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 وانتاج قلويدات البابافرين والنسكابين 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 B_5 فأعطى اعلى معدل وزنين طري وجاف للكالس بلغا 155.1و14.54 ملغم، على التوالي مقارنة مع الوسط B_5 الذي اعطى معدل وزنين طري وجاف للكالس بلغا 127.4و11.81 ملغم على التوالي . وبينت النتائج ان وسط MS المجهز بتركيز 0.3 و 0.5 ملغم / لتر من BA وNAA ،على التوالي اعطى اعلى معدل للوزنين الطري والجاف للكالس بلغا 357.4 و33.71 ملغم، على التوالي مقارنة مع التركيز نفسه من BA وNAA في وسطB_5 الذي اعطى 253.3و23.4 ملغم للوزنين الطري والجاف للكالس على التوالي . اعطى الوسطMS 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 60و90و120غم / لتر فبلغ 445.5 و 333.3 و257.8 ملغم للوزن الطري و 45.7و34.1و24.0 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 و 53.9 ملغم على التوالي . تفوق الوسط MS المجهز بتركيز 90غم / لتر سكروز وسجل اعلى قيمة عند التركيز 30 ملغم / لتر تايروسين لقلويدي البابافرين والنسكابين فبلغا 3.9و5.9 ملغم / غم وزن طري للكالس على التوالي ، بينما كانت اقل القيم للبابافرين والنسكابين عند معاملة المقارنة 2.3و2.5 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 B_5 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 B_5 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 اهمية طبية واقتصادية كبيرة لاحتوائه على قلويدات عديدة (1). فقد ذكر(2) 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 وcodeine وthebaine والقلويدات غير المورفينية non morphinan alkaloids مثل noscapine وpapaverine التي تنتج من الصناعة الصيدلانية كمواد مسكنة analgesic. وقد بين(3) 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 متمايزة تنشأ على مناطق القطع او الجروح للاجزاء النباتية على مكونات الوسط الغذائي التي لها تأثير كبير في نشوء الكالس وادامته (4) 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 عاليـــــة ولاعتبارات اقتصاديـــــــــــــــة (5و 6). 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 (7). واشارت منظمة الصحة الدولية(WHO) ان 80% من سكان العالم يعتمدون على الادوية من مصادر نباتية في العلاج الطبي(8). 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 واللبيدات والبروتينات التي تنتج بالنبات باكمله او في عضو معين منه (9) 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 (10و11) .فقد تمكنت (12) 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 (13 و 14) . وذكر بعض الباحثين ان اضافة الاحماض الامينية الى الوسط الغذائي خارج الجسم الحي لاتعمل كمركب بادئ فقط (Precursor) بل كمحفز (Elicitor) ايضاً (15و6)

ونظراً لاهمية القلويدات عموماً وقلويدات papaverine وnoscapine في العلاج الطبي والصيدلاني التي تتواجد في نباتات العائلة الخشخاشية كنواتج 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 وB_5 بأستخدام انواع وتراكيز مختلفة من منظمات النمو النباتية وحث انسجة الكالس على زيادة انتاجها من قلويدي papaverine وnoscapine عن طريق تعريضها لاجهاد معين مع اضافة البادئ البنائي المناسب والكشف كماً ونوعاً عن هذين المركبين بأستخدام جهاز كروموتوغرافيا السائل ذو الاداء العالي (HPLC).

المواد وطرائق العمل :-

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

1- تحضير الوسط الغذائي : -

استعملت املاح الوسط الغذائي MS (16)و B_5 (17) واضيف الى املاح الوسطين الغذائيين كل من الفيتامينات ومنظمات النمو والسكروز جدول(1) وعدل الرقم الهيدروجيني pH الى5.7 بمحلول 1 عياري من هيدروكسيد الصوديوم او حامض الهيدروكلوريك . وكذلك اضيف الاوكسينNAA (Naphthalene acetic acid) بالتراكيز (0،0.5 و1.0و1.5) ملغم / لتر والسايتوكاينين BA(Banzyl adenine)بالتراكيز (0،0 و3 و0.6) ملغم / لتر لايجاد التركيز المناسب لاستحثاث الكالس من القمة النامية لبادرات الخشخاش بعمر اسبوع النامية من البذور التي تم تعقيمها بمادة هايبوكلورات الصوديوم بتركيز 3% لمدة 15 دقيقة (12). وسخن الوسط الغذائي بواسطة جهاز الخلاط المغناطيسي الحراري Hot plate magnetic stirrer وبعد ان اصبح الوسط متجانساً وزع في انابيب الزراعة ثم عقمت بجهاز الموصدة Autoclave على درجة حرارة 121م^o وتحت ضغط 1.04 كغم/سم ^{2} ولمدة20 دقيقة .

