

Influence of nutrient medium components ,sucrose and tyrosine on callus induction , papaverine and noscapine alkaloids production on *Papaver somniferum* In vitro

تأثير مكونات الوسط الغذائي والسكروز والتايروسين في استحثاث الكالس و انتاج قلويدات البابافرين والنسكابيين من نبات الخشخاش *Papaver somniferum*. خارج الجسم الحي

د.محمد شهاب حمد

كلية الزراعة /جامعة بغداد

المستخلص:

اجريت الدراسة في مختبرات زراعة الانسجة النباتية -كلية الزراعة - جامعة بغداد ومختبرات مركز الرقابة والبحوث الدوائية في وزارة الصحة خلال المدة من ايلول 2008 ولغاية تشرين الاول 2009 . اشارت النتائج الى تفوق الوسط الغذائي MS على الوسط B₅ فأعطى اعلى معدل وزنين طري وجاف للكالس بلغا 155.1 و14.54 ملغم، على التوالي مقارنة مع الوسط B₅ الذي اعطى معدل وزنين طري وجاف للكالس بلغا 127.4 و11.81 ملغم على التوالي . وبينت النتائج ان وسط MS المجهز بتركيز 0.3 و 0.5 ملغم / لتر من BA و NAA ،على التوالي اعطى اعلى معدل للوزنين الطري والجاف للكالس بلغا 357.4 و33.71 ملغم، على التوالي مقارنة مع التركيز نفسه من BA و NAA في وسط B₅ الذي اعطى 253.3 و23.4 ملغم للوزنين الطري والجاف للكالس على التوالي . اعطى الوسط MS المجهز بتركيز 30غم / لتر سكروز اعلى معدل للوزنين الطري والجاف للكالس بلغا 548.5 و51.6 ملغم على التوالي . وانخفض معدل الوزنين الطري والجاف للكالس بزيادة تركيز السكروز الى 60 و90 و120غم / لتر فبلغ 445.5 و333.3 و257.8 ملغم للوزن الطري و 45.7 و34.1 و24.0 ملغم للوزن الجاف على التوالي . وتشير النتائج ان وسط MS المجهز بتركيز 30 غم / لتر سكروز و 20 ملغم / لتر تايروسين اعطى اعلى معدل للوزنين الطري والجاف للكالس بلغا 598.5 و53.9 ملغم على التوالي . تفوق الوسط MS المجهز بتركيز 90غم / لتر سكروز وسجل اعلى قيمة عند التركيز 30 ملغم / لتر تايروسين لقلويد البابافرين والنسكابيين بلغا 3.9 و5.9 ملغم / غم وزن طري للكالس على التوالي ، بينما كانت اقل القيم للبابافرين والنسكابيين عند معاملة المقارنة 2.3 و2.5 ملغم / غم كالس طري على التوالي .

Abstract

A study was conducted at the tissue culture lab.College of Agriculture /University of Baghdad and Drug Research Center /Health Ministry during the period Sep. 2008 till Oct.2009 . Result indicated that MS medium was superior in both fresh and dry weights of callus 155.1 ; 14.54 mg respectively , compared with B₅ medium that gave 127.4 ; 11.81 mg for both fresh and dry weights of callus, respectively .Results showed that MS medium supplemented with 0.3 mg/l BA and 0.5 mg/ l of NAA gave the highest values of fresh and dry weights of callus 357.4 ; 33.71mg, respectively compared with B₅ medium supplemented with the same concentration of BA and NAA which gave 253.3 ; 23.4 mg for both fresh and dry weights of callus ,respectively . Results indicated that MS medium supplemented with 30g/l of sucrose gave the highest values 548.5 ; 51.6 fresh and dry weights of callus ,respectively . However, values of both parameters were reduced with the increasing of sucrose concentration up to 60 ; 90 and120 g/L , it gave 445.5 ; 333.3 and 257.8 mg and 45.7 ; 34.1 and 24.0 mg for both fresh and dry weights of callus, respectively. MS medium supplemented with 30g/L sucrose and 20 mg/L tyrosine gave the highest values 598.5 ; 53.9 mg of both fresh and dry weights of callus, respectively . MS medium supplemented with 90g/L sucrose and 30 mg/L tyrosine gave the highest values 3.9 ; 5.9 mg/g of papaverine and noscapine for fresh callus weight, respectively . While, the lowest values of papaverine and noscapine 2.3 ; 2.5 mg/g for fresh callus weight respectively of control treatment.

المقدمة :-

يعد نبات الخشخاش *Papaver somniferum* الذي يعود للعائلة الخشخاشية *Papaveraceae* ذو أهمية طبية واقتصادية كبيرة لاحتوائه على قلويدات عديدة (1). فقد ذكر (٢) ان اكثر من 12000 قلويدا معروفا في النباتات غالباً ما يستخدم كمواد طبية ويعد الخشخاش اكثرها اهمية كمصدر طبي واقتصادي للقلويدات المورفينية *Morphinan alkaloids* مثل *morphine* و *codeine* و *thebaine* والقلويدات غير المورفينية *non morphinan alkaloids* مثل *noscipine* و *papaverine* التي تنتج من الصناعة الصيدلانية كمواد مسكنة *analgesic*. وقد بين (٣) انه عند زراعة الخلايا في نبات الخشخاش ان كمية القلويدات غير المورفينية كانت اعلى من القلويدات المورفينية .

يعتمد نشوء الكالس الذي هو عبارة عن خلايا برنكيمية غير متميزة تنشأ على مناطق القطع او الجروح للاجزاء النباتية على مكونات الوسط الغذائي التي لها تأثير كبير في نشوء الكالس وادامته (٤) استخدمت تقنية زراعة الانسجة النباتية للتغلب على بعض المعوقات التي تواجه طرائق الزراعة التقليدية للنباتات المنتجة لمثل هذه المركبات لاسباب تتعلق بالمناخ او ظروف التربة والحصول على نقاوة عالية ولا اعتبارات اقتصادية (٥ و ٦). ان كل هذه العوامل شجعت على انتاج المركبات الثانوية *Secondary products* تحت ظروف مسيطر عليها في مختبرات زراعة الانسجة النباتية لتجاوز بعض الصعوبات في استخلاص المركبات الفعالة ولتوفير المصادر النباتية على مدار السنة بكميات كافية بدلاً من الحصول عليها من المادة الخام (٧). و اشارت منظمة الصحة الدولية (WHO) ان 80% من سكان العالم يعتمدون على الادوية من مصادر نباتية في العلاج الطبي (٨). وغالباً ما تتجمع هذه المواد (نواتج الايض الثانوي) في خلايا وانسجة نباتية خاصة في مراحل تطور محددة من زراعة الخلايا والانسجة النباتية مقارنة بمركبات الايض الاولي كالكربوهيدرات والليبيدات والبروتينات التي تنتج بالنبات باكماله او في عضو معين منه (٩) ويزداد تكوين هذه المركبات عند تعرض النبات للاجهاد *stress*. لهذا يعد استخدام تقانة زراعة الانسجة النباتية في زيادة انتاج النباتات الطبية من المركبات الفعالة صيدلانياً قياساً بالكمية التي تنتجها النباتات الام من الاستخدامات التطبيقية لهذه التقانة (10 و 11). فقد تمكنت (١٢) من زيادة كمية المركبات الثانوية التي تستخدم في المجال الطبي لقلويدي المورفين والكودائين في الكالس المستحث من بادرة نبات الخشخاش وقلويدات التروبان في نبات البلادونا (١٣ و ١٤). وذكر بعض الباحثين ان اضافة الاحماض الامينية الى الوسط الغذائي خارج الجسم الحي لاتعمل كمركب بادئ فقط (Precursor) بل كمحفز (Elicitor) ايضاً (١٥ و ٦).

