استحثاث الكالس من الاوراق الحقيقية لنبات السكران الابيض(*Hyoscyamus albus* L.) والتقدير الكمي والنوعي لقلويدات الاتروبان

زياد شهاب احمد — كلية الزراعة والغابات/ جامعة الموصل
طلال محمود احمد — كلية الزراعة والغابات/ جامعة الموصل
محمد شهاب حمد — كلية الزراعة / جامعة بغداد

ziaddema@gmail.com

الملخص

اجريت التجربة في مختبر زراعة الانسجة النباتية التابع لقسم البستنة / كلية الزراعة / جامعة بغداد خلال سنة 2016، لغرض استحثاث الكالس وتحفيزه على أنتاج قلويدات الاتروبان (الهيوسيامين، السكوبولامين) من نبات السكران الابيض خارج الجسم الحي، باستخدام تراكيز مختلفة لكل من حامض الجاسمونك JA, كلوريد الصوديوم NaCl والفينل الأنين Phe. 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 جاف للكالس اذ بلغ (69) 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 7.5 غم. لتر$^{-1}$ من الـ NaCl مع 30 ملغم. لتر$^{-1}$ من الـ Phe في أعطاء أعلى كمية لقلويد الهيوسيامين اذ بلغت 1242.51 مايكروغرام. غرام وزن جاف$^{-1}$، ويلاحظ من خلال النتائج أرتفاع كمية قلويد السكوبولامين عند معاملة التداخل الثلاثي المتضمنة أضافة الـ JA بتركيز 1 ملغم. لتر$^{-1}$ مع 10غم. لتر$^{-1}$ من الـ NaCl مع 30 ملغم. لتر$^{-1}$ من الـ Phe لتبلغ 3498.00 مايكروغرام. غرام وزن جاف$^{-1}$.

الكلمات المفتاحية: السكران ، الاتروبان ،خارج الجسم الحي، حامض الجاسمونك.

Callus Initiation from Real Leaves of *Hyoscyamus albus* L. and Qualitative and Quantitative Estimation of Atropine Alkaloids

Mohammed Sh. Ahmed — Coll. of Agric. & Forestry — Univ. of Mosul
Talal M. Ahmed — Coll. of Agric. & Forestry — Univ. of Mosul
Ziyad Sh. Ahmed — Coll. of Agric. — Uni. of Baghdad

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 Induction and overproduce of some alkaloids represented by (Hyoscyamine and Scopolamine) from *Hyoscyamus albus* L. *In Vitro*.Using different concentrations for each of JA, NaCl, and Phe , Culture medium 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 dry Callus weight (69 mg). The quantitative and qualitative assessment of the Tropine alkaloids were estimated using HPLC device. The results of HPLC technology analysis showed the superiority of medium provided with JA concentration of 2 mg. L^{-1} with 7.5 g. L^{-1} of the NaCl with 30 mg L^{-1} of the Phe in giving the highest amount of the Hyoscyamine alkaloid reached to 1242.51 µg. g dry weight^{-1}. As for the Scopolamine alkaloid, its amount increased to 3498.00 µg. g dry weight^{-1} with triple interaction treatment including the addition of the JA concentration of 1 mg L^{-1} with 10 g L^{-1} of the NaCl with 30 mg L $^{-1}$ of the Phe.

البحث مستل من أطروحة دكتوراه للباحث الأول

المقدمة

ينتمي نبات السكران الأبيض إلى العائلة الباذنجانية التي تضم حوالى 96 جنساً و 3000 نوع والتي تنتشر في معظم مناطق العالم (17)، حيث تمتاز بعض نباتات هذه العائلة بقابليتها على أنتاج عدد من القلويدات المهمة والتي تدخل في الصناعات الدوائية (26). تعتبر التقانات الحيوية في الوقت الحاضر من أهم الوسائل المساعدة في تحسين أنتاج المحاصيل الزراعية المختلفة وإنتاج الغذاء والدواء, بالإضافة الى اختصار الوقت والكلفة وزيادة الانتاج النباتي (20 و 7). يعد الإجهاد الملحي أحد أنواع الإجهادات البيئية التي تتعرض لها النباتات أثناء فترة حياتها والتي تسبب تغيرات في نمو وأيض وفسلجة النباتات والتي يمكن أن تؤثر في أنتاج مركبات الأيض الثانوي في النباتات المعرضة لها (12)، فقد لاحظ (11) أن زراعة جذور نبات *Datura metel* على وسط B5 والمجهز بتراكيز 129.3 ملي مول من الـ NaCl قد أعطى أعلى كمية قلويد بالنسبة لقلويد الهيوسيامين والسكوبولامين بعد ستة أسابيع من الزراعة. كما يسبب إضافة NaCl إلى مزارع الكالس لنباتي *D. metel* و *D. stramonium* بتراكيز 125 ملي مول من NaCl في أعطاء أعلى كمية لقلويد السكوبولامين إذ بلغت 5.279و 1.187 ملغم. غم وزن جاف$^{-1}$، بينما بلغت كمية قلويد الأتروبين 2.788 و1.331 ملغم. غم وزن جاف$^{-1}$ بالنسبة لنباتي *D. metel* و*D. stramonium* على التوالي (10).

