دراسة مقارنة لإنتاج قلويدات التروبين داخل وخارج الجسم الحي في نوعي

Datura metel Linn و *Datura innoxia* Mill

أطروحة مقدمة

من كريم طالب خشان الحاتمي

إلى مجلس كلية العلوم – جامعة بابل

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الدكتوراه فلسفة

في علوم الحياة / النبات

جمادي الأولى – ١٤٢٧ حزيران– ٢٠٠٦

Comparative Study Between *Datura Datura metel* Linn with *innoxia* Mill and Respect To Production of Tropane Alkaloid in vivo and in vitro

A Dissertation Submitted by

Khareem Talib Khashan Al-Hatami

to the Council of College of Science University of Babylon

In Partial Fulfillment of the Requirements for the

Degree of Doctor of Philosophy in

Biology/ Botany

١٤٢٧ –Jumadi Al-Aola **٢٠٠٦ –Jun**

بسم الله الرحمن الرحيم

صدق الله العظيم

سورة الفرقان (الآية ١)

أقرار لجنة المناقشة

نشهد نحن أعضاء لجنة المناقشة بإطلاعنا على هذه الأطروحة الموسومة (دراسة مقارنة لإنتاج قلويدات التروبين داخل وخارج الجسم الحي في نوعي الداتورة Datura innoxia mill و Datura metel linn) وقد ناقشنا الطالب كريم طالب خشان الحاتمي في محتوياتها وكل ما يتعلق بها وذلك بتاريخ ١١/١/ ٢٠٠٦ ووجدنا أنها جديرة بالقبول بدرجة (امتياز) لنيل درجة دكتوراه فلسفة في علوم الحياة/النبات.

التوقيع:
رئيس اللجنة: عبدالله إبراهيم شهيد
المرتبة العلمية: أستاذ/ فسلجة نبات
العنوان: جامعة بابل / كلية العلوم
التاريخ: / /٢٠٠٦

التوقيع:
العضو: مؤيد صبري شوكت
المرتبة العلمية: أستاذ مساعد/ تقانه احيائية
العنوان:جامعة بغداد /كلية العلوم
التاريخ: / /٢٠٠٦

التوقيع:
العضو:قيس سعد شبيب
المرتبة العلمية:أستاذ مساعد/ كيمياء حياتية
العنوان:جامعة بابل / كلية طب الاسنان
التاريخ: / /٢٠٠٦

التوقيع:
العضو:رباب عمران راضي
المرتبة العلمية:أستاذ مساعد/ تقانة احيائية
العنوان:جامعة بابل / كلية العلوم
التاريخ: / /٢٠٠٦

التوقيع:
العضو:محسن جلاب
المرتبة العلمية:أستاذ مساعد/زراعة نسيجية
العنوان:جامعة الكوفة / كلية العلوم
التاريخ: / /٢٠٠٦

التوقيع:
العضو:عبد العظيم كاظم محمد
المرتبة العلمية:أستاذ / فسلجة نبات
العنوان:جامعة بابل / كلية العلوم
التاريخ: / /٢٠٠٦

التوقيع:
العضو:المرحوم حسين محسن كاظم
المرتبة العلمية:أستاذ مساعد / زراعة نسيجية
العنوان:جامعة كربلاء / كلية الزراعة
التاريخ: / /٢٠٠٦

مصادقة مجلس كلية العلوم/ جامعة بابل

التوقيع:

الاسم: د.عودة مزعل ياسر

المرتبة العلمية: أستاذ

العنوان: كلية العلوم- العميد

التاريخ: / /٢٠٠٦

التوقيع:
العضو:
المرتبة العلمية:
العنوان:
التاريخ: / /٢٠٠٦

التوقيع:
العضو:
المرتبة العلمية:
العنوان:
التاريخ: / /٢٠٠٦

التوقيع:
العضو:
المرتبة العلمية:
العنوان:
التاريخ: / /٢٠٠٦

التوقيع:
العضو:
المرتبة العلمية:
العنوان:
التاريخ: / /٢٠٠٦

التوقيع:
العضو:
المرتبة العلمية:
العنوان:
التاريخ: / /٢٠٠٦

شكـــر وتقـــدير

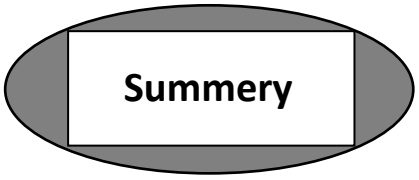
الحمد لله والصلاة والسلام على رسول الله محمد (ص) وعلى آله وصحبه ومن والاه .... وبعد ؛

فأنا على مشارف إنهاء دراستي أعزي نفسي والأسرة العلمية وأسرة الفقيد الغالي المرحوم الأستاذ الدكتور حسين محسن كاظم آل خنجر الذي شاءت قدرة الله تعالى أن لا يكون بيننا ويكون في ذمة الخلود نسأله تعالى أن يتغمده في رحمته ويجعل هذا الجهد العلمي الذي رعاه بكل أمانة وإخلاص في حياته رحمة وصدقة جارية، فإنا لله وإنا إليه راجعون.

كما وأجد من الواجب أن أسجل بكل فخر واعتزاز شكري وتقديري إلى الأستاذ العزيز الدكتور عبد العظيم كاظم محمد للجهود الكبيرة والرعاية الأبوية والعلمية التي أبداها في رعاية بحثي وإغنائه بكل ما يحتاجه البحث العلمي من معرفة علمية والتي تركت أثرها الكبير في دراستي مع دعائي له بالصحة والنجاح. وأقدم شكري العالي إلى الهيأة التدريسية في كلية العلوم – جامعة بابل – قسم علوم الحياة وفي مقدمتهم السيد العميد المحترم للجهود الكبيرة التي بذلت في مساعدتي وتوفير فرصة الدراسة في الكلية مع التقدير . ومن دواعي سروري أتقدم بالشكر الجزيل للرعاية ألأبوية المستمرة طيلة فترة البحث التي قدمها الدكتور سامي وحيد ألحسناوي عميد كلية العلوم – جامعة الكوفة والسيد رئيس قسم علوم الحياة الدكتور سامي عبد الرضا والأخوة أعضاء الهيأة التدريسية في القسم وأخص بالذكر الدكتور العزيز أحمد عبيس مطر ولا بد لي أن أسجل فائق شكري وتقديري إلى الدكتور صالح مهدي حداوي / كلية العلوم جامعة – كربلاء - والهيأة التدريسية في قسم علوم الحياة وأخص بالذكر الأستاذ العزيز ناجح هاشم مع الأمنيات للجميع بالتوفيق شكري وتقديري إلى الأخ العزيز ألأستاذ خالد عبد مطر والهيأة التدريسية في كلية الزراعة – جامعة كربلاء لجهودهم المميزة لمساعدتي لإكمال البحث مع التوفيق ولا يفوتني أن أسجل شكري وتقديري إلى الدكتور أحمد المحنا و الدكتورة سناء في كلية الطب – جامعة الكوفة لمساعدتهم في إنجاز متطلبات البحث مع تمنياتي لهم بالنجاح وبإعجاب شديد وتقدير عال أتقدم بالشكر والتقدير إلى الأخ الأستاذ كريم – صاحب مكتب الجامعة للتجهيزات الطبية للجهود المميزة في توفير مستلزمات البحث من المواد الكيميائية والأجهزة الضرورية مع التوفيق.

ومع اعتزازي وتقديري أقدم شكري وامتناني إلى الأستاذ محمد المهداوي لجهوده المميزة في طبع الأطروحة مع تمنياتي له بالنجاح والتوفيق ونشكر مكتب الجيل للحاسبات لمساهمته في أنجاز هذه الأطروحة ... مع التقديـــر

وعلى الدوام كان لإخوتي وزملائي طلبة الدراسات العليا في كلية العلوم – جامعة بابل الأثر المباشر في المساعدة والعون، مع دعواتي لهم بالنجاح والتوفيق.



This work was conducted to determine qualitatively and quantitatively of tropane alkaloids (Hyosciamine and Hyoscine) in roots , leaves and seeds of *Datura metel* Mill and *Datura innoxia* Linn and in leaves callus induced by two phases (growth and accumulation phases) callus induced from leaves by using MS medim supplimented with ٢,٤-D at concentrations of (١, ٢ , ٣) mg/L

The effect of BA (Benzyl adenine) at concentration of (١, ٢ , ٣) mg/L was also investigated , besides the effect of salt and temperature stresses on production and accumulation phases of alkaloids in callus tissues and to compare the alkaloids content between callus and leaves in mother plant .

This study included continuous alcohol extraction by ethanol (٨٠٪) of roots , leaves and seeds and by ethanol and ether at ratio ٤:١ (v/v) for callus extraction .

Dragendorff and Mayer indicators were used to test alkaloids besides application of thin Layer chromatography (TLC) detection of absorbance values of alkaloids were acomplished by UV-spectrophotometer and the content of alkaloid were done by HPLC (high performance liquid chromatography .

The results revealed that alcoholic extracts of roots , leaves and seeds besides callus growth and accumulation phases illustrated of data with Dragendorff and Mayer tests .

Meanwhile the developed spots of (TLC) with relative front were indentical to the relative flow of controls (standard hyosciamine and hyoscine) alkaloids. absorbance values of these samples were identical with these controls.

The results showed the superiority of hyosciamine on hyoscine in all explants of the two species of Datura and high valus were found in *D. metel* in the total alkaloids in term of plant organism the content of alkaloid were more in the roots than in leaves and seeds .

Data revealed that the fresh and dry weights of callus of the two species grown MS medim supplimented with ٢,٤-D at ٢ mg/L were higher than in the control Besides with domination of hyscoamine content on hyoscine content in

this treatment and superiority the callus of *D. metel* on *D- innoxia* in the total alkaloids and on its content in leaves of parent plant.

Also , the result indicated an increase in hyoscamine and hyoscine content with increasing of oncentration supplied BA besides the hyosciamine is higher than hyoscine in parent plant leaves .

The data illustrated that there was increase in Alkaloid content in callus grown in salt media as increasing there concentration and meanwhile there is significant decrease of fresh and dry weight of callus with increasing salt concentration .

Finally , result revealed that there were significant decreases of callus fresh and dry weights and content of alkaloids with decreasing temperature . However hysociamine and hyoscine content were increased with decreases temperature .

الخـلاصة : ABSTRACT

أجريــت الدراســة لمعرفــة كميــة قلويــدات التــروبين Tropane alkaloids (الهيوســيامين *Hyoscyamine* والهيوسين *Hyoscine*) فـي جـذور وأوراق وبـذور نـوعين مـن نبـات الـداتورة *Datura Metel* Mill و *Datura Innoxia* Linn وفي الخلايا المستحثة من أوراق الداتورة وفق نظام الطورين (طور نشوء الكالس وطور التراكم) .

إذ تم استحثاث أنسجة الكالس (Callus) من أوراق نباتات النوعين في وسط MS المجهز بمنظم النمو ٢,٤-D (٢,٤- Dichlorophenoxy Acetic Acid) بالتراكيز(٢ , ٣ , ١) ملغم / لتر لتحفيز نشوء الكالس.

كذلك دراسة تأثير منظم النمو ألـ BA (Benzyl adinine) بالتراكيز(١ , ٢ , ٣) ملغم / لتر والإجهاد الملحي Salt stress بالمستويات(٣ , ٦ , ٩ , ١٢ , ١٥) ديسيسمنز / م إضافة إلى الإجهاد الحراري Temprature stress باستخدام درجات الحرارة (٢٥ ± ١ و ١٠ ± ١)°م في معدل الوزن الطري والجاف لأنسجة الكالس وفي إنتاج وتجميع ألقلويدات في الأنسجة المستحثة ومقارنة كميتها مع ما موجود في أنسجة أوراق النبات الأصل .

جرى استخلاص كحولي مستمر للجذور والأوراق والبذور بمذيب الايثانول (٨٠ %) وبمذيبي الإيثر والايثانول بنسبة (١: ٤) V/في استخلاص أنسجة الكالس ولجميع المعاملات.

تم التحري والكشف عن القلويدات الأساسية فيها (الهيوسيامين والهيوسين) باستخدام كواشف دراجندورف (Dragendoorff) ومايـر (Mayer) . وجرى تحليل كروموتوكرافيا الطبقة الرقيقة TLC (Thin Layer Chromatography) للمستخلصات الكحولية ثم تم التأكد من نوعيتها بطريقة لونية باستخدام جهاز المطياف الضوئي(UV- Visible Spectrophotometer) .

أظهرت النتائج بأن المستخلصات الكحولية الخام لجذور وأوراق وبذور نباتات النوعين وكذلك الكالس المستحث من الأوراق والكالس النامي في طور التراكم لجميع المعاملات قد أعطت كشفاً ايجابياً مع كواشف دراجندورف وماركوس وماير وكانت قيم Rf للبقع المفصولة في صفائح هلام السليكا (TLC) تشير إلى تطابقها مع قيم Rf البقع المفصولة للمحاليل القياسية للهيوسيامين والهيوسين كما أظهرت منحنيات الامتصاص الضوئي لجميع المستخلصات الكحولية وجود منحنيات مطابقة لمنحنيات المحاليل القياسية لتلك القلويدات .

وأظهرت نتائج التقدير الكمي تفوق كمية قلويد الهيوسيامين على الهيوسين في كميته في الأجزاء النباتية للنوعين مع تفوق نبات *D. Metel* في المحتوى الكلي لتلك ألقلويدات مع سيادة تلك القلويدات في جذور النوعين على كميتها في الأوراق والبذور.

وتظهر النتائج تفوقاً معنويا لنباتات النوعين في معدل الوزن الطري والجاف لأنسجة الكالس في المعاملة ٢,٤-D تركيز ٢ ملغم / لتر مع سيادة قلويد الهيوسيامين على الهيوسين في كميته في هذه المعاملة وتفوق كالس نبات *D.Metel* على كالس نبات *D.Innoxia* في المحتوى الكلي للقلويدات وكذلك على كميتها في أوراق النبات الأصل .

وبينت النتائج ارتفاع كمية الهيوسيامين والهيوسين بارتفاع تراكيز ألـBA في وسط نمو الكالس ولنوعي الداتورة ، وكانت السيادة لقلويد الهيوسيامين على قلويد الهيوسين في أوراق النبات الأصل .

وتشير النتائج إلى ارتفاع كمية تلك القلويدات في أنسجة الكالس النامي في الأوساط الغذائية الملحية (٣ , ٦ , ٩ , ١٢ , ١٥) ديسيسمنز / م وازدادت بزيادة التراكيز الملحية في وسط النمو كما ظهر تأثير معنوي للتراكيز الملحية في معدل الوزن الطري والجاف لأنسجة الكالس الذي انخفض مع زيادة التراكيز الملحية في الوسط الغذائي .

وأشارت النتائج إلى وجود تأثير معنوي للدرجات الحرارية المنخفضة (١ + ٥ , ١ + ١٠ مْ) في معدل الوزن الطري والجاف في أنسجة الكالس وكذلك في محتواها من القلويدات أعلاه إذ انخفض معدل الوزن الطري والجاف مع انخفاض الدرجات الحرارية في حين حدث العكس مع قلويدات الهيوسيامين والهيوسين الذي ازدادت كميتها في خلايا أنسجة الكالس مع زيادة انخفاض الدرجات الحرارية .

المحتويـــــــــــــات

التسلسل	المواضيع	الصفحة
	الفصل الأول : المقدمة واستعراض المراجع	**١-٢٥**
١	المقدمـــة	٢
١ – ١	أهداف الدراسة	٣
٢	استعراض المراجع	٤
٢ – ١	*الوصف النباتي*	٦
٢ – ١ – ١	*Datura metel* Linn.	٦
٢ - ١ – ٢	*Datura Innoxia* Mill.	٦
٢ – ٢	الاستخدام الطبي لقلويدات الهيوسيامين والهيوسين	٩
٢ – ٣	تصنيف المركبات القلويدية	٩
٢ – ٤	النسبة المئوية للقلويدات في جذور وأوراق وبذور نباتات الداتورة بنوعيه	١٠
٢ - ٤ - ١	*D. metel*	١٠
٢ – ٤ - ٢	*D. Innoxia*	١٠
٢ – ٥	التمثيل الحيوي لقلويدات الهيوسيامين والهيوسين	١٢
٢ – ٦	إنزيمات التمثيل الحيوي لقلويدات الهيوسيامين والهيوسين	١٤

٢ – ٧	المحاليل القياسية للقلويدات	١٥
٢ – ٨	استخلاص القلويدات بالمذيبات العضوية	١٦
٢ – ٩	كواشف الرش في تقنية كروموتوكرافيا الطبقة الرقيقة TLC	١٦
٢ - ١٠	طرق التحليل الكيميائي للقلويدات	١٦
٢ – ١٠ - ١	تقنية جهاز HPLC	١٧
٢ – ١٠ – ٢	جهاز المطياف الضوئي UV	١٧
٢ – ١٠- ٣	تقنية الـ TLC	١٨
٢ – ١١	زراعة الأنسجة النباتية	١٨
٢ – ١١- ١	تأثير منظمات النمو النباتية في استحداث أنسجة الكالس وإنتاج مركبات الأيض الثانوي	١٩
٢ – ١١ - ٢	تأثير الدرجات الحرارية المنخفضة في إنتاج مركبات الأيض الثانوي	٢٢
٢ – ١١ - ٣	تأثير الضوء في إنتاج مركبات الأيض الثانوي	٢٣
٢ – ١١ - ٤	تأثير الملوحة في إنتاج مركبات الأيض الثانوي	٢٤
	الفصل الثاني : المواد وطرائق العمل	**٢٦ - ٤٦**
٣	المواد وطرائق العمل	٢٦
٣ – ١	المواد والأجهزة	٢٦
٣ – ١ - ١	المواد الكيميائية	٢٦
٣ – ١ - ٣	المحاليل	٢٩
٣ – ١ - ٤	الكواشف المستخدمة للمركبات القلويدية في المستخلصات الكحولية	٣٠
٣ – ١ - ٥	كواشف الرش في تقنية كروموتوكرافيا الطبقة الرقيقة TLC	٣١
٣ – ٢	طرائق العمل	٣١
٣ – ٢ - ١	إعداد بذور نباتات الداتورة وزراعتها	٣١
٣ – ٢ - ٢	إعداد الأوراق والجذور والبذور للأستخلاص الكحولي	٣٢
٣ – ٢ - ٣	تحضير مستخلصات المركبات القلويدية الخام	٣٢
٣ – ٢ - ٤	فصل قلويدات الهيوسيامين والهيوسين من أوراق وجذور وبذور نباتات النوعين باستخدام تقنية كروموتوكرافيا الطبقة الرقيقة TLC	٣٤
٣ – ٢ - ٥	التقدير النوعي للمركبات القلويدية في المستخلصات الكحولية الخام باستخدام المطياف الضوئي	٣٥
٣ – ٢ - ٥ - ١	النموذج القياسي للعينات القياسية	٣٥
٣ – ٢ - ٦	تقدير المحتوى الكلي للمركبات القلويدية في المستخلص الكحولي	٣٥
٣ – ٢ - ٧	التقدير النوعي للمركبات القلويدية في المستخلص الكحولي الخام	٣٦
٣ – ٢ - ٨	قياس درجة الانصهار	٣٦
٣ – ٢ - ٩	إنشاء الزروعات النسيجية	٣٦
٣ – ٢ - ٩ - ١	إعداد الجزء النباتي	٣٦
٣ – ٢ - ٩ - ٢	إعداد الوسط الغذائي	٣٧
٣ – ٢ - ٩ - ٣	تعقيم الجزء النباتي	٣٧
٣ – ٢ - ٩ - ٤	استحداث أنسجة الكالس	٣٨
٣ – ٢ - ٩ - ٤ - ١	طور النشوء	٣٨
٣ – ٢ - ٩ - ٤ - ٢	تعيين الوزن الطري (غم) في أنسجة الكالس .	٣٨
٣ – ٢ - ٩ - ٤ - ٣	تعيين الوزن الجاف (ملغم) في أنسجة الكالس .	٣٩
٣ – ٢ - ١٠	استخلاص القلويدات من أنسجة الكالس	٣٩
٣ – ٢ - ١١	فصل القلويدات من المستخلص الكحولي لأنسجة الكالس باستخدام تقنية	٤١

