زيادة أنتاج مركب الـ spilanthol في نبات مقلة العين (.L) *Spilanthes acmella*باستعمال تقنية الزراعة النسيجية

Increasing the Production of Spilanthol in *Spilanthes acmella* (L.)Murr. by Using Tissue Culture Techniques

بشرى محمد جابرعلوش زينة حسن جزار
كلية العلوم للبنات/ جامعة بغداد
Bushra M. Jaber Alwash Zena H. Jazar
College of Science for Women/ Baghdad University

الملخص

اجريت الدراسة بهدف زيادة انتاج مركب الـ spilanthol كونه مركب ذو تاثير طبي مهم في المزارع النسيجية لنبات مقلة العين Murr *Spilanthes acmella*. عقمت البذور وزرعت على وسط (MS)، استعملت منظمات النمو NAA بالتراكيز 2.0, 4.0, 6.0 ملغم/لتر و BA بتركيز 1.0, 2.0, 3.0 ملغم/لتر و BAP بالتراكيز1.0, 2.0, 3.0 ملغم/لتر وبتوليفات مختلفة لاستحثاث الكالس من قطع الاوراق، كما استعمل الـ casein hydrolysate بتركيز 0.1غم وبالتداخل مع منظمات النمو اعلاه لاستحثاث الكالس وتحفيزه على زيادة انتاجيته من مركب الـ spilanthol، ثم استعملت تقنية الـHPLC للكشف الكمي و النوعي عن مركب الـ Spilanthol في النبات الام وفي المزارع النسيجية الناتجة من زراعة القطع النباتية، اظهرت النتائج ان مادة هايبوكلورات الصوديوم بتركيز 1.5%ولمدة 15دقيقة كانت ذات كفاءة عالية في التعقيم، اعطت التوليفة 3.0 ملغم/لتر BAP + 6.0 ملغم/لتر NAA + 0.1غم متحلل الكازئين اعلى وزن طري للكالس المستحث من قطع الاوراق، اما اعلى كمية لـ Spilanthol فتم الحصول عليها من الكالس الناتج من زراعة قطع الاوراق على وسط حاوي 2.0 ملغم/لتر BAP + 2.0 ملغم/لتر NAA + 0.1غم متحلل الكازئين وقدرت كميته بـ 80.46 ملغم/غم وهذه زيادة كبيرة مقارنة بكميته في النبات الام والبالغة 43.65 ملغم/غم. اظهرت النتائج امكانية تحفيز نبات الـ *S.acmella* على زيادة انتاجيته لمركب الـ spilanthol باستعمال تقنية زراعة الانسجة وبوجود منظمات النمو ومتحلل الكازئين.

الكلمات المفتاحية: زراعة الانسجة, spilanthol , نبات مقلة العين

Abstract

This study was aimed to increase the production of Spilanthol from *S. acmella* by using tissue cultures. Seeds were sterilized and cultured on MS medium supplemented with different concentrations 2.0,4.0,6.0 mg/l of Naphthalene acetic acid (NAA),1.0 , 2.0 , 3.0 mg/l Benzyl adenine (BA)and 1.0, 2.0, 3.0 mg/l Benzyl amino purine (BAP). These growth regulaters were used for callus induction from leaf segments, plus 0.1 gm casein hydrolysate in combination with the same growth regulaters for callus induction and Spilanthol production. Quality and quantity of Spilanthol were investingated using high performance liquid chromatography (HPLC), results showed that using 1.5% sodium hypochlorate for 15 min was very effective for disinfecting and survival . The combination of 3.0 mg/ l BAP, 6.0 mg/l NAA with 0.1 gm casein hydrolysed was most effective for callus induction from leaf segments ,The highest mean fresh weight and the highest amount of Spilanthol reached to 80.46 mg/g in combination of 2.0 mg/lBAP, 2.0 mg/l NAA with 0.1 g casein hydrolysed. This increased the Spilanthol compound to its highest amount when compaired with the original plant.

Key words: tissue culture, spilanthol, *Spilanthes acmella*

المقدمة

تنتج النباتات الطبية مجموعة واسعة من المركبات الفعالة فسيولوجيا والتي تسمى بمركبات الايض الثانوي secondary metabolite والتي تستخدم في الكثير من التطبيقات، حيث تدخل كمادة اولية او عوامل مساعدة في صناعة الادوية فضلا عن تحضير مبيدات الحشرات، مطعمات للاغذية والمشروبات، العطور،والالوان [1]. هذه المركبات ليس لها دور مباشر في عمليات البناء الضوئي، التنفس، نقل المحاليل، تمثيل المغذيات، تصنيع الكربوهيدرات، البروتينات والدهون[2]. وغالبا ما يكون لها دور دفاعي ضد الافات والمسببات المرضية وقد توفر حماية للنبات ضد التعرض للـ UV، وقد تكون بهيئة زيوت طيارة او صبغات لجذب الملقحات [3]، وقد وفرت التطبيقات المختلفة من الزراعة النسيجية امكانية الحصول على مركبات مهمة اقتصادياً ومن ضمنها المركبات الدوائية التي يصعب تحضيرها مختبريا فضلا عن كلفتها العالية عند تصنيعها [4]. يعد نبات*Spilanthes acmella*(L.) Murrمن نباتات الزينة فضلا عن كونه نبات طبي عشبي حولي أو ثنائي الحول ينتمي الى العائلة (Asteraceae). يعرف هذا النبات بأسم (Paracress) او(toothache plant) وتعد الأجزاء الجنوبية من البرازيل الموطن الاصلي للنبات ويكثر انتشاره في المناطق المدارية وشبه المدارية من العالم تشمل ماليزيا, جنوب امريكا, شمال استراليا, افريقيا, وفي الهند [5].