ومن جانب اخر يلاحظ ان إضافة البوادئ الى المزارع النسيجية يكون له دور مهم في عملية البناء الحيوي لمركبات الأيض الثانوي، فمن المعلومات المتداولة حول تحفيز وتسريع عملية البناء الحيوي للقلويدات عند تغذية الوسط المستخدم لأستحثاث الكالس ببادئ من الاحماض الامينية، تعزز من كون أن الحامض الاميني لا يعمل كبادئ فقط بل كمحفز ايضاً (24). فقد أوضح (14) أن محتوى القلويدات في مزارع كالس نبات *D. stramonium* قد ازداد بحوالي خمس مرات أكثر عند اضافة الحامضين الامينين Ornithine و Phenylalanine الى الوسط الغذائي مقارنة بالوسط الخالي منهما. كما يمكن تحفيز إنتاج rosmarinic acid من المزارع الخلوية لنبات *Salvia officinalis* عند إضافة 40 ملغم. لتر$^{-1}$من الـ Phe إلى الوسط مقارنة بالأوساط غير المعاملة (18).

تهدف هذه التجربة إلى: معرفة تأثير JA و NaCl و Phe في انتاج قلويدات الاتروبان (الهيوسيامين والسكوبولامين) من الكالس المستحث من الاوراق الحقيقية لنبات السكران الابيض.

المواد وطرائق العمل:

نفذت التجربة في مختبر زراعة الانسجة النباتية التابع لقسم البستنة / كلية الزراعة / جامعة بغداد للفترة من شباط 2016 الى أب 2016، لغرض استحثاث الكالس وتحفيزه على أنتاج قلويدات التروبان من نبات السكران الابيض خارج الجسم الحي.

تأثير تراكيز مختلفة من JA و NaCl و Phe وتداخلاتها في معدل الوزن الجاف 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 ومتداخلة مع بعضها البعض، مضافاً له 0.75 و 0.1 ملغم. لتر$^{-1}$ 2,4-D و BA على التوالي ولمدة أربعة أسابيع، ثم جفف الكالس على درجة حرارة 60مْ لحين ثبات الوزن (الصحاف، 1989) وسجلت نتائج الوزن الجاف للكالس، وتلى ذلك تقدير قلويدات الأتروبان نوعياً وكمياً.

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

أجريت عملية التقدير الكمي والنوعي لقلويدات الأتروبان، في شركة الحقول البيضاء للاستثمارات والدراسات البيئية والهندسية، وذلك بأخذ 100 ملغم 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 الى ان يصبح الـ

pH 2 أو اقل من ذلك بقليل. توضع العينة في قمع الفصل مع اضافة 20مل*2 من diethyl ether ، ثم يرج ويفتح بين الحين والاخر، ويوضع قمع الفصل على الحامل لحين تكون طبقتين تجمع الطبقة السفلى (التي تحتوي على قلويدات الأتروبان وdiethyl ether) وتهمل العليا، ويحرك المحلول الحاوي على قلويدات الأتروبان وdiethyl ether بإستخدام جهاز الخلاط الكهربائي المغناطيسي الحراري (بدون حرارة)، ثم يضاف كمية من الامونيا 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(25). يتم حقن كمية 20 مايكروليتر من المحاليل القياسية 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 القياسية، وحقنت العينات بالتتابع، لتحديد تركيز المركبات الفعالة في كل عينة، وحسب المعادلة المذكورة في أدناه، 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 الاحصائي Gen Stat، و قورنت المتوسطات وفق اختبار L.S.D وبمستوى احتمال 5٪ (5) كل معاملة ضمت 10 تكرارات.

النتائج والمناقشة

تأثير تراكيز الـ JA و NaCl و Phe وتداخلاتها في معدل الوزن الجاف 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 و0.1 ملغم. لتر$^{-1}$ من الـ BA.

توضح نتائج الجدول (1/ a) إن أضافة الـ JA بتركيز 2 ملغم. لتر$^{-1}$ الى الوسط الغذائي قد أعطى أعلى معدل وزن جاف للكالس اذ بلغ 28 ملغم. بينما أنخفض معدل الوزن الجاف للكالس ليبلغ 18 ملغم عند معاملة 1 ملغم. لتر$^{-1}$ من الـ JA. ويلاحظ من نتائج نفس الجدول، إن كافة تراكيز الـ NaCl سببت انخفاض معنوي في معدل الوزن الجاف للكالس مقارنة مع المعاملة الخالية من تراكيز الـ NaCl، إذ سجلت معاملة المقارنة أعلى معدل وزن جاف للكالس بلغ 52 ملغم. كما ان التداخل الثنائي بين تراكيز الـ JA و NaCl والتي تتضمن أضافة 2 ملغم. لتر$^{-1}$ من الـ JA مع 0.0 غم. لتر$^{-1}$ من الـ NaCl كان له تأثير كبير وبشكل معنوي في زيادة معدل الوزن الجاف للكالس عن جميع المعاملات الأخرى، إذ ازداد معدل الوزن الجاف للكالس في تلك المعاملة ليبلغ 63 ملغم،

وتشير نتائج الجدول (1/ b) الى وجود انخفاض معنوي متباين في معدل الوزن الجاف للكالس ينتج عند أضافة تراكيز الـ Phe الى الوسط، إذ سجلت معاملة المقارنة أعلى معدل للوزن الجاف للكالس بلغ 25 ملغم، والتي لم تختلف معنوياً عن جميع المعاملات الأخرى الاعن المعاملة المتضمنة أضافة 30 ملغم. لتر$^{-1}$ من الـ Phe الى الوسط الغذائي المستخدم لأستحثاث، والذي أنخفض فيها معدل الوزن الجاف الى 20 ملغم. كما أشارت نتائج التداخل الثنائي بين تراكيز الـ JA و Phe في الجدول (1/ b) الى تفوق الوسط الغذائي المجهز بـ 2 ملغم. لتر$^{-1}$ من الـ JA مع 0.0 ملغم. لتر$^{-1}$ من الـ Phe معنوياً في أعطاء أعلى معدل للوزن الجاف بلغ 31 ملغم. أما بالنسبة للتداخل الثنائي