2- زراعة القمم النامية

اخذت البادرات واستاصلت منها القمم النامية بطول 1 ملم (12) وزرعت على الاوساط الغذائية المعدة لاستحثاث الكالس وبواقع عشرة مكررات لكل معاملة وحضنت الزروعات في الظلام التام على درجة حرارة 25 ±2 م^o

3- قياس الوزنين الطري والجاف للكالس المستحث

قيس الوزنين الطري والجاف للكالس بعد خمسة اسابيع من الزراعة بأستخدام ميزان حساس حيث استخرجت قطع الكالس الطري ووضعت على ورق ترشيح 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 الوزنين الطري والجاف للكالس المستحث في مرحلة النشوء لتحديد افضل وسط غذائي وافضل نوع وتركيز من الاوكسين والسايتوكاينين .

4- ادامة الكالس
تم زراعة الكالس الناتج من مرحلة الاستحثاث في وسطMS المجهز بتوليفة منNAA بالتراكيز (0،0.25،0.50 ،1.0) ملغم / لتر والـBA بالتراكيز (0، 0.25،0.50،1.0) 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

المـــادة	محتويات الوسط الغذائي(ملغم/ لتر)	
	MS	B_5
الأملاح	قوة كاملة	قوة كاملة
Pyrodoxine- HCl	0.5	1.0
Glycine	2.0	-
Nicotinc acid	0.5	1.0
Thiamine- HCl	0.1	0.01
Myo-inositol	100	100
NAA,BA	حسب التراكيز المستعملة بالتجربة	حسب التراكيز المستعملة بالتجربة
Kinetin	0.2	0.2
Sucrose	30000	20000
Agar	7000	7000

5- 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 بالتركيز 0.50 ملغم / لتر من كل من NAAوBA واضيف السكروز بالتراكيز (30، 60،90 ،120) غم / لتر و التايروسين بالتراكيز (0،10،20،30،40) ملغم / لتر الى الوسط الغذائي وبواقع عشرة مكررات لكل تركيز . حضنت الزروعات في الظلام وعلى درجة حرارة 25 ±2 م وبعد خمسة اسابيع اخذ الوزنين الطري والجاف للكالس بأستخدام ميزان حساس ثم اجريت عملية الاستخلاص.
6- استخلاص القلويدات 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 (18)
7- التقدير الكمي والنوعي للقلويدات غير المورفينية بأستعمال جهاز الكروموتوغرافيا السائل ذو الاداء العالي (HPLC).
- تحضير المحلول القياسي من Noscapine
اخذ 10 ملغم من النسكابين وخفف باستعمال 10مل من الأيثانول ليكون التركيز النهائي1ml /mg 1 (Noscapine:Ethanol)
- تحضير المحلول القياسي من Papaverine
اخذ 10 ملغم من البابافرين وخفف باستعمال 10مل من الأيثانول ليكون التركيز النهائي1ml /mg 1 (Papaverine:Ethanol)
تم سحب مقدار 1سم^3 لكل من المحلولين القياسين للنسكابين والبابافرين وحقن في جهز الـHPLC لتحديد زمن الاحتجاز Retention time وارتفاع حزمة العينة Area للمحلولين القياسين بعدها استخدم المستخلص للتحليل في جهاز HPLC حيث اذيبت العينة الجافة الناتجة عن طريق الاستخلاص في 2.5 سم3 من الايثانول وحقن حجم1 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 19:

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

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

النتائج والمناقشة :-

1- تأثير نوع الوسط الغذائي وتراكيز BA و NAA والتداخل بينهما في معدل الوزنين الطري والجاف للكالس (ملغم)