للنبات تطبيقات هائلة في مجال تصنيع المواد الصيدلانية,الغذاء, ومستحضرات التجميل والعناية بالجسم وفي الطب الشعبي لعلاج الم الأسنان, التهاب الفم ومشاكل الحنجرة. أن أزهار وأوراق النبات استعملت كتوابل تضاف للطعام كماوثق النبات لاستعماله كقاتل للحشرات ومضاد للأكسدة ومحفّز للجهاز المناعي مضاد للالتهابات و مضاد للبكتريا و مضاد للفطريات وذلك بسبب احتوائه على المركب الفعال (Spilanthol) ذو التأثير البيولوجي المهم[5]، وهو من مركبات الـ Isobutylamide الذي يعود لمجموعة المركبات الفعالة الالكامايدات (Alkamides) وهي مجموعة واسعة من

البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الثاني

مركبات الايض الثانوي الفعالة بيولوجيا، تتواجد في اكثر من 25 عائلة نباتية ومن بينها ثلاث عوائل تحوي على كميات وفيرة من هذه المركبات وهي Asteraceaeو Piperaceaeو Rutaceae وتشمل على اكثر من 200 مركب [6]. ويتوقع ان لهذه المركبات مستقبل واعد في اعتبارها مصدرا للعقاقير الطبية ومستحضرات التجميل وكمصدر للمركبات القاتلة للحشرات. ولأهمية النبات الطبية واستعمالاته المتعددة, فقد ازداد الطلب العالمي على هذا النبات واستثمر بشكل كبير وواسع من قبل الناس المحليين والشركات الصيدلانية بالاضافة الى انخفاض نسبة انبات البذور وكفاءتها, فقد أنحسر هذا النبات في السنوات الأخيرة بصورة سريعة في البلدان التي ينتشر فيها ونقصان كبير في اعدادها[7،8]. لذلك وظفت تقانة الزراعة النسيجية في الإكثار الدقيق لهذا النبات. وبناءا على ما سبق من اهمية طبية كبيرة لمركب الـ Spilanthol ولكون النبات غير موجود في العراق لحد الان ولا توجد اي بحوث او دراسات عليه في العراق لذلك فقد هدفت الدراسة الحالية الى زيادة انتاج مركب الـ Spilanthol في المزارع النسيجية لنبات *Spilanthes acmella* باستخدام تقنية زراعة الانسجة النباتية.

المواد وطرائق العمل

تعقيم الأجزاء النباتية

استعملت بذور نبات *Spilanthesacmella* (L.) Murr. التي تم الحصول عليها باستيرادها من شركة Pan American Seed الأميركية, غسلت لمدة 5-10 دقائق بماء الحنفية الجاري قبل البدء بعملية التعقيم ثم نقلت الى داخل كابينة انسياب الهواء الطبقي (Laminar air flow hood) في غرفة الزرع. اختبرت مادة هايبوكلورات الصوديوم بتراكيز:0.0, 1.5, 2, 2.5ملغم/لتر وبمدد زمنية 0. 0 ,5 ,10 ,15 دقيقة لكل تركيز وذلك لمعرفة الطريقة المناسبة للتعقيم وسجلت النتائج بعد مرور أربعة اسابيع من الزراعة.

مرحلة تحضير الأجزاء النباتية

زرعت البذور في قناني زجاجية حاوية على وسط Murashige and Skoog (MS) [9] كامل القوة خالي من منظمات النمو وذلك بهدف الحصول على نبيتات معقمة وبعد مرور 25 يوماً من بدء الزراعة أصبحت البادرات جاهزة لتقطيع الأوراق اذ استعملت كمصدر للأجزاء النباتية المعقمة في أغلب التجارب اللاحقة.