الحاصل بين تراكيز الـ NaCl و Phe المبينة في الجدول (1 / c) فقد كان هذا التداخل ذو 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 الجاف للكالس المستحث من الأوراق الحقيقية إذ بلغ معدل الوزن 57 ملغم، بينما أنخفض الوزن الجاف للكالس بزيادة تراكيز كل من الـ NaCl و Phe وبشكل معنوي ليبلغ 3 ملغم، عند معاملتي التداخل الثنائي المتضمنة أضافة 10غم. لتر$^{-1}$ من الـ NaCl مع 20 أو 30 ملغم. لتر$^{-1}$ من الـ Phe. وتبين نتائج التداخل الثلاثي بين تراكيز الـ JA مع NaCl و Phe في الجدول (1 / d) الى وجود اختلافات معنوية في معدل الوزن الجاف للكالس المستحث من الأوراق الحقيقية لنبات السكران الأبيض بأختلاف تراكيز كل من الـ JA و NaCl و Phe، حيث 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 في أعطاء أعلى معدل للوزن الجاف للكالس بلغ 69ملغم، بينما نلاحظ انخفاض كبير وبشكل معنوي في معدل الوزن الجاف للكالس بزيادة تراكيز كل من الـ NaCl و Phe وتقليل تراكيز الـ JA المستخدمة في الدراسة، إذ سجل الوسط الغذائي المجهز بـ 0.5 أو 1 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 جاف للكالس بلغ 2 ملغم لكلا المعاملتين.

جدول 1 / a. تأثير تراكيز الـ JA ملغم. لتر$^{-1}$ و NaCl غم. لتر$^{-1}$ وتداخلاتهما في معدل الوزن الجاف 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 dry weight (mg) of callus Induction of the 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	53	35	18	5	3	23
0.5	46	31	14	4	2	20
1.0	43	29	13	4	3	18
1.5	54	37	19	6	5	24
2.0	63	43	21	8	6	28
أ. ف. م.0.05	6					3
المعدل	52	35	17	6	4	
أ. ف. م.0.05	3					

جدول 1 / b. تأثير تراكيز الـ JA ملغم. لتر$^{-1}$ و Phe ملغم. لتر$^{-1}$ وتداخلاتهما في معدل الوزن الجاف 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 dry weight (mg) 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	25	24	22	21	23
0.5	22	20	19	17	20
1.0	21	19	18	16	18
1.5	26	25	23	21	24
2.0	31	29	27	25	28
أ. ف. م. 0.05	6				3
المعدل	25	24	22	20	
أ. ف. م.0.05	3				

جدول 1 / c. تأثير تراكيز الـ NaCl غم. لتر$^{-1}$ و Phe ملغم. لتر$^{-1}$ وتداخلاتهما في معدل الوزن الجاف 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 dry weight (mg) of callus Induction of the 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	57	53	50	47	52
2.5	38	36	34	32	35
5.0	20	18	16	14	17
7.5	6	6	5	5	6
10.0	5	4	3	3	4
أ. ف. م. 0.05	6				3
المعدل	25	24	22	20	
أ. ف. م.0.05	3				

جدول 1 / d. تأثير تراكيز الـ JA ملغم. لتر$^{-1}$ و NaCl غم. لتر$^{-1}$ و Phe ملغم. لتر$^{-1}$وتداخلاتها في معدل الوزن الجاف 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 dry weight (mg) of callus Induction of the 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	58	55	50	49
	2.5	38	36	36	32
	5.0	20	19	17	14
	7.5	6	6	6	4
	10.0	4	4	3	3
0.5	0.0	50	47	44	41
	2.5	35	33	29	28
	5.0	17	15	14	12
	7.5	5	5	4	4
	10.0	3	2	2	2
1.0	0.0	47	45	41	40
	2.5	33	30	28	26
	5.0	16	14	12	11
	7.5	6	5	4	3
	10.0	3	3	3	2
1.5	0.0	60	56	51	49
	2.5	39	38	35	34
	5.0	22	20	18	15
	7.5	7	6	6	5
	10.0	5	5	4	4
2.0	0.0	69	65	62	57
	2.5	47	44	42	38
	5.0	26	22	21	18
	7.5	9	9	7	6
	10.0	7	6	5	5
أ. ف. م. 0.05	13				

من خلال ما تم استعراضه في الجداول السابقة نستنتج أن معدل الوزن الجاف للكالس ينخفض بزيادة تراكيز كل من كلوريد الصوديوم والحامض الأميني الفينل الأنين، وقد يعود السبب في ذلك الى التأثير السلبي للملوحة في معدل انقسام واستطالة الخلايا من خلال تأثير الملوحة في التفاعلات المؤدية إلى أنتاج المواد المشجعة للانقسام كالاوكسينات والسايتوكاينينات والجبريلينات وبالتالي ستؤدي إلى تحديد حجم الخلايا وعدد الخلايا في الحزم الوعائية الناقلة (15). أما سبب الانخفاض في معدل الوزن الجاف للكالس عند زيادة تراكيز الفينل الأنين في الوسط الغذائي، قد يرجع إلى إن أضافة هذه المركبات إلى الوسط الغذائي تؤدي إلى زيادة الضغط الأزموزي للوسط وبالتالي سوف يزداد الجهد المسلط على النسيج أو الخلايا المزروعة في ذلك الوسط مما يسبب نقص في معدل الماء الممتص من قبل الخلايا مما يعيق معدل انقسام الخلايا (1). وتتفق هذه النتائج مع (4) التي بينت بأن معدل الوزن الجاف لكالس نبات البلادونا المستحث من القمة النامية ينخفض بزيادة تراكيز الفينل الأنين ليبلغ إدناه عند التركيز 40 ملغم. لتر$^{-1}$ من الـ Phe بعد خمسة أسابيع من الزراعة. كذلك تتفق هذه النتائج مع ما أوضحه (2) بأن كافة تراكيز كلوريد الصوديوم تؤدي إلى حصول انخفاض معنوي في الوزن الجاف لكالس نبات عين البزون المستحث من الأوراق الحقيقية ليبلغ إدناه عند التركيز 4 غم. لتر$^{-1}$ بعد خمسة أسابيع من الزراعة.

