تأثير حامض الجاسمونك JA وكلوريد الصوديوم NaCl والفينل الأنين Phe في إنتاج بعض قلويدات الاتروبان لنبات السكران الأبيض.*Hyoscyamus albus* L خارج الجسم الحي

زياد شهاب احمد محمد شهاب حمد طلال محمود احمد

كلية الزراعة / جامعة تكريت كلية الزراعة / جامعة بغداد كلية الزراعة والغابات/ جامعة الموصل

ziaddema@gmail.com

الملخص

اجريت التجربة في مختبر زراعة الأنسجة النباتية التابع لقسم البستنة / كلية الزراعة / جامعة بغداد خلال سنة 2016، لغرض استحثاث الكالس وتحفيزه على إنتاج قلويدات الاتروبان (التروبين، الأتروبين) من نبات السكران الأبيض خارج الجسم الحي، باستخدام حامض الجاسمونك JA بالتراكيز (0.0، 0.5، 1.0، 1.5، 2.0) ملغم. لتر$^{-1}$، NaCl بالتراكيز(0.0، 2.5، 5.0، 7.5، 10.0) غم. لتر$^{-1}$، والـفينل الأنين Phe بالتراكيز(0، 10، 20، 30) ملغم. لتر$^{-1}$ بشكل منفرد ومتداخل مع بعضها البعض الآخر. فقد أعطى الوسط الغذائي المجهز بـ JA بتركيز 2 ملغم. لتر$^{-1}$ مع 0.0 غم. لتر$^{-1}$ من الـ NaCl مع 0.0 ملغم. لتر$^{-1}$ من الـ Phe، أعلى معدل وزن طري للكالس اذ بلغ (876) ملغم. كما تم التقدير الكمي والنوعي لقلويدات الاتروبان بإستخدام جهاز HPLC. حيث أظهرت نتائج التحليل تفوق الوسط الغذائي المجهز بـ JA بتركيز 2 ملغم. لتر$^{-1}$ مع 5 غم. لتر$^{-1}$ من الـ NaCl مع 30 ملغم. لتر$^{-1}$ من الـ Phe في أعطاء أعلى كمية لقلويد التروبين بلغت 553.23 مايكروغرام. غرام وزن جاف$^{-1}$، أما بالنسبة لقلويد الأتروبين فقد ازدادت كمية هذا القلويد لتبلغ 922.73 مايكروغرام. غرام وزن جاف$^{-1}$ عند معاملة التداخل الثلاثي المتضمنة إضافة الـ JA بتركيز 2 ملغم. لتر$^{-1}$ مع 10 غم. لتر$^{-1}$ من الـ NaCl مع 10 ملغم. لتر$^{-1}$ من الـ Phe.

Effect of JA, NaCl and Phe on *in vitro* Production of Some Atropine Alkaloids for *Hyoscyamus albus* L.

Talal M. Ahmed **Mohammed Sh. Ahmed** **Ziyad Sh. Ahmed**

Coll. of Agric. **Coll. of Agric.** **Coll. of Agric. & Forestry**

Univ. of Tikrit **Uni. of Baghdad** **Univ. of Mosul**

ABSTRACT

This study was conducted in the laboratory of plant cells and tissue Department of Gardening and Landscaping / College of Agriculture / University of Baghdad in 2016 for the purpose of callus *in vitro* induction and overproduce of some alkaloids represented by (Tropine and Atropine) from *Hyoscyamus albus* L.Using JA at concentrations (0.0, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0) mg. L^{-1}, NaCl at concentrations (0, 2.5, 5.0, 7.5 and 10.0) g. L^{-1} and Phe at concentrations (0, 10, 20 and 30) mg. L^{-1} ,single and in combination with each other, . Culture media that is provided with JA concentration of 2 mg. L $^{-1}$ with 0.0 g. L $^{-1}$ of the NaCl with 0.0 mg. L $^{-1}$ of the Phe gave the highest percentage of fresh Callus weight (876) mg. The quantitative and qualitative assessments of the Tropine alkaloids were estimated using HPLC device. The results of HPLC technique analysis showed the superiority of medium provided with JA concentration of 2 mg. L $^{-1}$ with 5 g. L $^{-1}$ of the NaCl with 30 mg. L $^{-1}$ of the Phe in giving the highest amount of the Altropin alkaloid reached to 553.23 µg. g dry weight^{-1}. As for the atropine alkaloid, its amount increased to 922.73 µg. g dry weight $^{-1}$ with triple interacted treatment including the addition of the JA concentration of 2 mg. L $^{-1}$ with 10 g. L $^{-1}$ of the NaCl with 10 mg. L $^{-1}$ of the Phe.

