

تحليل المستخلص الميثانولي لكالس نبات الحلبة *Trigonella foenum graesum* L. تحت الأجهاد المائي بتقنية الـ GC-MS

إيلاف عبد الأمير الربيعي

عمار رضا عبيس

كلية العلوم، قسم علوم الحياة، جامعة بابل

ammarrredha@yahoo.com

elafalrubaie89@yahoo.com

الخلاصة

هدفت الدراسة الحالية الى دراسة تأثير الأجهاد المائي باستخدام مادة الـ PEG بتركيز مختلفة (0, 3, 6, 9 %) في حث بعض المركبات الكيميائية في كالس نبات الحلبة *Trigonella foenum graesum* L. اذ تم استحداث كالس نبات الحلبة خارج الجسم الحي على وسط MS باستعمال توليفة لمنظمي النمو D-2,4- بالتركيز 0.5, 1, 1.5 ملغم/لتر و BA بالتركيز 0.5, 1, 1.5 ملغم/لتر للوصول الى افضل توليفة لانتاج اعلى معدل وزن طري لكالس نبات الحلبة لاجل استخدامها في التجارب اللاحقة، وكانت التوليفة (1mg/L BA) + (1mg/L2,4-D) افضل توليفة لانتاج اعلى معدل وزن طري لكالس نبات الحلبة. وقد أستعملت التوليفة أعلاه لأدامة الكالس المستحث. استخدم المذيب الكحولي الميثانول لأجل استخلاص مركبات الايض الثانوي من عينات الكالس المستحثة تحت تأثير الاجهاد المائي. استخدم جهاز Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) لتحديد مركبات الايض الثانوي في عينات المستخلص الكحولي لكالس الحلبة. وقد لوحظ من نتائج الـ GC-MS وجود العديد من المركبات (17 مركبا كيميائيا) لجميع عينات مستخلص النبات. الكلمات المفتاحية : كالس ، نبات الحلبة ، الأجهاد المائي ، GC-MS.

Abstract

This study aimed to study the effect of water stress using different concentration of PEG (0,3,6,9%) to induce some chemical compound of *Trigonella foenum graesum* L. callus. The induction of callus has been done in vitro on MS media by using combinations of 2,4-D (0.5, 1, 1.5 mg/L) and BA (0.5, 1, 1.5 mg/L) to reach the best combination for the best highest callus fresh weight to choose it in the next experiment. The results showed that the combination (1mg/L BA) +(1mg/L2,4-D) was the best combination to produce the highest fresh callus of *Trigonella* , which was used for induced callus.

The solvent of methanol was used to extract the secondary metabolites from the induced callus under the stress condition. Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) technique was used to determine the secondary metabolite in the samples of methanol extracts of *Trigonella* callus, which revealed from the results that there were many compounds (about 17) for all plant samples.

Key words: callus , *trigonella foenum graecum* L., water stress , GC-MS.

المقدمة

الحلبة نبات عشبي، حولي قائم ينتمي الى رتبة Fabales وتحت العائلة الفراشية Papilionoidae والعائلة البقولية Fabacea. يأتي الاسم الشائع للحلبة Fenugreek من *Foenum-graecum* وهذا يعني "الحشيش اليوناني"، أما أسم جنس الحلبة *Trigonella* فهو مشتق من الأسم اليوناني القديم وتعني "الزوايا-الثلاث" الذي تشير الى الشكل الثلاثي للأوراق (Fazli and Hardman,1968). أن أول وصف مسجل للحلبة كان على ورق البردي المصري القديم الذي يعود الى 1500 سنة قبل الميلاد (Flammang et al.,2004).

