EFFECT OF SUCROS AND PHENYLALANIN ON ACCUMALATION OF TROPANE ALKALOIDS IN BALLADONNA *Atropa belladonna* CALLUS IN VITRO

تأثير السكروز والفنيل الانين في تراكم قلويدات التروبان في كالس نبات البلادونا *Atropa belladonna* خارج الجسم الحي

نورا جبر جاسم ألساعدي محمد شهاب حمد
كلية الزراعة / جامعة بغداد

المستخلص

نفذ البحث في مختبر زراعة الأنسجة النباتية – قسم البستنة – كلية الزراعة – جامعة بغداد خلال عامي 2009-2010 وتضمنت الدراسة تأثير كل من السكروز والفنيل الانين في معدل الوزن الطري والجاف للكالس المستحث من القمة النامية لبادرة البلادونا وفي تراكم قلويدات التروبان في الكالس المتضمنة (الاتروبين ، الهيوسيامين ، والهيوسين او الاسكوبولامين) . اظهرت النتائج تفوق المعاملة 30 غم.لتر$^{-1}$ من السكروز مع 20 ملغم . لتر$^{-1}$من الفنيل الانين في اعطاء اعلى معدل لوزن الكالس الطري والجاف والمستحث من القمة النامية التي زرعت في الوسط الغذائي MS المجهز بالتركيز 1.5ملغم.لتر$^{-1}$من 2,4-D والتركيز 0.4 ملغم .لتر$^{-1}$ من BA حيث بلغ 495.7- 52.4 ملغم على التوالي . كما اظهرت النتائج تفوق المعاملة 60 غم.لتر$^{-1}$ من السكروز والتركيز 10 ملغم .لتر$^{-1}$ من الفنيل الانين في اعطاء اعلى تركيز لمركبي الاتروبين والهيوسيامين بلغ 528.73- 70.29 مايكروغرام/غرام وزن جاف ، في حين اعطت المعاملة 60 غم.لتر$^{-1}$ من السكروز مع 40 ملغم .لتر$^{-1}$من الفنيل الانين اقل تركيز للاتروبين بلغ 65.90 مايكروغرام/ غرام وزن جاف.

ABSTRACT

An experiment was conducted at tissue culture lab .,Dept of Hort., College of Agriculture , University of Baghdad . during 2009-2010 . The study included effect of each sucrose and phenylalanine on fresh and dry weight of callus derived from shoot tip of belladonna and on accumulation of tropane alkaloid in callus which included (Atropine ,hyoscyamine , hyosine or scopolamine) . Results indicated the treatment 30 g.l^{-1} sucrose with 20 mg.l^{-1} phenylalanine gave the highest fresh and dry weight of callus (495.7 -52.4) mg respectively , while the treatment 60g.l^{-1} sucrose with 10mg.l^{-1} phenylalanine gave the highest concentration of Atropine and Hyoscyamine of (528.73 -70.29) µg.Gdw^{-1} respectively , while the treatment 60g.l^{-1} sucrose with 40mg.l^{-1} phenylalanine gave the lowest concentration of Atropine of 65.90 µg.Gdw^{-1} .

المقدمة

يعد نبات البلادونا (ست الحسن) *Atropa belladonn* من النباتات الطبية المهمة وينتمي للعائلة الباذنجانية Solanaceae التي تضم 90 جنسا" و2000 نوع من النباتات (1) .يضم جنس الاتروباAtropa مجموعة من اربعة انواع من الاعشاب المعمرة القائمة وتنتشر اجناس البلادونا من شرق اوربا الى الهملايا ، اما اشهر الانواع فهو *A.belladonna* . ان استخدام المنتجات الطبيعية للنباتات الطبية في المجال الصيدلاني معروفة منذ القدم ، ويعرف الان مايزيد عن 2000 نوع من المملكة النباتية بوصفها مصدرا للمنتجات الطبية ،ولها فعالية دوائية جيدة (2).

تشكل منتجات الايض الثانوي بشكل عام العلاقة المباشرة بين النبات المنتج لهذه المواد والظروف البيئية المحيطة به، كمقاومة الامراض والحشرات وجاذبيتها للملقحات (3) تنتج النباتات مركبات عضوية معقدة سميت بالمنتجات الثانوية Secondary products وتشمل مجاميع رئيسة هي Alkaloids، Phenolics ، Flavonoids، Steroids، Terpinoids (4) ويزداد تكوين هذه المركبات في النباتات عند تعرض النبات للاجهاد (Stress) كالظروف البيئية، مثل: درجات الحرارة العالية، او الجفاف ،او التعرض للبرد الشديد ،او الاصابات الحشرية ،او المايكروبية (5) . يتم بناء القلويدات النباتية في بعض الخلايا من الانسجة النباتية لبعض النباتات الطبية ،وتتجمع هذه المنتجات في الخلايا نفسها او تنتقل ليتم خزنها على هيئة مركبات قاعدية صلبة القوام،او بهيئة مركبات سائلة زيتية ،وتوجد هذه المنتجات مع الاحماض العضوية او المعدنية على هيئة املاح وتتصف القلويدات بالطعم المر، وبأنها عديمة اللون غالبا" (6) تحتل القلويدات او النباتات التي تحتويها الموقع الاول في الاهمية العلاجية ،لما لها من تأثير فسيولوجي على الانسان والحيوان، وتوجد القلويدات عادة في النبات بحالة حرة او على شكل املاح

لبعض الاحماض العضوية (7) لقد اثبت الطب الحديث ان قلويدات البلادونا تثبط الجهاز العصبي المركزي اللاودي الذي يتحكم في مختلف انشطة الجسم اللاارادية ،وذلك عن طريق خفضها للسوائل مثل اللعاب، وافرازات المعدة والامعاء ،والقصبة الهوائية، فضلا" عن نشاط المسالك البولية والمثانة (1) و ان هذه القلويدات تزيد ضربات القلب وتوسع حدقة العين كما تقلل التعرق وان خلاصة البلادونا تساعد على تخفيض الام القلب وكذلك علاج الكبد والمرارة (8) اثبتت الدراسات البحثية ان الهيكل الاساسي للقلويدات خاصة مجموعة التروبان تشتق من بعض الاحماض الامينية وبعض الجزيئات البايلوجية الاخرى(6) . فلغرض زيادة انتاج مركبات الايض الثانوي لابد من اضافة المركبات الوسطية المنتجة لها ومنها الاحماض الامينية ، فقد لوحظ ان اضافتها الى معلق الخلايا قد زاد من انتاج قلويدات التروبان وIndol alkaloids (9 و 10 و 11) .

يهدف البحث الى معرفة تأثير كل من الفنيل الانين والسكروز في انتاج بعض قلويدات التروبان في كالس نبات البلادونا والمتمثلة بقلويد الاتروبين وقلويد الهيوسيامين وقلويد الهيوسين او الاسكوبولامين .