تأثير تراكيز مختلفة من JA وNaCl وPhe في كمية قلويدات الأتروبان (هيوسيامين) بعد ستة أسابيع من الزراعة

توضح نتائج الجدول (2) إلى إن أضافة تراكيز الـ JA إلى وسط MS أدت إلى خفض كمية قلويد الـ Hyosyamine في بادئ الأمر مقارنة بمعاملة المقارنة في ماعدا التركيز 2 ملغم. لتر$^{-1}$ الذي أدى أضافته إلى الوسط الغذائي إلى زيادة كمية قلويد الهيوسيامين مقارنة بجميع التراكيز الأخرى ومعاملة المقارنة، إذ بلغت كمية هذا القلويد 163.27 مايكروغرام. غرام وزن جاف$^{-1}$، فيما أنخفض كمية قلويد الهيوسيامين لأدنى مستوياته بـ 6.04 مايكروغرام. غرام وزن جاف$^{-1}$ عند أضافة الـ JA إلى الوسط الغذائي بتركيز 1 ملغم. لتر$^{-1}$. ويلاحظ في نفس الجدول إن هنالك تأثير واضح لتراكيز الـ NaCl في كمية قلويد الهيوسيامين، إذ أن زيادة تركيز ملح NaCl في الوسط الغذائي أدى إلى زيادة كمية القلويد وذلك عند التركيزين 2.5 و5 غم. لتر$^{-1}$، إذ أعطى التركيز 5 غم. لتر$^{-1}$ أعلى كمية لقلويد الهيوسيامين مقدارها 125.54 مايكروغرام .غرام وزن جاف$^{-1}$، ثم حدث انخفاض في كمية قلويد الهيوسيامين عند التراكيزين 7.5 و10 غم. لتر$^{-1}$ اللذان اختلفا فيما بينهما ظاهرياً، ليبلغ ادنى مستوى له عند التركيز 10 غم. لتر$^{-1}$ بـ 44.49 مايكروغرام. غرام وزن جاف$^{-1}$. ويلاحظ من نتائج الجدول نفسه تفوق الوسط الغذائي المجهز بـ 30 ملغم. لتر$^{-1}$ من الـ Phe في أعطاء أعلى كمية لقلويد الهيوسيامين بلغت 303.10 مايكروغرام. غرام وزن جاف$^{-1}$متفوقاً بذلك على بقية التراكيز الأخرى بضمنها الوسط الغذائي الخالي من تراكيز الـ Phe، بينما قلت كمية قلويد الهيوسيامين لتبلغ 37.77 مايكروغرام. غرام وزن جاف$^{-1}$عند التركيز 20 ملغم. لتر$^{-1}$. وبالرجوع الى نتائج التداخل الثلاثي المبينة في الجدول (2) يلاحظ وجود اختلافات في كمية قلويد الهيوسيامين المقدرة بأختلاف تداخل تراكيز الـ JA و NaCl و Phe , اذ أعطى التداخل بين بـ 2 ملغم. لتر$^{-1}$ من الـ JA مع 7.5 غم. لتر$^{-1}$ من الـ NaCl مع 30 ملغم. لتر$^{-1}$ من الـ Phe أعلى كمية للقلويد بلغت 1242.51 مايكروغرام. غرام وزن جاف$^{-1}$ شكل (1)، في حين يلاحظ أن معاملة التداخل الثلاثي بين 0.5 ملغم. لتر$^{-1}$ من الـ JA مع 7.5 غم. لتر$^{-1}$ من الـ NaCl مع 20 ملغم. لتر$^{-1}$ من الـ Phe، قد أعطى أقل كمية لقلويد الهيوسيامين بلغت 8.22 مايكروغرام. غرام وزن جاف$^{-1}$ شكل (2).