البحث مستل من أطروحة دكتوراه للباحث الأول

المقدمة

ينتمي نبات السكران الأبيض *Hyoscyamus albus* L. إلى العائلة الباذنجانية Solanacea، ويعد من النباتات الطبية المهمة التي تستخدم كمصدر للهيوسيامين والسكوبولامين (6)(9)، فقد أوضح (14) بان هذين المركبين يظهران في المقدمة ضمن قائمة العشرة مركبات الأولى الطبيعية الأكثر استخداما في الولايات المتحدة الأمريكية. فقد أشارت منظمة الصحة الدولية إلى أن 80 % من سكان العالم يعتمدون على الأدوية المنتجة من مصادر نباتية في العلاج الطبي (10). وتهدف العديد من البحوث إلى إيجاد الطرائق الكفيلة لزيادة إنتاج المواد والمركبات العلاجية من النباتات, وخصص لذلك مجموعات كبيرة من الباحثين المختصين, خاصة مع الثورة التي احدثتها منظمات النمو النباتية في مجال تأثيرها في زيادة إنتاج وتراكم المواد الفعالة في تلك النباتات وتنشيط الخلايا وتمايزها, ولغرض تخفيف التكاليف الباهظة التي كانت تصرف في إنتاج هذه المواد في الحقل *in vivo* فأصبحت تنتج مختبريا خارج الجسم الحي *in vitro* في زروعات خلوية يتحكم بها وبكمية إنتاجها منظمات النمو والمحفزات التي ترفع من تراكم هذه المواد، حيث يمكن التحكم في إنتاج مركبات الأيض الثانوي (القلويدات) من خلال التنظيم والتحكم بالعوامل الفيزيائية والمغذيات لغرض زيادة إنتاج تلك المركبات، حيث أشارت العديد من الدراسات إلى أمكانية تحفيز الأجزاء النباتية المزروعة لإنتاج المركبات الثانوية عند تعرضها للإجهاد، كالإجهاد الملحي الذي يتمثل بإضافة كلوريد الكالسيوم او الصوديوم إلى الوسط الغذائي او من خلال إضافة البوادئ التي تعد مركبات أولية أو وسطية في مسار السلسلة البنائية للمركب الفعال. فقد تمكن بعض الباحثين من زيادة كمية المركبات الثانوية التي تستخدم في المجال الطبي كقلويدات التروبان، فقد بين (4) أن إضافة 200 ملغم. لتر$^{-1}$ من NaCl إلى وسط استحثاث وتنمية الكالس لنبات السكران الأسود قد سبب انخفاض في معدل الوزن الطري للكالس بلغ 845 ملغم، مقارنة مع معاملة المقارنة التي بلغ فيها معدل الوزن 1958 ملغم، بعد ستة أسابيع من الزراعة، كما بينت دراستهم أن كمية قلويد الهيوسيامين المستخلص من كالس نبات السكران الأسود النامي على وسط MS والمجهز بـ 200 ملغم. لتر$^{-1}$ من الـ NaCl قد انخفضت بشكل كبير ومعنوي مقارنة مع معاملة المقارنة إذ بلغ فيها محتوى الهيوسيامين 81.25 جزء بالمليون مقابل 3.72 جزء بالمليون للمعاملة بـ NaCl، بالإضافة إلى ذلك وجد أن تركيز الـ NaCl المستخدم قد زاد من محتوى الكالس لـقلويد الـ Scopolamine حيث بلغت كمية هذا القلويد 151.97 جزء بالمليون مقابل 56.93 لمعاملة المقارنة بعد ستة اسابيع من الزراعة. كما ذكر (2) أن هنالك تباين في إنتاج قلويدات الأتروبان من كالس نبات البلادونا باختلاف تراكيز الفينل الأنين والسكروز المستخدمة، حيث لاحظ أن استخدام الـ Phe بتركيز 10 ملغم. لتر$^{-1}$ والسكروز بتركيز 60 غم. لتر$^{-1}$، أدى إلى زيادة إنتاج مركب Atropine، اذ بلغ 528.73 مايكروغرام. غرام وزن جاف$^{-1}$، اما بالنسبة لكمية قلويد الـ Scopolamine فقد ازدادت لتبلغ 174.55 مايكرو غرام. غرام وزن جاف$^{-1}$، عند المعاملة المتضمنة إضافة الـ Phe بتركيز 20 ملغم. لتر$^{-1}$ مع السكروز بتركيز 60 غم. لتر$^{-1}$.

وتهدف هذه الدراسة إلى : دراسة تأثير حامض الجاسمونك بوصفه من الهرمونات النباتية الحديثة الاكتشاف وكلوريد الصوديوم والفينل الأنين في إنتاج قلويدات الاتروبان (التروبين والأتروبين) من الكالس الناتج عن زراعة الأوراق الحقيقية لنبات السكران الأبيض.

المواد وطرائق العمل :

نفذت التجربة في مختبر زراعة الأنسجة النباتية التابع لقسم البستنة / كلية الزراعة / جامعة بغداد للفترة من شباط 2016 إلى أب 2016، لغرض استحثاث الكالس وتحفيزه على إنتاج قلويدات الاتروبان (التروبين والأتروبين) من أوراق نبات السكران الأبيض خارج الجسم الحي.

تأثير تراكيز مختلفة من JA و NaCl و Phe وتداخلاتها في معدل الوزن الطري للكالس.

زرعت أجزاء من الورقة الحقيقية الحاوية على العرق الوسطي في الوسط الغذائي المجهز بتراكيز مختلفة من كل من JA بالتراكيز (0.0، 0.5، 1.0، 1.5، 2.0) ملغم. لتر$^{-1}$، NaCl بالتراكيز(0.0، 2.5، 5.0، 7.5، 10.0) غم. لتر$^{-1}$، والـ Phe بالتراكيز(0، 10، 20، 30) ملغم. لتر$^{-1}$ بشكل منفرد ومتداخل مع بعضها البعض، مضافاً له 0.75 و 0.1 ملغم. لتر$^{-1}$ 2,4-D و BA على التوالي، وسجلت نتائج الوزن الطري للكالس بعد ستة أسابيع من الزراعة بإستخدام الميزان الحساس، ومن ثم تقدير قلويدات الأتروبان نوعياً وكمياً.

تأثير تراكيز مختلفة من JA و NaCl و Phe وتداخلاتها في كمية قلويدات الاتروبان (التروبين والأتروبين).

ISSN 2072-3875

أجريت عملية التقدير الكمي والنوعي لقلويدات الأتروبان، في شركة الحقول البيضاء للاستثمارات والدراسات البيئية والهندسية، وذلك بإخذ 100 ملغم وزن جاف من كل معاملة وتذاب في 10 مل من الميثانول، وتركها لمدة 10 دقائق على جهاز الخلاط الكهربائي المغناطيسي الحراري (بدون حرارة)، ثم ترشيح العينة، بعد ذلك يضاف لها HCl بتركيز 1 % بشكل قطرات متتابعة إلى أن يصبح الـ pH 2 أو اقل من ذلك بقليل. توضع العينة في قمع الفصل مع إضافة 20مل*2 من diethyl ether ، ثم يرج ويفتح بين الحين والأخر، ويوضع قمع الفصل على الحامل لحين تكون طبقتين تجمع الطبقة السفلى (والتي تحتوي على قلويدات الأتروبان و diethyl ether) وتهمل العليا، ويحرك المحلول الحاوي على قلويدات الأتروبان وdiethyl ether بإستخدام جهاز الخلاط الكهربائي المغناطيسي الحراري (بدون حرارة)، ثم تضاف كمية من الأمونيا للعينة ليصبح الـ pH 12 أو قريباً من ذلك، ثم يعاد وضعها في قمع الفصل ويضاف لها 10 مل من الكلوروفورم $CHCL_3$سوف تتكون طبقتين السفلى تحتوي على القلويدات مع الكلوروفورم تؤخذ لغرض القراءة (11). يتم حقن كمية 20 مايكروليتر من المحاليل القياسي في جهاز كروماتو غرافيا السائل ذو الأداء العالي High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ذا النوع (Shimadzu 10AV-LC)، لغرض تحديد زمن الاحتجاز Retention time وارتفاع حزمة العينة Area لكل محلول من المحاليل القياسي، وحقنت العينات بالتتابع، لتحديد تركيز المركبات الفعالة في كل عينة، وحسب المعادلة المذكورة في إدناه، علماً أن نوع عمود الفصل (Column) المستخدم (1.D 50X4.5 mm) والطور المتحرك يتكون من (0.01M Phosphate buffer PH 8.2: acetonitrile 60:40 V:V)، وبلغت سرعة جريان العينة في الجهاز 1.2 مل دقيقة$^{-1}$، وقيست القراءات على طول موجي مقداره 231 nm وبدرجة حرارة 25 مْ. حسب تركيز كل مركب وفق المعادلة الأتية:- تركيز النموذج = تركيز المحلول القياسي × (مساحة النموذج / مساحة النموذج القياسي) ×عدد مرات التخفيف