المواد وطرائق العمل :-

1- تعقيم البذور : عقمت بذور نبات البلادونا *A.belladonna* بأستخدام التركيز 4.5% من مادة هابيوكلورات الصوديوم ولمدة 15 دقيقة (12) وبعد الانتهاء من العقيم زرعت البذور المعقمة في الوسط الغذائي MSوبربع قوة املاحه وذلك لغرض انتاج البادرات التي استأصلت منها القمة النامية والتي استخدمت لاحقاً في استحثاث الكالس .

2- استحثاث الكالس : تم استحثاث الكالس لنبات البلادونا وذلك عند زراعة القمة النامية في الوسط الغذائي MS والمجهز بالتركيز 1.5 ملغم.لتر $^{-1}$ من 2,4-D والتركيز 0.4 ملغم.لتر$^{-1}$ منBA ثم ادخل الكالس المستحث في تجربة الادامة والتي تضمنت زراعة الكالس الذي تم الحصول في الوسط الغذائي MS والمجهز بتوليفة من 2,4-D بالتراكيز (0، 0.5 ، 1، 2) ملغم .لتر$^{-1}$ والـ BA بالتركيز(0، 0.25، 0.50، 1) ملغم .لتر$^{-1}$ لمعرفة افضل وسط لادامة الكالس (12و13) . حيث زرع 100 ملغم من الكالس والمستحث من القمة النامية في وسط MS المجهز بالتراكيز اعلاه ، واخذت القياسات بعد خمسة اسابيع من الزراعة

3- تجربة اضافة البادئ البنائي ومصدر الاجهاد:
تم زراعة الكالس المستحث من القمة النامية لبادرة البلادونا والذي كان بمعدل 150 ملغم في اوساط غذائية حاوية على نفس تراكيز هرمونات الاستحثاث السابقة مع اضافة تراكيز مصدر الاجهاد (السكروز) بالتراكيز (30 و 60و90 و120) غم.لتر$^{-1}$ وتراكيز البادئ البنائي (الفنيل الانين) بالتراكيز (0،10،20،30و40) ملغم.لتر$^{-1}$ واستمرت زراعة الكالس في هذه الاوساط الغذائية وبعد خمسة اسابيع من الزراعة تم حساب الوزن الطري والجاف للكالس ثم اجريت عملية الاستخلاص (13).

4- عملية الاستخلاص : الاستخلاص والتقدير الكمي والنوعي للمادة الفعالة من الكالس

اجريت عملية الاستخلاص والتقدير الكمي والنوعي للقلويدات، في شركة الحقول البيضاء للاستثمارت والدراسات البيئية والهندسية ،وبحسب الاتي:-
تم استخلاص المسحوق الجاف للنبات (1)غم لكل من الكالس المستحث من طرف الفرع (القمة النامية) والنباتات النامية في البيت الزجاجي ، بأستخدام 50مل من مذيب (Hexane، BDH، UK) وذلك لغرض التخلص من الدهون والزيوت والتربينات والشموع وغيرها من المواد، ثم استخدم 20مل من كحول الاثيلي Ethanol وبخر المستخلص الكحولي الى 1 مل Grude alkaloids mixture والذي يحتوي على خليط من القلويدات تمحقن المحلول القياسي في جهاز Mass HPLC ذا النوع A1 (Shimadzuja 2010 Chromatography LC) لغرض تحديد زمن الاحتجاز Retention time وارتفاع حزمة العينة Area لكل من المحلول القياسي والعينة اذ حقن المستخلص في عمود (Column) من نوع(D(50X4.5 mm 1. وطور متحرك (mobile phase) يتكون من Methanol: water V/V وبنسبة 80:20 وكانت سرعة جريان الجهاز 1مل / دقيقة وقيست القراءات على طول موجي قدره 245 nm وبدرجة حرارة 25 م° .
تم حساب تركيز كل عينة حسب المعادلة الاتية :-

تركيز النموذج = مساحة النموذج X تركيز المحلول القياسي X عدد مرات التخفيف
مساحة المحلول القياسي

5- التحليل الاحصائي : نفذت جميع التجارب بأستخدام التصميم العشوائي الكامل CRDCompletely Randomized Designe وبتجارب عاملية، وحللت النتائج بأستخدام البرنامج الاحصائي (Genstat, 5) وقورنت المتوسطات بحسب اختبار اقل فرق معنوي أ.ف.م وعلى مستوى احتمال 0.05 . (14)

النتائج والمناقشة :

1- تأثيرD-2,4 و BA وتداخلهما في ادامة الكالس المستحث من القمة النامية لبادرة البلادونا .(معدل وزن طري)

تشير نتائج الجدول (1) الى تفوق الوسط الغذائي MS المجهز بD-2,4 بالتركيز 1 ملغم.لتر$^{-1}$ في اعطاء اعلى معدل لوزن الكالس الطري بلغ 364.1 ملغم الذي لم يختلف معنويا" عن التركيز 0.5 ملغم . لتر$^{-1}$ من D-2,4 الذي اعطى 363.3ملغم في حين اعطى التركيز (0 ,2) ملغم\لتر من D-2,4 معدل وزن طري للكالس بلغ (149.1 ،266.7) ملغم على التوالي، واوضحت نتائج الجدول تفوق BA بالتركيز 0.25 في اعطاء معدل لوزن الكالس الطري بلغ 356.8 ملغم والذي لم يختلف معنويا عن التركيز 0.50 ملغم .لتر$^{-1}$BA الذي اعطى 342.9 ملغم وبلغ اقل معدل لوزن الكالس الطري 193.0 ملغم عند معاملة المقارنة .
وعن تاثير التداخل بين تراكيز D-2,4 وBA المضافة للوسط الغذائي فقد اظهرت نتائج الجدول نفسة تفوق الوسط الغذائي المجهز بتركيز 1 ملغم .لتر$^{-1}$ من D-2,4 مع 0.25 ملغم .لتر$^{-1}$ من BA اذ اعطى معدل لوزن الكالس الطري بلغ 510.0 ملغم بينما اقلة في الوسط الغذائي المجهز بالتركيز 0 ملغم .لتر$^{-1}$ من D-2,4 مع 0.25 ملغم \لتر منBA حيث اعطى 127.0 ملغم .

جدول (1) تأثير D-2,4 والـBA في ادامة الكالس المستحث من القمة النامية لبادرة البلادونا بعد خمسة اسابيع من الزراعة (الوزن الطري ملغم).