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

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

تراكيز الـ Phe ملغم. لتر$^{-1}$					
30	**20**	**10**	**0.0**	**تراكيز الـ Nacl غم. لتر$^{-1}$**	تراكيز الـ JA ملغم. لتر$^{-1}$
303.10	**37.88**	**43.97**	**75.60**	**0.0**	0.0
141.23	**119.26**	**66.05**	**78.88**	**2.5**	
19.14	**174.45**	**19.90**	**125.54**	**5**	
112.16	**165.42**	**42.02**	**54.63**	**7.5**	
370.29	**85.03**	**63.67**	**44.49**	**10**	
31.00	**2.90**	**4.80**	**38.62**	**0.0**	0.5
75.14	**34.49**	**36.28**	**12.41**	**2.5**	
17.79	**99.63**	**25.32**	**18.22**	**5**	
122.78	**8.22**	**16.07**	**16.55**	**7.5**	
109.09	**79.23**	**60.07**	**62.24**	**10**	
3.81	**11.93**	**76.88**	**6.04**	**0.0**	1.0
13.80	**108.98**	**94.69**	**76.29**	**2.5**	
69.28	**58.86**	**32.99**	**50.66**	**5**	
42.81	**27.56**	**12.45**	**9.09**	**7.5**	
185.23	**189.20**	**98.54**	**60.17**	**10**	
68.49	**30.77**	**86.19**	**28.83**	**0.0**	1.5
135.79	**153.01**	**167.03**	**67.59**	**2.5**	
160.73	**133.63**	**182.47**	**82.67**	**5**	
75.01	**83.13**	**174.32**	**67.30**	**7.5**	
126.51	**84.98**	**332.24**	**233.75**	**10**	
554.02	**211.13**	**493.87**	**163.27**	**0.0**	2.0
785.24	**366.73**	**529.96**	**218.92**	**2.5**	
949.37	**626.35**	**748.20**	**448.98**	**5**	
1242.51	**346.18**	**994.14**	**628.76**	**7.5**	
157.75	**643.36**	**822.62**	**951.01**	**10**	

تأثير تراكيز مختلفة من JA وNaCl وPhe في كمية قلويدات الأتروبان (السكوبلامين) بعد ستة أسابيع من الزراعة.

أظهرت النتائج في الجدول (3) إن أعلى كمية لقلويد السكوبلامين لمستويات الـ JA بلغت 712.36 مايكروغرام. غرام وزن جاف$^{-1}$ في المعاملة التي جهزت بـ 1.5 ملغم. لتر$^{-1}$ من الـ JA وبفارق كبير عن أقل كمية والتي بلغت 116.26 مايكروغرام. غرام وزن جاف$^{-1}$ لمعاملة 0.5 ملغم. لتر$^{-1}$ من الـ JA . وفيما يخص تأثير تراكيز الـ NaCl فقد أوضحت النتائج أن تعريض الكالس إلى تركيز 7.5 غم. لتر$^{-1}$ من الـ NaCl أدى إلى زيادة كمية القلويد إلى 50.47 مايكروغرام. غرام وزن جاف$^{-1}$، متفوقاً عن معاملة 2.5 غم. لتر$^{-1}$ من الـ NaCl والتي أعطت كمية بلغت 20.56 مايكروغرام. غرام وزن جاف$^{-1}$. أما بخصوص تأثير تراكيز الـ Phe فيلاحظ وجود زيادة في كمية قلويد السكوبلامين بزيادة تراكيز الـ Phe حيث وصلت أعلى كمية لهذا القلويد الى 579.99 مايكروغرام. غرام وزن جاف$^{-1}$، عند أضافة 30 ملغم. لتر$^{-1}$ من الـ Phe متفوقة بذلك على معاملة 10 ملغم. لتر$^{-1}$ من الـ Phe والتي انخفضت فيه كمية قلويد السكوبلامين الى 20.15 مايكروغرام. غرام وزن جاف$^{-1}$. أما فيما يخص التداخل الثلاثي بين تراكيز الـ JA و NaCl و Phe المستخدمة فتشير النتائج الى تفوق التداخل الحاصل بين تركيز 1 ملغم. لتر$^{-1}$ من الـ JA مع 10 غم. لتر$^{-1}$ من الـ NaCl مع 30 ملغم. لتر$^{-1}$ من الـ Phe في أعطاء أعلى كمية لقلويد السكوبلامين بلغت 3498.00 مايكروغرام. غرام وزن جاف$^{-1}$ شكل (3)، بينما انخفضت هذه الكمية لتبلغ 117.71 مايكروغرام. غرام وزن جاف$^{-1}$ عند التداخل الثلاثي الحاصل بين 0.5 ملغم. لتر$^{-1}$ من الـ JA مع 2.5 غم. لتر$^{-1}$ من الـ NaCl مع 20 ملغم. لتر$^{-1}$ من الـ Phe شكل (4).

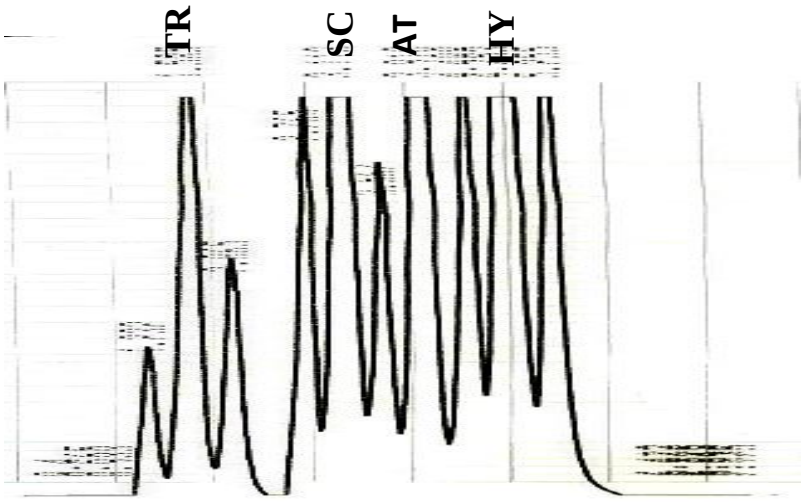
نستنتج من ما ورد في الجدولين السابقين أن كمية قلويدات الأتروبان قد اختلفت بأختلاف تراكيز الـ JA أو NaCl أو Phe المضافة إلى الوسط الغذائي كلاً على حدة أو متداخلة مع بعضها البعض، وقد يعزى سبب زيادة أنتاج قلويدات الاتروبان عند التراكيز المناسبة لـ JA، كون أن حامض الجاسمونك يساهم في مسار نقل الإشارة Signal Transduction Phethway حيث يحفز الأنزيمات اللازمة للتحولات البايوكيميائية الخاصة ببناء مركبات الأيض الثانوي (23). وقد يعود سبب زيادة أنتاج النبات للقلويدات عند استخدام الـ NaCl كأحد أنواع المحفزات اللاحيوية، إلى دور النبات في تعديل أزموزية الخلية بزيادة سالبيتة جهد ماء الخلية النباتية المعرضة للإجهاد الأزموزي (16)، وقد يرجع سبب زيادة أنتاج قلويدات التروبان عند إضافة الحامض الأميني الـ Phe إلى الوسط الغذائي بتراكيز مناسبة إلى كونه بادئها البنائي (19) (13).