تعد زراعة الأنسجة النباتية من الطرائق المهمة والمفيدة في المجال التجاري إذ أستخدمت هذه التقنية في الأكتار السريع للنباتات وخاصة الطبية منها للحصول على عدد كبير من النباتات التي يصعب تكثيرها بالطرائق التقليدية في أي فصل من السنة وأقل وقت وتكلفة، وتمت الأستفادة من هذه التقنية للحصول على

سلالات عالية الإنتاج ومقاومة للأمراض ومتحمل للظروف البيئية، وتعد زراعة الأنسجة النباتية من الطرائق المهمة لنقل الجينات المرغوبة للمحاصيل الأقتصادية (الرفاعي والشوبكي، 2002) .

يعد نبات الحلبة من أقدم النباتات الطبية المعروفة لقابليته على خفض نسبة السكر والكوليسترول في الدم وتنشيط نمو الخلايا السرطانية (Suboh et al., 2004). وبناءً على ماسبق من أهمية طبية للنبات وأحتوائه على مركبات ثانوية مهمة تدخل في الصناعات الصيدلانية ولكن أنتاجها قليل مقارنة بالحاجة الفعلية لهذه المركبات. فقد اجريت هذه الدراسة التي تهدف الى حث أنسجة النبات على زيادة أنتاج مركبات الأيض الثانوي وذلك عن طريق تجهيز الوسط الحاوي على الكالس بتركيز مختلفة من ال-PEG. والكشف ونوعاً عن المركبات المنتجة عن طريق التحليل بواسطة ال- GC-MS للمستخلص الميتانولي لكالس نبات الحلبة.

المواد وطرائق العمل

جمع بذور النبات وتعقيمه:

جمعت بذور الحلبة *Trigonella foenum graecum* L. من السوق المحلية في محافظة بابل وشخصت في معشب كلية العلوم/جامعة بابل. وضعت كمية مناسبة من البذور في قارورة وغسلت بالماء المقطر ثلاث مرات للتخلص من الغبار والشوائب العالقة، ثم نقلت الى كابينة انسياب الهواء الطبقي air flow laminar – cabinet اذ جرى تعقيمها عن طريق غمرها بـ 15% هيبوكلورات الصوديوم مع التحريك لمدة 7 دقائق. غسلت بعدها بالماء المقطر المعقم لمدة دقيقة واحدة لثلاث مرات وعقمت بعدها بـ الكحول الإيثيلي (70%) ورجت لمدة 30 ثانية ثم غسلت بالماء المقطر المعقم لمدة دقيقة واحدة على ثلاث مرات لإزالة الكحول الإيثيلي، ثم وضعت البذور في طبق بتري حاو على ورقة ترشيع معقمة من أجل ازالة المياه العالقة (Awika and Rooney,2004).

زراعة البذور

بعد تحضير وسط MS وتعقيم البذور أخذت ثلاث بذرات وزرعت في أنابيب الزراعة الحاوية على 10 ml وسط MS المجهز بتركيز مختلفة من منظمات نمو النبات 2,4-D، بالتركيز (1.5,1,0.5) ملغم/لتر وBA بالتركيز (1.5,1,0.5) ملغم/لتر وبمعدل 15 مكرر لكل توليفة من 2,4-D وBA لغرض استحثاث الكالس، ثم حضنت تحت ظروف إضاءة (16 ساعة يومياً) ودرجة حرارة $24 \pm 2^\circ \text{C}$.

طور استحثاث الكالس

استخدمت تقنية زراعة الأنسجة النباتية وفقاً لـ Hirata وآخرون (1990) لغرض استحثاث الكالس من بذور الحلبة، ثم نقل الكالس الى وسط جديد لغرض تحفيز إنتاج الأيض الثانوي ودراسة بعض المؤشرات الحيوية للنبات

طور تراكم الكالس

الأجهاد المائي

تحضير وسط الأجهاد المائي PEG

أستخدمت أفضل توليفة لمنظمات النمو $1 \text{ ml/L}(2,4\text{-D}) + 1 \text{ ml/L}(\text{BA})$ وأضيف للوسط PEG (Polyethylene glycol 4000) بتركيز مختلفة (0,3، 6,9%) ثم وضع الوسط على الصفيحة الساخنة لمدة 5دقيقة لضمان الذوبان الكامل للمكونات، وتم تعديل pH الوسط إلى 5.8 بأستخدام هيدروكسيد الصوديوم (0.1 نورمالي) أو حامض الهيدروكلوريك بتركيز (0.1 نورمالي) قبل إضافة الاكار.