	كروموتوكرافيا الطبقة الرقيقة TLC	
٣ – ٢ - ١٢	التقدير النوعي للقلويدات في المستخلص الكحولي لأنسجة الكالس النامي في الأوساط الغذائية الملحية	٤١
٣ – ٢ - ١٣	طور التراكم	٤١
٣ – ٢ - ١٣ - ١	منظم النمو (الببنزل أدنين BA) .	٤١
٣ – ٢ - ١٣ - ٢	تعيين الوزن الطري (غم) لأنسجة الكالس	٤٢
٣ – ٢ - ١٣ - ٣	تعيين الوزن الجاف (ملغم) في أنسجة الكالس .	٤٢
٣ – ٢ - ١٤	فصل القلويدات من المستخلص الكحولي لأنسجة الكالس باستخدام تقنية TLC	٤٢
٣ – ٢ - ١٥	التقدير النوعي للمركبات القلويدية في أنسجة الكالس باستخدام المطياف الضوئي	٤٣
٣ – ٢ - ١٦	الأوساط الغذائية الملحية	٤٣
٣ – ٢ - ١٦ - ١	تحضير المحلول الملحي	٤٣
٣ – ٢ - ١٦ - ٢	تحضير الوسط الغذائي الملحي	٤٣
٣ – ٢ - ١٦ - ٣	زراعة الكالس في الأوساط الغذائية الملحية	٤٤
٣ – ٢ - ١٧	الدرجات الحرارية المنخفضة	٤٤
٣ – ٢ - ١٧ - ١	فصل المركبات القلويدية في المستخلص الكحولي لأنسجة الكالس النامي في الأوساط الملحية باستخدام تقنية TLC	٤٤
٣ – ٢ - ١٧ - ٢	التقدير النوعي للقلويدات في مستخلص الكالس النامي في الأوساط الملحية باستخدام المطياف الضوئي	٤٥
٣ – ٢ - ١٧ - ٣	التقدير الكمي للقلويدات في أنسجة الكالس باستخدام جهاز HPLC	٤٥
٣ – ٢ - ١٨	التحليل الإحصائي	٤٦
	الفصل الثالث : النتائج والمناقشة	٤٧-١٢٨
٤	النتائج والمناقشة	٤٧
٤ – ١	الكواشف الترسيبية	٤٧
٤ – ٢	التقدير النوعي لقلويدات الهيوسيامين والهيوسين باستخدام المطياف الضوئي	٤٨
٤ – ٢ - ١	التقدير النوعي للمحاليل القياسية للقلويدات	٤٨
٤ – ٢ - ٢	التقدير النوعي لقلويدات الهيوسيامين والهيوسين في المستخلصات النباتية الخام باستخدام المطياف الضوئي	٤٩
٤ – ٢ - ٢ - ١	*D. Innoxia*	٤٩
٤ – ٢ - ٢ - ٢	*D. metel*	٥٠
٤ – ٣	تحديد صفات المركبات القلويدية المفصولة لتقنية كروموتوكرافيا الطبقة الرقيقة TLC	٥١
٤ – ٣ - ١	فصل المركبات القلويدية في أوراق نوعي الداتورة	٥١
٤ – ٣ - ٢	فصل المركبات القلويدية في جذور نوعي الداتورة	٥٢
٤ – ٤	قياس درجة انصهار المركبات القلويدية في مستخلصات نوعي الداتورة	٥٥
٤ – ٥	المحتوى الكلي للقلويدات في المستخلصات الكحولية الخام	٥٦
٤ – ٦	التقدير الكمي و النوعي لقلويدات الهيوسيامين والهيوسين باستخدام تقنية TLC	٥٨
٤ – ٦ - ١	قياس زمن الاحتجاز Retention time لقلويدات الهيوسيامين والهيوسين في المحاليل القياسية	٥٨

٤ – ٦ - ٢	التقدير الكمي و النوعي للقلويدات في المستخلص الكحولي لجذور وأوراق وبذور نوعي الداتورة باستخدام HPLC	٦٠
٤ – ٦ - ٢- ١	*D. metel*	٦٠
٤ – ٦ - ٢ -٢	*D. Innoxia*	٦٣
٤ – ٦ - ٣	المقارنة بين كمية قلويدات الهيوسيامين والهيوسين في نباتات النوعين.	٦٦
٤ – ٧	إنتاج وتراكم قلويدات الهيوسيامين والهيوسين باستخدام تقنية الزراعة النسيجية	٦٧
٤ – ٧ - ١	طور النشوء	٦٧
٤ – ٧ - ١ - ١	تأثير تراكيز الـ ٢,٤-D في الوزن الطري (غم) لأنسجة الكالس المستحدث من نوعي الداتورة .	٦٧
٤ – ٧ - ١ - ٢	تأثير تراكيز الـ ٢,٤-D في الوزن الجاف(ملغم) لأنسجة الكالس المستحدث من نوعي الداتورة .	٧١
٤ – ٨	طور التراكم	٧٣
٤ – ٨ - ١	المعاملة بالـ BA البنزل أدنين	٧٣
٤ – ٨ - ١ - ١	تأثير إضافة الـ BA في الوزن الطري(غم) في كالس نوعي الداتورة .	٧٣
٤ – ٨ - ١ - ٢	تأثير إضافة الـ BA في الوزن الجاف(ملغم) في كالس نوعي الداتورة .	٧٦
٤ – ٨ - ٢	الملوحة	٧٧
٤ – ٨ - ٢ - ١	تأثير تراكيز الأملاح في الوزن الطري (غم) لأنسجة الكالس .	٧٧
٤ – ٨ - ٢ - ٢	تأثير تراكيز الأملاح في الوزن الجاف (ملغم) لأنسجة الكالس.	٨٢
٤ – ٨ - ٣	الدرجات الحرارية المنخفضة	٨٣
٤ – ٨ - ٣ - ١	تأثير الدرجات الحرارية المنخفضة (١ ± ٥ , ١٠±١)ْم في المظهر العام لنسيج الكالس .	٨٣
٤ – ٨ - ٣ - ٢	تأثير الدرجات الحرارية المنخفضة (١ ± ٥ , ١٠±١)ْم في معدل الوزن الطري (غم) لأنسجة كالس نوعي الداتورة .	٨٦
٤ – ٨ - ٣ - ٣	تأثير الدرجات الحرارية المنخفضة (١ ± ٥ , ١٠±١)ْم في معدل الوزن الجاف (ملغم) لأنسجة كالس نوعي الداتورة .	٨٩
٤ – ٩	الكواشف الترسيبية للمركبات القلويدية في مستخلصات الكالس	٨٩
٤ – ٩ - ١	فصل المركبات القلويدية في مستخلص نوعي الداتورة باستخدام تقنية كروموتوكرافيا الطبقة الرقيقة TLC	٩١
٤ – ٩ - ١ - ١	*D. metel*	٩١
٤ – ٩ - ١ - ٢	*D. Innoxia*	٩٢
٤ – ١٠	التقدير النوعي للقلويدات في أنسجة الكالس النامي في ألوساط الغذائية الملحي	٩٥
٤ – ١١	التقدير الكمي والنوعي لقلويدات الهيوسيامين والهيوسين في مستخلص كالس نوعي الداتورة باستخدم تقنية HPLC	٩٨
٤ – ١١ - ١	المعاملة بمنظم النمو الـ ٢,٤-D (طور النشوء)	٩٨
٤ – ١١ - ٢	المقارنة بين كمية القلويدات في المستخلص الخام لأوراق نوعي الداتورة وفي الكالس المستحدث منها باستخدام تقنية HPLC	١٠١
٤ – ١١ – ٣	المعاملة بمنظم النمو BA (طور التراكم)	١٠٣
٤ – ١١ – ٤	المقارنة بين كمية القلويدات في مستخلص نبات الداتورة الخام والكالس النامي في طور التراكم بوجود الـ BA	١٠٨

٤ – ١٢	التقدير الكمي والنوعي للقلويدات في أنسجة كالس نوعي الداتورة النامي في الأوساط الملحية باستخدام تقنية HPLC	١١١
٤ – ١٢ – ١	*D. metel*	١١١
٤ – ١٢ - ٣ - ٢	*D. Innoxia*	١١٦
٤ – ١٢ - ٣ - ٣	المقارنة بين كمية القلويدات في أنسجة الكالس النامي في الأوساط الملحية وأوراق نبات الأم	١١٨
٤ – ١٢ - ٤	المعاملة بالدرجات الحرارية المنخفضة	١٢١
٤ – ١٢ - ٤ - ١	*D. metel*	١٢١
٤ – ١٢ - ٤ - ٢	*D. Innoxia*	١٢٣
٤ – ١٢ - ٥	المقارنة بين كمية القلويدات في أنسجة الكالس النامي في الدرجات الحرارية المنخفضة وكميتها في أوراق نبات الأم	١٢٥
٤ – ١٢ - ٥ - ١	*D. metel*	١٢٥
٤ – ١٢ - ٥ - ٢	*D. Innoxia*	١٢٦
	الاستنتاجات والتوصيات	١٢٩-١٣٠
	الاستنتاجات	١٢٩
	التوصيات	١٣٠
	المصادر والمراجع	١٣١-١٥١
	المصادر العربية	١٣١
	المصادر الأجنبية	١٣٤

١- المقدمــة : (Introduction) :

جـنس الـداتورة (*Datura*) مـن اجنـاس العائلـة الباذنجانيـة (*Solanaceae*) الـذي يضـم (١٠) أنواع عشبية وشجيرية واسعة الانتشار في المناطق الاستوائية والمعتدلة من العالم وموطنه الأصلي أوربا وتسمى الداتورة بأسماء عدة منها : الداتولة ، التاتورة ، التاتولة ، حشيشة الشيطان ، وصفير السلطان (الاجراجي ، ١٩٩١ والدجوي ، ١٩٩٦). وتوجد في العراق ثلاثة أنواع رئيسية أدخلت من قبل وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي (الخالدي ، ٢٠٠٥) م ثم توسعت دائرة انتشارها في مناطق مختلفة من العراق بوصفها نباتات للزينة أو للأغراض الطبية ينتشر النوعين : *Datura Metel Linn* و *Datura Innoxia Mill* إذ يكون انتشارها في المنطقتين الوسطى والجنوبية من العراق أما النوع الثالث فهو *Datura Stramonium Linn* فانه واسع الانتشار في المنطقة الشمالية من العراق (Chakravarty ، ١٩٧٦ ومحمد ، ١٩٩٦). ولنبات الداتورة قيمة استراتيجية في توفير الدواء فقد استخدم الهيوسيامين بشكل واسع في علاج مرض الربو Asthma من خلال تأثيره في الأوعية والشعيبات القصبية ومنبه للجهاز العصبي المركزي (Central nervous system) من خلال تنشيط ألـ Acetylcholine ومقاومة فعل ألـ Muscarinic ويعد مؤثرا في معدل زيادة ضربات القلب وعلى المعدة عن طريق تقليل حركة المعدة (Clark وجماعته، ١٩٨٨ و Dale ، ١٩٩٦). أما قلويد الهيوسين (Hyoscine) فيعد ذا فعل قوي على حدقة العين ويسبب توسعها وتفقد العضلات الهدبية (Ciliary Muscles) قدرتها كما انه يسبب قلة افراز الغدد اللعابية والغدد العرقية والافرازات المعدية والعصارة البنكرياسية والغدد الدمعية وله تأثير مثبط للجهاز العصبي المركزي ويستخدم لعلاج الآلام الحادة الناشئة من اضطراب وظائف الجهاز الهضمي والجهاز البولي والتناسلي ولمعالجة

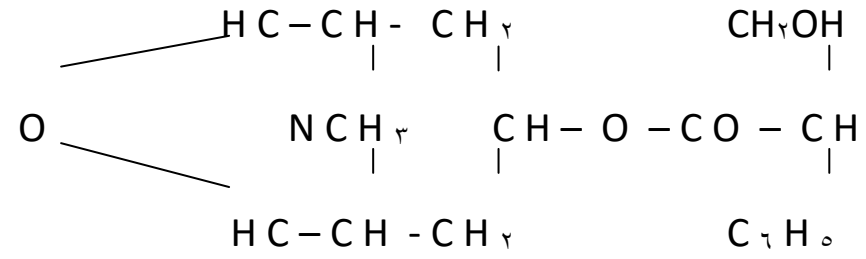
الآلام الحادة المصحوبة بتشنجات (Antspasmodic) اثناء عملية الولادة (Brown و Tylor ، ١٩٩٦ و Narula وجماعته، ٢٠٠٤) ويعزى التأثير المضاد لالتهابات الكلية إلى وجود هذه القلويدات في العقار المستخدم والتي يكون فعلها كالآتي :

Hyoscine اكثر من Hyoscyamine

(Dale ، ١٩٩٦ و Leurence وجماعته ، ١٩٩٧)

يصنف نبات الداتورة على أنه أحد النباتات الطبية (Medicinal Plant) المهمة في العالم لاحتوائها على العديد من المركبات الكيميائية الفعالة بيولوجيا مثل المركبات القلويدية (Alkaloid Compounds) والمركبات الفينولية (Phenolic Compounds) والمركبات التربينية (Terpenoid Compounds) والكلايكوسيدات وغيرها (الدجوي ، ١٩٩٦ ، والربيعي ، ١٩٩٩ ، والملاح وأواب ، ٢٠٠١ ، والخالدي ، ٢٠٠٥) .

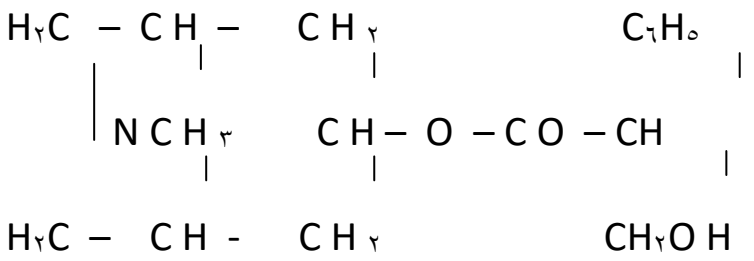
وتعد المركبات القلويدية في نبات الداتورة من أهم المجموعات العلاجية ، فنجد أن كلا النوعين *D. metel* و *D.innoxia* يحتويان على قلويد السكوبلامين (Scopolamine) الهيوسين (Hyoscine) وتركيبه الكيميائي $C_{17}H_{21}NO_4$ ويتركز في الجذور ويتكون من الهيوسيامين (Hyoscyamine) عبر مركب وسطي هو ٦B- hydroxyl hyoscyamine باشتراك انزيم ٦*B*- (H٦H) hyoscyamine hydroxylase الذي يتواجد في الجذور وينتقل الى الأجزاء الهوائية من النبات (Matsud وجماعته، ١٩٩١ و Hashimoto وجماعته، ١٩٩٣ ، و Celine و Michele، ٢٠٠٥).



(Hyoscine)

أما قلويد الهيوسيامين Hyoscyamine (Atropine) فيعد القلويد الأساسي الآخر في نباتات الداتورة وتركيبه الكيميائي $C_{17}H_{23}O_3N$ ويمكن الحصول على التروبين بمستوى تجاري بتسخين Hyoscyamine مع الكلوروفورم (Chakravarty ، ١٩٧٦) والهيوسيامين مسحوق أبيض متبلور ذو درجة تمييع تتراوح بين (١١٠ - ١١٨ م˚) ووزنه الجزيئي ٢٨٩.٠٤ دالتون ، وتتراوح نسبة قلويدات الهيوسيامين والهيوسين في كلا النوعين بين (٠.٠١ - ٣ %) من الوزن الجاف اعتمادا على نوع النبات والظروف البيئية المحيطة (Kitamura وجماعته، ١٩٩٣ و Verpoorteو Al- Fermann، ٢٠٠٠)

.



Hyoscyamine

١ – ١ : أهداف الدراسة Aims of the study :

نظرا للأهمية البالغة لقلويدات الهيوسيامين والهيوسين في المجال الطبي جاءت هذه الدراسة لتحقيق الأهداف الآتية :

١. إيجاد وسائل أخرى لإنتاج تلك القلويدات بوصفها مركبات أيض ثانوي واستخلاصها من نوعين من نبات الداتورة *D.metel* و*D. innoxia* ومن مصدرين المصدر الأول : أجزاء النبات الطبيعي والمصدر الثاني الكالس المستحصل عليه من زراعة الأجزاء الورقية في وسط MS بوجود ألـ ٢,٤-D ومقارنتها .
٢. دراسة تأثير السايتوكاينين ومنها ألـ BA (البنزيل أدنين) في إنتاج وتراكم تلك القلويدات في أنسجة الكالس.
٣. دراسة تأثير الإجهاد الملحي في إنتاج وتراكم هذه القلويدات في أنسجة الكالس.
٤. دراسة تأثير الدرجات الحرارية المنخفضة في إنتاج وتراكم تلك القلويدات في أنسجة الكالس .

