تأثير التراكيز الملحية في مركبات الايض الثانوي لنبات قرن الغزال *Euphorbia tirucalli* L. خارج الجسم الحي

سهام عبد الرزاق سالم **محمد يحيى احمد**

الكلية التقنية/ المسيب **مديرية زراعة النجف**

الخلاصة

اجري البحث الحالي في مختبر زراعة الانسجة النباتية التابع لقسم تقنيات الانتاج النباتي في الكلية التقنية / المسيب ومختبرات وزارة العلوم و التكنلوجيا خلال الفترة 2014-2015 بهدف دراسة تأثير الملوحة في انتاج بعض مركبات الايض الثانوي في المزارع النسيجية لنبات قرن الغزال *Euphorbia tirucalli* L. . تم الحصول على الكالس بزراعة سلاميات النبات على وسط MS الحاوي على منظمات النمو 2,4-D بتركيز 1.0 ملغم/لتر و BA بتركيز 0.5 ملغم /لتر، وهي التوليفة المثالية في اعطاء اعلى نسبة للكالس. تم اعادة زراعة كالس بوزن 250ملغم على نفس التوليفة اعلاه مضافا اليها ملح كلوريد الصوديوم NaCl بالتراكيز 0.0 و50 و100 و200 ملي مولر. تم تقدير الوزنين الطري والجاف ومحتوى البرولين والسكريات الذائبة ، كما قدرت المركبات الفينولية (الكويرستين والميرستين وحامض الكلوروجنك) في الكالس المزروع على التراكيز الملحية المختلفة باستعمال جهاز HPLC وقورنت مع عينات النبات الاصل. بينت النتائج وجود فروقات معنوية بين المعاملات المختلفة حيث اثرت الملوحة سلبا في خفض الوزن الطري والجاف للكالس مع فقدان الكالس لحيويته في التركيز الملحي 200ملي مولر. وتفوقت معاملتي التركيزين الملحيين 50 و100 ملي مولر في محتوى البرولين(0.93 و0.90 ميكرو مول/غم وزن طري على التوالي)، وانخفض محتوى السكريات الذائبة معنويا بزيادة التراكيز الملحية. كما اظهرت النتائج تأثير الملوحة في محتوى الكالس من مركبات الايض الثانوي، اذ تفوقت معاملة التركيز الملحي 50ملي مولر معنويا في محتوى مركب الكويرستين والبالغ 1.90ميكرو غم/ غم وزن جاف. في حين لم يختلف محتوى الميرستين معنويا بين معاملتي المقارنة والملوحة 50 ملي مولر(2.41 و2.06 ميكرو غم/ غم وزن جاف على التوالي). وتفوقت معاملة المقارنة على المعاملات الاخرى في محتوى الكالس من حامض الكلوروجنك (43.67 ميكرو غم/غم وزن جاف). وكان للتركيز الملحي 200 ملي مولر تأثير سلبي في محتوى الكالس من المركبات الثانوية اعلاه.

Effect of salinity on secondary metabolites of deer horn plant

(*Euphorbia tirucalli* L.) *in vitro*

Siham Abd Al-Razzaq Salim **Mohammad Yahya Ahmed**

Al-Musaib Technical College **Agricultur Directorate of Najaf**.

Abstract

The present research was conducted to evaluate the effects of salinity on *in vitro* production of phenolic compounds(quercetin, myricetin and chlorogenic acid) in plant *Euphorbia tirucalli* L. Callus which was induced by planting internod on MS medium supplied with plant growth regulators 2,4-D at 1.0 mg/L and BA at 0.5 mg/L . About 250 mg of callus was subjected to different concentrations of NaCl included: 0.0, 50, 100 and 200 mM in MS medium with the same concentrations of growth regulators above. Fresh and dry weights, contents of proline and soluble sugars were determined. The quality of phenolics (quercetin, myricetin and chlorogenic acid) were estimated in extracts of callus and original plant using HPLC technique. Significant differences were reported among different treatments where salinity had negative effect on reduced fresh and dry weights of callus with losing of callus viability on 200 mM of NaCl. The highest proline content was observed in salinity treatments 50 and 100 mM(0.93 and 0.90 µmole/g fresh weight respecpectivety), whereas the content of soluble sugars was reduced significantly with high levels of salinity. Maximum content of quercetin(1.90 µg/g dry weight) was shown under salt concentration 50 mM. No significant difference was observed in myricetin content between control and 50 mM treatments(2.41 and 2.06 µg/g dry weight respectively). The highest level of chlorogenic acid was observed in control (43.67 µg/g dry weight) compared with other salinity concentrations. Results showed that the salt concentration 200 mM had negative effects on all above contents in callus.

* البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الثاني

المقدمة

يعود نبات قرن الغزال *Euphorbia tirucalli* L. الى العائلة الحليبية (السحلبيـة) Euphorbiaceae وهو من النباتات العصارية التي تعيش في المناطق الاستوائيـة وشبـه الاستوائية في شرق افريقيا وجنوب امريكا واسيا والهند (Webster, 1994). ولهذا النبات تسميات مختلفة منها قرن الغزال والفربيون وشجيرة الاقلام وشجيرة الحليب ونبات النفط ، وهو نبات زينة شجيري تكون افرعه خضراء اسطوانية الشكل تحمل اوراقا قليلة وصغيرة جدا تتساقط بصورة مبكرة كما يحتوي على مادة حليبية تنتج عند قطع او جرح النبات (Vander-Velde, 2003). يستخدم هذا النبات في العلاجات التقليدية ضد امراض الربو والاكزيما والمفاصل ومعالجة السرطان ، فضلا عن كونه مصدرا مهما لإنتاج الفيتامينات والمركبات الطبية والمبيدات الحشرية (Wu *et al.*, 1991).