ونظراً لاهمية القلويدات عموماً وقلويدات *papaverine* و *noscipine* في العلاج الطبي والصيدلاني التي تتواجد في نباتات العائلة الخشخاشية كناتج ايض ثانوي ولاجل السيطرة على انتاجها لاغراض صيدلانية وحصره حكومياً وعدم التجارة به. هدفت هذه الدراسة الى نشوء واستحثاث الكالس من بادرات الخشخاش على وسطي MS و B₅ باستخدام انواع وتراكيز مختلفة من منظمات النمو النباتية وحث انسجة الكالس على زيادة انتاجها من قلويدي *papaverine* و *noscipine* عن طريق تعريضها لاجهاد معين مع اضافة البادئ البنائي المناسب والكشف كماً ونوعاً عن هذين المركبين باستخدام جهاز كروماتوغرافيا السائل ذو الاداء العالي (HPLC).

المواد وطرائق العمل :-

نفذت التجارب في مختبرات زراعة الانسجة النباتية – كلية الزراعة – جامعة بغداد ومختبرات مركز الرقابة والبحوث الدوائية في وزارة الصحة خلال المدة من ايلول 2008 ولغاية تشرين الاول 2009.

١- تحضير الوسط الغذائي :-

استعملت املاح الوسط الغذائي MS (١٦) و B₅ (١٧) و اضيف الى املاح الوسطين الغذائيين كل من الفيتامينات ومنظمات النمو والسكرول جدول (1) وعدل الرقم الهيدروجيني pH الى 5.7 بمحلول 1 عياري من هيدروكسيد الصوديوم او حامض الهيدروكلوريك. وكذلك اضيف الاوكسين NAA (Naphthalene acetic acid) بالتراكيز (0.5 و 1.0 و 1.5) ملغم / لتر والساييتوكاينين BA (Banzyl adenine) بالتراكيز (0 و 3 و 0.6) ملغم / لتر لايجاد التركيز المناسب لاستحثاث الكالس من القمة النامية لبادرات الخشخاش بعمر اسبوع النامية من البذور التي تم تعقيمها بمادة هايبيوكولات الصوديوم بتركيز 3% لمدة 15 دقيقة (١٢). وسخن الوسط الغذائي بواسطة جهاز الخلاط المغناطيسي الحراري Hot plate magnetic stirrer وبعد ان اصبح الوسط متجانساً وزع في انابيب الزراعة ثم عقت بجهاز الموصدة Autoclave على درجة حرارة 121م° وتحت ضغط 1.04 كغم/سم^٢ ولمدة 20 دقيقة .

٢- زراعة القمم النامية

اخذت البادرات واستصلت منها القمم النامية بطول 1 ملم (١٢) وزرعت على الاوساط الغذائية المعدة لاستحثاث الكالس

وبواقع عشرة مكررات لكل معاملة وحضنت الزروع في الظلام التام على درجة حرارة 25 ± 2م°

٣- قياس الوزن الطري والجاف للكالس المستحث

قيس الوزن الطري والجاف للكالس بعد خمسة اسابيع من الزراعة باستخدام ميزان حساس حيث استخرجت قطع الكالس الطري ووضعت على ورق ترشيع وازيلت بقايا الوسط الغذائي الملتصقة بها وحسب الوزن الطري. جففت قطع الكالس الطري في فرن كهربائي Oven على درجة حرارة 70م° وتم تسجيل وزنها عند ثبات الوزن. وقد استخدم معيار الوزن الطري والجاف للكالس المستحث في مرحلة النشوء لتحديد افضل وسط غذائي وافضل نوع وتركيز من الاوكسين والساييتوكاينين .

٤- ادامة الكالس

تم زراعة الكالس الناتج من مرحلة الاستحثاث في وسط MS المجهز بتوليفة من NAA بالتراكيز (1.0، 0.50، 0.25، 0) ملغم / لتر والـ BA بالتراكيز (1.0، 0.50، 0.25، 0) ملغم / لتر لمعرفة افضل وسط لادامة الكالس حيث زرع 100 ملغم من الكالس في وسط MS واخذت القياسات بعد خمسة اسابيع من الزراعة

جدول (1) مكونات الوسطين الغذائيين من المركبات العضوية الخاصة باستحثاث الكالس

محتويات الوسط الغذائي (ملغم/ لتر)		المادة
B ₅	MS	
قوة كاملة	قوة كاملة	الأملاح
1.0	0.5	Pyrodoxine- HCl
-	2.0	Glycine
1.0	0.5	Nicotinc acid
0.01	0.1	Thiamine- HCl
100	100	Myo-inositol
حسب التراكيز المستعملة بالتجربة	حسب التراكيز المستعملة بالتجربة	NAA,BA
0.2	0.2	Kinetin
20000	30000	Sucrose
7000	7000	Agar

٥- زراعة الكالس في الوسط المجهز بتراكيز مختلفة من السكروز والتايروسين اخذ وزن 150 ملغم من الكالس المستحث من القمة النامية لبادرات الخشخاش وزرع على الوسط الغذائي MS المجهز بالتراكيز 0.50 ملغم / لتر من كل من NAA و BA و اضيف السكروز بالتراكيز (30، 60، 90، 120) غم / لتر و التايروسين بالتراكيز (0، 10، 20، 30، 40) ملغم / لتر الى الوسط الغذائي وواقع عشرة مكررات لكل تركيز . حضنت الزروعات في الظلام وعلى درجة حرارة 25 ± 2 م وبعد خمسة اسابيع اخذ الوزنين الطري والجاف للكالس باستخدام ميزان حساس ثم اجريت عملية الاستخلاص.

٦- استخلاص الفلويديات من الكالس

اخذ وزن 2.5 غم من الكالس الطري لكل معاملة ثم غسل بالماء المقطر للتخلص من بقايا الوسط الغذائي ثم عومل وفق طريقة (١٨)

٧- التقدير الكمي والنوعي للفلويديات غير المورفينية باستعمال جهاز الكروموتوغرافيا السائل ذو الاداء العالي (HPLC).

