تأثير الجزء النباتي وجاسمونات المثيل في إنتاج بعض المركبات الفينولية من نبات المريمية *Salvia officinalis* خارج الجسم الحي

شامل إسماعيل نعمة

مركز دراسات الصحراء – جامعة الأنبار

الخلاصــة

نُفذت تجربة مختبرية في مختبر زراعة الأنسجة النباتية التابع لكلية الزراعة/ جامعة بغداد، بهدف دراسة تأثير الجزء النباتي وجاسمونات المثيل في إنتاج بعض المركبات الفينولية في كالس نبات المريمية *Salvia officinalis*. سببت إضافة جاسمونات المثيل والتداخل الثنائي بين عاملي الدراسة في حدوث إنخفاض معنوي في الوزن الطري للكالس المستحث من السويقة الجنينية السفلى والورقة الفلقية. أظهرت النتائج وجود إختلاف معنوي في إنتاج المركبات الفينولية بين الكالس المُستحث من السويقة الجنينية السفلى والكالس المستحث من الورقة الفلقية. كما أظهرت النتائج وجود فروقات معنوية بين التراكيز المختلفة من جاسمونات المثيل في محتوى الكالس المستحث من الورقة الفلقية على المركبات الفينولية، وكان أفضل تركيز لجاسمونات المثيل في تحفيز إنتاج المركبات الفينولية هو 300 مايكرومول والذي حقق معدلاً بلغ 11.47 و 254.12 و 36.90 و 26.59 و 92.80 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ وزن طري لكل من Vanillic acid و Rosmarinic acid و Quercetin و Naringinin و Apigenin بالتتابع. كما أعطى ذات التركيز زيادة معنوية في إنتاج مركب Coumaric acid عند إستخلاصه من الكالس المستحث من السويقة الجنينية السفلى والذي حقق أعلى إنتاج لهذا المركب بلغ 19.60 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ وزن طري. في حين كانت معاملة الكالس المستحث من الورقة الفلقية بالتركيز 200 مايكرومول من جاسمونات المثيل هي من أظهرت أعلى معدل في إنتاج لمركبي Chlorogenic acid و Luteolin بلغا 29.59 و 77.68 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ وزن طري. ارتفع تركيز Caffeic acid عند إضافة 100 مايكرومول من جاسمونات المثيل، إذ وصل إلى 25.97 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ وزن طري للكالس المستحث من الورقة الفلقية.

الكلمات المفتاحية:
نبات المريمية، المركبات الفينولية، جاسمونات المثيل.

للمراسلة :
شامل اسماعيل نعمة
البريد الالكتروني:
shamil7899@yahoo.com

Effect of Explant and Methyl Jasmonate on Prduction of Phenolic Compounds *In vitro* of *Salvia officinalis*

Shamil I. Neamah
Center of Desert Studies- University of Anbar

ABSTRACT

This experiment was conducted at plant tissue culture Laboratories, College o Agriculture, University of Baghdad. The objectives of this study effect of explant and methyl jasmonate in the production of phenolic compounds in callus of buckwhea *Salvia officinalis*. The concentrations of methyl jasmonate and the second interactior caused by a significant reduction in average callus fresh weight in hypocotyl and cotyledon. The results showed that the concentration of methyl jasmonate significantly effected at the content of phenolic compounds at the callus inducted from hypocotyl and cotyledon. The best concentration of methyl jasmonate stimulated the production was 300 µM for phenolic compounds reached to 11.47 254.12, 36.90, 26.59 and 92.80 µg.100mg^{-1} weight fresh for Vanillic acid Rosmarinic acid, Quercetin, Naringinin and Apigenin. Also, gave same concentratior a significant increase of Coumaric acid 19.60 µg.100mg^{-1} weight fresh when extrac in callus inducted from hypocotyl. But, the concentration of methyl jasmonate 200 µM with the callus inducted from cotyledon gave the highest product for Chlorogenic acid and Luteolin 29.59 and 77.68 µg.100mg^{-1} weight fresh. And, Caffeic acid acic reached 25.97 µg.100mg^{-1} weight fresh at the concentration 100 µM of methy jasmonate at callus inducted from cotyledon.

Key words:
Salvia officinalis, Phenolic compounds, Methyl Jasmonate.
Correspondence:
Shamil I. Neamah
E-mail:
shamil7899@yahoo.com

المقدمة :

تُعد النباتات الطبية بما تحويه من مركبات فعالة عاملاً مهماً في صراع الأنسان ضد المرض بعد ان أخذت بعض الأدوية تفقد فعاليتها الوقائية أمام الأمراض المختلفة، لذا باتت تلك النباتات مصدراً لاغنى عنهُ لمعالجة الأمراض، فضلاً عن كونها عنصر رئيس في تحضير الأدوية (Dewick، 2009). المريمية *Salvia officinalis* أحدى أهم تلك النباتات، تنتمي للعائلة الشفوية (Lamiaceae) وتمتاز بقيمتها في مجال التغذية فضلاً عن قيمتها العلاجية العالية (Gird وآخرون، 2014)، إذ تمتاز بمحتواها العالي بالكثير من أنواع الزيوت العطرية والتربينية (Mayer وآخرون، 2009) فضلاً عن إحتواءها على مزيج من المركبات الفينولية (Martins وآخرون، 2015) أستمدت من خلالها لقيمتها العلاجية العالية في كونها مضادات للأكسدة (Kontogiani وآخرون، 2013) ومضاد للألتهابات (Bauer وآخرون، 2012) ومضاد للتشنجات ومنظم لهرمون الجنس (Maniciula وآخرون، 2013).