تعد مركبات الايض الثانوية Secondary metabolites compounds جزءا من مركبات النباتات الطبية وتكون ذات وظائف غير مباشرة في نموها وتكون ذات قيمة اقتصادية عالية لدخولها في صناعة العقاقير والعطور والمطيبات الغذائية والاصباغ فضلا عن اهميتها في تعايش النبات ضمن بيئته لدخولها في الدفاع ضد الكائنات الممرضة (Verpoorte *et al.*,2002 ; Jahan *et al.*, 2013) . ولأهمية هذه المركبات الفعالة فقد اتجهت بعض الدول الى استعمال التقنيات الحديثة لزراعة الأنسجة خارج الجسم الحي لزيادة انتاج هذه المركبات من بعض النباتات الطبية ، اذ تمتاز هذه المركبات باستقرار عالي وفعالية بيولوجية عالية مقارنة بالمركبات الصناعية فضلا عن امكانية انتاجها على مدار السنة دون التقيد بموسم النمو الذي ينتج فيه ذلك المركب الفعال (Lila, 2005 ; Mahash, 2008 ; Jain *et al.*, 2012) . ونظرا للدور الذي يلعبه الاجهاد الملحي في تغيير المسارات البنائية للعديد من مركبات الايض الثانوية ومنها المركبات الفعالة طبيا فقد جرى الاهتمام في السنوات الاخيرة حول توظيف زراعة الخلايا والانسجة لإنتاج هذه المركبات تحت تأثير الاجهاد الملحي لملاحظة تأثيراته في زيادة تراكم او نقصان في انتاج هذه المركبات (Yazici *et al.*, 2007 ; Xu *et al.*, 2015) .

ولأهمية هذه المركبات الفعالة في نبات قرن الغزال فقد هدف البحث الحالي الى دراسة تأثير الاجهاد الملحي في تكوين المركبات الثانوية الفعالة في النبات باستعمال تقانة المزارع النسيجية، فضلا عن الكشف نوعا وكما عن هذه المركبات عن طريق تقنية التحليل الكروماتوغرافي بواسطة جهاز كروماتوغرافيا السائل ذي الاداء العالي High Performance Liquid Chromatography (HPLC) .

المواد وطرائق العمل

أجريت هذه التجربة في مختبر زراعة الانسجة النباتية التابع لقسم تقنيات الانتاج النباتي في الكلية التقنية / المسيب ومختبرات وزارة العلوم و التكنلوجيا خلال الفترة 2014-2015

تحضير الوسط الغذائي : حضر الوسط الغذائي MS (Murashige and Skoog, 1962) مختبريا بسحب الكميات المناسبة من محاليل الاصل للعناصر الكبرى والصغرى و الحديد والفيتامينات. واضيف السكروز بمقدار 30غم/لتر وعُدِلت الدالة الحامضية pH للوسط الى 5.7 ± 0.1 بإضافة بضع قطرات من محلول هيدروكسيد الصوديوم او حامض الهيدروكلوريك (0.1 عياري)، ثم اضيف الاكار بمقدار 7.0غم/لتر، ووزع الوسط في قناني زجاجية (3 × 15 سم) وبواقع 20مل/قنينة.

استحثاث الكالس : استعملت السلاميات لنبات قرن الغزال اذ جرى تعقيمها باستعمال هايبوكلورات الصوديوم(3%) لمدة 15دقيقة ، ثم غسلت بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات، وزرعت على وسط MS الحاوي على التوليفة 2,4-Dبتركيز 1.0ملغم/لتر و BA بتركيز 0.5ملغم/لتر والتي كانت الافضل في اعطاء اعلى نسبة من كالس قرن الغزال في تجربة سابقة .

اختبار تراكيز مختلفة من كلوريد الصوديوم NaCl : بعد الحصول على كميات كافية من الكالس ، أخذت اوزان مقدارها (250ملغم) وزرعت على اوساط غذائية جديدة حاوية على التوليفة المناسبة لاستحثاث وادامة الكالس اعلاه مضافاً اليها كلوريد الصوديوم بتراكيز 0.0 و50 و100 و200 ملي مولر. بعدها تم حساب الوزن الطري والجاف للكالس ثم قدرت مركبات البرولين والسكريات الذائبة والمركبات الثانوية الفعالة في الكالس النامي تحت تأثير الاجهاد الملحي.

تحضير مستخلصات النبات الاصل وكالس قرن الغزال: تم تجفيف الكالس والنبات الاصل كلا على حدة وطحن وتم استخلاصه بطريقة الاستخلاص الكحولي البارد باستعمال كحول الايثانول المطلق بنسبة 1:10 ، وزن :حجم، كالس او نبات :كحول ، وحضن بدرجة حرارة 25 ±2°م في حاضنة معقمة ومظلمة لمدة يومين، ثم رشح وحفظ (Hussain *et al.*, 2011)

التقدير الكمي لبعض المركبات الفينولية في النبات الاصل وكالس قرن الغزال تحت الاجهاد الملحي: استعمل جهاز كروماتوغرافيا السائل ذي الاداء العالي HPLC نوع Shimadzu-Germany 2004 في تقدير كمية المركبات الفينولية الكويرستين quercetin والميرستينmyricetin وحامض الكلوروجنكchlorogenic acid وكالاتي:

تقدير مركبات الكويرستين والميرستين : اتبعت طريقة Kulevanova وآخرون(2002) في تقدير مركبات الكويرستين والميرستين في عينات النبات الاصل وكالس قرن الغزال تحت تاثير الاجهاد الملحي ، حيث نقل 25مل من مستخلص النبات والكالس الى قمع الفصل واضيف له 50مل ماء مقطر واستخلص بواسطة خلات الاثيل لثلاث مرات (15 مل لكل مرة) ثم جمع المستخلص وغسل بـ 50مل ماء مقطر ثم جففت مع كبريتات الصوديوم اللامائية ورشحت وبخرت لتجف تحت ضغط منخفض . بعدها حولت الى محلول بإضافة 10مل من الميثانول لها لتقدير الكويرستين والميرستين حيث حقن 20 ميكرو ليتر من النموذج في جهاز HPLC ذي الظروف التالية: الطور الصلب نوع C18 بأبعاد (4.6 × 250 ملم وحجم الدقائق

5مايكرومتر)، والطور المتحرك المتكون من حامض الخليك والسيناميك(30:70) وبسرعة جريان 1مل/ دقيقة وبدرجة حرارة 30 ºم وبطول موجي 275 نانومتر وبوقت 30 دقيقة. تم تعيين تراكيز المركبات الفعالة كما بمقارنة مساحة حزمة المركب القياسي مع مساحة حزمة النموذج تحت الظروف نفسها باستخدام القانون الاتي:

تركيز المركب المجهول =(مساحة حزمة النموذج/مساحة حزمة المركب القياسي) ×تركيز المركب القياسي × عدد مرات التخفيف

تقدير الحامض الفينولي الكلوروجنك: اتبعت طريقة Wanyika وآخرون(2010)، وذلك بأخذ 10 ميكرو لتر من الراشح وخفف بـ 900 ميكرو لتر من الماء المقطر الخالي من الايونات نوع Water HPLC grade ، ثم حقن 20 ميكرولتر من النموذج في جهاز HPLC ذي الظروف: الطور الصلب نوع C18 بأبعاد (4.6 × 250 ملم وحجم الدقائق 5 ميكرومتر)، والطور المتحرك يتكون من نسبة حجمية من Water grade: acetic acid: methanol (200 :1 :799 مل)، وبمعدل جريان 1مل/دقيقة وبدرجة حرارة 40ºم وطول موجي 278نانومتر. تم تعيين تراكيز حامض الكلوروجنك كميا بمقارنة مساحة حزمة المركب القياسي مع حزمة النموذج تحت الظروف نفسها باستعمال القانون المذكور اعلاه.

التحليل الاحصائي: تم تحليل النتائج احصائيا وفق التصميم العشوائي الكامل Completely Randomized Design (CRD) وقورنت الفروقات المعنوية بين المتوسطات باختبار اقل فرق معنوي(LSD)Least Significance Difference وبمستوى احتمالية 0.05 (SAS, 2004).

النتائج والمناقشة

تأثير الملوحة في الوزنين الطري والجاف لكالس قرن الغزال في الوسط الغذائي MS:

أظهرت نتائج الجدول(1) التأثيرات السلبية للتراكيز الملحية لكلوريد الصوديوم في معدلات الوزنين الطري والجاف للكالس، اذ اعطت معاملة المقارنة اعلى معدل للوزن الطري بلغ 672.41 ملغم والذي لم يختلف معنويا عن التركيزين الملحيين 50 و100 ملي مولر واللذين اعطيا 520.58 و478.64 ملغم على التوالي مقارنة بالتركيز 200 ملي مولر. كما كان للملوحة تأثير معنوي في خفض معدلات الوزن الجاف للكالس، اذ تفوقت معاملة المقارنة والتركيز الملحي 50 ملي مولر باعطائهما اعلى معدل للوزن الجاف بلغ 46.48 و 40.43 ملغم على التوالي مقارنة بالتركيزين 100 و200 ملي مولر. يعد قياس الوزن الطري والجاف للكالس او الخلايا النباتية مؤشرا على نمو الخلايا والنباتات كاستجابة للإجهادات البيئية المحيطة بها. وإن الانخفاض الحاصل في معدلات هذين الوزنين مع ارتفاع تراكيز كلوريد الصوديوم في الوسط الغذائي يشير الى انخفاض او تثبيط قابلية امتصاص الماء من قبل الخلايا المعرضة للإجهاد الملحي وبالتالي حصول تراكم للأملاح في الخلايا مسببا تشوهها او موتها (Sharma and Ramawat, 2013; Borgongnone *et al.*, 2014; Ni *et al.*, 2015).

تأثير الملوحة في محتوى البرولين والسكريات الذائبة في الكالس المعرض للإجهاد الملحي:

تشير النتائج في الجدول (2) الى ان محتوى البرولين في النبات الاصل(0.51ميكرو مول/ غم وزن طري) كان الاكثر انخفاضا عن بقية معاملات الكالس. وسجلت معاملتي الملوحة 50 و100 ملي مولر تفوقا معنويا في رفع محتوى الكالس من البرولين والذي بلغ 0.93 و0.90 ميكرومول/ غم وزن طري على التوالي، في حين انخفض محتوى البرولين عند معاملة التركيز 200 ملي مولر ليبلغ 0.56 ميكرو مول/ غم وزن طري، مما يشير الى ان مدى تحمل كالس قرن الغزال من الملوحة لا يتعدى 100 ملي مولر. ان زيادة تراكم البرولين قد تكون ناجمة عن الاختلاف في التوازن الازموزي داخل الخلية اذ يزداد انتاج هذا الحامض من قبل الانسجة المعرضة للملوحة لتعديل الازموزية بين الفجوة والسايتوبلاوم (Kavi-Kishore *et al.*, 2005)، فضلا عن زيادة قابلية الخلايا على سحب الماء من الوسط الغذائي الملحي لتخفيف سمية الايونات المرتبطة بالأضرار الناجمة عن الملوحة العالية (Munns and Tester, 2008; Ni *et al.*, 2015) . كما تشير نتائج الجدول ذاته الى التأثير السلبي للملوحة في خفض محتوى الكالس من السكريات الذائبة، اذ اعطت معاملة المقارنة اعلى محتوى للكالس من السكريات الذائبة بلغ 3.19 ملغم/غم وزن جاف مقارنة بالانخفاض التدريجي في المحتوى السكري بتأثير التراكيز الملحية 50 و100 و200 ملي مولر والتي اعطت 2.77 و2.08 و1..45 ملغم/غم وزن جاف على التوالي، في حين يلاحظ ان محتوى النبات الاصل من السكريات الذائبة بلغ 3.13 ملغم/غم وزن جاف والذي لم يختلف معنويا عن محتواها في كالس معاملات المقارنة والملوحة بالتركيزين 50 و100 ملي مولر. تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ماذكرته الحميشي (2007) من قلة محتوى بذور صنفين من البزاليا من السكريات الذائبة مع زيادة الملوحة في ماء الري ومع Jasim وآخرون (2010) في كالس نخيل التمر المعرض للإجهاد الملحي، في حين سلكت سلوكا معاكسا لما ذكره عدد من الباحثين حول زيادة تراكم السكريات في انسجة كالس النباتات التي قاموا بدراستها مع زيادة تركيز الملوحة في الوسط الغذائي (Libal-Waksler *et al.*, 1994; Sharma and Ramawat, 2013; Al-Athary, 2015) . ان هذا الانخفاض في محتوى السكريات الذائبة قد يعود الى ان زيادة مستوى الملوحة في الوسط الغذائي يؤثر في ايض الخلية وبذلك تزداد سرعة التنفس، فضلا عن استهلاك جزء كبير من الطاقة التنفسية في عملية التكيف الازموزي للأنسجة بدلا من استعمالها في عملية النمو مما يؤدي الى زيادة تدفق الجذور الاوكسيجينية الحرة التي تثبط فعالية الانزيمات مما يؤثر سلبا في النمو وهذا من شأنه ان يقلل من انتاج السكريات (Parida and Das, 2005; Ni *et al.*, 2015).