زراعة الكالس على وسط الأجهاد المائي PEG

أخذ 250 ملغم من الكالس الطازج واعدت زراعته على اوساط حاوية على PEG بالتراكيز المختلفة (0,3,6,9%)، وزراع 15 مكررا لكل تركيز من تراكيز PEG، وتمت عملية الزراعة تحت ظروف معقمة وقياس الوزن الطري والجاف بعد 6 اسابيع من الزراعة .

تحليل المركبات الفعالة للمستخلص الميثانولي لكالس نبات الحلبة باستخدام جهاز GC-MS

تم تحليل المستخلص الميثانولي لكالس لنبات الحلبة وفصل المركبات الفعالة باستخدام جهاز كروماتوغرافيا الغاز المدمج بمطياف الكتلة Gas Chromatography-Mass Spectrometry وذلك اعتماداً على الطريقة الثانية المعتمدة من قبل Abdul-Jalil (2014) كانت أبعاد العمود الشعري IMS injection volume هو 5µl، الطور المتحرك carrier gas هو الهليوم، ومعدل الجريان الثابت constant flow rate بلغ 1ml/min، شخّصت المركبات الفعالة بمقارنة المركبات التي ظهرت في المستخلص الكحولي لكالس الحلبة مع المركبات القياسية من نوع NIST mass spectral search program for the NIST/EPA/NIH mass spectral library version 2.0 f / 2008 and NIST08.LIB المدمجة مع الجهاز.

النتائج والمناقشة

من نتائج تقنية الـ GC-MS كما في الجداول 1-5 حدد العديد من المركبات الكيميائية، فكما مبين في الجدول 1 تم الكشف عن المركبات الكيميائية التالية في كالس السيطرة: heptane، 2,3-dimethylpentane، Hexane، Iso-pentane، 3-methylhexane، (1.440:RT). وفي الجدول 2 كشف عن المركبات الكيميائية التالية في الكالس المعامل بتركيز 3% PEG: alpha-Hydroxyphenazine، 1,2-Dinitrobenzene، Cyclo buta furo quinoxaline، (18.050 :RT). وفي الجدول 3 كشف عن المركبات الكيميائية الأتية في الكالس المعامل بتركيز 6% PEG: N-Hexadecanoic acid، 2(2,5-Hexadiynyloxy)tetrahydro- 2H-pyran، (18.098:RT). وفي الجدول 4 كشف عن المركبات الأتية في الكالس المعامل بتركيز 9 PEG: 1,2-dihydro-2-Oxo-6-phenyl، 1-Formyl-beta-carboline، (18.050 :RT) اما الجدول 5 فهو يمثل منحنيات المركبات الكيميائية التي تم تحديدها بواسطة تقنية الـ GC-MS.

تلعب النباتات الطبية دورا مهما في المحافظة على صحة الانسان ولذلك لقابليتها على انتاج العديد من المركبات الطبية والصيدلانية التي تستعمل في علاج العديد من الامراض التي تصيب الانسان والحيوان (Taylor et. al., 1988). اذ يستطيع النبات تصنيع وتجميع العديد من المركبات صغيرة الوزن الجزيئي تسمى مركبات الايض الثانوي (Wink,2003). اذ يستخدمها النبات ضد الاصابات الميكروبية والادغال وكاشارات كيميائية وكذلك يستخدمها كجاذبات لبعض الحشرات والحيوانات (Dewick, 2002). لمركبات الايض الثانوي مدى واسع من الفعالية البيولوجية في تستخدم كمضادات للحياة المجهرية ومضادات للالتهابات ومضادات للاكسدة...الخ، وتقسّم الى ثلاث مجاميع رئيسية هي القلويدات والفينولات والتربينات (Van Etten et. al., 2001).