توصف المركبات الفينولية بكونها من أهم نواتج الأيض الثانوي التي يتمتع بها نبات المريمية وبمستويات عالية، وتصنف من ضمن مضادات الأكسدة نظراً لمساهمتها في حماية الخلية ومكوناتها من مهاجمة الجذور الحرة (Free radicals) التي تنشأ من خلال عملية أكسدة الغذاء لإنتاج الطاقة في الجسم البشري والتي تعمل على مهاجمة وتدمير المكونات الخلوية محدثةً أضراراً بالغة في مادتها الوراثية ووظائفها الخلوية المختلفة (Neamah، 2016). بالنظر لما تملكهُ تلك المركبات من قدرة على منع أو إبطاء عملية أكسدة الغذاء داخل الأغشية الخلوية، فضلاً عن دورها في حماية الخلايا الحية من التلف البايولوجي التي تحدثه عملية تأكسد الدهون من خلال الأنظمة الدفاعية التي تمتاز بها تلك المركبات، إذ تساهم في إزالتهِ او تقليلهِ ومن ثم حماية الجسم من الأمراض التي يُعد الإجهاد التأكسدي أساساً لنشوئها (Nuttail وآخرون، 1998). من هذا المنطلق وجب علينا الأهتمام بهذا المحصول في بلدنا والتوسع في دراستهِ، وإيجاد الطرائق العلمية الحديثة في إنتاج وإستخلاص المركبات الطبيعية منهُ وبيان فوائدها.

تتجه الأنظار صوب الزراعة النسيجية والتي أصبحت وسيلة لا غنى عنها في إنتاج تلك المركبات، وذلك بالنظر لعدم قدرة الزراعة التقليدية في مواجهة الطلب المتزايد على تلك المركبات، فضلاً عن الصعوبات التي تواجهها عملية إنتاج الكثير من المواد الطبيعية بالطرق التقليدية، نتيجة لإختلاف العوامل البيئية أو لوجود محددات آخرى تتعلق بالنبات نفسه، كما أن قسما من هذه المركبات يصعب تحضيره مختبريا، لذا لابد من إستخلاصه من مصادره النباتية. وهنا تبرز أهميه زراعة الانسجة النباتية لإدامة إنتاج تلك المركبات وذلك لعدم تأثرها بالظروف البيئية كالتغايرات الفصلية من موسم لآخر والأفات الزراعية المختلفة، إذ تتم عملية الإنتاج في ظروف مسيطر عليها وتسوق في الوقت المناسب عند وجود طلب من السوق المحلية أو العالمية عليها لذا تساعد تلك التقانة في الإنتاج السريع لهذه المركبات على مدار السنه دون التقيد بموسم الزراعة فضلاً عن إمكانية إجراء كثير من التحولات البايولوجية في مسارات تصنيع تلك المركبات بإتجاه زيادتها كما، علاوة على توفر الزراعة النسيجية للنبات إمكانية للسيطرة على نمو الخلايا لتسهيل تكوين المنتج وزيادتهِ أو التسريع في إنتاجهِ من خلال إضافة البواديء والمظهرات إلى مزارع النبات النسيجية ومنها منظم النمو جاسمونات المثيل (Ibrahim، 2016).

تُصنف الجاسمونات بكونها من منظمات النمو النباتية الحديثة التي تمتاز بقابليتها العالية على إعاقة نمو النسيج النباتي، ويعد جاسمونات المثيل أحد أهم مركباتها وأكثرها شيوعاً واستعمالاً، إذ أثبتت التجارب المختبرية دور مركبات الجاسمونات في إحداث كثير من التغيرات الفسيولوجية داخل الأنسجة النباتية مصحوبة بتحورات مورفولوجية في الجزء النباتي المزروع مختبرياً، فضلاً عن دورها في إعادة تنظيم إنتاج الخلايا النباتية للمركبات الأساسية والثانوية على حدٍ سواء، من خلال تحفزها على إظهار الجينات المسؤولة عن البناء الحيوي لتلك المركبات (Luo وآخرون، 2014). واستعملت مركبات الجاسمونات في الكثير من التطبيقات العملية لتقانة زراعة الأنسجة النباتية منها إنتاج بعض المركبات الطبية وفي تحفيز ونشوء الأجنة الجسمية لبعض النباتات الإقتصادية خارج الجسم الحي (Ibrahim، 2016).

إستناداً إلى كل ماتقدم يتضح لنا دور كل من النباتات الطبية والتقانة الإحيائية على حداً سواء في إدامة وتوفير المادة الخام الأساس للصناعة الدوائية من خلال توظيف تقانة زراعة الأنسجة النباتية في الإنتاج السريع لتلك المركبات المتخصصة ذات القيمة الصناعية والتسويقية بدلاً عن الطرائق التقليدية التي ترافقها الكثير من المشاكل والتي سبق إيضاحها، كل هذهِ العوامل دفعت لإنتاج تلك المركبات المهمة إقتصادياً عن طريق مزارع النبات النسيجية.

لذا تهدف هذهِ الدراسة إلى إمكانية إنتاج بعض المركبات الفينولية ذات الفعالية الطبية من كالس نبات المريمية وتحديد الجزء النباتي الأمثل لإنتاج تلك المركبات، فضلاً عن محاولة تحفيز إنتاج تلك المركبات بإستعمال التراكيز المختلفة من جاسمونات المثيل.

المواد وطرائق البحث :

تم الحصول على بذور نبات المريمية من شركة Prorganics الأمريكية المتخصصة في إنتاج البذور، عقمت البذور بهايبوكلورات الصوديوم تركيز 2.0% لمدة 15 دقيقة، ثم غسلت البذور بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات متتالية ثم زرعت على وسط MS (Murashige و Skoog، 1962). حضنت الزروعات على درجة حرارة 25 ±1م° وإضاءة 1000 لوكس مدة 16 ساعة يومياً. بعد إنبات البذور المعقمة، أخذت السويقة الجنينية السفلى والورقة الفلقية لغرض إستحثاثها لتكوين الكالس. جرى ذلك تحت ظروف معقمة داخل منضدة سريان الهواء الطبقي وزرعت في انابيب زراعة بأبعاد 2.5×8.0سم الحاوية على 10 مل من الوسط الغذائي الذي يحتوي على 2,4-D و BA بالتركيزين 1.0 و 0.2 ملغم.لتر$^{-1}$ (AL-Marsoomi، 2010). وقد إستعملت التوليفة نفسها أعلاه لإدامة الكالس المستحث وحسب الوزن الطري للكالس. أخذ 100 ملغم من الكالس وزرع في وسط الإدامة مضافاً لهُ جاسمونات المثيل بتراكيز مختلفة (0، 100، 200، 300 مايكرومول). حُضنت الزروعات في الظروف المشار لها في زراعة البذور وبعشرة مكررات لكل تركيز، حسب الوزن الطري للكالس بعد ثلاثة أسابيع من الزراعة.