التقدير الكمي لمحتوى الكالس من المركبات الفينولية الفعالة تحت تأثير الإجهاد الملحي بواسطة جهاز HPLC:

أشارت النتائج في جدول (3) والشكل (1 و 2) الى تأثير الملوحة في المركبات الفينولية (الكويرستين والميرستين وحامض الكلوروجنك)، اذ كان هناك تأثير معنوي و إيجابي للملوحة في زيادة تراكم المركب الفعال الكويرستين ، حيث

وصلت الزيادة الى 1.90 ميكروغم/غم وزن جاف عند تركيز 50 ملي مولر مقارنة بمعاملة المقارنة (1.44 ميكروغم/غم وزن جاف)، في حين انخفض هذا المحتوى عند ارتفاع التركيز الملحي الى 100 ملي مولر(0.91ميكروغم/غم وزن جاف)، فضلا عن فقدان الكالس لحيويته عند تعرضه للتركيز الملحي 200 ملي مولر فلم يسجل اي تركيز للكويرستين، مما يشير الى ان الحدالذي يتحمله الكالس من الإجهاد الملحي في انتاج الكويرستين لا يتعدى 50 ملي مولر. وأظهرت نتائج الجدول ذاته ان اجهاد الكالس بالتراكيز الملحية اعلاه قد أثر سلبا في انتاج المركب الفعال الميرستين، اذ سجلت معاملة المقارنة اعلى تركيز بلغ 2.41 ميكروغم/غم وزن جاف والذي لم يختلف معنويا عن محتواه في النبات الاصل (2.37 ميكروغم/غم وزن جاف) مقارنة بما سجلته التراكيز الملحية (50 و100 و200 ملي مولر) من محتوى للميرستين بلغ 2.06 و1.10 و0.0 ميكروغم/غم وزن جاف على التوالي. لقد اشارت الدراسات السابقة الى ان الإجهاد الملحي يؤدي إما الى زيادة محتوى المركبات الفينولية ومنها الكويرستين وذلك لزيادة الفعالية المضادة للاكسدة لمنع الضرر الحاصل نتيجة لتعرض الخلايا النباتية للإجهاد الملحي (Parida and Das, 2005; Tattini *et al.*, 2006) ، او الى انخفاض في محتوى هذه المركبات نتيجة للمستويات المختلفة من الملوحة التي ريما تؤثر سلبا في التصنيع الحيوي لبعض المركبات الثانوية الفعالة (Daneshmand *et al.*, 2010).

جدول(1): تأثير تراكيز مختلفة من الملوحة في معدل الوزن الطري والجاف(ملغم) لكالس نبات قرن الغزال (*E. tirucalli* L.) المزروع على الوسط الغذائي MS بعد اربعة اسابيع من الزراعة(الوزن الابتدائي 250 ملغم)

معاملات الملوحة (ملي مولر)	الوزن الطري (ملغم)	الوزن الجاف (ملغم)
0.0	672.41	46.48
50	520.58	40.43
100	478.64	30.48
200	305.80	21.28
LSD(0.05)	**214.61**	**18.57**

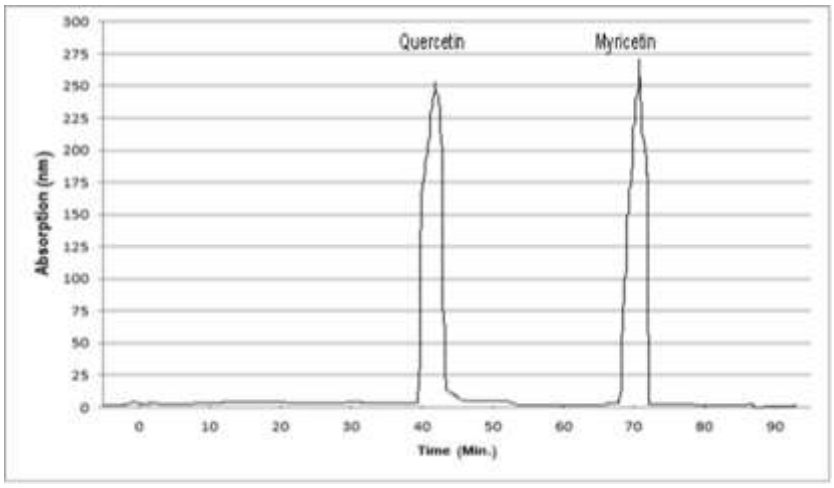
جدول (2): تأثير تراكيز مختلفة من الملوحة في محتوى البرولين والسكريات الذائبة في كالس نبات قرن الغزال (*E. tirucalli* L.) المزروع على الوسط الغذائي MS

معاملات الملوحة (ملي مولر)	محتوى البرولين (ميكرو مول/ غم وزن طري)	محتوى السكريات الذائبة (ملغم/ غم وزن جاف)
النبات الاصل	0.51	3.13
0.0	0.79	3.19
50	0.93	2.77
100	0.90	2.08
200	0.56	1.45
LSD(0.05)	**0.27**	**1.27**