٢ - استعراض المراجع :

أصبحت النباتات الطبية اليوم تحتل مكانة مرموقة في مجال الطب والصناعات الدوائية وتحظى بعناية متميزة من قبل الدول المنتجة لها لاحتوائها على العديد من المركبات الكيميائية الفعالة (حسين ، ١٩٨١). وتعد المركبات الكيميائية الثانوية Allelochemicals مركبات حيوية ينتجها النبات لإنجاز وظائف بيولوجية عدة منها دفاعية ضد الكائنات المجهرية والكائنات الآكلة للأعشاب أو تستخدم لجذب الحشرات لغرض التلقيح وتمتلك فعالية بيولوجية تخص العلاقات البيئية بين الكائنات الأخرى (Rice ، ١٩٨٧ ، وروكستين ، ١٩٩١). ويكون إنتاجها غير محدد وبعضها ذو وظيفة غير محددة وتكون معظمها متغيرة بتغير نوع النبات والظروف البيئية والموقع الجغرافي وفصل النمو (Tang وجماعته، ١٩٨٧). تزداد أغلب مركبات الأيض الثانوي خلال فترة التزهير بينما ينخفض إنتاجها خلال فترة النمو الخضري (Dewick ، ١٩٩٧), وذكر Chakravarty (١٩٧٦) أن نبات ألـ *D.innoxia* يحوي على أكبر كمية من القلويدات عندما يكون في فترة التزهير. وأكد الباحث Oksman وجماعته ١٩٨٧) (بأن قلويد ألـ Hyoscine يتركز في أوراق نبات *Hyoscyamus Muticus* قبل حدوث عملية التزهير بينما تزداد كمية ألـ Hyoscyamine خلال فترة التزهير في حين تزداد كميتهما معا خلال فترة نضج الثمار وتتركز مركبات الأيض الثانوي في أجزاء النبات المختلفة اعتمادا على عدة عوامل منها وقت الحصاد ونوعية المعاملة بعد الحصاد إضافة إلى عوامل بيئية مثل درجة الحرارة وملوحة التربة وموقع النبات (Koike وجماعته، ١٩٩٨). وتخلق العديد من المركبات الثانوية في واحد أو أكثر من المسارات الأيضية التي تشترك فيها الإنزيمات المتخصصة وتخزن في خلايا النبات بشكل حر أو مرتبط بمركبات أخرى وتفرز الى المحيط الخارجي وتؤثر في نفس النبات المنتج لها أو في غيرها من النباتات بصورة مباشرة أو غير مباشرة (Wickens ، ٢٠٠١). وتزداد منتجات الأيض الثانوي في أجزاء النبات نتيجة التعرض للإصابة الحشرية والكائنات المجهرية كاصابة جذور نباتات الداتورة ببكتيريا *Agrobactrium Rhizogenes* ، واستحثاث تكون الشعيرات الجذرية التي تمتاز بقدرة عالية على انتاج قلويدات التروبين بطريقة ألـ Bioreactor (Hamill وجماعته، ١٩٨٧ و Wilson، ١٩٩٧) أو التعرض الى ظروف بيئية قاسية (Verporte و Al-Fermann ، ٢٠٠٠). وبيّن Oksman وجماعته(١٩٨٧) بأن النباتات الناتجة من الكالس المستحدث من أوراق نبات ألـ *Hyoscyamus Muticus* (Haploid Plant) تمتاز بنمو خضري مختزل وجذور تمتلك قدرة عالية في إنتاج قلويد الهيوسين مقارنة بالنبات النامي في الظروف الطبيعية ومن أصل بذري Diploid Plant .

وأشار الملاح وأواب (٢٠٠١) بأن النباتات المتكونة من الكالس المستحدث من أوراق وسيقان نبات *D.innoxia* تمتلك مواصفات مرغوبة وإنتاجية عالية من المركبات القلويدية نتيجة لإعادة ترتيب الكروموسومات أو انتقال أجزاء منها .

لقد استعمل الإنسان منذ القدم المملكة النباتية كمحاولة منه لاستخدامها في علاج الأمراض التي تصيبه ، وتصيب حيواناته وأصبحت النباتات الطبية مصدر غني للكثير من المواد الكيميائية الطبيعية

التي يكون إنتاجها مسيطر عليه وراثيا ، وخصوصا تلك التي لها فعالية تآزرية في فعلها البايلوجي مع المركبات الأخرى (Metspala وجماعته، ٢٠٠١) . وتنتج النباتات الطبية طيفا واسعا من مركبات الأيض الثانوي إذ تقدر بأكثر من (٨٨٠٠٠) مركبا معظمها مركبات تنتجها النباتات الطبية (Chapmann وHall ، ١٩٩٨).

لقد وجد ما يقارب ألـ (٣٠٠٠) مركب قلويدي في (٤٠٠٠) نوع نباتي وأول قلويد تم عزله هو ألـ (Morphine) عام ١٨٠٥ من نبات *Opium Poppy* (Herbert ، ١٩٨٨ ، و Sulisbry ، ١٩٩٢), ويذكر أن للمركبات الأيضية الثانوية أهمية اقتصادية وطبية وصناعية ، ولها دور في الحفاظ على النظام البيئي من التلوث (Al- Okaily ، ١٩٩٨) .

توجد ثلاث مجاميع رئيسة من المركبات الثانوية هي المركبات الفينولية ، والقلويدية ، والتربينية بالإضافة إلى مركبات أخرى (Rice ، ١٩٨٧) و تتخلق أغلب مركبات الأيض الثانوي من بعض الاحماض الأمينية ومن مركب ألـ acetate الذي هو مادة بادئة للأستيلينات المتعددة وتدخل في التخليق الحيوي للبروتينات والحوامض الدهنية والكاربوهيدرات وان ألـ Shikimic acid يعد مادة بادئة للمركبات العطرية وبعض الفينولات مثل حامض السيناميك Cinnamic acid (Man ، ١٩٨٦).

وتشترك العديد من الانزيمات في عملية التخليق الحيوي لمركبات الأيض الثانوي وتكون شديدة التأثر بالعوامل الحيوية (Biotic factors) وغير الحيوية (Abiotic factors) مثل انزيم H٦H وانزيم (PMT) *N*. Putrescine Methyltransferase التي تشترك في عملية التخليق الحيوي لقلويدات التروبين في نبات الداتورة ، ويشترك ثلاثة عشر انزيما في عملية التخليق الحيوي لقلويد ألـ berbine في نبات *Coptis* الذي ينتمي إلى مجموعة Isoquinoline Alkaloids الذي يستخدم مضادا للبكتيريا Antibacterial Agent (Liang وجماعته، ١٩٨٩ و Fumihiko وجماعته، ٢٠٠٠) .

٢-١ : الوصف النباتي :

٢ - ١ – ١ : *D. metel* :

نبات شجيري معمر ذو ساق بنفسجي اللون منتصب موطنه الأصلي الهند, ارتفاعه بين (٢ - ١) م أو أكثر (شكل ١) والجذر عمودي كثير التفرعات (العبدلي ، ١٩٧٥). أما الأوراق فهي مسننة الحافة ذات لون أخضر فاتح أو مصفر ولها عنق طويل بطول ٨.٢ سم حادة الطرف يتراوح طولها ١٥ ٨ - سم وعرضها ١٠ سم أو أكثر رقيقة الملمس عديمة الزغب شكل (A ٢). والأزهار فهي بنفسجية اللون ذات ثلاث طبقات عطرية ذات تويج متطاول ذي عشرة أسنان ، وكأس انبوبي الشكل ، شكل (B ٢

) . والثمار بشكل علب (Capsules) كروية الشكل ذات نتوءات بارزة وعند النضج تتفتح من الأعلى بواسطة أربع فتحات متقابلة (Migahid , ١٩٧٨) شكل (٢ C), أما البذور فهي عديدة مسطحة تشبه الأذن في شكلها (Earshape) بنية اللون ذات حافات مجعدة طولها حوالي ٤ - ٥ ملم عديمة الرائحة ذات طعم مر (العبدلي ، ١٩٧٥). يتكاثر النبات بواسطة البذور التي تزرع في تربة مزيجية طينية ابتداء من منتصف حتى نهاية آذار عندما تكون درجة حرارة التربة بين ١٥ - ١٨ ْم (Zutst و Atal ، ١٩٧٠).

٢ - ١ – ٢ : *D. innoxia.* :

الموطن الأصلي للنبات ولاية مكسيكو في الولايات المتحدة الأمريكية و في العراق ينمو بالقرب من شواطئ نهر الفرات في محافظتي بابل والنجف الأشرف. وهو عشب كثير الزغب يصل الى ارتفاع (١ - ١.٥) م أو أكثر (شكل ٣), الساق زغبي منتصب كثير التفرعات قطره قرب القاعدة ٤ - ٥ سم ، والجذور بنية اللون والأوراق متبادلة ولها عنق طوله ٤ - ٧ سم ذات شكل بيضوي رمحي (Ovate - Lanceolate حادة الطرف غير متساوية القاعدة ملساء الحافة أو مسننة بأسنان متباعدة ، يتراوح طولها بين ١٥- ٢٠ سم مكسوة بزغب كثيف من الوجهين (مخملية الملمس) (شكل ٤A). والأزهار كبيرة يتراوح طولها بين ١٠- ١٨ سم ،بيضاء اللون عطرية الرائحة ذات تويج بوقي الشكل ذي عشرة أسنان وكأس انبوبي الشكل طوله ٥ سم تقريبا والجزء السفلي منه متفتح ومن الأعلى مقسم الى خمسة أقسام (شكل ٤B). تكون الثمرة بشكل علب (Capsules) شبه كروية ذات أشواك رقيقة وتتفتح من الأعلى عند النضج بواسطة أربع فتحات (شكل ٤C). أما البذور فهي صفراء مسطحة كلوية الشكل(Reniform) عديمة الرائحة ذات طعم مر ويبلغ وزن ١٠٠٠ بذرة حوالي ٨-١٢ غم (Chakravarty ، ١٩٧٦ و العبدلي ، ١٩٧٥). يتكاثر النبات بواسطة البذور التي تزرع في تربة مزيجية طينية ابتداء من ١- ١٥ آذار عندما تكون درجة حرارة التربة بين ١٣ - ١٨ ْم (Chakravarty ، ١٩٧٦) .

٢ - ٢ : الاستخدام الطبي لقلويدات الهيوسيامين والهيوسين :

ان التنوع الحياتي للطبيعة يعد مصدرا مهما للصناعات الطبية ، ومن الأدوية المعتمدة للمدة من ١٩٨٣ - ١٩٩٤ نجد ان ٦ % منها مركبات طبيعية و٢٤ % منها مركبات مشتقة و ٩ % مركبات معتمدة على منتجات طبيعية كأساس (Craggy وجماعته، ١٩٩٧). وتعد المركبات القلويدية من أهم المجموعات الدوائية لتأثيراتها الطبية (Harbone ، ١٩٨٤ و Chapmann و Hall ، ١٩٩٨) وهناك العديد من المركبات القلويدية التي تستخدم مضادات حيوية ضد الكثير من الكائنات المجهرية مثل ألـ Caffeic acid وألـ Chlorogenic acid و ألـ *P*-

Coumaric acid و ألـ Pencillic acid وألـ Hyoscyamine وألـ Hyoscine ، وغيرها (Miller ، وجماعته، ١٩٩١ و Kinghorn و Balandrine ، ١٩٩٣).

٢ - ٣ : تصنيف المركبات القلويدية :

القلويدات مركبات عضوية قاعدية تحتوي على ذرة نتروجين واحدة أو أكثر في الحلقة الهيدروجينية كما في قلويد Ergotamine الذي يحتوي على ٥ ذرات نتروجين (Tyler وجماعته، ١٩٨٨). و تصنف المركبات القلويدية تبعا لطبيعة التركيب الكيميائي الذي اشتقت منه مثل قلويدات ألـ Arecoline و Lobeline و Nicotine التي تشتق من ألـ Pyridine وألـ Piperidine أما قلويد ألـ Hyoscyamine وألـ Hyoscine فإنها تشتق من ألـ Atropane (Tyler وجماعته، ١٩٨٨). تتكون القلويدات بشكل رئيسي في النباتات الزهرية وبخاصة ذوات الفلقتين (Dicotolydon) في العصير الخلوي لأنسجة البشرة (Wardle وجماعته، ١٩٩٨) . والقلويدات تعمل كمنظمات نمو لاسيما كمثبطات انبات (Goodwin و Mercer، ١٩٨٥), وتتركز في أجزاء مختلفة من النبات كالبذور مثل قلويد Physostigma والثمار مثل قلويد ألـ Conium وفي الجذور مثل الهيوسين والهيوسيامين وفي الأجزاء الأرضية كالرايزومات مثل قلويد Sanguinaria . هذا وتنتج العديد من العوائل النباتية المركبات القلويدية كما في الجدول (١) وبكميات غير محددة فمثلا في مغطات البذور Angiosperm كعائلات ذوات الفلقتين مثل ألـ Solanaceae وألـ Rubiaceae و ألـ Papaveraceae بينما ينعدم انتاج المركبات القلويدية في نباتات ذوات الفلقة الواحدة (Monocotolydone) ، أما نباتات معراة البذور (gymnosperm) فنادرا ما تحتوي على القلويدات (Tyler وجماعته، ١٩٨٨). وتتخصص بعض العوائل النباتية بإنتاج المركبات القلويدية بشكل رئيسي ومنها قلويد الهيوسيامين في العائلة الباذنجانية إذ أكد الباحثان Celine و Michele (٢٠٠٥) بأن العائلة الباذنجانية تنتج ما يقارب (٠.٥ – ٠.٨) غرام لكل ١٠٠ غرام وزن جاف من قلويد الهيوسين في حين تختص العائلة الدفلية بإنتاج قلويد Vincristin (ساعور وجماعته، ٢٠٠٠). إن معظم المركبات القلويدية في حالتها النقية تكون متبلورة صلبة لها درجة تميع والقليل منها على شكل سوائل أو مواد لزجة أو زيتية مثل النيكوتين الذي يكون عديمة اللون والرائحة , وبعضها ملون مثل الكولجسين (أصفر) لا تذوب في الماء إلا انها تذوب في المذيبات العضوية مثل الكحول والكلورفورم والايثر (الراوي و جاكرافارتي ، ١٩٨٨) .

٢-٤: النسبة المئوية للقلويدات في جذور وأوراق وبذور نباتات الداتورة بنوعيه:

٢ –٤ – ١ : *D. metel* :

وجد من خلال الدراسات بأن كل جزء من أجزاء النبات تحتوي على قلويدات الهيوسيامين والهيوسين التي تمثل القلويدات الرئيسة في النبات وتتراوح النسبة المئوية لهذه القلويدات في الأوراق والبذور بين (٠.٢٠ – ٠.٥٠) % كوزن جاف، أما في الجذور فتشكل (٠.٢٠ – ٠.١٠)% كوزن جاف وتنخفض هذه النسبة في ثمار النبات وتصل الى ٠.١٢ % كوزن جاف (العبدلي ، ١٩٧٥) . وأشار قطب (١٩٧٩) الى أن نسبة تلك القلويدات في أوراق نبات ألـ *D. metel* تقل مع تقدم عمر النبات وخصوصاً في مرحلة الاثمار .

٢-٤-٢ : *D.innoxia*

تبلغ النسبة المئوية للقلويدات في أوراق النبات بين (٠.٣٣ – ٠.٣٩) % كوزن جاف ، وفي الجذور تبلغ (٠.٢١ – ٠.٤٦) % كوزن جاف في حين تحتوي أزهار النبات على نسبة عالية من القلويدات تبلغ (٠.٧٦ – ٠.٨٩) % كوزن جاف ، وفي البذور تبلغ ٠.٨٣ % بينما تنخفض هذه النسبة في سيقان النبات وتصل الى ٠.٢٤ % كوزن جاف (العبدلي ، ١٩٧٥) .

جدول (١) المركبات القلويدية الرئيسة في النباتات الطبية وعوائلها حسب ما ذكره Tyler وجماعته (١٩٨٨)

	Family	Plant	Type of Alkaloids	Prinsple of Alkaloids
١	Palmae Lobeliaceae	*Nicotiana Species* , *Areca Species* , *Lobelia Inflata*	Pyridine , Piperidine Alkaloids	Nicotine , Lobelia , Lobeline , Areca
٢	Solanaceae	*D. species* *Atropa Belladona* *Buboisia* *Myoporoides* *Erythroxylum* *Coca*	Tropane Alkaloid	Hyoscyamine (A tropine) Hyoseyine , Belladouna Cocaine , Buboisia
٣	Rubiaceae	*Cinchona Succirubra* *Cinchona Ledgeriana* *Cephaelis* *ipecacuonha* *Opium Poppy*	Quinoline Alkaloid Isoquinoline Alkaloid	Cinchona (quinine , quinidine , cinchonine , cinchonidine) Opium (Morphine, Codeine , Thebaine)
٤	Papaveraceae	*Papaver Somniferum*	Ioecae ipecac	
٥	Aopcynaceae	*Rauvolfia Serpentina L.* *Catharanthus Roseues*	Indole Alkaloid Vincrstine	Strychine , Brucine ,Ergot

٦	Loganiaceae	*Strychnos Nux – vomica L.* *Physostigma Venenosum*	Physostigma	Nux – vomica Pilocarpine , Pilosine ,
٧	Rutaceae	*Pilocarpus Jaborandl*	Imidazole Alkaloid	Pilocarpine , Isopilocarpine Pilosine
٨	Liliaceae	*Veratrum Virrde* *Veratrum Album*	Steroidal Alkaloid	Veratrum , (Alkamines , Veratrosine ,Veratraming Hellebore
٩	Gnetaceae	*Ephedra sinica* *Colchicum Autumnale L.*	Alkaloidal Amines	Ephedrine ,colchicine , Peyote
١٠	Sterculiaceae	*Cola nitida*	Purine Bases	Cola , Kola

٢ -٥ : التمثيل الحيوي لقلويدات الهيوسيامين والهيوسين :

تخلق القلويدات في الجذر في منطقة خلف القلنسوة ثم تنتقل إلى الأجزاء الهوائية عبر الخشب (Xylem) (Waller و Nowaohi ، ١٩٧٨) وتمتلك الشعيرات الجذرية في نباتات العائلة الباذنجانية قدرة كبيرة على تجميع تلك القلويدات (Oksmanو Arroo ، ٢٠٠٠), وتتركز القلويدات بشكل أساسي في الفجوات (Vacuoles) والسايتوبلازم ولنواة الخلية دور أساسي في أيضها (, ١٩٧٤ Simola). وتوجد القلويدات عادة في حويصلة الخلية على شكل أملاح عضوية قابلة للذوبان في الماء تابعة للأحماض Tannic acid ، Oxalic acid ، Citric acid (Haghes , ١٩٧٣) وعند انتقال هذه الأملاح الى الأجزاء الهوائية تحدث لها عمليات أيضية مختلفة لتكون قلويدات الهيوسيامين والهيوسين (Kitamura وجماعته ، ١٩٩٣ و Dale ,١٩٩٦) ويبين المخطط في الشكل (٥) المسار الأيضي المفترض للهيوسيامين والهيوسين (Satoوجماعته، ١٩٩٩). إن التخليق الحيوي لهذه المركبات تشتق من مركب ألـ Diamine Putrescine الذي ينتج بدوره من عملية ألـ Decarboxylation لمركب ألـ Ornithine باشتراك انزيم Ornithine Decarboxylase (ODC) أو بصورة غير مباشرة من عملية ألـ Decarboxylation للـ Arginine باشتراك الانزيم Arginine Decarboxylase (ADC) (Alka وجماعته، ٢٠٠٤). ومن الجدير بالذكر بأن مركبات ألـ Polyamines و ألـ Diamine كألـ Putrescine لها دور تنظيمي في عمليات النمو وانقسام الخلايا وأيض الأحماض النووية وتساهم في تأخير الشيخوخة (Senesence) في أنسجة النبات وخصوصاً المعرضة للإجهاد الملحي والحراري (Altman و Uriel ، ١٩٨١). ويحدث لمركب ألـ Putrescine عملية *N*–Methylation تحولة الى Methyl *N*- Putrescine باشتراك الانزيم PMT ، وتعد هذه العملية الخطوة الاولى في تخليق تلك القلويدات, ثم يتأكسد مركب ألـ *N* - Methyl Putrescine ألى Methyl- ^- Pyrrolinium

Cation، باشتراك انزيم Diamine Oxidase ثم يتأيض الى مركب ألـ Tropinone الذي يختزل بواسطة انزيم Tropinone Reductase (TR.١) الى مركب ألـ Tropine الذي يتكثف مع مركب ألـ Phenyllatic Acid لينتج الهيوسيامين والذي منه يتكون الهيوسين باشتراك الانزيم H٦H .