فقد أوضح (9) بأن كمية قلويدات الكولين والترايكونيلين المستخلص من كالس نبات الحلبة المستحث من السويقة الجنينية السفلى بعد ثلاثة أسابيع من الزراعة، قد ازداد بزيادة تراكيز الـ JA المضافة إلى وسط أدامة الكالس وصولاً إلى التركيز 4 ملغم. لتر$^{-1}$. أما بخصوص تأثير تراكيز الـ Phe في أنتاج مركبات الأيض الثانوي، فقد بينت (3) بأن هنالك تباين في كمية القلويدات الاندولية بأختلاف تراكيز الـ Phe المستخدمة، فقد لاحظت حصول زيادة معنوية في كمية قلويد Vincristine وVinblastine عند أضافة 10 ملغم. لتر$^{-1}$ من الـ Phe في حين انخفضت كمية هذين المركبين عند أضافة إضافة 30 و45 ملغم. لتر$^{-1}$ من الـ Phe إلى وسط الإدامة بعد أربعة أسابيع من الزراعة.

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

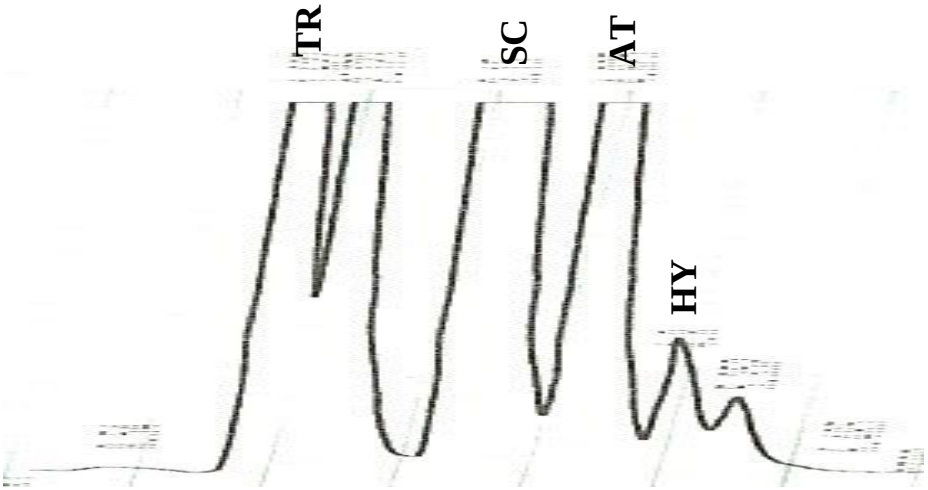
Table (3) effect concentration different of Jasmonic acid, chloride AL sodium and phenyl alanine in amount Scoplamine alkaloid after six week.

تراكيز الـ Phe ملغم. لتر$^{-1}$					
3	**20**	**10**	**0.0**	**تراكيز الـ NaCl غم. لتر$^{-1}$**	تراكيز الـ JA ملغم. لتر$^{-1}$
579.99	**295.19**	**20.15**	**19.69**	**0.0**	0.0
676.47	**357.81**	**33.42**	**20.56**	**2.5**	
786.60	**410.04**	**12.85**	**38.65**	**5**	
703.28	**452.80**	**252.84**	**50.47**	**7.5**	
142.68	**534.73**	**255.07**	**23.27**	**10**	
220.62	**313.60**	**471.05**	**116.26**	**0.0**	0.5
670.49	**117.71**	**407.99**	**280.98**	**2.5**	
974.95	**2019.79**	**421.27**	**412.69**	**5**	
1143.30	**1110.89**	**1269.82**	**678.49**	**7.5**	
492.85	**936.41**	**950.20**	**391.89**	**10**	
157.17	**703.77**	**487.01**	**515.05**	**0.0**	1.0
946.80	**1369.89**	**615.88**	**205.96**	**2.5**	
777.10	**1166.43**	**998.45**	**1257.23**	**5**	
3018.60	**697.77**	**1111.21**	**843.34**	**7.5**	
3498.00	**2558.66**	**934.25**	**1531.04**	**10**	
582.50	**667.08**	**1026.36**	**712.36**	**0.0**	1.5
784.66	**1699.76**	**2028.96**	**1892.61**	**2.5**	
2282.64	**2297.67**	**1725.61**	**1550.51**	**5**	
1859.02	**1552.82**	**2539.49**	**1299.39**	**7.5**	
3136.40	**1349.19**	**2078.95**	**1196.44**	**10**	
504.41	**358.02**	**996.20**	**488.03**	**0.0**	2.0
746.03	**716.90**	**683.13**	**801.06**	**2.5**	
1657.40	**900.11**	**826.47**	**625.48**	**5**	
1074.29	**1121.25**	**1249.25**	**1474.78**	**7.5**	
1904.68	**747.35**	**1159.08**	**1579.26**	**10**	