مرحلة نشوء الكالس

بعد الحصول على البادرات المعقمة ثم نقلها من القناني الزرعية الى اطباق زجاجية معقمة في كابينة انسياب الهواء وتحت ظروف تامة التعقيم حيث فصلت الاوراق عن النبات ثم خدشت من السطح السفلي الذي سوف يلامس الوسط الزرعي، ثم زرعت على اوساط (MS) مضاف لها منظمات نمو مختلفة (الاوكسينات، السايتوكاينيات) بتراكيز مختلفة، وضمن توليفات مختلفة لمعرفة تاثيرها في استحثاث الكالس، وبعدد 6 مكررات لكل معاملة وبواقع ثلاث اجزاء نباتية لكل مكرر وكما ياتي:

اولاً: تاثير تراكيز مختلفة من منظمات النمو النباتية في استحثاث الكالس من قطع الاوراق لنبات مقلة العين وكما ياتي:

أ- اضافة BA بالتراكيز 0.0 , 1.0 , 2.0 , 3.0 ملغم/لتر مع NAA بالتراكيز 0.0 , 2.0 , 4.0 , 6.0 ملغم/لتر واضافتها لوسط MS وزراعة قطع الاوراق عليها ثم تسجيل الاوزان الطرية للكالس الناتج بعد مرور 4 اسابيع من الزراعة.

ب- اضافة BAP بالتراكيز 0.0 , 1.0 , 2.0 , 3.0 ملغم/لتر بالتداخل مع NAA بنفس بالتراكيز اعلاه، وزعت قطع الاوراق سجلت النتائج بعد اربعة اسابيع.

ثانياً: تاثير بروتين casein hydrolysate بالتداخل مع منظمات النمو في استحثاث الكالس وزيادة انتاجيته للـ Spilanthol من قطع الاوراق لنبات مقلة العين:

استعمل البروتين بتركيز 0.1 غم في جميع التجارب اللاحقة وكما ياتي:

أ- وسط MS حاوي على 0.1 من Casein hydrolysate مع منظمي النمو BA بالتراكيز 0.0, 1.0, 2.0, 3.0 ملغم/لتر مع NAA بالتراكيز 0.0, 2.0, 4.0, 6.0 ملغم/لتر، ثم زرعت قطع الاوراق على هذه الاوساط وسجلت النتائج بعد مرور اربعة اسابيع.

ب- وسط MS حاوي على 0.1 من Caseinhy drolysate مع منظمي النمو BAPبالتراكيز 1.0, 2.0, 3.0 ملغم/لتر و NAAبالتراكيز 2.0, 4.0, 6.0 ملغم/لتر ثم زرعت قطع الاوراق وسجلت الاوزان الطرية للكالس الناتج بعد اربعة اسابيع من الزراعة .

الحصاد والتجفيف

بعد انتهاء الفترة المحددة لزراعة الكالس (بعد مرور اربعة اسابيع) من زراعة قطع الاوراق على الاوساط الزرعية السابقة الذكر، تم جمع الكالس من القناني الزرعية وازالة الوسط الزرعي العالق به ثم اخذت اوزانه (الوزن الطري) باستعمال الميزان الحساس. بعدها تم تجفيف الكالس المحصود بوضعه داخل فرن كهربائي بدرجة حرارة 40 م الى حين ثبات وزن الكالس، وعند ذلك تم اخذ (الوزن الجاف) للكالس، بعدها تم طحن الكالس وحفظه في قناني زجاجية لحين اجراء الاستخلاص والتحليلات الكيميائية.

استخلاص الـ Spilanthol من الكالس

تم استخلاص الـ Spilanthol من الكالس ومن النبات الام المجفف وذلك بالطريقة الاتية:

اخذ وزن 0.25 غم من النموذج المجفف المطحون واضيف له 20 مل من الميثانول بتركيز 95%، تم وضع في جهاز الاستخلاص (saxulate) على درجة حرارة 80م ولمدة ساعة، بعدها تم ترشيحه واعادة الاستخلاص Re-extracted مرة ثانية وبنفس الطريقة، ثم جمع الراشح وركز الى 5 مل[10].

استعمل جهاز كروموتوغرافيا السائل ذي الأداء العالي (HPLC). نوع Spectrophysics / UV – visible detector في تقدير نوع وكمية مركب الـ Spilanthol من مستخلصات الكالس المستحث من قطع الاوراق ومستخلص النبات الام ومقارنتها مع العينة القياسية حيث حقنت العينات في عمود نوع:

C-18 , DB (deactivated base) Fast liquid chromotochraphycolum (FLC)

ابعاده 4.6 mm × 50 وحجم الدقائق 3 مايكرومتر ودرجة الحرارة 30 مْ وقدرت النواتج في المستخلصات بحقن 20 مايكروليتر في العمود وتحت الظروف الاتية:

Mobile phase (طور متحرك): acetonitrile: deionied water (90 :10) (v:v)

Flow rate (سرعة الجريان): 0.6 ml / min

UV Detection تحت طول موجي: 237 nm

سجلت القراءات على الطول الموجي وحسب زمن الاحتجاز Rt (Retention time) للمحاليل القياسية والعينات المدروسة وقد قدر تركيز المادة الفعالة (SFGpilanthol) كميا بمقارنة مساحة حزمة المادة القياسية مع مساحة حزمة النموذج تحت نفس الظروف اعتماداً على القانون التالي[11]:

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

التحليل الاحصائي

أستعمل البرنامج SAS,2004 في التحليل الإحصائي لدراسة تأثير العوامل المختلفة في الصفات المدروسة، وقورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات باختبار أقل فرق معنوي (LSD) [12].