- تحضير المحلول القياسي من Noscapine

اخذ 10 ملغم من النوسكابيين وخفف باستعمال 10 مل من الأيثانول ليكون التركيز النهائي 1 mg/ 1ml (Noscapine:Ethanol)

- تحضير المحلول القياسي من Papaverine

اخذ 10 ملغم من البابافيرين وخفف باستعمال 10 مل من الأيثانول ليكون التركيز النهائي 1 mg/ 1ml (Papaverine:Ethanol)

تم سحب مقدار 1 سم³ لكل من المحلولين القياسيين للنوسكابيين والبابافيرين وحقن في جهاز HPLC لتحديد زمن الاحتجاز Retention time وارتفاع حزمة العينة Area للمحلولين القياسيين بعدها استخدم المستخلص للتحليل في جهاز HPLC حيث اذبيت العينة الجافة الناتجة عن طريق الاستخلاص في 2.5 سم³ من الايثانول وحقن حجم 1 سم³ منها في عمود Column من نوع C18 5mm MSPL1 ذي أبعاد (12 CM x 4.6 MM) وطور متحرك Mobile phase يتكون من Eethanol: 0.3% ammonium carbonate in water وكانت سرعة جريان الجهاز 2ml/1 min وقد قيست القراءات على طول موجي قدره 285 نانوميتر وحسب زمن الاحتجاز وتركيز العينات حسب المعادلة الآتية كما وردت في ١٩:

ارتفاع حزمة العينة × تركيز المحلول القياسي

$$\frac{\text{ارتفاع حزمة العينة} \times \text{تركيز المحلول القياسي}}{\text{ارتفاع حزمة المحلول القياسي}} = \text{التركيز (ملغم)}$$

٨- التحليل الاحصائي

نفذت جميع التجارب باستخدام التصميم العشوائي الكامل CRD بتجارب عاملية وحلت النتائج باستخدام البرنامج الإحصائي SAS (20) وقورنت المتوسطات حسب اختبار اقل فرق معنوي L.S.D وعلى مستوى احتمال 0.05

النتائج والمناقشة :-

١- تأثير نوع الوسط الغذائي وتراكيز BA و NAA والتداخل بينهما في معدل الوزنين الطري والجاف للكالس (ملغم) تشير النتائج في الجدول (2 أ و ب) الى وجود فروقات معنوية في نوع الوسط الغذائي للوزنين الطري والجاف للكالس . اذ تفوق الوسط الغذائي MS على الوسط الغذائي B5 واعطى اعلى معدل وزنين طري وجاف للكالس بلغا 155.1 و14.54 ملغم ، على التوالي . كما اثر التداخل بين نوع الوسط الغذائي وتراكيز BA معنوياً في الوزنين الطري والجاف للكالس فأعطى الوسط MS المجهز بالتركيز 0.3 ملغم / لتر من BA اعلى معدل بلغا 231.3 و 21.70 ملغم للوزنين الطري والجاف للكالس على التوالي . بينما اعطى الوسط الغذائي B5 عند التركيز نفسه من BA 156.2 و 14.42 ملغم للوزنين الطري والجاف ، على التوالي . وكان للتداخل بين الوسط MS وتراكيز NAA تأثيراً معنوياً فأعطى الوسط MS المجهز بتركيز 0.5 ملغم / لتر من NAA اعلى معدل بلغا 222.3 و 20.86 ملغم للوزنين الطري والجاف على التوالي والذي لم يختلف معنوياً عن التركيز 1 ملغم / لتر من NAA الذي اعطى 214.4 و 20.09 ملغم للوزنين الطري والجاف على التوالي . في حين اعطى الوسط B5 المجهز بتركيز 0.5 ملغم / لتر NAA 184.4 و 17.0 ملغم للوزنين الطري والجاف للكالس الذي اختلف معنوياً عن تراكيز NAA الاخرى المضافة الى الوسط الغذائي نفسه ، وبالنسبة للتأثير المشترك لنوع الوسط الغذائي وتراكيز BA و NAA فيلاحظ ان القمم النامية المزروعة في وسط MS المزود بـ 0.3 ملغم / لتر BA + 0.5 ملغم / لتر NAA قد اعطى اعلى معدل بلغا 357.4 و 33.71 ملغم للوزنين الطري والجاف للكالس على التوالي والذي اختلف معنوياً عن جميع التداخلات .

من خلال ماتقدم من نتائج وجد ان الوسط MS قد تفوق على الوسط الغذائي B5 وبوجود BA و NAA في معدل الوزنين الطري والجاف للكالس المستحث من القمة النامية وقد يعزى السبب الى التفوق في محتوى الوسط MS العالي من العناصر الغذائية وخاصة عنصر النتروجين الذي يدخل في بناء الاحماض الامينية والنوية والمرافقات الانزيمية (21 و 22) مما شجع نمو وتطور الجزء النباتي المزروع كما قد يرجع الى زيادة السكر بالوسط MS وهو المصدر الكربوهيدراتي الذي يزود الخلية بالطاقة اللازمة للنمو والبقاء (23) وهذا يتفق مع ماتوصلت اليه (12) على نبات الخشخاش و (14) على نبات البلادونا اللتين وجدنا ان وسط MS كان افضل من وسط B5 في استحثاث الكالس من القمة النامية للبادرات . ويستنتج ان التركيز 0.3 ملغم / لتر من BA والتركيز 0.5 ملغم / لتر من NAA في وسط MS كان التركيز الامثل الذي اعطى اعلى معدل للوزنين الطري والجاف للكالس المستحث من القمة النامية .

وقد يعود سبب ذلك الى تأثير منظمات النمو في تشجيع الخلايا على الانقسام والانتساع فضلاً عن تأثيرها في الصفحة الوسطى للخلايا مما يساعد على اتساع الجدار الخلوي وذلك عند الوصول الى التوازن الامثل بين الاوكسين والساييتوكاينين اذ يعمل الساييتوكاينين بوجود الاوكسين في الوسط الغذائي كمفتاح لبدء لانقسام الخلوي، اما عند زيادة التركيز فإنه يؤدي الى الاخلال بالتوازن الامثل مما يؤدي الى انخفاض معدل وزن الكالس (٧) وقد لوحظ ان اضافة الاوكسينات الى الوسط الغذائي وبتركيز اعلى من التركيز المثالي فإنه يؤثر في عمل الانزيمات المسؤولة عن بناء الجدار الخلوي وتحللها مما يؤثر في الخصائص الميكانيكية للجدار والتأثير في انقسام الخلايا وتكوين الكالس (٢٢) تتفق هذه النتائج مع ماتوصلت اليه (٢٤، ٢٥، ٢٦، ٢٧). من ان وجود الساييتوكاينين مع الاوكسين قد حفز استحثاث الكالس من الاجزاء النباتية المزروعة على وسط MS.

٢- تأثير NAA و BA وتداخلهما في ادامة الكالس المستحث . تشير النتائج في الجدول (3 أ و ب) الى تفوق الوسط الغذائي MS المجهز بالتركيز 0.5 ملغم / لتر NAA في اعطاء اعلى معدل لوزني الكالس الطري والجاف بلغا 373.1 و 33.7 ملغم على التوالي . الذي اختلف معنوياً عن التراكيز الاخرى . وتوضح النتائج في الجدول نفسه تفوق BA بالتركيز 0.50 ملغم / لتر في اعطاء اعلى معدل لوزني الكالس الطري والجاف بلغا 375.2 و 34.31 ملغم على التوالي الذي اختلف معنوياً عن التراكيز الاخرى . وعن تأثير التداخل بين تراكيز NAA و BA المضافة الى الوسط الغذائي فقد اظهرت النتائج الجدول نفسه الى تفوق الوسط المجهز بتركيز 0.5 ملغم / لتر NAA و 0.5 ملغم / لتر BA اذ اعطى اعلى معدل لوزني الكالس الطري والجاف بلغا 532.30 و 50.22 ملغم على التوالي والذي اختلف معنوياً عن بقية التداخلات .