تراكيز D-2,4 ملغم /لتر	تراكيز BA ملغم / لتر				المعدل
	0	0.25	0.50	1	
0	140.0	127.0	200.8	128.8	149.1
0.5	210.0	470.0	478.8	294.4	363.3
1	208.8	510.0	449.5	288.1	364.1
2	213.1	320.0	242.5	291.3	266.7
أ.ف.م0.05	43.92				21.96
المعدل	193.0	356.8	342.9	250.6	
أ.ف.م.0.05	21.96				

2- تأثيرD-2,4 و BA وتداخلهما في ادامة الكالس المستحث من القمة النامية لبادرة البلادونا .(معدل وزن جاف)

تشير نتائج الجدول (2) الى تفوق الوسط الغذائي المجهز بالتركيز 1 ملغم . لتر$^{-1}$D-2,4 معنويا" في اعطاء اعلى معدل لوزن الكالس الجاف بلغ 34.19 ملغم والتي لم تختلف عن التركيز 0.5ملغم . لتر$^{-1}$ من D-2,4 بينما بلغ اقله عند معاملة المحايد حيث بلغ 13.56 ملغم . واوضحت النتائج تفوق الوسط BA بالتركيز 0.25 ملغم . لتر$^{-1}$ في اعطاء اعلى معدل لوزن الكالس الجاف بلغ 32.88 ملغم واعطت التراكيز (1،0) ملغم . لتر$^{-1}$BA معدل وزن جاف للكالس بلغ (17.62 ،23.75) ملغم على التوالي .
وعن تأثير التداخل بين تراكيز D-2,4 وBA في معدل وزن الكالس الجاف فقد اوضحت النتائج الى تفوق الوسط الغذائي المجهز بالتركيز 1 ملغم . لتر$^{-1}$D-2,4و0.25ملغم.لتر$^{-1}$BA في اعطاء اعلى معدل وزن جاف للكالس بلغ 47.13 بينما بلغ اقله في الوسط المجهز بالتركيز 0 ملغم . لتر$^{-1}$D-2,4 و0.25ملغم . لتر$^{-1}$BA حيث اعطى 11.63ملغم . واعطى الوسط الغذائي المجهز بالتراكيز 0.5ملغم .لتر$^{-1}$D-2,4 و0.5 ملغم /لتر BA معدل وزن جاف للكالس بلغ 45.25 ملغم بينما اعطى الوسط المجهز بالتراكيز 2 ملغم .لتر$^{-1}$D-2,4 و1 ملغم .لتر$^{-1}$BA معدل وزن جاف للكالس بلغ 27.75ملغم.

جدول (2) تأثير D-2,4 والـBA في ادامة الكالس المستحث من القمة النامية لبادرة البلادونا بعد خمسة اسابيع من الزراعة (الوزن الجاف ملغم).

تراكيز D-2,4 ملغم /لتر	تراكيز BA ملغم / لتر				المعدل
	0	0.25	0.50	1	
0	12.63	11.63	17.87	12.13	13.56
0.5	19.00	44.13	45.25	27.87	34.06
1	19.37	47.13	43.00	27.25	34.19
2	19.50	28.62	22.25	27.75	24.53
أ.ف.م0.05	4.25				2.13
المعدل	17.62	32.88	32.09	23.75	
أ.ف.م.0.05	2.13				

تشير نتائج الجدولين (1– 2) الى زيادة معدل الوزن الطري والجاف للكالس مع زيادة تراكيز BA وصولا" الى التركيز المثالي اذ اعطى التركيز 0.25 ملغم / لتر (356.8، 32.88) ملغم وزن طري وجاف للكالس على التوالي . واعطى الوسط الغذائي المجهز بالتركيز 1 ملغم .لتر$^{-1}$2,4-D و 0.25 ملغم . لتر$^{-1}$BA اعلى معدل لوزن الكالس الطري والجاف بلغ (510.0، 47.13) ملغم على التوالي . يلاحظ ان النمو الجيد للكالس يكون من خلال التوازن بين تراكيز الاوكسينات والسايتوكاينينات وان الزيادة في تراكيز اي منهما على حساب الاخر سوف يؤثر سلبا" في نمو الكالس (15 و 16) ويعد BA من اكثر السايتوكاينينات استخداما" في مجال زراعة الانسجة النباتية لما له من فعالية مقارنة بـKin و2ip لاحتوائة على اكثر من اصرة مزدوجة واحدة (17) اذ يعمل السايتوكاينين وبوجود الاوكسين مفتاحا" لبدء الانقسام الخلوي وان وجود كلا المنظمين في وسط الزراعة ضروري جدا" لاستحثاث الكالس (18) .

3- تأثير السكروز والفنيل الانين والتداخل بينهما في معدل الوزن الطري للكالس المستحث من القمة النامية لبادرة البلادونا

تشير نتائج الجدول (3) الى تفوق الوسط الغذائي المجهز بالتركيز 30 غم / لتر سكروز في اعطاء اعلى معدل لوزن الكالس الطري بلغ 441.9 ملغم في حين اعطت التراكيز (60 ، 90، 120) غم / لتر من السكروز معدل وزن طري للكالس بلغ (354.2، 278.4، 247.6)ملغم على التوالي . واظهرت نتائج الجدول نفسه تفوق التركيز 0 ملغم / لتر من الحامض الاميني الفنيل النين في اعطاء اعلى معدل وزن طري للكالس بلغ 351.7 ملغم وبلغ اقله عند التركيز 40 ملغم / لتر من الفنيل النين اذ اعطى 309.3 ملغم . وتشير نتائج الجدول نفسه تفوق الوسط الغذائي المجهز بالتركيز 30 غم / لتر من السكروز مع 20 ملغم / لتر من الفنيل النين في اعطاء اعلى معدل لوزن الكالس الطري بلغ 495.7 ملغم في حين بلغ اقله في الوسط الغذائي المجهز بالتركيز 120غم / لتر من السكروز مع 40 ملغم / لتر من الفنيل النين حيث اعطى 239.7 ملغم وزن طري للكالس .

جدول (3) تأثير السكروز والفنيل الانين والتداخل بينهما في معدل الوزن الطري للكالس ملغم

الفنيل النين ملغم / لتر	تراكيز السكروز غم / لتر				المعدل
	30	60	90	120	
0	467.5	403.4	293.0	243.0	351.7
10	444.8	367.6	279.9	259.6	338.0
20	495.7	335.6	296.5	245.1	343.2
30	437.8	288.5	264.7	250.4	310.4
40	363.5	376.1	258.0	239.7	309.3
أ.ف.م.0.05	45.9				22.9
المعدل	441.9	354.2	278.4	247.6	
أ.ف.م.0.05	20.5				

4- تأثير السكروز والفنيل الانين والتداخل بينهما في معدل الوزن الجاف للكالس المستحث من القمة النامية لبادرة البلادونا

اظهرت نتائج الجدول (4) تفوق الوسط الغذائي المجهز بالتركيز 30 غم / لتر من السكروز في اعطاء اعلى معدل لوزن الكالس الجاف بلغ 43.8 ملغم في حين اعطت التراكيز (60 ،90 ،120) غم / لتر من السكروز معدل وزن جاف للكالس بلغ (36.7، 30.8، 24.9) ملغم على التوالي . اما عن تأثير تراكيز الحامض الاميني الفنيل النين ،فقد اظهرت النتائج تفوق التركيز 0 ملغم / لتر منه فاعطى 35.6 ملغم وزن جاف للكالس، في حين اعطى التركيز 30 ملغم / لتر من الفنيل النين 32.9 ملغم ولم تختلف التراكيز (10 ،20،40) ملغم /لتر من الفنيل النين فيما بينها في معدل الوزن الجاف للكالس .

