Effect of some Physical Elicitors on some Secondary Metabolite Induction of Hypercom Triquetrifolium in Vitro

Baan M.Abdulrazzak
College of Science, Al-Mustansiriyah University/|Baghdad
Email:Baan_twaij@yahoo.com
Dr.Saadia H.Mahmood
College of Science, Al-Mustansiriyah University/|Baghdad
Dr.Kadhim M.Ibrahim
College of Science, Al-Nahrian University/ Baghdad

Received on: 8/11/2012 & Accepted on: 4/4/2013

ABSTRACT

This project aimed to increase the production of some secondary metabolites using physical and chemical elicitors in tissue cultures of Hypercom triquetrifolium L.. The quality and quantity of photochemical were estimated using methanolic extracts of dried leaves and callus were analyses using HPLC. Callus was initiated on leaf discs cultured on Murashig and Skoog (MS) medium supplemented with 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) and Benzyl adenosine (BA) at concentrations of 0,0.1, 0.5, 2.0 or 5.0 mg/l for *H.* triquetrifolium callus. Results showed that the combination of 2,4-D at 0.1 mg/l with BA at 0.5 mg/l was the most effective for callus induction percentage reached 90%. The highest mean fresh weight reached 64.33 mg for *H.* triquetrfolium. The same combination was used for callus maintenance for plants. Results also showed an increase in the concentration of secondary metabolites in methanol extracts induced on leaves. Callus cultures induced on leaf discs were treated with some physical stimuli such as light, ultraviolet, the different exposure to photoperiod (dark for 24 hrs, 12 hrs light, 16 hrs light or 24 hrs light), the uv exposure time was 10 or 20 minutes. Result showed that there are significant differences between the various treatmeant, The best light exposure time caused an increase in the production of secondary metabolism was 12 hrs light for calli in both plants. Both exposure times (10 or 20 mint) induced the yield of secondary metabolites in callus cultures of *H.* triquetrifolium equally.

تأثير بعض المحفزات الفيزيائية في إنتاج مركبات الايض الثانوي لنبات الروجة Hypericum triquetrifolium خارج الجسم الحي

الخلاصة

اجري البحث الحالي بهدف زيادة إنتاج بعض مركبات الايض الثانوي في المزارع النسيجية لنبات الروجة *Hypericum triquetrifolium*, قدرت مركبات الايض الثانوي بالتحليل الكمي والنوعي باستعمال جهاز HPLC وقورنت مع المستخلص الميثانولي للأوراق الجافة للنبات الكامل. تم الحصول على الكالس بأخذ أجزاء من أوراق النبات وزراعتها على الوسط الغذائي Murashige and (MS) Skoogالحاوي على منظمات النمو شملت 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) وBenzyl adinenine (BA) بالتركيز 0.1 و 0.5 ملغم /لتر على التوالي. وبغية زيادة إنتاج المركبات

https://doi.org/10.30684/etj.32.2B.20
2412-0758/University of Technology-Iraq, Baghdad, Iraq
This is an open access article under the CC BY 4.0 license http://creativecommons.org/licenses/by/4.0

الثانوية وظفت عوامل تحفيز فيزيائية وتضمنت الضوء (Light) والأشعة فوق البنفسجية (Ultraviolet), مدد تعرض الزروعات للإضاءة والأشعة فوق البنفسجية فكانت 24 ساعة ظلام, 12 ساعة ضوء, 16 ساعة ضوء, 24 ساعة ضوء إما الأشعة فوق البنفسجية كانت مدة التعريض 10 أو 20 دقيقة. أفضل مدة تعريض للإضاءة لزيادة إنتاج المركبات الثانوية 12 ساعة ضوء لكالس النبات. أما بالنسبة للأشعة فوق البنفسجية فقد أعطت كلا المدتين تحفيز لكالس نبات الروجة على إنتاج المركبات الثانوية بالتساوي.

الكلمات المفتاحية: زراعة الانسجة, نبات الروجة. *Hypericum triquetrifolium* , مركبات الايض الثانوي, HPLC