وتمكن Palazon وجماعته(٢٠٠٣) في الحصول على انتاجية عالية من ألـ Hyoscine (٢.٥g / ١٠٠ g) كوزن جاف عن طريق ادخال الجين *h٦h* في خلايا نبات Duboisia , والذي أدى الى تعزيز تحول ألـ Hyoscyamine الى Hyoscine . وأشار Celine و Michele (٢٠٠٥) بأن استنسال الجينات المشفرة لانزيمات التخليق الحيوي للقلويدات لا تؤدي دائما الى زيادة ألـ Hyoscine في الشعيرات الجذرية لنبات *D. innoxia* وإنما يؤدي الى ظهور العديد من الصفات المورفولوجية وصفات متعلقة بالنمو وانتاج القلويدات, في حين الباحث Rothe وجماعته (٢٠٠٣) بأن ادخال الجين *pmt* في الشعيرات الجذرية لنبات *Atropa Belladonna* لا يؤدي الى تعزيز انتاج قلويدات الهيوسيامين والهيوسين فيها .

٢ - ٦ : انزيمات التمثيل الحيوي لقلويدات الهيوسيامين والهيوسين :

إن التمثيل الحيوي لهذه القلويدات يتطلب اشتراك مجموعة من الانزيمات الخاصة بالتمثيل الحيوي لمركبات الأيض الأولية ويعد الانزيم PMT هو المسؤول عن تخليق قلويدات الهيوسيامين والهيوسين الذي يحفز خطوة التحول الأولى في التمثيل الحيوي ويحول ألـ Putrescine الى *N*-Methylputrescine (Moyano وجماعته، ٢٠٠٣). ويوجد هذا الانزيم بمستويات عالية في الشعيرات الجذرية لنباتات الداتورة أكثر من الانزيمات الأخرى مثل ADC و ODC ويكون الإنزيم PMT شديد الحساسية للظروف المحيطة (Pinol وجماعته، ١٩٩٩). وأكد العديد من الباحثين بأن الجذور المزروعة خارج الجسم الحي تبقى محتفظة بالانزيمين ADC و ODC في حالتها الفعالة ومحتفظة بقدرتها على انتاج ألـ Putrescine ، ولكن استخدام ألـ Putrescine في عملية التخليق الحيوي للقلويدات الأساسية فيها تكون ضعيفة (Caroll وجماعته، ١٩٩٤ و Ophelic وجماعته،٢٠٠٤) .

وتشترك في عملية التخليق الحيوي لقلويدات الهيوسيامين والهيوسين مجموعة من الجينات أهمها الجين المشفر لانزيم H٦H المهم في عملية التحول الحيوي (Biotransformation) للهيوسيامين الى ألـ Hyoscine في خطوتين من التفاعل (Hashimoto جماعته١٩٩٣ و Jouhikainen وجماعته، ١٩٩٩) .

وقام Moyano وجماعته (٢٠٠٣) بعزل الجين المشفر للانزيم PMT من نبات التبغ *Nicotina tabacum* واستنساله في خلايا الشعيرات الجذرية لنبات ألـ *D.innoxia* فلاحظ انه يحفز إنتاج هذه القلويدات. في حين وجد Lei وجماعته (٢٠٠٤) بأن الانزيم الفعال في التمثيل الحيوي للهيوسين هو انزيم H٦H في الشعيرات الجذرية لنبات ألـ *Hyoscyamus*

niger وان وظيفة انزيم PMT هي زيادة قدرة التمثيل النسبي لقلويدات الهيوسيامين والهيوسين. كما بين الباحث Rothe (١٩٨٧) بان تخليق القلويدات في الجذور النامية في الزجاج (*In vitro*) يزداد مع زيادة التعبير الجيني (Gene Experssion) للـ *pmt* ويصبح الانتاج مفرطا عند زيادة عدد نسخ هذا الجين في خلايا الجذور وهذا بدوره يؤدي الى زيادة كمية انزيم PMT الفعال وزيادة مستويات *N*-Methyl Putrescine . كذلك وجد الباحث Suzuki وجماعته(١٩٩٩) بأن الجذور النامية في الزجاج تظهر ضعف مستويات انزيم ألـPMT المنتج مقارنة بجذور النبات الاصلي النامي في الظروف الطبيعية على الرغم من عدم وجود اختلاف في التعبير الجيني للـ *pmt*.

٢ - ٧ : المحاليل القياسية للقلويدات :

تستخدم سلفات التروبين Atropine Sulfate المصنعة تجاريا من قبل شركات الأدوية كمحلول قياسي لمركب الهيوسيامين الطبيعي الذي يخلق حيويا في بعض أجزاء نباتات العائلة الباذنجانية كنبات *A. belladonna* وألـ *D. Species* وغيرها . وكبريتات التروبين مسحوق بلوري أبيض وعند الاذابة يكون عديم اللون وعادة ما يكون ساما ويلصف(Fluoresces) في الهواء الرطب ، ويتأثر ببطء في الضوء أما كبريتات الهيوسين (Hyoscine Sulfate) المصنعة تجاريا فتعد محلولا قياسيا لمركب الهيوسين الطبيعي وهو مسحوق أبيض وعند الإذابة يكون محلولا عديم اللون وعديم الرائحة (Tyler وجماعته، ١٩٨٨).

٢ – ٨ : استخلاص القلويدات بالمذيبات العضوية :

ان تحديد المذيبات الفعالة له أهمية بالغة في عمليات الاستخلاص والتنقية للمركبات القلويدية (Jorgenson و Daniels ، ١٩٨٢), كما ان تحديد قابلية الذوبان بالمذيبات العضوية يعد خطوة مهمة في تحديد الطبيعة الكيميائية للمركب المراد استخلاصه . (Backet و Stenalke ، ١٩٧٥). ان الفكرة الأساسية من عملية استخلاص وتنقية القلويدات النباتات تتضمن عزل الحوامض والراتنجات والدهون والصبغات وغيرها من المكونات من المستخلص النباتي ، وبما ان القلويدات عبارة عن أملاح غير ذائبة في الماء وان عدم ذوبانها يعني وجودها بهيأة قاعدة حرة ، والاستخلاص هو تحرير هذه القواعد الحرة باستخدام بعض المذيبات العضوية كالكلوروفورم والإيثر وترسيب المكونات الأخرى كالأحماض العضوية والتانينات بواسطة قاعدة مناسبة وعادة تجري عملية استرجاع للمذيبات المستخدمة في الاستخلاص بواسطة التقطير وليس من الضروري أن تكون نقية جدا وإنما يسمح بوجود نسبة محددة من المواد التي جرى استخلاصها فيما إذا كان المذيب سيعاد استخدامه مرة أخرى لاستخلاص المواد نفسها (الغانمي ، ٢٠٠٠) . ويفضل أن تصاحب عملية الاستخلاص عمليات الرج والخلط ، أما خلال عملية فصل الأطوار فيفضل أن تكون بطيئة لإعطاء فرصة لزيادة الكمية المستخلصة ، ويجب أن تتوافر الصفات الآتية في المذيب لكي يكون مناسبا لعملية الاستخلاص :

- يجب أن يذيب المادة المراد استخلاصها بسهولة.

- يجب أن تكون ذائبية المذيب ضعيفة جدا في المذيب الحاوي على المادة المراد استخلاصها .
- أن لا يستخلص هذا المذيب الشوائب ، أو يستخلص كمية قليلة منها .
- أن لا يتفاعل كيميائيا مع المواد المراد استخلاصها.
- يمكن التخلص منه بسهولة بعد عملية الاستخلاص (Hart , ١٩٨٣) .

وذكر الغانمي (٢٠٠٥) ان عملية الاستخلاص بالمذيبات تعتمد على الفرق في قابلية الذوبان في مذيبات مختلفة فمثلا تستخلص المواد المحبة للدهون في مذيبات عضوية غير قابلة للامتزاج بالماء مثل البروبانول أو خلات البيوتيل ثم تعاد الى الطور المائي في العمليات اللاحقة. ويمكن استخلاص المواد من داخل الخلية النباتية مباشرة بواسطة المذيبات بعد تجميع الخلايا وتجفيفها ، وهذا يشكل نقطة اقتصادية مهمة إذ تستخدم فيها كميات قليلة من المذيبات مع سهولة استخلاص وتنقية المركبات الكيميائية من أنسجة الكالس لعدم وجود الصبغات في خلايا الكالس (Bajaj وجماعته، ١٩٨٨).

٢ - ٩ : كواشف الرش في تقنية كروموتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) :

تستخدم كواشف معينة متكونة من مزيج من المركبات للكشف عن المركبات القلويدية والمفصولة في تقنية كروموتوغرافيا الطبقة الرقيقة وتتفاعل هذه الكواشف التي ترش على صفائح هلام السليكا التي تمثل الطور الثابت مع القلويدات واظهار لون محدد معتمدا على نوع الكاشف (الربيعي, ١٩٩٩).

٢ – ١٠ : طرائق التحليل الكيميائي للقلويدات :

إن نسبة كبيرة من العقار في الطب الصيدلاني الحديث تعزل بشكل مباشر من أجزاء محددة من النبات أو تصنع بتحوير بعض المركبات الأساسية في العضو الأساسي للنبات ، وعند توفر هذه المركبات الفعالة بايلوجيا فإن طرائق التحليل الكيميائي لهذه المركبات تعد مهمة من الناحية الاقتصادية والطبية (Tolonenوجماعته، ٢٠٠٣) .

وتستخدم مجموعة من التقنيات التحليلية في هذا المجال ومنها :

٢ – ١٠ – ١ تقنية جهاز (HPLC) :

يعد استخدام جهاز كروموتوكرافيا السائل عالي الأداء واحدة من التقنيات المستخدمة في تقدير كمية ونوعية المركبات القلويدية في نباتات العائلة الباذنجانية نظرا لقابلية منظومة الجهاز على فصل مكونات المستخلص النباتي الخام ، أو مستخلص خلايا الكالس عند أطوال موجية محددة والتعرف عليها باستخدام نوع محدد من المحاليل التي تمثل الطور المتحرك (Mobile Phase) مع العمود (Column) المناسب الذي يمثل الطور الثابت (Stationary Phase) الذي يختلف باختلاف المركبات المراد التعرف عليها فقد تمكن Al–Hashimi وجماعته (١٩٩٩) من الكشف عن قلويدات الهيوسيامين والهيوسين في مستخلص أوراق نبات *D. stramonium* باستخدام تقنية HPLC

بواسطة عمود من نوع ODS – DB (٢٥ سم × ٠.٤ سم) ، وطور متحرك متكون من ٨٣ % KH_2PO_4 (٥٠ مليمول) و١٧ % من Acetonitrile وقيست العينة على طول موجي ٢١٦ نانوميتر, أما الخالدي (٢٠٠٤) فقد تمكن من تحديد كمية ونوعية قلويدات الهيوسيامين والهيوسين في مستخلص أوراق وجذور وبذور وسيقان نباتات *D. Stramonium* و *D. Innoxia* والكالس المستحدث من الأوراق باستخدام جهاز HPLC عند أطوال موجية ٢٧١ ، ٢٤٠ على التوالي وبواسطة عمود من نوعDB – ODS (٢٥ سم × ٠.٤ سم) وطور متحرك متكون من ٨٣ % KH_2PO_4 (٥٠ مليمول) و١٧ % من Acetonitrile .

٢ – ١٠ – ٢ جهاز المطياف الضوئي -UV:

استخدمت الطرائق اللونية بشكل واسع في تقدير المركبات القلويدية ويعد جهاز المطياف الضوئي واحدا من الأجهزة التي تستخدم في عملية الكشف والتقدير النوعي لمركبات الأيض الثانوي ومنها قلويدات الهيوسين والهيوسيامين في نباتات العائلة الباذنجانية وعلى أطوال موجية تراوحت بين ٢٠٠ – ٨٠٠ نانوميتر ويتم عن طريق المطياف الضوئي تحديد امتصاص الأطوال الموجية للمركبات القلويدية القياسية باستخدام محاليل قياسية لتلك المركبات ومقارنة الأطوال الموجية لتلك المركبات في المستخلصات الكحولية الخام مع قيم الأطوال الموجية للمحاليل القياسية لغرض التعرف على تلك المركبات واثبات تواجدها في المستخلصات الكحولية. وأشار Dale (١٩٧٩) الى امكانية الكشف عن قلويدات التروبين عند الأطوال الموجية (٢٥٢ ، ٢٦٤ ، ٢٨٥) نانوميتر والتي تطابق قراءات العينة القياسية , أما الملاح وأواب (٢٠٠١) فقد ذكر أن الأطوال الموجية الهيوسين والهيوسيامين في أوراق نبات *D. innoxia* بلغت (٢٩٠ ، ٣٠٣) نانوميتر على التوالي. وذكر Harbone (١٩٧٣)بأن الطول الموجي لامتصاص قلويدات التروبين بلغ ٢٥٨ نانوميتر أما الخالدي (٢٠٠٥) فقد أشار أن الطول الموجي لامتصاص قلويدات الهيوسين والهيوسيامين قد بلغت (٢٧٠ ، ٢٤٠) نانوميتر على التوالي.

٢ – ١٠ – ٣ : تقنية ألـ (TLC) :

تعد تقنية كروموتوغرافيا الطبقة الرقيقة احدى تقنيات الادمصاص الكروموتوغرافي للمواد باستخدام صفائح هلام السليكا (Slica gel) والمؤلفة من مادة قطبية (Polar Material) ذات مساحة سطحية خاصة التي تمثل الطور الثابت (Stationary Phase). أما الطور المتحرك (Mobile Phase) فيتكون من مجموعة مواد أو مذيبات غير قطبية (Non – Polar) واعتماداً على اختلاف الجزيئات في المستخلص أو المزيج المستخدم في عملية الترحيل تدمص الجزيئات على الطور الثابت وتنفصل عن مكونات المزيج لتعطي معدل مسافة جريان نسبي R_f (Relative Flow) الذي يختلف باختلاف المواد ، ويمكن قياسه وفق المعادلة الآتية :-

المسافة التي يقطعها المركب

الجريان النسبي R_f = ——————————

المسافة التي يقطعها المذيب

ثم مقارنة قيم R_f للبقع المفصولة مع قيم R_f للمحاليل القياسية (Kitamura وجماعته، ١٩٩٣)

٢ - ١١ : زراعة الأنسجة النباتية Plant Tissue Culture :

ان فكرة استخدام المنتجات الطبيعية للنباتات الطبية في المجال الطبي معروفة منذ القدم ويعرف الآن ما يزيد على ٢٠٠٠ نوع من المملكة النباتية بوصفها مصدرا للمنتجات الطبية ولها فعالية دوائية مؤكدة (ساعور وجماعته، ٢٠٠٠ و Narula وجماعته، ٢٠٠٤ و Celine و Michele ، ٢٠٠٥). ويذكر ان الصناعات الدوائية لا تعتمد دائما على المصادر النباتية الطبيعية كمصدر للعقار وذلك لعدة أسباب منها وفرتها المحدودة وعدم استقراريتها الوراثية وتقلب الإنتاجية بالإضافة إلى تدمير وخراب البيئة الطبيعية للنبات وصعوبة تطبيق التكنولوجيا في العمليات الزراعية (Pand و Srivastava، ١٩٩٨). وبهدف تحقيق الاستفادة من مركبات الأيض الثانوي تسعى المؤسسات العلمية البحثية ومختبرات صناعة الأدوية في العالم إلى استعمال التقنيات الحديثة ومنها زراعة الأنسجة النباتية في مجال تصنيع هذه المركبات وتحويلها الى أدوية علاجية (Verppote وجماعته، ١٩٩١). ولوحظ من خلال الدراسات ان بعض الانسجة النباتية المستحدثة من أجزاء مختلفة والمزروعة بشكل مستمر تنتج بعض المواد المهمة طبيا وعند عزل سلالات الخلايا المنتجة لهذه المواد وإكثارها أمكن الحصول على مركبات أيضية اقتصادية مهمة وتصنيعها طبياً (Hara وجماعته، ١٩٨٧وStockigt ,١٩٩٥).