ولغرض إستخلاص المركبات الفينولية تم إتباع طريقة (Briggs وآخرون، 2004) وزن 100 ملغم من عينات الكالس المستحث من السويقة الجنينية السفلى والورقة الفلقية المفصولتان من البادرات المعقمة لنبات المريمية وأضيف لها 10 مل من الميثانول النقي 95% نوع HPLC grade. وضعت العينة في حمام مائي هزاز ذو الموجات فوق الصوتية (Ultrasonic Shaker Water Bath) في درجة حرارة 70ْم ولمدة 120 دقيقة. تجري بعدها عملية فصل بإستعمال جهاز Centrifugation 800 دورة ولمدة 5دقائق بعدها سحب المذيب وأعيدت الخطوات السابقة مع الراسب المتبقي ولكن بإستعمال 10مل من الإيثانول النقي 95%. ركز المذيب المستخلص بوساطة المحلولين السابقين بوساطة تيار من النيتروجين (N2) للوصول بالحجم إلى 0.5 مل (زيادة تركيز المذيب بطريقة التبخر). تمت زيادة حجم المذيب بإضافة كمية من محتوى الطور المتحرك والمبين في أدناه للوصول بالحجم إلى 1مل رشح الحجم الأخير بإستعمال ورق ترشيح قياس0.25 مايكروميتر في جهاز HPLC تحت الظروف المثلى. أستعمل جهاز كروموتوكرافيا السائل ذو الأداء العالي HPLC نوع Shimadzu LC-10 ATVP في تقدير كمية ونوعية المركبات الفينولية في مستخلصات الكالس. قدرت المركبات الفينولية بحقن العينة في عمود نوع C18 ذي أبعاد (50×4.6mm I.D) وحجم الدقائق 3 µm ودرجة حرارة 25ْم وقدرت المركبات الفينولية لمستخلص العينات بحقن 25 مايكروليتر في العمود وتحت الظروف الأتية:

- الطور المتحرك Acetic acid(2.5%): Methanol: Acetonitrile (35:5:10, v/v)
- سرعة الجريان 1.0 ml./min.
- الطول الموجي 360 نانوميتر (Briggs وآخرون، 2004)

سجلت القراءات على الأطوال الموجية وحسب زمن الإحتجاز Rt للمحاليل القياسية والعينات المدروسة. قدرت تراكيز المواد الفعالة كمياً بمقارنة مساحة حزمة المادة القياسية مع مساحة حزمة النموذج تحت نفس الظروف إعتماداً على المعادلة التالية:

تركيز المركب الفينولي= مساحة حزمة النموذج/مساحة حزمة المركب القياسي×تركيز المركب القياسي×عدد مرات التخفيف.

أخضعت جميع البيانات إلى التحليل الأحصائي بإستعمال التصميم العشوائي الكامل (C. R. D)، وتم حساب قيمة أقل فرق معنوي LSD للمقارنة بين المتوسطات الحسابية عند مستوى احتمال 0.05 من خلال إستعمال برنامج GenState 12th Edition الموضوع في الحاسبة الإلكترونية.

النتائج والمناقشة:

تأثير الجزء النباتي والتراكيز المختلفة لجاسمونات المثيل في الوزن الطري للكالس المُستحث من البادرات المعقمة لنبات المريمية :

أظهرت النتائج في الجدول (1) عدم وجود فرق معنوي في الوزن الطري للكالس المستحث من كلا الجزئين النباتيين الداخلين في الدراسة. في حين أدت معاملة الكالس بالتراكيز المختلفة لمنظم النمو جاسمونات المثيل إلى حدوث إنخفاض معنوي في الوزن الطري للكالس المستحث، وحقق التركيز 300 مايكرومول أقل معدل معنوي لهذا الوزن بلغ 84.4 ملغم واختلف من خلالهِ معنوياً عن التركيز 200 مايكرومول الذي إختلف بدورهِ معنوياً عن باقي التراكيز في حين أعطت معاملة المقارنة أعلى معدل للوزن الطري بلغ 260.9 ملغم. كما أثر التداخل الثنائي بين عاملي الدراسة معنوياً في الوزن الطري للكالس المستحث، إذ نلاحظ تفوق السويقة الجنينية السفلى عند معاملة المقارنة بإعطائها أعلى معدل للوزن الطري للكالس المستحث منها بلغ 274.6 ملغم وبنسبة زيادة غير معنوية بلغت 11.08% عن ذات المعاملة للكالس المستحث من الورقة الفلقية. في حين سببت الزيادة في تراكيز إضافة منظم النمو جاسمونات المثيل خفض معنوي للوزن الطري للكالس المستحث من كلا الجزئين النباتيين ولكن ما نلاحظه هو وجود تباين في نسب التاثير لتلك التراكيز بين كل جزء نباتي وعلى العموم فقد أعطى الكالس المستحث من الورقة الفلقية عند تضمين وسطهُ الغذائي بجاسمونات المثيل بالتركيز 300 مايكرومول أدنى معدل للوزن الطري على الأطلاق بلغ 75.0 ملغم. إختلاف إستجابة الأجزاء النباتية في الوزن الطري ناجم عن وجود إختلافات جوهرية في طبيعة النسيج المكون لكل منهما والأصل الذي نشأ منهُ فضلاً عن وجود إختلاف في المحتوى الهرموني لكل منهما لذا إختلف مقدار التأثير لمنظم النمو في كلاً منهما (George وآخرون، 2009).