تشيرالنتائج 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 155.1و14.54 ملغم ،على التوالي . كما اثر التداخل بين نوع الوسط الغذائي وتركيز BA معنوياً في الوزنين الطري والجاف للكالس فأعطى الوسط MS المجهز بالتركيز 0.3 ملغم / لتر من BAاعلى معدل بلغا 231.3 و 21.70 ملغم للوزنين الطري والجاف للكالس على التوالي . بينما اعطى الوسط الغذائي B_5 عند التركيز نفسه من BA 156.2 و14.42 ملغم للوزنين الطري والجاف ،على التوالي . وكان للتداخل بين الوسطMS وتراكيز NAA تأثيراً معنوياً فأعطى الوسط MS المجهز بتركيز 0.5 ملغم / لتر من NAA اعلى معدل بلغا 222.3 و20.86 ملغم للوزنين الطري والجاف على التوالي والذي لم يختلف معنوياً عن التركيز 1 ملغم / لتر من NAA الذي اعطى 214.4 و20.09ملغم للوزنين الطري والجاف على التوالي . في حين اعطى الوسط B_5 المجهز بتركيز 0.5 ملغم / لتر NAA 184.4و17.0 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 وNAA فيلاحظ ان القمم النامية المزروعة في وسطMS المزود بـ0.3 ملغم / لترBA +0.5 ملغم / لترNAA قد اعطى اعلى معدل بلغا 357.4 و33.71 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 الغذائيB_5 وبوجود BAوNAA 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 والنووية والمرافقات الانزيمية (21 و 22) مما شجع نمو وتطور الجزء النباتي المزروع كما قد يرجع الى زيادة السكروز 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 وجدتا ان وسط MS كان افضل من وسطB_5 في استحثاث الكالس من القمة النامية للبادرات . ويستنتج ان التركيز 0.3 ملغم / لتر من BA والتركيز 0.5 ملغم / لتر من NAA في وسطMS 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 والاتساع فضلاً عن تأثيرها في الصفيحة الوسطى للخلايا مما يساعد على اتساع الجدار الخلوي وذلك عند الوصول الى التوازن الامثل بين الاوكسين والسايتوكاينين اذ يعمل السايتوكاينين بوجود الاوكسين في الوسط الغذائي كمفتاح لبدء لانقسام الخلو ي، اما عند زيادة التركيز فأنه يؤدي الى الاخلال بالتوازن الامثل مما يؤدي الى انخفاض معدل وزن الكالس (7) وقد لوحظ ان اضافة الاوكسينات الى الوسط الغذائي وبتركيز اعلى من التركيز المثالي فأنه يؤثر في عمل الانزيمات المسؤولة عن بناء الجدار الخلوي وتحللها مما يؤثر في الخصائص الميكانيكية للجدار والتأثير في انقسام الخلايا وتكوين الكالس (22) تتفق هذه النتائج مع ماتوصل اليه (24 ،25 ،26 ،27). من ان وجود السايتوكاينين مع الاوكسين قد حفز استحثاث الكالس من الاجزاء النباتية المزروعة على وسط MS.

2- تأثير NAAوBA وتداخلهما في ادامة الكالس المستحث .

تشير النتائج في الجدول (3 أ و ب) الى تفوق الوسط الغذائيMS المجهز بالتركيز 0.5 ملغم / لتر NAA في اعطاء اعلى معدل لوزني الكالس الطري والجاف بلغا 373.1و33.7 ملغم على التوالي . الذي اختلف معنوياً عن التراكيز الاخرى . وتوضح النتائج في الجدول نفسه تفوق BA بالتركيز0.50 ملغم / لتر في اعطاء اعلى معدل لوزني الكالس الطري والجاف بلغا 375.2و34.31 ملغم على التوالي الذي اختلف معنوياً عن التراكيز الاخرى . وعن تأثير التداخل بين تراكيز BAوNAA المضافة الى الوسط الغذائي فقد اظهرت النتائج الجدول نفسه الى تفوق الوسط المجهز بتركيز 0.5 ملغم / لتر NAA و0.5 ملغم / لترBA اذ اعطى اعلى معدل لوزني الكالس الطري والجاف بلغا 532.30و50.22 ملغم على التوالي والذي اختلف معنوياً عن بقية التداخلات .

يلاحظ ان النمو الجيد للكالس يكون من خلال التوازن بين تراكيز الاوكسينات والسايتوكاينينات وان الزيادة في تراكيز اي منهما على حساب الاخر سوف يؤثر سلباً في نمو الكالس (28 ،4) .ان فعالية السايتوكاينين في احداث الانقسام تزداد بوجود الاوكسين في الوسط الغذائي وعند المستوى المناسب من التركيز (7 ،27) تتفق هذه النتائج مع ماتوصلت اليه (14) من ان اضافة تراكيز معينة من الاوكسين والسايتوكاينين قد حفز نمو وادامة الكالس المستحث من القمة النامية لبادرة البلادونا.

3- تأثير تراكيز السكروز والتايروسين في معدل الوزنين الطري والجاف للكالس (ملغم).

