تأثير المعاملة بالكوليسترول في أنتاج المركبات الفعالة من نبات *Thevetia neriifolia* Juss خارج الجسم الحي

مصطفى سليم حبيب * **د. سهام عبد الرزاق سالم**
جامعة الفرات الأوسط التقنية ـ الكلية التقنية المسيب

المستخلص

أجريت تجارب الدراسة الحالية في مختبر زراعة الأنسجة النباتية التابع لقسم تقنيات الإنتاج النباتي / الكلية التقنية – المسيب/ جامعة الفرات الأوسط التقنية ومختبرات وزارة الصناعة والمعادن/ مركز أبن البيطار للفترة من 2016-2017 بهدف دراسة تأثير الكوليسترول في مؤشرات نمو الكالس المستحث من سلاميات نبات الدفلة الصفراء *Thevetia neriifolia* Juss. وتقدير المركبات الثانوية فيه. اجريت تجربة اعادة زراعة وزن 350ملغم من الكالس المأخوذ من المزرعة النسيجية(والنامي على التوليفة المثالية 1.0 ملغم/لترD-2,4 + 0.3 ملغم/لتر Kin) على وسط MS يحتوي على تراكيز مختلفة من الكوليسترول(0.0 و 50 و100 و200 ملغم/لتر).حضنت مزارع الكالس في غرفة النمو تحت ظروف نمو مثالية من درجة حرارة وضوء لمدة ثلاثة اسابيع. اظهرت النتائج ان تراكيز الكوليسترول سببت انخفاضا معنويا في معدل الوزن الطري وقطر الكالس عن معاملة المقارنة, بينما لم تختلف معدلات الوزن الجاف والنمو النسبي للكالس في تراكيز الكوليسترول عن المقارنة. واجريت عملية استخلاص المركبات الثانوية من عينات كالس المقارنة والكالس المزروع على التراكيز المختلفة للكوليسترول باستعمال المذيب العضوي الهكسان , وجرى تشخيص هذه المركبات باستعمال جهاز Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS). اظهرت النتائج اختلافا واضحا في نسب المركبات الثانوية في عينات كالس المقارنة والكالس المزروع على تراكيز الكوليسترول, اذ اظهرت التحاليل سيادة بعض المركبات الثانوية مثل فيتامين E و beta-Sitosterol و alpha-Amyrin و beta-Amirin وNonacosan و Eicosan في معظم التراكيز قيد الدراسة.

الكلمات المفتاحية:- كوليسترول ، كاينتين ، كالس ،*Thevetia neriifolia* Juss

***البحث مستل من رسالة الماجستير للباحث الاول**

EFFECT OF CHOLESTEROL TREATMENT IN THE PRODUCTION OF ACTIVE COMPOUNDS OF THEVETIA NERIIFOLIAJUSS PLANT IN VITRO

Dr.siham abd Al-Razzaq salim **Mustafa saleem Habeeb**

ABSTRACT

The experiments of current study were carried out in the Plant Tissue Culture Laboratory of the Department of Plant Production Techniques, Al-MusiabTechnical College, Al- Furat Al-Awsat Technical University and the laboratories of the Ministry of Industry and Minerals/Ibn Al-Bitar Center during 2016-2017 to study the effect of cholesterol on the growth of callus induced from internodes of *Thevetia neriifolia* Juss. and estimate the secondary metabolites in it. A 350 mg of callus was transferred to fresh MS medium

supplemented with the optimum combination of 1.0mg/L 2,4-D+0.3mg/L Kin with different concentrations of cholesterol (0.0, 50, 100 and 200 mg/L). The callus cultures were incubated in growth room under optimum conditions of temperature and light for three weeks. Results showed that the concentrations of cholesterol caused a significant decreasing in fresh weight and diameter of callus, whereas the dry weight and relative growth rate of callus in the cholesterol concentrations did not differ from the control. The extraction process of secondary metabolites from callus grown on medium with or without concentrations of cholesterol was done using hexane procedure, and then they were identified using Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS). Results showed a clear difference in the secondary metabolites percentages in the tested samples. The analysis showed the abundance of some secondary metabolites such as vitamin E, beta-sitosterol, alpha-Amyrin, beta-Amyrin, Nonacosan and Eicosan in most of the studied treatments.

Key Words:- Cholesterol, *Thevetia neriifolia*, callus, Kinetine, 2,4-D.

المقدمة

يُعد نبات الدفلة الصفراء *Thevetia neriifolia Juss.* احد اهم النباتات العائدة الى العائلة الدفلية Apocynaceae و التي تمتاز معظم نباتاتها بانها نباتات زينة فضلا عن اهميتها الطبية Joshi, 2000 (1) . وسمي الجنس *Thevetia* نسبة الى المستكشف الفرنسي Andre Thevet (1502 – 1590 م) الذي اكتشفه كنبات اصلي خلال رحلته الى البرازيل وقام بنقله الى اوروبا عام 1556 م Kishan *et al.*, 2012 (2) . ويسمى النبات بالدفلة الصفراء Yellow oleander بسبب لون ازهاره الصفراء ،وهناك نوع اخر مرادف له الا ان ازهاره تكون برتقالية اللون ويعرف ايضا بنفس الاسم وهو *Thevetia peruviana Schum.* Supinya *et al.*, 2002(3). نباتات الدفلة الصفراء شجيريه دائمة الخضرة من ذوات الفلقتين تنمو الى ارتفاع 3-4 متر، اوراقها شريطية الشكل ذات لون اخضر لامع مرتبة بشكل حلزوني على الافرع .وتكون الازهار صفراء بوقية الشكل مكونة من خمس بتلات ملتوية ذات رائحة خفيفة تعطي ثماراً خضراء اللون تتحول الى اللون البني الداكن او الاسود عند النضج ، وتنتج افرعها مادة حليبية بيضاء عند جرحها Chvalliev, 1990(4) Oluwasegun *et al.*,2015(5) . تستعمل معظم اجزاء النبات في العلاجات التقليدية, كعلاج الاضطرابات القلبية الحادة والتهاب المفاصل والنقرس وحب الشباب والغثيان ومضادة للالتهابات البكتيرية والفطرية Misra *et al.*, 1999(7) Bose *et al.*, 2009(6) . اذ تعود اهميتها الطبية الى احتواءها على المركبات الفعالة طبيا ومنها القلويدات والفينولات والكلايكوسيدات القلبية والتربينات Nesy *et al.*, 2015(8) .لقد وفرت تقنيات زراعة الانسجة النباتية Plant tissue culture techniques من خلال مزاع الكالس والمعلقات الخلوية امكانية الحصول على المركبات الفعالة طبيا واقتصاديا والتي يصعب تحضيرها في المختبر فضلا عن كلفتها العالية عند تصنيعها Purohit, 2003(9) .