التحليل الإحصائي :

استخدام التصميم العشوائي الكامل Completely Randomized Designee وبتجارب عامليه، وحللت النتائج بإستخدام برنامج التحليل الإحصائي Gen Stat، و قورنت المتوسطات وفق اختبار L.S.D وبمستوى احتمال 5٪، (3) كل معاملة تضمنت 10 مكررات.

النتائج والمناقشة :

تأثير تراكيز الـ JA و NaCl و Phe وتداخلاتها في الوزن الطري للكالس (ملغم) المستحث من الأوراق الحقيقية لنبات السكران الأبيض بعد ستة أسابيع من الزراعة في وسط MS المجهز بـ 0.75 ملغم. لتر$^{-1}$ من الـ 2,4-D و 0.1 ملغم. لتر$^{-1}$ من الـ BA.

تشير نتائج الجدول (1 / a) إلى أن التركيز 2 ملغم. لتر$^{-1}$ من الـJA الأكثر تأثيراً في زيادة معدل الوزن الطري للكالس، إذ أزداد معدل الوزن الطري للكالس عند هذا التركيز ليبلغ 337 ملغم مقارنة بالتركيز 0.5 ملغم. لتر$^{-1}$ والذي انخفض فيه معدل الوزن الطري للكالس ليبلغ إدناه بـ231 ملغم. بينما أدت إضافة تراكيز الـ NaCl إلى الوسط الغذائي إلى حصول انخفاض معنوي واضح في معدل الوزن الطري للكالس، إذ أعطت معاملة المقارنة أعلى معدل وزن طري للكالس بلغ 624 ملغم مقارنة بالوسط الغذائي المجهز بـ 10غم. لتر$^{-1}$ من الـ NaCl والذي انخفض فيه معدل الوزن الطري للكالس ليبلغ 38 ملغم. كما يبين الجدول نفسه أن التداخل الثنائي بين تراكيز الـ JA و NaCl كان معنوياً في التأثير في صفة معدل الوزن الطري للكالس، إذ تفوقت المعاملة 2 ملغم. لتر$^{-1}$ من الـ JA مع 0.0 غم. لتر$^{-1}$ من الـ NaCl معنوياً في أعطاء أعلى معدل وزن طري للكالس بلغ 831 ملغم. بينما يلاحظ في جدول (1/ b) وجود انخفاض معنوي في معدل الوزن الطري للكالس عند إضافة تراكيز الـ Phe إلى الوسط الغذائي مقارنة بمعاملة المقارنة، التي أعطت أعلى معدل وزن طري بلغ 293 ملغم. أما بالنسبة لتأثير التدخل الثنائي بين تراكيز الـ JA و Phe فقد كان معنوياً في معظم المعاملات كما هو موضح في الجدول (1 / b) حيث تفوقت المعاملة 2 ملغم. لتر$^{-1}$ من الـ JA مع 0.0 ملغم. لتر$^{-1}$ من الـ Phe في أعطاء أعلى معدل للوزن الطري للكالس بلغ 366 ملغم، بينما انخفض معدل الوزن الطري للكالس بشكل معنوي ليبلغ إدناه بـ 206 ملغم، عند المعاملة المتضمنة 0.5 من الـ JA مع 30 ملغم. لتر$^{-1}$ من الـ Phe. أما بخصوص التداخل الثنائي بين تراكيز الـ NaCl و Phe المبينة في الجدول (1 / c) فقد كان هذا التداخل ذا تأثير معنوي، إذ كانت المعاملة 0.0 غم. لتر$^{-1}$ من الـ NaCl مع 0.0 ملغم. لتر$^{-1}$ من الـ Phe الأكثر تأثيراً في زيادة معدل الوزن الطري للكالس المستحث من الأوراق الحقيقية إذ بلغ معدل الوزن 675 ملغم.

في حين تشير نتائج التداخل الثلاثي بين تراكيز الـ JA و NaCl و Phe في الجدول (1/ d) إلى تفوق الوسط الغذائي المجهز بـ 2 ملغم. لتر$^{-1}$ من الـ JA مع 0.0 غم. لتر$^{-1}$ من الـ NaCl مع 0.0 ملغم. لتر$^{-1}$ من الـ Phe معنوياً، إذ أعطى أعلى معدل وزن طري للكالس يمكن الوصول له بلغ 876 ملغم، حيث اختلفت هذه المعاملة معنوياً عن معظم المعاملات الأخرى، في حين أعطى الوسط الغذائي والمجهز بـ 0.5 ملغم. لتر$^{-1}$ من الـ JA مع 10 غم. لتر$^{-1}$ من الـ NaCl مع 30 ملغم. لتر$^{-1}$ من الـ Phe، ادنى معدل وزن طري للكالس المستحث من الأوراق الحقيقية بلغ 15 ملغم بعد ستة أسابيع من الزراعة.

جدول 1 / a. تأثير تراكيز الـ JA ملغم. لتر$^{-1}$ و NaCl غم. لتر$^{-1}$ وتداخلاتهما في معدل الوزن الطري للكالس (ملغم) المستحث من الأوراق الحقيقية لنبات السكران الأبيض.

Table 1/a. Effect concentration different of Jasmonic acid mg.l^{-1} and chloride AL sodium g.l^{-1} And their interventions in Average fresh weight of callus Induction of the real leaves of the plant *Hyoscyamus albus* L.