وتشير نتائج الجدول نفسه الى تفوق الوسط الغذائي المجهز بالتركيز 30 غم / لتر سكروز مع 20 ملغم / لتر من الفنيل النين في اعطاء اعلى معدل لوزن الكالس الجاف بلغ 52.4 ملغم في حين بلغ اقله عند الوسط الغذائي المجهز بالتركيز 120 غم / لتر سكروز مع 0 ملغم / لتر من الفنيل النين اذ بلغ 23.6 ملغم .

جدول (4) تأثير السكروز والفنيل النين والتداخل بينهما في معدل الوزن الجاف للكالس ملغم

الفنيل النين ملغم /لتر	تراكيز السكروز غم / لتر				المعدل
	30	60	90	120	
0	43.8	46.1	28.9	23.6	35.6
10	43.8	36.3	33.2	25.2	34.6
20	52.4	32.3	30.3	23.9	34.7
30	44.2	30.3	30.2	26.7	32.9
40	34.6	38.4	31.3	25.3	32.4
أ.ف.م0.05	5.6				2.8
المعدل	43.8	36.7	30.8	24.9	
أ.ف.م0.05	2.5				

اشارت نتائج الجدولين (3 و 4) الى انخفاض معدل وزن الكالس الطري مع زيادة تراكيز السكروز المضافة الى الوسط الغذائي اذ بلغ في الوسط الغذائي المجهز بالتركيز 30غم / لتر سكروز اعلى معدل لوزن الكالس الطري بلغ 441.9 ملغم في حين اعطى الوسط الغذائي المجهز بالتركيز 120 غم / لتر سكروز اقل معدل لوزن الكالس الطري بلغ 247.6 ملغم . بينما اعطى الوسط الغذائي المجهز 30غم / لتر سكروز اعلى معدل لوزن الكالس الجاف بلغ 43.8 ملغم، وبلغ اقله في الوسط المجهز 120 غم / لتر سكروز واعطى 24.9 ملغم .

وعن تاثيرالفنيل الانين في معدل وزن الكالس الطري والجاف فيلاحظ ان الحامض الاميني لم يؤثر معنويا" في زيادة معدل وزن الكالس فقد بلغ اعلى معدل لوزن الكالس الطري والجاف عند معاملة المحايد (351.7، 35.6) ملغم .وتشير نتائج الجدول ايضاً الى تفوق الوسط الغذائي المجهز بالتركيز 20 ملغم / لتر من الفنيل النين و30 غم / لتر سكروز في اعطاء اعلى معدل لوزن الكالس الطري بلغ 495.4 ملغم واعطى الوسط نفسه وزن جاف للكالس بلغ 52.4ملغم، بينما كان اقل وزن طري في الوسط المجهز 40ملغم / لتر من الفنيل النين و 120 غم / لتر سكروز بلغ 239.7ملغم وكان اقل وزن جاف للكالس في الوسط المجهز 0ملغم / لتر من الفنيل النين مع 120 غم / لتر سكروز بلغ 23.6ملغم . ان عملية التمثيل الضوئي التي يقوم بها الجزء النباتي المزروع تكون غير كافية لنموه ،و يعتمد في النمو على السكر المضاف ويضاف الى ذلك ان زيادة تركيز CO_2 في انابيب الزراعة عن المستوى المرغوب يعمل على اعاقة معدل التمثيل الضوئي (19) .

و يعد السكروز هو المصدر الكربوهيدراتي الذي يزود الخلايا بالطاقة اللازمة للنمو والبقاء (20) ويلاحظ ان زيادة تراكيز السكروز في الوسط الغذائي عن المستوى الملائم يسبب زيادة الجهد الازموزي المسلط على الخلايا لانتقال الماء من المنطقة التي يكون فيها الجهد المائي عاليا" الى المنطقة التي يكون فيها الجهد المائي منخفضا" ومن ثم يؤثر في نمو الكالس (5).

تتفق مع (21) الذي وجد ان اعلى وزن طري للكالس كان عند زراعة الشعيرات الجذرية لنبات *D. innoxia* في الوسط الغذائي المجهز 1-2% من السكروز ، وتتفق مع (13) التي وجدت ان التركيز 30 غم /لتر سكروز اعطى اعلى معدل وزن طري وجاف للكالس لنبات الخشخاش.

ولاتتفق مع ما توصل اليه (22) الذي وجد ان زيادة السكروز سببت زيادة في انتاج نسيج الكالس وانتاج قلويد Scopolamine وذلك عند دراسته على نبات *H. niger*.

5- تأثير السكروز والفنيل الانين في تراكيز الاتروبين والهيوسيامين والهيوسين المتكون في الكالس المستحث من القمة النامية لنبات البلادونا

تشير نتائج الجدول (5) والمقدرة بجهاز Mass HPLC الى تفوق المعاملة 10 ملغم / لتر من الفنيل النين مع 60غم / لتر سكروز ظاهريا" في اعطاء اعلى تركيز لمركب Atropineبلغ 528.73 مايكروغرام / غرام وزن جاف وكما في الشكل (7) ، في حين اعطت المعاملة 30 ملغم / لتر من الفنيل النين مع 30 غم / لتر من السكروز تركيز لمركب Atropine بلغ 268.92 مايكروغرام / غرام وزن جاف كما في الشكل (4) وكان اقل تركيز لمركب الاتروبين عند المعاملة 40 ملغم / لتر من الفنيل النين مع 60 غم / لتر من السكروز بلغت 65.90 مايكرو غرام / غرام وزن جاف كما في الشكل (10) ، وبلغ اعلى تركيز لمركب Hyoscyamine عند المعاملة 10 ملغم / لتر من الفنيل النين مع 60 غم / لتر من السكروز 70.29 مايكروغرام/ غرام وزن جاف كما في الشكل (7) وكانت اقل تركيز لمركب الهيوسيامين 10.78 مايكروغرام / غرام وزن جاف عند المعاملة 20 ملغم / لتر من الفنيل النين مع 30 غم / لتر سكروز وكما في الشكل (3) .

اعطت المعاملة 20 ملغم / لتر من الفنيل الانين و60 غم / لتر من السكروز تركيز لمركب الهيوسين Hyoscine بلغ 174.55 مايكروغرام / غرام وزن جاف وكما في الشكل (8).

وقد يعزى سبب زيادة انتاج القلويدات بزيادة تراكيز الحامض الاميني المضافة الى الوسط الغذائي في كونه البادئ البنائي لها (23) .تتفق هذه النتائج مع ماتوصل اليه(24) الذي وجد ان اضافة Ornithine وphenylalanine الى وسط مزارع كالس

Daturastramonium يزيد من محتوى القلويد 5 مرات مقارنه بالوسط الخالي منه و وتوصل (25) ان الحامض الاميني phenylalanine قد زاد من انتاج قلويدات hyosyamine ، Scopolamine عند زراعة الجذور المتحولة transfer root لنبات الداتورة *Daturametel* .وتتفق مع (26 و 27) .