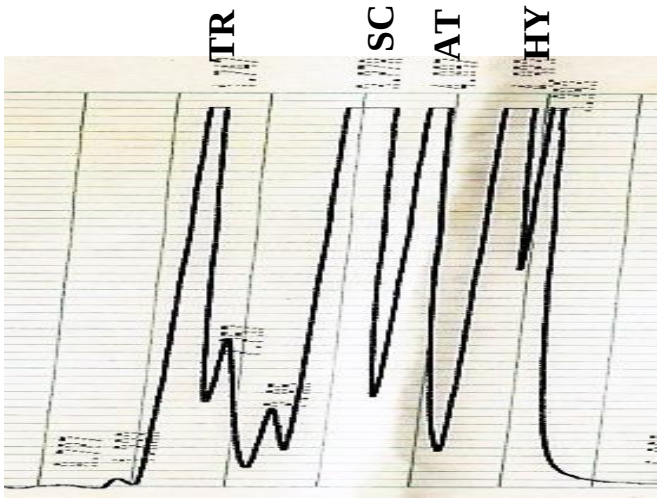
شكل (1) تأثير JA بتركيز 2 ملغم. لتر$^{-1}$+ NaCl بتركيز 7.5غم. لتر$^{-1}$ + Phe بتركيز 30 ملغم. لتر$^{-1}$ في إنتاج المركبات الثانوية من نسيج الكالس.

Compound	Time	Area	Conc µg. g^{-1}
Tropine (TR)	1.585	165314	8.6217
Scopolamine(SC)	3.113	365200	19.0463
Atropine(AT)	3.918	282520	14.7343
Hyoscyamine(HY)	4.753	503460	26.257



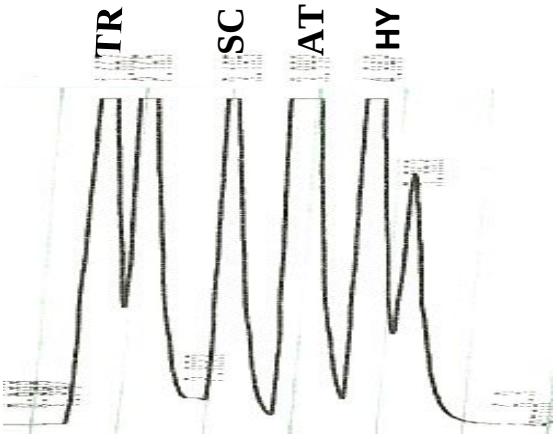
شكل (2) تأثير JA بتركيز 0.5 ملغم. لتر$^{-1}$+ NaCl بتركيز 7.5 غم. لتر$^{-1}$+ Phe بتركيز 20 ملغم. لتر$^{-1}$ في إنتاج المركبات الثانوية من نسيج الكالس.

Compound	Time	Area	Conc µg. g^{-1}
Tropine	1.627	471845	14.8885
Scopolamine	3.15	1736529	54.794
Atropine	4.025	472028	14.8942
Hyoscyamine	4.8	58179	1.8358



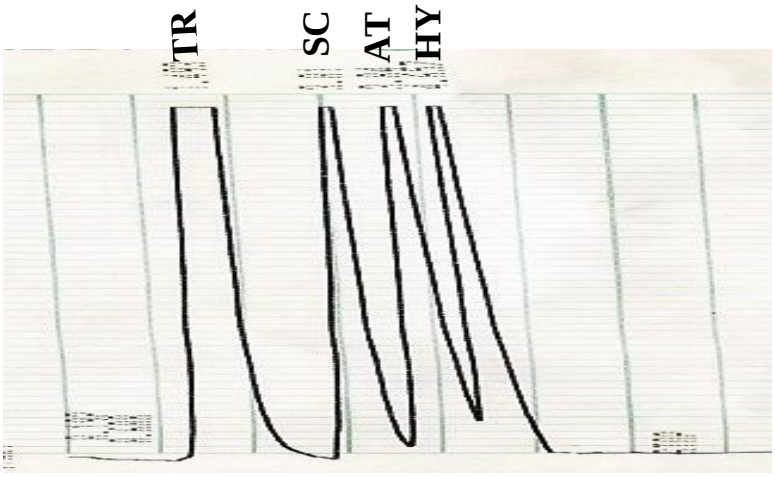
شكل (3) تأثير JA بتركيز 1 ملغم. لتر$^{-1}$+ NaCl بتركيز 10غم. لتر$^{-1}$ + Phe بتركيز 30 ملغم. لتر$^{-1}$ في إنتاج المركبات الثانوية من نسيج الكالس.