المقدمة

وجد بأن الضوء يعمل على زيادة المركبات الفينولية داخل الأنسجة المزروعة في المزارع النسيجية للنبات كونه يزيد من النشاط الأنزيمي عشرة أضعاف (مقارنة بالظلام) للدور الذي يؤديه الضوء في عملية البناء الضوئي والنمو وحسب اختلاف شدته وطول الفترة الضوئيه [1]. وقد أدرك الكثير من الباحثين تأثير الأشعة فوق البنفسجية سواء كانت مفيدة أو مضرة للنباتات. إذ إنها قد تتلف المادة الوراثية داخل الخلية النباتية، فيتاثر محتوى الخلية من الشفرات الوراثية التي تنظم عملياته الحيوية [2] . بالنظر للأهمية الطبية لنبات الروجة ولاحتوائه على مركبات ثانوية مهمة تدخل في العمليات الصيدلانية ولكن إنتاجه منها قليل مقارنة بالحاجة الفعلية لهذه المركبات. لذا أستوجب الأمر إكثار النبات نسيجيا وإضافة بعض المحفزات التي قد تزيد من إنتاج النبات للمركبات الفعالة. عندها يمكن تبني خطوط إنتاجية في معامل الأدوية لإنتاج هذه المركبات بكميات كبيرة وباستخدام المفاعلات الحيوية. وبناءا على ماسبق فقد هدفت الدراسة الحالية إلى :-

أمكانية زيادة إنتاج المركبات الثانوية في أنسجة النبات بالاستفادة من تقانات الزراعة النسيجية. التحري عن مقدار الزيادة الحاصلة في بعض المركبات الفعالة والمهمة صيدلانيا نتيجة لاستعمال بعض المحفزات الفيزيائية ومقارنتها مع المركبات النباتية غير المعاملة منها. والكشف كما ونوعا عن مركبات الايض الثانوي المنتجة عن طريق التحليل الكروماتوكرافي باستخدام جهاز كروماتوكرافيا السائل ذو الأداء العالي (HPLC).

المواد وطرائق العمل

تحضير المحلول الخزين: حضر المحلول الخزين لجميع منظمات النمو النباتية بواقع 100 ملغم / لتر. وحفظ في حاضنة على درجة حرارة 25°م واستبدل شهريا بتحضير محلول خزين جديد.

الوسط الغذائي MS: حضر وسط [16] MS مختبريا من مجموعة العناصر الكبرى والصغرى ومصدر الحديد وفيتامينات وسكروز, وأضيف إليه منظمات النمو النباتية وحسب التركيز المطلوب. عدل الرقم الهيدروجيني إلى 5.7 بإضافة قطرات من هيدروكسيد الصوديوم عياري 0.1 أو حامض الهايدروكلوريك عياري 0.1 ثم أضيف إليه الاكار (Agar-Agar) وحسب التركيز المطلوب, ووزعت الأوساط في قناني زجاجية (Universal tubes).

استحثاث الكالس: اعتمدت التوليفة BA بتركيز 0.5 ملغم /لتر و 2,4-D بتركيز 0.1 ملغم / لتر والتي كانت الأفضل في إعطاء أعلى نسبة من كالس نبات الروجه وكررت عملية إعادة الزراعة Re culture) كل 8 أسابيع واعتمد هذا الوسط كوسط إدامة.

التعريض لفترات إضاءة مختلفة: وزعت أوزان مقدارها 60 ملغم من كالس نبات الروجة, على أوساط جديدة احتوت على نفس مكونات وسط إدامة الكالس, وقسمت إلى 4 مجاميع وكل مجموعة حضنت تحت الظروف اعلاه مع اختلاف زمن التعرض للإضاءة حيث كانت 24 ساعة ظلام أو 12 ساعة ضوء أو 16 ساعة ضوء أو 24 ساعة ضوء مستمر.

التعرض للأشعة فوق البنفسجية: استخدمت نفس مكونات وسط إدامة الكالس وقسمت إلى مجموعتين وكل مجموعة عرضت إلى الأشعة فوق البنفسجية نوع UV–c ذات الأمواج القصيرة بطول موجي 100 – 280 نانوميتر وبطاقة (4.43 – 12.4) فولت, وبفترات تعريض 10 – 20 دقيقة.

استخلاص الأوراق وكالس نبات الروجه [12]:- وزن 10 ملغم من العينات (الأوراق الجافة, والكالس) لنبات لروجه وأضيف إليها 10 مل من الميثانول تركيز 95% نوع HPLC grade. حمض بإضافة بضع قطرات من حامض ألخليك تركيز 1%. وحرك النموذج بواسطة جهاز الأمواج فوق الصوتية لمدة 10 دقائق . بعدها ركز المذيب الحاوي على المواد الفعالة بوساطة تيار من النيتروجين (N_2) للوصول بالحجم إلى 0.5 مل. تم زيادة التركيز للمذيب المحتوي على المواد الفعالة بإضافة خلات الامونيوم وصولا الى حجم 1 مل. بعدها رشح الحجم الأخير بوساطة ورق ترشيح قياس 0.25 مايكروميتر. وحقن 20 مايكروليتر في جهاز HPLC تحت ظروف الفصل المثبته من قبل المصنع.

