *Nerium oleander* في نمو بكتريا *Escherichia coli*، *Klepsiella pneumonia* خارج الجسم الحي. مجلة جامعة الكوفة لعلوم الحياة. 2(1): 38-44.

5. محمد، أبراهيم هادي .(2011). تأثير مستخلصات نبات الدفلة *Nerium oleander* على النبيبات الدقيقة للخلايا السرطانية H22 (Hepatic cell) والموت المبرمج في الورم للفئران المختبرية. مجلة ديالى للعلوم الزراعية. 3(1): 1-12.

6. Derwich, E., Benziane, Z. and Boukir, A. (2010). Antimicrobial activity and chemical composition of essential oil from flower of *Nerium oleander*. Electronic J. of environmental, Agricultural and Food Chemistry. 9(6): 1074-1084.

7. Ibrahim, A., Khalifa, S., Khafagi, I., Yossef, D., Khan, I and Mesbah, M. (2009). nhancement of oleandrin production in suspension cultures of *Nerium oleander* by cmbined optimization of medium composition and substrate feeding. Plant Biosystems. 143(1): 97-103.

8. Soundarajan, T. and Karrunakaran, C. M. (2010). Micropropagation of *Nerium oleander* through the immature pods. J. of Agriculture Science. 2(2): 181-193.

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

10. Hussain, I., Khattak, M. U., Ullah, R., Muhmmad, Z., Khan, F. A., Ullah, Z. and Haider, S. (2011). Phytochemical screening and microbial activities of selected medicinal plants of Khyberpakhtunkhwa Pakistan. African J. of Pharmacology. 5(6): 746-750.

11. Cannel, R. J. P. (1998). Natural Products Isolation. Humana Press Inc. Totowa, New Jersey. Pp. 354-358.

12. Santhi, R., Lakshmi, G., Priyadharshini, A. M, and Anandaraj, L. (2011). Phytochemical screening of *Nerium oleander* leaves and *Momordica charantia* leaves. International Research J. of Pharmacy. 2(1): 131-135.

13. De, S., Dey, Y. N. and Ghosh, A. K. (2010). Phytochemical investigation and chromatographic evaluation of the different extracts of tuber of *Amorphaphallus paeoniifolius* (Araceae). International J. on Pharmaceutical and Biochemical Research. 1(5): 150-157.

14.SAS. 2004. Statistical Analysis System, User's Guide. Statistical. Version 7th ed. SAS. Inst. Inc. Cary. N.C. USA.

15. Mahesh, S. (2008). Plant molecular biotechnology. New Age International (P) Ltd., 1st Edit., New Delhi, India. Pp. 49-51.

16. Olero, J., Munoz-Bertorneu, J., Segura, J. and Arrillaga, I. (2012). Micropropagation of oleander (*Nerium oleander* L.). HortScience. 45(1): 98-102.

17. Zibbu, G and Batra, A. (2012). *In vitro* and *in vivo* determination of phenolic contents and antioxidant activity of desert plants of Appocynaceae family. Asian J. of Pharmaceutical and clinical Research. 5(1): 76-83.

18. Taha, H.S., Farag, S. H., Shams, K. A., Abdel-Azim, N.S. and Seif El-Nasr, M.M. (2011). *In vivo* and *in vitro* studies on 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.

19. Premjet, D., Premjet, S., Lelono, R. A. A. and Tachibana, S. (2010). Callus detection and determination of iridoid glycosides from *Barleria pionitis* Linn. Leaf explants. Australian J. Of Basic and Applied Sciences. 4(9): 4461-4467.