جدول1. تأثير الجزء النباتي والتراكيز المختلفة من جاسمونات المثيل والتداخل بينهما في الوزن الطري (ملغم) للكالس المُستحث من نبات المريمية بعد ثلاثة أسابيع من الإدامة في وسط MS (n=7)

تركيز جاسمونات المثيل (مايكرومول)	الجزء النباتي المُستعمل		المتوسط
	السويقة الجنينية السفلى	الورقة الفلقية	
0	274.6	247.2	260.9
100	170.2	159.0	164.6
200	107.2	135.2	121.2
300	93.8	75.0	84.4
المتوسط	161.4	154.1	
قيمة L.S.D	**الجزء النباتي= N.S**	**جاسمونات المثيل= **10.56**	
		التداخل= **14.94	

N.S غير معنوي ، * معنوي عند مستوى إحتمال 0.05 ، ** معنوي عند مستوى إحتمال 0.01

أما تأثير جاسمونات المثيل في الوزن الطري فقد يعزى لتأثيرها في نمو وحيوية الخلايا الحية من خلال دورها كأحدى المجاميع المثبطة لنمو النبات إذ تسبب تثبيط تكون البروتين وهو المفتاح الأساس لبناء الخلية فضلاً عن دورها في تثبيط تكون ATP وعملية التنفس مؤدية إلى نقصان حجم الخلايا من جهة آخرى (Avanci وآخرون، 2012) لتلك التراكيز دور في تحفيز إنتاج المركبات الفينولية التي تمتاز بسميتها وتأثيراتها السلبية في نمو وتطور الخلايا النباتية. واتفقت هذهِ النتيجة مع ما توصل اليهِ

باحثين اخرين منهم (Al-Attar، 2012 و Neamah، 2015) من وجود إنخفاض واضح في الوزن الطري للكالس من جراء إضافة حامض الجاسمونيك إلى الوسط الغذائي لتنمية الكالس المستحث من الأجزاء النباتية المختلفة لنباتي الحلبة والحنطة السوداء.

تأثير الجزء النباتي والتراكيز المختلفة لجاسمونات المثيل والتداخل بينهما في إنتاج بعض الأحماض الفينولية من كالس نبات المريمية :

أظهرت نتائج التحليل الأحصائي في الجدول (2) وجود تأثير معنوي لكل من الجزء النباتي وتراكيز إضافة جاسمونات المثيل في كمية المُنتج من مركب Caffeic acid، إذ حقق الكالس المُستحث من الورقة الفلقية أعلى معدل للإنتاج بلغ 21.63 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ وزن طري وبنسبة زيادة بلغت 61.90% عن ماتم إنتاجه من الكالس المستحث من السويقة الجنينية السفلى. كما ادت المعاملة بمنظم النمو جاسمونات المثيل إلى إحداث زيادة معنوية في إنتاج هذا المركب فقد حقق التركيز 200 مايكرومول أعلى معدل بلغ 19.95 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ وزن طري تفوق من خلالهِ معنوياً على معاملة المقارنة والتركيز 300 مايكرومول اللذان أعطيا معدلاً للإنتاج بلغ 14.01 و 17.14 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ وزن طري. كما يتضح من الجدول (3) وجود تأثير معنوي للتداخل الثنائي بين الجزء النباتي المُستعمل في الدراسة وتراكيز إضافة منظم النمو جاسمونات المثيل في معدل إنتاج Caffeic acid، ففي الكالس المستحث من الورقة الفلقية نجد بأن التركيز 100 مايكرومول قد حقق أعلى معدل لإنتاج المركب بلغ 25.97 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ وزن طري في حين أعطى الكالس المُستحث من السويقة الجنينية السفلى والمُعامل بالتركيز 100 مايكرومول من جاسمونات المثيل أدنى إنتاج للمركب بلغ 11.79 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ وزن طري.

وبنفس الطريقة انفة الذكر نجد بأن محتوى الكالس من مركب Vanillic acid قد تباين معنوياً من جزء نباتي لآخر وحقق الكالس المُستحث من الورقة الفلقية أعلى معدل لإنتاج المركب بلغ 10.58 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ وزن طري، متفوقاً بذلك معنوياً عن الكالس المُستحث من السويقة الجنينية السفلى التي أعطت معدلاً أقل لإنتاج المركب (6.13 مايكروغرام. 100ملغم$^{-1}$ وزن طري). كما ساهمت تراكيز إضافة جاسمونات المثيل في إحداث تغيراً معنوياً في معدلات إنتاج Vanillic acid وحقق التركيز 200 مايكرومول أعلى معدل لإنتاج المركب بلغ 8.89 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ وزن طري ومع إن إختلافهُ لم يصل لحدود المعنوية قياساً بما تم إنتاجهُ من قبل التركيز 300 مايكرومول، إلا إن تلك الزيادة قد تجاوزت حدود المعنوية قياساً بما تم إنتاجهُ من قبل معاملة المقارنة والتركيز 100 مايكرومول اللذان اعطيا معدلاً لإنتاج المركب بلغ 8.08 و 8.03 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ وزن طري بالتتابع (جدول 2). وأدى التداخل بين عاملي الدراسة إلى ظهور زيادة معنوية في كمية المُنتج لهذا المركب بين المُعاملات قيد الدراسة، وحقق التركيز العالي 300 مايكرومول عند تضمينهِ للوسط الغذائي المُعد لتحفيز الكالس المُستحث من الورقة الفلقية أعلى معدل معنوي لإنتاج مركب Vanillic acid بلغ 11.47 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ وزن طري متفوقاً بذلك معنوياً على أغلب المُعاملات قيد الدراسة، في حين أنتج الكالس المُستحث من السويقة الجنينية السفلى والمُعامل بالتركيز 300 مايكرومول من جاسمونات المثيل بلغ 5.36 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ وزن طري (جدول 3).