تميل النباتات الى تجميع المركبات الثانوية الفعالة عند مراحل معينة من النمو، ويتأثر تراكم هذه المركبات بالحالة الفسيولوجية والعمرية للنبات وكذلك بوجود المحفزات (الحيوية Biotic واللاحيوية Abiotic), و التي اصبح بالإمكان استعمالها لزيادة انتاج او استحثاث تصنيع مركبات ثانوية جديدة بتقنية المزارع النسيجية Ramakrishna and Ravishankar 2011(10). ويعد الكوليسترول Cholesterol من المركبات التي يمكن ادخالها الى وسط الزراعة لتحفيز الاجزاء النباتية وخاصة الكالس والمعلقات الخلوية على انتاج المركبات الثانوية الفعالة, وقد اشارت الدراسات السابقة الى اهمية ذلك, اذ ازداد محتوى المركب Solasodine في المعلقات الخلوية لنباتي *Solanum xanthocarpum* و *S. aviculare* عند اضافة الكوليسترول الى وسط تنمية هذه المعلقات Dornenburg and Knorr, 1995(11). كما ادت اضافة الكوليسترول الى المزارع الخلوية لنبات *Withania somnifera* الى زيادة محتوى المركب

الفعال Withaferin A Chitturi *et al.*, 2010(12). تهدف الدراسة الحالية الى التحري عن مدى قدرة الكالس على النمو وانتاج المركبات الثانوية الفعالة عند تنميته على تراكيز مختلفة من الكوليسترول.

المواد وطرائق العمل

نفذت تجارب الدراسة الحالية في مختبر زراعة الانسجة النباتية-الكلية التقنية المسيب ومختبرات وزارة الصناعة والمعادن/ مركز ابن البيطار خلال السنة 2016 – 2017 على نبات الدفلة الصفراء وكالاتي:

اختيار الجزء النباتي ووسط استحثاث الكالس

لأجل الحصول على كميات مناسبة من الكالس, استؤصِلَت أفرع طرية من النبات ، و قطعت الى أجزاء نباتية حاوية على سلاميات بطول 2 سم , وغسلت جيداً بإضافة بضع قطرات من الصابون السائل, ثم وضعت تحت الماء الجاري لمدة ساعة واحدة لإزالة الأتربة و الملوثات السطحية . نقلت هذه الأجزاء الى كابينة انسياب الهواء الطبقي, إذ تم تعقيمها بغمرها بمحلول كلوريد الزئبق (HgCl2) بتركيز 0.1 % مع الرج المستمر لمدة خمس دقائق ، وبعد انتهاء فترة التعقيم المحددة غُسلت الأجزاء النباتية جيدا بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات لمدة ثلاث دقائق في كل مرة لإزالة التأثير المتبقي للمادة المعقمة. زرعت الاجزاء النباتية بعد تقطيعها الى طول 1.5سم على وسط MS (13) Murashige and Skoog,1962, والمحضر بوزن 4.43غم من الوسط الجاهز والمجهز من شركة Himedia-India مع وزن 30غم سكروز والفيتامينات ومنظمات النمو المكونة من 2,4-D بتركيز 1.0ملغم/لتر و Kin بتركيز 0.3 ملغم/لتر كأفضل توليفة لاستحثاث الكالس من تجربة سابقة. عدل pH الوسط الغذائي الى 0.1±5.7 بإضافة بضع قطرات من محلول NaOH او HCl بتركيز 0.1 عياري. تم اضافة الاكار بمقدار 7.0 غم/لتر الى الوسط ووضع على جهاز الخلاط المغناطيسي ذو الصفيحة الساخنة لإذابة الاكار, ثم صب الوسط في جارات زجاجية بأبعاد 15*3 سم (بواقع 20مل لكل جارة). عقم الوسط بدرجة حرارة 121°م وضغط 1 بار لمدة 20دقيقة. وبعد زراعة الاجزاء النباتية, تم تحضين المزارع النسيجية في غرفة النمو بدرجة حرارة 26 °م وبشدة اضاءة 1000 لوكس وفترة اضاءة 16 ساعة.

دراسة تأثير تراكيز مختلفة من الكوليسترول

درس تأثير تراكيز مختلفة من الكوليسترول في وزن الكالس الطري والجاف , فقد أُخِذَ وزن 350 ملغم من الكالس المستحث على التوليفة المثالية من 2,4-D و Kin (حسب الفقرة السابقة) وزرع على وسط MS المجهز بنفس التوليفة المثالية من منظمات النمو ومجهزاً بالكوليسترول بالتراكيز 0.0 و 50 و 100 و 150 و 200 ملغم/لتر وبواقع 10 مكررات لكل تركيز. حضنت المزارع تحت نفس الظروف المشار اليها اعلاه، وجرى حساب الوزن الطري والجاف(ملغم) والنمو النسبي (ملغم/يوم) للكالس وقطر الكالس(ملم) بعد اربعة اسابيع من الزراعة .

تحضير مستخلص الكالس والنبات الاصل

جففت عينات الكالس(المقارنة والمعاملة بتراكيز الكوليسترول) والنبات الأصل بصورة منفردة وطحنت, وتمت عملية الاستخلاص باستعمال مذيب الهكسان حيث اخذ 5 مل من الهكسان لكل 5 ملغم من مسحوق النبات الاصل (الاوراق) ومسحوق الكالس ووضع الخليط في الانابيب الخاصة بجهاز الطرد المركزي Centrifuge لمدة 10 دقائق وبعدها ترك المستخلص لمدة 24 ساعة محفوظاً في قناني خاصة في الثلاجة بدرجة حرارة 4 °م لحين الاستعمال .

تقدير مركبات الايض الثانوية باستعمال تقنية GC/ MS

تم تشخيص المركبات الفعالة في المستخلص قيد الدراسة باستعمال جهاز كروموتوغرافيا الغاز المتصل بمطياف الكتلة نوع GC Mass Agilent Technologies Gc 7820A GC system (جدول1) وبعد الحصول على طيف كتلة كل مركب تم معالجة نتائج البرنامج GC MS solution وتعريف المنحنيات peaks المفصولة على اساس قاعدة بيانات الاطياف بالمكتبة NSTA 08

Table(1):conditions of GC-MS analysis apparatus type
جدول (1) ظروف عمل جهاز GC- MS لتحليل المركبات الثانوية

Apparatus type نوع الجهاز	GC-MS Agilent 19091S-433UI apparatus
نوع الحقن المستخدم	Split 1:20
نوع عمود الفصل	HP-5MS capillary column(30m ×250µm ×0.25µm thickness) coated with 5% phenyl-polymethylsiloxan
درجة حرارة الحقن	350 م^0
درجة حرارة العمود	تبدأ من 40 مº م وتستقر لمدة 2دقيقة ثم تزيد بمقدار 4ºم كل دقيقة حتى تصل الى درجة 350 مº وتبقى كذلك لمدة 5 دقائق ثم يحصل له تبريد
الغاز المستخدم	هيليوم He نقاوة 99.99
مطياف الكتلة	Electron Impact Ionization (EI); recorded in intervals from 40 to 600 m/z
حجم العينة عند الحقن	5 مايكرولتر
درجة حرارة مطياف الكتلة	300 م^0

التحليل الإحصائي

صممت تجارب الدراسة كتجارب عامليه وفق التصميم العشوائي الكامل Completely Randomized Design (CRD) , وحللت النتائج باستعمال برنامج التحليل الإحصائي GenStat لدراسة تأثير المعاملات المختلفة في الصفات المدروسة. ثم قورنت الفروقات المعنوية بين المتوسطات باختبار اقل فرق معنوي Least Significant Difference (LSD) وبمستوى احتمالية 5% (14)GenStat, 2012.