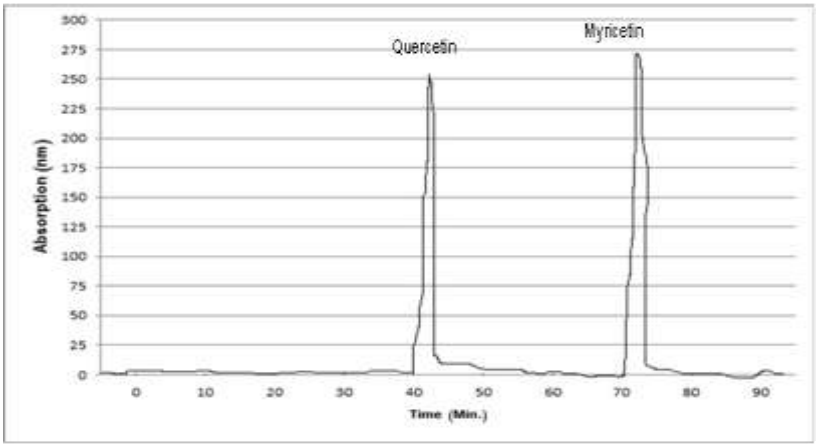
جدول(3): تأثير تراكيز مختلفة من الملوحة في محتوى المركبات الفينولية (الكويرستين والميرستين وحامض الكلوروجنك) في كالس نبات قرن الغزال (*E. tirucalli* L.) المزروع على الوسط الغذائي MS

معاملات الملوحة (ملي مولر)	محتوى الكويرستين (ميكروغم/غم وزن جاف)	محتوى الميرستين (ميكروغم/غم وزن جاف)	محتوى حامض الكلوروجنك (ميكروغم/غم وزن جاف)
النبات الاصل	1.35	2.37	40.63
0.0	1.44	2.41	43.67
50	1.90	2.06	17.19
100	0.91	1.10	2.68
200	0.00	0.00	0.00
LSD(0.05)	**0.26**	**0.27**	**1.13**

كما بينت نتائج الجدول نفسه ان الملوحة قد اثرت بصورة سلبية في تركيز الحامض الفينولي الكلوروجنك chlorogenic acid ، اذ كانت معاملة المقارنة هي المتفوقة معنويا على جميع المعاملات الاخرى باعطائها اعلى معدل بلغ 43.67 ميكروغم/غم وزن جاف، في حين كان الانخفاض معنويا ليبلغ 17.19 و2.68 و0.0 ميكروغم/غم وزن جاف عند التراكيز الملحية 50 و100 و0.0 ملي مولر على التوالي. اشار عدد من الباحثين الى انخفاض محتوى حامض الكلوروجنك مع زيادة المستويات الملحية (Muthukumarasamy *et al.*, 2000; Sabra *et al.*, 2013)، في حين اشار اخرون الى زيادة محتوى هذا الحامض بزيادة التراكيز الملحية (Navarro *et al.*, 2006; Colla *et al.*, 2013). يمكن ايعاز سبب زيادة محتوى الحامض الفينولي في الكالس غير المعرض للإجهاد الملحي مقارنة بالنبات الاصل الى انه ربما توفرت لكالس الظروف الملائمة لنمو كحرارة و الضوء و الكمية كافية من الغذاء مما ادى الى زيادة في انتاجها لهذا المركب في الكالس، اذ ان مرحلة نشوء الزروعات واستحثاث وادامة الكالس والظروف المثالية للمزارع النسيجية تعد محفزات عملية ادت الى زيادة في هذا الانتاج في الكالس مقارنة مع النبات الاصل (Mohy *et al.*, 2009) . وان التذبذب الحاصل في محتوى الكلوروجنك مع اختلاف التراكيز الملحية ربما يرجع الى الحالة الفسلجية للخلايا النباتية المعرضة للملوحة والتي تؤثر في تصنيع وتراكم هذا الحامض تحت ظروف الملوحة (Gengmao *et al.*, 2015).

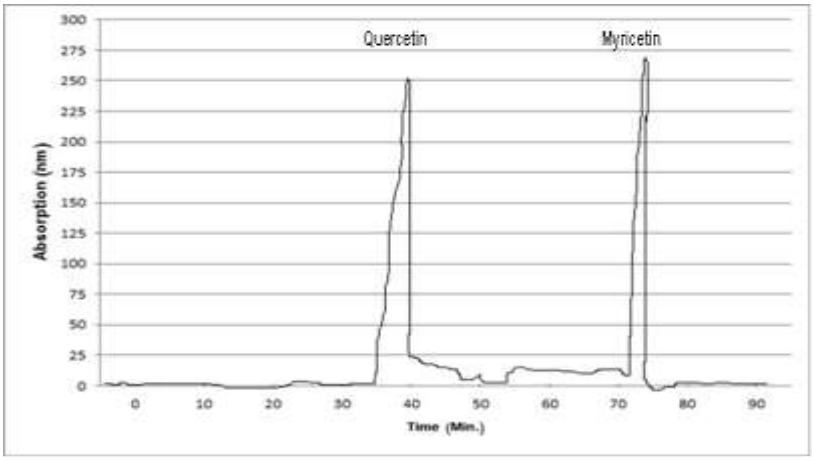


(أ): الكويرستين والميرستين القياسيين المحللين بواسطة HPLC.
الكويرستين: زمن الاحتجاز = 39.583 المساحة النسبية = 2238900
الميرستين: زمن الاحتجاز = 68.872 المساحة النسبية = 2579341

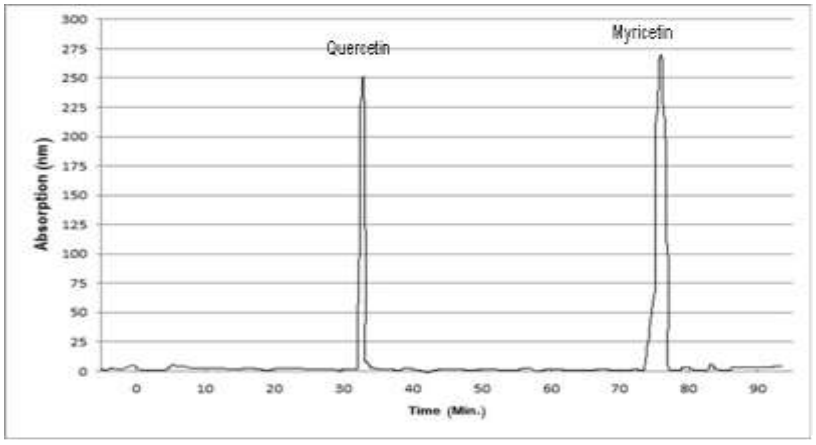


(ب): الكويرستين والميرستين للعينة الاصل لنبات قرن الغزال المحللين بواسطة HPLC.