يوضح الجدول (4 أ و ب) انخفاضا معدل وزني الكالس الطري والجاف معنوياً بزيادة تراكيز السكروز المضافة الى وسط MS المجهز بتركيز 0.5 ملغم / لتر منNAAوBAاذ اعطى وسطMS المجهز بتركيز 30 غم / لتر من السكروز اعلى معدل وزنين طري وجاف للكالس بلغا 548.5 و51.6 ملغم على التوالي وانخفض معدل وزني الكالس الطري والجاف عند التركيز 120غم / لتر من السكروز فبلغا257.8 و24.0 ملغم على التوالي . ويشير الجدول نفسه الى ان الوسط MS المجهز بالتركيز 20ملغم / لتر من التايروسين اعطى اعلى معدل وزن طري للكالس بلغ 412.3ملغم في حين بلغ اقله 356.2ملغم عند

التركيز 40 ملغم / لتر من التايروسين . واظهرت النتائج تفوق التركيز 0 ملغم / لتر من الحامض الاميني التايروسين في اعطاء اعلى معدل وزن جاف للكالس بلغ 41.5ملغم وبلغ اقله 35.3 ملغم عند التركيز 30ملغم / 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 53.9ملغم .

قد يعزى السبب في تفوق الوسط الغذائي المجهز بتركيز 30غم / لتر سكروز في وزني الكالس الطري والجاف الى ان السكروز هو المصدر الكربوهيدراتي الذي يزود الخلايا بالطاقة اللازمة للنمو والبقاء (4) 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 (29) . وبالتالي فأن السكروز المضاف الى الوسط الغذائي يعد مصدراً للطاقة فضلاً عن المحافظة على جهد اوزموزي مناسب في وسط الزراعة (4) ،وهذا يتفق مع ما وجده (30 ،12 ،14) 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 BAوالـNAA والتداخل بينهما في معدل الوزن الطري والجاف للكالس (ملغم) بعد خمسة اسابيع من الزراعة

2.أ: الوزن الطري

نوع الوسط الغذائي	تراكيز BA(ملغم / لتر)	تراكيز NAA(ملغم / لتر)				المعدل
		0.0	0.5	1.0	1.5	
MS	0.0	0.0	136.2	118.9	127.1	95.5
	0.3	0.0	357.4	326.8	241.3	231.3
	0.6	0.0	173.5	197.7	183.4	138.6
المعدل		0.0	222.3	214.4	183.9	155.1
B_5	0.0	0.0	132.8	143.6	126.5	100.7
	0.3	0.0	253.3	198.7	172.9	156.2
	0.6	0.0	167.3	172.4	162.2	125.4
المعدل		0.0	184.4	171.5	153.8	127.4
قيمة L.S.D 0.05	الوسط الغذائي =9.76 الوسطX BA=11.55			الوسطX NAA= 10.85 التداخل الثلاثي=14.96		

2.ب: الوزن الجاف

نوع الوسط الغذائي	تراكيز BA(ملغم/ لتر)	تراكيز NAA(ملغم / لتر)				المعدل
		0.0	0.5	1.0	1.5	
MS	0.0	0.0	12.13	10.85	11.63	8.65
	0.3	0.0	33.71	30.65	22.46	21.70
	0.6	0.0	16.75	18.79	17.58	13.28
المعدل		0.0	20.86	20.09	17.22	14.54
B5	0.0	0.0	12.14	13.33	11.57	9.26
	0.3	0.0	23.41	18.12	16.18	14.42
	0.6	0.0	15.63	16.26	15.14	11.75
المعدل		0.0	17.06	15.90	14.29	11.81
قيمة L.S.D 0.05	الوسط الغذائي = 0.8 الوسطX BA=1.1			التداخل الثلاثي=1.9 الوسطX NAA= 1.2		

جدول(3): تأثير تراكيزNAA والـBA والتداخل بينهما في ادامة الكالس (الوزن الطري والجاف)ملغم بعد خمسة اسابيع من الزراعة (الوزن الابتدائي100ملغم)

3.أ:الوزن الطري(ملغم)

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

.

3 ب.الوزن الجاف(ملغم)

تراكيزNAA (ملغم /لتر)	تراكيزBA(ملغم / لتر)				المعدل
	0.0	0.25	0.50	1.00	
0.0	12.13	12.26	16.83	12.28	13.37
0.25	20.14	41.18	42.56	23.12	31.75
0.50	19.94	41.94	50.22	22.72	33.70
1.00	18.87	29.66	27.65	22.96	24.78
ا.ف.م.0.05	2.85				1.17
المعدل	17.77	31.26	34.31	20.27	
ا.ف.م0.05	1.17				

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)

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

. 4.ب : الوزن الجاف (ملغم)