التقدير الكمي والنوعي للنواتج الثانوية: استعمل جهاز كروماتوغرافيا السائل ذي الأداء العالي HPLC نوع Spectrophysics / UV-visible detector في تقدير كمية ونوعية النواتج الثانوية في مستخلصات الأوراق والكالس [6] وقورنت بالعينات القياسية.

فصلت المكونات الفعالة لنبات الروجة تحت الظروف القياسية الثابتة وحسب [15] , إذ حقنت العينات في عمود الطور المعكوس نوع Reversed phase suspelcosil C-180D ذي أبعاد (50 × 4.6 mm. I.D) وحجم الدقائق 3 µm. ودرجة حرارة 30°C [11] وقدرت النواتج الثانوية لمستخلص الأوراق والكالس بحقن 20 مايكروليتر في العمود وتحت الظروف التالية :- الطور المتحرك: 0.01 M خلات الامونيوم Ammonium acetate بنسبة (V/V 60 : 40), سرعة الجريان: 0.8 مل /دقيقة, الطول ألموجي: 285 nm نانوميتر, درجة حرارة: 30 درجة مئوية, الوقت المستغرق: 10 دقائق.

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

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

النتائج والمناقشة

التقدير الكمي والنوعي لبعض المركبات الكيميائية في مستخلصات أوراق نبات الروجة: عند حساب تركيز المركبات القياسية كما مبين بالجدولين 1 و2 كانت مقاديرها في الأوراق إذ سجل Hypericin أعلى معدل للمركبات في الأوراق بلغ 0.81174 ملغم /غم وفي الكالس سجل0.6899 ملغم/غم.[19] وجدا بأن مركبات الايض الثانوي وبالأخص الهايبرسين قد اختلف تركيزها في الكالس المستحث منها في النبات الأم وعزيا ذلك إلى أن اختلاف ظروف زراعة الأنسجة عن الظروف الطبيعية في الحقل أدت إلى تحفيز خلايا الكالس على زيادة إنتاج مركبات الايض الثانوي للنباتات أو قد يرجع السبب إلى عوامل إضافية مثل (الضوء, الرطوبة, نوع الجزء النباتي, مرحلة نمو النبات, والعوامل الوراثية). [9] علل السبب إلى عوامل أخرى مثل مكان تواجد النبات وحالة النبات الفسلجية قبل الاستخلاص. أما [13] أكدوا أن مركبات الايض الثانوي كانت أعلى نسبة في كالس الأوراق الفتية لنبات الروجه منها في النبات الأم وعللوا السبب إلى أن مرحلة نشوء الزروعات من استحثاث وأدامه وتضمين لمنظمات النمو ربما أدت إلى تحفيز الخلايا على زيادة إنتاج مركبات الايض الثانوي.

جدول (1) زمن الاحتجاز, المساحة, تراكيز المركبات القياسية لمركبات الايض الثانوي التي ظهرت من تحليل HPLC.

ت	مركبات الايض المدروسة	زمن الاحتجاز (دقيقة)	مساحة المركبات القياسية	تركيز المحلول القياسي(مايكروغرام\مل)
1	Catchin	1.01	14183	25
2	Hypersoid	1.82	20299	25

25	18011	2.99	Hypericin	3
25	16950	3.97	Pseudohypericin	4
25	15646	4.67	Hyperforin	5
25	14279	5.52	Prenylated phlorglucin	6

جدول (2) المركبات الثانوية (ملغم/غم) في الأوراق المجففة وكالس نبات الروجة n=3.

المركبات الثانوية	الأوراق الجافة	الكالس	قيمةT $P \leq 0.05$
Catchin	0.03065	0.16570	0.018
Hypersoid	0.08385	0.09482	0.004
Hypericin	0.81174	0.6899	0.025
Pseudohypericin	0.13581	0.1785	0.0092
Hyperforin	0.01917	0.1796	0.037
Prenylated phlorglucin	0.11583	0.2275	0.014