النتائج والمناقشة

تشير نتائج الجدول(2) الى تأثير تراكيز الكوليسترول في معدلات الوزن الطري والجاف والنمو النسبي وقطر الكالس بعد ثلاثة اسابيع من الزراعة على الوسط الغذائي المجهز بهذه التراكيز , فقد اظهرت النتائج تفوق معاملة المقارنة معنويا على جميع تراكيز الكوليسترول بإعطائها اعلى معدل للوزن الطري للكالس بلغ 695 ملغم , في حين اعطت التراكيز العالية من الكوليسترول اقل المعدلات والتي بلغت 401 و 402 ملغم عند التركيزين 150 و 200 ملغم على التوالي وبفارق معنوي كبير عن معاملة المقارنة.

Table(2):Effect of cholesterol concentrations on callus fresh and dry weights(mg),relative growth and diameter(mm)of Thevetia neriifolia on MS medium after 3weeks of culture(initiated callus 350mg)

جدول (2) : تأثير تراكيز الكوليسترول في معدلات الوزن الطري والجاف (ملغم) والنمو النسبي (ملغم/يوم) وقطر (ملم) الكالس لنبات الدفلة الصفراء *Thevetia neriifolia* في الوسط الغذائي MS بعد ثلاثة اسابيع من الزراعة (وزن الكالس بداية التجربة 350 ملغم)

الكوليسترول cholesterol (ملغم/لتر)	الوزن الطري للكالس Soft weight of callus (ملغم)	الوزن الجاف للكالس Dry weight of callus (ملغم)	معدل النمو النسبي للكالس Relative growth rate of callus (ملغم/يوم)	قطر الكالس Callus Diameter (ملم)
0.0	695	49.0	7.56	9.93
50	453	38.0	6.63	6.00
100	462	40.0	8.10	6.20
150	401	33.0	6.36	5.96
200	402	32.0	6.03	5.52
L.S.D. (0.05)	189.8	غير معنوي	غير معنوي	1.99

كما اشارت نتائج الجدول نفسه الى عدم وجود فروق معنوية بين تراكيز الكوليسترول في معدلات الوزن الجاف والنمو النسبي للكالس. وتفوقت معاملة المقارنة معنويا على بقية تراكيز الكوليسترول في معدل قطر الكالس بإعطائها اعلى معدل بلغ 9.93 ملم. يتبين من النتائج اعلاه ان تراكيز الكوليسترول قد اثرت سلبا في مؤشرات نمو الكالس. تتفق هذه النتائج مع(12) Chitturi et al.,2010 من حصول نمو بطئ للكالس النامي على التراكيز 25 و50 و 100 ملغم/لتر من الكوليسترول التي استعملوها في دراستهم على كالس نبات *Withania somnifera* , اذ قد تكون هذه التراكيز مجهدة للخلايا النامية , في حين اشارت دراسة سابقة لـــ Grossmannet al.,1985(15) الى ان الكوليسترول المضاف للوسط قد ساعد في تنظيم معدل الانقسام للخلايا النامية في المزارع الخلوية لنباتات الرز والذرة وفول الصويا التي كانت مثبطة بمعوق النمو Tetcyclacis . يعد الكوليسترول من الستيرولات Sterols التي تتواجد في اغشية الخلايا للكائنات الحية ومنها النباتات والتي تنظم سيولة ونفاذية طبقات الفوسفوليبيد الثنائية Schaller, 2003(16), فضلا عن دخولها في العديد من العمليات الحيوية في النبات مثل انقسام الخلايا النباتية ونموها وتكون الاجنة Embryogenesis والدخول في عمليات التصنيع الحيوي كبادئات للستيرويدات النباتية ومنها الهرمونات الستيرويدية Helfman,1971; He *et al.*, 2003(17).

بينت نتائج الجدول(3) تأثير التراكيز المختلفة للكوليسترول في النسبة المئوية للقلويدات المستخلصة من كالس نبات الدفلة الصفراء, اذ تواجد المركب Aziridine في معاملة المقارنة فقط , في حين كانت هناك سيادة لبعض المركبات القلويدية في معظم تراكيز الكوليسترول قيد الدراسة, اذ ان المركب Pyrrolo[2,3-b] indole,1,2,3,3a,8,8a hexahydro-5-methoxy-3a,8-dimethyl كان سائدا في جميع المعاملات باستثناء معاملة التركيز 150ملغم/لتر من الكوليسترول, و شكلت نسبة هذا المركب زيادة واضحة في معاملة التركيز

100ملغم/لتر لتصل الى 15.152%. ولوحظ ان المركب Benzo[h] quinolone,2,4-dimethyl لم يكن موجودا في كالس معاملة المقارنة وبدأ بالظهور في بقية تراكيز الكوليسترول حيث سجلت اعلى نسبة له في التركيز 150ملغم/لتر والبالغة 2.722%. ولوحظ كذلك ان المركبين [1,2,4] Triazolo[1,5-a] pyrimidine-6-carboxylic acid,4,7-dihydro-7-imino-,ethyl ester و 2-Ethylacridine لم يتواجدا في معاملتي المقارنة والتركيز 150ملغم/لتر وظهرا بنسب مختلفة في بقية التراكيز ليبلغا اعلى النسب وهي 3.578 و1.045% على التوالي عند معاملة التركيز 50ملغم/لتر كما أظهرت المركبات Melamine,tris(trim ethyl silyl) derivative و Bytanoic acid ,3-oxo-2(phenyl و Hexa methylene)-,ethyl ester و hydropyridine,1-methyl-4-[4,5-dihydroxy -[phenyl و Methadone N-oxide بتصنيع جديد في التراكيز 50 و 150ملغم/لتر على التوالي.