يلاحظ ان النمو الجيد للكالس يكون من خلال التوازن بين تراكيز الاوكسينات والساييتوكاينينات وان الزيادة في تراكيز اي منهما على حساب الاخر سوف يؤثر سلباً في نمو الكالس (٢٨، ٤٠) . ان فعالية الساييتوكاينين في احداث الانقسام تزداد بوجود الاوكسين في الوسط الغذائي وعند المستوى المناسب من التركيز (٧، ٢٧) تتفق هذه النتائج مع ماتوصلت اليه (١٤) من ان اضافة تراكيز معينة من الاوكسين والساييتوكاينين قد حفز نمو وادامة الكالس المستحث من القمة النامية لبادرة البلادونا .

٣- تأثير تراكيز السكر والتايروسين في معدل الوزنين الطري والجاف للكالس (ملغم) . يوضح الجدول (4 أ و ب) انخفاض معدل وزني الكالس الطري والجاف معنوياً بزيادة تراكيز السكر المضافة الى وسط MS المجهز بتركيز 0.5 ملغم / لتر من NAA و BA اذ اعطى وسط MS المجهز بتركيز 30 غم / لتر من السكر اعلى معدل وزنين طري وجاف للكالس بلغا 548.5 و 51.6 ملغم على التوالي وانخفض معدل وزني الكالس الطري والجاف عند التركيز 120 غم / لتر من السكر فبلغا 257.8 و 24.0 ملغم على التوالي . ويشير الجدول نفسه الى ان الوسط MS المجهز بالتركيز 20 ملغم / لتر من التايروسين اعطى اعلى معدل وزن طري للكالس بلغ 412.3 ملغم في حين بلغ اقله 356.2 ملغم عند

التركيز 40 ملغم / لتر من التايروسين . واطهرت النتائج تفوق التركيز 0 ملغم / لتر من الحامض الاميني التايروسين في اعطاء اعلى معدل وزن جاف للكالس بلغ 41.5 ملغم وبلغ اقله 35.3 ملغم عند التركيز 30 ملغم / لتر من الحامض الاميني التايروسين . وتشير النتائج في الجدول نفسه الى تفوق التركيز 30 غم / لتر سكروز مع 20 ملغم / لتر من التايروسين معنوياً في اعطاء اعلى معدل لوزن الكالس الطري بلغ 598.5 ملغم عن بقية التداخلات . في حين اعطى التركيز نفسه من السكروز والتايروسين اعلى معدل لوزن الكالس الجاف بلغ 53.9 ملغم .

قد يعزى السبب في تفوق الوسط الغذائي المجهز بتركيز 30 غم / لتر سكروز في وزني الكالس الطري والجاف الى ان السكروز هو المصدر الكربوهيدراتي الذي يزود الخلايا بالطاقة اللازمة للنمو والبقاء (٤) وعند زيادة تراكيز السكروز المضافة الى الوسط الغذائي عن المستوى المناسب يسبب زيادة في الشد stress او الجهد الازموزي المسلط على الخلايا الذي يسبب انخفاض في جاهزية الماء وبالتالي المواد الغذائية الذائبة فيه والذي يؤثر في نمو الكالس وايض بعض المركبات الخلوية (٢٩) . وبالتالي فإن السكروز المضاف الى الوسط الغذائي يعد مصدراً للطاقة فضلاً عن المحافظة على جهد اوزموزي مناسب في وسط الزراعة (٤) ، وهذا يتفق مع ما وجدته (٣٠، ١٢، ١٤) من ان اضافة التراكيز العالية من السكروز تؤدي الى انخفاض في الوزنين الطري والجاف للكالس المستحث من الاجزاء النباتية .

جدول (2): تأثير نوع الوسط الغذائي وتراكيز BA وال-NAA والتداخل بينهما في معدل الوزن الطري والجاف للكالس (ملغم) بعد خمسة اسابيع من الزراعة

أ.1: الوزن الطري

المعدل	تراكيز NAA (ملغم / لتر)				تراكيز BA (ملغم / لتر)	نوع الوسط الغذائي
	1.5	1.0	0.5	0.0		
95.5	127.1	118.9	136.2	0.0	0.0	MS
231.3	241.3	326.8	357.4	0.0	0.3	
138.6	183.4	197.7	173.5	0.0	0.6	
155.1	183.9	214.4	222.3	0.0	المعدل	
100.7	126.5	143.6	132.8	0.0	0.0	B ₅
156.2	172.9	198.7	253.3	0.0	0.3	
125.4	162.2	172.4	167.3	0.0	0.6	
127.4	153.8	171.5	184.4	0.0	المعدل	
الوسط X NAA = 10.85				الوسط الغذائي = 9.76		قيمة L.S.D
التداخل الثلاثي = 14.96				الوسط X BA = 11.55		

ب.2: الوزن الجاف

المعدل	تراكيز NAA (ملغم / لتر)				تراكيز BA (ملغم / لتر)	نوع الوسط الغذائي
	1.5	1.0	0.5	0.0		
8.65	11.63	10.85	12.13	0.0	0.0	MS
21.70	22.46	30.65	33.71	0.0	0.3	
13.28	17.58	18.79	16.75	0.0	0.6	
14.54	17.22	20.09	20.86	0.0	المعدل	
9.26	11.57	13.33	12.14	0.0	0.0	B ₅
14.42	16.18	18.12	23.41	0.0	0.3	
11.75	15.14	16.26	15.63	0.0	0.6	
11.81	14.29	15.90	17.06	0.0	المعدل	
التداخل الثلاثي = 1.9				الوسط الغذائي = 0.8		قيمة L.S.D
الوسط X NAA = 1.2				الوسط X BA = 1.1		

جدول (3): تأثير تراكيز NAA والـ BA والتداخل بينهما في ادامة الكالس (الوزن الطري والجاف) ملغم بعد خمسة اسابيع من الزراعة (الوزن الابتدائي 100 ملغم)

3.أ: الوزن الطري (ملغم)

المعدل	تراكيز BA (ملغم / لتر)				تراكيز NAA (ملغم / لتر)
	1.00	0.50	0.25	0.0	
145.4	134.6	169.5	137.1	131.4	0.0
350.3	263.4	486.9	427.2	223.7	0.25
373.1	252.6	532.3	471.5	236.3	0.50
291.5	259.8	312.2	364.3	229.8	1.00
19.88	32.46				ا.ف.م. 0.05
	229.8	375.2	350.0	205.3	المعدل
	19.88				ا.ف.م. 0.05

3 ب. الوزن الجاف (ملغم)