ان تقنية زراعة أنسجة الكالس ومزارع المعلقات الخلوية (Cell Suspension Culture) تعد من التقنيات الحديثة المهمة التي أوجدت مصدرا جديدا للمنتجات الثانوية وأكثر كفاءة من الاعتماد على النبات مباشرة لاستخلاص المركبات المختلفة منها وان القليل من الدراسات التي تناولت أسلوب المقارنة بين المركبات الثانوية المنتجة من قبل النبات الأصل والأنسجة المستحدثة من أجزاء مختلفة والتي تشكل علاقة جيدة من أجل اختيار خطوط الخلايا ذات الانتاجية العالية (Zenk, ١٩٧٧). ولأجل تحقيق هذا الهدف توجهت الدراسات الحالية الى البحث عن العوامل المحفزة لنمو وإنتاجية الخلايا المزروعة من المركبات الثانوية الطبيعية كونها تقدم عدة أفضليات على النباتات النامية في الطبيعة ، ومنها :

- عزل المركبات الكيميائية من الخلايا والأنسجة المزروعة يكون أسرع وأسهل مقارنة باستخلاصها من النبات الاصل.
- العديد من المركبات الوسطية التي تتداخل مع المركبات المهمة صيدلانيا يمكن تجنبها من خلال الزراعة النسيجية .
- زراعة الانسجة النباتية تعد مصدرا مهما لإنتاج المركبات الأيضية بكميات كبيرة .
- زراعة الانسجة النباتية تعد أنموذجا رائعا لعملية استخلاص المركبات الثانوية منها.
- يمكن الانتاج بشكل مدور خلال السنة من دون أي تأثير للفصول وفي ظروف مسيطر عليها كإنتاج مادة Paclitaxel من نبات *Taxus brevifola* الذي يحدد بالطقس ومعدل

النمو للأشجار وينخفض إنتاج هذه المادة بنسبة ٤٠ - ١٠٠ kg/mg في حالة انخفاض معدل نمو النبات (Fumihiko, ٢٠٠٠).

٢ - ١١ – ١ : تأثير منظمات النمو النباتية في استحداث أنسجة الكالس وانتاج مركبات الأيض الثانوي

إن منظمات النمو النباتية عبارة عن مركبات كيميائية عضوية (غير المغذيات) تتكون طبيعيا أو تصنع مختبريا وبتراكيز واطئة جدا لها تأثيرات كبيرة في العمليات الحيوية للنمو وتكشف الاجزاء النباتية أو تثبيط أو تحوير احدى العمليات الفسيولوجية في النبات ومنها الاوكسينات (Auxines) والسايتوكانينات (Cytokininis) الجبريلينات(Gibbrellins) وحامض الأبسسك (Abscisc Acid) والاثلين (محمد ، ١٩٩٠). لقد وجد بأن لتركيز ونوعية منظمات النمو والنسبة بينهما في وسط النمو هو العامل المحدد الرئيسي لعملية استحداث أنسجة الكالس (Callus) من الأجزاء النباتية (Centenoوجماعته، ١٩٩٦) وعملية السيطرة على التمايز وتكشف الأعضاء من أنسجة الكالس ١٩٨٩ (Torres , و Evans , ١٩٨٩) . وعملية انتاج وتراكم مركبات الأيض الثانوي في الخلايا المزروعة (Nakazaw و Toda ، ١٩٩٥ و Tangوجماعته، ١٩٨٧) ومن خلال الدراسات العديدة التي أجراها الباحثون تأكد نجاح استحداث أنسجة الكالس من أجزاء مختلفة من نبات الداتورة في وسط MS الذي تأكد بأنه أفضل الأوساط الغذائية المعدة لهذا الغرض (Szoke وجماعته، ١٩٨٢ و يونس والملاح ، ٢٠٠١). ويذكر أن الكالس عبارة عن كتلة من الخلايا البرنكيمية غير المتمايزة غير المنتظمة تنشأ من الخلايا المولدة (المرستيمية) للجزء النباتي اعتمادا على عوامل تحفيز الكالس وهي الاوكسينات والسايتوكانينات (سلمان ، ١٩٨٨) . وتعد أوراق نبات الداتورة الأكثر استجابة لاستحداث أنسجة الكالس مقارنة بالجذور والسيقان والبتلات وغيرها (الملاح و أواب، ٢٠٠١).

وتسلك الخلايا المتعددة لأنسجة الكالس سلوكا مشابها لخلايا نبات الاصلفي عمليات النمو وانتاج المركبات الأيضية (Mary , ٢٠٠٥). وفي دراسة أجراها الملاح وأواب (٢٠٠١) لم تنجح عملية استحداث أنسجة الكالس من زراعة جذور نبات *D.innoxia* باستخدام ثلاثة أوساط غذائية وهي LS و B_5و MS بوجود منظمات النمو (2,4–D , BA , NAA , IAA) . بينما تمكن Nguyen وجماعته(١٩٨١) من استحداث أنسجة الكالس من زراعة أوراق وجذور نبات *D.innoxia* في وسط MS المجهز بـ2,4–D والكاينتين (Kintin) بتركيز ١ ملغم / لتر لكل منهما ، وبلغ الوزن الطري لأنسجة الكالس ٥.٧٩٠ غرام في الوسط الزرعي. وذكر الباحثان Dong و Geuny (١٩٨٨) امكانية الحصول على كالس من نبات *D. Stramonium* عند زراعة الأوراق والجذور والسيقان في وسط MS الحاوي على NAA (Naphthalene Acetic Acid) تركيز ٠.١ ملغم / لتر و Zeatin تركيز ٠.٨ ملغم / لتر , أما Natash وجماعته (١٩٩٣) فقد تمكنا من استحداث أنسجة الكالس من جذور نبات *D.innoxia* في وسط MS المجهز بـ NAA و الكاينتين والجبرلين تركيز ٠.٥ ملغم / لتر لكل منها. لقد أكد عدد من الباحثين بأن الأوكسينات المضافة الى الوسط الغذائي المعد لزراعة الخلايا النباتية تفقد تلك الخلايا قدرتها على تجميع القلويدات (Rhodes وآخرون، ١٩٨٩ وRobines وجماعته،١٩٩١). ولاحظ Ophelic وجماعته (٢٠٠٤) بأن

الخلايا غير المتمايزة المستحدثة من جذور نبات *D. stramonium* تفقد قدرتها على تخليق قلويدات الهيوسيامين والهيوسين .

وذكر Van-Den (١٩٨٤) بان الخلايا النباتية المزروعة الزجاج *In-Vitro* تتغاير في الصفات الكمية والنوعية لمركبات الأيض الثانوي وان إنتاجها يتعلق بعملية تمايز الأنسجة والأعضاء وهذا التغاير يعزى الى الخصائص الوراثية, وهذا ما أكده Wewetzer (١٩٩٨) بأن خلايا نبات *Digitalis lanata* المزروعة في الزجاج غير قادرة على إنتاج مركبات الكلايكوسايدات (Glycosides) عندما لا يكون هناك تمايز مظهري وعند إعادة تمايز هذه الخلايا تعاد عملية تخليق هذه المواد. وفسر عدد من الباحثين ذلك الانخفاض من خلال عدم قدرة الخلايا غير المتمايزة على إدخال مركبات الأيض الأولية (Primary Metabolites) في عملية تخليق المركبات القلويدية وحدوث بعض الظواهر الفسيولوجية ومنها كبح نشاط الإنزيمات التي تشترك في هذه العملية ، وان هذه الإنزيمات تفقد من المزارع بعد اعادة زراعة الخلايا (Subculture) على أوساط غذائية حاوية على الاوكسينات (Robins وجماعته،١٩٩١ و Ford وجماعته، ١٩٩٦ و Ophelic وجماعته، ٢٠٠٤). لقد أكد Rhodes وجماعته(١٩٨٩) أن اعادة تمايز (Redifferentition) الخلايا المستحدثة من جذور نبات *D.stramonium* يعيد قدرتها على تخليق قلويدات الهيوسيامين والهيوسين . وأكد الباحثان(Natash وجماعته، ١٩٩٣) من خلال الدراسات بأن كمية تلك القلويدات تبدأ بالانخفاض مع ازدياد تركيز الاوكسينات في وسط نمو خلايا نبات *D.innoxia*, بينما أكد العديد من الباحثين من خلال دراسات أخرى على نباتات طبية مختلفة أن زيادة تركيز الاوكسينات في وسط نمو الخلايا يحفز انتاج مركبات الأيض الثانوي ويزيد من تخليقها (ساعور ،٢٠٠٠ والملاح ، ٢٠٠١). وتوصل Al – Hattab وجماعته(٢٠٠٠) الى أن وجود ألـ D–٢,٤ مع الكاينتين في وسط النمو يزيد من انتاج قلويدات الهيوسيامين والهيوسين في الكالس المستحدث من أوراق نبات ألـ *D.metel* النامي في وسط (M S) لمدة ثلاثة أشهر. ولقد أظهر الباحثان Carew و Krueger (١٩٧٧) أن زيادة تركيز ألـ D–٢,٤ في الوسط الغذائي لنبات عين البزون *Catharanthus roseus* أدت الى زيادة إنتاج القلويدات الاندولية (Indole Alkaloids) مع بطء عملية نمو الخلايا في حين ان انخفاض تركيز ألـ D–٢,٤ سبب زيادة ملحوظة في نمو الخلايا وقلة انتاج المركبات القلويدية في الخلايا المزروعة. اما السايتوكاينينات فإنها تؤثر بصورة فعالة في انتاج وتراكم المركبات الثانوية ومنها المركبات القلويدية من خلال دورها في تجميع المغذيات وزيادة العمليات البنائية داخل الخلية (مور ، ١٩٨٢) فقد اتضح بأن وجود البنزل ادنين BA وألـ Zeatine في وسط النمو لنباتات عين البزون والداتورة يزيد من عملية انتاج وتراكم المركبات القلويدية (ساعور ، ٢٠٠٠ و الخالدي ، ٢٠٠٥), إذ لاحظ الخالدي (٢٠٠٥) بأن وجود السايتوكاينينات وخصوصا البنزيل ادنين BA تركيز ٠.٥ ملغم / لتر في وسط نمو كالس نبات ألـ *D.stramonium* وألـ*D.Innoxia* سبب زيادة في انتاج قلويدات الهيوسيامين والهيوسين مقارنة بكميتها في النبات الأم. بينما بين Eva (١٩٨٢) ان وجود الكاينتين في وسط نمو الكالس المستحدث من اوراق *D.innoxia* ليس له تأثير في معدل نمو انسجة الكالس وثبط انتاج القلويدات فيها. وتوصل Natash وجماعته(١٩٩٣) بأن زراعة جذور ألـ *D.innoxia* في وسط (MS) غير الحاوي على منظمات النمو يؤدي الى قلة محتوى قلويدات الهيوسيامين والهيوسين فيها وان الجذور المزروعة في وسط (MS) المجهز بـ IBA (Indole Putyric acid) بتركيز ٠.٥ ملغم / لتر قد احتوت على

القلويدات بتركيز ثمانية اضعاف أكثر من محتواها في وسط (MS) الخالي من منظمات النمو. كذلك وجد نفس الباحثين بأن الجبرلين (GA_3) مع الاوكسين (IAA) Indol acetic acid (اندول اسيتك اسد) في وسط نمو الجذور ثبط انتاج قلويدات الهيوسيامين والهيوسين وان كميتها تكون أكثر في الوسط الغذائي المجهز بتركيز أقل من الاوكسينات أي انه كلما انخفض تركيز الاوكسين في وسط النمو يزداد إنتاج وتجميع المركبات القلويدية في الجذور المزروعة .

تختلف النباتات الاصلوخلاياها المستحثة منها في استجابتها للظروف البيئية المحيطة مثل درجة الحرارة والرطوبة والفترة الضوئية التي يتعرض لها ، وينعكس هذا الاختلاف في التأثير على نمو الخلايا وتحفيزها على إنتاج المركبات الفعالة وتراكمها (Bajaj و Simola ، ١٩٩١). فقد وجد Missaleva وجماعته(١٩٩٣) بأن زراعة أجزاء من جذور *D. Innoxia* في وسط (MS) المحتوي على ٠.٥ ملغم / لترمن IBA أعطى تركيز ٠.٠٦٢ ملغم / غرام وزن جاف من قلويد الهايوسيامين و ٠.٠٨٣ ملغم / غرام وزن جاف من قلويد الهيوسين .

٢ - ١١ – ٢ : تأثير الدرجات الحرارية المنخفضة في انتاج مركبات الأيض الثانوي : تنمو الخلايا النباتية المزروعة في الزجاج في مدى حراري ما بين ١±٢٧ و ١±٢٥ مْ وأي تغيير في هذا المدى يؤثر كثيرا في العمليات الكيميائية والبايوكيميائية التي تحدث في الخلية ومنها تخليق وتجميع المركبات الثانوية في الخلايا المزروعة (Zenk وجماعته، ١٩٧٧ و Nobel ، ١٩٨٨). ومن الجدير بالذكر تستخدم الدرجات الحرارية المنخفضة (٤ , ٥ , ١٠)ْم في حفظ الأنسجة والخلايا النباتية وحفظ بروتوبلازم الخلايا germplasm لفترة زمنية طويلة (Hassan ، ٢٠٠٤). ويواجه النبات أو جزء منه مشاكل عديدة عند تعرضه لدرجات حرارية منخفضة ومنها حدوث تغيرات منفردة للخلايا كتغيير أو تبدل في ألـ Fluidity للأنظمة الغشائية ومنها غشاء الخلية عن طريق تبدل ألـ Lipid bilayer من حالته a liquid – crystalline إلى gel-crystalline وازدياد مستوى حامض الأبسسك (ABA) في الخلايا غير المتأقلمة للبرودة Nonacclimated (Mohapatra وجماعته، ١٩٨٨) واستنساخ بعض الجينات المشفرة للانزيمات المستحثة بالبرودة والخاصة بتخليق البروتينات مثل إنزيمات ألـ Phosphatase وألـ Protein Kinase عند ارتفاع محتوى ألـ (ABA) في الخلايا المعرضة للبرودة (Holappa و Walker ، ١٩٩٥). وذكر Kavi-kishor وجماعته(١٩٩٥) ارتفاع محتوى الخلايا والأنسجة المعرضة للبرودة من الحامض الأميني البرولين والذي يؤدي دوراً تنظيمياً في عملية تحمل الازموزية. وأشار Hanson و Buenet (١٩٩٤) إلى زيادة بعض مكونات الخلية كاستجابة لانخفاض الدرجات الحرارية ومنها ألـ Polyamine وبعض المركبات الرباعية الأمونيوم (Quaternary Ammonium Compounds). أما Ohta (١٩٧٨) فقد وجد نقصان تخليق ألـ Caffeine من قبل خلايا نبات التبغ *Nicotiana Tobacum* عند تعرضها لدرجة حرارية أقل من ٢٦ْم .

وأكد العديد من الباحثين ان تغير درجات الحرارة أثناء تحضين الخلايا المزروعة له تأثير كبير في تخليق مركبات الأيض الثانوي من قبل الخلايا المزروعة (Nettleship وSlaytor ، ١٩٧٤ و Yamada وجماعته، ١٩٨٠ و Dougall وآخرون، ١٩٨٣). إن

انخفاض درجة الحرارة يزيد من تدفق كمية الكالسيوم في الخلايا المعرضة للبرودة الذي يعمل كمراسل ثان (Secondary Messenger) والذي ينظم العديد من العمليات الأيضية للخلايا (Poovaiah و Redday،١٩٩٣). وأشار Hassane (٢٠٠٤) إلى ارتفاع محتوى الكلوروفيل في القمم النامية لنبات الموز (Panana) المعرض لدرجة حرارية قدرها ١٠ ْم.

٢ - ١١ – ٣ : تأثير الضوء في انتاج مركبات الأيض الثانوي :

للضوء دور مهم في عملية تخليق مركبات الايض الثانوي و اشار Hiraoka و Tabata (١٩٧٤) بأن نمو أنسجة الكالس المستحدث من أوراق نبات ألـ *D.innoxia* ومحتواها من المركبات القلويدية كان أفضل بظروف الإضاءة مقارنة بالظلام. وان الكالس المستحدث من المبيض والبتلات لنفس النبات في ظروف الظلام ويكون متشابها مورفولوجيا ويكون أقل صلابة من الكالس المستحدث من الأجزاء النباتية ذاتها في ظروف الضوء, وهذا ما أكده Eva (١٩٨٢) بأن المحتوى الكلي من قلويدات الهيوسيامين والهيوسين في أنسجة الكالس المستحدث من جذور وأوراق نبات *D.innoxia* تزداد مرتين أكثر في الآنسجة النامية في الضوء مقارنة بالظلام. في حين ذكر Nguyen وجماعته(١٩٨١) ان أنسجة الكالس المستحدث من جذور نبات ألـ *D.innoxia* تكون حساسة جدا للضوء لكن Kiet's (١٩٧٨) ذكر بأن الكالس المستحدث من جذور نبات ألـ *D.innoxia* يكون غنيا بالقلويدات في ظروف الظلام مقارنة بظروف الإضاءة . بينما ذكر Nguyen (١٩٨١) أن نمو الكالس المستحدث من أوراق وجذور نبات ألـ *D.innoxia* كان متساويا في ظروف الظلام والضوء ويكون الكالس المستحدث في ظروف الظلام أكثر كثافة منه في ظروف الضوء .

٢ - ١١ – ٤ : تأثير الملوحة في انتاج مركبات الأيض الثانوي :

تعد الملوحة (Salinity) احدى المشاكل الرئيسة التي يواجهها الانتاج النباتي ومنها النباتات الطبية في العديد من المناطق الاروائية في العالم سيما المناطق الجافة وشبه الجافة(Hasegawa و Bressan ، ٢٠٠٠ و Orcutt وNilesn ، ٢٠٠٠). ويعد كلوريد الصوديوم NaCl من أكثر الاملاح شيوعا في الترب الملحية العراقية (الحسيني ، ١٩٨٤) .