اعطت المعاملة 0 ملغم / لتر من الفنيل النين و30 غم / لتر من السكروز تركيز لمركب الاتروبين بلغ 190.83 مايكروغرام / غرام وزن جاف وكما في الشكل (1) بينما اعطت المعاملة 40 ملغم / لتر من الفنيل النين و30 غم / لتر من السكروز تركيز لمركب الاتروبين بلغ 92.04 مايكروغرام / غرام وزن جاف وكما في الشكل (5) وعن مركب الهيوسين يلاحظ ان المعاملة 0 ملغم / لتر من الفنيل النين مع 30 غم / لتر من السكروز قد اعطت تركيز لمركب الهيوسين بلغ 63.02 مايكروغرام / غرام وزن جاف ،في حين اعطت المعاملة 40 ملغم / لتر من الفنيل النين مع 30 غم / لتر من السكروز تركيز لمركب الهيوسين بلغ 59.80 مايكروغرام / غرام وزن جاف وكما في الشكل (5).

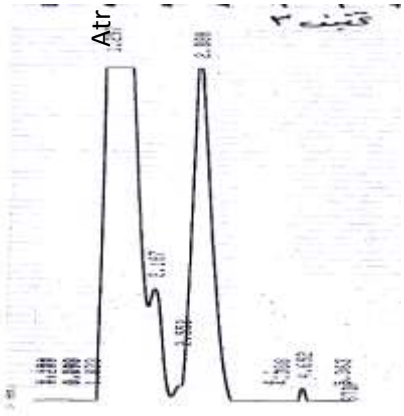
وقد يرجع سبب انخفاض انتاج القلويدات عند التراكيز العالية من الحامض الاميني الفنيل النين الى ان التراكيز العالية من الحامض الاميني في الوسط الغذائي تسبب شدا" على النسيج النباتي وربما سمية وهذا ما اكده عدد من الباحثين في ان زيادة تراكيز الحامض الاميني في الوسط الغذائي سبب سميتة كما في البطاطا والحنطة (28 و 29 و 30 و31) . فضلا" عن ان زيادة الاحماض الامينية سوف يؤدي الى زيادة المركبات النتروجينية الذائبة في داخل الخلايا مما يؤدي الى زيادة ضغطها الازموزي، الامر الذي يدفعها لسحب الماء من الخلايا المجاورة فتمتلئ وتضغط على جدار الخلية، فتصبح طرية ورقيقة ،وتتعرض بسهولة للتمزق، مما يؤدي الى تلف الخلايا .

اعطت المعاملة 0 ملغم / لتر من الفنيل النين و 90 غم / لتر من السكروز تركيز لمركب الاتروبين Atropine بلغ 116.07 مايكروغرام / غرام وزن جاف وكما في الشكل (11) في حين اعطت المعاملة 40 ملغم / لتر من الفنيل النين و90 غم / لتر من السكروز تركيز لمركب الاتروبين بلغ 99.85 مايكرو غرام /غرام وزن جاف وكما في الشكل (15) ، واعطت المعاملة 10 ملغم / لتر من الفنيل النين و120 غم / لتر من السكروز تركيز لمركب الهيوسيامين بلغ 63.90 مايكروغرام / غرام وزن جاف وكما في الشكل (17) بينما اعطت المعاملة 30 ملغم / لتر من الفنيل النين و120 غم / لتر من السكروز تركيز لمركب الهيوسيامين بلغ 17.90 مايكروغرام / غرام وزن جاف وكما في الشكل(19).

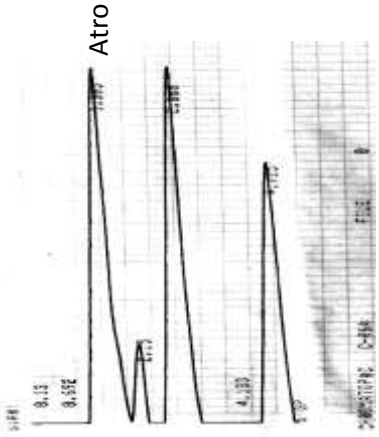
وقد يعود سبب قلة الاستجابة عند زيادة تراكيز الحامض الاميني والسكروز الى زيادة الجهد المسلط والذي اثر سلبا" في تلك الخلايا ،مما قد تسبب في تلفها ومن ثم انخفاض في فعالية الانزيمات المسؤولة عن تخليق الايض الثانوي (32) او قد يعزى السبب الى ان زيادة الاجهاد قد يسبب انخفاض قابلية الخلايا على امتصاص العناصر الغذائية التي تحتاجها بكفاءة لانتاج مركبات الايض الاولي، ومن ثم قلة في انتاج الايض الثانوي الذي يعد ناتجا" نهائيا" للايض الاولي (33 و34).

جدول (5) تأثير السكروز والفنيل الانين في انتاج الاتروبين والهيوسيامين والهيوسين مايكروغرام / غرام وزن جاف والمقدرة من كالس نبات البلادونا

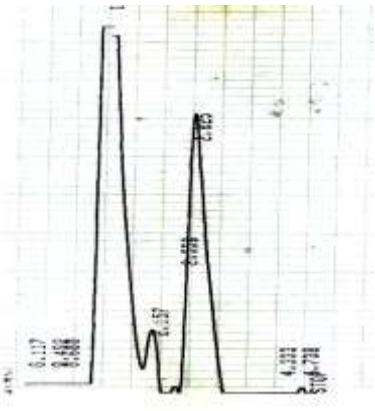
Hyoscine	Hyoscyamine	Atropine	السكروز غم /لتر	الفنيل النين ملغم /لتر
63.02	18.60	190.83	30	0
99.30	25.59	101.43	60	
54.46	30.16	116.07	90	
50.63	23.75	67.79	120	
59.97	14.45	80.44	30	10
96.87	70.29	528.73	60	
43.01	20.83	84.39	90	
85.41	63.90	118.77	120	
40.44	10.78	107.03	30	20
174.55	13.03	117.04	60	
40.44	25.52	127.88	90	
62.11	13.51	66.11	120	
65.39	55.47	268.92	30	30
103.08	28.90	94.92	60	
48.52	15.08	129.56	90	
57.18	17.90	107.25	120	
59.80	21.78	92.04	30	40
159.43	15.28	65.90	60	
61.93	25.96	99.85	90	
58.74	10.84	94.42	120	