المعدل	تراكيز BA (ملغم / لتر)				تراكيز NAA (ملغم / لتر)
	1.00	0.50	0.25	0.0	
13.37	12.28	16.83	12.26	12.13	0.0
31.75	23.12	42.56	41.18	20.14	0.25
33.70	22.72	50.22	41.94	19.94	0.50
24.78	22.96	27.65	29.66	18.87	1.00
1.17	2.85				ا.ف.م. 0.05
	20.27	34.31	31.26	17.77	المعدل
	1.17				ا.ف.م. 0.05

جدول (4): تأثير السكروز والتايروسين والتداخل بينهما في معدل الوزن الطري والجاف للكالس (ملغم) المستحث من القمه النامية بعد خمسة اسابيع من الزراعة (الوزن الابتدائي 150 ملغم)

4.أ: الوزن الطري (ملغم)

المعدل	تراكيز السكروز (غم / لتر)				تايروسين (ملغم / لتر)
	120	90	60	30	
438.4	276.5	391.3	518.4	567.5	0
411.1	259.8	357.2	478.7	548.6	10
412.3	264.3	340.7	437.8	598.5	20
363.4	248.9	294.8	381.4	528.6	30
356.2	239.6	274.6	411.3	499.2	40
20.9	43.6				أ.ف.م. 0.05
	257.8	333.3	445.5	548.5	المعدل
	19.4				أ.ف.م. 0.05

4 ب: الوزن الجاف (ملغم)

المعدل	تراكيز السكروز (غم / لتر)				تايروسين (ملغم / لتر)
	120	90	60	30	
41.5	24.5	38.6	50.1	52.8	0
40.0	23.7	36.4	48.7	51.2	10
39.7	24.0	35.8	45.3	53.9	20
35.5	23.2	30.1	38.1	50.8	30
37.4	24.6	29.3	46.5	49.3	40
2.4	5.8				أ.ف.م. 0.05
	24.0	34.1	45.7	51.6	المعدل
	2.2				أ.ف.م. 0.05

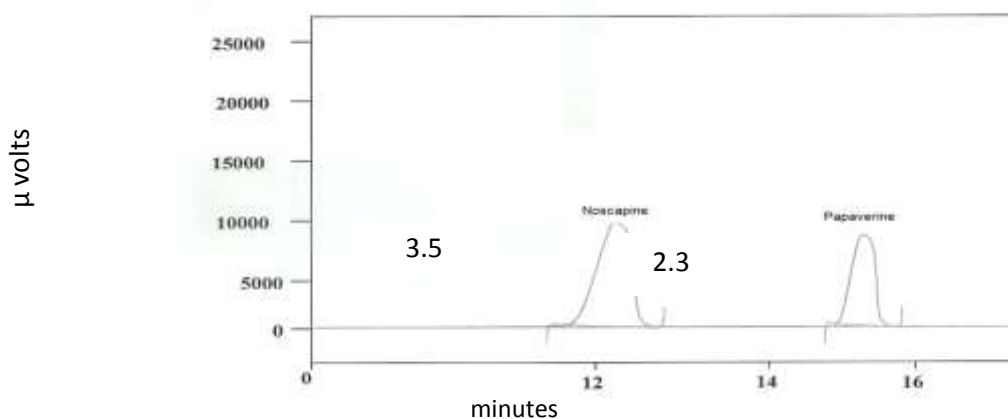
٤- تأثير التداخل بين تراكيز السكروز والتايروسين في محتوى الكالس الطري من البافيرين والنسكاين. يلاحظ من النتائج المبينة في جدول (5) والمقدرة بجهاز HPLC ان هناك زيادة في كمية فلويدى البافيرين والنسكاين المستخلصة من الكالس الطري للقيمة النامية لبادرة الخشخاش استجابة لزيادة تراكيز السكروز والتايروسين المضافة الى الوسط الغذائي MS المجهز بـ0.5 ملغم / لتر من كل من NAA و BA . حيث يتبين من الوسط الغذائي MS المجهز بتركيز 30غم / لتر سكروز ان هناك استجابة في انتاج الفلويدين بزيادة تراكيز التايروسين والمضافة للوسط عند وجود مستوى ثابت من السكروز . حيث بلغت اقل قيمتين عند معاملة المقارنة 2.3 و3.5 ملغم / غم من البافيرين والنسكاين ، على التوالي شكل (1) . وعلى قيمتين في الوسط MS المجهز بتركيز 30 ملغم / لتر من التايروسين بلغا 3.2 و5.2 ملغم / غم من البافيرين والنسكاين ، على التوالي شكل (2). ثم انخفضت الاستجابة بزيادة تركيز التايروسين الى 40ملغم / لتر اذ اعطى 3.1 و4.8 ملغم / غم من البافيرين والنسكاين على التوالي. كما تبين النتائج في الجدول نفسه ان الوسط الغذائي MS المجهز بتركيز 60غم / لتر سكروز ان هناك استجابة اعلى من الوسط السابق في انتاج فلويدى البافيرين والنسكاين بزيادة تركيز التايروسين المضاف للوسط فبلغت اعلى قيمتين 3.5 و5.5 ملغم / غم بابافيرين ونسكاين عند التركيز 30ملغم / لتر تايروسين شكل(3) . ثم قلت الاستجابة بزيادة تركيز التايروسين الى 40 ملغم / لتر اذ بلغا 3.3 و5.1 ملغم / غم بابافيرين ونسكاين على التوالي . وقد تفوق الوسط الغذائي MS المجهز بتركيز 90 غم / لتر سكروز فأعطى اعلى استجابة في كمية الفلويدات بزيادة تراكيز التايروسين المضافة الى الوسط الغذائي عند وجود مستوى ثابت من السكروز حيث بلغت اقل قيمتين 2.9 و4.2 ملغم / غم بابافيرين ونسكاين على التوالي عند معاملة المقارنة كما في الشكل (4) ثم تلاها التركيز 20ملغم / لتر تايروسين فبلغا 3.7 و5.7 ملغم / غم بابافيرين ونسكاين على التوالي شكل (5) وبلغت اعلى قيمتين للبافيرين والنسكاين 3.9 و5.9 ملغم / غم على التوالي عند التركيز 30 ملغم / لتر تايروسين شكل (6). ثم قلت الاستجابة بزيادة تركيز التايروسين الى 40ملغم / لتر فبلغا 3.6 و5.6 ملغم / غم من البافيرين والنسكاين على التوالي . ثم قلت الاستجابة لانتاج الفلويدات في الوسط الغذائي MS المجهز بتركيز 120 غم / لتر من السكروز واذ بلغا 2.7 و4.0 ملغم / غم بابافيرين ونسكاين على التوالي في معاملة المقارنة وبلغت اعلى قيمة في الوسط الغذائي نفسه عند التركيز 30 ملغم / لتر من التايروسين اذ بلغا 3.4 و5.7 ملغم / غم بابافيرين ونسكاين على التوالي شكل (7).