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

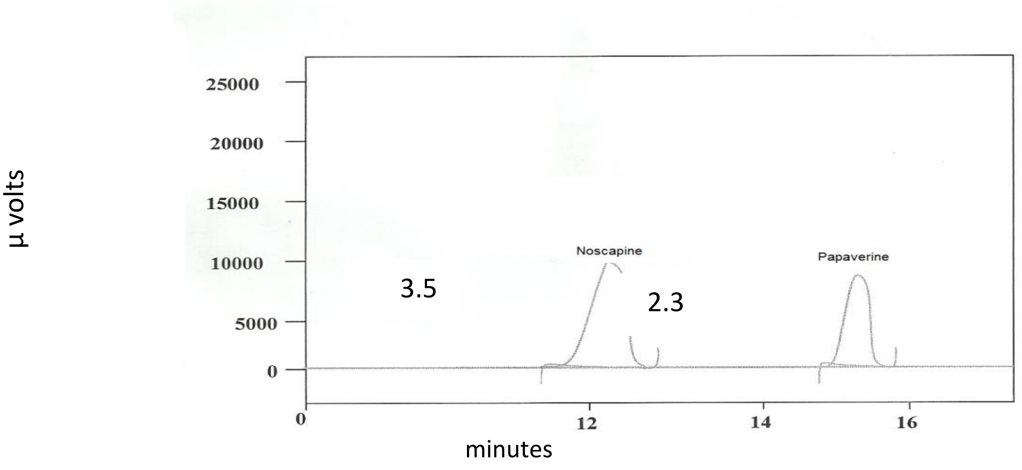
4- تأثير التداخل بين تراكيز السكروز والتايروسين في محتوى الكالس الطري من البابافرين والنسكابين.

يلاحظ من النتائج المبينة في جدول (5) والمقدرة بجهاز HPLC ان هناك زيادة في كمية قلويدي البابافرين والنسكابين المستخلصة من الكالس الطري للقمة النامية لبادرة الخشخاش استجابة لزيادة تراكيز السكروز والتايروسين المضافة الى الوسط الغذائي MS المجهز بـ0.5 ملغم / لتر من كل من NAA وBA . حيث يتبين من الوسط الغذائي MS المجهز بتركيز 30غم / لتر سكروز ان هناك استجابة في انتاج القلويدين بزيادة تراكيز التايروسين والمضافة للوسط عند وجود مستوى ثابت من السكروز . حيث بلغت اقل قيمتين عند معاملة المقارنة 2.3و3.5 ملغم / غم من البابافرين والنسكابين ،على التوالي شكل (1) . واعلى قيمتين في الوسط MS المجهز بتركيز 30 ملغم / لتر من التايروسين بلغا 3.2 و5.2 ملغم / غم من البابافرين والنسكابين ،على التوالي شكل (2). ثم انخفضت الاستجابة بزيادة تركيز التايروسين الى 40ملغم / لتر اذ اعطى 3.1و4.8 ملغم / غم من البابافرين والنسكابين 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 قلويدي البابافرين والنسكابين بزيادة تركيز التايروسين المضاف للوسط فبلغت اعلى قيمتين 3.5و 5.5 ملغم / غم بابافرين ونسكابين عند التركيز 30ملغم / لتر تايروسين شكل(3) . ثم قلت الاستجابة بزيادة تركيز التايروسين الى 40 ملغم / لتر اذ بلغا 3.3و5.1 ملغم / غم بابافرين ونسكابين على التوالي . وقد تفوق الوسط الغذائي MSالمجهز بتركيز 90غم / لتر سكروز فأعطى اعلى استجابة في كمية القلويدات بزيادة تراكيز التايروسين المضافة الى الوسط الغذائي عند وجود مستوى ثابت من السكروز حيث بلغت اقل قيمتين 2.9و4.2 ملغم /غم بابافرين ونسكابين على التوالي عند معاملة المقارنة كما في الشكل (4) ثم تلاها التركيز 20ملغم / لتر تايروسين فبلغا 3.7و5.7 ملغم / غم بابافرين ونسكابين على التوالي شكل (5) وبلغت اعلى قيمتين للبابافرين والنسكابين3.9و5.9 ملغم / غم على التوالي عند التركيز 30 ملغم / لتر تايروسين شكل (6). ثم قلت الاستجابة بزيادة تركيز التايروسين الى 40ملغم / لتر فبلغا 3.6و5.6 ملغم /غم من البابافرين والنسكابين على التوالي . ثم قلت الاستجابة لانتاج القلويدات في الوسط الغذائي MS المجهز بتركيز 120 غم / لتر من السكروز واذ بلغا 2.7و4.0 ملغم /غم بابافرين ونسكابين على التوالي في معاملة المقارنة وبلغت اعلى قيمة في الوسط الغذائي نفسه عند التركيز 30 ملغم / لتر من التايروسين اذ بلغا 3.4و5.7ملغم / غم بابافرين ونسكابين على التوالي شكل (7).

