وزارة التعليم العالي والبحث العلميّ
جامعة ديالى
كلية التربية للعلوم الصرفة
قسم علوم الحياة

إنشاء وزراعة المعلقات الخلوية لنبات السذب *Ruta graveolens* L. ودراسة تأثير بعض المهيجات على تراكم مركبات Furanocoumarin خارج الجسم الحي

أطروحة مقدمة إلى
مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة ديالى وهي جزء من
متطلبات نيل درجة الدكتوراه فلسفة في علوم الحياة/ علوم الحياة

من قبل
ضحى صباح نادر

بكالوريوس علوم الحياة/ كليّة التربية للعلوم الصرفة/ جامعة ديالى 2004
ماجستير علوم الحياة/ كلية التربية للعلوم الصرفة/ جامعة ديالى 2018

بإشراف

الأستاذ المساعد الدكتور
مثنى محمد إبراهيم

الأستاذ الدكتور
تلفان عناد احمد

ذو الحجة / 1442 هـ

تموز / 2021 م

1- المقدمة

يعد نبات السذب *Ruta graveolens* L. نباتاً طبياً معمراً يعود الى العائلة السذبية Rutaceae (Kannan وBabu، 2012) واسع الانتشار له تاريخ طويل في الطب الشعبي فقد تمت الاشارة الى استخدامه طبياً منذ أكثر من 1500 سنة، كما استعمل في صناعة الأدوية محلياً وخصوصاً في اوربا (Parray وآخرون، 2012).

يعد نبات السذب المصدر الرئيسي للعديد من المركبات الفعالة التي تملك فوائد طبية كبيرة اذ تعزى استخدامات هذا النبات في الطب الشعبي الى وجود القلويدات والكومارينات وأكثر من 120 نوع المواد الفلافونويدية المسجلة بنسبة كبيرة فيه (Gentile وآخرون، 2015)، وفضلاً عن هذا ان النبات ينتج عدة انواع من المواد الايضية الثانوية أبرزها Furanocomarins وTanins وTerpenoids وEssential Oil التي تكسبه رائحته القوية، كما اشير الى احتوائه على أشباه الكاروتينات والكلوروفيلات وعدد من المضادات الحيوية للمايكروبات Antimicrobials مثل قلويد Acridone (Hashemi وآخرون (2011).

تزايدت الحاجة خلال الأونة الأخيرة للعديد من المواد الصيدلانية والأصباغ مما استلزم توظيف تقانة الزراعة النسيجية كتوظيف مزارع الكالس أو المعلقات الخلوية أو تحويرها وراثياً لزيادة إنتاجية النباتات من هذه المواد، إذ أصبحت زراعة الخلايا والأنسجة النباتية المصدر النموذجي الأسرع في انتاج المركبات الصيدلانية خارج الجسم الحي بكميات كبيرة وبصورة مستمرة بعيداً عن التقيد بالظروف البيئية وعدم تداخلها مع مركبات أخرى، كما يحصل عند عزلها من النبات الكامل (Karuppusamy، 2009).

ان تقانة مزارع المعلقات الخلوية هي احدى التقانات المهمة في مجال زراعة الانسجة النباتية لما لها من تطبيقات حيوية فهي توفر نظاماً جيداً لدراسة نمو الخلايا وتخصصها، وتعد أنظمة نموذجية لدراسة المسارات الأيضية المختلفة وحث الأنزيمات والتعبير الجيني، فضلاً عن ذلك فان المعلقات الخلوية ذات حيوية عالية القدرة على النمو والانقسام في الوسط الغذائي السائل المدعم بمنظمات النمو (Lendevai وآخرون، 2002).

تنتج مزارع المعلقات الخلوية جميع نواتج الأيض الأولية والثانوية التي تنتجها نباتات الأبوين التي استحثت منها المزارع النسيجية. وبالرغم من أن انتاج مركبات الأيض الثانوية في المزارع النسيجية واطئاً بشكل عام ولا يكفي لتلبية متطلبات عمليات الانتاج على المستوى الصناعي فأن انتاج مركبات الأيض الثانوية في أنسجة النباتات النامية خارج الجسم الحي يتأثر بعوامل عديدة منها فيزيائية وأخرى كيميائية حيث يمكن رفع معدلات نمو الخلايا ومركبات الأيض الثانوية الى أعلى مستوياتها من خلال أمثلة ظروف النمو ومن ثم انتخاب خلايا عالية الانتاجية لإدخالها ضمن الانتاج التجاري للمادة المطلوبة (Ramawat، 2008).

يحدث بناء وتراكم مركبات الأيض الثانوية في النباتات المعرضة للأجهادات الحيوية وغير الحيوية المختلفة، اذ ان هذه المركبات تسمح للنباتات أن تبقى على قيد الحياة تحت ظروف الاجهاد في بيئتها، واعتماداً على هذا المبدأ فأن بعض الاستراتيجيات المستخدمة لتشجيع انتاج مركبات الايض الثانوي خارج الجسم الحي قد تم تطويرها وتشمل المعاملة بالميكروبات والعوامل الفيزيائية والكيمياوية التي تعرف بالمظهرات (المهيجات) (Yue وآخرون، 2016)، ومن المعروف استخدام المظهرات الحيوية (Biotic elicitors) مثل الفطريات التي تعد من أفضل المظهرات الحيوية لكونها تعمل على تحفيز الخلايا النباتية لإنتاج مركبات الأيض الثانوية كالفلافونويدات والفينولات كما هو الحال في استخدام مستخلص الفطر *A. niger* كمظهر حيوي. والمظهرات غير

الحيوية (Abiotic elicitors) الكيميائية التي تمت دراستها بصورة مكثفة لغرض التلاعب في النباتات مثل MeJA التي تعمل كمركبات اشارة مهمة في عملية الاظهار (Shanker و Shanker، 2016).