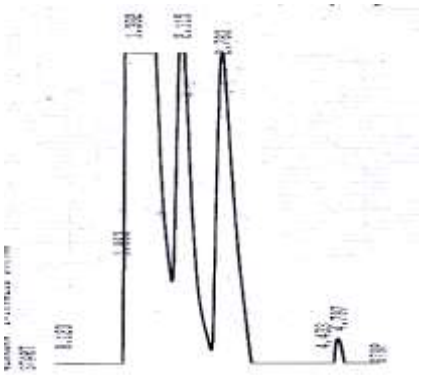
الشكل(1) تأثير الفنيل الانين بتركيز0 ملغم.لتر$^{-1}$ +سكروز بتركيز30 غم.لتر$^{-1}$



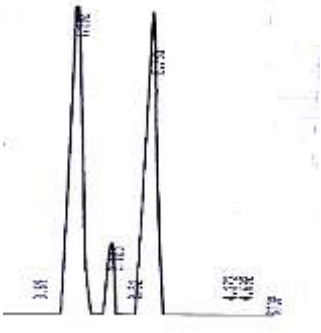
الشكل (2) تأثير الفنيل الانين بتركز10ملغم.لتر$^{-1}$ + سكروز بتركيز 30 غم.لتر$^{-1}$



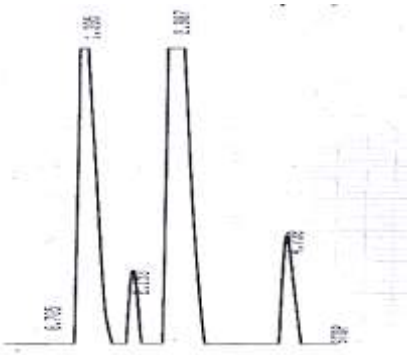
الشكل(3) تأثير الفنيل الانين بتركيز20 ملغم.لتر$^{-1}$ +سكروز بتركيز30 غم.لتر$^{-1}$



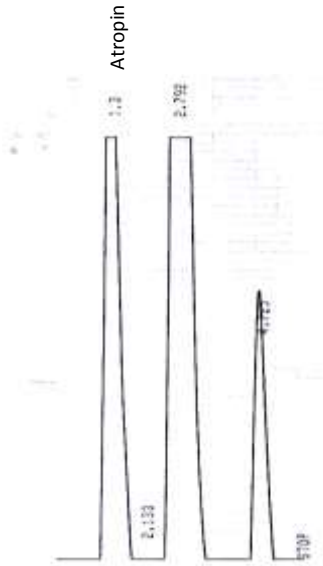
الشكل (4) تأثير الفنيل الانين بتركز30ملغم.لتر$^{-1}$ + سكروز بتركيز 30 غم.لتر$^{-1}$

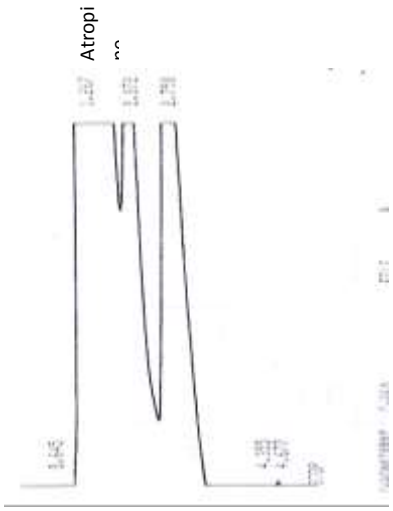


الشكل(5) تأثير الفنيل الانين بتركيز40 ملغم.لتر$^{-1}$ +سكروز بتركيز30 غم.لتر$^{-1}$

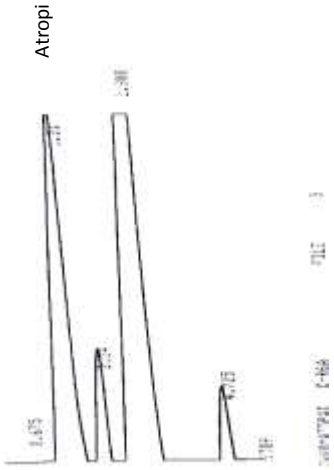


الشكل (6) تأثير الفنيل الانين بتركز0ملغم.لتر$^{-1}$ + سكروز بتركيز 60 غم.لتر$^{-1}$

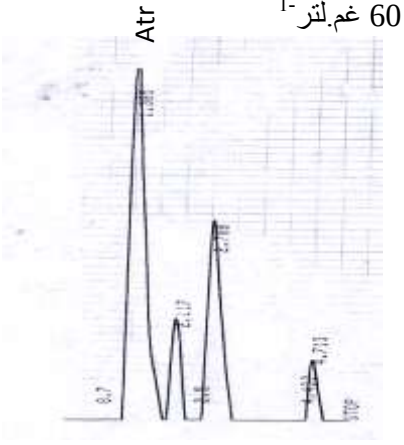


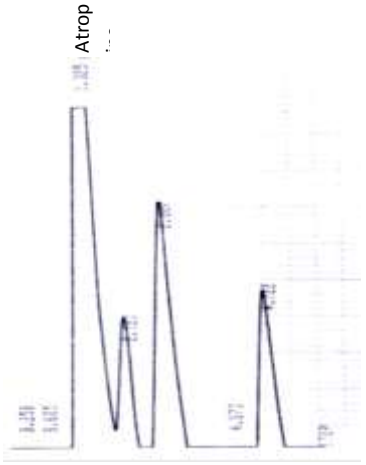


الشكل(7) تأثير الفنيل الانين بتركيز10 ملغم.لتر$^{-1}$ +سكروز بتركيز60 غم.لتر$^{-1}$ الشكل (8) تأثير الفنيل الانين بتركز20ملغم.لتر$^{-1}$ + سكروز بتركيز 60 غم.لتر$^{-1}$

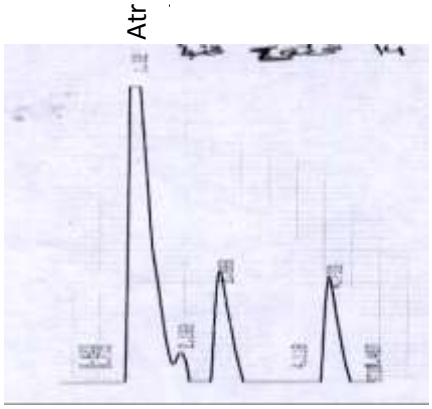


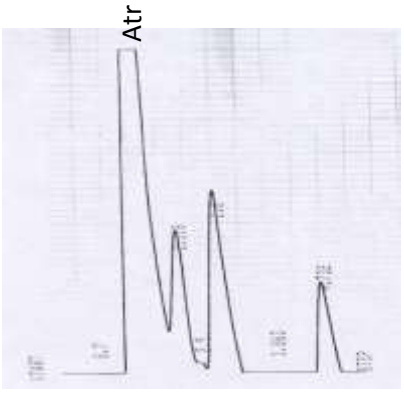
الشكل(9) تأثير الفنيل الانين بتركيز30 ملغم.لتر$^{-1}$ +سكروز بتركيز60 غم.لتر$^{-1}$ الشكل (10) تأثير الفنيل الانين بتركز40ملغم.لتر$^{-1}$ + سكروز بتركيز 60 غم.لتر$^{-1}$