Table(3):Effect of cholesterol concentrations on percrntage of Alkaloids(%)extracted from T.neriifolia callus analyzed by GC-MS

جدول (3): تأثير تراكيز الكوليسترول (ملغم/لتر) في النسبة المئوية للمركبات الثانوية-القلويدات (%)المستخلصة من كالس نبات الدفلة الصفراء *T.neriifolia* والمشخصة بجهاز GC-MS

ت	المركبات الثانوية secondary compounds	الكوليسترول (ملغم/لتر) cholesterol				
	القلويدات(%)	0.0	50	100	150	200
1	Aziridene	0.221				
2	(4-Oxo-4H-quinazolin-3-yl)acetic acid,methyl ester	0.070				
3	3-N-Nitroso-Solanocapsine	0.138				
4	Adamantane-1-(3,3-dichloropropyn-1-yl)	0.186				
5	7-chloro-2-cyclohexyl-4-[3H]quina zoline	0.253				
6	1,3,5-Triazine,4,6-bis(2,2,2-trifluoro-1-trifluoro methyl ethoxy-2-propyl amino	0.358				
7	Pyrrolo[2,3-b]indole,1,2,3,3a,8,8a-hexa hydro-5-methoxy-3a,8-dimethyl	1.852	0.592	15.152		2.643
8	Benzo[h]quinoline,2,4-dimethyl		1.700	0.191	2.722	1.956
9	Melamine,tris(trim ethylsilyl)derivative				0.208	
10	Butanoic acid,3-oxo-2(phenyl methylene)-,ethyl ester		0.856			
11	Hexa hydropyridine,1-methyl-4-[4,5-dihydroxy phenyl]-		0.502			
12	[1,2,4]Tri azolo[1,5-a]pyrimidine-6-carboxylic acid,4,7-dihydro-7-imino-,ethyl ester		3.578	1.770		1.547
13	2-Ethyl acridine		1.045	0.334		0.229
14	5-Methyl-2-phenyl indolizine		4.354	0.817	0.276	
15	8-Amino-2,6-dimethoxylepidine			7.509		
16	Pyrrolidine butanoic acid,2-[(1,1-dimethyl ethoxy)carbonyl]-.alpha.nitro-,2,6-bis(1,1-dimethyl ethyl)-4-methoxy phenyl ester[S-(R*,R*)]-			0.705	0.443	
17	Corydaldine			0.245		
18	1,2,5-Oxadiazol-3-amine,4-(4-methoxy phenoxy)-			0.145		0.230
19	N-N-Dimethyl-4-nitroso-3-(trim thylsilyl)aniline			0.136		
20	Methadone N-oxide				0.784	

واوضحت نتائج الجدول(4) تأثير تركيز الكوليسترول في النسبة المئوية للتربينات المختلفة المستخلصة من كالس نبات الدفلة الصفراء, اذ كان المركب التربيني alpha-Amyrin هو السائد في معاملات جميع التراكيز وكانت اعلى نسبة له عند معاملة المقارنة والبالغة 15.638%, في حين كانت متقاربة عند التراكيز 50 و100 و150ملغم/لتر (10.412 و11.446 و10.499% على التوالي), وانخفضت هذه النسبة عند معاملة التركيز 200ملغم/لتر. فضلا عن ذلك, فقد كان المركب Urs-12-en-3-ol,acetate,(3.beta.) سائدا في جميع المعاملات باستثناء معاملة التركيز 150ملغم/لتر, وشكل اعلى نسبة

له عند معاملة المقارنة والبالغة 18.641%. وظهرتصنيع المركب التربيني beta-Amyrin بأعلى نسبة مئوية بلغت 15.152% عند معاملة التركيز 100% لتنخفض بعد ذلك في معاملتي التركيزين 150 و200ملغم/لتر (6.005 و5.258% على التوالي), في حين لم يظهر هذا المركب عند معاملتي المقارنة والتركيز 50ملغم/لتر من الكوليسترول في حين ظهر تصنيع جديد للمركب Cyclo butan,1,2-diphenylفي معاملة التركيز 50ملغم/لتر فقط حيث بلغت نسبته 0.333%. ولم يظهر هذا المركب في المعاملات الأخرى.

Table(4):Effect of cholesterol concentrations on percrntage of Terpenes(%)extracted from T.neriifolia callus analyzed by GC-MS

جدول (4): تأثير تراكيز الكوليسترول (ملغم/لتر) في النسبة المئوية للمركبات الثانوية-التربينات(%)المستخلصة من كالس نبات الدفلة الصفراء *T.neriifolia* و المشخصة بجهاز GC-MS

ت	المركبات الثانوية secondary compounds	الكوليسترول cholesterol (ملغم/لتر)				
	التربينات(%)	0.0	50	100	150	200
1	2-Methyl-cis-7,8-epoxy nonadecane	0.188				
2	9-Undecen-2-one,6,10-dimethyl-	0.150				
3	alpha-Amyrin	15.638	10.412	11.446	10.499	8.960
4	Urs-12 en-3-ol,acetate,(3.beta)	18.641	6.014	1.180		5.363
5	5H-3,5a-Epoxy naphth[2,1-c]oxepin,dodecahydro-3,8,8,11a-tetra methyl-,[3S-(3.alpha.5a.alpha.,7a.alpha.,11a.beta.,11b.alpha.)]	0.070		6.407		
6	trans-Geranyl geraniol	1.046				
7	A-Neogammacer-22(29)-en-3-ol,acetate (3.beta.,21.beta.),	1.802				1.527
8	Cyclo butan,1,2-diphenyl-		0.333			
9	Urs-12-en-24-oic acid,3-oxo-methyl ester		3.381	1.822		2.881
10	Silane	0.101	4.940	0.705	0.498	
11	beta.-Amyrin			15.152	6.005	5.258
12	Lup-20(29)-en-3-ol,ester,(3.beta.)	1.802				1.712

واشارت نتائج الجدول(5) الى تأثير تراكيز الكوليسترول في المركبات الفينولية المستخلصة من الكالس النامي على هذه التراكيز,أذ ظهر المركبان 1H-Indole,2-methyl-3-phenyl- و 1H-Indole,5-methyl-2-phenyl- في معاملات التراكيز 50 و100 و150ملغم/لتر من الكوليسترول, اذ كانت اعلى نسبة لتواجد المركب الاول والبالغة 1.041% عند معاملة التركيز 50ملغم/لتر وللمركب الثاني بلغت 0.784% عند معاملة التركيز 150ملغم/لتر, في حين لم يظهر كلا المركبين في معاملتي المقارنة والتركيز 200ملغم/لتر وظهر المركب Cyclopenteno[4,3-b] tetra hydro furan لأول مرة في معاملة التركيز50 ملغم/لتر وبنسبة بلغت 1.357% وهو المركب الوسطي لتصنيع حامض الاسكوربك (فيتامين C). كما ساد المركب 1H-Indol,2-methyl-3-phenyl في معاملات التراكيز 50 و100 و150 ملغم/لتر وبنسب 1.041 و 0.817 و0.751% على التوالي حيث انخفضت هذه النسب بزيادة التركيز ولم يتواجد هذا المركب في معاملة المقارنة والتركيز 200ملغم/لتر, وكذلك الحال بالنسبة للمركب 1H-Indole,5-methyl-2-phenyl- .