أما بالنسبة لمركب Chlorogenic acid فأن الجدول (2) يُظهر بأن كلا عاملي الدراسة قد أثرا معنوياً في إنتاجهِ، إذ حقق الكالس المُستحث من الورقة الفلقية زيادة معنوية في معدل إنتاجهِ بلغ 26.88 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ وزن طري وبنسبة زيادة بلغت 31.77% عن ماتم إنتاجهُ من الكالس المُستحث من السويقة الجنينية السفلى. كما زاد معدل إنتاج المركب معنوياً بزيادة المعاملة بجاسمونات المثيل، إذ حقق التركيز 200 مايكرومول أعلى معدل لإنتاج المركب بلغ 24.87 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ وزن طري ومع أن ذلك التفوق لم يصل مستوى المعنوية قياساً بما تم إنتاجه عند المعاملة بالتركيز 300 مايكرومول (24.04 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ وزن طري)، إلا أنهُ قد تفوق معنوياً على معاملة المقارنة والتركيز 100 مايكرومول الذين أعطيا معدلاً لإنتاج المركب بلغ 22.64 و 23.00 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ وزن طري. وبينت النتائج في الجدول (3) وجود تاثير معنوي لهذا

التداخل في إنتاج مركب Chlorogenic acid، إذ حقق الكالس المُستحث من الورقة الفلقية عند تضمين وسطهُ الغذائي بالتركيز 200 مايكرومول من جاسمونات المثيل أعلى معدل لإنتاج المركب بلغ 29.59 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ وزن طري في حين حقق التركيز 300 مايكرومول (18.82 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ وزن طري) عند تضمينهُ للوسط المُعد لتحفيز الكالس المُنمى من السويقة الجنينية السفلى.

وبينت النتائج تفوق الكالس المستحث من السويقة الجنينية السفلى معنوياً في زيادة إنتاج Coumaric acid، إذ حققت معدل لإنتاج المركب بلغ 17.09 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ وزن طري متفوقة بذلك عن ما تم إنتاجهُ من الكالس المُستحث من الورقة الفلقية والذي أعطى معدل أقل للإنتاج بلغ 13.14 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ وزن طري (جدول 2). وساهمت التراكيز المختلفة من منظم النمو جاسمونات المثيل في إحداث تاثيراً معنوياً في إنتاج هذا المركب وحقق التركيز 300 مايكرومول أعلى معدل لإنتاج المركب فيها بلغ 18.73 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ وزن طري واختلف بذلك معنوياً عن سائر تراكيز إضافة جاسمونات المثيل التي لم تختلف فيما بينها معنوياً (جدول 2). بينما لم يؤثر التداخل الثنائي بين الجزء النباتي وتراكيز إضافة منظم النمو جاسمونات المثيل معنوياً في إنتاج هذا المركب (جدول 3).

يتضح من الجدول (2) وجود إختلاف معنوي لكل من الجزء النباتي وتركيز جاسمونات المثيل في إنتاج مركب Rosmarinic acid خارج الجسم الحي، فقد حقق الكالس المُستحث من الورقة الفلقية أعلى معدل معنوي للإنتاج بلغ 233.72 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ وزن طري. كما أظهرت تراكيز إضافة جاسمونات المثيل تأثيراً معنوياً، إذ شهدت الزيادة في تراكيز إضافة منظم النمو زيادة في معدلات إنتاج Rosmarinic acid حتى حقق التركيز 300 مايكرومول (180.30 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ وزن طري) ومع كون ذلك التفوق لم يصل مستوى المعنوية قياساً بالتركيز 200 مايكرومول، إلا أن كلا التركيزين قد تفوقا معنوياً قياساً بمعاملة المقارنة والتركيز 100 مايكرومول اللذان اعطيا معدل للإنتاج بلغ 161.75 و 169.04 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ وزن طري. كما سبب التداخل الثنائي إختلاف معنوي في إنتاج المركب (جدول 3)، وحقق الكالس المُستحث من الورقة الفلقية والمُعامل بالتركيز 300 مايكرومول أعلى معدل بلغ 254.12 مايكروغرام. 100ملغم$^{-1}$ وزن طري تفوق من خلالهِ معنوياً على كافة المُعاملات قيد الدراسة بينما أعطى الكالس المُستحث من السويقة الجنينية السفلى وغير المُعامل بجاسمونات المثيل أدنى معدل لإنتاج المركب بلغ 103.57 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ وزن طري.

جدول2. تأثير الجزء النباتي والتراكيز المختلفة من جاسمونات المثيل في إنتاج بعض الأحماض الفينولية (مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ وزن طري) من كالس نبات المريمية بعد أربعة أسابيع من الإدامة في وسط MS (n=3)

الجزء النباتي	Caffeic acid	Vanillic acid	Chlorogenic acid	Coumaric acid	Rosmarinic acid
السويقة الجنينية السفلى	13.36	6.13	20.40	17.09	110.92
الورقة الفلقية	21.63	10.58	26.88	13.14	233.72
قيمة L.S.D	1.475**	0.369**	1.058**	1.841**	2.933**
تركيز MJ (مايكرومول)					
0	14.01	8.08	22.64	13.75	161.75
100	18.88	8.03	23.00	13.40	169.04
200	19.95	8.89	24.87	14.58	178.18
300	17.14	8.41	24.04	18.73	180.30
قيمة L.S.D	2.086**	0.522**	1.496**	2.604**	4.148**

N.S غير معنوي ، * معنوي عند مستوى إحتمال 0.05 ، ** معنوي عند مستوى إحتمال 0.01

جدول3. تأثير التداخل بين الجزء النباتي والتراكيز المختلفة من جاسمونات المثيل في إنتاج بعض الأحماض الفينولية (مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ وزن طري) من كالس نبات المريمية بعد أربعة أسابيع من الإدامة في وسط MS (n=3)

