تأثير حامض السالسيلك في انتاج الزيوت الطيارة من المزارع النسيجيه لنبات الثوم *Allium sativum* L خارج الجسم الحي

Effect salicylic acid on producing volatile oils from Garlic *Allium sativum* L. *in vitro*

زينب سالم حسين هاشم كاظم محمد العبيدي
كلية العلوم/ الجامعة المستنصرية
Zainab Salim Hussin Hashim Kadhim Mohammed
College of Science/ University of Al-Mustansiriya

الملخص

أجري البحث لدراسة تأثير اضافة تراكيز مختلفة من حامض السالسيلك (0،50،100،150،200)ملغم/ لتر في انتاج بعض مركبات الايض الثانوي لنبات الثوم *Allium sativum L.* قدرت مركبات الايض الثانوي بالتحليل الكمي والنوعي بأستعمال جهاز High performance liquid chromatography(HPLC). حفز الكالس على النشوء من زراعة اجزاء من فصوص الثوم على وسط MS المدعم بأضافة 2ملغم/لتر 2,4-D (Dichlorophenoxy acetic acid) و0.5ملغم /لتر (NAA) Naphthalene acetic acid و1ملغم/لتر Benzyl adinenine (BA) وقد استعملت التوليفه نفسها لأدامة الكالس ادت اضافة حامض السالسيلك الى زياده معنويه في معدل الوزن الطري اذ وصل الى 743 ملغم عند تركيز 100 ملغم /لتر من حامض السالسيلك وكذلك زيادة معنوية في اغلب الزيوت الطيارة مقارنه مع فصوص الثوم.

الكلمات المفتاحية: حامض السالسيلك، نبات الثوم، الزيوت الطيارة

Abstract

The research was conducted to study the effect of adding different concentrations of Salicylic acid (0,50,100,150,200) mg/ l in the production of some secondary metabolic compounds of plant(garlic) *Allium sativum* L. Quantitative and qualitative analysis of secondary metabolites were estimated by using(HPLC). Garlic cloves were culture on MS media supplemented with 2mg/l of 2,4-D, 0.5mg/l of NAA and 1mg/l of BA for callus induction. Adding salicylic acid (100 mg/l) cause in significant increase of fresh weight 734mg and volatile oil in callus extract compared.

Key words: Salicylic acid, *Allium sativum* L., Volatile oils.

المقدمة

تعد النباتات مصدراً مهماً للمواد الغذائية ومجهزاً لعدد كبير من المواد الكيميائية التي تشمل المواد الصيدلانية, المبيدات الحشرية, المطعمات, العطور والالوان. وعلى الرغم من التقدم في طرائق الأنتاج, لاتزال مصدراً لمركبات معقدة جداً او باهضة الثمن عند انتاجها بالطرائق الاخرى [2]. وفرت التطبيقات المختلفة لزراعة الانسجة امكانية الحصول على مركبات مهمة اقتصادياً ومن ضمنها المركبات الدوائيه التي يصعب تحضيرها مختبرياً فضلاً عن كلفتها العالية عند تصنيعها [3]. وهناك الكثير من الفوائد التي تقترن بأنتاج 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 وأنتاجها يكون سريع وغير معتمد على الموسم ولا حاجة لمساحات اراضي واسعة [4]. يعد الثوم من محاصيل الخضر المهمة في العالم إذ يزرع نظراً لفوائده الطبية والغذائية [5]. ويستعمل الثوم طازجاً او مجففاً او يعصر لأستخراج عصيره، ليستخدم في اعداد الطعام وتتبيل لحوم الأسماك بسبب نكهته المرغوبة التي تعزى لاحتوائه مواد متطايرة [6]. ومن استخداماته الطبية المعروفة استعماله كمقشع وخافض للحرارة [7] . كما ينصح تناول الثوم في معالجة التهاب الحنجرة وبحة الصوت [8]. تحتوي فصوص الثوم في تركيبها على مركبات السلفا التي تعمل على حماية خلايا الكبد من تاثيرات مادة الكاربون تتراكلورايد التي تساعد على تراكم الدهون في الكبد. كما إن مركب Ajoene الموجود في الثوم يعمل على قتل الفطريات التي تصيب الجلد [9]. ويعرف الثوم بانه عاملاً خافضاً لضغط الدم المرتفع، وخافض لارتفاع الكولسترول في الدم [7]. أن الهدف من البحث توظيف تقنية زراعة الانسجة في امكانية زيادة المركبات الثانوية في نبات الثوم والتي تعد مواد طبية وصيدلانية تدخل في كثير من الصناعات الدوائية وذلك عن طريق أستخدام حامض السالسيلك كمحفز كيمياوي لزيادة هذه المركبات.