تراكيز الـ JA ملغم. لتر$^{-1}$	تراكيز الـ NaCl غم. لتر$^{-1}$					المعدل
	0.0	2.5	5.0	7.5	10.0	
0.0	583	390	206	56	32	253
0.5	546	371	174	43	23	231
1.0	557	397	190	44	28	243
1.5	606	420	214	61	47	270
2.0	831	474	246	78	57	337
أ. ف. م. 0.05	7					33
المعدل	624	411	206	57	38	
أ. ف. م.0.05	33					

جدول 1 / b. تأثير تراكيز الـ JA ملغم. لتر$^{-1}$ و Phe ملغم. لتر$^{-1}$ وتداخلاتهما في معدل الوزن الطري للكالس (ملغم) المستحث من الأوراق الحقيقية لنبات السكران الأبيض.

Table 1/b. Effect concentration different of Jasmonic acid mg.l^{-1} and chloride AL Phenyl alanine mg.l^{-1} And their interventions in Average fresh weight of callus Induction of the real leaves of the plant *Hyoscyamus albus* L.

تراكيز الـ JA ملغم. لتر$^{-1}$	تراكيز الـ Phe ملغم. لتر$^{-1}$				المعدل
	0.0	10	20	30	
0.0	277	253	246	229	253
0.5	257	231	222	206	231
1.0	267	243	235	215	243
1.5	301	270	254	237	270
2.0	366	337	324	311	337
أ. ف. م. 0.05	65				33
المعدل	293	279	256	240	
أ. ف. م. 0.05	29				

جدول 1 / c. تأثير تراكيز الـ NaCl غم. لتر$^{-1}$ و Phe ملغم. لتر$^{-1}$ وتداخلاتهما في معدل الوزن الطري للكالس (ملغم) المستحث من الأوراق الحقيقية لنبات السكران الأبيض.

Table 1/c. Effect concentration different of chloride AL sodium g.l^{-1} and Phenyl alanine mg.l^{-1} and their interventions in Average fresh weight of callus Induction of the real leaves of the plant *Hyoscyamus albus* L.

تراكيز الـ NaCl غم. لتر$^{-1}$	تراكيز الـ Phe ملغم. لتر$^{-1}$				المعدل
	0.0	10	20	30	
0.0	675	642	600	581	624
2.5	447	431	393	371	411
5.0	236	216	201	170	206
7.5	65	63	53	45	57
10.0	45	41	35	30	38
أ. ف. م. 0.05	65				33
المعدل	293	279	256	240	
أ. ف. م. 0.05	29				

جدول 1 / d. تأثير تراكيز الـ JA ملغم. لتر$^{-1}$ و NaCl غم. لتر$^{-1}$ و Phe ملغم. لتر$^{-1}$ وتداخلاتها في معدل الوزن الطري للكالس (ملغم) المستحث من الأوراق الحقيقية لنبات السكران الأبيض.

Table 1/d. Effect concentration different of Jasmonic acid mg.l^{-1} and chloride AL sodium g.l^{-1} and phenyl alanine mg.l^{-1} and their interventions in Average fresh weight of callus Induction of the real leaves of the plant *Hyoscyamus albus* L.

تراكيز الـ JA ملغم. لتر$^{-1}$	تراكيز الـ NaCl غم. لتر$^{-1}$	تراكيز الـ Phe ملغم. لتر$^{-1}$			
		0.0	10	20	30
0.0	0.0	631	600	557	542
	2.5	413	400	387	360
	5.0	237	217	201	170
	7.5	63	62	58	44
	10.0	40	34	28	27
0.5	0.0	585	550	536	512
	2.5	414	397	347	327
	5.0	202	181	169	142
	7.5	50	48	39	35
	10.0	32	24	21	15
1.0	0.0	590	572	550	517
	2.5	445	426	367	351
	5.0	212	202	187	158
	7.5	55	52	41	29
	10.0	32	31	30	21
1.5	0.0	690	640	559	535
	2.5	458	449	398	376
	5.0	239	227	210	180
	7.5	65	64	59	56
	10.0	52	51	44	40
2.0	0.0	876	850	799	798
	2.5	507	482	463	442
	5.0	290	253	238	201
	7.5	90	90	70	63
	10.0	68	64	49	48
أ. ف. م.0.05	147				

نستنتج مما سبق في الجداول (1/ d-c-b-a) أن الوزن الطري للكالس انخفض بزيادة تراكيز كل من كلوريد الصوديوم والحامض الأميني الفينل الأنين، وقد يعود السبب في ذلك إلى أن امتصاص الأملاح من قبل النسيج النباتي و تراكمها داخل الأنسجة بكميات تزيد عن حاجة النبات تؤثر سلباً على العمليات الحيوية وهو ما يعرف بالتأثير السمي Toxic effect ، حيث أنها تؤدي إلى حدوث تغيرات في النشاطات الأنزيمية المؤدية إلى استمرار التفاعلات الكيميائية التي تؤثر على النمو، وكذلك تعمل الملوحة الزائدة على تثبيط عمل أنزيمات البناء ومنها أنزيمات تصنيع أو بناء البروتينات والكاربوهيدرات وأنزيمات تحلل دورة السكر (15). بينما قد يعود سبب الزيادة في الوزن الطري عند التراكيز المنخفضة للفنيل الأنين بان إضافة البادئات من الأحماض الأمينية إلى الأوساط الزراعية تعمل على زيادة إنتاج الكالس لأنها تزيد العمليات الأيضية للنتروجين العضوي وهو اكثر امتصاصاً وتمثيلاً من النتروجين اللاعضوي المضاف إلى الوسط الزراعي (17).

تأثير تراكيز مختلفة من JA و NaCl و Pheفي كمية قلويدات الأتروبان (التروبين) بعد ستة أسابيع من الزراعة.