تركيز MJ (مايكرومول)	Caffeic acid	Vanillic acid	Chlorogenic acid	Coumaric acid	Rosmarinic acid
			السويقة الجنينية السفلى		
0	11.96	6.43	22.87	16.05	103.57
100	11.79	5.58	19.76	14.95	122.95
200	14.82	7.14	20.16	17.75	110.67
300	14.86	5.36	18.82	19.60	106.48
			الورقة الفلقية		
0	16.07	9.73	22.41	11.45	219.93
100	25.97	10.47	26.24	11.85	215.13
200	25.07	10.63	29.59	11.40	245.70
300	19.42	11.47	29.27	17.85	254.12
قيمة L.S.D	2.950**	0.7382**	2.116**	N.S	5.866**

N.Sغير معنوي ، * معنوي عند مستوى إحتمال 0.05 ، ** معنوي عند مستوى إحتمال 0.01

تأثير الجزء النباتي والتراكيز المختلفة لجاسمونات المثيل والتداخل بينهما في إنتاج بعض المركبات الفلافونيدية من كالس نبات المريمية :

نلاحظ من الجدول (4) بأن مستوى الإنتاج لمركب Quercetin قد إختلف معنوياً تبعاً لنوع الجزء النباتي والتركيز المُستعمل من جاسمونات المثيل، إذ تفوق الكالس المستحث من الورقة الفلقية بإنتاجهِ لأعلى معدل وبنسبة زيادة بلغت 80.35% قياساً بمستوى إنتاج الكالس المستحث من السويقة الجنينية السفلى. كما أحدثت الزيادة في تراكيز إضافة منظم النمو جاسمونات المثيل تغيراً معنوياً في معدل إنتاج هذا المركب وحقق التركيز 300 مايكرومول أعلى معدل لإنتاجهِ بلغ 27.42 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ وزن طري، ومع إن مستوى الزيادة لم تصل لحدود المعنوية قياساً بالتركيز 200 مايكرومول إلا أن كلا التركيزين قد تفوقاً معنوياً قياساً بمعاملتي المقارنة والتركيز 100 مايكرومول اللذان حققا معدلاً لإنتاج المركب بلغا 22.09 و 24.11 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ وزن طري بالتتابع. أيضاً أثر التداخل الثنائي بين عاملي الدراسة معنوياً في كمية المُنتج من مركب Quercetin (جدول 5)، إذ حقق الكالس المستحث من الورقة الفلقية عند تضمين وسطهِ الغذائي بجاسمونات المثيل بالتركيز 300 مايكرومول أعلى معدل لإنتاج المركب بلغ 36.90 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ وزن طري تفوق من خلالها معنوياً على أغلب المعاملات قيد الدراسة بينما أعطى الكالس المستحث من السويقة الجنينية السفلى وغير المُعامل بجاسمونات المثيل أدنى معدل لإنتاج المركب بلغ 17.57 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ وزن طري.

كما يتضح من الجدول (4) وجود تأثير معنوي للجزء النباتي المُستعمل في مدى إنتاج مركب Naringinin وتفوقت الورقة الفلقية بإعطائها إنتاجاً أوفر لهذا المركب (19.86 مايكروغرام. 100ملغم$^{-1}$ وزن طري) قياساً بما تم إنتاجه من السويقة الجنينية السفلى. بينما لم تحدث المُعاملة بجاسمونات المثيل أية زيادة معنوية في إنتاج Naringinin. كما يشير الجدول (5) وجود تاثير معنوي للتداخل بين الجزء النباتي وتراكيز جاسمونات المثيل، إذ حقق التركيز 300 مايكرومول أعلى معدل للمركب المُنتج على الإطلاق بلغ 26.59 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ وزن طري إختلف من خلالهِ معنوياً مع كافة التركيز قيد الدراسة في الوقت الذي سببت فيهِ معاملة الكالس المُستحث من السويقة الجنينية السفلى بذات التركيز إلى الوصول لأدنى معدل لإنتاج المركب بلغ 5.89 مايكروغرام. 100ملغم$^{-1}$ وزن طري.

جدول4. تأثير الجزء النباتي والتراكيز المختلفة من جاسمونات المثيل في إنتاج بعض المركبات الفلافونيدية (مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ وزن طري) من كالس نبات المريمية بعد أربعة أسابيع من الإدامة في وسط MS (n=3)

الجزء النباتي	Quercetin	Naringinin	Apigenin	Luteolin
السويقة الجنينية السفلى	17.91	11.51	82.42	59.84
الورقة الفلقية	32.30	19.86	88.53	72.15
قيمة L.S.D	1.695**	1.857**	1.963**	2.687**
تركيز MJ (مايكرومول)				
0	22.09	14.47	83.26	58.45
100	24.11	16.38	85.00	71.26
200	26.82	15.66	86.60	70.96
300	27.42	16.24	87.04	63.32
قيمة L.s.d	2.397**	N.S	2.776**	3.800**

N.S غير معنوي ، * معنوي عند مستوى إحتمال 0.05 ، ** معنوي عند مستوى إحتمال 0.01

أما بالنسبة لمركب Apigenin فقد أثر الجزء النباتي المُستعمل معنوياً في كمية المنتج من هذا المركب وحقق الكالس المُستحث من الورقة الفلقية أعلى معدل معنوي لإنتاجهِ وبنسبة زيادة بلغت 7.41% عن الكالس المُستحث من السويقة الجنينية السفلى (جدول 4). كما يشير ذات الجدول إلى وجود إختلاف معنوي في معدل إنتاج المُركب بتغير تركيز جاسمونات المثيل وحقق التركيز 300 مايكرومول أعلى معدل لإنتاج المركب بلغ 87.04 مايكروغرام. 100ملغم$^{-1}$ وزن طري واختلف من خلالها معنوياً عن معاملة المقارنة التي اعطت ادنى معدل للإنتاج بلغ 83.26 مايكروغرام. 100ملغم$^{-1}$ وزن طري. وأدى التداخل بين عاملي الدراسة إلى إحداث تغير معنوي في مستوى إنتاج Apignin وساهم التركيز 300 مايكرومول عند تضمينهُ للوسط الغذائي المُعد لتحفيز إنتاجهِ من الكالس المُستحث من الورقة الفلقية بأعلى معدل للإنتاج بلغ 92.80 مايكروغرام. 100ملغم$^{-1}$ وزن طري في حين نجد بأن ذات التركيز عند تضمينهُ للوسط الغذائي المُعد لتحفيز الكالس المُستحث من السويقة الجنينية السفلى بأدنى معدل للإنتاج بلغ 81.28 مايكروغرام. 100ملغم$^{-1}$ وزن طري (جدول 5).