قد يعود السبب في زيادة انتاج الفلويدات بزيادة تراكيز الحامض الاميني التايروسين المضافة الى كونه البادئ البنائي للعديد من فلويدات الـ Benzylisoquinoline مثل البافيرين والنسكاين (٣١) فمن الوظائف المهمة للاحماض الامينية توفير الهيكل الكربوني والمكونات النايتروجينية للفلويدات (٣٢) فضلاً عن ان زيادة تراكيز الاحماض الامينية المضافة سوف يؤدي الى زيادة المركبات النايتروجينية الدائبة في داخل الخلايا مما يؤدي الى زيادة جهدها الازموزية الامر الذي يدفعها لسحب الماء من الخلايا المجاورة فتمتلى وتضغط على جدار الخلية الذي ربما يؤدي الى اتلاف الخلايا والذي له تأثير سلبي في محتواها من المركبات الثانوية (٣٣) او قد يعود السبب الى ان زيادة الاجهاد قد يسبب انخفاض قابلية الخلايا على امتصاص العناصر الغذائية التي تحتاجها لانتاج مركبات الايض الاولى وبالتالي قل انتاج الايض الثانوي الذي يعد ناتجا نهائيا للايض الاولى (٢٢).

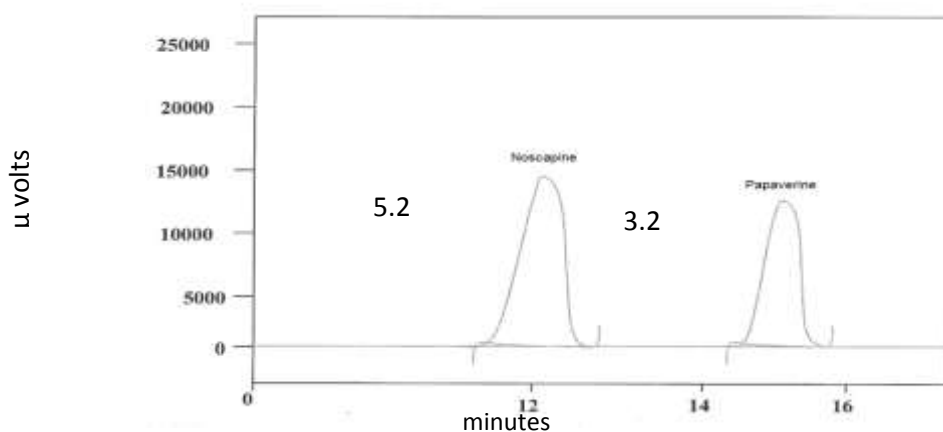
ويلاحظ ان هناك زيادة تدريجية في كمية فلويدى البافيرين والنسكاين في مستخلص كالس نبات الخشخاش بزيادة تراكيز السكروز المضافة للوسط حيث ان تعريض نسيج الكالس الى ظروف الشد stress يؤدي الى تحفيز خلاياه لانتاج مركبات الايض الثانوي وبكميات اكبر من النبات الام وهذا ما اكده (٢٩) . وتتفق هذه النتائج مع مذكره (٢٩، ٢١) في انتاج المركبات الثانوية خارج الجسم الحي، وتتفق مع ما وجدته (٣٤) من ان اضافة السكروز والتايروسين تؤدي الى زيادة انتاج فلويدى المورفين والكودائين من كالس نبات الخشخاش خارج الجسم الحي.

جدول(5): تأثير التداخل بين تراكيز السكروز والتايروسين في محتوى الكالس الطري من البابافرين والنسكابين (ملغم/غم وزن طري) بعد خمسة اسابيع من الزراعة

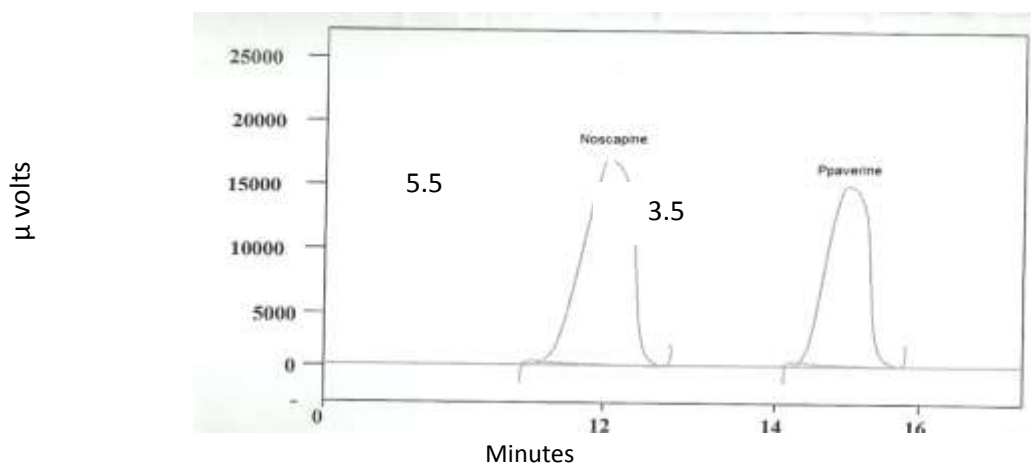
السكروز (غم/لتر)	التايروسين(ملغم/لتر)	Papaverine (ملغم/غم) وزن طري	Noscapine (ملغم/غم) وزن طري
30	0	2.3	3.5
	10	2.6	4.5
	20	2.8	5.1
	30	3.2	5.2
	40	3.1	4.8
60	0	2.5	3.9
	10	2.7	4.8
	20	3.0	5.3
	30	3.5	5.5
	40	3.3	5.1
90	0	2.9	4.2
	10	3.4	5.2
	20	3.7	5.7
	30	3.9	5.9
	40	3.6	5.6
120	0	2.7	4.0
	10	3.1	4.5
	20	3.1	5.1
	30	3.4	5.7
	40	3.0	4.7



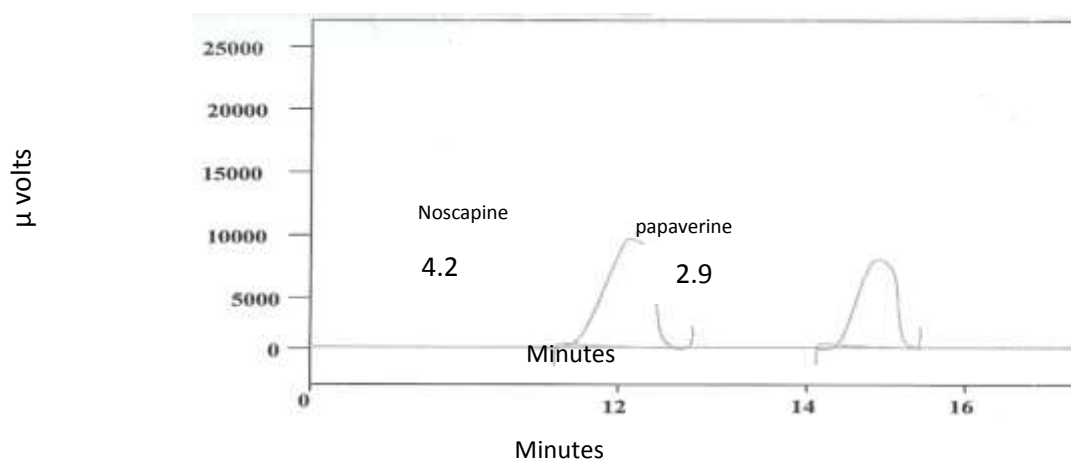
شكل (1): كمية البابافرين والنسكابين (ملغم/غم) في وسط MS المجهز بـ 30 غم / لتر سكروز + 0 ملغم / لتر تايروسين