Compound	Time	Area	Conc µg. g^{-1}
Tropine	1.747	222338	8.118
Scopolamine	3.278	1562288	57.0425
Atropine	4.097	288128	10.5202
Hyoscyamine	4.923	374492	13.6735



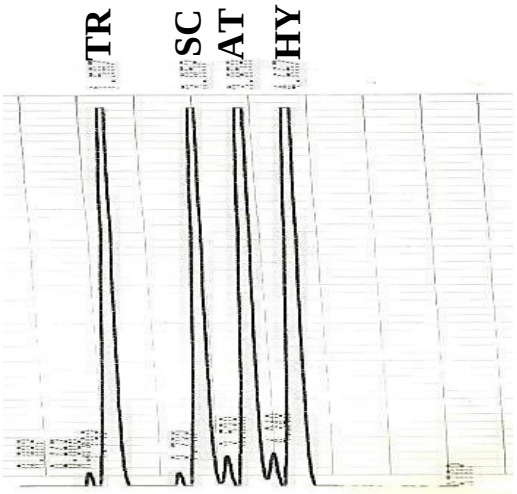
شكل (4) تأثير JA بتركيز 0.5 ملغم. لتر$^{-1}$+ NaCl بتركيز 2.5 غم. لتر$^{-1}$+ Phe بتركيز 20 ملغم. لتر$^{-1}$ في إنتاج المركبات الثانوية من نسيج الكالس.

Compound	Time	Area	Conc µg. g^{-1}
Tropine	1.667	270325	15.8296
Scopolamine	3.185	184008	10.7751
Atropine	3.992	581372	34.0438
Hyoscyamine	4.842	244097	14.2937



شكل (a) منحنى المحلول القياسي Standard Peak للأشكال 2، 3، 4.

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



شكل (b) منحنى المحلول القياسي Standard Peak للشكل 1.

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

المصادر

1- ابو زيد، الشحات نصر. (2006). فسيولوجيا وكيمياء القلويدات في النباتات الطبية وأهميتها الدوائية والعلاجية. دار الكتب العلمية للنشر و التوزيع, القاهرة.

2- جاسم، عماد حمدي. (2013). تحفيز أنتاج القلويدات الاندولية في كالس نبات عين البزون *Catharanthus roseus* L. G. Don خارج الجسم الحي، أطروحة دكتوراه، قسم البستنة وهندسة الحدائق، كلية الزراعة، جامعة بغداد. العراق.

3- الزهيري، إخلاص متعب أحمد. (2016). تأثير بعض المواد الكيميائية في نمو نبات عين البزون وإنتاجه من القلويدات الاندولية داخل وخارج الجسم الحي. رسالة ماجستير، قسم البستنة وهندسة الحدائق, كلية الزراعة, جامعة ديالى. العراق.

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

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

7- سلمان، محمد عباس. (1988). أساسيات زراعة الأنسجة والخلايا النباتية. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي/ جامعة بغداد – العراق.

8- الصحاف, فاضل حسين. (1989).تغذية النباتات التطبيقي. جامعة بغداد. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. العراق.

9- عباس، أستبرق سامي ومحمود، سعدية حسن وابراهيم، كاظم محمد. (2012). تأثير حامض الجاسمونك في إنتاج بعض مركبات الأيض الثانوي في كالس نبات الحلبة *Trigonella foenum- graecum* L. خارج الجسم الحي. مجلة علوم المستنصرية. المجلد 23. العدد 7.

10- Abd El-Rahman, R.; S. E. Gomaa; N. R. Abdelsalam; H. E. M. F. El-Wakil; A. S. Khaled and H. M. Hassan. (2013). Effect of Sodium Chloride on Tropane Alkaloids Accumulation and proline content in *Datura metel* and *D. stramonium* callus cultures. International Journal of Advanced Biological Research ISSN: 2322- 4827, Volume 1, Issue2,: 197-210.

11- Ajungla, L.; P. P. Patil, R. B. Barmukh, and T. D. Nikam. (2009). Influence of biotic and abiotic elicitors on accum-ulation of Hyoscyamine and Scopolamine in root culture of *Datura metel* L.. Indian Journal of Bioticnology, Vol. 8,: 317-322.

12- Ashraf, M.; M. Ozturk and H. R. Athar. (2009). Salinity and Water Stress: Improving crop Efficiency. Springer Science and Business Media B. V.

13- 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.

14- Ballica. R. and D. D. Y. Ryu. (1993). Tropane Alkaloids production in *Datura stramonium* Suspension culture :Elicitor and precursor Effect. Biotechnol. Bioeng ., 41: 1075-1081.

15- David, M. O. and E. T. Nilsen. (2000). The Physiology of Plant Under Stress. John Wiley and Sons, Inc.

propagation of *Citrus spp*. by Organogenesis and Somatic. Embryogenesis Protocols for Micro propagation of Selected Economically-Important Horticultural plants. Methods in Molecular Biology, Volume 994, :99-118.

23- Mizukami, H.; Y. Tabira and B. E. Ellis. (1993). Methyl jasmonate induced rosmarinic acid biosynthesis in *Lithospermum enthrorhizon* suspension cultures. Plant. Cell. Rep., 12: 706-709.

24- Ramawat, K. G.. (2004). Plant Biotechnology, Printed in India, pp: 50-62.

25- Richard, J. P.. (1998). Natural Products Isolation. The Benlamin Cummings Bub-lishing company, Inc. Menlo-pank, USA.: 585-614.

26- Yamada, Y. and M. Tabata. (1997). Plant biotechnology of Tropane alkaloids. Plant Biote-chnology,14:1-10.

16- Evans, W. C.. (2002). Trease and Evans Pharmacognosy 15th ed. W. B. Saunders Company Ltd. London. UK.

17- Gemeinholzer, B. and M. Wink. (2001). Solanaceae: occurrence of Secondary Compounds versus molecular phylogeny. University Heidelberg, Institute fur Pharmaz-erutische Biology, Heidelberg, Germany.

18- 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 of wild *Saliva officinalis*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 73: 117-121.

19- 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.

20- Maria- Antonietta, G. and C. Benedetta. (2013). Micro