المواد وطرق العمل

أجري البحث في مختبر زراعة الأنسجة /قسم علوم الحياة /كلية العلوم/الجامعه المستنصرية. تم الحصول على نبات الثوم من الاسواق المحلية في بغداد. عقمت الفصوص بهايبوكلورات الصوديوم1.2% لمدة 5 دقائق ثم غسلت الفصوص بالماء المقطر المعقم 3 مرات متتالية وزرعت على وسط Murashige and Skoog(1962) (MS)[1] يحتوي على 2ملغم/لترD-2,4 و0.5ملغم /لتر NAAو1ملغم /لترBA. حضنت الزروعات في الضوء تحت درجه حراره25±1م وشدة اضاءه 1000 لوكس مدة 16 ساعة يومياً لمدة ثلاثة اسابيع. وقد استعملت التوليفة نفسها اعلاه لأدامة الكالس المستحث لحين الحصول على كمية كافية من الكالس. بعد الحصول على الكمية المطلوبة من الكالس أخذ 300ملغم من الكالس لكل مكرر وزرع في وسط ادامة الكالس مضافاً اليه حامض السالسيلك بالتراكيز (0،50،100،150،200)ملغم /لتر حضنت الزروعات تحت نفس الظروف اعلاه وبواقع عشرة مكررات لكل تركيز. حسب الوزن الطري والجاف للكالس بعد ثلاثة اسابيع من الزراعة. ولغرض استخلاص الزيوت الطيارة تم اتباع طريقة [10] أذ تم وزن(2)غم من فص الثوم او الكالس الرطب و وضع في جهاز السكسوليت واضيف اليه 2ml من البترولويوم لمدة 4 ساعات ثم ركز المستخلص تحت ضغط مختزل ومن ثم اخذ 1 ml من المستخلص واذيب في 20ml من البترولويوم و2ml من الميثانول و2ml من هيدروكسيدالبوتاسيوم رجّ الخليط لمدة دقيقتين ثم ترك لمدة (10) دقائق تم ازالة الطبقة العيا وغسلت بالماء اما الطبقة السفلى التي

تحتوى على الزيوت الطيارة حللت بجهاز الـ HPLC. مواصفات الجهازمبينة في جدول (1). تم تعيين تراكيز المواد الفعالة كمياً بمقارنة مساحة حزمة المادة القياسية مع مساحة حزمة النموذج تحت نفس الظروف باستخدام القانون الاتي :-

$$\text{تركيز المادة المجهولة} = \frac{\text{مساحة حزمة النموذج}}{\text{مساحة الحزمه القياسي}} \times \text{تركيز القياسي} \times \text{عدد مرات التخفيف [11]}$$

بعض مواصفات جهازHPLC

الشركة و الموديل Shimadzu 10AV-LC, أبعاد العمود, 50×4.6mm I.D , الطور المتحرك,-Mobil phase:hexane:2-propanol(99:1, V/V), حجم الجزيئات, Particle size 3um, سرعة الجريان , Flow rate 1.2 m1.min-1, نوع وعدد المضخات, Binary delivery pump model LC-10A shimadzu.