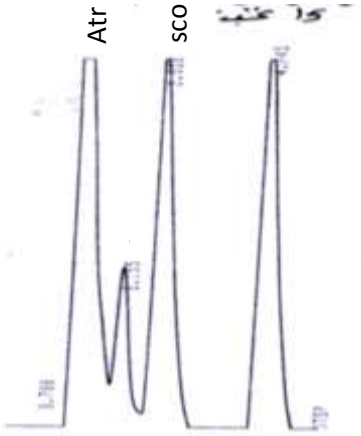


الشكل(11) تأثير الفنيل الانين بتركيز0 ملغم.لتر$^{-1}$ +سكروز بتركيز90 غم.لتر$^{-1}$ الشكل (12) تأثير الفنيل الانين بتركز10ملغم.لتر$^{-1}$ + سكروز بتركيز 90 غم.لتر$^{-1}$

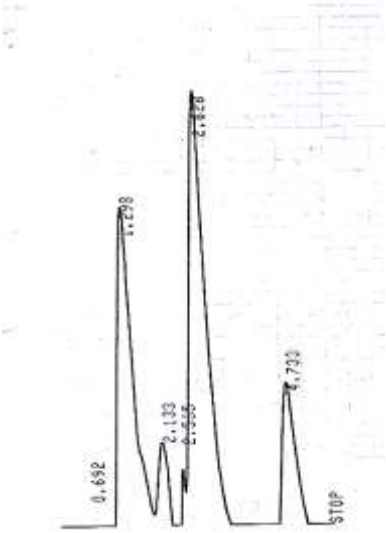


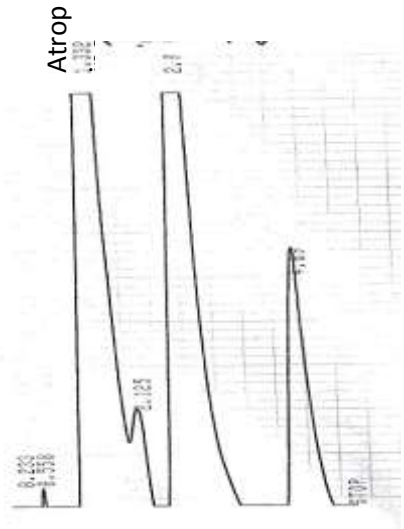


الشكل(13) تأثير الفنيل الانين بتركيز20ملغم.لتر$^{-1}$ +سكروز بتركيز90 غم.لتر$^{-1}$ الشكل (14) تأثير الفنيل الانين بتركز30ملغم.لتر$^{-1}$ + سكروز بتركيز 90 غم.لتر$^{-1}$

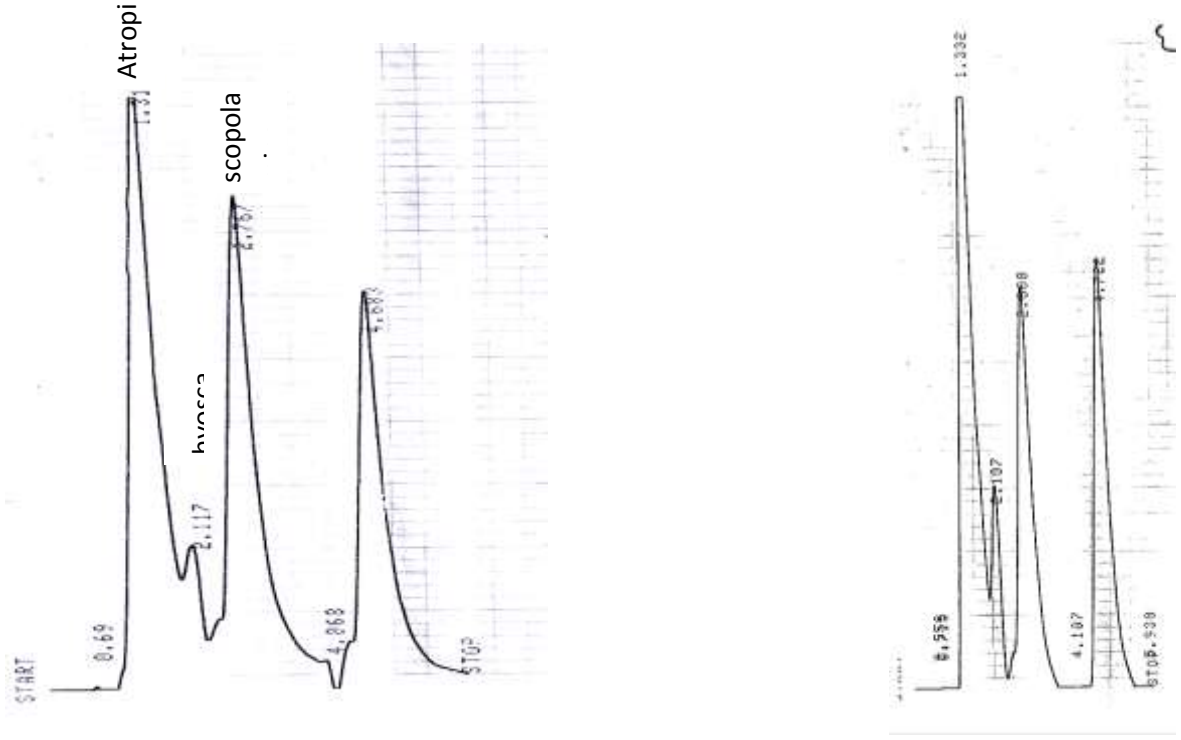


الشكل(15) تأثير الفنيل الانين بتركيز40ملغم.لتر$^{-1}$ +سكروز بتركيز90 غم.لتر$^{-1}$ الشكل (16) تأثير الفنيل الانين بتركز0ملغم.لتر$^{-1}$ + سكروز بتركيز 120 غم.لتر$^{-1}$





الشكل(17) تأثير الفنيل الانين بتركيز10ملغم.لتر$^{-1}$ +سكروز بتركيز120 غم.لتر$^{-1}$ كل (18) تأثير الفنيل الانين بتركز20ملغم.لتر$^{-1}$ + سكروز بتركيز 120 غم.لتر$^{-1}$



الشكل(19) تأثير الفنيل الانين بتركيز30ملغم.لتر$^{-1}$ +سكروز بتركيز120 غم.لتر$^{-1}$ الشكل (20) تأثير الفنيل الانين بتركز40ملغم.لتر$^{-1}$ + + سكروز بتركيز 120 غم.لتر$^{-1}$