النتائج والمناقشة

بينت النتائج ان استخدام التركيز 1.5%من هايبوكلورات الصوديوم ولمدة 15 دقيقة كان الأفضل في تحقيق نسبة بقاء (Survival rate) بلغت 100% كما كانت خالية من التلوث, أما التراكيز والمدد الأقل فنسب التلوث فيها متوسطة, وأعطت التراكيز والمدد الأعلى نباتات ضعيفة النمو نسبيا ولم تظهر أي نسبة تلوث بسبب زيادة تركيز NaOCl وتأثيراتها السلبية على الزروعات.

تاثير منظمات النمو في استحثاث الكالس

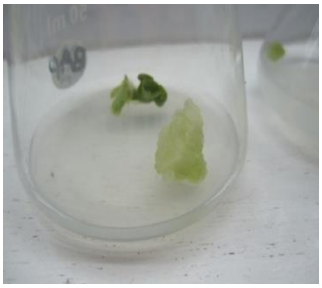
اظهرت النتائج الموضحة في الجدولين (2,1) ان لمستويات BA و NAAالمضافة تاثيرا معنويا في الوزن الطري والجاف للكالس المستحث من قطع الأوراق عند أضافتهما كلا" على حدة الى الوسط الغذائي , اما في حالة التداخل فقد تفوقت التوليفة 2.0ملغم/لتر BA و 2.0 ملغم/لتر NAA على باقي التوليفات في زيادة الوزن الطري للكالس حيث بلغ فيها وزن الكالس 0.383غم شكل (1)، كذلك تفوقت التوليفة 3.0 ملغم/لتر BA و2.0 ملغم/لتر NAA في وزن الكالس الجاف وقد بلغ الوزن 0.0273غم.

جدول (1): تاثير تراكيز مختلفة من BA و NAA والتداخل بينها مع في الوزن الطري (غم) للكالس المستحث من قطع اوراق نبات مقلة العين بعد اربعة اسابيع من الزراعة

BA	NAA				المعدل
	0	2	4	6	
0	0.00	0.653	0.670	0.652	0.493
1	0.588	0.282	0.253	0.202	0.331
2	1.169	0.383	0.294	0.292	0.534
3	0.252	0.278	0.311	0.154	0.248
المعدل	0.502	0.399	0.382	0.325	---
قيم LSD للـ NAA 0.176 * ، للـ BA 0.176 * ، للتداخل NAAxBA 0.227 *					

جدول (2): تاثير تراكيز مختلفة من BA و NAA والتداخل بينها في الوزن الجاف (غم) للكالس المستحث من قطع اوراق *spilanthes acmella* .

BA	NAA				المعدل
	0	2	4	6	
0	0.00	0.0432	0.0509	0.0461	0.0350
1	0.0547	0.0207	0.0178	0.0160	0.0273
2	0.109	0.0233	0.0198	0.0218	0.0434
3	0.049	0.0273	0.0253	0.0173	0.0297
المعدل	0.0531	0.0286	0.0284	0.0253	---
قيم LSD للـ NAA 0.017 * ، للـ BA 0.017 * ، للتداخل NAAxBA 0.051 *					



شكل(1): كالس ناشئ من زراعة قطع الاوراق على وسط MSمزود بـ 2.0ملغم/لترNAAو2.0ملغم/لتر BA بعد اربعة اسابيع من الزراعة

تؤكد النتائج الى اهمية وجود الـ BA في الوسط الغذائي لنشوء الكالس وذلك لدوره في انقسام الخلايا، اذ ينشط بناء الحامض النووي DNA ومن ثم تكوين RNA فالبروتينات والانزيمات وبالتالي انقسام النواة والخلايا [13].

اما بالنسبة لتاثير NAA فنجد ان بزيادة تركيزه يقل الوزن الطري والجاف للكالس وقد يعود ذلك الى ان التراكيز العالية ادت الى تقليل معدل انقسام الخلايا [14]، وهذا ما اشار اليه Taiz و Zeiger (2002)[2]بان اضافة NAA او 2, 4 D الى الوسط الغذائي بتراكيز اعلى من المستوى المثالي قد يؤثر سلبا على عمل الانزيمات المسؤولة عن بناء الجدران الخلوية مما يؤثر في الخصائص الميكانيكية لها وبالتالي التاثير على انقسام الخلايا وتكوين الكالس.