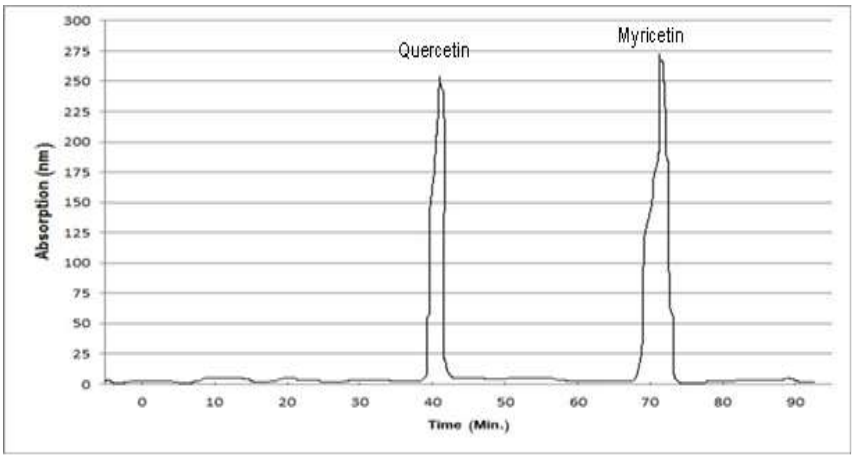
الكويرستين: زمن الاحتجاز = 40.121 المساحة النسبية = 1189642
الميرستين: زمن الاحتجاز = 70.110 المساحة النسبية = 2178931



(ج): الكويرستين والميرستين لكالس نبات قرن الغزال (المقارنة) الناشئ على وسط MSمزود بـ1.0 ملغم/لتر 2,4-D و 0.5 ملغم/لتر BA والمحللين بواسطة HPLC.
الكويرستين: زمن الاحتجاز = 35.684 المساحة النسبية = 2475811
الميرستين: زمن الاحتجاز = 72.369 المساحة النسبية = 2784631



(د): الكويرستين والميرستين لكالس نبات قرن الغزال المجهد ملحيا(50 ملي مولر) والناشئ على وسط MS مزود بـ 1.0ملغم/لتر2,4-D و 0.5ملغم/لترBA والمحللين بواسطة HPLC.
الكويرستين: زمن الاحتجاز = 34.567 المساحة النسبية = 1786352
الميرستين: زمن الاحتجاز = 74.861 المساحة النسبية = 2648923

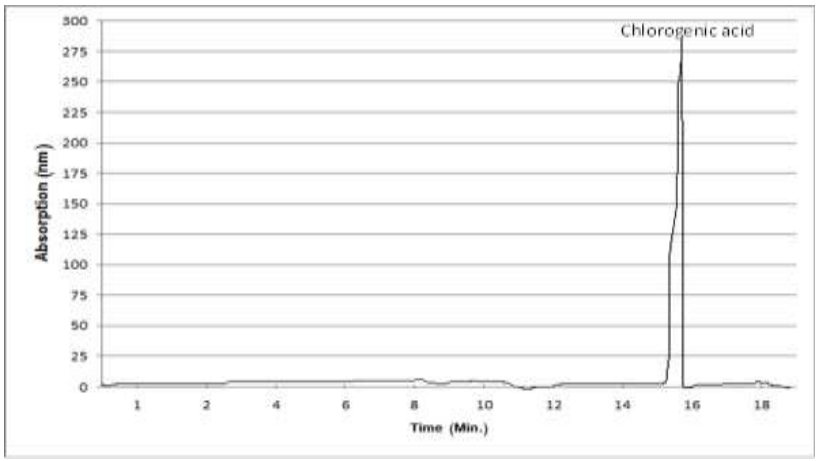


(هـ): الكويرستين والميرستين لكالس نبات قرن الغزال المجهد ملحيا(100ملي مولر) والناشئ على وسط MS مزود بـ 1.0ملغم/لتر 2,4-D و 0.5ملغم/لتر BA والمحللين بواسطة HPLC.

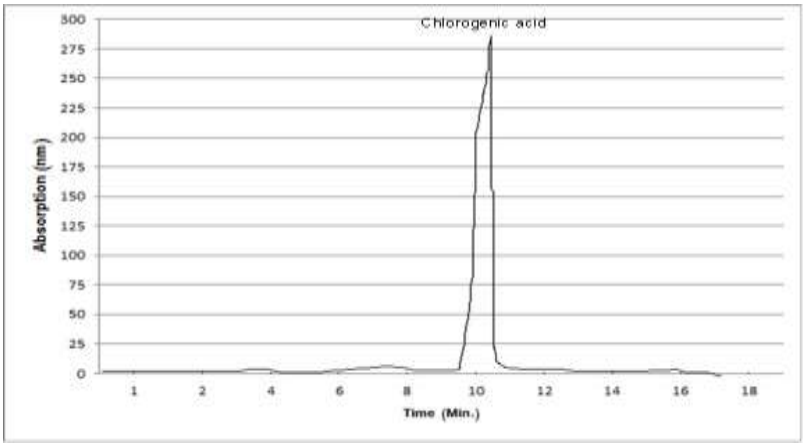
الكويرستين: زمن الاحتجاز = 39.981 المساحة النسبية = 537874

الميرستين: زمن الاحتجاز = 67.963 المساحة النسبية = 2476812

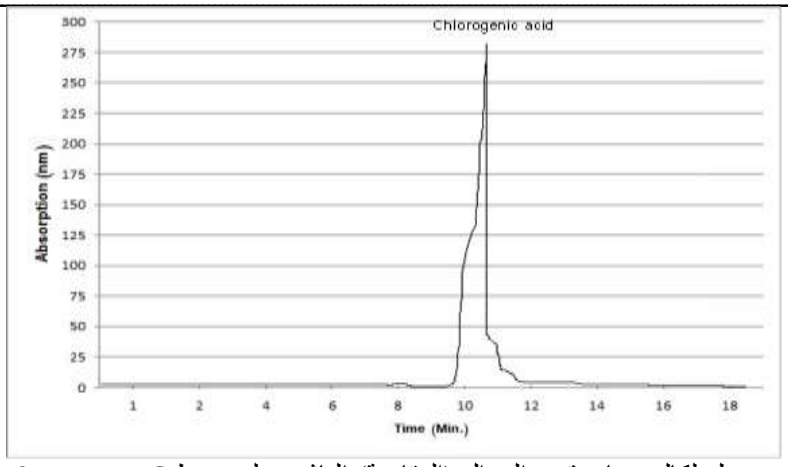
شكل (1): زمن الاحتجاز والمساحة النسبية لمركبي الكويرستين والميرستين القياسيين وفي عينات نبات قرن الغزال وكالس المقارنة والمعرض للإجهاد الملحي .