المصادر:-

1. شوفاليه . 2010. الطب البديل ، التداوي بالاعشاب والنباتات الطبية .ترجمة د.عمر الايوبي ،اشراف د.محمد دبس ، ص66
2. Hartmann, T. .2004.Plant - derived secondary Metabolites as defensive chemicals in herbivorous insects : acase study in chemical ecology .Plant 219:1- 4 .
3. Verpoot ,R .and A.W.Alfermann .2000. In metabolism engineering of plant secondary metabolism ,kluwer .Academic publishers ,pp. 3-8.
4. Shohji , T.R., T.Iwase , K.Nakajima , Y. Yamada and T. Hashimoto . 2004 . Expression patterns of tow tobacco Isoflavonereductase-Likegenes and their possible roles in secondary metabolism in tobacco , plant molbiol 50 : 427 - 440.
5. Huany ,W.L.and L.F.Liu . 2002. Carbohydrate metabolism in rice during callus indiucation and shoot regeneration induced by osmotic stress , Bot . Bull .Acad .Sience .43 :107 – 113 .
6. الشحات ، نصر ابو زيد .2006 . فسيولوجيا وكيمياء القلويدات في النباتات الطبية واهميتها الدوائية والعلاجية ،دار الكتب العلمية للنشر والتوزيع ،القاهرة .مصر .
7. النعيمي ، د. جبار حسن 2010 . العلاج باشجار وشجيرات الفاكهة والغابات ،ص 13 :15
8. Leemr. 2007 . ((Solanaceae IV : Atropa belladonna ,Deadly night shade)) (PDF) .J R Coll physicians Edinb 37 (1) : 77 – 84.
9. Moreno , P .R . H., V. D. Heijden , and R. verpoote ,. 1993. Effect of terpeniods precursor feeding and elicitation on formation of indole alkaloids in cell suspension cultures of Cathranthusroseus Plant cell reports, 12: 702 -705.
10. Whitmer , S., C. Canel, D . Hallard , C . Goncalves and R .Verpoote ,. 1998 .Influence of precursor availability on alkaloids accumulation by trans-genic cell line of *Cathranthusroseus* , plant Physiology , 116 :853-857.
11. Silvestrni , A., G . Pasqua , B. Botta, B. Monacelli , R. vanderHeijden, and R. Verpoote ,. 2002. Effect of alkaloid precursor feeding on acamptotheca acuminate cell line . Plant physiology and bio –chemistry , 40: 749-753.

12. المرسومي ، حيدر عماد رشيد . 2010. تأثير مكونات الوسط الغذائي والجزء النباتي المزروع في تكوين الكالس وانتاج بعض المركبات ذات الاستعمالات الطبية في نبات المريمية Saliva officinalis . رسالة ماجستير . قسم البستنة . كلية الزراعة . جامعة بغداد . العراق .
13. المختار ،سراب عبد الهادي .2008 .دراسة انتاج بعض القلويدات المورفينية من نبات الخشخاش *Papaversomniferanm*. خارج الجسم الحي .رساله ماجستير قسم البستنة – كلية الزراعة– جامعة بغداد
14. الساهوكي ،مدحت ووهيب ،كريمة احمد .1990 . تطبيقات في تصميم وتحليل التجارب . وزاره التعليم العالي والبحث العلمي .العراق .
15. Mineo,L.1990.Plant tissue culture techniques .C.A. Goldman,Editor .pp:151-174.
16. Hedden .P and G. Stephen. 2006.Plant Hormone signaling
17. Krishnamurthy ,K.V, D.A.Godbole and A.F.Mascarenhas . 1984.Studies on a drought resistant legume :the moth bean vignaacouitifoliu -1- protoplast culture and organo genesis .plant cell Rep . 3:30-32.
18. Goodwin ,M. 1985.Introduction to plant biochemistry .Second edition pergamonpress.New York .
19. فهمي ،فكري جلال محمد .2003. زراعة الانسجة النباتية –كلية الزراعة جامعة اسيوط .ص 137-142 .
20. Morris, P. 1986. Regulation of production synthesis in cell culture of Cath .roseusII.Coparison of production media .plantamedica. Pp.121-126.
21. Laszol ,I. 2003. Investigation on primary and Secondary metabolism ofDaturainnoxiaMill.Tissue culture. semmelweis University ,Institute of pharmacognosy ,Budapest .
22. Hilton ,M.G. andM.J.C.Rhodes .1994.The effect of varying level of Gamborage B5 salt and temperature on the accumulation of starch and hyoscyamine in bath culture of transformed roots of Daturaatramonium Plant Cell Tissue Org .Cult .,38:45-51.
23. Khanna, R. ,A.K.Mathur and N.K.Mehrotra .2005.Selection of 3- fluorotyrosine tolerant callus line in two cultivars of opium poppy .Vol 88,NO.1.
24. Ballica . R, D. D. Y. Ryu. 1993 .Tropane Alkaloids production in Daturastramonium Suspension culture :Elicitor and precursor Effect , BiotechnolBioeng , 41: 1075-1081
25. Aziz , A ., M . Marziah ,M .Radzali and M.S. Halimi . .2002.The Influence of Precursors on Hyoscyamine and Scopolamine Production by Transformed root Culture of Daturametel L. Tropical Medicinal plants , 3 (1) :105- 111.
26. Karam, N.S.; F.M.Jawad; N.A.Arikat and R.A.Shibli.2003. Growth and rosmarinic acid accumulation in callus , cell suspension and root culture Saliva fruticosa . plant cell , tissue and organ culture , 73 :1-121.
27. 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 pf applied science and Engineering . 2, 1:29-48.
28. Matthews ,B.F,S.H.Shye and J.M.Widholm. 1980. Mechanism resistance of selected carrot cell suspension culture to S-(2-aminothly)-L-Cysteine .Z.pflanzenphysiol,96.453-463
29. Jacobsen, E. 1986 .Isolation ,characterization and regeneration of a S-(2-aminoethyl)-L-Cycteine resistant cell line of a dihaploid potato J.plant physiol. 123, 307-315.
30. Kumpaisal ,R.T.H. and Y. yamada . 1988. Selection and characterization of S-(2-aminoethyl)-L- Cycteine assistant Whaet Cultures .J. plant physiol. 133, 608-614
31. Miao, S. D.,R.Duncan and J.M. Widholm . 1988. Selection regenerable maize callus culture resistante to 5- methyl –DL- tryptophane ,S-(2-aminoethyl) –L- cyctiene and

high levels of L- Lysine plus L-theronine . planta Cell Tissue .Org .Cult . 14, 3- 14.

32. عبد القادر ، فيصل وعبد اللطيف ،فهيمة وشوقي ،احمد وابو طبيخ ،عباس والخطيب ،غسان .1982 . علم فسيولوجيا النبات . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي .العراق.

33. Hiraoka, N.1976.Studies on alkaloids production on Datura Tissue Culture .Dissertation,Kyoto.

34. ياسين،بسام طه.1992 .فسلجة الشد المائي في النبات .جامعة الموصل .وزارة التعليم العالي والبحث العلمي ،العراق.ص:30-33.