Table(5):Effect of cholesterol concentrations on percrntage secondary compounds of Phenols(%)extracted from T.neriifolia callus analyzed by GC-MS

جدول (5): تأثير تراكيز الكوليسترول(ملغم/لتر) في النسبة المئوية للمركبات الثانوية- الفينولات(%)المستخلصة من كالس نبات الدفلة الصفراء *T.neriifolia* والمشخصة بجهازGC-MS

ت	المركبات الثانوية secondary compounds	الكوليسترول cholesterol (ملغم/لتر)				
	الفينولات (%)	0.0	50	100	150	200
1	Benzo(b)naphtho(1,2-d)furan	18.641				
2	Indeno[2,1-b]Chromene	10.715				
3	2,6,10,14,18-Pentamethyl-2,6,10,14,18-eicosa pentane	1.046				
4	2,3,4-Tri methoxy phenyl acetonitrile	0.186				
5	2-Myristynoyl-glycin amid	0.253		0.166		
6	Bis phenol,bis(tert-butyl dimethylsilyl) Ether	0.358	4.946			
7	1H-Indole,2-methyl-3-phenyl-		1.041	0.817	0.751	
8	1-Benzazirene-1-carboxylic acid,2,2,5a-trimethyl-1a-[3-oxo-1-butenyl]Perhydro-,methyl ester		0.539			
9	Cyclo penteno[4,3-b]tetra hydro furan		1.357			
10	Valeric acid	0.292				
11	Benzeneacet acid.alpha.3,4-tris[(tri methylsilyl)oxy]-,tri methylsilyl ester			0.229		
12	Phenol,2;2-methyl enebis[1,1-dimethyl ethyl)-4-methyl-			0.426	0.118	
13	1H-Indole,5-methyl-2-Phenyl-		0.535	0.334	0.784	
14	1,2-Benzene dicarboxylic acid,mono					
15	(2-ethyl hexyl)ester			0.353		
16	(E)-2-bromobutylox chalcone			0.205		

وبينت نتائج الجدول(6) وجود تأثير لتراكيز الكوليسترول في تشجيع تصنيع انواع مختلفة من الاحماض الدهنية واللبيدات المستخلصة من الكالس , اذ تواجد الحامض الدهني غير المشبع Oleic acid في معاملة المقارنة فقط وبنسبة بلغت 0.310%, في حين ساد المركبان Nonacosan و beta-Sitosterol في جميع المعاملات, اذ ازدادت نسبة المركب الاول لتصل الى 5.016% عند معاملة التركيز 50ملغم/لتر من الكوليسترول, وبلغت نسبة المركب الثاني 6.168% عند معاملة التركيز 100ملغم/لتر, تلاهما المركب Supraene الذي ساد في جميع المعاملات باستثناء معاملة التركيز 100ملغم/لتر, اذ بلغت اعلى نسبة لهذا المركب 3.303% عند معاملة التركيز200ملغم/لتر , كما ظهر المركب 12-Oleanen-3-yl acetate,(3.alpha.) بأعلى نسبة له بلغت 9.209% عند معاملة التركيز 100ملغم/لتر وكان هذا المركب سائدا في التراكيز الاخرى باستثناء معاملة التركيز 150ملغم/لتر. وظهرت سيادة للمركب Olean-12-ene في جميع المعاملات باستثناء معاملة التركيز 100ملغم/لتر من الكوليسترول وبلغت اعلى نسبة 22.021% عند معاملة التركيز 150 ملغم/لتر , كما اظهر المركب Octacosane بنسب مئوية بلغت 7.813 و 2.953% في التركيزين 100 و150 ملغم/لتر على التوالي ولم يظهر في معاملة المقارنة والتراكيز الأخرى.

كما كان فيتامين E سائدا ايضا في جميع تراكيز الكوليسترول , وكانت اعلى نسبة لهذا المركب والبالغة 3.268% قد سجلت عند معاملة التركيز 50ملغم/لتر, في حين لم يتواجد هذا الفيتامين في معاملة المقارنة.

Table (6): Effect of cholesterol concentrations (mg / L) in the percentage of secondary compounds - fatty acids and lipids(%) extracted from T.neriifolia callus analyzed by GC-MS

جدول (6): تأثير تراكيز الكوليسترول (ملغم/لتر) في النسبة المئوية للمركبات الثانوية-الأحماض الدهنية واللبيدات(%)المستخلصة من كالس نبات الدفلة الصفراء *T.neriifolia* و المشخصة بجهاز GC-MS

الكوليسترول cholesterol (ملغم/لتر)					المركبات الثانوية secondary compounds	ت
200	150	100	50	0.0	الاحماض الدهنية واللبيدات(%)	
					2-methyl-1-octadecene	1
				0.101	Trichlorodocosyl	2
				0.190	Di(8-chloroocty)ester	3
				0.310	Oleic acid	4
				0.188	Hepta decafluorononanoic acid Tridrcyl ester	5
0.209				0.159	n-Hexadecanoic acid,Hepta decyl ester	6
0.054	0.439	0.983	3.268		Vitamin E	7
0.926				0.150	9-Octadeceneic acid (z)-,methyl ester	8
5.839		9.209	0.340	7.291	12-Oleanen-3-yl acetate,(3.alpha.)	9
0.176	0.022	2.609	5.016	0.963	Nonacosane	10
		1.135	0.188	0.292	Triacontane	11
	2.953	0.430		0.292	Heptacosane	12
		0.346		3.676	Ecosane	13
		4.986			Thiocarbamic acid ,N,N-dimethyl,S-1,3-diphenyl-2-butenyl ester	14
			0.856		Nona hexa contanoic acid	15
3.303	0.213		0.049	1.046	Supraene	16
			0.253		5H-Benzo cycloheptene,6,7-dihydro	17
			0.499		9,19-Cuclolanost-24-en-3-ol,acetate, (3.beta.)-	18
0.357	0.733		0.100		Hexa triacontane	19
0.027	0.081		2.098		Pentatrracontane	20
0.495	0.315	6.168	3.012	2.091	.beta.Sitosterol	21
			3.059	2.544	Taraxasterol	22
5.050	22.021		0.592	4.767	Olean -12-ene	23
		0.800			Cedran-diol,(8s,14)-	24
0.165	0.178				2-methyl hexa cosine	25
	0.804				Tetratriacontane	26
1.137	0.542				5-Cholestene-3-ol	27
	7.870				Spirost-8-en-11-one,3-hydroxy-,3.beta.,5.alpha.,14,beta.,20.beta.,22.beta.,25R)-	28
	2.953	7.813			Octacosane	29

وتبين من نتائج الجدول(7) انخفاض تأثير تراكيز الكوليسترول في النسبة المئوية للمركبات المختلفة , اذ تواجد المركبان Anthracene,9,10-dihydro-9,9-10-trimethyl و Ferrocene,11-(acetylthio)undecyl بأعلى نسبة لهما والبالغة 1.357 و 3.012% على التوالي عند معاملة التركيز 50ملغم/لتر من الكوليسترول, في حين لم يظهر كلا المركبين في المعاملات الاخرى للكالس.