توضح نتائج الجدول (2) إلى أن كمية قلويد الـ (Tropine) قد ازدادت عند إضافة 2 ملغم. لتر$^{-1}$ من JA إلى وسط MS والخالي من أي مستوى من مستويات NaCl وPhe ، لتبلغ 137.40 مايكروغرام. غرام وزن جاف$^{-1}$ ، مقارنة بالوسط الغذائي المجهز بـ 1.5 ملغم. لتر$^{-1}$ من حامض الجاسمونك، والذي انخفض فيه كمية قلويد الـ Tropine ليبلغ إدناه بـ 2.25 مايكروغرام. غرام وزن جاف$^{-1}$. ويلاحظ أن هنالك زيادة في كمية قلويد التروبين بزيادة تراكيز كلوريد الصوديوم في وسط MS، حيث وصلت كمية قلويد الـ Tropine إلى 86.06 مايكروغرام. غرام وزن جاف$^{-1}$عند التركيز 10 غرام لتر$^{-1}$ من كلوريد الصوديوم، مقارنة بالتركيز 2.5 غم. لتر$^{-1}$، والذي أعطى كمية قلويد بلغت 27.21 مايكروغرام. غرام وزن جاف$^{-1}$. أما بخصوص تأثير إضافة تراكيز الحامض الأميني Phe في كمية قلويد الـ Tropine والمبينة في الجدول نفسه، نجد أن كمية هذا القلويد قد ازدادت بزيادة تراكيز الحامض الأميني الفينل الأنين والمضاف إلى وسط MS، فقد وصلت كمية قلويد الـ Tropine إلى 113.45 و119.71 مايكروغرام. غرام وزن جاف$^{-1}$ عند التركيزين 20 و 30 ملغم. لتر$^{-1}$ من الـ Phe ، مقارنة بالتركيز 10 ملغم. لتر$^{-1}$ والذي انخفض فيه كمية هذا القلويد لتبلغ 37.88 مايكروغرام. غرام وزن جاف$^{-1}$. في حين أعطى التداخل الثلاثي أعلى كمية لقلويد التروبين يمكن الحصول عليها بلغ 553.23 مايكروغرام. غرام وزن جاف$^{-1}$ في الوسط الغذائي المتضمن إضافة 2 ملغم. لتر$^{-1}$ من حامض الجاسمونك مع 5 غم. لتر$^{-1}$ من كلوريد الصوديوم و 30 ملغم. لتر$^{-1}$ من الفينل الأنين شكل (1). وتشير نتائج الجدول نفسه، إلى أن الوسط الغذائي والمجهز بـ 0.5 ملغم. لتر$^{-1}$ من حامض الجاسمونك مع 10 غم. لتر$^{-1}$ من كلوريد الصوديوم و20 ملغم. لتر$^{-1}$ من الفينل الأنين في أعطاء أقل كمية لقلويد الـ Tropine بلغت 10.59 مايكروغرام. غرام وزن جاف$^{-1}$ شكل (2).

تأثير تراكيز مختلفة من JA و NaCl وPhe في كمية قلويدات الأتروبان (الأتروبين) بعد ستة أسابيع من الزراعة.

تظهر نتائج الجدول (3) إلى أن اعلى كمية لقلويد الـ Atropine قد بلغت 128.85 في الاوساط الغذائية المعاملة بـ 1.5 ملغم. لتر$^{-1}$ من الـ JA والخالية من أي تركيز من تراكيز الـ NaCl و Phe، فيما انخفضت كمية هذا القلويد ليبلغ إدناه بـ 24.54 مايكروغرام. غرام وزن جاف$^{-1}$ في الوسط الغذائي المجهز بـ 0.5 ملغم. لتر$^{-1}$ من الـ JA، وأن أعلى كمية لقلويد الـ Atropine قد لوحظت في الكالس النامي في أوساط ملحية مقارنة مع الكالس النامي في وسط خالي من الـ NaCl، فقد تفوق الكالس النامي في وسط MS المجهز بـ 5 غم. لتر$^{-1}$ من الـ NaCl، في أعطاء أعلى كمية قلويد بلغت 121.46 مايكروغرام. غرام وزن جاف$^{-1}$، مقارنة بمعاملة 7.5 غم. لتر$^{-1}$ من الـ NaCl، التي أعطت أقل محتوى لهذا القلويد بلغ 10.66 مايكروغرام. غرام وزن جاف$^{-1}$. أما فيما يخص تأثير الحامض الأميني Phe في كمية قلويد الـAtropine فيلاحظ من الجدول (3) حدوث زيادة في كمية قلويد الـ Atropine في جميع معاملات Phe بالمقارنة مع معاملة السيطرة فيما عدا معاملة 10 ملغم. لتر$^{-1}$ والذي انخفضت فيها كمية هذه القلويد بالمقارنة مع جميع المعاملات ليبلغ 12.93 مايكروغرام. غرام وزن جاف$^{-1}$ ، بينما أعطت المعاملة 30 ملغم. لتر$^{-1}$ من الـ Phe أعلى قيمة بلغت 99.59 مايكروغرام. غرام وزن جاف$^{-1}$. أما بالنسبة لنتائج التداخل الثلاثي الحاصل مابين عوامل التجربة، فيلاحظ تفوق الوسط الغذائي المجهز بـ 2 ملغم. لتر$^{-1}$ من الـ JA مع 10 غم. لتر$^{-1}$ من الـ NaCl مع 10 ملغم. لتر$^{-1}$ من الـ Phe ظاهرياً على

جميع التداخلات الثلاثية الأخرى في كمية قلويد الأتروبين ليبلغ 922.73 مايكروغرام. غرام وزن جاف$^{-1}$ شكل (3). فيما بلغت كمية هذا القلويد 57.09مايكروغرام. غرام وزن جاف$^{-1}$ عند الوسط الغذائي المجهز بـ 0.5 ملغم. لتر$^{-1}$ من الـ JA مع 2.5 غم. لتر$^{-1}$ من الـ NaCl و 10 ملغم. لتر$^{-1}$ من الـ Phe وهي أقل كمية لقلويد الـ Atropine يمكن أن تتخلق نتيجة التداخل الثلاثي بين تراكيز الـ JA و NaCl و Phe، كما يبين شكل (4).

جدول (2) تأثير تراكيز مختلفة من حامض الجاسمونك وكلوريد الصوديوم والفينل الأنين في كمية قلويد التروبين بعد ستة أسابيع من الزراعة.

Table (2) effect concentration different of Jasmonic acid, chloride AL sodium and phenyl alanine in amount Tropine alkaloid after six week.