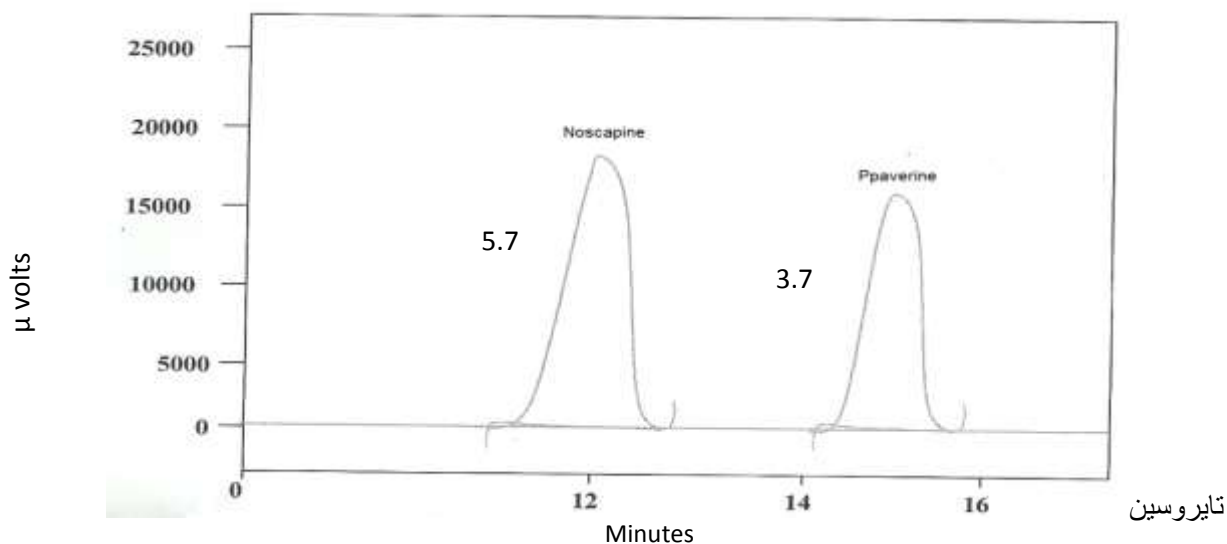
شكل (2): كمية البابافرين والنسكابيين (ملغم /غم) في وسط MS المجهز بـ30 غم /لتر سكروز+30ملغم/لتر تايروسين



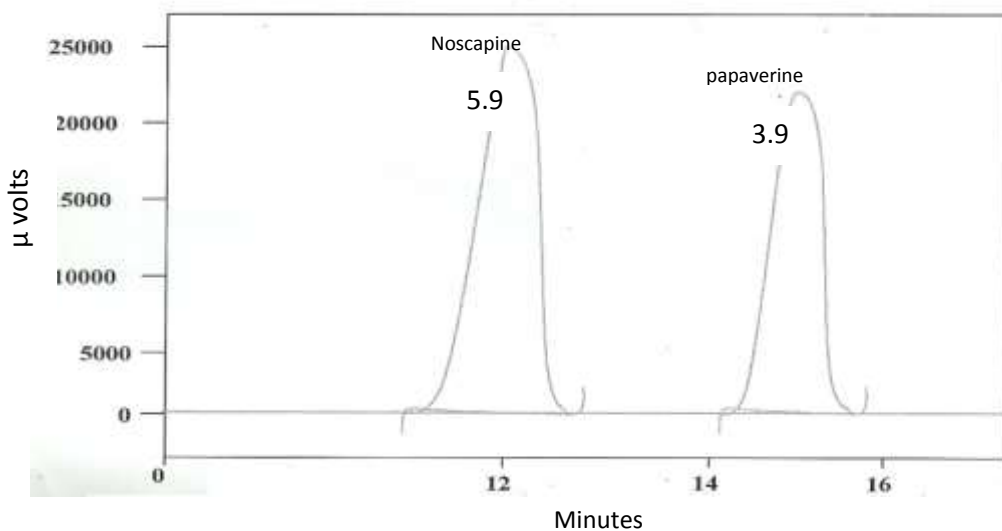
شكل (3): كمية البابافرين والنسكابيين (ملغم /غم) في وسط MS المجهز بـ60 غم /لتر سكروز+30ملغم/لتر تايروسين



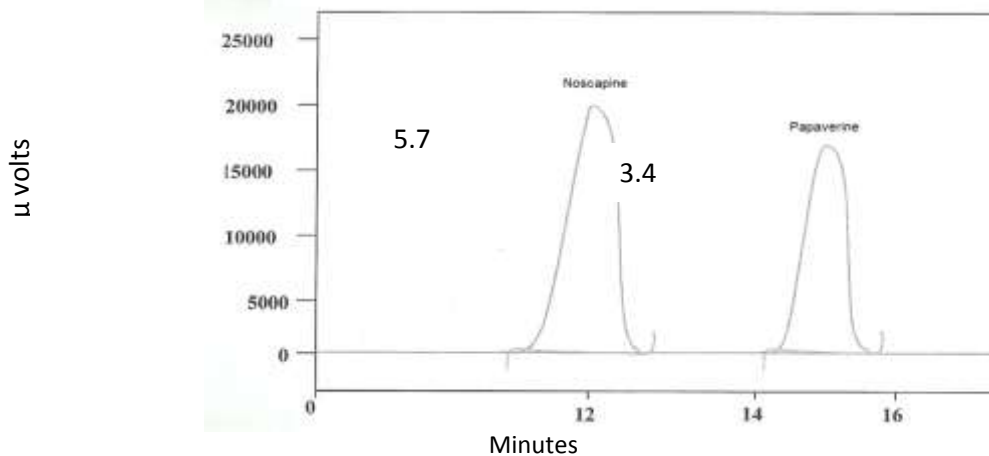
شكل (4): كمية البابافرين والنسكابيين (ملغم /غم) في وسط MS المجهز بـ90 غم /لتر سكروز+0 ملغم/لتر



شكل (5): كمية البابافرين والنسكابين (ملغم /غم) في وسط MS المجهز بـ 90 غم /لتر سكروز + 20 ملغم/لتر تايروسين



شكل (6): كمية البابافرين والنسكابين (ملغم /غم) في وسط MS المجهز بـ 90 غم /لتر سكروز + 30 ملغم/لتر تايروسين



شكل (7): كمية البابافرين والنسكايبين (ملغم /غم) في وسطMS المجهد ب120 غم /لتر سكروز+30 ملغم/لتر تايروسين

المصادر :