واستخدمت تجارب الملوحة بشكل واسع في مجال تربية وتحسين النباتات وفهم التأثيرات الفسلجية للشد الملحي إذ أشار العديد من الباحثين بإمكانية عزل مجتمعات من الخلايا النباتية وتنميتها على الأوساط الغذائية الملحية وإكسابها صفة التحمل (Tolerance) للملوحة ودراسة تأثير الأملاح في مختلف العمليات الأيضية داخل الخلايا النباتية (Lutts وجماعته، ١٩٩٦ و Emilio وجماعته، ١٩٩٦ و Basu وجماعته، ١٩٩٧). لقد درس عدد من الباحثين مجمل التغيرات التي تحدث تحت تأثير الملوحة في النباتات مثل التغيرات في النمو والمكونات الكيميائية كالكاربوهيدرات والبروتين والأحماض الأمينية الحرة والقلويدات وبعض العناصر الغذائية إذ تزداد هذه المكونات مع ازدياد الشد الملحي (Jeschke و Wolf ، ١٩٨٨ و Ali ، ١٩٩١ و الحاتمي ، ٢٠٠١). ووجد عدد من الباحثين ومنهم Imamul و

Lather ١٩٨٣) والحاتمي (٢٠٠١) وعبد الحسين (٢٠٠٤) ازدياد محتوى خلايا نباتات الفاصوليا *Phaseolus aureus* و الطماطة *Lycopersicon esculentum* و التفاح *MM ١٠٦* وعمارة *Omara* على التوالي من العناصر الغذائية Na^+ , Cl^- , K^+ , Ca^{++} ومحتواها من الكاربوهيدرات والحامض الأميني البرولين بازدياد مستويات أملاح ألـ NaCl في وسط نمو الخلايا المستحدثة من أجزاء مختلفة منها, أما بخصوص المركبات الثانوية فان فعاليتها تزداد عند انخفاض الجهد المائي Water Potential (اكثر سالبية) الناتج عن ازدياد الشد الملحي (Salt Stress) الذي يؤدي بدوره الى زيادة تركيز مركبات الأيض الثانوي في الخلايا والانسجة المزروعة في أوساط غذائية ملحية (Einhelling ، ١٩٨٧ و Choesin و Boerner ، ١٩٩١).

ووجد Ahmed و Ali (١٩٩٠) ارتفاع المحتوى الكلي من قلويدات التروبين في ثمار نبات ألـ *D.stramonium* و *Hyoscyamus muticus* بازدياد مستويات الملوحة في محيط الجذور, في حين توصل Ali (١٩٩١) الى أن المحتوى الكلي من البرولين Proline والبروتينات في ثمار ألـ *D. stramonium* المعرضة للشد الملحي قد انخفض مع ازدياد مستويات الملوحة في محيط الجذور مع ارتفاع محتوى الثمار من الاحماض الامينية الحرة في أوساط غذائية تحت ظروف شد ملحي قدره ١٥٣.٨ مايكرومولار NaCl يزيد من كمية القلويدات في الأوراق الفتية (Brachet و Cosson ، ١٩٨٦). أما بخصوص تأثير الشد الملحي الناتج عن وجود الأملاح في وسط نمو خلايا نباتات الداتورة فإن الدراسات المتوفرة حالياً حول هذا الموضوع قليلة جداً إن لم تكن معدومة وأكد العديد من الباحثين ارتفاع محتوى الخلايا والأنسجة المعرضة للإجهاد الملحي والحراري من مركبات ألـ Polyamines والبرولين وبعض الأحماض الأمينية مثل ألـ Orinthine وألـ Argnine وألـ Putrescine و ألـ Homoserine كاستجابة لهذه الظروف (Lefever وجماعته، ٢٠٠١ و Casper وجماعته، ٢٠٠٢ و Capell ، ٢٠٠٤) .

وأشار Sarkadi - Simon وجماعته (٢٠٠٢) إلى ارتفاع محتوى الأنسجة المعرضة إلى الإجهاد الملحي لنباتات *Tritcum monococcum* و *T.aestivum* من الحامض الأميني البرولين و ألـ glutamic acid وألـ Aspartic acid وألـ Orinthine وألـ Argnine بمعدل (٦ , ١٣٠ , ١٣٠ , ٢٧ , ٢٠) مرة تقريباً ضعف كميتها في نباتات المقارنة. وذكر الباحثان Polle (١٩٩٧) و Aziz وجماعته(١٩٩٩) بأن الحامض الأميني البرولين يعد مصدر للنتروجين ويعمل ككاسح (Scavenger) للجذور الحرة ومنها Hydroxyl radical ويجنب الخلية الضرر الناجم عن ازدياد الشد الملحي والحراري وهذا يفسر انخفاض محتوى البرولين في الأنسجة المعرضة للشد الملحي والحراري وارتفاع تركيز مركبات ألـ Polyamine كاستجابة لهذه الظروف. وذكر عدد من الباحثين ومنهم Drolet وجماعته (١٩٨٦) و Bar وجماعته (١٩٩٦) بأن مركبات ألـ Polyamine تعمل كمواد لتأخير الشيخوخة تحت هذه الظروف. ولاحظ Casper وجماعته(٢٠٠٢) ارتفاع محتوى مركبات ألـ Polyamine وكذلك ألـ Putrescine كاستجابة لظروف الشد الملحي في أنسجة نبات الحنطة *T.aestivum* النامي في وسط MS المجهز بأملاح NaCl تركيز ٠.١ مول / لتر وبالتالي تحولها الى قلويدات الهيوسيامين والهيوسين.

٣ . المواد وطرائق العمل :

٣ - ١ : المواد والأجهزة :

٣ - ١ – ١ : المواد الكيميائية :

كانت جميع المواد الكيميائية والكواشف المستخدمة في هذه الدراسة من النوع المختبري كما استخدم الماء المقطر في جميع مراحل وخطوات العمل ، واستخدمت المواد الكيميائية المبينة في أدناه :

الشركة المصنعة	التسمية العلمية	المواد الكيميائية
BDH-England	Ethanol	ايثانول
BDH-England	Chloroform	كلوروفورم
BDH-England	Sulphuric acid	حامض الكبريتيك المركز
BDH-England	Hydrochloric acid	حامض الهيدروكلوريك
Fluka Switzerland	Anhydrous Sodium Phosphate	كبريتات الصوديوم اللامائية
Difco	Lead Acetate	خلات الرصاص
BDH-England	Ammonia Hydroxide	محلول الأمونيا
BDH-England	Potassium Nitrate	نترات البوتاسيوم
Mall	Ammonium Nitrate	نترات الامونيوم
BDH-England	Hydrous Mangnesium Sulphate	كبريتات المغنسيوم المائية
Fluka	Hydrous Calcium Chloride	كلوريد الكالسيوم المائي
Fluka	Dihydrogen Potassium Phosphate	فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين
BDH-England	Hydrous Manganous Sulphate	كبريتات المنغنيز المائية
BDH-England	Ortho Phosphoric acid	اورثو حامض الفسفوريك
Tetanal	Potassium Iodid	ايوديد البوتاسيوم
Merck	Boric Acid	حامض البوريك
BDH-England	Hydrous Zink Sulphate	كبريتات الزنك المائية
BDH-England	Hydrous Cupric Sulphate	كبريتات النحاس المائية
BDH-England	Hydrous Sodium Molybdate	مولبدات الصوديوم المائية
Fluka	Cobalt Chloride	كلوريد الكوبلت المائي
Fluka	Hydrous Ferric Sulphate	كبريتات الحديدوز المائية
Fluka	Nicotinic Acid	حامض النيكوتين
Sigma	Thiamine - HCL	ثيامين حامض الهيدروكلوريك
Sigma	Pyridoxine - HCL	بايريدوكسين حامض الهيدروكلوريك
BDH-England	Myo- Inositol	مايو - اينوسيتول
BDH-England	Sucrose	سكروز
Seelze	Agar – Agar	آكار
Fluka	Sodium Chloride	كلوريد الصوديوم
BDH-England	Bizmuth Nitrate	نترات البزموث

BDH-England	Tween ٢٠	توين ٢٠
Renaudin France	Hyoseine Standard	هيوسين قياسي
Renaudin France	Atropine Standard	اتروبين قياسي
Sigma	Benzyl Adenine	بنزيل أدنين(منظم غو)
Sigma	٢-٤ Dichlorophenoxy Acetic acid(٢,٤ D)	٢-٤ ثنائي كلوروفينوكسي حامض الخليك(منظم غو)
Sigma	Naphthalene Acetic acid NAA	نفثالين حامض الخليك (منظم غو)
Fluka	Ether	ايثر
Fluka	Methyl - blue	صبغة الميثيل الأزرق
Sigma	Acetone	أسيتون
Sigma	Gibbrilic acid	الجبرلين(منظم غو)
BDH- England	Sodium Hydroxide	هيدروكسيد الصوديوم
E- Merck Dr.	Silica Gel plat	صفائح هلام السليكا
Sigma	Acetonitril	اسيتونايترايل
BDH- England	Mercury Chloride	كلوريد الزئبقيك

٣ - ١ – ٢ : الأجهزة المستخدمة ومصدرها :

الشركة المجهزة	اسم الجهاز	
	بالإنكليزية	بالعربية
Metler , Switzerland	Sensitive Balance	ميزان حساس
Pye – Unicam	PH-Meter	مقياس الاس الهيدروجيني
Hirayama	Incubator	حاضنة
Millipore	Vaccum Pump	مضخة تفريغ
Sorval	Centrifugc	جهاز طرد مركزي
M.D.H	Laminar Air Flow	هود بايلوجي

موصدة	Autoclave	Hirayama
فرن كهربائي	Oven	Hirayama
مطياف ضوئي	Uv-Spectrophotometer	Shimadzu Uv- ١٦٠
جهاز السائل عالي الاداء	H P L C	Shimadzu
جهاز تعقيم هوائي	Hote Plate Stirrer	Hirayama
مقياس التوصيل الكهربائي	Ec. Meter	India
جهاز الاستخلاص	Soxhelet	Julabo - Germany
مطحنة كهربائية	Mill	Electa
جهاز تقطير الماء	Distillator	Controls
خلاط	Vortex	M.D.H
مقياس درجة الانصهار	Electrothermal Melting Point	England

٣ - ١ – ٣ : تحضير المحاليـــــل :

- **محلول حامض الكبريتيك ٢ % (V/V) :**

حضر باضافة ٢ سم^{٣} من حامض الكبريتيك المركز الى٩٨ سم^{٣} من الماء المقطر.

- **محلول هيدروكسيد الامونيوم ١٠ % (V/V):**

حضر باضافة ١٠ سم^{٣} من محلول الأمونيا الى ٩٠ سم^{٣} من الماء المقطر ، وحفظ في قنينة زجاجية محكمة الغلق .

- **محلول هيدروكسيد الأمونيوم ٢٥ % (V/V):**

حضر باضافة ٢٥ سم^{٣} من محلول الأمونيا الى ٧٥ سم^{٣} من الماء المقطر ، وحفظ في قنينة زجاجية محكمة الغلق.

- **محلول** الايثانول ٨٠ % **(V/V):**

حضر باضافة ٨٠ سم^{٣} من الايثانول المطلق الى٢٠ سم^{٣} من الماء المقطر ، وحفظ في قنينة زجاجية محكمة الغلق .

- **محلول حامض** الهيدروكلوريك ٥ %(**V/V**)

حضر باضافة ٥ سم^{٣} من حامض الهيدروكلوريك Hcl الى ٩٥ سم^{٣} من الماء المقطر ، واستخدم في عملية الاستخلاص .

- **محلول كلوريد الصوديوم (W/V) :**

أخذ وزن ٣ غرام من ملح كلوريد الصوديوم النقي ، وأذيب في ٥٠ سم^{٣} من الماء المقطر ، وحفظ في قنينة زجاجية (Buringh , ١٩٨٢) .

- **محلول الجبرلين تركيز ٥٠٠ *PPM*** ($GA_{٣}$) :

حضر باذابة ٥٠ ملغ من مادة الجبرلين النقي في ١٠٠ سم^{٣} من الماء المقطر، وحفظ في قنينة زجاجية محكمة الغلق .

- **محاليل منظمات النمو النباتية :**

حضر محلول أساسي لجميع منظمات النمو النباتية بإذابة ١٠ ملغم من ألـ ٢,٤-D وأذيب في ٣ سم^{٣} من الكحول الأثيلي المطلق لضمان الإذابة الكاملة وأكمل الحجم الى ١٠٠ سم^{٣} ليصبح لدينا محلولا أساسيا تركيزه ٠.١ ملغم/مل . أما (BA) البنزيل أدنين فقد أذيب ١٠ ملغم في ٣ سم^{٣} من حامض الهيدروكلوريك وأكمل الحجم الى ١٠٠ سم^{٣} لنحصل على تركيز ٠.١ ملغمة / سم^{٣} في المحلول الأساسي ، وعندما يراد تحضير وسط غذائي تركيز ٢,٤-D أو ألـ (BA) بتركيز ١ ملغم / لتر نسحب من المحلول الأساسي لكل منهما ١٠ سم^{٣} وتضاف الى الوسط الغذائي ثم يكمل الحجم الى ١ لتر .

محلول الطور المتحرك في تقنية كروموتوغرافيا السائل ذي الأداء العالي(HPLC):

استخدم محلول متكون من ٨٣ % KH_2PO_4 (٥٠ مليمول) ١٧% Acetonitrile كطور متحرك (Mobile Phase) في تقنية HPLC ، حيث أذيب وزن ٠.٦٨ غرام من KH_2PO_4 في ١٠٠ مل من الماء المقطر D.W وأخذ منه ٨٣ مل وأضيف إلى ١٧ مل من Acetonitrile ليصبح لدينا ١٠٠ مل من المحلول ثم يعدّل الأس الهيدروجيني (PH) باستخدام قطرات من محلول Arthophosphate إلى ٣ واستخدم مع الجهاز (الخالدي ، ٢٠٠٥) .

٣ - ١ - ٤ :الكواشف المستخدمة للمركبات القلويدية في المستخلصات الكحولية :

١ - كاشف ماير (Mayers Reagent) :

يستخدم في الكشف عن عموم القلويدات ويتم تحضيره بإذابة ١٣.٥ غم من كلوريد الزئبقيك $HgCl_2$ و ٥ غم من يوديد البوتاسيوم KI في لتر ماء مقطر. ثم يؤخذ منه (١ - ٢) سم^{٣} ويضاف الى ٥ سم^{٣} من المستخلص الكحولي لأوراق وجذور وبذور نبات الداتورة والكالس المستحدث منها في طور النشوء والنامي في طور التراكم ، فيظهر راسب أبيض الى أسمر (Harbone , ١٩٨٤ و المختار ، ١٩٩٤) ، ويفضل اضافة كمية قليلة من حامض الهيدروكلوريك المخفف الى الكاشف قبل الاستخدام (Antherden , ١٩٦٩) .

٢ - كاشف دراجندورف (Dragendorff Reagent) :

يستخدم في الكشف عن القلويدات البايروليدية كما ذكر من قبل المنصور ، ١٩٩٥ ، ويتركب من محلولين :

أ. اذابة ٢٠ غرام من نترات البزموث في ٨٠ سم^{٣} ماء مقطر .
ب. اذابة ١٦ غرام من يوديد البوتاسيوم في ٤٠ سم^{٣} ماء مقطر .

يمزج المحلولان في دورق زجاجي واحد ثم يؤخذ (١ - ٢) سم^{٣} منه ويضاف الى ٥ سم^{٣} من المستخلص الكحولي فيظهر لون برتقالي أو برتقالي محمر (المختار ، ١٩٩٤ و السلامي ، ١٩٩٨)

للدلالة على وجود المركبات القلويدية ، ويفضل اضافة كمية قليلة من حامض الهيدروكلوريك المخفف الى الكاشف قبل الاستخدام (Antherden , ١٩٦٩) .

٣ - ١ – ٥ : كواشف الرش فى تقنية كروموتوغرافيا الطبقة الرقيقة (T.L.C) :

١ . **كاشف دراجندورف :**

ويحضر من محلولين :

أ – اذابة ٠.٦ غرام من نترات البزموث في ٢ سم^{٣} من حامض الهيدروكلوريك المركز ، ويكمل الحجم الى ١٥ سم^{٣} بالماء المقطر .

ب – اذابة ١٠ غرام من يوديد البوتاسيوم في ١٠ سم^{٣} ماء مقطر .

ويخلط المحلولان في دورق واحد ، ويضاف اليهما ٧ سم^{٣} من حامض الهيدروكلوريك المركز و ١٥ سم^{٣} ماء مقطر ، ثم يكمل الحجم الى ٤٠٠ سم^{٣} بالماء المقطر ، ويرش على الصفائح الرقيقة ، ويعطي لون برتقالي الى بني دلالة على وجود المركبات القلويدية في المستخلص المستخدم في الترحيل (Harbone , ١٩٨٤ و السلامي ، ١٩٩٨) .

٢ . **كاشف ماركوس Marqus Reagent:**

يستخدم في كشف القلويدات البيروليدية والستروبدية (المنصور ، ١٩٩٥) ، ويحضر بخلط ١ سم^{٣} من الفورمالديهايد ٢% في ١٠ سم^{٣} من حامض الكبرتيك المركز ، ويستخدم مع صفائح T.L.C فيعطي لون أصفر الى أرجواني (Harbone , ١٩٨٤ والسلامي، ١٩٩٨) .

٣ - ٢ : طرائق العمل :

٣ - ٢ – ١ : اعداد بذور نباتات الداتورة وزراعتها :

جمعت بذور نباتات ألـ *D. metel* و ألـ *D.innoxia* من المشاتل في محافظة بابل ومن شواطئ نهر الفرات في قضاء الكوفة وتم تشخيص بذور نباتات النوعين في معشب كلية العلوم – جامعة الكوفة. زرعت ٢٥ بذرة جافة لكل نوع في سنادين بلاستيكية (١٥ × ٣٠ سم) مملوءة بتربة مؤلفة من البتموس والرمل بنسبة (١:١) (Demeyer و Dajaeger ، ١٩٨٧) وبواقع ٣سنادين لكل نوع بعد معاملة البذور بمادة الجبرلين GA_3 تركيز (*PPM* ٥٠٠) لمدة ٢٤ ساعة (محمد ، ١٩٨٣) لتحفيزها على الإنبات. ثم وضعت السنادين في درجة حرارة الغرفة ٣٠°م (الأنباري ، ١٩٩٩) وتم سقيها بمعدل رية واحدة في كل يومين ونبتت البذور بعد (٦- ٨) يوم ، وبمعدل (١٠ – ١٥) بادرة في كل سندانة خففت البادرات إلى (٢ – ٣) بادرة لكل سندانة بحسب نمو البادرات وزرعت البقية في تربة مماثلة في الحديقة .