كما يبين كل من الجدولين (4,3) تأثير أضافة منظمي النمو BAPوNAAبتراكيز مختلفة في الوزن الطري والجاف للكالس المستحث من قطع الاوراق، حيث كان هناك تأثيرا"معنويا على الوزن الطري والجاف عند أضافتهما كلا" على حدة الى الوسط الزرعي. إما عند التداخل بينهما فقد تفوقت التوليفة 3.0 ملغم/لتر من BAP وتركيز 4.0 ملغم/لترNAA حيث بلغ اعلى وزن طري للكالس وقيمته 1.178 غم شكل(2) ,كما تفوقت التوليفة 3.0 ملغم/لتر من BAP و 2.0 ملغم/لتر من NAA وقيمته 0.713 غم .في حين تفوقت التوليفة 1.0ملغم/لترBAPو 6.0ملغم/لترNAA في الحصول على أعلى وزن جاف للكالس حيث بلغ 0,190غم .

جدول (3): تاثير تراكيز مختلفة من BAP و NAA والتداخل بينها في الوزن الطري للكالس المستحث من قطع اوراق *spilanthes acmella* بعد اربعة اسابيع من الزراعة

BAP	NAA				المعدل
	0	2	4	6	
0	0.00	0.653	0.670	0.652	0.493
1	0.316	0.368	0.806	0.613	0.525
2	0.606	1.052	1.141	0.950	0.937
3	0.507	0.997	1.178	0.456	0.784
المعدل	0.357	0.767	0.948	0.667	---
قيم LSD للـ NAA 0.188 * ، للـ BAP 0.188 * ، للتداخل NAAxBAP 0.391 *					

جدول (4): تاثير تراكيز مختلفة من BAP و NAA والتداخل بينها في الوزن الجاف للكالس المستحث من اوراق *spilanthes acmella*

BAP	NAA				المعدل
	0	2	4	6	
0	0.00	0.0432	0.0509	0.0461	0.0350
1	0.0362	0.0285	0.0817	0.190	0.0841
2	0.0670	0.107	0.108	0.107	0.0972
3	0.0571	0.113	0.112	0.0312	0.0783
المعدل	0.0400	0.0729	0.0881	0.0935	---
قيم LSD للـ NAA 0.027 * ، للـ BAP 0.027 * ، للتداخل NAAxBAP 0.060 *					

شكل(2) كالس ناشئ من زراعة قطع الاوراقعلى وسط MSمزود بـ4.0 ملغم/لتر NAA و3.0 ملغم/لتر BAP بعد اربعة اسابيع من الزراعة

قد يرجع سبب زيادة معدلات استحثاث تكوين الكالس في الاوساط الحاوية على BA و BAP و NAA مقارنة بمعاملة السيطرة الى تاثيرها في تحفيز الخلايا على الانقسام والاتساع [15, 16]. ان التوليفات المناسبة التي تفوقت في استحثاث الكالس ربما ادت الى حصول توازن داخلي بين منظمي النمو الذي يختلف باختلاف ظروف الزراعة [17], ان تفوق منظم النمو BAP مع NAA على BA مع NAA يعود الى احتواء الـ BAPحلقة بيورين والتي قد تدخل في البناء الحيوي للمركبات وزيادة كتلة الخلايا .

تاثير بروتين Casein hydrolysate بالتداخل مع منظمات النمو في استحثاث الكالس من قطع الاوراق لنبات مقلة العين

توضح نتائج الجدولين (6,5) ان لاضافة Casein hydrolysate مع منظمي النمو BA و NAA تاثيرا معنويا في زيادة الوزن الطري فقط ولم يكن لهما تاثير معنوي في الوزن الجاف للكالس المستحث من قطع الاوراق عند أضافتهما كلا على حدة, إما في حالة التداخل بين منظمي النمو مع الكازئين فقد أظهرت تاثيرا معنويا في كل من الوزن الطري والجاف للكالس, إذ تفوقت التوليفة 2.0 ملغم/لتر BA و 6.0 ملغم/لتر NAA وقد بلغ 1.096غم في شكل (3) في زيادة الوزن الطري للكالس، وايضا" تفوقت التوليفة ذاتها في الوزن الجاف للكالس فقد بلغ 0.0893 غم.

جدول (5): تاثير تراكيز مختلفة من BA و NAA والتداخل بينها بوجود متحلل الكازئين في الوزن الطري للكالس المستحث من قطع الاوراق بعد 4 أسابيع من الزراعة على وسط MS

BA	NAA				المعدل
	0	2	4	6	
0	0.00	0.803	0.845	0.697	0.586
1	0.302	0.790	0.810	0.546	0.612
2	0.632	0.726	0.892	1.096	0.836
3	0.987	0.435	0.720	0.767	0.727
المعدل	0.480	0.688	0.816	0.776	---
قيم LSD للـ NAA 0.285 * ، للـ BA 0.285 * ، للتداخل NAAxBA 0.417 *					

جدول (6): تاثير تراكيز مختلفة من BA و NAA بوجود متحلل الكازئين والتداخل بينها في الوزن الجاف للكالس المستحث من قطع الاوراق.