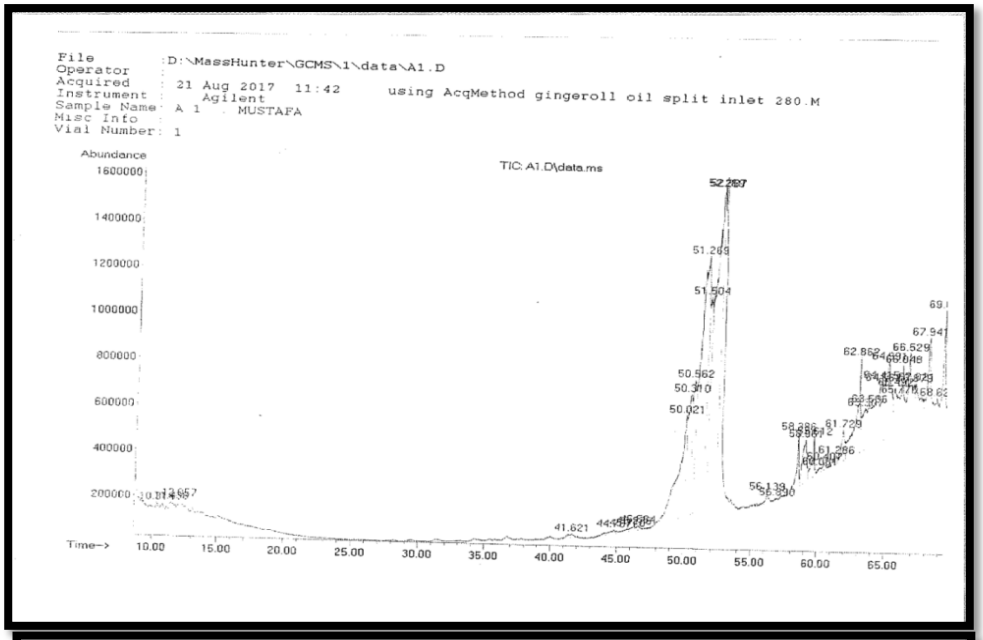
Table(7):Effect of cholesterol concentrations on percrntage of Other secondary metabolites (%)extracted from T.neriifolia callus analyzed by GC-MS

جدول (7): تأثير تراكيز الكوليسترول (ملغم/لتر) في النسبة المئوية للمركبات الثانويةالمختلفة (%)المستخلصة من كالس نبات الدفلة الصفراء *T.neriifolia* و المشخصة بجهاز GC/MS

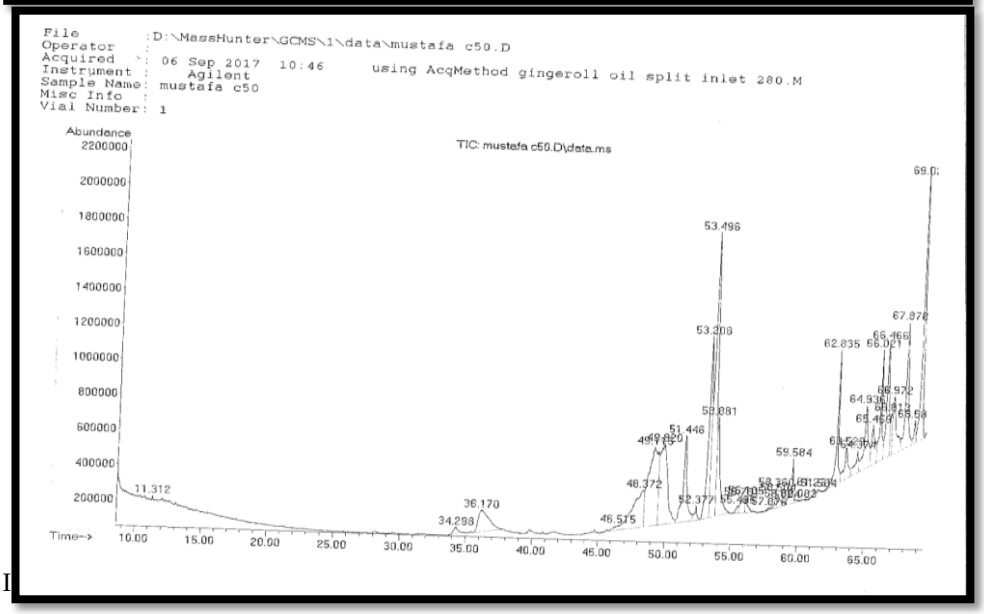
ت	اسم المركب Type of compound	نوعه Type	الكوليسترول (cholesterol) (ملغم/لتر)				
			0.0	50	100	150	200
1	2(hexadecyloxy)-	هيدروكاربون	0.159				
2	Iron	عنصر مغذي	0.976				
3	beta-Alanine,n-pentafluoro propionyl-propyl ester	حامض أميني مرتبط بمجموعة أستر					
4	Anthracene,9,10-dihydro-9,9-10-trimeyhyl	هيدروكاربون متعدد الحلقات		1.375			
5	Cyclo tetrasiloxne, octamethyl	هيدروكاربون					0.045
6	Cyclotrisiloxane,hexamethyl-	هيدروكاربون					
7	Fumaric acid	حامض كاربوكسيلي	0.310	0.502			
8	Phthalic acid	حامض حلقي	0.190		0.078		
9	Ferrocene,11-(acetyl thio)undecyl-			3.012			
10	Octa siloxane,1,1,3,3,5,5,7, 7,9,9,11,11,13,13,15,15-hexa deca methyl-	هيدروكاربون			0.229	0.476	
11	Cyanic acid					0.113	
12	1-Octadecanesul phenyl chloride					0.178	

يتبين مما سبق وجود تأثير مهم لتراكيز الكوليسترول في تحفيز تصنيع المركبات الثانوية في كالس نبات الدفلة الصفراء كالقلويدات والتربينات والفينولات والاحماض الدهنية واللبيدات اذ تؤدي هذه المركبات ادوارا مهمة كمضادات للالتهابات والاحياء المجهرية والسرطان(18)Sheoran *et al.*, 2015, وقد وجد ان تصنيع هذه المركبات يعتمد على توليفة الوسط الغذائي وما يحتويه من منظمات النمو والمحفزات لتشجيع الكالس على تصنيع المركبات الثانوية الفعالة وبنسب مختلفة(19)Iriawati *et al.*,2014. و وجد ان الكوليسترول يشجع تصنيع المركبات الدهنية وبنسب عالية وانواع مختلفة كالأحماض الدهنية غير المشبعة والمشبعة والستيرويدات اذ يدخل كمادة اساس في التصنيع الحيوي لهذه المركبات ومشتقاتها .وتتفق هذه النتيجة مع