٣ - ٢ – ٢ : اعداد الأوراق والجذور والبذور للاستخلاص الكحولي:

جمعت أوراق وجذور كل نوع على حدة بعد أن تركت النباتات تنمو لمدة ثلاثة أشهر إذ ذكر الملاح وأواب (٢٠٠١) بأن نباتات الداتورة تبدأ بالتزهير بعد مرور ٨٥ يوما من الزراعة وعقد الثمار يبدأ بعد مرور ١١٥ يوما من زراعة البذور. ثم استئصلت الأوراق ابتداء من الورقة الثالثة من قاعدة الساق وحتى الورقة تحت القمية في مرحلة تزهير النبات في الصباح الباكر وجففت في الظل في درجة حرارة الغرفة. ثم طحنت باستخدام المطحنة الكهربائية وجهزت للاستخلاص بالمذيبات العضوية (الايثانول ٨٠ %) وجمعت الجذور خلال فترة التزهير بعد قلع النباتات من التربة وتنظيفها من الأتربة والمواد العالقة بها أما البذور فقد تم جمعها في نهاية مرحلة الإثمار وأعدت للاستخلاص بنفس الخطوات السابقة .

٣ - ٢ – ٣ : تحضير مستخلصات المركبات القلويدية الخام :

اعتمدت طريقة Harborne (١٩٨٤) في استخلاص المركبات القلويدية من أوراق وجذور وبذور نباتات النوعين عن طريق الاستخلاص المستمر Contenous Extraction في جهاز السكسوليت Sexhelet Extractor لمدة ٢٤ ساعة باستخدام الكحول الأثيلي ٨٠ % وكما يأتي :

- أخذ ١٠ غرام من مسحوق المادة الجافة للجزء النباتي .
- مزج مع ٢٠٠ سم^{٣} كحول أثيلي ٨٠ % .
- استخلاص مستمر لمدة ٢٤ ساعة في جهاز السكسوليت .
- ركز المستخلص باستخدام المبخر الدوار وصولا للجفاف.
- أذيبت المادة الجافة في ٥ سم^{٣} من الكحول الأثيلي ٨٠ % .
- أضيف الى المحلول ٣٠ سم^{٣} من حامض الكبريتيك ٢ % .
- ركز المحلول الحامضي بالمبخر الدوار للتخلص من الكحول الأثيلي .
- اختبر المحلول الحامضي مع كاشف ماير ودراجندورف وكاشف ماركوس للتأكد من وجود المركبات القلويدية في المستخلص الحامضي .
- اضيف الى المحلول الحامضي كمية مناسبة من محلول هيدروكسيد الأمونيوم لرفع ألـ PH الى ٩.
- مزج المحلول القاعدي مع ١٠ سم^{٣} كلوروفورم في قمع الفصل .
- أخذت الطبقة السفلى (طبقة الكلوروفورم) الحاوية على القلويدات .
- أعيدت الخطوة الأخيرة ثلاث مرات .
- أضيفت كبريتات الصوديوم اللامائية الى المحلول لامتصاص الرطوبة.
- ركز المحلول بالمبخر الدوار للتخلص من الكلوروفورم .

مادة نباتية جافة

↓

مزج مع ٢٠٠ سم^{٣} كحول أثيلي ٨٠ %

↓

Sexhelet Extractor(٢٤ ساعة)

↓

ركز المستخلص الى ٥ سم^{٣} كحول أثيلي

٣ - ٢ – ٤ :فصل قلويدات الهيوسيامين والهيوسين من أوراق وجذور وبذور نباتات النوعين باستخدام تقنية كروموتوكرافيا الطبقة الرقيقة (TLC):

استخدم نظام المذيب ٢٥% NH_4OH , Water , Acetone بنسبة (٣ : ٧: ٩٠) كأفضل مذيب لفصل المركبات القلويدية من أوراق وجذور وبذور نباتات النوعين قيد الدراسة (الربيعي ، ١٩٩٩) استخدمت ألواح هلام السليكا الجاهزة Pre Coated (P.C) المجهزة من شركة E Merck Darmstade. الألمانية ، وبسمك ٠.٢٥ ملم ، وبأبعاد ٢٠ × ٢٠ سم أخذ ٢ سم^3 من المستخلص الحاوي على القلويدات الخام لكل جزء نباتي على حدة. وركز على هيأة نقاط (Spots) باستخدام أنابيب شعرية دقيقة وبأبعاد متساوية على مسافة ٢ سم من بداية طبقة الكروموتوغرافيا ، ثم وضعت الصفائح في الإناء الزجاجي الحاوي على المذيب وغطي بإحكام وبعد وصول المذيبات الى نهاية الورقة تقريبا نقلت الصفائح وتركت لتجف في جو المختبر ، ثم حددت مواقع وألوان البقع المفصولة بالعين المجردة ، ثم تحت الأشعة فوق البنفسجية UV ، بعدها رشت الصفائح بكواشف الرش دركندوف وماركوس ، ثم حددت ألوان البقع المفصولة ، وحسبت قيم الجريان النسبي R_f (Relative Flow) . (Harbone , ١٩٨٤) على وفق المعادلة الاتية :

$$\text{قيمة الجريان النسبي} = \frac{\text{المسافة التي قطعها المركب (البقعة)}}{\text{المسافة التي قطعها المذيب}}$$

٣ - ٢ – ٥ : التقدير النوعي للمركبات القلويدية في المستخلصات الكحولية الخام باستخدام المطياف الضوئي :

٣ - ٢– ٥ : محاليل المركبات القياسية :-

استخدمت كبريتات التروبين Atropine Sulphate (الهيوسيامين) وكبريتات الهيوسين Sulphate Hyoscine الموجودة في أوراق وجذور وبذور النوعين والكالس المستحث من الأوراق في طور النشوء ، والكالس النامي في طور التراكم باستخدام جهاز المطياف الضوئي لغرض اثبات وجود قلويدات الاتروبين فيها ، إذ أذيب ٠.٥ ملغم من سلفات الاتروبين في ١ سم^3 من الكحول الأثيلي المطلق لنحصل على محلول ذي تركيز ٥٠٠ مايكروغرام / سم^3 من الاتروبين ومنه تم تحضير التراكيز(١٠ ,٢٠ ,٣٠ ,٤٠ ,٥٠) مايكروغرام / سم^3 . أما بخصوص الهيوسين فقد أذيب ١٠ ملغم من سلفات الهيوسين في ١٠ مل الكحول الأثيلي المطلق لنحصل على محلول تركيزه ١ ملغم / سم^3 هيوسين ومنه تم تحضير التراكيز (٠.٢ ، ٠.٤ ، ٠.٦ ، ٠.٨ ، ١) مايكروغرام (Wagner وجماعته ، ١٩٨٤).

٣ –٢ – ٦ : تقدير المحتوى الكلي للمركبات القلويدية في المستخلص الكحولي :

اعتمدت طريقة British Pharma-Copiea (١٩٦٨) في تقدير المحتوى الكلي للمركبات القلويدية في أوراق وجذور وبذور نباتات النوعين وحسب طريقة (١٩٨٨) Toshihiro في تقدير المركبات القلويدية في أنسجة الكالس المستحدث من أوراق النوعين قيد الدراسة في طور النشوء وكذلك الكالس النامي في أطوار التراكم وضع المستخلص الحامضي المحضر في الخطوات (٣-٢-٣) و (٣-٢-١٠) في قمع الفصل (Sefaratory Funnel) وأضيف إليه محلول هيدروكسيد الأمونيوم NH_4OH ٥% ليتحول الى محلول قاعدي ، واستخلص ثلاث مرات مع ٥٠ سم^3 كلوروفورم ثم أضيف اليه ٥ سم^3 من حامض الكبريتيك ٢ % وسخن المحلول لازالة الكلوروفورم ثم تسحح الزيادة من الحامض مع هيدروكسيد الصوديوم NaOH (٢ عياري) مع استخدام محلول المثيل الأحمر كدليل Indicator ، إذ تضاف قطرات من هيدروكسيد الصوديوم الى المحلول الحامضي الى نقطة التعادل واختفاء اللون الأحمر ان حامض الكبريتيك يكافئ ٠.٠١٤٤٤ غرام من القلويدات المحسوبة كهيوسيامين في أوراق وجذور وبذور نباتات النوعين ويكافئ حامض الكبريتيك ما مقداره ٠.٠٠٥٧٨٧٩ كهيوسيامين في الكالس المستحث في طور النشوء وجميع أطوار التراكم.

٣ - ٢ – ٧ : التقدير النوعي للمركبات القلويدية في المستخلص الكحولي الخام:

استخدمت الطرق اللونية لتقدير قلويدات الهيوسيامين والهيوسين في الأجزاء المدروسة في نوعي الداتورة وقرئت على أطوال موجية تراوحت بين ٢٠٠ – ١١٠٠ نانوميتر باستخدام مطياف الأشعة

فوق البنفسجية المرئية وحددت الأطوال الموجية وقيم الامتصاص للقلويدات في الأجزاء النباتية المدروسة والكالس على انفراد ، وقورنت النتائج مع المحاليل القياسية لسلفات الاتروبين والهيوسين .

٣ – ٢ – ٨ : قياس درجة الانصهار :

الاختبارات العالمية لتشخيص المركبات القلويدية هي درجة الانصهار أو التمييع ودرجة الامتصاص وقياس معدل مسافة الجريان ، وذكر(Dale , ١٩٩٦) بأن الاتروبين ذو درجة تميع تتراوح بين ١١٥ – ١١٨ْم ، وذو ذائبية في الكلوروفورم بنسبة ١ : ١ في حين ان درجة التميع لسلفات الاتروبين هي ١٩١ – ١٩٦ ْم ، وغير ذائب في الايثر والكلوروفورم تم تقدير درجة التميع لقلويدات الهيوسيامين والهيوسين في المستخلصات الكحولية الخام للأجزاء النباتية المدروسة ومستخلصات الكالس المستحث في طور النشوء والكالس النامي في أطوار التراكم باستخدام جهاز تقدير درجة الانصهار ٩٣٠٠ , Electrothermal Molting Point)
(, حيث وضع وزن ١-٢ ملغم من المادة الجافة لكل عينة نباتية في الجهاز أعلاه وسلطت عليها درجات حرارية بمقدار ٢ ْم لكل دقيقة صعودا وسجلت الدرجة الحرارية التي بها بدأت المادة بالانصهار ثم الدرجة الحرارية لانصهار المادة بالكامل و قورنت بدرجة انصهار المادة القياسية .

٣ - ٢ – ٩ . إنشاء الزروعات النسيجية :

٣- ٢ - ٩ - ١ : إعداد الجزء النباتي Explant :

جمعت أوراق النوعين في الصباح الباكر وخلال فترة التزهير لغرض استحثاث (Induction) أنسجة الكالس منها ابتداء من الورقة الثالثة من قاعدة الساق وحتى الأوراق تحت القمة واستؤصلت الأوراق باستخدام المشارط المعقمة ثم جرى غسلها بالماء الجاري ، وأعدت للزراعة النسيجية في الوسط الغذائي الخاص باستحداث أنسجة الكالس .

٣- ٢ - ٩ - ٢ : تحضير الوسط الغذائي :

استخدم الوسط الغذائي المعروف MS (Murashiqe و Skoog، ١٩٦٢) والمبينة مكوناته وتراكيزها في الجدول (٢) ولغرض تحضير الوسط الغذائي أعلاه أضيفت العناصر الغذائية الكبرى والصغرى بنسب محددة وحضرت محاليل أساسية لها في قناني زجاجية منفردة (Reagent Bottles) و يتكون وسط إنشاء الزراعة من مجموعة من العناصر الغذائية الكبرى والصغرى ومصدر للحديد مضافا إليها مجموعة الفيتامينات وهي الثيامين Thiamine – HCL ، و النيكوتين Nicotinic Acid ، و الاينوسيتول Inositole ، و البايريدوكسين Pyridoxine كذلك الحامض الأميني الكلايسين Glycine والسكروز كمصدر للكاربوهيدرات ثم يضاف الاكار لتصلب الوسط الزرعي .

جدول (٢) مكونات وسط MS الغذائي

ت	المادة	التركيز ملغم / لتر
١	أملاح MS	قوة كاملة
٢	Thiamine – HCL	٠.١
٣	Pyridoxine - HCL	٠.٥
٤	Nicotinic acid	٠.٥
٥	Glycine	٢.٠
٦	Inositole	١٠٠
٧	Sucrose	٣٠٠٠٠
٨	Agar	٨٠٠٠

٣- ٢ - ٩ - ٣ : تعقيم الجزء النباتي :

عقمت الأجزاء النباتية (الأوراق) المعدة لاستحثاث أنسجة الكالس ولنباتات النوعين قبل زراعتها في الأوساط الغذائية المحددة إذ تم غسلها بالماء الجاري لإزالة الأتربة والمواد العالقة بها ثم وضعت في وعاء زجاجي سعة ٥٠٠ سم^{٣} وأضيف اليها الكحول الأثيلي بتركيز ٧٠ % مع التحريك المستمر لمدة نصف دقيقة ثم غسلت الأوراق بالماء المقطر ثلاث مرات وبعد ذلك استخدمت مادة هايبوكلورات الصوديوم NaOCl (Sodium Hybochlorite) بتركيز ٢ % لمدة نصف دقيقة مع اضافة مادة ٢٠ Tween كمادة ناشرة ، ثم غسلت الأوراق بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات لإزالة آثار المادة المعقمة ، وتم اجراء عملية الزراعة في ظروف معقمة باستخدام جهاز انسياب الهواء الطبقي (Laminar air flow) وبذلك أصبحت الأوراق جاهزة للزراعة على الوسط الغذائي المناسب لاستحثاث أنسجة الكالس .

٣- ٢ - ٩ - ٤ : استحثاث أنسجة الكالس :

استخدمت تقنية زراعة الأنسجة النباتية (Plant Tissue Culture) وفق نظام (Hirata وجماعته ، ١٩٩٠) لغرض استحثاث أنسجة الكالس من الأجزاء الورقية لنباتات النوعين وإعادة زراعة الكالس في أوساط غذائية جديدة لغرض تحفيز إنتاج وتراكم قلويدات الهيوسيامين والهيوسين في الأنسجة المستحثة وكما يأتي :

٣- ٢ - ٩ - ٤ - ١ : طور نشوء الكالس :

تم تقطيع الأوراق المعقمة ولكلا النوعين إلى أجزاء مساحتها ٢ سم^{٢} تقريبا وزرعت في الوسط الغذائي MS المشار إليه في الجدول (٢) في قناني زجاجية معقمة وبحجم ٢٠ سم^{٣} مضافا إليه منظم النمو ٢,٤–D (٢,٤-Dichlorophenoxy acetic acid) بتراكيز ١ ، ٢ ، ٣ ملغم / لتر وبواقع جزء نباتي واحد لكل قنينة زجاجية وبمعدل ١٢ مكرر لكل تركيز من ألـ ٢,٤-D لغرض تحديد الوسط الغذائي الأمثل لاستحداث أنسجة الكالس من أوراق النوعين مع الاخذ بنظر الاعتبار ان التقطيع والزراعة تجري في ظروف معقمة باستخدام منضدة انسياب الهواء الطبقي وباستعمال الأواني الزجاجية والملاقط

والمشارط المعقمة جيداً باستخدام جهاز ألموصدة (Autoclave) وحضنت الزروعات في الحاضنة على درجة حرارة ١ ± ٢٥ مْ وشدة إضاءة ١٠٠٠ لوكس لمدة ١٦ ساعة .

٣- ٢ - ٩ - ٤ - ٢ : تعيين الوزن الطري(غم)لأنسجة الكالس :

بعد مرور ١٥ يوما من زراعة الأجزاء الورقية لنباتات النوعين في وسط (MS) تكون كالس في قواعد الأجزاء الورقية الذي يميل لونه الى الأخضر الفاتح في نبات *D.innoxia* لاحتوائه على أكبر عدد من الكلوروبلاست (Dale ، ١٩٩٦) والى البني الغامق في نبات *D.metel* وبعد مرور ٤٥ يوما اكتمل تكون أنسجة الكالس الذي يعد وزنه الطري(غم) مؤشراً على حيوية الكالس في وسط النمو ويتم اعتماده في اختيار الوسط الغذائي الأمثل في استحثاث أنسجة الكالس تم حساب الوزن الطري لأنسجة الكالس المستحث من أوراق نباتات النوعين ولكافة تراكيز ٢,٤–D المستخدم في المعاملات ، إذ استخرج الكالس من الأنابيب الزجاجية وعين وزنه الطري باستخدام الميزان الكهربائي الحساس بعد إزالة بقايا الوسط الغذائي العالقة به لمنع تداخلها مع الوزن الطري .

٣- ٢ - ٩ - ٤ - ٣ : تعيين الوزن الجاف (ملغم) لأنسجة الكالس :

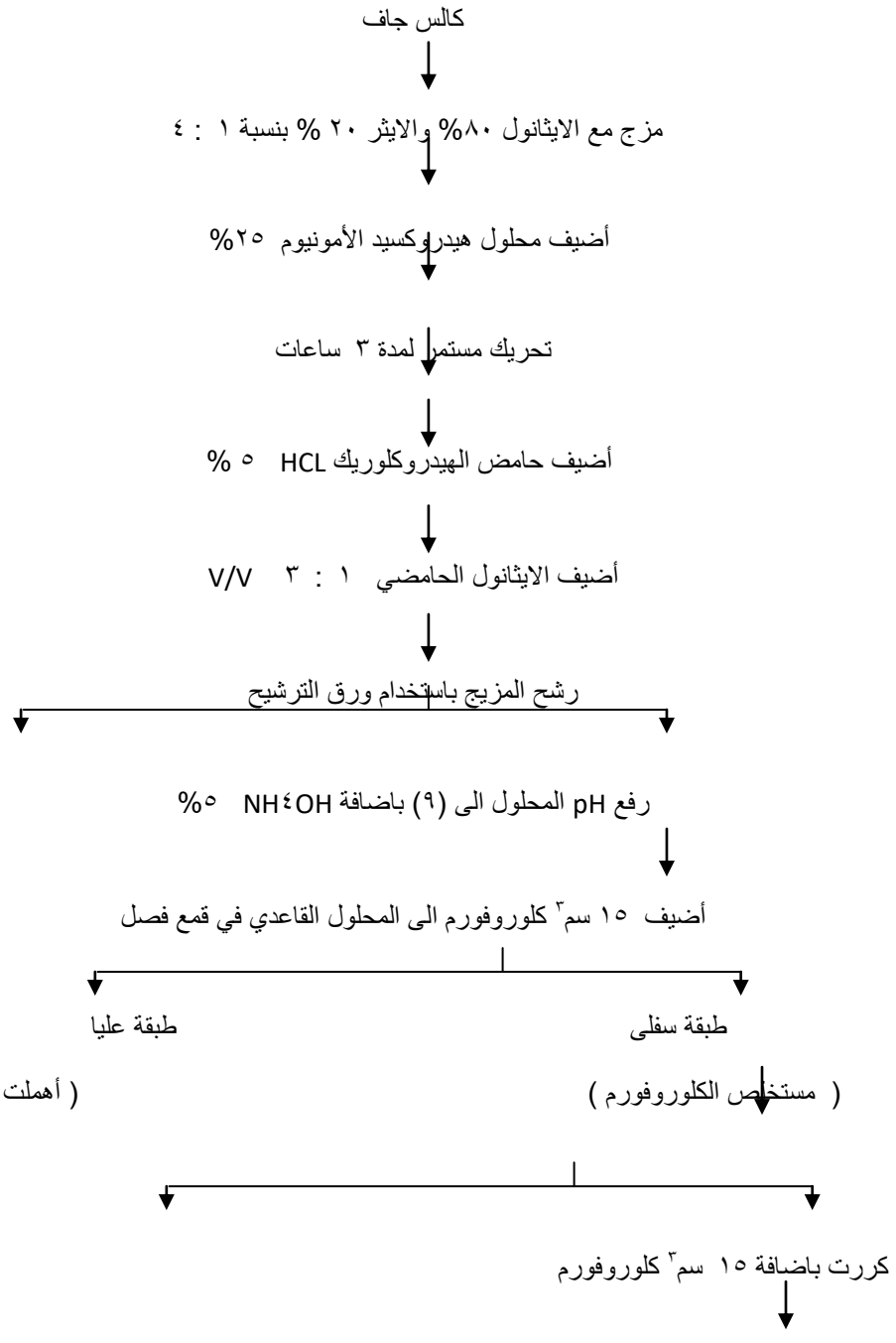
أخذ الكالس الذي عين وزنه الطري في الفقرة السابقة ووضع في أطباق بتري الزجاجية وبواقع طبقين يحوي كل منهما على ٦ قطع من نسيج الكالس ولكل تركيز من ألـ ٢,٤–D المستخدم ، ووضعت الأطباق الزجاجية في فرن كهربائي على درجة حرارة ٦٠مْ لمدة ٤٨ ساعة ثم استخرج وتم حساب وزنه الجاف.