BA	NAA 0	NAA 2	NAA 4	NAA 6	المعدل
0	0.00	0.0724	0.0820	0.0502	0.0511
1	0.0492	0.0601	0.0692	0.0511	0.0574
2	0.0510	0.0723	0.0812	0.0893	0.0734
3	0.0651	0.0384	0.0613	0.0594	0.0560
المعدل	0.0413	0.0608	0.0734	0.0625	---
NS BA , NS NAA , قيمةLSD للتداخل NAAxBA 0.048 *					

شكل(3): كالس ناشئ من زراعة قطع الاوراق على وسط MS مزود ب 6.0ملغم/لترNAA و 2.0ملغم/لتر BAP بوجود 0.1 غم متحلل الكازئين بعد اربعة اسابيع من الزراعة

تشير نتائج الجدولين (8,7) ان اضافBAPوNAA مع Casein hydrolysate له تاثير معنويا في زيادة الوزن الطري والجاف للكالس المستحث من قطع الاوراق عند أضافتهما كلا على حدة, وفي حالة التداخل بينهما مع وجود الكازئين أيضا اثرت تاثير معنوي, حيث أعطت التوليفة 3.0 ملغم/لتر من BAP وتركيز 6.0 ملغم/لتر من NAAبوجود الكازئين أعلى وزن طري للكالس حيث بلغت 1.481 غم شكل (4)، في حين تفوقت التوليفة 2.0 ملغم/لتر من BAP و 4.0 ملغم/لتر من NAAوبوجود الكازئين في الحصول على اعلى وزن جاف بلغ 0.149 غم.

جد ول (7): تاثير تراكيز مختلفة من BAP و NAA مع الكازئين والتداخل بينها في الوزن الطري للكالس المستحث من قطع اوراق نبات *spilanthes acmella* بعد اربعة اسابيع من الزراعة

BAP	NAA 0	NAA 2	NAA 4	NAA 6	المعدل
0	0.00	0.803	0.845	0.697	0.586
1	0.398	0.894	0.480	1.157	0.732
2	0.732	1.136	0.781	1.245	0.973
3	0.621	1.011	0.844	1.481	0.989
المعدل	0.437	0.961	0.737	1.145	---
قيم LSD لـ NAA 0.230 * ، لـ BAP 0.23 * ، للتداخل NAAxBAP 0.419 *					

جدول (8): تاثير تراكيز مختلفة من BAP و NAA بوجود متحلل الكازئين والتداخل بينها في الوزن الجاف للكالس المستحث من قطع اوراق *spilanthes acmella*

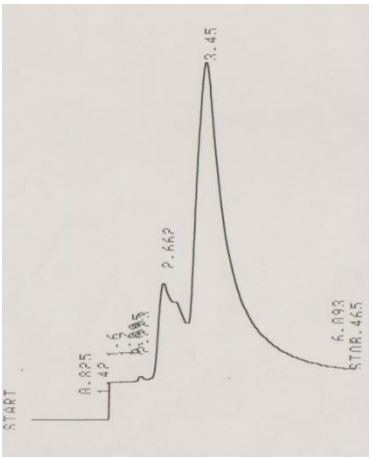
BAP	NAA 0	NAA 2	NAA 4	NAA 6	المعدل
0	0.00	0.0724	0.082	0.0502	0.0511
1	0.040	0.0760	0.0313	0.0897	0.0592
2	0.0758	0.126	0.149	0.0938	0.1111
3	0.0647	0.103	0.0798	0.119	0.0916
المعدل	0.0451	0.0943	0.0855	0.0881	---
قيم LSD لـ NAA 0.026 * ، لـ BAP 0.026 * ، للتداخل NAAxBAP 0.039 *					

شكل(4): كالس ناشئ من زراعة قطع الاوراق على وسط MS مزود ب 6.0ملغم/لتر NAA و 3.0ملغم/لتر BAP مع 0.1 غم متحلل الكازئين بعد اربعة اسابيع من الزراعة .

ان لاضافة الـ Casein hydrolysate تاثيرا واضحا في زيادة الاوزان الطرية والجافة للكالس المستحث من قطع الاوراق عند مقارنة نتائجها مع الجداول السابقة الحاوية نفس التراكيز من منظمي النمو, ولكن بعدم وجود الـ Casein hydrolysate، اي ان اضافة هذا البروتين قد حفزت على استحثاث الكالس وزيادة الاوزان الطرية والجافة وذلك لما يحويه من مجموعة من الاحماض الامينية التي تدخل في البناء الحيوي للعديد من المركبات الفعالة,تتفق هذه النتائج مع ماتوصل اليه كل من Baldi و Dixit [18] حيث اكدا زيادة انتاج مركب الـartemisinin في مزارع الخلايا المعلقة لنبات *Artemisia annua* عند اضافة الـ Casein hydrolysate الى الوسط الزرعي .