يلاحظ من نتائج الجدول (4) أن إختلاف الجزء النباتي وتركيز منظم النمو قد أثرا معنوياً في كمية المُنتج من مركب Luteolin، إذ تبين بأن الكالس المُستحث من الورقة الفلقية قد حقق أعلى معدل لإنتاج المركب بلغ 72.15 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ وزن طري متفوقاً بذلك معنوياً عن الكالس المُستحث من السويقة الجنينية السفلى التي أعطت معدلاً لإنتاج المركب بلغ 59.84 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ وزن طري. أيضاً هناك تأثيراً معنوياً لتركيز إضافة منظم النمو في إنتاج هذا المركب، إذ حققت الإضافة بالتركيز 100 مايكرومول أعلى معدل لإنتاج Luteolin بلغ 71.26 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ وزن طري، ومع أن ذلك التفوق لم يصل لحدود المعنوية قياساً بما تم إنتاجه من قبل التركيز 200 مايكرومول إلا أن كلاهما قد تفوقا معنوياً على معاملة المقارنة والتركيز 300 مايكرومول اللذان أعطيا أدنى معدل لإنتاج المركب بلغ 58.45 و 63.32 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ وزن طري بالتتابع. كما وجد تأثير معنوي للتداخل بين عاملي الدراسة، فقد حقق التركيز 200 مايكرومول عند معاملتهِ بالكالس المستحث من الورقة الفلقية أعلى معدل معنوي لإنتاج هذا المركب على الإطلاق بلغت 77.68 مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ وزن طري بينما نجد بأن عند معاملة الكالس المُستحث من السويقة الجنينية السفلى بالتركيز 300 مايكرومول من جاسمونات المثيل قد أعطى أدنى معدل لإنتاج المركب بلغ 52.25 مايكروغرام. 100ملغم$^{-1}$ وزن طري (جدول 5).

جدول5. تأثير التداخل بين الجزء النباتي والتراكيز المختلفة من جاسمونات المثيل في إنتاج بعض المركبات الفلافونيدية (مايكروغرام.100ملغم$^{-1}$ وزن طري) من كالس نبات المريمية بعد أربعة أسابيع من الإدامة في وسط MS (n=3)

Luteolin	Apigenin	Naringinin	Quercetin	تركيز MJ (مايكرومول)
		السويقة الجنينية السفلى		
57.55	84.80	11.64	17.57	0
65.34	82.04	16.50	19.36	100
64.25	81.56	12.03	16.80	200
52.25	81.28	5.89	17.93	300
		الورقة الفلقية		
59.55	81.72	17.30	26.62	0
77.18	87.95	16.27	28.86	100
77.68	91.63	19.29	36.84	200
74.39	92.80	26.59	36.90	300
5.945**	3.926**	3.715**	3.390**	قيمة L.s.d

N.S غير معنوي ، * معنوي عند مستوى إحتمال 0.05 ، ** معنوي عند مستوى إحتمال 0.01

إن إختلاف الأجزاء النباتية قيد الدراسة في محتواها من المركبات الفينولية المختلفة ربما يعود لإسباب تتعلق بالنسيج الذي نشأت منهُ وطبيعة المحتوى الهرموني لذلك النسيج فقد يسبب حالة من التضاد مع التراكيز المُضافة من جاسمونات المثيل أو ربما يعود لطبيعة المركبات الفعالة الموجودة في كل جزء نباتي. أما بالنسبة للتاثير الإيجابي لتراكيز المعاملة بجاسمونات المثيل في زيادة إنتاج المركبات الفينولية المُختلفة فيعود إلى دور هذا المركب في تحفيز المسارات الأيضية المتخصصة ببناء المركبات الفينولية وهي مسار Phenylpropanoid مما ساهم في زيادة تراكم المركبات الفينولية في هذا النبات، كما ساهمت المعاملة بمثيل الجاسمونات في زيادة فعالية إنزيم Phenyalalnine ammonia-lyase المسؤول عن تحفيز المسار الأيضي Phenylpropanoid مما يسبب في زيادة تراكم تلك المركبات (Kim وآخرون، 2011). فضلاً عن دور هذا المنظم في إحداث تغيرات في التعبير الجيني والدفع بإتجاه إظهار الجينات المسؤولة عن تشفير الإنزيمات المحفزة لإنتاج المركبات الفينولية بكلا نوعيها الأحماض الفينولية والمركبات الفلافونيدية (Cui وآخرون، 2011 و Ma وآخرون، 2012). كما ان زيادة تركيز منظم النمو عن حدودها المثلى من شأنها أن تسبب شداً على النسيج النباتي بسبب تأثيراتها السمية مما يؤدي إلى إنخفاض فعالية الإنزيمات المسؤولة عن تخليق هذهِ المركبات. وفي هذا الجانب أشارت دراسات مختلفة إلى الدور الإيجابي الذي يلعبه حامض الجاسمونيك في إحداث زيادة معنوية في إنتاج المركبات الفينولية المختلفة من النسيج العائد للأنواع النباتية المختلفة (Franceschi و Grimes، 1991 و Ahmed وآخرون، 2002 و Wang و Zheng، 2005 و Kim وآخرون، 2006 و Kim وآخرون، 2007 و Luo وآخرون، 2014).

المصادر :

Al-Attar, E. S. A. 2012. Stimulation of some secondary metabolites with medical important of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) *in vitro*. MSc Thesis, College of Science, Al-Mustansiriyah University.