٣- ٢ - ١٠ : استخلاص القلويدات من أنسجة الكالس :

تم استخلاص المركبات القلويدية من أنسجة الكالس النامي في طور النشوء والكالس النامي في طور التراكم ولكلا النوعين وفق ما ذكره Al-Hattab وجماعته (٢٠٠٠) وكما يأتي :

- أخذ وزن محدد من الكالس الجاف .
- سحق جيدا في هاون خزفي .
- خلط مع مزيج من الايثانول ٨٠ % والايثر ٢٠% بنسبة ١ : ٤ (V/V) .
- أضيف محلول هيدروكسيد الأمونيوم NH_4OH ٢٥ % ثم وضع على جهاز الهزاز Shaker لمدة ثلاثة ساعات .
- اضيف الى المحلول القاعدي كمية من HCL ٥ % .
- مزج المستخلص مع ايثانول حامضي ١ : ٣ (V/V).
- رشح المزيج باستخدام ورق الترشيح Whattman No.١ .
- رفع pH المحلول الى ٩ باضافة كمية من هيدروكسيد الأمونيوم ٥% .

- استخلص المحلول القاعدي مع الكلوروفورم ثلاث مرات وأخذت الطبقة السفلى الذائبة فيها القلويدات في كل مرة .
- أضيفت كبريتات الصوديوم اللامائية لامتصاص الرطوبة .
- ركز المحلول باستخدام المبخر الدوار .



٤ - ٤ - ٥ : فصل قلويدات الهيوسيامين والهيوسين في المستخلص الكحولي لأنسجة الكالس باستخدام تقنية كروموتوكرافيا الطبقة الرقيقة TLC :

٣- ٢ - ١١ : فصل القلويدات من المستخلص الكحولي لأنسجة الكالس باستخدام تقنية كروموتوكرافيا الطبقة الرقيقة TLC :

استخدم نظام المذيب المتكون من الكلوروفورم – الكحول الأثيلي – الأمونيا ٢٥% : ($CHCL_3$: C_2H_5OH : NH_4OH ٢٥٪) بنسبة (١ : ١٤ : ٨٥) حسب (Kitamura وجماعته ، ١٩٩٢) واتباع نفس الخطوات الموصوفة في الفقرة (٣ -٢-٤) في عملية الكشف النوعي عن المركبات القلويدية في المستخلص الكحولي لأنسجة الكالس المستحث من أوراق نوعي الداتورة في طور النشوء باستخدام ألـ 2,٤-D تركيز ٢ ملغم / لتر وكذلك الكالس النامي في وسط التراكم بوجود ألـ BA تركيز ٢ ملغم / لتر بعد وصول المذيبات خلال طبقة هلام السليكا عموديا Ascending لغاية ٢ سم من الحافة العلوية للوح هلام السليكا ، تم تحديد ارتفاع المذيب وتركت الألواح لتجف في درجة حرارة الغرفة ، ثم استخدام كاشف الرش Dragendorffes الحضر حسب طريقة Wagnar وجماعته (١٩٨٤) وجد ظهور بقع برتقالية اللون يتم قياس معدل الجريان النسبي للبقع المفصولة (تمثل المسافة التي يقطعها المركب مقسومة على المسافة التي يقطعها المذيب على صفائح هلام السليكا) .

٣- ٢ - ١٢ :التقدير النوعي للقلويدات في المستخلص الكحولي لأنسجة الكالس النامي في الأوساط الغذائية الملحية :

استخدم مطياف الأشعة فوق البنفسجية –المرئية لتقدير قلويدات الهيوسيامين والهيوسين في أنسجة الكالس المستحث من أوراق نوعي الداتورة النامي في الأوساط الغذائية الملحية (طور التراكم) أذيبت العينات الجافة في ٥ سم^3 من الكحول الأثيلي ٨٠% وتم قياسها على طول موجي تراوح بين ٢٠٠- ٤٠٠ نانوميتر ثم حددت الأطوال الموجية وقيم الامتصاص للمركبات القلويدية وكانت النتائج مع الاطوال الموجية وقيم الامتصاص للمحاليل القياسية لسلفات الاتروبين والهيوسين .

٣- ٢ - ١٣ : طور التراكم :

٣- ٢ - ١٣ - ١ : منظم النمو (البنزيل أدنين BA) :

بعد مرور فترة ٦ أسابيع من زراعة الأجزاء الورقية لنباتات النوعين ثم اختيار الكالس النامي في وسط MS الحاوي على منظم النمو ألـ 2,٤-D تركيز ٢ ملغم /لتر كونه يمثل أفضل تركيز لاستحداث أنسجة الكالس من حيث الوزن الطري والجاف وتم استئصاله من تلك الأجزاء في ظروف معقمة باستخدام جهاز تعقيم الهواء الطبقي ومشارط معقمة جيدا ، وقطع إلى أجزاء بحدود ١ غرام لكل قطعة من الكالس وأعيدت زراعته مرة ثانية في وسط MS المضاف إليه منظم النمو ألـ BA بالتراكيز (١ ، ٢ ، ٣ ملغم / لتر) لدراسة تأثيره في تحفيز الإنتاج والتراكم لقلويدات الهيوسيامين والهيوسين في

أنسجة الكالس زرع الكالس بواقع ١٢ مكرر لكل تركيز من ألـ BA المستخدم وتمت مراعاة عملية تقطيع الكالس ووزنه استخدام المشارط والملاقط وأطباق بتري المعقمة في جهاز ألموصدة (Autoclave) على درجة حرارة ١٢١ ْم وضغط قدره ١.٠٤ كغم / سم٢ لمدة ٢٠ دقيقة واستخدام جهاز الميزان الحساس المعقم جيدا بالكحول الأثيلي المطلق وحضنت الزروعات في الحاضنة على ١ ± ٢٥ ْم وظروف إضاءة قدرها ١٠٠٠ لوكس لمدة ١٦ ساعة .

٣ - ٢ -١٣- ٢ : تعيين الوزن الطري (غم) لأنسجة الكالس :

عين الوزن الطري لأنسجة الكالس ولكافة تراكيز ألـ BA المضاف إلى الوسط الغذائي لنمو الكالس المشار إليه في خطوة العمل السابقة لمعرفة تأثير BA في حيوية الكالس النامي في وسط النمو .

اتبعت نفس الخطوات في الفقرة (٣-٢-٩-٤-٢) في قياس الوزن الطري من حيث خطوات تعيين الوزن الطري .

٣ - ٢ -١٣- ٣ : تعيين الوزن الجاف (ملغم) لأنسجة الكالس :

اتبعت نفس خطوات العمل الموصوفة في الفقرة (٣-٢-٩-٤-٣)في تعيين الوزن الجاف لأنسجة الكالس الذي حسب وزنه الطري في الفقرة السابقة واعتمد كمؤشر على حيوية أنسجة الكالس في وسط النمو الحاوي على ألـ BA .

٣ - ٢ - ١٤ : فصل القلويدات من المستخلص الكحولي لأنسجة الكالس باستخدام تقنية TLC :

استخدم نظام المذيب الموصوف في الفقرة (٣-٢-١١)في عملية فصل قلويدات الهيوسيامين والهيوسين من أنسجة الكالس المستحدث من أوراق نوعي الداتورة والنامي في وسط MS المجهز بمنظم النمو BA تركيز (١ ، ٢ ، ٣ ملغم / لتر) وألـ D – ٢,٤ تركيز ٢ ملغم / لتر وباستخدام صفائح هلام السليكا التي سبق ذكرها وبنفس خطوات العمل الموصوفة في الفقرة (٣-٢-٤) ثم حددت مواقع وألوان البقع المفصولة وحددت قيم التحرك النسبي R_f للمركبات المفصولة وقورنت بقيم R_f للمحاليل القياسية .

٣ – ٢ - ١٥ : التقدير النوعي للمركبات القلويدية في أنسجة الكالس باستخدام المطياف الضوئي :

رحلت المستخلصات الكحولية الخام للكالس النامي في طور التراكم باستخدام منظم النمو ألـ BA ولكافة التراكيز المستخدمة على طول موجي بين ٢٠٠ – ٤٠٠ نانوميتر ، وحددت الأطوال الموجية وقيم الامتصاص للمركبات المفصولة وقورنت بالأطوال الموجية وقيم الامتصاص للمحاليل القياسية .

٣ - ٢ - ١٦ : الأوساط الغذائية الملحيـة :

٣ - ٢ – ١٦- ١ : تحضير المحلول الملحي :

من خلال الدراسات وجد بأن ملح كلوريد الصوديوم NaCl هو أكثر الأملاح انتشارا في التربة العراقية (الزبيدي ، ١٩٧٥) ، وقد حضر محلول ملحي لكلوريد الصوديوم باذابة ٣ غرام من NaCL النقي في ٥٠ سم٣ ماء مقطر (١٩٦٢,Buringh) واستخدم في تحضير أوساط غذائية ذات مستويات مختلفة من الملوحة لغرض دراسة تأثير الشد الملحي في انتاج وتراكم المركبات القلويدية في الكالس المستحدث من الأجزاء الورقية لنوعي الداتورة .

٣ - ٢ - ١٦– ٢ : تحضير الوسط الغذائي الملحي :

استخدم لهذا الغرض الوسط الغذائي MS مضافا اليه منظمات النمو النباتية التي تشملD–٢,٤ تركيز ٢ ملغم / لتر كونه يمثل أفضل تركيز مستخدم في استحثاث أنسجة الكالس من أوراق نباتات *D. metel* و ألـ *D.innoxia* من حيث كميته ، والبنزل أدنين BA تركيز ٢ ملغم /لتر في تحفيز إنتاج وتراكم المركبات القلويدية في خلايا أنسجة الكالس أما التوصيل الكهربائي للوسط Electric (EC) Conductivity فقد تم قياسه بجهاز قياس التوصيل الكهربائي Ec-Meter وتم تعديله باضافة قطرات من محلول التمليح المحضر في الفقرة السابقة وبذلك حضرت أوساط غذائية ذات ملوحة (٣ ، ٦ ، ٩، ١٢ ، ١٥) ديسيسمنز / م وبعدها عدل الأس الهيدروجيني PH الى ٥.٨ بواسطة هيدروكسيد الصوديوم أو حامض الهيدروكلوريك واحد عياري قبل اضافة الأكار (Agar) ومن الجدير بالذكر ان هذه الأوساط تحتوي على المستوى الكامل من الأملاح اللاعضوية الموجودة في وسط MS باستثناء الوسط ٣ ديسيسمنز/ متر ، إذ يحتوي على نصف الكمية من هذه ألأملاح .

٣ - ٢ - ١٦– ٣ : زراعة الكالس في الأوساط الغذائية الملحية :

أخذ وزن ١ غرام من الكالس المستحدث في طور النشوء لكل نبات على حدة وتم زراعته في أوساط غذائية ملحية بالتراكيز (٣ , ٦ , ٩ , ١٢ , ١٥) ديسيسمنز/ متر مضافا اليها ألـ D–٢,٤ تركيز ٢ ملغم / لتر و BA البنزل أدنين تركيز ٢ ملغم / لتر كونها تمثل النسبة المتوازنة من منظمات النمو في استحثاث أنسجة الكالس وتحفيز إنتاج قلويدات الهيوسيامين والهيوسين وتم زراعة ١٢ مكرر لكل نبات ولكل تركيز ملحي مستخدم في التجربة وبواقع ٦٠ مكرر لكل نبات وتمت الزراعة بظروف معقمة وتم تعيين الوزن الطري والجاف لانسجة الكالس النامية بعد ٦ اسابيع من الزراعة .

٣ - ٢ – ١٧ : الدرجات الحرارية المنخفضة :

تعد درجة الحرارة من أهم العوامل الرئيسة التي تؤثر في نمو وإنتاج مركبات الأيض الثانوي من قبل النبات الأصل وكذلك خلايا الكالس المستحثة منها إن الدراسات حول تأثير الدرجات الحرارية المنخفضة في إنتاج وتراكم القلويدات الرئيسة فيها في نباتات العائلة الباذنجانية ومنها الداتورة تكاد تكون معدومة ، ولأجل تحقيق هذا الهدف أخذ وزن ١ غرام من الكالس المستحث في طور النشوء من أوراق نوعي الداتورة في وسط MS المجهز بألـ D–٢,٤ تركيز ٢ ملغم / لتر وألـ BA تركيز ٢ ملغم / لتر ، وتمت مراعاة نفس الظروف من حيث التعقيم ووزن الكالس وزراعته في الأوساط الغذائية حضنت الزروعات على درجات حرارية قدرها (١±٥ ،١٠±١٠)ْم وبمعدل ١٢ مكرر لكل درجة حرارية لمدة ٦ أسابيع في ظروف إضاءة قدرها ١٠٠٠ لوكس لمدة ١٦ ساعة وتم تحديد الوزن الطري والجاف لانسجة الكالس النامية .

٣ - ٢ – ١٧ - ١ : فصل المركبات القلويدية في المستخلص الكحولي لأنسجة الكالس النامي في الأوساط الملحية باستخدام تقنية TLC :

استخدم نظام المذيب نفسه في الفقرة (٣-٢-١١) بنفس خطوات العمل السابقة الذكر في فصل قلويدات الهيوسيامين والهيوسين في أنسجة الكالس النامي في الأوساط الغذائية الملحية باستخدام صفائح هلام السليكا وبنفس المواصفات أعلاه ثم حددت مواقع وألوان البقع المفصولة وحددت قيم التحرك النسبي R_f للمركبات المفصولة وقورنت بقيم R_f للمحاليل القياسية .

٣ – ٢ - ١٧– ٢ : التقدير النوعي للقلويدات في مستخلص الكالس النامي في الأوساط الملحية باستخدام المطياف الضوئي :

اتبعت خطوات العمل الموصوفة في الفقرة (٣-٢-١٥) في التقدير النوعي ، ورحلت المستخلصات الكحولية لأنسجة الكالس على طول موجي بين ٢٠٠-٤٠٠ نانوميتر وحددت الأطوال الموجية وقيم الامتصاص للمركبات المفصولة وقورنت بالأطوال الموجية وقيم الامتصاص للمحاليل القياسية .

٣ – ٢ - ١٧– ٣ :التقدير الكمي للقلويدات في أنسجة الكالس باستخدام جهاز HPLC

استخدمت تقنية HPLC في التقدير الكمي لقلويدات الهيوسيامين والهيوسين في أنسجة الكالس باستخدام محلول مكون من KH_2PO_4 (٥٠ مليمول) (٨٣ %) و ألـ Acetonitrile %) (١٧ الذي يمثل الطور المتحرك وعدل الأس الهيدروجيني للمحلول الى($pH_{=3}$) بواسطة ألـ Arthophosphate وكان الطور الثابت Statinary Phase عبارة عن عمود نوع ODS – DB (٢٥ × ٠.٤) سم وتم حقن ٢٠ مايكروليتر من مستخلص الأوراق والجذور والبذور وكذلك مستخلصات الكالس المستحثة من أوراق نوعي الداتورة ومستخلصات الكالس النامي في طور التراكم بوجود ألـ BA

والنامي في التراكيز الملحية وكذلك في الدرجات الحرارية المنخفضة (١±٥ , ١ ± ١٠) وقرئت على طول موجي قدره ٢٥٤ نانوميتر تم تحديد زمن الاحتجاز Retention Time للقلويدات أعلاه في العينات المدروسة ومقارنته بزمن احتجاز المحاليل القياسية ثم حساب تركيز قلويدات الهيوسين والهيوسيامين وفق المعادلة الآتية :

$$\frac{\text{Standard Concentration}}{\text{Unknown Concentration}} = \frac{\text{Area of Standard}}{\text{Area of Unknown}}$$

٣ - ٢ – ١٨ : التحليل الإحصائي Statistical Analyisis :

استخدمت في هذه الدراسة مجموعتين من التجارب :

الأولى : أجريت وفق التجارب العاملية في تصميم القطاعات العشوائية الكاملة بعاملين الأول : نوع النبات والثاني تتضمن المعاملات ، وكان عدد المشاهدات ١٢ مكرر لكل معاملة واختبرت المتوسطات وفق أقل فرق معنوي وعلى مستوى احتمال ٥% .

الثانية : أجريت وفق التصميم العشوائي الكامل في ١٢ مشاهدة لكل عامل واختبرت المتوسطات في أقل فرق معنوي على مستوى احتمال ٥% كما تم اختبار المتوسط العام لمادتي (الهيوسين والهيوسيامين) وفق اختبار T للترجيح في أفضلية إنتاج المادتين بالنسبة للعينات المدروسة .