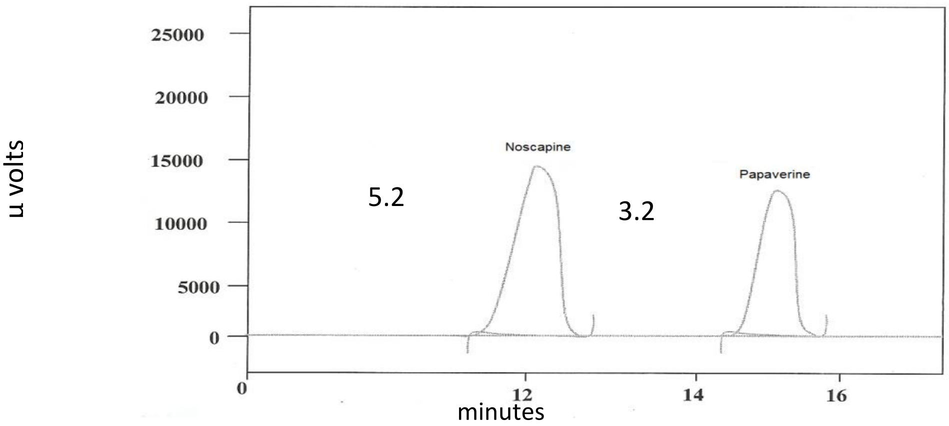
قد يعود السبب في زيادة انتاج القلويدات بزيادة تراكيز الحامض الاميني التايروسين المضافة الى كونه البادئ البنائي للعديد من قلويدات الـ Benzylisoquinoline مثل البابافرين والنسكابين (31) فمن الوظائف المهمة للاحماض الامينية توفير الهيكل الكاربوني والمكونات النايتروجينية للقلويدات (32) فضلاً عن ان زيادة تراكيز الاحماض الامينية المضافة سوف يؤدي الى زيادة المركبات النايتروجينية الذائبة في داخل الخلايا مما يؤدي الى زيادة جهدها الازموزية الامر الذي يدفعها لسحب الماء من الخلايا المجاورة فتمتلئ وتضغط على جدار الخلية الذي ربما يؤدي الى اتلاف الخلايا والذي له تأثير سلبي في محتواها من المركبات الثانوية (33) او قد يعود السبب الى ان زيادة الاجهاد قد يسبب انخفاض قابلية الخلايا على امتصاص العناصر الغذائية التي تحتاجها لانتاج مركبات الايض الاولي وبالتالي قله انتاج الايض الثانوي الذي يعد ناتجا نهائيا للايض الاولي (22).
ويلاحظ ان هناك زيادة تدريجية في كمية قلويدي البابافرين والنسكابين 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 (29) .وتتفق هذه النتائج مع ماذكره (29 ،21) في انتاج المركبات الثانوية خارج الجسم الحي، وتتفق مع ما وجده (34) من ان اضافة السكروز والتايروسين تؤدي الى زيادة انتاج قلويدي 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

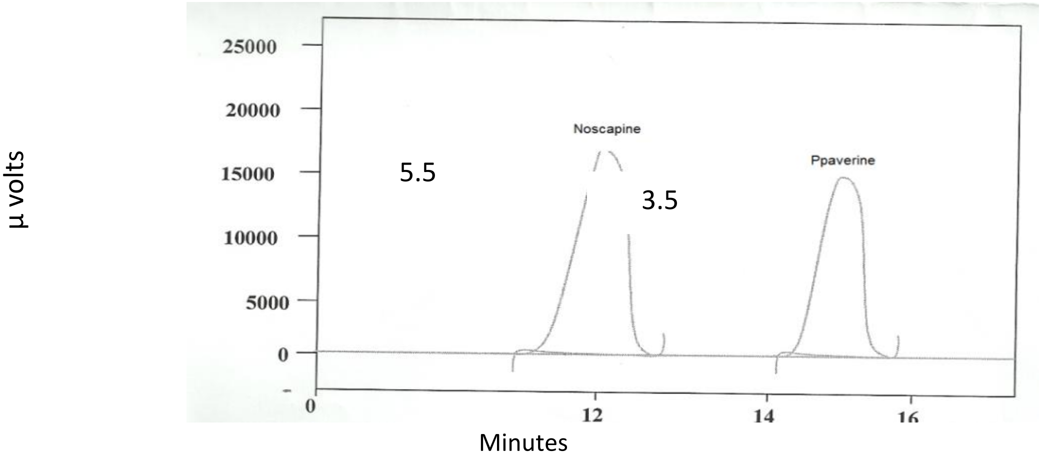
Noscapine (ملغم/غم) وزن طري	Papaverine (ملغم/غم) وزن طري	التايروسين(ملغم/لتر)	السكروز (غم/لتر)
3.5	2.3	0	30
4.5	2.6	10	
5.1	2.8	20	
5.2	3.2	30	
4.8	3.1	40	
3.9	2.5	0	60
4.8	2.7	10	
5.3	3.0	20	
5.5	3.5	30	
5.1	3.3	40	
4.2	2.9	0	90
5.2	3.4	10	
5.7	3.7	20	
5.9	3.9	30	
5.6	3.6	40	
4.0	2.7	0	120
4.5	3.1	10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