يعتبر الجفاف او الاجهاد المائي من العوامل الرئيسية التي تحدد نمو النباتات اذ انه يضعف النمو الطبيعي للنبات ويقلل من الماء الداخل للنبات ولكن للنباتات العديد من الطرق الفسلجية التي من خلالها يستطيع الصمود امام الاجهاد المائي ومنها غلق الثغور لتقليل فقدان الماء وكذلك زيادة عدد الجذور لزيادة

كمية الماء الممتصة وتقليل عدد وحجم الاوراق لتقليل الماء المفقود من خلال عملية النتح والتنفس (Lichtenthaler *et. al.*, 1981). وكذلك ينتج النبات العديد من مركبات الايض الثانوي التي من شأنها تزيد مقاومة النبات للاجهاد المائي مثل، البرولين وحامض السالسليك والساييتوكاينينات والحوامض العضوية والابسيسيك اسد والاحماض الامينية والجبرلينات والاكسينات وانزيمات المضادة للاكسدة ومركبات اخرى (Farooq *et. al.*, 2012).

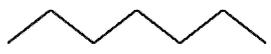
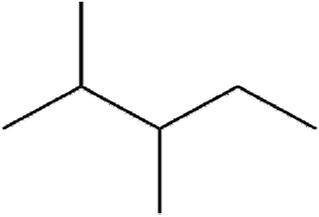
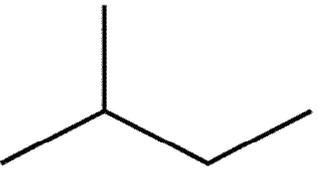
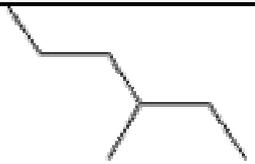
عند تعرض النبات الى اجهاد مائي فإنه تتجمع العديد من المركبات داخل النبات تؤدي الى ضعف النبات وربما موته ومن هذه المركبات هي الجذور الحرة التي تكون غير مستقرة ولها القابلية على التفاعل مع مكونات الخلية مثل البروتينات والحامض النووي لذلك يعتمد النبات الى طرق عديدة للتخلص من هذه المركبات ومنها انتاج وتجميع مركبات لها القابلية على التفاعل مع الجذور الحرة والتخلص منها ومن هذه المركبات هي بعض الانزيمات المضادة للاكسدة وبعض المركبات الكيميائية لذلك نرى ان النبات ينتج كميات كبيرة من مركبات الايض الثانوي في حالة تعرضه للاجهادات (Herrera-Santoyo, 2007). كما ذكر Akula و Ravishankar (2011) أن الأجهاد يزيد من المركبات الثانوية المختلفة في النباتات كمنظمات أوزموزية مثل التراكونيلين وباقي مركبات الأيض الثانوي في نبات الحلبة

نظرا لطبيعة التركيب الكيميائي المتنوع لبذور الحلبة وأحتوائها على الكثير من المركبات الصابونية والقلويدات وغيرها فقد ظهرت لها عدة أستعمالات في مجالات الصناعات الغذائية والدوائية والتي وصفت في الكثير من مؤلفات النباتات الطبية. فعلى صعيد الصناعات الغذائية وبسبب رائحتها المميزة يستعمل مطحون بذور الحلبة كتابل تجاري (Hardman and Fazli, 1972) إذ يستعمل كتابل بهارات (Condiment) ومصدر نكهة صناعية في الهند وماليزيا أما في مصر يضاف مطحون بذور الحلبة إلى الحنطة وطحين الذرة لصناعة الخبز، وفي اليمن يستعمل كجزء أساسي في الغذاء اليومي (Zia *et al.*, 2001).