وحللت التجارب وفق تصميم كامل التعشيه(Completely Randomize Design (CRD لدراسة تاثير المعاملات المختلفه في الصفات المدروسه. وقورنت الفروقات المعنويه بين المتوسطات باختباراقل فرق معنوي (Least Significant Differences(LSD باحتمالية 5%. [12].

النتائج والمناقشة

تأثير حامض السالسيلك في معدل الوزن الطري

يلاحظ من جدول (1) أن أعلى معدل وزن طري للكالس بلغ 743ملغم عند تركيز 100 ملغم / لتر, أذ سجل معدل الوزن الطري للكالس أنخفاضاً مع زيادة تركيز حامض الساليسليك أذ بلغ اقل وزن طري للكالس571ملغم عند تركيز 150 ملغم / لتر لكن هذا الأنخفاض لم يختلف معنوياً عن التراكيز الاخرى (200,150,50) ملغم/لتركما أن جميع المعاملات لم تفرق معنوياً عن معاملة السيطرة باستثناء معاملة الـ100ملغم/لتر. وهذه النتائج تتفق مع نتائج [13] أذ وجدا أن استعمال التراكيز العالية من حامض الساليسليك يؤدي إلى زيادة المحتوى الإجمالي للمركبات الفينولية التي بدورها تؤدي إلى تثبيط نمو الكالس مما يقلل من كتلته الحيوية.

جدول (1): تأثير حامض السالسيلك في معدل الوزن الطري للكالس

التركيز (ملغم /لتر)	الوزن (ملغم)
Control	558
50	647
100	743
150	571
200	605
0.05 LSD	154.6

تأثير حامض السالسيلك في معدل الوزن الجاف للكالس

يلاحظ من جدول (2) أن أعلى معدل وزن جاف للكالس بلغ 167.2ملغم عند تركيز 100 ملغم /لترلكنه لم يفرق معنوياًعن تركيز150،200ملغم/لترأذ بلغ معدل الوزن الجاف للكالس 159.2و 144.5ملغم على التوالي. ويتبين من بيانات الجدول نفسه أن اقل وزن جاف للكالس في معاملة السيطرة اذ بلغ المعدل 129.2 ملغم/لتريليه المعامله عند تركير50ملغم/لتر اذ بلغ المعدل 136.2 ملغم لكنه لم يفرق معنوياًعن معاملة السيطرة وعن معاملة 150ملغم/لترمن حامض السالسيلك. وهذه النتائج تتفق مع نتائج [14] في أن استعمال حامض السالسيلك بتراكيزعالية يؤدي الى توقف الكالس عن النمو وأنخفاض وزنه لأنه يؤدي إلى زيادة المحتوى الإجمالي للمركبات الفينولية التي بدورها تؤدي إلى تثبيط نمو الكالس مما يقلل من كتلته الحيوية.

جدول(2): تأثير حامض السالسيلك في معدل الوزن الجاف للكالس

التركيز (ملغم /لتر)	الوزن (ملغم)
Control	129.2
50	136.2
100	167.2
150	144.5
200	159.2
0.05 LSD	26.89

تأثير تراكيز مختلفة من حامض السالسيلك (ملغم /لتر) في أنتاج المركبات الثانوية من الكالس والتقدير الكمي والنوعي لها بتقانة HPLC