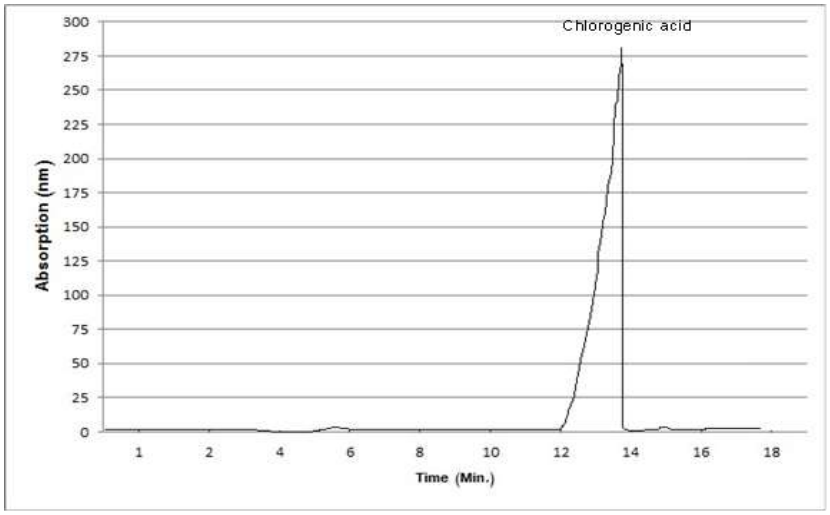
(أ): حامض الكلوروجنك القياسي المحلل بواسطة HPLC. زمن الاحتجاز = 15.827 المساحة النسبية = 1479326



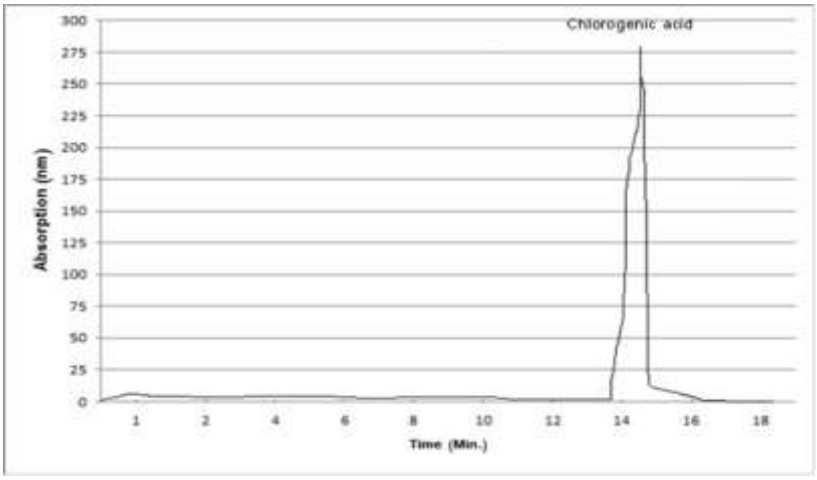
(ب): حامض الكلوروجنك للعينة الاصل لنبات قرن الغزال المحلل بواسطة HPLC. زمن الاحتجاز = 9.352 المساحة النسبية = 2341691



(ج): حامض الكلوروجنك لكالس نبات قرن الغزال (المقارنة) الناشئ على وسط MS مزود بـ 1.0ملغم/لتر 2,4-D و 0.5ملغم/لتر BA والمحلل بواسطة HPLC. زمن الاحتجاز = 9.846 المساحة النسبية = 2537462



(د): حامض الكلوروجنك لكالس نبات قرن الغزال المجهد ملحيا(50ملي مولر) والناشئ على وسطMS مزود بـ 1.0ملغم/لتر 2,4-D و 0.5ملغم/لتر BA والمحلل بواسطة HPLC.
زمن الاحتجاز = 12.114 المساحة النسبية = 1962458



(ه): حامض الكلوروجنك لكالس نبات قرن الغزال المجهد ملحيا(100ملي مولر) والناشئ على وسط MS مزود بـ 1.0ملغم/لتر 2,4-D و 0.5 ملغم/لترBA والمحلل بواسطة HPLC.
زمن الاحتجاز = 13.954 المساحة النسبية = 1654923

شكل (2): زمن الاحتجاز والمساحة النسبية لعينات حامض الكلوروجنك القياسي وعينة النبات الأصل وكالس المقارنة والمعرض للإجهاد الملحي

المصادر References

الحميشي ، انتصار حسين مهدي (2007). دراسة الشد الملحي والمائي في نبات البزاليا *Pisum sativum* L. . اطروحة دكتوراه . كلية العلوم . جامعه القادسية . العراق.

-Al-Athary, M.A. (2015). Enhancement of secondary metabolites and callus induction in *Catharanthus roseus* (L.) Don. using some biotic and abiotic factors. PhD. Dissertation. Faculty of Science. Kufa University. Iraq.

-Borgognone, D.; M., Cardarelli; E., Rea; L., Lucini and G., Colla (2014). Salinity source-induced changes in yield, mineral composition, phenolic acids and flavonoids in leaves of artichoke and cardoon grown in floating system. J. Sci. Food Agric., 94(6): 1231-1237.

-Colla, G.; Y., Rouphael; M., Cardarelli; E., Svecova; E., Rea and L., Lucini (2013). Effects of saline stress on mineral composition, phenolic acids and flavonoids in system. J. Sci. Food Agric., 93(5): 1119-1127.

-Daneshmand, F.; M.J., Arvin and K.M., Kalantari (2010). Physiological responses to NaCl stress in three wild species of potato *in vitro*. Acta Physiol. Plant., 32:91-101.