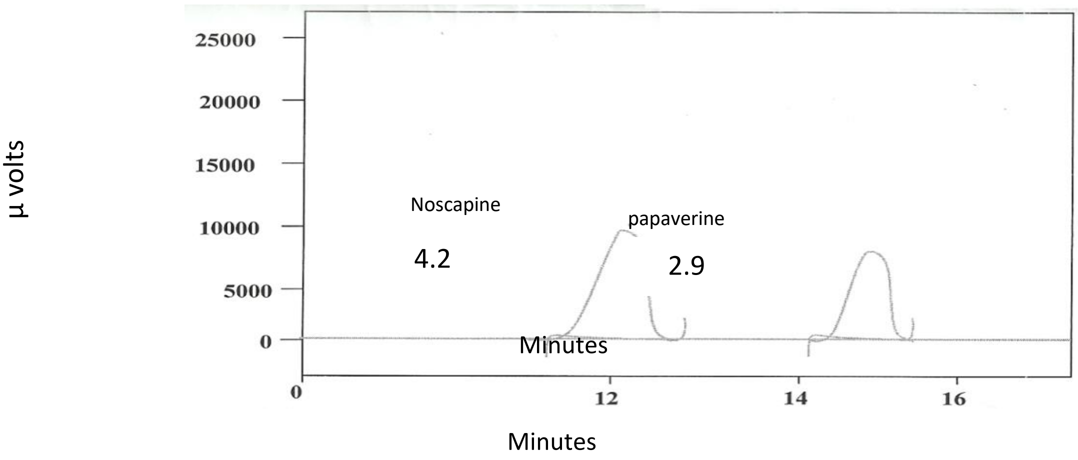
شكل (1): كمية البابافرين والنسكابين (ملغم/غم) في وسط MS المجهز بـ30 غم / لتر سكروز +0ملغم /لتر تايروسين



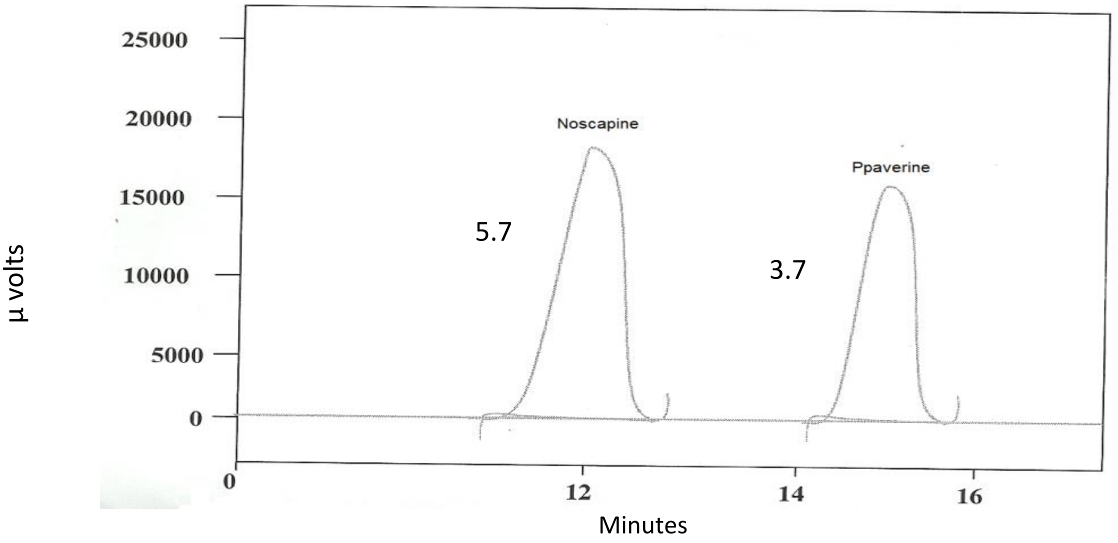
شكل (2): كمية البابافرين والنسكابين (ملغم /غم) في وسطMS المجهز بـ30 غم /لتر سكروز+30ملغم/لتر تايروسين