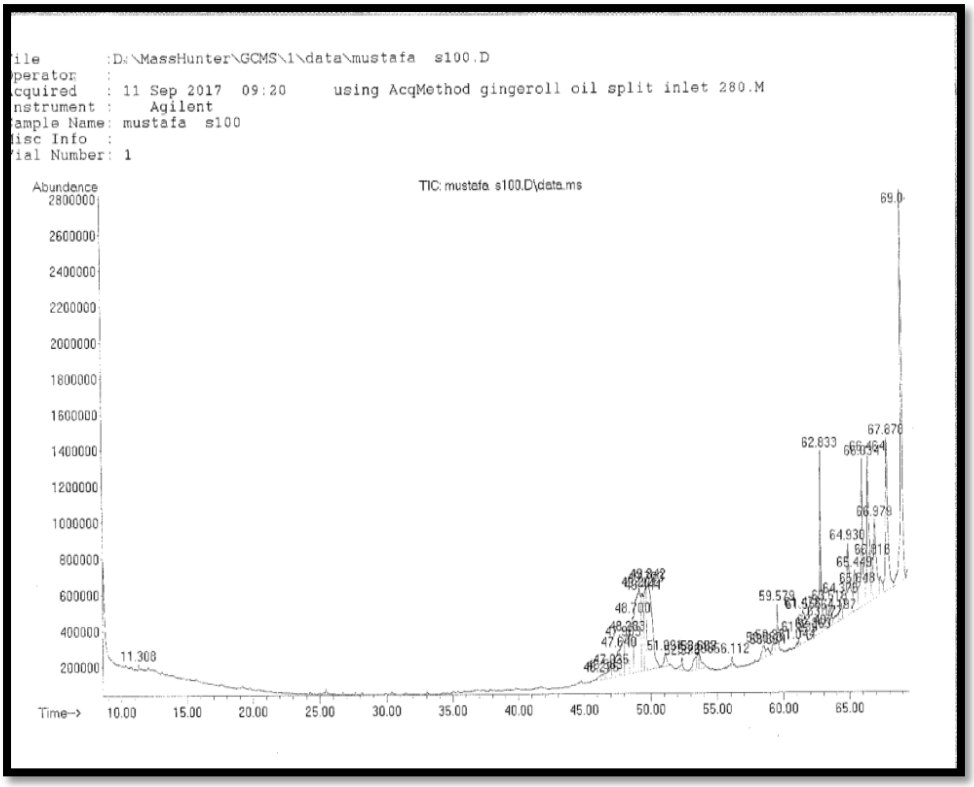
(20)Razeghi et al.,2016. وأشار(21)et al., Christiansen الى أن مركبات الستيرويدات النباتية لها اهمية في المجالات الطبية والتجميلية وتضاف كمكملات غذائية للحد من مستوى الكوليسترول العالي في الدم , وخاصة مركبات beta-Sitosterol والدخول كعامل اساس في تصنيع المركبات الثانوية الأخرى فضلا عن مساهمتها في نقل مجاميع الأسل acyl والسكر والبروتين(22)Balbaa*et al*,2008. ويبين الشكل كروماتوغرافيا المركبات الثانوية المستخلصة من الكالس النامي على التراكيز المختلفة من الكوايسترول



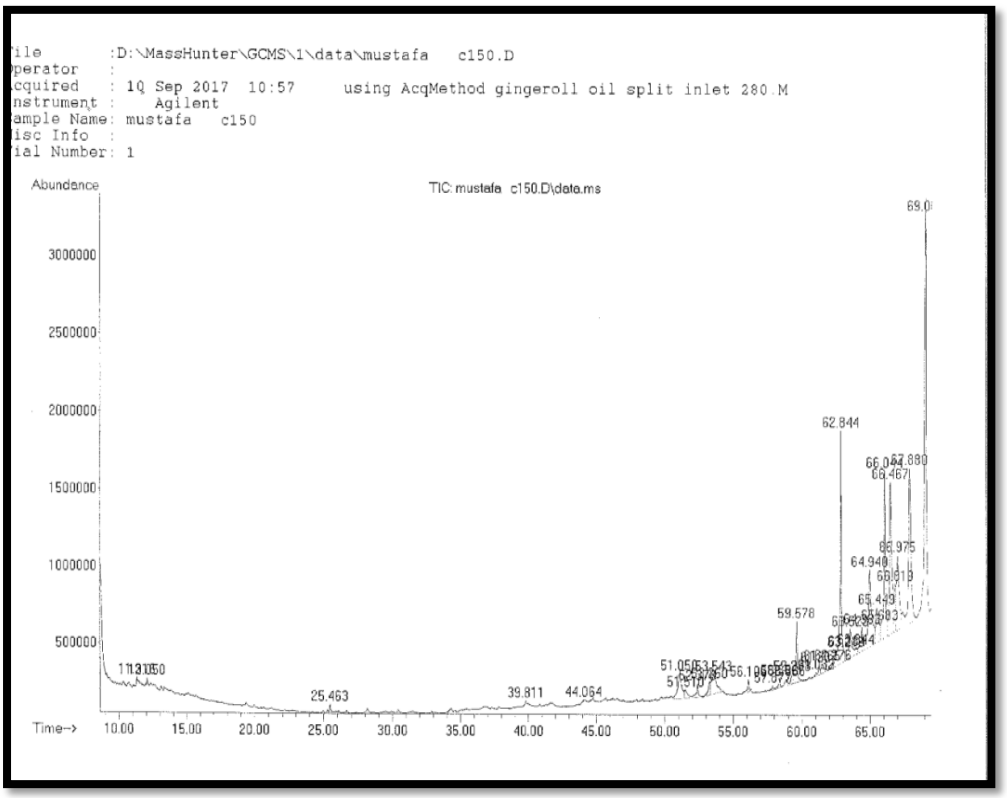
-ا-



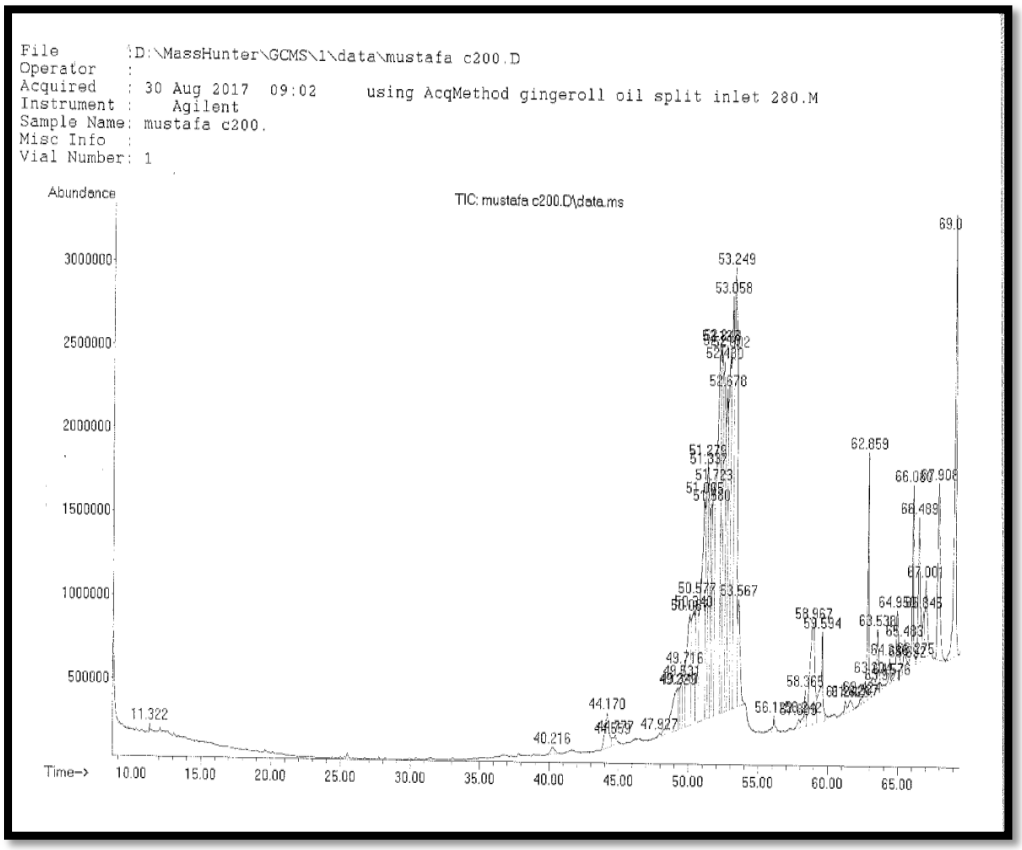
ب


File :D:\MassHunter\GCMS\1\data\mustafa s100.D
Operator :
Acquired : 11 Sep 2017 09:20 using AcqMethod gingeroll oil split inlet 280.M
Instrument : Agilent
Sample Name: mustafa s100
Misc Info :
Vial Number: 1
Abundance
TIC: mustafa s100.D\data.ms
Time-->