توضح النتائج في جدول (3) اختلاف تراكيز المركبات الثانوية اعتماداً على تراكيز حامض الساليسليك المضافة, عند حساب تركيز المركبات الثانوية وجد أن تراكيز حامض الساليسليك المضافة قد أثرت في تحفيز زيادة أنتاج المركبات الثانوية لكن بصوره غير متساوية, فعند اضافة 50ملغم /لتر من حامض السالسيلك ارتفعت اغلب التراكيزأذ سجلت 25.0 ,46.2 ,100.3 ,45.4 ,98.2ملغم لكل من المركباتDiallyldisulfide, Agoene, Allicine, y-glotomylcystin, s-allylcystin ولم تكن هذه الزيادة في تراكيز المركبات معنوية باستثناء المركبان الـ Allicin والـDiallyldisulfide أذ كانت الزيادة في التركيزين معنوية بالمقارنة مع تراكيزهما في فص الثوم اما مركب Diallyltrisulfide فقد سجل أنخفاضاً عند مقارنته مع فص الثوم. وعند اضافة 100ملغم /لترمن حامض السالسيلك فقد ارتفعت كل من Diallyldisulfide, Agoene, Allicine, y-glotomylcystin, ,s-allylcystin أذ بلغت 62.1, 161.3, 94.2, 27.8,126.0 ولم تكن هذه الزيادة معنوية باستثناء مركبات الـ-Diallyldisulfide, Allicine, y glotomylcystin فقد كانت الزيادة في تركيزها زيادة معنوية عند المقارنة مع تركيزها في فص الثوم اما مركب الـ Diallyltrisulfide فقد أنخفض تركيزه مقارنةً مع تركيزه في فص الثوم فقد بلغ 80.1ملغم لكن تركيزه في هذه المعاملة تفوق معنوياً

على تركيزه في معاملة ال50ملغم /لتر. اما عند اضافة 150ملغم/لترمن حامض السالسيلك فقد ارتفعت كل من المركباتDiallyldisulfide, Agoene, Allicine, y-glotomylcystin, ,*s*-allylcystin فقد سجل معدل بلغ 102.7, 144.3, 84.0, 55.0,94.2وكانت زيادة كل من المركبات الـDiallyldisulfide, *s*-allylcystin, Agoen,Allicin زياة معنوية عند المقارنة مع تراكيزهم في فص الثوم. اما عند اضافة 200ملغم /لتر من حامض السالسيلك فقد ارتفعت المركبات Diallyldisulfide, Agoene , Allicine, y-glotomylcystin, *s*-allylcystin أذاعطت معدل بلغ49.4,144.0 , 73.0, 114.7, 75.7 ملغم على التوالي وكانت زيادة كل من مركب Allicinوالـ Agoen والـ iallyldisulfide,*s*-allylcystinDمعنوية عند المقارنة مع فص الثوم. اما بالنسبة لمركب ال Diallyltrisulfide فقد أنخفض تركيزه عند المقارنة مع تركيزه في فص الثوم أذ اعطى معدل بلغ 49.9 ولم يكن هذا الأنخفاض معنوياً اما بالنسبة لمعاملة السيطرة فقد سجل مركب الـAllicin زيادة معنوية في تركيزه عند المقارنة مع فص الثوم وبالنسبة لمركب Diallyltrisulfide فقد سجل أنخفاضا معنويًا في تركيزه عند المقارنة مع تركيزه في فص الثوم أذ اعطى معدل بلغ 28.5 ملغم .وهذه النتائج تتفق مع [15] أذ بين أن اضافة حامض السالسيلك تحفز على زيادة مركبات الايض الثانوي وخاصةً المركبات الفينولية وبزيادة التركيز تؤدي الى عدم الامكانيه على أنتاج أنواع من الكلايكوسيدات وهذا ماأكدوه خلال تجاربهم على نبات *Zirgber officinale*.

جدول(3): تأثير تراكيز مختلفة من حامض الساليسليك (ملغم /لتر) في أنتاج المركبات الثانوية من الكالس والتقدير الكمي والنوعي بأستخدام تقانة HPLC