Ahmed, H. F. S.; M. M. El-Araby and A. A. O. Said. 2002. Differential effect of jasmonic acid on the defense of Faba Bean against *Fusarium* wilt: modulation of other phyotormones and simple phenols. *Int. J. Agric. Biol*., pp:447-453.

AL-Marsoomi, H. I. M. 2010. Influence of medium components and explants on callus initiation and secondary metabolites production from *Salvia officinalis* plants. MSc Thesis, College of Agriculture, University of Baghdad. pp: 124.

Avanci, N.C.; D.D. Luche; G.H. Goldman and M.H.S. Goldman. 2012. Jasmonates are phytohormones with multiple functions, including plant defense and reproduction. *Gen. Mol. Res.*, 9(1):484-505.

Bauer J.; J. Kuehnl; J. M. Rollinger; O. Scherer; H. Northoff; H. Werzo and A. Koeberle. 2012. Carnasol and Carnosic acids from *Salvia officinalis* inhibit Microsomal prostaglandin E2 synthase-1. *J. Pharm. Exp. Ther*., 342(1): 169-176.

Briggs, C. J.; C. Campbell; G. Pierce and P. Jiang. 2004. Bioflavonoid analysis and antioxidant properties of Tartary Buckwheat accessions. Proceedings of the 9th International Symposium on Buckwheat. pp:593- 597.

Cui, G.; L. Huang; X. Tang and J. Zhao. 2011. Candidate genes involved in tanshinone biosynthesis in hairy roots of (*Salvia miltiorrhiza*) revealed by cDNA microarray. *Mol. Biol. Rep.*, 38: 2471–2478.

Dewick, P. M. 2009. Medicinal Natural Products. Third Edition. A Biosynthetic Approach. University of Nottingham, UK. pp:539.

Franceschi, V. R. and H. D. Grimes. 1991. Induction of soybean vegetative storage proteins and anthocyanins by low-level atmospheric methyl jasmonate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 6745–6749.

George, E. F.; M. A. Hall and G. D. Klerk. 2009. Plant Propagation By Tissue Culture. 3rd Edition. Published by springer. pp: 479.

Gird, C. E.; I. Nencu; T. Costea; L. E. Dutu; M. L. Popescu and N. Ciupitu. 2014. Quantitative analysis of phenolic compounds from Salvia officinalis L. leaves. FARMACIA. 62(4): 649-657.

Ibrahim, K. M. 2016. Applications in Plant Biotechnology. College of Applied Biotechnology. pp: 680.

Kim, H. J.; F. Chen; X. Wang and HJ. H. Choi. 2006. Effect of methyl jasmonate on phenolics, isothiocyanate, and metabolic enzymes in radish sprout (*Raphanus sativus* L.). *J. Agric. Food Chem.* 54: 7263–7269.

Kim, H. J.; J. M. Fonseca; J. H. Choi and C. Kubota. 2007. Effect of methyl jasmonate on phenolic compounds and carotenoids of romaine lettuce (*Lactuca sativa* L.). *J. Agric. Food Chem.* 55: 10366–10372.

Kim, H. J.; K. J. Park and J. H. Lim. 2011. Metabolomic analysis of phenolic compounds in Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* M.) sprouts treated with methyl jasmonate. *Agric. Food Chem.*, 59: 5707-5713.

Kontogiani V. G.; G. Tomic; I. Nikolic; A. Nerantzaki; N. Sayyad; S. Stosic-Grujicic; I. Stonovic; I. P. Gerothanassis and A. G. Tzakos. 2013. Phytochemical profile of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* extracts and correlation to their antioxidant and antiproliferative activity. *Food Chem.*, 136(1): 120-129.

Luo, H.; Y. Zhu; J. Song ; L. Xu; C. Sun; X. Zhang; Y. Xu; L. He; W. Sun; H. Xu; B. Wang; X. Li; C. Li; J. Liu and S. Chen. 2014. Transcriptional data mining of *Salvia miltiorrhiza* in response to methyl jasmonate to examine the mechanism of bioactive compound biosynthesis and regulation. *Physiol. Plant*., 152: 241–255.

Ma, Y.; L. Yuan; B. Wu; X. Li; S. Chen and S. Lu. 2012. Genome-wide identification and characterization of novel genes involved in terpenoid biosynthesis in (*Salvia miltiorrhiza*). *J. Exp. Bot.*, 63: 2809-2823.

Maniciula D.; C. Roba; I. Oprean and R. Misca-Barbu. 2013. Synthesis of ursolic acid dipeptide derivates with potential biological activity. *Rev. Chim.*, 64(12): 1454-1458.

Martins, N.; L. Barros; C. Santos-Buelga; S. Silva and I. C. F. R. Ferreira. 2015. Evaluation of bioactive properties and phenolic compounds in different extracts prepared from *Salvia officinalis* L. *Food Chim.*, 170: 378-385.

Mayer, B.; C. H. Baggio; C. S. Freitas; A. C. Dos Santos; A. Twardowschy; H. Horst; M. G. Pizzolatti; G. A. Micke; M. Heller; E. P. Dos Santos; M. F. Otuki and M. C. A. Marques. 2009. Gastroprotective Constituents of Salvia officinalis L. fitoterapia, 80:421-426.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.

Neamah, S. I. 2015. *In vivo* and *In vitro* Production of Active Ingredients from Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* M.) plants. Ph.D Dissertation, Department of Field crops, College of Agriculture, University of Baghdad. pp: 167.

Neamah, S. I. 2016. Antioxidant and Lipid Peroxidantion Inhibitory of Compounds in Common Buckwheat. *TIJAS.*, 47(5):

Nuttail, S.L.; M. J. Kendall; E. Bombarardelli and P. Morazzoni. 1998. An evaluation of the antioxidant activity of a standardized grape seed extract, leuco select. *J. Clin. Pharm. Ther.*, 23:385-389.

Wang, S. Y. and W. Zheng. 2005. Preharvest application of methyl jasmonate increases fruit quality and antioxidant capacity in raspberries. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 40:187–195.