ج


File :D:\MassHunter\GCMS\1\data\mustafa c150.D
Operator :
Acquired : 10 Sep 2017 10:57 using AcqMethod gingeroll oil split inlet 280.M
Instrument : Agilent
Sample Name: mustafa c150
Misc Info :
Vial Number: 1
Abundance
TIC: mustafa c150.D\data.ms
Time-->

د



Figure(1): GC-MS Chromato gram of secondary metabolites extracted from callus cultured on different concentrations of cholesterol :a)control b)50mg c)100mg d)150mg e)200mg .

شكل(1) : كروماتوغرام GC-MS Chromatogram للمركبات الثانوية المستخلصة بطريقة الهكسان للكالس النامي على التراكيز المختلفة من الكوليسترول: أ) معاملة المقارنة. ب) التركيز 50ملغم/لتر . ج) التركيز 100ملغم/لتر. د) التركيز 150ملغم/لتر . هـ) التركيز 200ملغم/لتر.

الاستنتاجات

نستنتج من الدراسة الحالية وجود تأثير مهم لتراكيز الكوليسترول في تحفيز انتاج المركبات الثانوية الفعالة من كالس نبات الدفلة الصفراء كمركبات القلويدات مثل Benzo[h]quinoline,2,4-dimethyl والتربينات مثل المركب alpha-Amyrin وفيتامين E و-beta Sitosterol و Nonacosane التي لها اهمية طبية في تصنيع المستحضرات الطبية والاهمية الاقتصادية.

المصادر

1.Joshi,S.G.2000.family Apocynaceae .In:Medicinal plants 1 st Ed.new Delhi,Oxford and IBH publishing company Pvt. Ltd.p.40-51.

2.Kishan,S.;Kumar,A.K. ;Vimlesh, M.; Mubeen,V.S.and Alok,S.(2012). Areviewon: Thevetia peruviana . Int.Res.J. Pharm. ,3(4):74_76.

3.Supinya,T.;Norio;N.Masao,H.;Tamio ,F.andTanomyjit,S.(2002). Flavan one and Flavanol glycosides from the leaves of Thevetia peruviana and their HIV-1 inhibtory activities. Chemical pharmacology Bulletin,50(5):630-635.

4.Chevalliev,A.(1990). The Encyclopedia of Medicinal Plants-A Practical Reference Guide to over 550 Key Herbs and their Medical Uses. D.K. Publishing.

5.Oluwasegun ,A.;Nasiru, A, and John, E.(2015). In vitro antioxidant potential of methanol extracts of Allmanda Schottii Pohl. And Thevetia peruiana (pers.)K.(Apocynaceae. Asian J.Plant Sci. Res.,5(1):10_13.

6.Bose,T.K.; Basu, R.K.; Biswas, B.;De,J.N.;Majumdar, B.C. and Dara, S.(1999). Cardiovascular effects of yallow oleander ingestion. J. Ind.Med .Asso., 97(10):407_410.

7.Misra,M.K.;sarwatM.;Bhakuni,P.;T uteja,R.andTuteja,N.(2009). Oxid ative stress and is chemic myocardial syndromes.Med.Sci.Monit.,15:209 _219.

8.Nesy,E.A.;Padikkala, J. And Mathew, L.(2015). In vitro plant regeneration of Thevetia neriifolia Juss. From in ternode explant via indirect organogenesis.Int.J.Pharm. Pharm,Sci.,7(1):169_172.Obasi N B & Lgboechi A C, Fitoterapia, 62, 1991, 159.

9.Purohit, S. S.(2003). Plant Tissue Culture.Shyam Printing Press, Jodhpur. Pp.153-175.

growth retardant tetcyclacis. Planta, 164(3): 370-375.

16.Schaller, H. (2003). The role of sterols in plant growth and development . Progress. Lipid Res., 42(3): 163-175.

17.Helftman, E. (1971). Functions of sterols in plants. Lipids, 6: 128-133.

18.Sheoran, N.; A.V.,Nadakkakatha; V., Munjal; A., Kundu; K.,Subaharan; V., Venugopal; S., Rajamma; S.J., Eapen and.

19.Irawati, I.; A., Rahmawati and R.R., Esyanti(2014). Analysis of secondary metabolite production in somatic embryo of pasak bumi (*Eurycoma longifolia* Jack). Procedia Chem., 13: 112-118.

20.Razeghi, L.; M., Aziz; S.M., Ziaratnia; A.R., Bagheri and S.H., Nemati (2016). Evaluation in vitro culture of Kelussia odoratissima Mozaff and secondary metabolites production through suspension cultures. Pharm. Innov. J., 5(1): 74-80.

21.Christiansen, L.; M., Karjalainen; T., Seppanen-Laakso; R., Hiltunen and J., Yliruusi (2003). Effects of β-sitosterol on

10.Ramakrishna ,A. And Ravishankar, G.A.(2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. Plant Signal Behav., 6(11): 1720_1731.

11.Dornenburg, H. and D., Knorr.(1995). Strategies for the improvemet of secondary metabolite production in plant cell cultures. Enzyme Microb. Technol., 17: 674-684.

12.Chitturi, D.; R.K., Venisetty; R.K., Molmoori; C.K., Kokate and S.S., Apte (2010). Enhanced bioproduction of withaferin A from suspension cultures of Withania somnifera . Ann. Biol. Res., 1(2): 77-86.Chopra R N.Sci Cult.24,1958,59.

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

14.GenStat. 2012. SAS/Stat User Guide for Personal Computer, SAS Institute Inane Cary, N. C. USA.

15.Grossmann, K.; E.W.,Weiler and J., Jung (1985). Effects of different sterols on the inhibition of cell culture growth caused by the

precipitation of cholesterol from non-aqueous and aqueous solutions. Int. J. Pharm., 254(2): 155-166.

22.**Balbaa, L.K.; G., Nahed; A., Abdel and A.A., Youssef (2008).** Physiological effects of stigmasterol and nicotinamide on growth, flowering, oil yield and some chemical compositions of *Tagetes erecta* L. plant. J. App. Sci. Res., 3(12): 1936-1942.