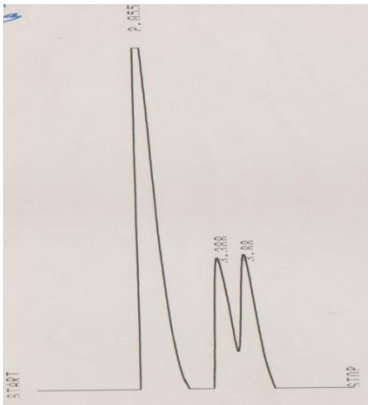
التقدير الكمي والنوعي لمركب الـ Spilanthol في نبات مقلة العين والكالس المستحث من قطع الاوراق والسيقان

تبين نتائج تحليل HPLC للنبات الام ولعينات الكالس المجفف ان لاضافة منظمات النمو BA ، BAP ، NAA بالتراكيز المختلفة والتداخل بينهما بوجود متحلل الكازئين قد اثر في زيادة انتاج مركب الـ Spilanthol في عينات الكالس مقارنة مع كميته في النبات الام البالغة 43.65 شكل(5) يوضح منحني الـ spilanthol في النبات الام.



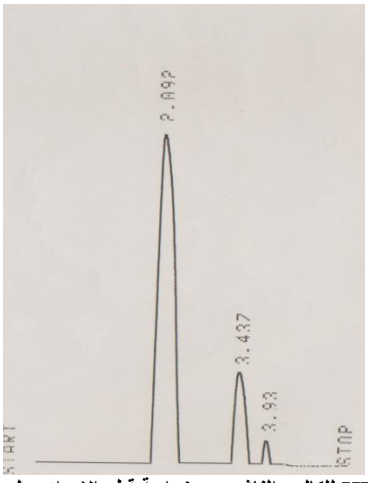
شكل(5): تحليل HPLC ل Spilanthol للنبات الام المزروع تحت ظروف المختبر
Peak area:42527
Retention time:2.662

وقد تم الحصول على اكبر كمية من هذا المركب بلغت 80.46 مايكروغرام /مل من زراعة قطع الاوراق في وسط MS حاوي 2.0 ملغم/لتر BAP و 2.0 ملغم/لتر NAA مع 0.1 من Casein hydrolysate كما في شكل (6).



شكل (6): تحليل HPLCللكالس الناشئ من زراعة قطع الاوراق على وسط MS مزودب2.0 ملغم/لتر NAA و 2.0ملغم/لترBAP مع0.1 غم متحلل الكازئين
Peak area : 78379
Retention time : 2.055

اما شكل (7) فيوضح منحني الـ Spilanthol الناتج من الكالس ايضا المستحث من قطع الاوراق مع نفس التوليفة السابقة اعلاه وهي MS + 2.0 ملغم/لتر من BAP + 2.0 ملغم/لتر من NAA لكن مع عدم وجود الكازئين وهنا انخفضت الكمية مما في وجود الكازئين حيث بلغ تركيزه 49.79.



شكل(7) : تحليل HPLC للكالس الناشئ من زراعة قطع الاوراق على وسط MSمزود بـ2.0 ملغم/لتر NAA و2.0ملغم/لترBAP
Peak area :54037
Retention time :2.092

نلاحظ من النتائج السابقة ان اضافة منظمات النمو بوجود الـ Casein hydrolysate اثر في زيادة وزن الكالس و زيادة كمية مركب الـ Spilanthol، حيث تؤكد النتائج السابقة اهمية وجود السايتوكاينين خصوصاً BAP الذي اعطى اوزان اعلى من الكالس وبكمية اكبر من مركب الـ Spilanthol وذلك لدوره في انقسام الخلايا اذ تنشط بناء الحامض النووي DNA ومن ثم تكوين RNA فالبروتينات والانزيمات وبالتالي انقسام النواة والخلايا العاني [13]. وكذلك اهمية وجود الاوكسين NAA خصوصاً ضمن التراكيز الواطئة (المثلى لتحفيز الكالس من اجزاء نبات مقلة العين) حيث شجع الخلايا على الانقسام وبالتالي زيادة الوزن الطري للكالس، وهذا ماكده Skoog و Miller وMohamad و Hassan [16,15] حيث وضحوا ان سبب زيادة معدلات استحثاث تكوين الكالس في الاوساط الحاوية على الاوكسينات والسايتوكاينيات BA و 2,4 D بسبب تاثيرها في تحفيز الخلايا على الانقسام والاتساع، كما ان التوليفات المناسبة التي تفوقت في استحثاث الكالس ربما ادت الى حصول توازن داخلي بين منظمي النمو BAP و NAA الذي يختلف باختلاف ظروف الزراعة Mohammad و Amin [19]، وان النتائج التي تم التوصل اليها تتفق مع Singh و Chaturvedi [20] عندما حصلوا على اكبر كمية كالس من زراعة قطع الاوراق على وسط MS حاوي 5.0 ملغم/لتر BAP + 1.0 ملغم/لتر NAA + 1.0 ملغم/لتر 2,4 D لنبات مقلة العين *S.acmella*، كما تتفق مع ما توصل اليه Hewage و Senarath [21] حيث حصل على اكبر كمية كالس من زراعة قطع الاوراق لنبات *Spilanthescalva* على وسط MS مزود بـ 2.25 ملغم/لتر BAP و 1.0 ملغم/لتر 2,4 D بعد مرور اربعة اسابيع من الزراعة، كما نلاحظ من النتائج اعلاه اهمية وجود الـ Casein hydrolysate في تحفيز الكالس و زيادة انتاج مركب الـ Spilanthol بشكل كبير في مقارنة مع كميته في نفس التوليفة السابقة الذكر ولكن غير حاوية على هذا البروتين وقد يعود السبب الى احتواءه مجموعة من الاحماض الامينية خصوصا حامض الـ Valine الذي يدخل في البناء الحيوي للمركب الفعال (Spilanthol) وهذا ما اكده Espinosa واخرون [22].