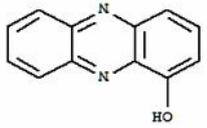
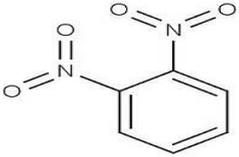
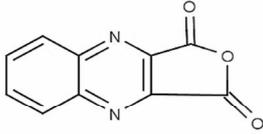
تُنسب الفعالية البايولوجية والدوائية الى مجموعة متنوعة من المكونات في الحلبة وهي: الستيرويدات، المركبات النتروجينية، المركبات الفينولية المتعددة، المركبات الطيارة، الحوامض الأمينية وغيرها (Petropoulos, 2002).

تحتوي بذور الحلبة على ألياف أساسية صمغية (galactomannans)، وتشكل مصدراً للبروتين 30% وتكون عالية المحتوى باللايسين والتربتوفان، 45-60 % كاربوهيدرات، والنشأ 26 %، ألياف منظمة طبيعية 13%، دهون 6%، صمغ 4% رماد 11%، وهو أيضاً مصدر غني بالكالسيوم والحديد وبيتا كاروتين β -carotene وفيتامينات اخرى. وبالمقارنة مع البقوليات تحتوي بذور الحلبة على كمية كبيرة من المعادن منها: Ca, P, Mg, Fe, Zn, Mn لكن ليس هناك تغاير بين الانواع الاخرى للحلبة (Kan *et. al.*, 2005).

جدول 1 تحديد المركبات الكيميائية في المستخلص الميثانولي لكالس نبات الحلبة المعامل بـ PEG %0 بتقنية الـ GC-MS .

RT	المركب	الأسم النظامي	الصيغة الجزيئية	الوزن الجزيئي	Mass peaks	المجموعة
1-1.440		Heptane	C ₇ H ₁₆	100	352	Alkane
2-1.440		2,3-dimethylpentane	C ₇ H ₁₆	100	352	Alkane
3-1.440		Hexane	C ₆ H ₁₄	86	352	Alkane
4-1.440		Iso-pentane	C ₅ H ₁₂	72	352	Alkane
5-1.440		3-methylhexane	C ₇ H ₁₆	100	352	Alkane

جدول (2) تحديد المركبات الكيميائية في المستخلص الميثانولي لكالس نبات الحلبة المعامل بـ 3% PEG بتقنية الـ GC-MS .

RT	المركب	الأسم النظامي	الصيغة الجزيئية	الوزن الجزيئي	Mass peaks	المجموعة
1-18.050		alpha-Hydroxyphenazine	C ₁₂ H ₈ N ₂ O	196	44	Alkaloids
2-18.050		1,2-Dinitrobenzene	C ₆ H ₄ N ₂ O ₄	168	44	Alkaloids
3-18.050		Cyclo buta furo quinoxaline	C ₁₂ H ₈ N ₂ O	196	44	Alkaloids

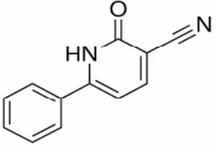
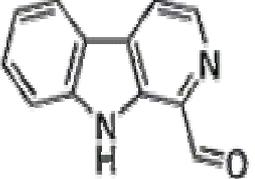
جدول (3) تحديد المركبات الكيميائية في المستخلص الميثانولي لكالس نبات الحلبة المعامل بـ 6%