-Gengmao, Z.; S., Li; X., Sun; Y., Wang and Z., Chang (2015). The role of silicon in physiology of the medicinal plant *Lonicera japonica* L. under salt stress. Sci. Rep., 5: 12696; doi:10.1038/srep 12696.

-Hussein, I.; M.U., Khattak; R., Ullah; Z., Muhammad; F.A., Khan; Z., Ullah and S., Haider (2011). Phytochemical screening and microbial activities of selected medicinal plants of Khyberpakhtunkhwa Pakistan. Afr. J. Pharm., 5(6): 746-750.

-Jahan, N.; K., Rahman; S., Ali and M.R., Asi (2013). Phenolic acid and flavonol contents of gemmo-modified and native extract of some indigenous medicinal plants. Pak. J. Bot., 45(5):1515-1519.

-Jain, S.; **B., Pancholi and R., Jain (2012).** *In vitro* callus propagation and secondary metabolite quantification in *Sericostoma pauciflorum*. Iran. J. Pharm. Res., 11(4) : 1103-1109.

-Jasim, A.M., Abbas, M.F. and Alzubaidy, B.H. (2010). Effect of salt stress and proline on chemical on content of embryogenic callus and somatic embryos of date palm (*Phoenix dactylifera* L. 'Ashkar'). Acta Hort., 882: 219-224.

-Kavi-Kishore, P.B. ; S., Sangam; R.N., Amrutha; P.S., Laxmi; P.S., Naidu; K.R., Rao; S., Rao; K.J., Reddy; P., Theriappan and N., Sreenivasulu (2005). Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. Current Sci., 88: 424–438.

-Kulevanova, S.; M., Stefova; T.K., Panovska and T., Stafilov (2002). HPLC identification and determination of myricetin, quercetin, kaempferol and total flavonoids in herbal drugs. Mace. Pharm. Bull., 48 (1,2): 25-30.

-Libal-Waksler, Y.; M., Nir; G., Ben-Hayyium and E., Telor (1994). Starch metabolism in salt tolerant and sensitive Shamouti callus. Plant Physiol. Biochem., 32: 659-665.

-Lila, M.A. (2005). Valuable Secondary Products from *In Vitro* Culture. Chapter 24. Concept Secondary Products *In Vitro*. CRC Press LLC. Ltd., Chi Chester.

-Mahesh, S. (2008). Plant Molecular Biotechnology. New Age International. Ltd.,1st ed., New Delhi. India. Pp.49-51.

Mohy, A.; Z., Khan; M., Ahmad; M.A., Kashmiri; S., Yasmin and H., Mazhar (2009). Chemotaxonomic significance of flavonoids in *Solanum nigrum* complex. Department of Botany. GC University. Katchery Road. Pakistan.

-Munns, R. and M., Tester (2008). Mechanisms of salinity tolerance. Ann. Rev. Plant Biol., 59:651-681.

physiological and biochemical adjustments in response to root zone salinity stress and high solar radiation in two Mediterranean evergreen shrubs, *Myrtus communis* and *Pistacia lentiscus*. New Phytologist, 170(4): 779-794.

Vander – Velde , N. (2003) . the vascular plant of Majuro Atoll, Republic of Marshall Island . Smithsonian in situation , Atoll. Rese. Bull. , 503:1-141.

-Verpoorte, R.; A., Contin and J., Memelink (2002). Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. Phytochem. Rev., 1(1): 13-25.

-Wanyika,H.N.; E.G., Gatebe; L.M., Gitu; E.K., Ngumba and C.M., Maritim (2010). Determination of caffeine content of tea and instant coffee brands found in the Kenyan market. Afr. J. Food Sci., 4(6): 353–358.

-Webster, G.L. (1994). Classification of the Euphorbiaceae. Ann. Mo. Bot. Gar., 81: 3-32.

-Wu, T.; Y., Lin; M., Haruna; D., Pan; C.Y., Shingu; H., Hsu; T., Nakano and K., Lee (1991). Antitumor agents , 119. Kansuiphorins A and B , two novel ant leukemic diterpene esters from *Euphorbia kansui* , J. Nat. Prod., 54 :823 – 829.

-Xu, A.; J.C., Zhan and W.D., Huang, W.D. (2015). Effects of ultraviolet, methyl jasmonate and salicylic acid, alone and in combination on stilbene biosynthesis in cell suspension cultures of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon. Plant Cell, Tiss. Organ Cult., 122: 197-211.

-Yazici, I.; I., Turkan; A.H., Sekmen and T., Demiral (2007). Salinity tolerance of purslane (*Portulaca oleracea* L.) is achieved by enhanced ant oxidative system, lower level of lipid peroxidation and proline accumulation. Environ. Exp. Bot., 61: 49-57.

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

-Muthukumarasamy, M.; S.D., Gupta and R., Pannerselvam (2000). Enhancement of peroxidase, polyphenol oxidase and dismutase activities by tridimefon in NaCl stressed *Raphanus sativus* L. Biol. Plant., 43:317-320.

-Navarro, J.M.; P., Flores; C., Garrido and V., Martinez (2006). Changes in the contents of antioxidant compounds in pepper fruits at ripening stages as affected by salinity. Food Chem., 96:66-73.

-Ni, J.; X., Yang; J., Zhu; Z., Liu; Y., Ni; H., Wu; H., Zhang and T., Liu (2015). Salinity induced metabolic profile changes in *Nitraria tangutorum* Borb. suspension cells. Plant Cell Tiss. Organ Cult., 122(1):239-248.

-Parida, A.K. and A.B., Das (2005). Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. Eco. Environ. Saf., 60:324-349.

-Sabra, A.; L., Adam; F., Daayf and S., Renault (2012). Salinity- induced changes in caffeic acid derivatives, alkamides and ketones in three *Echinacea* species. Environ. Exp. Bot., 77: 234-241.

-SAS. (2004). SAS / STAT Users Guide for Personal Computers. Release 7.0. SAS Institute Inc., Cary. NC., USA.

-Sharma, V. and K.G., Ramawat (2013). Salinity - induced modulation of growth and antioxidant activity in the callus cultures of miswak (*Salvadora persica*). J. Biotech., 3:11-17.

-Tattini, M.; D., Remorini; P., Pinelli; G., Agati; E., Saracini; M.L., Traversi and R., Massai (2006). Morpho - anatomical,