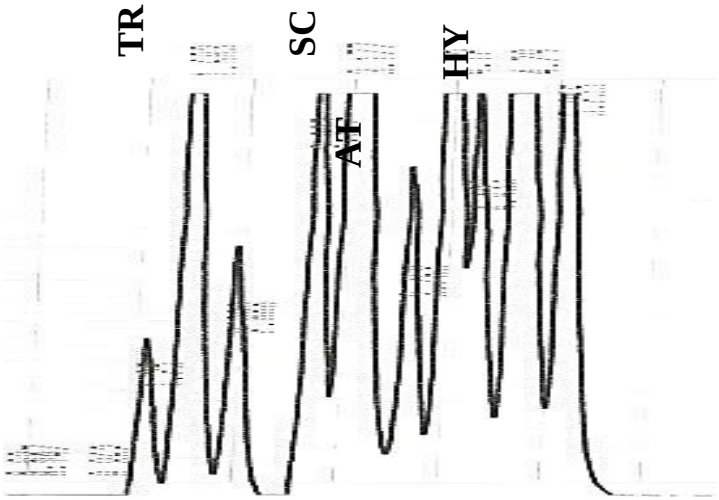
تراكيز الـ Phe ملغم. لتر$^{-1}$				تراكيز الـ NaCl غم. لتر$^{-1}$	تراكيز الـ JA ملغم. لتر$^{-1}$
30	20	10	0.0		
119.71	113.45	37.88	24.24	0.0	0.0
234.42	164.66	74.31	27.21	2.5	
112.93	77.64	104.75	28.58	5	
21.24	117.65	56.21	63.96	7.5	
65.92	67.37	54.97	86.06	10	
53.83	34.04	28.02	55.79	0.0	0.5
32.45	40.49	28.07	1.79	2.5	
20.38	53.01	71.93	12.99	5	
58.16	70.68	42.93	6.10	7.5	
50.95	10.59	56.28	6.15	10	
26.13	17.58	32.89	56.61	0.0	1.0
76.19	81.46	17.62	22.80	2.5	
57.37	114.69	84.07	32.63	5	
29.13	84.74	42.31	93.16	7.5	
116.57	125.63	103.31	73.41	10	
14.93	58.21	3.64	2.25	0.0	1.5
126.11	87.00	126.69	69.85	2.5	
54.79	110.41	182.11	71.22	5	
82.92	94.54	62.10	68.97	7.5	
125.59	128.65	88.87	117.08	10	
227.93	72.22	232.09	137.40	0.0	2.0
240.16	87.52	245.93	52.99	2.5	
553.23	179.24	241.27	77.44	5	
506.19	213.16	107.61	133.37	7.5	
545.24	202.27	479.36	208.17	10	

جدول (3) تأثير تراكيز مختلفة من حامض الجاسمونك وكلوريد الصوديوم والفينل الأنين في كمية قلويد الأتروبين بعد ستة أسابيع من الزراعة.

Table (3) effect concentration different of Jasmonic acid, chloride AL sodium and phenyl alanine in amount Atropine alkaloid after six week.

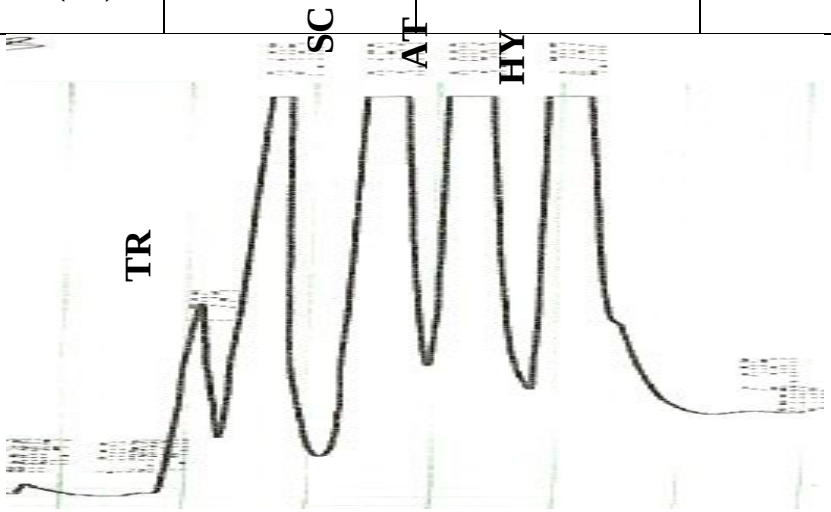
تراكيز الـ JA ملغم. لتر$^{-1}$	تراكيز الـ Nacl غم. لتر$^{-1}$	تراكيز الـ Phe ملغم. لتر$^{-1}$			
		0.0	10	20	30
0.0	0.0	56.12	12.93	87.91	99.59
	2.5	78.97	60.37	150.02	150.47
	5	121.46	58.98	171.17	218.31
	7.5	10.66	40.54	129.78	114.16
	10	28.54	85.77	69.72	280.23
0.5	0.0	24.54	32.33	39.38	35.45
	2.5	38.93	57.09	110.24	70.75
	5	52.29	63.55	146.34	115.12
	7.5	61.52	103.78	89.50	272.12
	10	40.36	139.48	126.01	207.40
1.0	0.0	44.97	128.33	60.32	274.79
	2.5	145.39	139.09	116.07	63.02
	5	128.80	328.47	373.20	348.59
	7.5	7.55	75.36	122.01	64.70
	10	79.47	205.10	157.67	191.22
1.5	0.0	128.85	0.00	82.04	96.57
	2.5	24.45	439.10	245.61	271.44
	5	74.96	549.60	515.26	295.00
	7.5	184.86	582.85	306.74	302.26
	10	394.65	635.75	331.20	566.78
2.0	0.0	115.85	355.10	151.11	268.19
	2.5	259.17	331.20	198.63	606.49
	5	450.87	603.74	332.29	224.33
	7.5	637.90	696.17	108.64	697.93
	10	810.31	922.73	710.95	831.55