- 1- Schiff , J.and L .Paul .(2002). Opium and its alkaloids. American Journal of Pharmaceutical Education, 66:186-194.
- 2- Dehghan ,E ;B .Hosseini ;H .Naghdi and A.F .Shahriari .(2010). Application of convertional and new biotechnological approaches for improving of morphine alkaloids production . Journal of Medicinal Plant , 9(35) 35-50.
- 3- Oluk ,E.A.(2006). Alkaloids production in tissue culture of *Papaver somniferum* L. Plant Tissue Cult., 16(1):1-4.
- 4- George ,E .F; M.A.Hall and G.J.Klerk . (2008) .Plant Propagation by Tissue Culture.3rd edition . Vol.1.
- 5- Mulabagal, I.V., and H . S. Tsay . (2004). Plant cell cultures an alternative and Efficient Source for the Production of Biologically Important Secondary Metabolites . International Journal of Applied Science and Engineering , 2 (1): 29 – 48.
- 6- Karuppussamy ,S.(2009). A review on trends in production of secondary metabolites from higher Plants by *In vitro* tissue , organ and cell culture .Journal of Medicinal plant Research , (13): 1222-1239.
- 7- Neumman, K.H. ,A. Kumar and J. Imani .(2009). Plant Cell and Tissue Culture. A tool in Biotechnology .Berlin.P:212-215.
- 8- Abdel - Rahman .R, H.EL-Din, A.EL-Said and H.D. Khelifa.(2008).Agrobacterium mediated transformation of *Datura metel* L. and tropane alkaloids determination .Research Journal of Cell and Molecular Biology , 2(2): 62-66.
- 9- Lila, M. (2005). Valuable secondary production from *in vitro* culture.Chapter 24. Secondary Products *In vitro*, CRC Press, LLC.
- 10- Park, S.; M.R .Uddian ;Y.K.Kim and S.Y.Lee.(2008).Biotechnological applications for rosmarinic acid production in plant .Afr.J. Bio., 7(25):4954-4965.
- 11- Ibrahim , A .I. ; ,A.E. K . Mostafa ; A. M. Amira and A. E. Asmaa .(2009). Alkaloids production and Organogenesis from callus of *Hyoscyamus muticus* L . *In vitro* . Journal of Applied Sciences Research, 5 (1): 82-92.Cairo,Egypt.
- ١٢- المختار ، سراب عبد الهادي. (2008). دراسة انتاج بعض القلويدات المورفينية من نبات الخشاش *Papaver somniferum* خارج الجسم الحي . رسالة ماجستير . قسم البستنة – كلية الزراعة – جامعة بغداد.
- 13- Marconi .P.L.; LM.Selten ; MA.Alvarez and S.I. Pitta- Alvarez. (2008). Change in growth and tropane alkaloids production of hairy roots of *Brugmansia candida* .J.Integrative Bio .Sci.,3: 38-44.
- ١٤- الساعدي . نوراجبر جاسم .(2011). انتاج بعض قلويدات التروبان من كالس نبات البيلادونا *Atropa belladonna* خارج الجسم الحي . رسالة ماجستير – قسم البستنة – كلية الزراعة – جامعة بغداد .
- 15- Mulabagal ,V.; C.Lee; S.M.Nalawade ; C.Y. Lin and H.Tsay .(2004).Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue culture .Bot .Acad. Sci., 45:1-22.
- 16- Murashige ,T.and F. Skoog . (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture .Physiol. Planta ., 15:4473- 497 .
- 17- Gamborg , O.L. and D.E.Eveleigh . (1968) .Culture methods and detection of glucanases in suspension culture of wheat and barley . Con . J. Biochem .,416 :417 – 421.
- 18- Staba, E.J.; S. Zito and M.Amin(1982). Alkaloids Production from *Papaver* tissue culture. J. Natural Products, 45(3):256-262.

- 19- Vincent P. G. and B. F. Engelke. (1979). High Pressure Liquid Chromatographic determination of the five major alkaloid in *Papaver somniferum*. Assoc. Anal Chem., 62: 310-314.
 - 20- SAS.(2002).SAS /STAT Users Guide for Personal Computer, SAS Institute Inc, Cary, N.C. USA.
 - 21- Ramawat, K. G. (2004). Plant Biotechnology. S. Chand and Company, 4th ed., LTD, Ram Nagar, New Delhi.
 - 22- Taiz and E. Zeiger, (2006). Plant Physiology. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland .
 - 23- Lee, K. J. and Yi, B. Y. (2003). Rapid Multiplication of Basil (*Ocimum basilicum*); Factors affecting callus formation and Plant Regeneration . ISHS. Acta Horticulturae, 625:265-269
 - 24- Ilahi, I. and E.G. Ghauri. (2004). Regeneration in cultures of *Papaver bracteatum* as influenced by growth hormones and temperature, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 38(1): 81-83.
 - 25- Yang , J.; Z.C.Gong and X.Tan .(2008).Induction of callus and extraction of alkaloids from Yi Mu Cao (*Leonurus heterophylus* Sw.) culture. African Journal of Biotechnology ,7(8) :1157-1162
 - 26- Rostampour ,S.; H. Hashemi and A Dehestani .(2010). *In vitro* regeneration of Persian poppy (*Papaver bracteatum*) Biologia , 65(4):647-652.
 - 27- Zakaria , R.A. ; M.H.Hour and N.Zare .(2011). Callus production and regeneration of medicinal plant *Papaver orientale* .African Journal of Biotechnology . 10(54) : 11152-11156.
 - 28- Hedden .P and G. Stephen. (2006).Plant Hormone Signaling .Blackwell Publisher Ltd.pp:97-101.
 - 29- Zhao, J.; Q. Hu; Q.Guo; and W.H. Zhu. (2001). Effects of Stress factors,bioregulators, and synthetic precursor on indole alkaloid production in compact callus cluster cultures of *Catharantus roseus*. Appl. Microbial. Biotechnol., 55: 693-698.
 - 30- Nessler, C.L. (2007). Somatic embryogenesis in the opium poppy , *Papaver somniferum*, Phytochemistry Reviews, 6(1): 97-101
 - 31- Khanna,R.;A.K. Mathur and N.K. Mehrotra. (2005). Selection of 3-fluorotyrosine tolerant callus Lines in two cultivars of Opium poppy(*Papaver somniferum* L.), Current Sci., 88(1):274-280.
 - 32- Sarin, R., .(2005).Useful metabolites from plant tissue cultures. Biotechnology 4 (2) : 79-93. University of Rajasthan , Jaipur , India.
 - 33- Coruzzi, G. M. and R.L. Last. (2000). Amino Acids In Biochemistry and ,Molecular Biologg of plants, Amerecan Society of Plant Phsiology Press: 358-410.
- ٣٤- حمد ، محمد شهاب و ابراهيم عبد الله حمزة وسراب عبد الهادي .(2010). تأثير السكروز والتايروسين في استحثاث الكالس وانتاج المورفين والكودائين من نبات الخشخاش *Papaver somniferum* خارج الجسم الحي . مجلة مركز بحوث التقنيات الاحيائية،المجلد الرابع -العدد الثاني:٤٥-٥٤