تعد الفيورانوكومارينات من المركبات العضوية الفينولية التابعة لمركبات الأيض الثانوي التي تضم 1500 مركباً من مركبات الكومارين، فقد وجدت مركبات Furanocoumarin بشكل رئيسي في سطح الأوراق وفي الثمار، حيث تنتج في النبات كآلية للدفاع ضد المفترسات مثل الحشرات واللبائن والاصابات الفطرية، وللفيورانوكومارينات تأثيرات فسيولوجية كمضادات للالتهابات وكمضادات للأكسدة وتأثيراتها المضادة للسرطان (Diwan و Malpathak، 2009). تعد مؤشرات الدنا من أدق أدوات الكشف عن التغايرات الوراثية في تجارب اكثار النباتات والنسائل الجسمية المختلفة Somaclonal Variation التي تم اكثارها واخلافها من المزارع النسيجية خارج الجسم الحي، والتي تتضمن العديد من التقنيات، ان تقنية التضاعف العشوائي متعدد الاشكال لسلسلة الدنا RAPD-PCR من التقنيات ذات الدقة التشخيصية الجيدة (Kumar و Gurusubramanian، 2011).

تهدف الدراسة الحالية التي تناولت نبات السذب *Ruta graveolens* L. الى مايلي:

- دراسة تأثير منظمات النمو في انشاء مزارع الكالس والمعلقات الخلوية الانموذجية.
- تأثير كثافات خلايا المعلق الخلوي عند الزراعة بطريقة النشر في تكوين الكالس.
- تأثير مستخلص فطر *Aspergillus niger* على انتاج مركبات Furanocoumarin في المزارع النسيجية للكالس والمعلقات الخلوية.
- تأثير المثيل جاسمونيت Methyl Jasmonate على انتاج مركبات Furanocoumarin في المزارع النسيجية للكالس والمعلقات الخلوية.

- توظيف تقانة التضخيم العشوائي لسلسلة DNA متعددة الأشكال (RAPD) لفحص التغاير الوراثي الحاصل بين النبيتات المتكونة خارج الجسم الحي مع نبات الام .

المستخلص

نُفذت الدراسة في كلية التربية للعلوم الصرفة / قسم علوم الحياة / مختبر زراعة الخلايا والأنسجة النباتية خلال الفترة من من تشرين الثاني/2019 ولغاية آب/2020، بهدف دراسة تأثير المهيج الحيوي *Aspergillus niger* والمهيج اللاحيوي Methyl Jasmonate (MeJA) في انتاج مركبات الفيورانوكومارين Psoralen، Xanthotoxin وBergapten في أوراق وسيقان النبات ومزارع الكالس ومزارع المعلقات الخلوية لنبات السذب *Ruta graveolens* L. وكانت النتائج على النحو التالي.

1. إن أفضل استحثاث للكالس تم الحصول عليه من الأجزاء النباتية للسيقان عند زراعتها على وسط Murashige and Skoog Medium (MS) المضاف اليه بتركيز 2.0 ملغم.لتر$^{-1}$ 2,4-Dichloro phenoxy Acetic Acid (2,4-D) متداخلا مع 0.5 ملغم.لتر$^{-1}$ (Kin) Kinetin والذي سجل أعلى وزن رطب بلغ 2.584 غم.قطعة$^{-1}$ بعد أربعة اسابيع من الزراعة، وامتاز الكالس المستحث بقوامه الهش.

2. نجحت الدراسة في انشاء معلقات خلوية انموذجية من الكالس الهش للسيقان على وسط MS المضاف اليه بتركيز 2.0 ملغم.لتر$^{-1}$ 2,4-D متداخلاً مع 0.5 ملغم.لتر$^{-1}$ Kin، وأدت زراعتها بكثافات مختلفة بطريقة النشر في وسط الاستحثاث بحالته الصلبة الى انقسام الخلايا وتكوين المستعمرات الخلوية وتطورها الى منشأت كالس ونموها الى قطع صغيرة الحجم من الكالس، فقد بلغ معدل أعداد المستعمرات الخلوية 87.71 مستعمرة.طبق$^{-1}$ عند زراعة الكثافة 22.2 × 10 ^{5} خلية.سم^{3} بالمقارنة مع كثافة الانشاء التي بلغت 21.57 مستعمرة. طبق$^{-1}$، وتفوقت الكثافة العالية معنوياً على باقي الكثافات وقد أعطت معدل منشآت الكالس التي بلغت 72.44منشأ. طبق$^{-1}$ بعد 27 يوماً من زراعة الخلايا المعلقة.

3. أظهرت الدراسة التكوين التلقائي للأفرع الخضرية المتمايزة التي بلغ عددها 40 فرعاً لثلاث قطع بعد 7 أسابيع من زراعة كالس المعلقات الخلوية بطريقة النشر الذي تم ادامته بعمر 30 يوماً على وسط MS المضاف اليه بتركيز 2.0 ملغم.لتر$^{-1}$ 2,4-D متداخلاً مع 0.5 ملغم.لتر$^{-1}$ Kin، وجذرت الأفرع الخضرية المتمايزة بنسبة 100% في وسط MS بكامل قوته التركيبة.

4. أظهرت بيانات الكشف عن وجود مركبات الفيورانوكومارين Psoralen، Xanthotoxin وBergapten بدلالة قراءات عمود كروموتوغرافيا السائل السريع Fast Liquid