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". 4Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. PP:1-36.

2. Taiz, L. and Zeiger, E. (2002). Plant Physiology, (3rdEd.)Sinauer. Sinauer Associates Inc. USA. PP:283-308.

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

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

5. Sahu, J., Jain, B. and Sahu, R. K. (2011). A review onpsychopharmacology and micro propagation of *Spilanthes acmella*. Pharmacology online. 2: 1105-1110.

6. Parmar, V., Jain, S., Bisht, K., Jain, R., Taneja, p., jha, A., Tyagi, O., Prasad, A., Wengel, J., olsen, C. and Bool. (1997). phytochemistry of thegenus piper. Phytochemistry. 46: 597-673.

7.Rao, N. K. and Reddy, R. K. (1983). Threatened plants of Tirupatiand its environs. In: Jain S.K., Rao P. R. (eds): An Assessment of Threatened Plants of India. Department of Environment, Howrah:167–168.

8.Yadav, K. and Singh, N. (2012). Rapid plant regeneration from nodal explants of *Spilanthes acmella* (L.) Murr.- an endangered medicinal plant. Analele Universității din Oradea – Fascicula Biologie. Tom. XIX, Issue: 1, pp. 35-39.

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

10. Singh, M. and Chaturvedi, R. (2012) (a) . Screening and quantification of an antiseptic alkylanmid, spilanthol from *in vitro* cell and tissue cultures of *spilanthes acmella* Murr. Industrial Crops and products. 36 (1): 321-328.

11. تويج, بان منعم عبد الرزاق. (2011). استخدام بعض المؤثرات الفيزيائية والكيميائية في تحفيز بعض مركبات الايض الثانوي لنباتي الروجة *Hypericum triquetrifolium* وعنب الذيب *Solanum nigrum* خارج الجسم الحي.

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

13. العاني, طارق علي. (1991). فسلجة نمو النبات وتكوينه. جامعة بغداد. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. جمهورية العراق.

14. Trigiano, R. N. and Gray, D. J. (2000). Plant Tissue Culture, Concepts and Laboratory Exercises, CRC Press LLC. Printed in the United States of America. P: 283 .

15. Skoog, F. and Miller, C. O. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue culture *in vitro* Symp. Soc. ExpBiol. 11:118-131.

16. Mohammad, A. M. S. and Hassan, H. A. (1988). Effect of some standard and prospective growth regulators on sunflower callus. I: Initiation and growth. Univ. 15:69-77.

17. Moreira-Dias, J.M. R. V., Molina, Y., Bordo, J. L., Guardiola and Garcia-Luis, A. (2000). Direct and indirect shoot organogenic pathways in epicotyl cuttings of troyercitrange differ in hormone requirements and in their response to light. Ann. Bot. 85:103-110.

18. Bald,i A. and Dixit, V.K. (2008). Yield enhancement strategies for artemisinin production by suspension culture of Artemisia annua*L*. Bioresour. Technol. 99: 4609-4614.

19. Mohammad, A. M. S. and Amin, R. M. (1993) . *In vitor* callus growth and differentaion of *pistachio vera* L.CV. Kallegh. Res . Stand. 8(5): 35-41 .

20. Singh, M. and Chaturvedi, R. (2010) (b) . Evaluation of nutrient uptake and physical parameters on cell biomass growth and production of spilanthol in suspension cultures of *spilanthes acmella* Murr. Bioprocess Biosysy Eng., 35:943-951

21. Hewages,S. and Senarath, W.T. (2008). *In virto* callus induction of spilanthesclava DC.IJRPC. 4(8):53-56.

22. Espinosa, N.C., Verdazco, A. A. and chavez, E. R. (2011).Valine and phenyl alanine as precursors in the Biosynthesis of Alkamides in Acmellaradicans. Natural Product Communications.Volume 6, Number 6:857-861.