تأثير مدة الإضاءة (ساعة) في إنتاج المركبات الثانوية من كالس نبات الروجة والتقدير الكمي والنوعي لها: عند حساب تركيز المركبات الثانوية اعتمادا على مدة الإضاءة وملاحظة الجدول 3 ولوحظ هناك فروقا معنوية بين تراكيز المركب الواحد مقارنة بمعاملة السيطرة, إذ وجد ارتفاع تركيز اغلب المركبات الثانوية عند تعريض الكالس إلى الضوء لمدة 12 ساعة, بلغ أوزان المركبات 0.14156, 1.1025, 0.9242, 0.3278 ملغم/غم للمركبات Hypersoid, Hypericin, Pseudohypericin, Hyperforin على التوالي, ارتفع تركيز المركب Catchin إلى 0.19482 ملغم/غم عند تعريض الكالس للضوء لمدة 24 ساعة, أما مركب Prenylated phlorglucin وصل تركيزه إلى 0.2275 ملغم/غم عندما حضن في الظلام. ويلاحظ أن أفضل مدة تعريض للإضاءة هي 12 ساعة ضوء لزيادة إنتاج اغلب المركبات الثانوية في كالس النبات. ومن هذا نجد أن لطول الفترة الضوئية قابلية على تحفيز وإنتاج المركبات الثانوية في نبات الروجة وبالأخص لمركب Hypericin وهذا ما أشار إليه [10; 14 ; 18] حيث يعد الضوء عامل أولي يحفز قابلية المزارع النسيجية لتكوين الكلوروفيل والصبغات الأخرى [8]. وذكر [3] بان مستوى Hypericin تضاعفت في الظلام مقارنة بالضوء لكن سجل بعض الباحثين تأثيرات مغايرة حيث وجد أن تأثير مدة الإضاءة أدى إلى زيادة مستوى Hypericin في نبات الروجة [5 ; 4 ; 7 ; 17] إذ أكدوا بان مدة الإضاءة كان لها الحافز الأكبر على زيادة إنتاج مركبات الايض الثانوي في نبات الروجة إذ يعمل الضوء على زيادة إنتاج صبغة الهايبرسين في النبات.

جدول (3) تأثير مدد الإضاءة (ساعة) في إنتاج المركبات الثانوية (ملغم/غم) من كالس لنبات الروجة n=3.

مدة الإضاءة / المركبات الثانوية	Control	0	12	16	24	LSD ≤0.05
Catchin	0.1657	0.1657	0.03225	0.03396	0.19482 *	0.02148
Hypersoid	0.09482 n.s	0.09482 n.s	0.14156	0.07915	0.0859	0.01452
Hypericin	0.6899	0.6899	1.10258*	0.39179 n.s	0.63666 n.s	0.06288 n.s
Pseudohypericin	0.1785	0.17856	0.3278	0.08531	0.17848	0.01673
Hyperforin	0.1796	0.1796	0.92429*	0.36769	0.57084	0.01842
Prenylated phlorglucin	0.2275	0.2275	0.21169	0.18438	0.16503	0.01396

تأثير مدة التعريض إلى الأشعة فوق البنفسجية في إنتاج المركبات الثانوية من كالس نبات الروجة والتقدير الكمي والنوعي لهذه المركبات: توضح النتائج في الشكل 4 منحني المركبات الثانوية للكالس المعرض إلى الأشعة فوق البنفسجية وللمدتين 10 و 20 دقيقة. عند حساب تركيز المركبات الثانوية اعتمادا على مدة التعريض وملاحظة الجدول 4 وجد إن هناك فروقا بين تراكيز المركب الواحد مقارنة بمعاملة السيطرة. تحفز إنتاج المركبات عند تعريض الكالس إلى الأشعة فوق البنفسجية ولمدة 10 دقائق والتي شملت Catchin, Hypericin, Hyperforin وكان تركيزها 0.14708, 0.84623, 0.85525 ملغم/غم على التوالي, أما عند تعريض الكالس إلى الأشعة فوق البنفسجية لمدة 20 دقيقة تحفز إنتاج المركبات Hypersoid, Pseudohypericin, Prenylated phlorglucin وكان تركيزها 0.21636, 0.16578, 0.14189 ملغم/غم على التوالي. وعند مقارنة النتائج مع معاملة السيطرة وجد ارتفاع في تراكيز المركبات الثانوية عند التعريض للأشعة فوق البنفسجية.

جدول (4) تأثير مدة التعرض إلى الأشعة فوق البنفسجية (دقيقة) في إنتاج المركبات الثانوية من كالس نبات الروجة المستحث من الأجزاء الورقية, n=3.