. GC-MS بتقنية الـ PEG

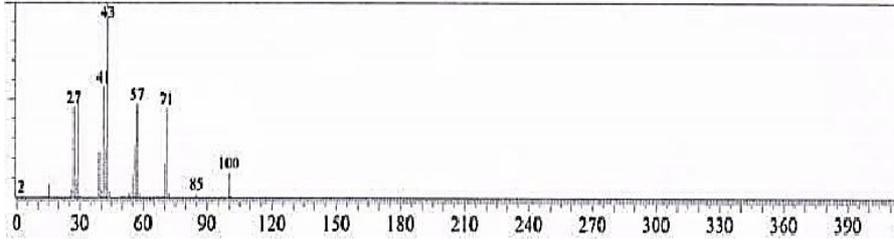
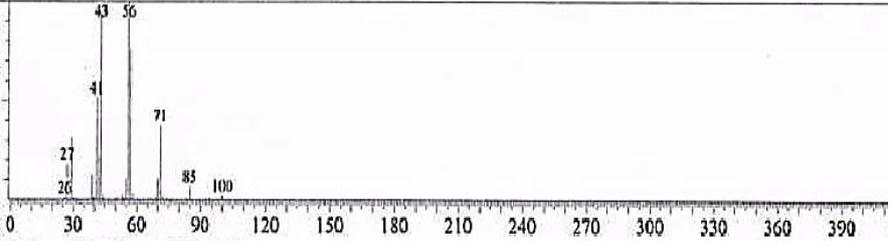
RT	المركب	الأسم النظامي	الصيغة الجزيئية	الوزن الجزيئي	Mass peaks	المجموعة
1-18.098		N-Hexadecanoic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256	83	Terpenes
2-18.098		2(2,5-Hexadiynyloxy)tetrahydro-2H-pyran	C ₁₁ H ₁₄ O ₂	178	83	Phenols

جدول (4) تحديد المركبات الكيميائية في المستخلص الميثانولي لكالس نبات الحلبة المعامل بـ 9%

. GC-MS بتقنية الـ PEG

RT	المركب	الأسم النظامي	الصيغة الجزيئية	الوزن الجزيئي	Mass peaks	المجموعة
1-18.050		1,2-dihydro-2-Oxo-6-phenyl	C ₁₂ H ₈ N ₂ O	196	44	Alkaloids
2-18.050		1-Formyl-beta-carboline	C ₁₂ H ₈ N ₂ O	196	44	Alkaloids

جدول 5 منحنيات المركبات الكيميائية في المستخلص الميثانولي لكالس نبات الحلبة تحت الاجهاد المائي .

اسم المركب	Peaks
heptane	
2,3-dimethylpentane	

Hexane	<p>Mass spectrum of Hexane showing major peaks at m/z 27, 41, 43, 57, 71, and 85.</p>
Iso-pentane	<p>Mass spectrum of Iso-pentane showing major peaks at m/z 13, 27, 41, 43, 57, and 72.</p>
3-methylhexane	<p>Mass spectrum of 3-methylhexane showing major peaks at m/z 15, 27, 41, 43, 57, 71, 85, and 100.</p>
alpha-Hydroxyphenazine	<p>Mass spectrum of alpha-Hydroxyphenazine showing major peaks at m/z 27, 39, 50, 63, 77, 84, 98, 114, 129, and 140.</p>
1,2-Dinitrobenzene	<p>Mass spectrum of 1,2-Dinitrobenzene showing major peaks at m/z 27, 39, 50, 63, 76, 92, 122, 152, and 168.</p>
Cyclo buta furo quinoxaline	<p>Mass spectrum of Cyclo buta furo quinoxaline showing major peaks at m/z 50, 68, 77, 90, 102, 116, 129, and 142.</p>

N-Hexadecanoic acid	
2(2,5-Hexadiynyloxy)tetrahydro-2H-pyran	
1,2-dihydro-2-Oxo-6-phenyl	
1-Formyl-beta-carboline	

المصادر

الرفاعي، عبد الرحيم توفيق وسمير عبد الرزاق الشويكي، 2002، تقنيات القرن ٢١ لتحسين النباتات باستخدام زراعة الانسجة النباتية. سلسلة الفكر العربي لمراجع العلوم الاساسية، دار الفكر العربي، الطبعة الاولى، القاهرة، مصر. عدد الصفحات ٦٠١ صفحة.

Fazli, F. R. Y. and Hardman, R., 1968, The spice, fenugreek, (*Trigonella foenum graecum* L.):it's commercial varieties of seed as a source of diosgenin. Trop. Sci., 10(1): 66-78.