نستنتج من ما ورد في الجدولين السابقين أن كمية قلويدات الأتروبان قد اختلفت بأختلاف تراكيز الـ JA أو NaCl أو Phe المضافة إلى الوسط الغذائي كلاً على حدة أو متداخلة مع بعضها البعض، وقد يعزى سبب زيادة إنتاج قلويدات الاتروبان عند التراكيز المناسبة لـ JA، إلى أن حامض الجاسمونك يعمل على تفعيل عملية البناء الحيوي لمركبات الأيض الثانوي، لذلك فان استعماله كمحفز يعد مفضلاً لزيادة إنتاج المركبات الصيدلانية في وقت قصير وبكلفة أقل (13)، ويشارك حامض الجاسمونك في مسار نقل الإشارة Signal Transduction Pathway حيث يحفز الأنزيمات اللازمة للتحولات البايوكيميائية الخاصة ببناء مركبات الأيض الثانوي (8). وقد يعود سبب زيادة كمية المركبات القلويدية بوجود الـ NaCl إلى دور الأملاح في زيادة محتوى الخلايا من بعض المركبات البادئة التي تلعب دور مهم في عملية التخليق الحيوي والتي يستخدمها النبات كوسيلة مواجهة للأيونات الملحية الزائدة مثل زيادة كمية الأحماض الأمينية والأحماض العضوية التي تستخدم كخزين للنتروجين الذي يساهم في زيادة التخليق الحيوي للقلويدات تحت ظروف الشد الملحي (12و16). وقد يرجع سبب زيادة إنتاج قلويدات التروبان عند إضافة الحامض الأميني الـ Phe إلى الوسط الغذائي بتراكيز مناسبة إلى كونه بادئها البنائي (7)(5). فقد أشار (1) بانه يمكن زيادة محتوى كالس نبات عين البزون من قلويد الفنكرستين بزيادة تراكيز الـ NaCl في الوسط الغذائي إلى 50 و75 ملي مول مقارنة بمعاملة المقارنة والتركيز 25 ملي مول، بينما لاحظ أن التركيز المثالي لزيادة كمية قلويد الفنبلاستين هو 50 ملي مول مقارنة بالتراكيز الأخرى المستخدمة وبضمنها معاملة المقارنة التي انخفض فيها تركيز هذين المركبين.



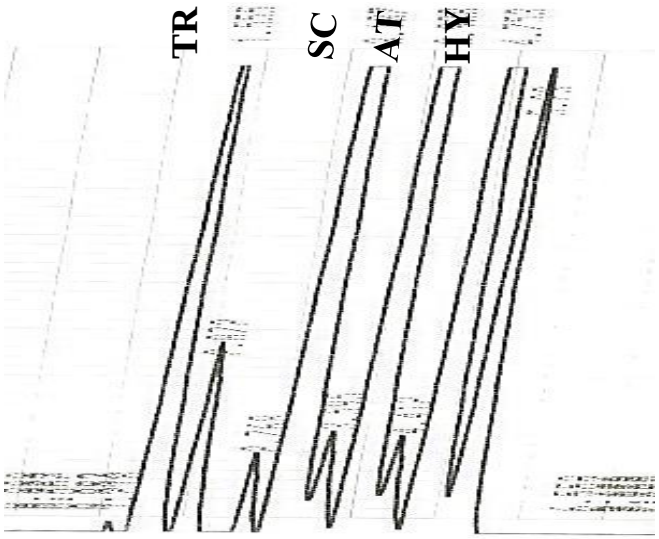
شكل (1) تأثير JA بتركيز 2 ملغم. لتر$^{-1}$+ NaCl بتركيز 5 غم. لتر$^{-1}$+ Phe بتركيز 30 ملغم. لتر$^{-1}$ في إنتاج المركبات الثانوية من نسيج الكالس.

Compound	Time	Area	Conc µg g^{-1}
Tropine (TR)	1.603	180677	8.7528
Scopolamine (SC)	3.177	563423	27.2946
Atropine (AT)	3.768	90809	4.3992
Hyoscyamine (HY)	4.79	384680	18.6356



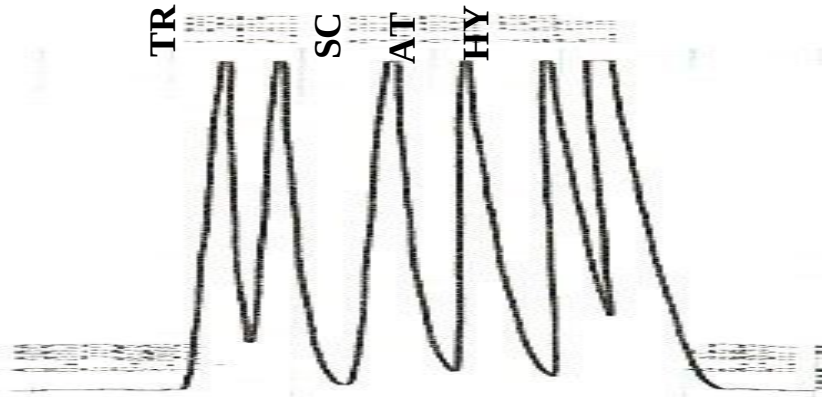
شكل (2) تأثير JA بتركيز 0.5 ملغم. لتر$^{-1}$+ NaCl بتركيز 10 غم. لتر$^{-1}$+ Phe بتركيز 20 ملغم. لتر$^{-1}$ في إنتاج المركبات الثانوية من نسيج الكالس.

Compound	Time	Area	Conc µg g^{-1}
Tropine (TR)	1.725	58942	2.0667
Scopolamine (SC)	3.153	1219816	42.7701
Atropine (AT)	3.983	553812	19.4182
Hyoscyamine (HY)	4.787	467211	16.3817



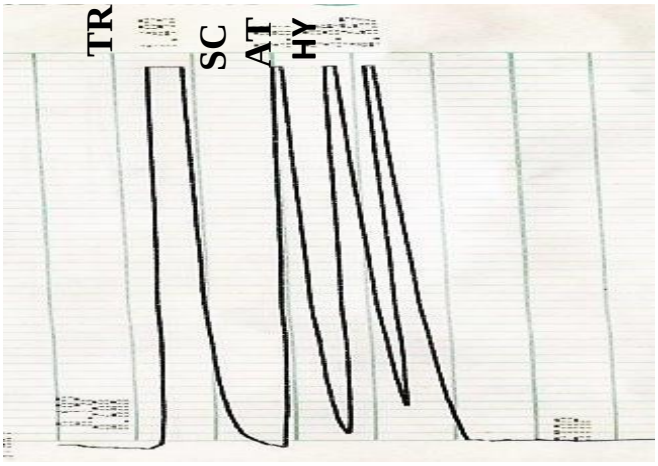
شكل (3) تأثير JA بتركيز 2 ملغم. لتر$^{-1}$+ NaCl بتركيز 10 غم. لتر$^{-1}$ + Phe بتركيز 10 ملغم. لتر$^{-1}$ في إنتاج المركبات الثانوية من نسيج الكالس.