الزمن / المركبات الثانوية	Control	10	20	LSD ≤0.05
Catchin	0.1657	0.14708	0.01781	0.02218
Hypersoid	0.09482	0.09825	0.21636	0.02596
Hypericin	0.6899	0.84623	0.71438	0.01739
Pseudohypericin	0.1785	0.13707	0.16578	0.00866

Hyperforin	0.1796	0.85525	0.40633	0.04833
Prenylated phlorglucin	0.2275	0.11275	0.14189	0.02105

يستنتج من نتائج هذه الدراسة: بان المعاملة بالمحفزات الفيزيائية كالضوء ادت إلى زيادة إنتاج المركبات الثانوية خاصة عند تعريض الكالس لمدة 12 ساعة ضوء. كما اختلفت استجابة الأنسجة لتراكم مواد الايض الثانوي مع زمن التعريض للأشعة فوق البنفسجية, ففي نبات الروجه استجابت خلايا الكالس للتحفيز وإنتاج المركبات الثانوية وحسب مدة التعريض للأشعة فوق البنفسجية, إذ ازدادت المركبات Catchin, Hypericin, Hyperforin عند تعريض الكالس لمدة 10 دقائق في الوقت الذي زادت المركبات Hypersoid, Pseudohypericin, Prenylated phlorglucin عند تعريض الكالس للاشعة لمدة 20 دقيقة.

المصادر

[1]. خينكاني, علي حسين جاسم (2010). منظمات النمو في النباتات, قسم ألبستنه والنخيل, كلية الزراعة, جامعة بابل, صفحة 12-30 , جمهورية العراق.

[2]. متولي, رقية محمد طه (2011). كيف تتحمل النباتات وهج الشمس الحارقة, قسم البساتين, كلية العلوم الزراعية, جامعة أسيوط, صفحة 85-102 ,جمهورية مصر العربية.

[3].Bais, H.P. and Walker, T.S. (2002). Factors affecting cell culture of Hypericum perforatum L. and production of hypericin in vitro. cell. Dev. Boil. Plant, 38:58 – 65.

[4].Briskin, D. and Gawienowski, M. (2001). HPLC profiling of the invasive plant species Hypericum canariense to assess rapid evolutionary changes in defensive chemistry, Plant Physiology, Biochemist, 39:1075-1081.

[5].Brokman, H. (1974). Hypericin the photodynamically active pigment from Hypericum perforatum. ; Natur wiss, 27:550-555.

[6].Budhiraja, R.P. (2004). Separation Chemistry. New Age International Ltd, Publishers, New Delhi, pp.171.239.

[7].Cappell, T., and Christou, P. (2004). Progress in Plant Metabolic Engineering. Curr. Opin. Biotechnology, 15:148-154.

[8].Chong, C. and Taper, C.D. (1974). Influence of light intensity on sorbitol metabolism, growth and chlorophyll content of malus tissue cultures. Ann. Bot., 38:359-62.

[9].Coruzzi, G.M. and Last, R.L. (2000). Amino Acid in Biochemistry and Molecular Biology of Plant, American Society of Plant Physiology Press, 358-410.

[10].Costes, C. and Chantal, T. (1967). Carotenoid Pigments of the Inflorescence of St. johns Wort (Hypericum perforatum). Herbal Medicine, Ann. Physiol. Veg. 9:157-177.

[11].Eisenthal, R. and Danson, M. J. (1992). Enzyme Assays. Practical Approach. Oxford University Press, chapter 4,123-166.

[12].Gray, D.E., Rotting, G.E., Garrett, H.E. and Pallardy, S.G. (2000). Stimulataneuos determination of predominant hyperforins and hypericins in st. Johns wort by liquid chromatography. J.AOAC. Int. 83, National Library of Medicine, (4):944-950.

[13].Jander, G., Norris, S.R., Joshi, M.F., Rugg, A. and Last, R.L. (2004). Application of high-throughput HPLC-MS/MS assay to Arabidopsis mutant screening, evidence that threonine aldolase plays a role in seed nutritional quality. The Plant J, 39:465-475.

[14].Kirakosyan, A. B., Vardapetyan, H.R. and Charchoglyan, A. G. (2000). The content of hypericin and pseudohypecicin in cell culture of *Hypericum*

perforatum L. (st. johns wort) and production of hypericin. Russ. J. Plant Physiology, 47:270-273.

[15].Meloan, C.E. (1999). Techniques in Analytical Chemistry, Chemical Separation, Principles, Techniques, and Experiments, USA.

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

[17].Namli, S., Akbas, F., Isikalan, G., Tilkat, E.A. and Davut B. (2010). The effect of different plant hormones on multiple shoots of Hypericum retusum L. (St. Johns Wort). Department of Biology, Faculty of Science and Art, The University of Batman, Batman, Turkey.

[18].Silva, B.A., Ferreres, F., Malva, J.O., and Dias, A.C.P. (2005). Phytochemical and antioxidant characterization of Hypericum perforatum alcoholic extracts. Food Chem., 90:157-167.

[19].Sirvent, T.M. and Gibson, D.M. (2000). Rapid Isocratic HPLC analysis of Hypericins. J. of Liquid Chromatography 23(2):251-259.