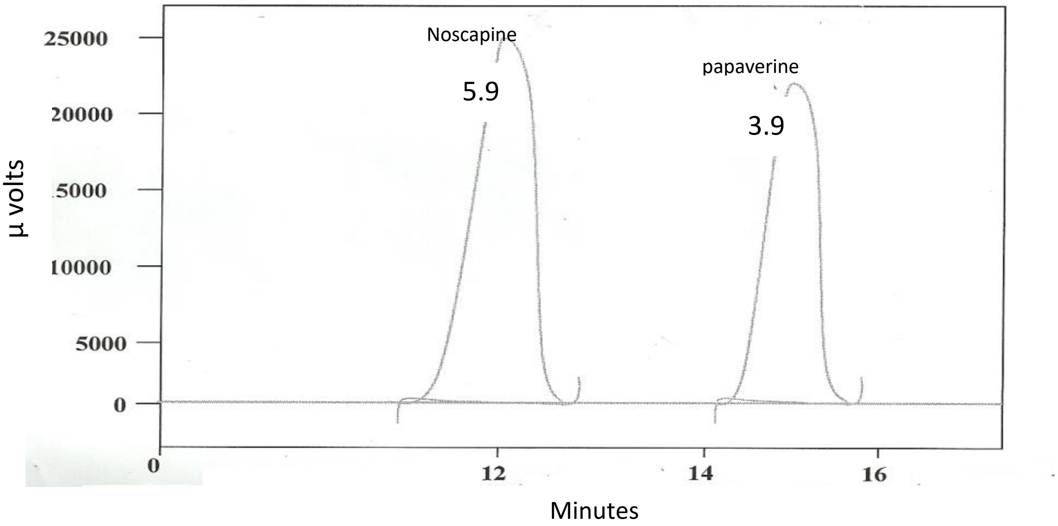
شكل (3) :كمية البابافرين والنسكابين (ملغم /غم) في وسطMS المجهز بـ60 غم /لتر سكروز+30ملغم/لتر تايروسين



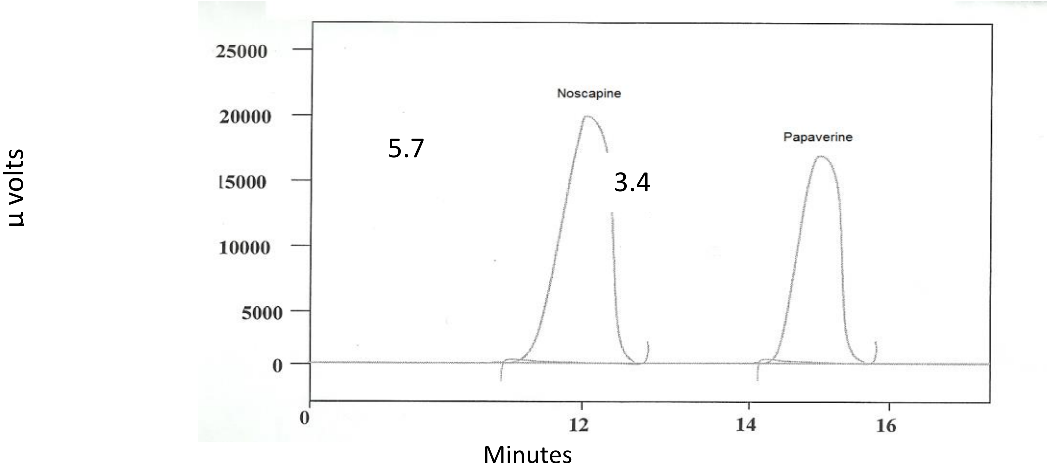
شكل (4): كمية البابافرين والنسكابين (ملغم /غم) في وسطMS المجهز بـ90 غم /لتر سكروز+0 ملغم/لتر



شكل (5): كمية البابافرين والنسكابين (ملغم /غم) في وسطMS المجهز بـ90 غم /لتر سكروز+20 ملغم/لتر تايروسين



شكل (6) :كمية البابافرين والنسكابين (ملغم /غم) في وسطMS المجهز بـ90 غم /لتر سكروز+30 ملغم/لتر تايروسين



شكل (7): كمية البابافرين والنسكابين (ملغم /غم) في وسطMS المجهز بـ120 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, l.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. Khlifa.(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.

12- 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.

14- الساعدي . نوراجبر جاسم .(2011). انتاج بعض قلويدات التروبان من كالس نبات البلادونا *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 Assciates, 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 heterphylus* Sw.) culture. African Journal of Biotecnology ,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. Biotechanol., 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-fluorotyosine 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 Socity of Plant Phsiology Press: 358-410.

34- حمد ، محمد شهاب وابراهيم 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:45-54