Compound	Time	Area	Conc µg g^{-1}
Tropine (TR)	1.555	298197	10.3704
Scopolamine (SC)	3.107	750517	26.1009
Atropine (AT)	3.938	711458	24.7425
Hyoscyamine (HY)	4.753	634901	22.08



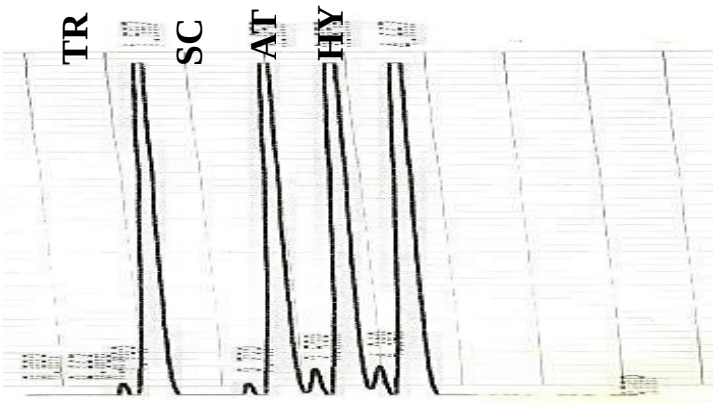
شكل (4) تأثير JA بتركيز 0.5 ملغم. لتر$^{-1}$+ NaCl بتركيز 2.5 غم. لتر$^{-1}$+ Phe بتركيز 10 ملغم. لتر$^{-1}$ في إنتاج المركبات الثانوية من نسيج الكالس.

Compound	Time	Area	Conc µg g^{-1}
Tropine (TR)	1.522	187393	9.9152
Scopolamine (SC)	3.013	637774	33.7453
Atropine (AT)	3.837	301100	15.9315
Hyoscyamine (HY)	4.658	256773	13.5862



شكل (a) منحنى المحلول القياسي Standard Peak للأشكال 2، 4.

Compound	Time	Area	Conc µg g^{-1}
Tropine (TR)	1.493	1668914	32.4244
Scopolamine (SC)	3.01	390795	7.5925
Atropine (AT)	3.84	1318409	25.6146
Hyoscyamine (HY)	4.657	1768979	34.3685



شكل (b) منحنى المحلول القياسي Standard Peak للأشكال 1، 3.

Compound	Time	Area	Conc µg g^{-1}
Tropine (TR)	1.507	326584	21.222
Scopolamine (SC)	3.052	339943	22.0901
Atropine (AT)	3.858	404793	26.3041
Hyoscyamine (HY)	4.667	405194	26.3302

المصادر

1- الحجيمي, إحسان جالي اذبيب. (2010). استعمال تقنية زراعة الأنسجة في إنتاج الفنكرستين والفنبلاستين في كالس نبات عين البزون *Catharanthus roseus* (L.) G. Don المتحمل للإجهاد الملحي, رسالة ماجستير, قسم البستنة وهندسة الحدائق، كلية الزراعة، جامعه الكوفة.

2- الساعدي, نورا جبر جاسم. (2011). إنتاج بعض قلويدات التروبان من كالس نبات البلادونا . L *Atropa belladonna* خارج الجسم الحي *In vitro* ، رسالة ماجستير، قسم البستنة, كلية الزراعة, جامعة بغداد. العراق.

3- الساهوكي، مدحت ووهيب، كريمة أحمد. (1990). تطبيقات في تصميم وتحليل التجارب. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. العراق.

4-Aljibouri, A. M. J.; K. W. Al-samarraei, A. S. Abd, D. M. Mageed and A. A. Ali. (2012). Alkaloids Production from Callus of *Hyoscyamus niger* L. in Vitro, Journal of Life Sciences, 6: 874-882.

5-Aziz, A.; M. Marziah; M. Radzail and M. S. Halimi. (2002). The Influence of Precursors on Hyoscyamine and Scopolamine Production by Transformed Root Culture of *Datura metel* L.. Tropical Medicinal Plants, 3 (1) : 105- 111.

6-Evans, W. C.. (1996). Trease and Evans Pharmacognosy 15th ed. W. B. Saunders Company Ltd. London. UK.

7-Khanna, R.; A. K. Mathur and N. K. Mehrotra. (2005). Selec-tion of 3-fluorotyrosine tole-rant callus line in two cultivars of opium poppy. Vol 88, No. 1.

8-Mizukami, H.; Y. Tabira and B. E. Ellis. (1993). Methyl jasm-onate induced rosmarinic acid biosynthesis in *Lithospermum enthrorhizon* suspention cult-ures.Plant. Cell. Rep., 12: 706-709.

9-Nabil, J.; G. Celedonio; G. R. Angel and Rafael Z.Rafael. (2009). Cloning characterization and analysis of expression prophils of acDNA encoding a hyoscyamine 6β-hydroxyllase (H6H) from Atropa baeticaWillk. Plant physiology and Biochemistry.V.47:20-25.

10-Ramawat, K. G.. (2008). Plant Biotechnology. Schand Com-pany LTD,. Ram Nagar, New Delhi. India. Pp: 24-40.

11-Richard, J. P.. (1998). Natural Products Isolation. The Benl-amin Cummings Bublishing company, Inc. Menlopank, USA.: 585-614.

12-Sato, F.; H. Takashi; H. Akira; T. Ken-ichi; C. Kum-Boo; M. Takashi; F. Hidek and Y. Yasyuki. (1999). Metabolic engeneering of plant alkaloid biosynthesis . Natl.Acad.Sci.; 10 : 367-372.

13-Sharma, M.; A. Sharma; A. Kumar and S. K. Basu. (2011). Enhasment of secondary metabolites in cultured plant cells through stress stimulus. Am. J. Plant Physiol., 6 (2): 50-71.

14-Straus, A.. (1989). Hyoscyamus spp: *In Vitro* Culture and production of tropane alkaloids. In: Bajaj YPS (ed) Biotechnology in Agriculture and Forestry, 7: 286-314. Medicinal and Aromatic Plants. Springer, Berlin Heid-ellberg New York.

15-Tuteja, N.. (2005). Unwinding after high salinity stress. II. Development of salinity to lerant plant without affecting yield. Plant J. (India), 24: 219-229.

16-Zhou, M. L.; J. R. Shao and Y. X. Tang. (2009). Production and metabolic engineering of Terpenoid Indole alkaloids in cell cultures of medicinal plant *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (Madagascar

periwinkle). Biotechnol. Appl . Biochem., 52(4): 313-23.

17-Zouine, J. and E. L. Hadrami. (2006). *Date Palm* embryo genic suspension culture: Effect of 2,4-D, glutamine and BA supplements. 3_{rd} Inter. Date Palm Conf., Abu-Dhabi. UAE.