Secondary metabolites	Control	SA 50	SA 100	SA 150	SA 200	فص الثوم	LSD 0.05
***s*-allylcystin**	**29.6**	**25.0**	**27.8**	**55.0**	**49.4**	**12,5**	**27.73**
y-gltomylcystin	**63.3**	**46.2**	**94.2**	**84.0**	**73.0**	**3.3**	**81.1**
Allicin	**100.8**	**100.3**	**161.3**	**144.3**	**114.7**	**16.7**	**68.24**
Vinyl-[4H]-1,2dithlin (agoene)	**57.2**	**45.4**	**62.1**	**102.7**	**75.7**	**5.9**	**66.27**
Diallyldisulfide	**64.0**	**98.2**	**126.0**	**94.2**	**144.0**	**3.8**	**80.3**
Diallyltrisulfide	**28.5**	**31.4**	**80.1**	**56.9**	**49.9**	**94.4**	**46.34**

الأستنتاجات

أن التركيز 100ملغم/لتر أدت الى زيادة 3مركبات ثانوية زيادة معنوية وهي:
Diallyldisulfide, Allicine, y-glotomylcystin والتركيز 150ملغم/لتر ادت الى زيادةمعنوية لـ4 مركبات ثانوية وهي:
Diallyldisulfide, *s*-allylcystin, Agoen,Allicin زياده معنوية عند المقارنة مع تراكيزهم في فص الثوم .

التوصيات:أجراء دراسات مماثلة لتجربة محفزات اخرى بغية معرفة تأثيرها في زيادة مركبات الأيض الثانوية لنبات الثوم.

المصادر

1. Murashing, and Skoog. (1962). Arevised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue. physiol. Plant. 15:373-497.

2. Taiz, L. and Zeiger, E. (2002). Plant Physiology,(3ED) Sinaue Sinauer Associates Inc. U.S.A. PP:283-308.

3. Discosmo, F. and Misawa, M. (1995). Plant cell and tissue culture: Alternatives for metabolite production. BiotechnologyAdvances.13(3):425-453.

4. Purohit, S.S. (1999). Agriculture Biotechnology Published by Updesh Purohit for Agrobios (india). P.833.

5. الصفدي، بسام ,علي، نزار ميدو عرابي، محمد عماد الدين. (1998). تحسين مقاومة الثوم لمرض العفن الابيض وانتاجيته وقدرته التخزينية باستخدام اشعة غاما. تقرير نهائي عن بحث علمي / قسم الزراعة / هيئة الطاقة الذرية. دمشق.

6. مطلوب، عدنان ناصر,محمد، عز الدين سلطان ،عبدول كريم صالح. (1989) . انتاج الخضراوات، الجزء الاول، الطبعة الثانية، جامعة الموصل. العراق.

7. الزبيدي، زهير نجيب وبابان، هدى عبد الكريم, وفليح، فارس كاظم. (1996). دليل العلاج بالاعشاب الطبية العراقية، شركة آب للطباعة الفنية المحدودة / بغداد.العراق.

8. الكاتب، يوسف منصور. (2000). تصنيف النباتات البذرية، مطبعة دار الكتب للطباعة والنشر/ جامعة الموصل، العراق.

9. الشافعي، درويش. (2001). اغذية واعشاب، مجلة اليرموك. الاعداد 73 ، 74.

10. Lawson, L.D., Wan, Z.J. and Hughes, B.G. (2003). Identification and HPL Cquantification of the sulfides and dialk (en)yl thiosulfides in commercial garlic product. Planta Medica.1991, 57:363-370.[Pub Med].

11. Budhiraja, R.P. (2004). Separation Chemistry. New Age International Ltd, Publishers, NewDelhi pp.171.239.

12. الراوي، خاشع محمود وعبدالعزيز محمد خلف. (1980). تصميم وتحليل التجارب الزراعية. مديرية دار الكتب للطباعة والنشر. جامعة الموصل. العراق.

13. Shilpashree, H.P. and Ravishanker, R. (2009). Salicylic acid induced hypericin production in cell culture of *Hypericum mysorense* L.

14. ألقدسي, 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.

15. Ghasemzaeh, A., Hawa, Z. and Jaafar, E. (2002). Effect of salicylic acid application on biochemical change in Ginger (*Zingiber officinsle* Roscae). J. Medic.Plants.6(5):790-795.