Flammang, A. M.; Cifone, M. A.; Erexson, G. L.; and Stankowski, L. F., 2004, Genotoxicity testing of a fenugreek extract. Food and Chemical Toxicology., 42: 1769–1775.

Suboh, S. M.; Bilito, Y. Y. and Aburjia, T. A., 2004, Protective effects of selected medicinal plants against protein degradation, lipid peroxidation and deformability of oxidatively stressed human erythrocytes. Phytotherapy, Res., 18(4):280-284.

- Awika, J. M.; and Rooney, L. W. ,2004**, Sorghum phytochemical and their potential aspects on human health. *Photochemistry*, 65(9):1199-1221.
- Hirata, K.; Yamanaka, A.; Karano, N.; Miyamoto, K. and Miura, Y., 1990**, Production of indol alkaloids in multiple shoot culture of *Catharanthus roseus*. *Agric. Biol. Chem.* 51:1311-1317.
- Hardman, R. and Fazli, F. R. Y., 1972**, studies in the steroidal sapogenin yield from *Trigonella Foenumgraecum* seed. *Planta. Med.*, 21(3): 322-328.
- Zia, T.; Hasnain, S.N. and Hasan, S.K.,2001**, Evaluation of the oral hypoglycaemic effect of *Trigonella foenum-graecum* L. [J.Ethnopharmacology.,75\(2-3\):](#) 191-195.
- Petropoulos, G. A., 2002**, Fenugreek, The genus *Trigonella*. Taylor and Francis, London and New York., pp: 1 - 255.
- Kan, Y.; Kan, A.; Ceyhan, T.; Sayar, E.; Kartal, M.; Altun, L.; Aslan, S.; and Cevheroglu, S.,2005**, Atomic absorption spectrometric analysis of *Trigonella foenum-graecum* L. seeds cultivated in turkey. *Turkish J. Pharm. Sci.*, 2(3): 187-191.
- Abdul-Jalill, R. DH., 2014**, GC-MS analysis of *Calendula officinalis* and cytotoxic effects of its flower crude extract on human epidermoid larynx carcinoma (Hep-2). *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.* 3(4), pp: 237-275.
- Akula, R. and Ravishankar, G. A., 2011**, Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling and Behavior*,6(11): 1720-1730.
- Taylor, V. E.; Brady, L. R. and Robbers, J. E. ,1988**, Pharmacognosy . 3 ed. Lea and Febiger. Philadelphia.
- Wink, M., 2003**, Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry.* 64(1):3-19.
- Dewick, P. M., 2002**, Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach, 2nd ed. Medicinal Natural Products. John Wiley and sons, Chichester. Pp: 1-507.
- Van-Etten, H.; Temporini, E. and Wasmann, C., 2001**, Phytoalexin (and phytoanticipin) tolerance as avirulence trait: why is it not required by all pathogens? *Physiological and Molecular plant pathology*, 59(2):83-93.
- Lichtenthaler, H. K.; Buschmann, C.; Doll, M.; Fietz, H. J.; Bach, T.; Kozel, U.; Meier D. and Rahmsdorf, U., 1981**, Photosynthetic activity, chloroplast ultrastructure, and leaf characteristics of high-light and low-light plants and of sun and shade leaves. *Photosynth. Res.* 2, 115-141.
- Farooq, M.; Hussain, M.; Wahid, A. and Siddique, K. H. M.,2012**, Drought Stress in Plants: An Overview (chapter1). R. Aroca (ed.), *Plant Responses to Drought Stress*, DOI: 10(3):642-653.
- Herrera-Santoyo, J.; López-Delgado, H. and Mora-Herrera, M. E., 2007**, Stress in callus of *Hippocrate aexcelsa*: catalase activity, hydrogen peroxide content and canophyllol accumulation. *APR.* 32(4):253-256.